

Fraunhofer Gesellschaft,
Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik,
Abteilung Gentechnologie in Hannover

Identifizierung und Charakterisierung von Modulatoren der Interferon- γ -Antwort

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover,
zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

DOCTOR RERUM NATURALIUM

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Biochem. Andreas Busche
geb. 30.04.1974 in Höxter

2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Juni 2003 in der Fraunhofer Gesellschaft am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in der Abteilung Gentechnologie in Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Otto angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Bernd Otto

Koreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 09.07.2003

Datum der Veröffentlichung: August 2003

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Andreas Busche, geboren am 30.04.1974 in Höxter, an Eides statt, dass ich die im Fachbereich Chemie an der Universität Hannover eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Identifizierung und Charakterisierung
von Modulatoren
der Interferon- γ -Antwort**

am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, IGB in der Abteilung Gentechnologie in Hannover unter der Anleitung von Prof. Dr. B. Otto ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung der Promotion eingereicht, noch wurde diese oder andere Arbeiten als Dissertation vorgelegt.

Hannover, den 04.Juni 2003

Zusammenfassung

Interferon- γ steht mit einer Vielzahl von inflammatorischen Erkrankungen in Zusammenhang. Gleichzeitig sind Interferone in verschiedenen viralen und onkologischen Indikationen wichtige Therapeutika. Zur Identifizierung von Modulatoren der IFN γ -Antwort wurde der Einfluss von kleinen organischen Verbindungen auf die IFN-vermittelte antivirale Aktivität detektiert. Dieses Testsystem hat sich bei der Analyse von über 1.000 Proben bewährt.

Bei der Charakterisierung der aktiven Proben zeigten sich neben der Inhibition der IFN γ -Signaltransduktion auch IFN γ -unabhängige zelluläre Wirkungen. Für die Substanz Cosmomycin B wurde eine starke Induktion des *CMV*-Promotors ermittelt. Durch ein neues Testprinzip, welches auf einer IFN γ -induzierten Repression der konstitutiv exprimierten Luciferase basiert, konnte dabei zwischen unspezifischer und IFN γ -spezifischer Inhibition unterschieden werden.

Für die im Screening gefundenen antiviralen Substanzen wurde keine Induktion eines IFN γ -Signals detektiert. Ein *Rheum palmatum*-Rohextrakt zeigte entgegengerichtete Effekte. Einerseits hatte dieses Extrakt eine antivirale Wirkung, andererseits wurde die IFN γ -vermittelte Stat1-Aktivierung unterbunden. In niedrigeren Konzentrationen zeigte sich zudem eine GAS-Induktion. Zur Klärung dieser Aktivitäten wurden die aufgetrennten Reinsubstanzen auf ihre Spezifität untersucht. So inhibierte das Stilbenderivat Rhapontigenin in höheren Konzentrationen mit einer IC₅₀ um 100 μ M die GAS-Induktion durch IFN γ und steigerte in niedrigeren Konzentrationen um 10 μ M die GAS-gesteuerte Luciferase-Expression. Eine antivirale Aktivität wurde durch das Anthrachinonderivat Emodin vermittelt.

Die Genprodukte IFN β , Pias1 und Socs1 haben bei inflammatorischen Erkrankungen eine dem IFN γ entgegengerichtete Wirkung. Als eine zusätzlich Erweiterung zum Primärscreen wurden diverse Reportersysteme entwickelt. Neben dem gut charakterisierten *ifn β* -Promotor wurden der humane *pias1*- und der *socs1*-Promotor vor eine Luciferase als Reporter gen kloniert und auf ihr Induktionsverhalten untersucht. Beim *pias1*-Promotorkonstrukt wurde im Gegensatz zum *socs1*-Konstrukt dabei an Stelle einer Induktion durch IFN eine Verringerung der Luciferase-Expression festgestellt. Die beiden Reportersysteme bilden damit zwei unterschiedliche neue Ansätze beim Screening auf Inhibitoren der IFN γ -Antwort.

Stichworte:

Interferon, Inhibitor, Screening

Abstract

There is a correlation between interferon- γ and exacerbations in a variety of inflammatory diseases. But interferons are also important therapeutics in viral and oncological diseases as well. To identify modulators of the IFN γ -response the effect of small organic compounds on the IFN-mediated antiviral activity was tested. This assay was used to analyze more than 1.000 samples.

Further characterizing the active samples, IFN γ independent cellular effects were found next to the inhibition of the IFN γ signal transduction. Cosmomycin B for example potently induced the *CMV*-promotor. A new assay system, based on an IFN γ -induced repression of a constitutively expressed luciferase, made it possible to discriminate unspecific from IFN γ -specific inhibition.

The samples exhibiting an antiviral activity in the primary assay did not induce an IFN-like signal. A *rheum palmatum* crude extract showed contradictory effects. On the one hand there was an antiviral activity and on the other hand an inhibition of the IFN γ -mediated Stat1-activation. Lower concentrations of this medical plant extract mediated a GAS-inducing effect. This extract was separated and the pure substances tested for their specificity. As one constituent the stilbene derivative rhapontigenin inhibited the GAS-induction at a higher concentration with an IC₅₀ of about 100 μ M and stimulated the GAS-promoted luciferase expression at lower concentrations of about 10 μ M. The antiviral activity of this extract was ascribed to the anthrachinone derivative emodine.

The gene products IFN β , Pias1 and Socs1 mediate an inhibition of IFN γ -induced effects in inflammatory diseases. Therefore in addition to the primary screening several reporter systems have been developed. Next to the well-characterized *ifn β* -promotor the human *pias1*- and the *socs1*-promotor have been cloned to control luciferase-expression and their inducibility has subsequently been studied. In contrast to the *socs1*-promotor the *pias1*-promotor-construct did not show an induction by IFN but a reduction of luciferase activity. Thus both reporter systems can be used as two different new approaches to identify inhibitors of the IFN γ -response.

Keywords:

Interferon, Inhibitor, Screening

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 INTERFERONE	1
1.2 INTERFERON- γ	6
1.3 INDUKTION DER INTERFERON-SYNTHESE	8
1.4 INTERFERON- γ -SIGNALTRANSDUKTION	11
1.5 ABSCHALTMECHANISMEN DES IFN γ -VERMITTELTEN SIGNALS	15
1.6 ASSOZIATION VON IFN γ MIT INFLAMMATORISCHEN ERKRANKUNGEN	24
1.7 SCREENINGSTRATEGIEN	26
1.7.1 <i>Testsystem</i>	26
1.7.1.1 Primärassay	26
1.7.1.2 Testsubstanzen	26
1.7.1.3 Mögliche Targets.....	27
1.7.2 <i>Reporter-Systeme</i>	28
1.7.3 <i>Zielsetzung</i>	29
2 MATERIAL UND METHODEN.....	30
2.1 MATERIAL	30
2.1.1 <i>Verwendete Geräte</i>	30
2.1.2 <i>Allgemein verwendete Materialien und Reagenzien</i>	30
2.1.3 <i>Programme</i>	31
2.1.4 <i>Zelllinien</i>	31
2.1.5 <i>Viren</i>	32
2.1.6 <i>Bakterienstämme</i>	33
2.1.7 <i>Vektoren</i>	34
2.1.8 <i>Puffer und Lösung</i>	36
2.2 METHODEN	39
2.2.1 <i>Antiviraler Assay</i>	39
2.2.2 <i>Modifizierter Antiviraler Assay (Screening-Primärassay)</i>	40
2.2.3 <i>Extraktion von Medizinalpflanzen</i>	42
2.2.4 <i>Dünnschichtchromatographie</i>	43
2.2.5 <i>Gesamtzelllysate</i>	44
2.2.6 <i>Zellfraktionierung</i>	44
2.2.7 <i>SDS-PAGE</i>	45
2.2.8 <i>Western-Blot</i>	46
2.2.8.1 <i>Immunfärbung</i>	46
2.2.9 <i>Antiproliferativer Assay</i>	47
2.2.9.1 <i>MTT-Reduktionstest</i>	48
2.2.10 <i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	48
2.2.11 <i>TOPO-Klonierung (Invitrogen)</i>	49
2.2.12 <i>Kolonie-PCR</i>	49
2.2.13 <i>Herstellung transformationskompetenter Zellen</i>	50
2.2.14 <i>Transformation von E.coli -Zellen</i>	50
2.2.15 <i>DNA-Sequenzierung</i>	51
2.2.16 <i>PCR</i>	52
2.2.17 <i>Transfektion</i>	55
2.2.18 <i>Selektion stabiler Klone</i>	56
2.2.19 <i>β-Galaktosidase-Assay</i>	56
2.2.20 <i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	57
2.2.21 <i>Luciferase-Assay</i>	58

3	ERGEBNISSE	60
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER ASSAYS	60
3.2	BEKANNTE KINASE-INHIBITOREN IM VERGLEICH.....	64
3.3	ZUSAMMENFASSUNG DES SCREENINGS.....	77
3.3.1	<i>Substanzen aus dem „Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie“</i>	<i>77</i>
3.3.2	<i>Screening mit Peptidfraktionen.....</i>	<i>78</i>
3.3.3	<i>Screening mit Medizinalpflanzen</i>	<i>79</i>
3.4	RHEUM PALMATUM-EXTRAKT.....	80
3.5	CHARAKTERISIERUNG DER PUTATIVEN IFN γ -INHIBITOREN	93
3.6	CHARAKTERISIERUNG ANTIVIRALER AKTIVITÄTEN.....	103
3.7	REPORTERKONSTRUKTE	106
3.7.1	<i>Klonierung der huifnβ-Promotor-Reporterkonstrukte.....</i>	<i>106</i>
3.7.2	<i>Klonierung des humanen pias1-Promotor-Luciferasekonstrukts.....</i>	<i>110</i>
3.7.3	<i>Klonierung des humanen socs1-Promotor-Luciferase -Konstrukts.....</i>	<i>121</i>
4	DISKUSSION	126
4.1	DAS ZELLBASIERTES SCREENINGSYSTEM	126
4.2	SCREENING AUF IFN γ -INHIBITION	127
4.3	SCREENING AUF ANTIVIRALEN SCHUTZ	130
4.4	TYROSINKINASE-INHIBITOREN UND DIE FRAGE DER SPEZIFITÄT	131
4.5	VIELE WIRKUNGEN - EIN EXTRAKT: DAS BEISPIEL RHEUM PALMATUM.....	136
4.6	PROMOTOR-LUCIFERASE REPORTERKONSTRUKTE.....	139
4.6.1	<i>Pias1.....</i>	<i>139</i>
4.6.2	<i>Socs1 Promotor.....</i>	<i>143</i>
4.7	SCHLUSSBETRACHTUNG UND AUSBLICK	145
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	147
6	LITERATURVERZEICHNIS	149
	ANHANG.....	161
	• Kooperationspartner	
	• Internet-Verweise	
	• Publikation	
	• Berechnung putativer Phosphorylierungsstellen für Pias1 (<i>Netphos</i>)	
	• Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1.1: schematische Darstellung der Signaltransduktion für TypI und TypII-IFN</i>	3
<i>Abb. 1.3.1: schematische Darstellung des Primings der TypI-Interferon-Induktion</i>	9
<i>Abb. 1.4.1: schematische Darstellung der IFNγ-Signaltransduktion</i>	11
<i>Abb. 1.5.1: räumliches theoretisches Modell der Interaktion von Socs1</i>	17
<i>Abb. 1.5.2: schematische Darstellung der Signalmoleküle Jak2, Stat1α und Socs1</i>	19
<i>Abb. 1.5.3: schematische Darstellung des murinen socs1-Promotors</i>	20
<i>Abb. 1.5.4: schematische Darstellung der negativen IFNγ-Signalgebung</i>	23
<i>Abb. 2.2.1: schematische Darstellung des Primärscreenings</i>	40
<i>Abb. 2.2.2: Ursprungsvektor lacZ</i>	57
<i>Abb. 2.2.3: schematische Darstellung der Luciferasereaktion</i>	58
<i>Abb. 3.1.1: Extinktionsspektren nach Formazan-Solubilisierung</i>	60
<i>Abb. 3.1.2: Toxizitätsbestimmung für DMSO auf A549-Zellen</i>	61
<i>Abb. 3.1.3: Vergleich der Induktion des GAS- und des ISRE-Luciferase-Konstrukts</i>	62
<i>Abb. 3.1.4: IFNγ-Induktion des GAS-Luciferase-Konstrukts</i>	62
<i>Abb. 3.1.5: GAS-Induktion durch Pervanadat</i>	63
<i>Abb. 3.2.1: Strukturformel für Trichodion</i>	64
<i>Abb. 3.2.2: Ergebnisse für Trichodion im Primärscreening</i>	64
<i>Abb. 3.2.3: Inhibition der IFNγ-medierten GAS-Induktion durch Trichodion</i>	65
<i>Abb. 3.2.4: Strukturformel von AG490</i>	66
<i>Abb. 3.2.5: anti-IFNγ-Wirkung von AG490</i>	66
<i>Abb. 3.2.6: Stat1-Tyr⁷⁰¹-phosphospezifischer Blot mit AG490 und Staurosporin</i>	67
<i>Abb. 3.2.7: GAS/ISRE-Induktionstest für Tyrphostin AG490</i>	67
<i>Abb. 3.2.8: Inhibition der IFNγ-medierten GAS-Induktion durch AG490</i>	68
<i>Abb. 3.2.9: Strukturformel von Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)</i>	68
<i>Abb. 3.2.10: Inhibition der IFNγ-medierten GAS-Induktion durch EGCG</i>	69
<i>Abb. 3.2.11: phosphospezifischer Stat1-Blot mit EGCG</i>	69
<i>Abb. 3.2.12: Pias1-Promotor-Luciferase-Konstrukt mit Trichodion und EGCG</i>	70
<i>Abb. 3.2.13: Strukturformel von Quercetin</i>	71
<i>Abb. 3.2.14: GAS-Induktionstest mit Quercetin</i>	71
<i>Abb. 3.2.15: Zytotoxizitätsbestimmung für Quercetin</i>	72
<i>Abb. 3.2.16: Quercetin als Inhibitor der IFNγ-induzierten pias1-Luciferase-Repression</i>	73
<i>Abb. 3.2.17: Strukturformel des Staurosporin</i>	73
<i>Abb. 3.2.18: Staurosporin im GAS-Induktionstest</i>	74
<i>Abb. 3.2.19: anti-IFN-Aktivität von Staurosporin im antiviralen Test</i>	75
<i>Abb. 3.2.20: Strukturformel für Dithranol (1,8,9-Anthracenriol)</i>	75
<i>Abb. 3.2.21: GAS-Induktionstest mit Dithranol</i>	76
<i>Abb. 3.2.22: Antiproliferationstest für Dithranol</i>	76

<i>Abb. 3.3.1: GAS-Induktionstest mit Peptidfraktionen</i>	78
<i>Abb. 3.4.1: Antivirale und zytotoxische Eigenschaft des Rheum-Extraktes</i>	80
<i>Abb. 3.4.2: Inhibition der Stat1-Phosphorylierung durch Rheum-Extrakt</i>	81
<i>Abb. 3.4.3: Trennung der Fraktionen 1-3 des Rheum-Extraktes über DC</i>	81
<i>Abb. 3.4.4: Inhibition der GAS-Luciferase Induktion durch Rheum-Extrakt</i>	82
<i>Abb. 3.4.5: Phosphorylierungsinhibition durch Rheum</i>	83
<i>Abb. 3.4.6: Inhibition der huIFNβ-Promotor-Luciferase-Induktion durch Rheum-Extrakt</i>	83
<i>Abb. 3.4.7: anti-IFNγ-Wirkung von Emodin im antiviralen Test</i>	85
<i>Abb. 3.4.8: Emodin als Inhibitor im GAS-Induktionstest</i>	86
<i>Abb. 3.4.9: DC Auftrennung in Reinsubstanzen des Rheum-Extraktes</i>	86
<i>Abb. 3.4.10: Stat-Tyr⁷⁰¹-phosphospezifischer Blot mit Rheum-Einzelsubstanzen</i>	88
<i>Abb. 3.4.11: Stilbenderivate im Vergleich als Inhibitoren der GAS-Induktion</i>	88
<i>Abb. 3.4.12: Tyr-Phosphorylierung nach Stilben + Pervanadat-Stimulation</i>	89
<i>Abb. 3.4.13: anti-IFNγ-Wirkung der Stilben-Derivate</i>	90
<i>Abb. 3.4.14: Stilben-Effekt auf CMV-promovierte Luciferase-Expression</i>	91
<i>Abb. 3.4.15: Resveratrolwirkung auf GAS-Aktivierung in und ohne Gegenwart von IFNγ</i>	92
<i>Abb. 3.4.16: antivirale Aktivität von Emodin</i>	92
<i>Abb. 3.5.1: zytotoxische und IFNγ-inhibierende Aktivität des Streptomyceten-Extraktes</i>	93
<i>Abb. 3.5.2: antiproliferativer Test des Rohextrakts GW22/1326</i>	94
<i>Abb. 3.5.3: anti-IFN-Wirkung von Cinerubin R</i>	95
<i>Abb. 3.5.4: antiproliferativer Test von Cinerubin R</i>	95
<i>Abb. 3.5.5: Strukturformel der Trioxacarcine C und D</i>	96
<i>Abb. 3.5.6: Primärscreening für Trioxacarcin D</i>	96
<i>Abb. 3.5.7: antiproliferativer Test von Trioxacarcin D</i>	97
<i>Abb. 3.5.8: anti-phospho-Stat1-Westernblot mit anti-IFNγ-aktiven Proben</i>	97
<i>Abb. 3.5.9: GAS-Inhibitorstest mit GW22/1326, Trioxacarcin D und Cinerubin R</i>	98
<i>Abb. 3.5.10: anti-IFNγ und zytotoxische Wirkung zweier GW22/1326-Fraktionen</i>	98
<i>Abb. 3.5.11: pias1-Promotor-Assay mit Cinerubin R, Trioxacarcin D</i>	99
<i>Abb. 3.5.12: Inhibition der GAS-Induktion durch Cosmomycin A und B</i>	100
<i>Abb. 3.5.13: Induktion der CMV-Luciferase-Expression durch Cosmomycine A und B</i>	100
<i>Abb. 3.5.14: Cosmomycin B-Wirkung auf das pias1-Promotor-Luc-Konstrukt</i>	101
<i>Abb. 3.5.15: AVA mit Überständen CMV-IFNβ-transfizierter CHO</i>	102
<i>Abb. 3.5.16: Induktionskinetik des CMV-Promotors durch Cosmomycin B</i>	102
<i>Abb. 3.6.1: Concanamycine A und C im Primärscreening</i>	103
<i>Abb. 3.6.2: Strukturformel für Concanamycin</i>	104
<i>Abb. 3.6.3: antivirale Aktivität von Concanamycin C</i>	104
<i>Abb. 3.6.4: Streptorubin A im Primärscreen</i>	105
<i>Abb. 3.6.5: antiproliferativer Test mit Streptorubin A</i>	105
<i>Abb. 3.7.1: Klonierschema für drei Reportersysteme mit dem humanen ifnβ-Promotor</i>	107
<i>Abb. 3.7.2: Orientierungs-PCR von Klonen nach Transformation</i>	108
<i>Abb. 3.7.3: Induktionskinetik des ifnβ-Promotors</i>	109

<i>Abb. 3.7.4: 442 bp - Sequenz des klonierten humanen <i>pias1</i>-Promotors</i>	110
<i>Abb. 3.7.5: Kinetik der Luciferase-Expression unter dem <i>Pias1</i>-Promotor</i>	111
<i>Abb. 3.7.6: <i>XbaI</i>-verdaute <i>Pias1</i>-Promotorkonstrukte</i>	112
<i>Abb. 3.7.7: IFN-Inhibition des CMV-Luciferase-Konstruktes</i>	113
<i>Abb. 3.7.8: konstitutive Expression der <i>pias1</i>-Promotorkonstrukte</i>	114
<i>Abb. 3.7.9: Ergebnis möglicherweise an die <i>pias1</i>- "Repressorsequenz" bindender TF</i>	114
<i>Abb. 3.7.10: Konzentrationsabhängigkeit der IFNγ und IFNβ-vermittelten <i>pias1</i>-Reporter-Inhibition</i>	115
<i>Abb. 3.7.11: <i>Pias1/3</i> Westernblot nach IFNγ-Stimulus</i>	116
<i>Abb. 3.7.12: <i>Stat1</i> α-Westernblot nach Phosphoseparation</i>	117
<i>Abb. 3.7.13: <i>Jak2</i>-Western nach Phosphoseparation</i>	117
<i>Abb. 3.7.14: <i>Pias1/3</i>-Western nach Phosphoseparation</i>	118
<i>Abb. 3.7.15: Phosphorylierungsstellen für humanes <i>Pias1</i> theoretisch ermittelt</i>	119
<i>Abb. 3.7.16: GAS/ISRE-Induktionstest für MTA</i>	120
<i>Abb. 3.7.17: Zytotoxizitätsbestimmung von MTA auf A549-Zellen</i>	120
<i>Abb. 3.7.18: schematische Darstellung des humanen <i>socs1</i>-Promotors</i>	121
<i>Abb. 3.7.19: <i>socs1</i> 2kb -Promotor-Luciferase-Expressions-Kinetik</i>	122
<i>Abb. 3.7.20: <i>socs1</i>-Promotor-Luciferase-Induktion bei verschiedenen IFN-Konzentrationen</i>	123
<i>Abb. 3.7.21: Agarosegel der <i>socs1</i>-Promotorvarianten</i>	124
<i>Abb. 3.7.22: Expressionscharakteristika der <i>socs1</i>-Promotorvarianten</i>	125

In den Abbildungen tritt aus Formatierungsgründen zum Teil eine Abweichung von der IUPAC-Nomenklatur auf. Hierbei steht IFNa für IFN α , IFNb für IFN β und IFNg für IFN γ .

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1.1.1: IFNγ-induzierte antivirale Mechanismen</i>	4
<i>Tab. 2.2.1: schematischer Belegplan des Primärscreenings</i>	41
<i>Tab. 2.2.2: getestete Medizinalpflanzen aus Nepal</i>	42
<i>Tab. 2.2.3: getestete Medizinalpflanzen aus Taiwan</i>	43
<i>Tab. 2.2.4: SDS-Gelzusammensetzung</i>	45
<i>Tab. 2.2.5: Ligationsansatz</i>	48
<i>Tab. 2.2.6: Sequenzieransatz</i>	51
<i>Tab. 2.2.7: Sequenzierprogramm</i>	51
<i>Tab. 2.2.8: PCR-Programm</i>	52
<i>Tab. 2.2.9: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes</i>	52
<i>Tab. 3.2.1: PTK-Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs</i>	70
<i>Tab. 3.2.2: Kinase-Inhibition durch Staurosporin</i>	74
<i>Tab. 3.3.1: Zusammenfassung der Aktivitäten im Primärscreening</i>	77
<i>Tab. 3.4.1: In <i>Rheum palmatum</i> nachgewiesene Substanzen</i>	84
<i>Tab. 3.4.2: Strukturformeln der Anthrachinonderivate</i>	87
<i>Tab. 3.4.3: Strukturformeln der Stilbenderivate</i>	87

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper	EMSA	Elektromobilitäts- <i>shift-assay</i>
Amp	Ampicillin	FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
AP	Alkalische Phosphatase	g	Erdbeschleunigung
APS	Ammoniumperoxydisulfat	GAS	(IFN)-Gamma aktivierte Sequenz
AS	Aminosäure	GAF	(IFN)-Gamma aktivierter (Transkriptions)-Faktor
ATCC	American Type Culture Collection	IC ₅₀	zu 50% inhibierende Konzentration
ATP	Adenosintriphosphat	iNOS	induzierbare NO-Synthase
AVA	antiviraler <i>assay</i>	IFN	Interferon
BCIP	5-Brom-4-chlor-indolylphosphat	IFNGR1	IFN γ -Rezeptor α -Kette
C	Cytosin	IFNGR2	IFN γ -Rezeptor β -Kette
CIS	<i>cytokine-inducible</i> SH2 Protein	IL	Interleukin
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>	IRF	IFN-regulierender Faktor
D	Dalton, atomare Masseneinheit	ISGF3	IFN-stimulierter Genfaktor 3
DC	Dünnschichtchromatographie	ISRE	IFN stimuliertes <i>Response-Element</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	IU	internationale Einheit 1 IU = Konz (50% der Zellen im AVA vor Lyse geschützt)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	Jak	Januskinase (Tyrosinkinasefamilie)
DTT	Dithiothreitol	JH	Jak-Homologie-Domäne
E	Extinktion	bp	base pair(s) (Basenpaar(e))
EC ₅₀	zu 50% effektive Konzentration	kD	Kilo-Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	LPS	Lipopolysaccharid
EGF	epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)	Luc	Luciferase
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	Luciferin	(S)-4,5-dihydro-2-(6-hydroxy-2-benzo-thiazoloyl)-4-thiazolcarboxylsäure
EMC	<i>Encephalomyocarditis</i>		
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>		

MCS	<i>multiple cloning site</i>	RNA	Ribonukleinsäure
MEM	<i>minimum essential medium</i>	RT	Raumtemperatur
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex	RPMI	Roswell Park Memorial Institut
mRNA	<i>messenger RNA</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
MTA	Methylthioadenosin	SH2	Src Homologie 2
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
NaPP	Natriumphosphatpuffer	Socs	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
NBCS	<i>new born calf serum</i>	SSI	Stat-induced
NBT	Nitrotetrazoliumblau		Stat-inhibitor
NK-	<i>natural killer</i> –Zellen	Stat	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
ONPG	Ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid	$t_{1/2}$	Halbwertszeit
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese	Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)	TAE	Tris-Acetat Puffer
PCR	DNA <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)	TBE	Tris-Borat Puffer
PFU	<i>plaque forming units</i>	TBST	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung) mit Tween20
pI	Isoelektrischer Punkt	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Pias	Protein-Inhibitor aktivierter Stats	TF	Transkriptionsfaktor
ppm	<i>parts per million</i>	TLR	<i>toll like receptor</i>
PRD	positive Regulations-Domäne	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
PRMT	Protein Arginin Methyltransferase	TSS	<i>transformation and storage solution</i>
PTK	Phosphotyrosinkinase	ü.N.	über Nacht
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>	ÜNK	Übernachtkultur
R _f	Retentionsfaktor	Upm	Umdrehungen pro Minute
RG	Reaktionsgefäß	UTR	<i>untranslated region</i>
rhuIFN- γ	rekombinantes humanes Interferon- γ	UV	Ultraviolett
		v/v	Volumen pro Volumen
		<i>well</i>	Kavität einer Mikrotiterplatte
		w/v	Gewicht pro Volumen
		WHO	Weltgesundheitsorganisation

YT *yeast extract* Medium

Alle physikalischen Größen wurden in SI-Einheiten angegeben. Nicht aufgeführte Abkürzungen, Symbole und Begriffe werden im Text erklärt..

1 Einleitung

1.1 Interferone

Zytokine sind kleine, sekretierte Proteine, die häufig durch Glykosylierung und intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert sind. Sie steuern eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie die hämatopoetische Differenzierung oder die Antwort auf Infektionen und Verletzungen. Zytokine wirken in nano- bis picomolaren Konzentrationen und werden anders als Hormone nicht in Drüsen als vorgefertigtes Protein gespeichert, sondern bei Stimulation schnell neu synthetisiert und sekretiert. Sie werden von den verschiedensten Zellarten produziert, insbesondere aber von Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen. Zytokine wirken überwiegend auf die unmittelbar benachbarten verschiedenen Zielzellen.

Zytokinwirkungen können additiv, synergistisch oder antagonistisch sein, so dass nicht ein Zytokin, sondern der *Zytokin-Cocktail* die entsprechende Zellantwort bedingt. Ein weiteres Merkmal der Komplexität der Zytokinsignalgebung ist das hohe Maß an Redundanz in Form einer ähnlichen Wirkung verschiedener Zytokine. Dies bedeutet, dass in der Regel mehr als nur ein Signal im Netzwerk aus der Balance geraten ist, wenn es zu einer drastischen, mit besonderem Interesse betrachtet krankheitsrelevanten Änderung der Zytokinantwort kommt. Zu den Zytokinen zählen neben den Interferonen die zahlreichen Interleukine, sowie Wachstums- und Kolonie-stimulierende Faktoren.

Unter dem Begriff der Interferone fasst man Polypeptide mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften zusammen. Die früher als Leukozyteninterferone bezeichneten Interferone- α , das Fibroblasteninterferon IFN β und das Immuninterferon IFN γ . Zur Abgrenzung zu den säurestabilen Interferonen wurde der Begriff des TypII-Interferons für das IFN γ eingeführt (Youngner and Salvin 1973). Als TypI-Interferone werden die IFN α -Subtypen, das IFN β , IFN δ , IFN ω und IFN τ bezeichnet. Der einzige Vertreter der TypII-Interferone blieb das IFN γ .

Entdeckt und benannt wurden die Interferone 1957 aufgrund ihrer Fähigkeit zur Interferenz mit der Virusreplikation (Isaacs and Lindenmann 1957). Nach der antiviralen wurde die antiproliferative Aktivität der Interferone entdeckt (Paucker K 1962). Hinzu kam eine immer noch wachsende Anzahl weiterer biologischer Aktivitäten. Die TypI-Interferone haben dabei eine höhere antivirale, das IFN γ eine stärkere antiproliferative Wirkung.

Die Interferone finden bei verschiedenen viralen, immunologischen und onkologischen Erkrankungen als wirksame Medikamente Verwendung. Die Vielseitigkeit der IFN-Wirkung lässt beständig neue klinische Studien folgen und die verfügbare Anzahl an Publikationen steigen. Die über IFN gesammelte "grenzenlose" Datenmenge schließt sogar Untersuchungen der (unveränderten) biologischen Aktivität von huIFN α während Weltraumflügen ein (Talas, Batkai *et al.* 1983).

Die immunregulatorischen Wirkungen sind beim IFN γ vielfältiger ausgeprägt als bei den TypI-Interferonen. Alle Interferone induzieren MHC I-Zelloberflächenantigene und aktivieren CD8⁺-T-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen. IFN γ induziert darüber hinaus aber auch die MHC II-Antigene und aktiviert Makrophagen. Die durch IFN γ induzierte H₂O₂-Synthese mononukleärer Phagozyten wird durch IFN α/β blockiert (Garotta, Talmadge *et al.* 1986). Weitere IFN γ -induzierte Gene, die durch IFN α/β inhibiert werden, sind MHC II, iNOS (Deguchi, Sakuta *et al.* 1995) und ICSBP (Politis, Sivo *et al.* 1992). Einen Eindruck der Unterschiede in der Geninduktion durch TypI und TypII-IFN erhält man bei Untersuchungen mit cDNA-Microarrays (Der, Zhou *et al.* 1998). Von den untersuchten 6.800 humanen Genen wurde für Hunderte eine differenzielle Regulation der mRNA in Fibrosarcoma-Zellen, die mit den Interferonen α , β und γ stimuliert wurden nach sechs Stunden gemessen. Dabei wurde allgemein eine stärkere Induktion durch die TypI-Interferone als durch das IFN γ festgestellt. Auch die zum Teil unterschiedliche Regulation durch die TypI-Interferone IFN α und IFN β wurde sowohl bei der Induktion, als auch bei der Repression zahlreicher Gene deutlich.

Interferone wirken speziesspezifisch. Dabei kommt dem IFN γ die ausgeprägteste, den Interferonen- α die geringste Artspezifität zu. Interferone konnten bei allen untersuchten Vertebraten nachgewiesen werden. Bei allen untersuchten Spezies konnte durch Konkurrenzexperimente gezeigt werden, dass IFN α und IFN β an einen gemeinsamen Rezeptor binden (siehe Abb. 1.1.1). Dennoch gibt es in den Aminosäuresequenzen der IFN α und des IFN β weitgehende Unterschiede (Streuli, Nagata *et al.* 1980).

IFN γ hingegen bindet an einen eigenen, den TypII-Rezeptor (Branca and Baglioni 1981). Dies erklärt auch die unterschiedlichen Wirkungen der TypI und der TypII-Interferone, die beim antiviralen und antiproliferativen Effekt synergistisch (Fleischmann and Schwarz 1981) bei der Regulation des Immunsystems aber zum Teil antagonistisch sind.

Die in Abb. 1.1.1 deutlich werdende Vernetzung der TypI- und TypII-IFN-Signaltransduktionswege zeigt sich am Beispiel des auch als p48 bekannten IRF-9. Dieser IFN-regulierte Transkriptionsfaktor bildet als Trimer mit Stat1 und Stat2 den Transkriptionsfaktor ISGF3. IRF-9 ist beim IFN α/β und auch beim IFN γ für die Vermittlung der antiviralen Antwort essenziell (Bluyssen, Durbin *et al.* 1996).

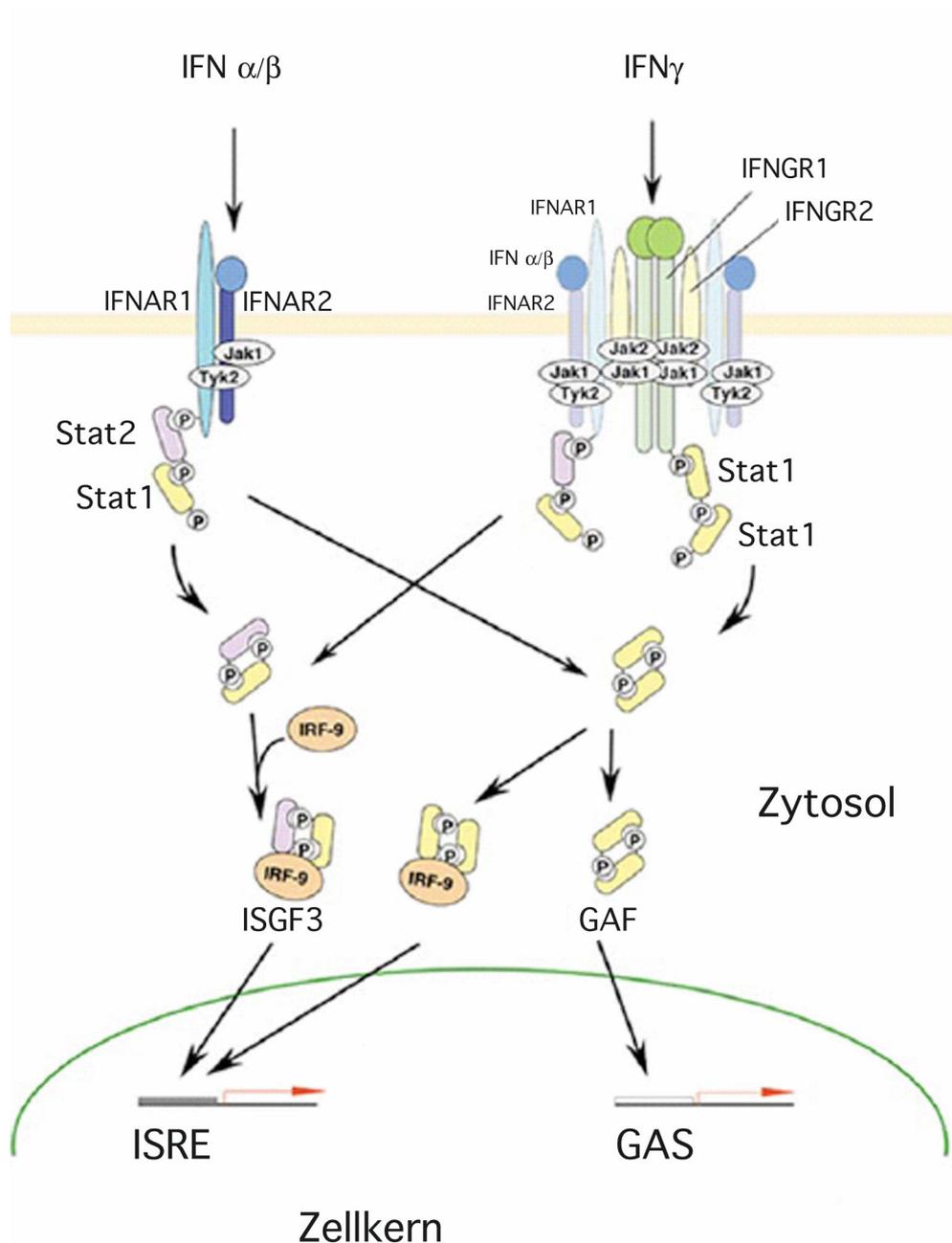


Abb. 1.1.1: schematische Darstellung der Signaltransduktion für TypI und TypII-IFN (TypI und TypII Interferone binden an unterschiedliche Rezeptoren, aktivieren den Jak/Stat-Signalweg und führen zu einer zum Teil überlappenden Geninduktion; nach (Taniguchi, Ogasawara *et al.* 2001))

Bindet IRF-9 an das aktivierte Stat1-Homodimer, ändert sich die GAS-Spezifität auf eine ISRE-spezifische Genaktivierung. Das dadurch veränderte Genexpressionsmuster wurde auch an einer Zelllinie mit einer verkürzten nicht funktionalen IRF-9-Mutante nach IFN γ -Stimulation nachgewiesen (John, McKendry *et al.* 1991).

IFN wirkt nicht virusspezifisch. Ein Virus kann gegen die Wirkungen des Interferons resistent sein, die es selbst induziert hat, welche aber gleichzeitig einen starken Inhibitor für ein anderes Virus darstellen. Die antiviralen Aktivitäten der Interferone stützen sich auf unterschiedliche Mechanismen, die je nach Virus verschiedene Phasen der Virus-Replikation beeinflussen können. Wichtige Schritte sind dabei insbesondere die Penetration, die Transkription, die virale Proteinsynthese, die virale Nukleinsäurereplikation, das Virus-*Assembly* und das *Budding* (Samuel 1991; Kerr and Stark 1992). Eine Auswahl wichtiger antiviraler Wirkweisen ist in der Tab. 1.1.1 zusammengefasst.

Tab. 1.1.1: IFN γ -induzierte antivirale Mechanismen; nach (Chesler and Reiss 2002)

Antivirales Protein	Wirkungsmechanismus	suszeptibles Virus
Mx	Transkriptionshemmung viraler RNA	VSV Influenza Masern
RNaseL 2'-5'-OAS	RNA-Abbau durch RNaseL nach Aktivierung durch Oligoadenylat	EMCV HIV Vaccinia-Virus
PKR	Proteinsyntheseinhibierung durch eIF2 α -Phosphorylierung	EMCV HIV
dsRAD	mRNA-Editierung durch Deaminierung von Adenin	Hepatitis Delta Virus
iNOS	gezielte Nitrosylierung von Cystein- und Tyrosinresten viraler Proteine	VSV HSV-1, HIV, EBV, Coxsackie, Vaccinia-Virus

Ein wichtiges Kontrollglied der IFN-induzierten antiviralen Mediatoren 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase, Proteinkinase R, dsRNA-abhängige Adenosin-Deaminase (dsRAD) und anderer ist eine Aktivierung durch die bei vielen viralen Infektionszyklen auftretende dsRNA (Jacobs and Langland 1996; Stark, Kerr *et al.* 1998). Als experimentell etabliertes Substitut für virale dsRNA wird oft homopolymeres PolyIC verwendet.

An dreifach defizienten PKR/RNaseL/Mx $-/-$ Mäusen konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass es zusätzliche IFN α -induzierbare Mechanismen gegen eine EMCV-Infektion gibt (Zhou, Paranjape *et al.* 1999). Tatsächlich wird einer Reihe weiterer IFN-induzierbarer Proteine wie der dsRNA-abhängigen Adenosin-Deaminase ADAR1 (Patterson and Samuel 1995), den *interferon stimulated genes* ISG12 (Martensen, Sogaard *et al.* 2001), ISG 15 (Yuan and Krug 2001), ISG20 (Nguyen, Espert *et al.* 2001), ISG 56 (Bazzigher, Pavlovic *et al.* 1992) sowie der Indolamin 2,3-Dioxygenase (Pfefferkorn 1984) eine antivirale Aktivität zugeschrieben.

Wird das primäre Ziel, die Virusvermehrung zu stoppen, dennoch nicht erreicht, sind Interferone auch an der Eliminierung der virusinfizierten Zellen beteiligt. Diese gezielte Zerstörung erfolgt über die Aktivierung von NK-Zellen, sowie CD8 $^+$ - und CD4 $^+$ -T-Zellen.

1.2 Interferon- γ

Entdeckt wurde das IFN γ acht Jahre nach den TypI-Interferonen ebenfalls anhand seiner antiviralen Aktivität (Wheelock 1965). Biologisch aktives IFN γ liegt als ein nichtkovalentes Homodimer vor. Die Struktur wurde durch Röntgenkristallografie gelöst (Ealick, Cook *et al.* 1991; Walter, Windsor *et al.* 1995). Das Fehlen von Cysteinresten und stabilisierenden Disulfidbrücken ist für Zytokine ungewöhnlich und ein Unterscheidungsmerkmal zu den TypI-Interferonen. Daraus ergibt sich auch eine höhere Hitzelabilität mit einer Denaturierung bei Temperaturen über 52°C (Waschütza 1995).

IFN γ ist ein N-glykosiliertes Protein (Positionen 25 und 97), die Glykosylierung ist für die *in vitro*-Aktivität jedoch unerheblich (Kelker, Yip *et al.* 1983). Ein IFN γ -Monomer variiert in seinem Molekulargewicht je nach Glykosylierungsgrad zwischen 17 kD (unglykosyliert) 20 kD (einfach glykosyliert) und 25 kD (zweifach glykosyliert). IFN γ hat im Unterschied zu den anderen Interferonen eine säurelabile Bindung, die ab einem pH 2,3 bricht und zum Verlust der biologischen Aktivität führt (Estrov, Kurzrock *et al.* 1993). Eine aminoterminal Verkürzung des Polypeptids um 10 AS führt ebenfalls zum Aktivitätsverlust (Arakawa, Horan *et al.* 1990), während eine carboxyterminale Verkürzung um 10 AS zu einem Anstieg der antiviralen Aktivität führt (Slodowski, Böhm *et al.* 1991).

Trotz der außergewöhnlichen Komplexität der IFN γ -Antwort beschränkt sie sich, soweit bisher bekannt, auf die Regulation der Immunantwort und die Infektabwehr. Dies bestätigt sich bei der phänotypischen Betrachtung von Mäuse-*Knockouts* für das Zytokin IFN γ (Dalton, Pitts-Meek *et al.* 1993), den IFNGR1 (Huang, Hendriks *et al.* 1993) und den Transkriptionsfaktor Stat1 (Durbin, Hackenmiller *et al.* 1996; Meraz, White *et al.* 1996). Die Veränderungen beschränken sich auf das Lymphsystem und eine erhöhte Suszeptibilität gegen pathogene Erreger.

Im Gegensatz zu den intronlosen TypI-Interferonen auf Chromosom 9 enthält das auf Chromosom 12 (Naylor, Sakaguchi *et al.* 1983) lokalisierte IFN γ -Gen drei Introns (Gray and Goeddel 1982). IFN γ wird im Gegensatz zum IFN α von nur einem Gen codiert, welches in eine einzige 1,2 kb mRNA-Spezies transkribiert wird (Derynck, Leung *et al.* 1982). Eine 23 AS umfassende hydrophobe Signalsequenz wird vom 166 AS-Polypeptid abgespalten (Rinderknecht, O'Connor *et al.* 1984). Die Sequenz der 143 AS des IFN γ zeigt keine Homologien zu den TypI-Interferonen.

Das erste Intron des IFN γ -Gens enthält eine hochpolymorphe repetitive CA-Mikrosatelliten-Sequenz mit bis zu 6 Allelen. Allel 2 mit 12 CA-Wiederholungen ist *in vitro* mit einem hohen Spiegel der IFN γ -Produktion verbunden (Pravica, Asderakis *et al.* 1999), welche womöglich mit einem nahegelegenen SNP in einer putativen NF κ B-Bindungsstelle zusammenhängt. Dieses Allel wurde bei einer Vielzahl an Erkrankungen mit einem erhöhten bzw. erniedrigten Erkrankungsrisiko in Zusammenhang gebracht. So für die Rheumatoide Arthritis (Khani-Hanjani, Lacaille *et al.* 2000), die Allograft-Fibrose bei Lungentransplantationspatienten (Awad, Pravica *et al.* 1999) und die akute *Graft-versus-host*-Erkrankung bei Knochenmarkstransplantationsempfängern (Cavet, Dickinson *et al.* 2001).

Die interferoninduzierbare Kinase PKR wird durch dsRNA aktiviert und inhibiert daraufhin durch Phosphorylierung des eIF2 α die Translation. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die mRNA des huIFN γ über eine PKR-Aktivierung ihre eigene Translationseffizienz steuern kann (Ben-Asouli, Banai *et al.* 2002). IFN γ -mRNA bildet in der 5' untranslatierten Region einen Pseudoknoten. Wird dieser durch Mutation destabilisiert, wird die Fähigkeit, die PKR zu aktivieren reduziert und die Translationseffizienz der IFN γ -mRNA stark erhöht.

IFN γ ist als pharmakologisch wirksames Protein bei der chronischen Granulomatose und der Osteopetrose zugelassen. Der Funktionsverlust der Cytochrom b558-Untereinheit gp91-phox ist die Hauptursache für die chronische Granulomatose (Orkin 1989). Dieses Gen wird in Neutrophilen durch IFN γ induziert. Bei der Marmorknochenkrankheit (Osteopetrose) steigert IFN γ die gestörte Knochenresorption durch Osteoklasten (Madyastha, Yang *et al.* 2000; Yang, Madyastha *et al.* 2002). Als neue Indikationen für IFN γ werden die idiopathische Lungenfibrose (Ziesche, Hofbauer *et al.* 1999), die Leberfibrose, Gebärmutterkrebs, die chronische Hepatitis-C-Virusinfektion und weitere in klinischen Studien getestet.

1.3 Induktion der Interferon-Synthese

Die Induktion der Transkription der IFN α -Gene sowie des IFN β -Gens in virusinfizierten Zellen ist ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität (Janeway CA 1999). Die Interferone, die von virusstimulierten Leukozyten produziert werden, sind überwiegend IFN α (Leukozyten-Interferone). Bei lymphoblastoiden Zellen sind es zu 90 % IFN α und zu 10% IFN β . Induzierte Fibroblasten produzieren hauptsächlich oder sogar ausschließlich IFN β .

Obwohl nahezu jede Zellart IFN α/β nach einer Virusinfektion produzieren kann, gibt es Zellen, die bis zum Tausendfachen der IFN-Menge sekretieren (Fitzgerald-Bocarsly 1993). Diese sogenannten natürlichen Interferon-produzierenden Zellen (NIPCs) sind als seltene Zellen im menschlichen Blut mit einer plasmazytoiden Morphologie beschrieben und scheinen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr zu spielen und neben der direkten Vermittlung eines antiviralen Status die IFN α/β -Expression zu *primen* (Sato, Suemori *et al.* 2000) (siehe Abb. 1.3.1).

Die Induktion wird hauptsächlich über Sequenzen in der 5'Region der IFN-Gene vermittelt. Diese Sequenzen nennt man virusinduzierbare Enhancer (Weissmann and Weber 1986; Taniguchi 1988; Maniatis, Whittermore *et al.* 1992). Bei der Analyse dieser Promotorregionen wurden die für die Virusinduktion essenziellen IRF-Erkennungssequenzen entdeckt (Fujita, Ohno *et al.* 1985; Ryals, Dierks *et al.* 1985; Fujita, Sakakibara *et al.* 1988; Goodbourn and Maniatis 1988).

Obwohl IRF-2 ursprünglich als negativer Regulator des IRF-1 ($t_{1/2} = 30$ min) identifiziert wurde, hat es auch eine besondere Funktion als negativer Regulator der IFN α/β Signalgebung. IRF-2 ist ein sehr stabiler nukleärer Faktor ($t_{1/2} = 8$ h) (Watanabe, Sakakibara *et al.* 1991), der die Transkription durch den IFN-aktivierten ISGF3 vermindert. IRF-1 und IRF-2 binden an die gleiche DNA-Bindungsstelle. Dieses als IRF-E bezeichnete DNA-Element mit der Konsensussequenz G(A)AAA^G/C^T/CGAAA^G/C^T/C (Tanaka, Kawakami *et al.* 1993) ist nahezu ununterscheidbar vom Interferon-induzierten Element ISRE (^A/GNGAAANNGAAACT) (Darnell, Kerr *et al.* 1994).

Besondere Bedeutung bei der Pathogen-Erkennung und der folgenden TypI-IFN-Induktion haben die *toll-like* Rezeptoren. LPS stimuliert TLR 4 (Anderson 2000) und dsRNA den TLR 3 (Alexopoulou, Holt *et al.* 2001).

Influenza A-virusinfizierte epitheliale Zellen sowie Monozyten/Makrophagen produzieren $\text{IFN}\alpha/\beta$ (Ronni, Sareneva *et al.* 1995). Humane epitheliale Zellen hingegen sind, wie am Beispiel von A549-Zellen gezeigt, nur schlechte $\text{IFN}\alpha/\beta$ -Produzenten bei Influenza A Virusinfektion (Ronni, Matikainen *et al.* 1997).

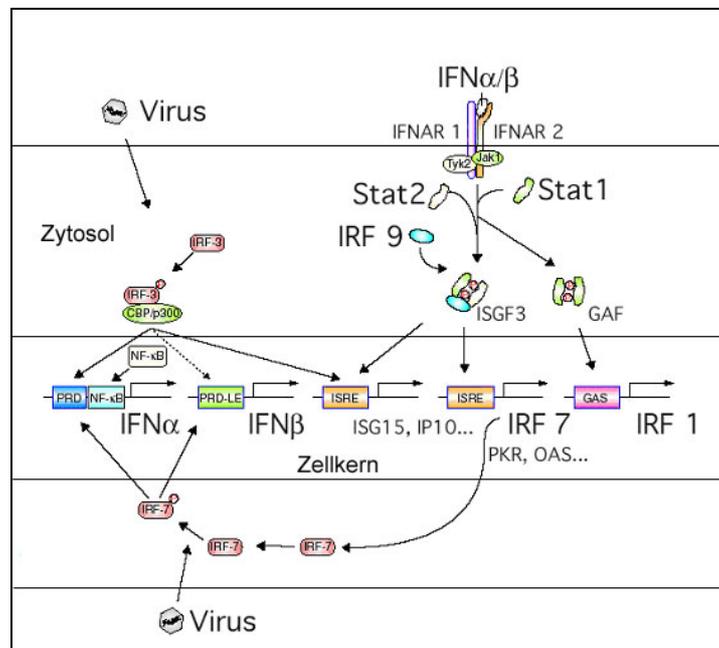


Abb. 1.3.1: schematische Darstellung des Primings der Typ I-Interferon-Induktion nach (Taniguchi and Takaoka 2002)

Für die Induktion der $\text{IFN}\gamma$ -Synthese spielen virale Stimuli nur eine untergeordnete Rolle. Die Hauptproduzentenzellen sind aktivierte NK Zellen (Perussia 1991), aktivierte TH1-Zellen (Mosmann and Coffman 1989) und aktivierte zytotoxische CD8^+ -T-Zellen (Sad, Marcotte *et al.* 1995). In T-Zellen ist neben dem *Cross-linking* des T-Zell-Rezeptorkomplexes als Hauptauslöser für die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion (Ullman, Northrop *et al.* 1990) auch eine Induktion durch IL-12 (Lederer, Perez *et al.* 1996) wichtig. In NK-Zellen wird die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion insbesondere durch die makrophagen-sezernierten Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-12 (Heinzel, Rerko *et al.* 1994; Trinchieri 1995) und durch $\text{IFN}\gamma$ selbst (Hardy and Sawada 1989) stimuliert. IL-12 wiederum wird durch $\text{IFN}\gamma$ induziert (Yoshida, Koide *et al.* 1994), so dass eine positive Rückkopplung besteht.

Eine chronische IL-12 Synthese wird bei inflammatorischen Erkrankungen wie der Colitis (Davidson, Hudak *et al.* 1998) beschrieben. IL-12 wird hauptsächlich von Makrophagen und dendritischen Zellen als Antwort auf verschiedene intrazelluläre Pathogene oder deren Produkte gebildet (Takenaka, Maruo *et al.* 1997).

IFN γ kann auch durch T-Zell-Mitogene wie Concanavalin A oder Phytohämagglutinin induziert werden (Gajewski, Schell *et al.* 1989). Die Konzentration der induzierten *ifn γ* -mRNA hat ein Maximum bei 18 – 24 h und nimmt dann langsam ab. Das reife Protein wird direkt nach der Synthese in den extrazellulären Raum sekretiert.

Glukokortikoide und Katecholamine hingegen, die wichtigsten Stresshormone, inhibieren die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-12, TNF- α und IFN γ (Elenkov and Chrousos 2002). Dies stellt eine Verbindung zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen und viralen Infektionen in akuten Stressphasen her.

1.4 Interferon- γ -Signaltransduktion

IFN γ vermittelt die pleiotrope Wirkung auf Zielzellen, indem es hochaffin an den IFN γ -Rezeptor (IFNGR) bindet ($K_a = 10^9$ - 10^{10}), der auf allen kerntragenden Zellen exprimiert wird (Farrar and Schreiber 1993). Die Rezeptoranzahl pro Zelle variiert abhängig von Zellart und Zellstatus stark und ist in der Regel relativ niedrig (200 - 25.000). Der funktionale IFNGR besteht aus zwei Untereinheiten. Die 90kDa α -Untereinheit IFNGR1 bindet den Liganden, während die β -Untereinheit IFNGR2 daraufhin die α -Untereinheit bindet. Bei Herabregulierung des IFNGR2 wird so trotz weiterhin erfolgender IFN-Bindung eine Desensitivierung möglich (Bach, Szabo *et al.* 1995).

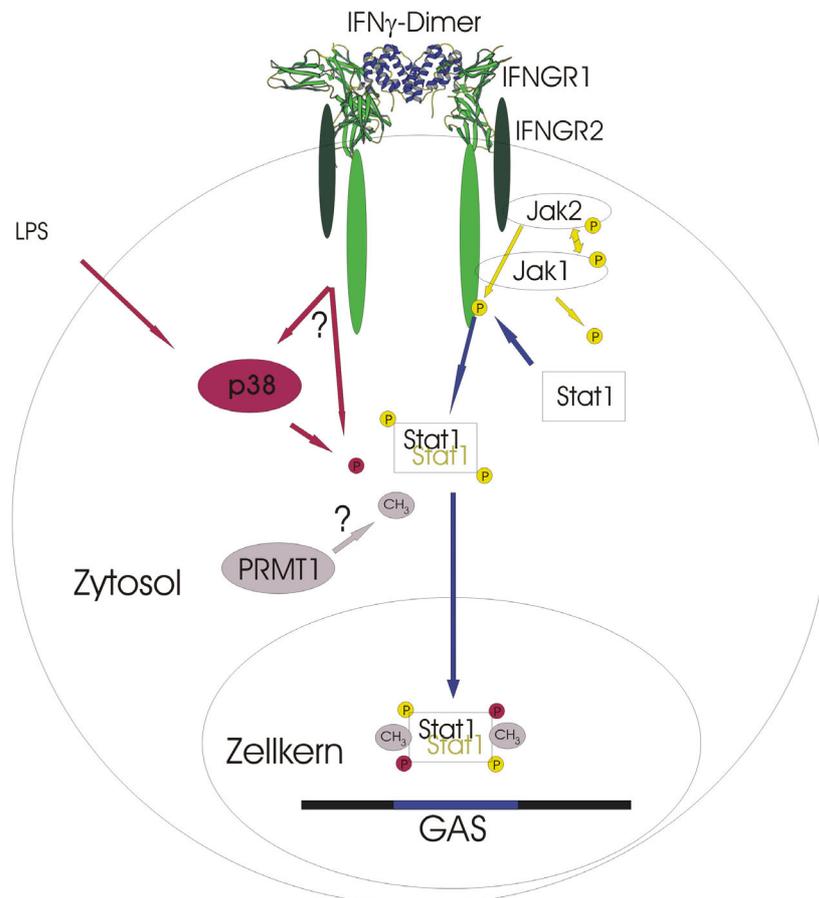


Abb. 1.4.1: schematische Darstellung der IFN γ -Signaltransduktion (gelb: Tyrosinphosphorylierung, rot: Serinphosphorylierung der Weg der IFN γ -stimulierten Ser-Phosphorylierung ist noch nicht geklärt, die Arg³¹-Methylierung wurde bisher nur für den TypI-Signalweg nachgewiesen)

Da vielen TypI und TypII-Zytokinrezeptoren eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität fehlt, hängt die zytoplasmatische Aktivierung der Signalkaskade von Januskinasen ab. Die Tyrosinkinase Jak2 ist konstitutiv mit dem IFNGR2 assoziiert (Bach, Tanner *et al.* 1996), Jak1 mit dem IFNGR1.

In Säugern sind die vier Januskinasen Jak1, Jak2 und Tyk2, die in den meisten Zellarten, sowie Jak3, welches hauptsächlich in Zellen hämatopoetischen Ursprungs vorkommt, bekannt. Insgesamt werden Jaks an etwa 20 verschiedenen Rezeptorproteinen über mindestens 25 unterschiedliche Liganden aktiviert (O'Brien, O'Shea *et al.* 2002). Jak2 bindet neben IFNGR2 auch gp130, EpoR, GHR, PRLR und den GM-CSFR.

Die Dimerisierung verschiedener Rezeptor-Ektodomänen, welche mit Jaks kovalent verknüpft wurden (Sakai, Nabell *et al.* 1995) oder allein die Überexpression von Jaks (Duhe and Farrar 1995; Lai, Ripperger *et al.* 1995) führen vermutlich durch den engen räumlichen Kontakt zwischen den Jaks zu einer Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung.

Die Jaks bestehen aus sieben hochkonservierten Jak-Homologie-Domänen (JH 1-7) (siehe Abb. 1.5.2). Während die C-terminale Domäne JH1 die Tyrosinkinase-Funktion enthält, zeigt die benachbarte JH2-Domäne zwar eine hohe Homologie zu funktionalen Kinasen, weist jedoch keine katalytische Aktivität auf (Wilks, Harpur *et al.* 1991). Die Rolle der JH2-Domäne ist noch nicht völlig geklärt. Eine Möglichkeit ist die Regulation der katalytischen Aktivität der JH1-Domäne (Luo, Rose *et al.* 1997). Ebenfalls unklar bleibt die strukturell konservierte, als funktional jedoch bisher nicht bestätigte SH2-Domäne der Jak2 (Giordanetto and Kroemer 2002). Die Domänen JH6 und JH7 des Jak2 sind für die Rezeptorassoziation mit dem IFNGR2 essenziell und auch ausreichend, wie eine Untersuchung anhand eines Fusionsproteins dieser Segmente an Jak1 zeigt (Kohlhuber, Rogers *et al.* 1997).

Eine ligandeninduzierte Assemblierung des Rezeptorkomplexes führt am intrazellulären IFNGR1 zur Phosphorylierung des Tyr⁴⁴⁰ durch Jak2 (siehe Abb. 1.4.1). Dadurch entsteht eine Stat1-Bindungsstelle. Stat1 wird durch Phosphorylierung des Tyr⁷⁰¹ aktiviert, dissoziiert daraufhin vom IFNGR1 und homodimerisiert zum Transkriptionsfaktor GAF.

Neben der Tyrosin-Phosphorylierung ist die IFN-induzierte Serin-Phosphorylierung an Position 727 ein wichtiger zusätzlicher Aktivierungsschritt. Ein Austausch des Ser⁷²⁷ gegen Alanin senkt die Transaktivierungskapazität um etwa 80% (Wen, Zhong *et al.* 1995). Stat1-defiziente U3A-Zellen, die mit der Stat1-S727A-Mutante rekonstituiert wurden, zeigten weder die IFN-induzierte antivirale (Horvath and Darnell 1996) noch antiproliferative Wirkung (Bromberg, Horvath *et al.* 1996). Zur Signalkaskade die zu dieser Serinphosphorylierung führt gibt es derzeit noch unterschiedliche Hypothesen.

Eine wichtige Voraussetzung für die IFN-induzierte Serinphosphorylierung ist dabei die vorangehende Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung (Kovarik, Mangold *et al.* 2001). Stat1 kann allerdings auch unabhängig von IFN und der Tyr-Phosphorylierung am Ser⁷²⁷ beispielsweise durch LPS über eine Aktivierung der MAPK p38 phosphoryliert werden (Kovarik, Stoiber *et al.* 1999)(siehe Abb. 1.4.1). Eine Kostimulation mit IFN γ und LPS führte zu einer stärkeren Ser⁷²⁷-Phosphorylierung und einer stärkeren Expression eines IFN γ -induzierten Reportergens (Kovarik, Stoiber *et al.* 1998).

Für die Signaltransduktion der TypI-Interferone wurde als zusätzlich funktional relevante postranslationale Modifikation eine Arg³¹-Methylierung des Stat1 beschrieben (Mowen, Tang *et al.* 2001). Ob diese Methylierung auch beim IFN γ eine Rolle bei der Signaltransduktion spielt, ist zur Zeit nicht bekannt. Zusätzliche Modifikationen werden jedoch auch hier postuliert, da eine Stat1-Aktivierung mit Oncostatin M zwar ebenso wie mit IFN γ eine Translokation des aktivierten Transkriptionsfaktors nach Tyr⁷⁰¹/Ser⁷²⁷-Phosphorylierung aber keine Induktion des GAS-Promotors zur Folge hat (Mahboubi and Pober 2002).

Stat1 wird neben den TypI und TypII-IFN auch von EGF, PDGF und IL-6 aktiviert. Die Stat1-Aktivierung ist ein kurzlebiges Signal, welches auch bei permanenter extrazellulärer Anwesenheit von IFN schnell wieder abgeschaltet wird (zu den Abschaltmechanismen siehe Kapitel 1.5).

Die schnelle Geninduktion der Zytokine wird über die latenten zytosolischen Stat-Proteine vermittelt (Darnell, Kerr *et al.* 1994). Das Stat1-Molekül spielt dabei sowohl für die unmittelbare Antwort auf die TypI als auch die TypII-Interferone eine entscheidende Rolle. Ohne funktionales Stat1 geht die natürliche Immunität gegen pathogene Mikroorganismen verloren (Durbin, Hackenmiller *et al.* 1996; Meraz, White *et al.* 1996). Dennoch konnte kürzlich an Mäusen *in vivo* gezeigt werden, dass es auch einen physiologisch relevanten IFN-abhängigen, Stat1-unabhängigen Signalweg zur Vermittlung antiviraler Wirkung gibt (Gil, Bohn *et al.* 2001). Die als *immune evasion* bekannte Fähigkeit vieler Viren, die antiviralen IFN-Wirkungen zu inhibieren, ist in manchen Fällen direkt gegen eine Aktivierung des Stat1 gerichtet (Chang and Laimins 2000; Rodriguez, Parisien *et al.* 2002). Gegen derartige Viren könnte ein Stat1-unabhängiges antivirales Signal bedeutsam sein.

Auch bei der IFN-induzierten Monozyten-Adhäsion ist Stat1 nicht essenziell. Eine zentrale Rolle für die Stat1-unabhängige IFN-Antwort spielt hier die Serin/Threonin-Kinase Akt (Navarro, Anand-Apte *et al.* 2003).

Die überwiegende Mehrheit der IFN γ -induzierbaren Gene wird durch Stat1-abhängige Mechanismen angeschaltet. Es gibt jedoch auch einige weitere Stat1-unabhängige Antworten (Ramana, Grammatikakis *et al.* 2000; Gil, Bohn *et al.* 2001; Ramana, Gil *et al.* 2001).

Stat1 wurde zusätzlich sowohl als Repressor (Ramana, Chatterjee-Kishore *et al.* 2000), als auch als konstitutiver Aktivator beschrieben, der unabhängig von seiner Fähigkeit zur Dimerisierung für die Expression einiger Caspasen notwendig ist (Kumar, Commane *et al.* 1997) und unabhängig von der Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung an ein überlappendes IFN-konsensus-Sequenz 2 / GAS-Element bindet und so zur Transkription von *Imp2* führt (Chatterjee-Kishore, Wright *et al.* 2000).

Es gibt neben dem Jak/Stat-Weg auch andere Wege die durch IFN γ aktiviert werden können. So wird die schnelle und transiente Jak1-abhängige Phosphorylierung von Raf-1 und MAPK beschrieben (Sakatsume, Stancato *et al.* 1998).

Das IFN-System wird durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus auf die IFN-Wirkung sensitiviert. Sowohl die TypI als auch die TypII-IFN regen die vermehrte Expression von Stat1, Stat2 und IRF-9 an (Lehtonen, Matikainen *et al.* 1997; Wong, Hatzinisiriou *et al.* 1998).

Die Geninduktion durch IFN lässt sich in eine Primärantwort und eine Folgeantwort unterteilen. Zunächst werden ohne eine Proteinneusynthese direkt die Gene transkribiert, die über ein funktionales IFN-induzierbares Element wie GAS, ISRE und ähnliche verfügen. Viele dieser Gene codieren für Transkriptionsfaktoren, die im weiteren Verlauf zusätzliche Gene regulieren und so eine zeitlich verzögerte Folgeantwort bewirken. Einer dieser primär gebildeten Transkriptionsfaktoren ist IRF-1, welcher stark durch IFN γ induziert wird (Sims, Cha *et al.* 1993). Die Induktion erfolgt über ein GAS-Enhancer-Element (Coccia, Marziali *et al.* 1995). IRF-1, welches auch durch andere Zytokine wie TNF α induziert wird (Fujita, Reis *et al.* 1989), vermag nun, weitere Gene, wie die iNO-Synthase (Kamijo, Harada *et al.* 1994), zu induzieren.

1.5 Abschaltmechanismen des $IFN\gamma$ -vermittelten Signals

Da es sich bei den Zytokinen um hochwirksame Moleküle handelt, sind sowohl die Sekretion als auch die erfolgende Zytokin-Antwort sehr stringent regulierte Prozesse. Die Störung einer angemessenen Regulation begünstigt autoinflammatorische und Autoimmunerkrankungen. Die Homöostase des Immunsystems erfordert eine ausgeklügelte Regulation der Zytokinproduktion und -wirkung. Die Aktivierung durch Zytokine ist in der Regel schnell und transient. Eine konstitutive Aktivierung der Jaks wurde hingegen bei einer Reihe an Krebserkrankungen beobachtet. Die spezifische Inhibition von Jak2 durch das Tyrphostin AG490 in Zellen von Leukämie-Patienten mit konstitutiv aktiviertem Jak2, konnte die Zellproliferation durch Apoptose-Induktion stoppen (Meydan, Grunberger *et al.* 1996).

Eine konstitutive Aktivierung von Januskinasen und Stat-Mediatoren kommt relativ häufig bei hämatopoetischen Erkrankungen und soliden Tumoren vor und unterstreicht die vitale Bedeutung der korrekten Terminierung des Zytokinsignals.

Im Vergleich zum seit Jahren fest etablierten Jak/Stat-Signaltransduktionsweg vom Rezeptor zum Kern (siehe Kapitel 1.4) beginnt das Bild von der Terminierung des Zytokinsignals erst seit kürzerer Zeit deutlichere Konturen zu gewinnen. Es setzt sich aber noch aus einer Reihe von einzelnen Mechanismen zusammen, bei denen die jeweilige Relevanz und das Zusammenspiel im Gesamtkontext noch nicht abschließend geklärt ist.

Rezeptorinternalisierung

Ein bei vielen Rezeptoren analog verlaufender Mechanismus beruht darauf, dass der phosphorylierte $IFN\gamma/IFNGR1$ -Komplex internalisiert wird und in einem angesäuerten endosomalen Vesikel dissoziiert (Farrar and Schreiber 1993). Freies $IFN\gamma$ wird lysosomal degradiert, während der freie Rezeptor einem großen intrazellulären Pool zugeführt und bei Bedarf an die Zelloberfläche zurücktransportiert wird. Die Anzahl der intrazellulär vorhandenen $IFNGR1$ ist in etwa 2-4 mal so groß wie die der auf der Zelloberfläche befindlichen. Dies bietet Spielraum, um schnell über die oberflächenexprimierte Rezeptorzahl die zelluläre Sensitivität für IFN zu modulieren. Neben der Verminderung der $IFNGR1$ -Zahl an der Oberfläche durch $IFN\gamma$ -induzierte Internalisierung, wird auch die $IFNGR2$ -Zahl verringert.

Für CD4⁺-T-Zellen wurde gezeigt, dass die IFNGR2-Expression durch IFN γ -Stimulation abgeschaltet wurde und die Zellen ihre Sensibilität für IFN γ verlieren (Bach, Szabo *et al.* 1995). Die unabhängige Regulation der beiden Rezeptorketten lässt zu, dass IFN γ je nach Bedarf an der Zelloberfläche gebunden werden kann und ein Signal auslöst, gebunden werden kann und kein Signal auslöst (nur IFNGR1) oder aber gar nicht erst gebunden wird, um so andere Zellen zu stimulieren.

Phosphatasen

Eine präzise Steuerung von Ausmaß und Dauer der Aktivierung ist für jeden der phosphorylierten Signalmediatoren essenziell. CD 45 wurde als hämatopoetische Jak-Phosphatase beschrieben, welche das Zytokin-Signal negativ reguliert (Irie-Sasaki, Sasaki *et al.* 2001).

Die negative Wirkung eines Ungleichgewichts zwischen stimulierenden und inhibierenden Signalen zeigt sich am Beispiel der *motheaten*-Maus, bei der die Phosphatase SHP-1 fehlt. Diese Mäuse haben eine deregulierte Zytokinantwort und entwickeln eine systemische Autoimmunerkrankung. Die IFN γ -vermittelte GAF-Aktivierung persistiert in SHP-1-defizienten Zellen (Massa and Wu 1996). Auch für die ungewöhnlich hohe IFN γ -Sensitivität der vaskulären EC-Zellen wird die sehr geringe SHP-1-Expression als Ursache vermutet (Min, Pober *et al.* 1998).

Als hauptsächliche nukleäre Stat1 Tyrosin-Phosphatase wurde die 45kD Splice-Variante der TcPTP (T-Zell Phosphotyrosin-Phosphatase) TC45 beschrieben (Ibarra-Sanchez, Simoncic *et al.* 2000).

Für Stat1 wurde ein Aktivierungs-Inaktivierungszyklus beschrieben, bei dem nach Stat1-Dephosphorylierung im Nukleus und anschließender Relokation ins Zytosol, das Stat1-Molekül wieder zur Aktivierung bereitsteht (Begitt, Meyer *et al.* 2000).

Ubiquitin-Proteasom Abbauweg

Auch eine negative Regulation der Konzentration an phosphoryliertem Stat1 α durch den Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg wurde festgestellt, so dass auf ein Maximum nach 15-30 min ein Abfall auf niedrige Konzentrationen nach 1-2 Stunden folgt (Kim and Maniatis 1996). Eine Verbindung des IFN γ -stimulierten Jak2-Abbaus über den Elongin BC-Komplex wird unter Socs1 behandelt (siehe Abb. 1.5.1).

Socs

CIS das erste Mitglied der Socs-Proteine wurde 1995 als ein Regulator in der Zytokin-Signaltransduktion identifiziert (Yoshimura, Ohkubo *et al.* 1995).

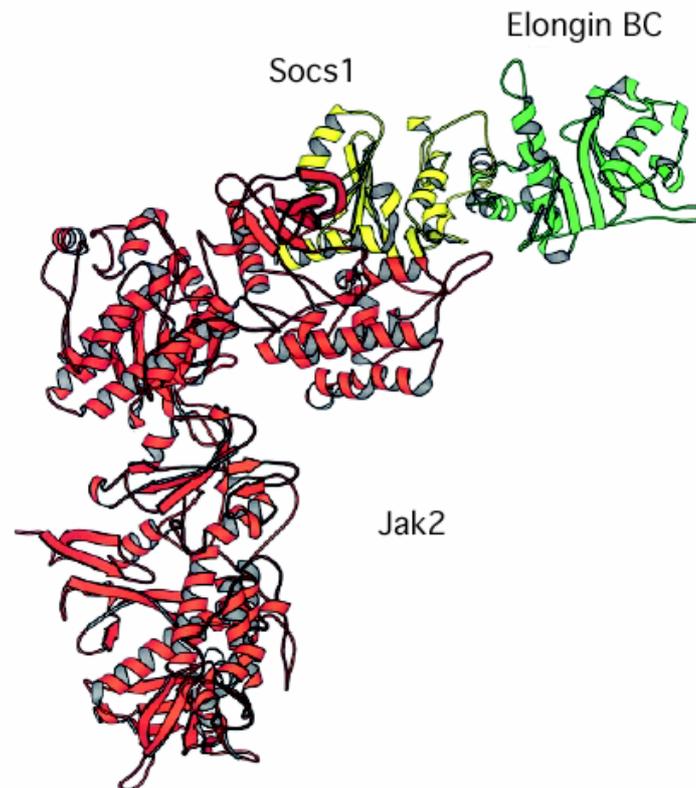


Abb. 1.5.1: räumliches theoretisches Modell der Interaktion von Socs1 (gelb) mit Jak2 (rot) und Elongin BC (grün); aus (Giordanetto and Kroemer 2003)

Socs1 wurde 1997 zeitgleich als negativer Regulator der IL-6-Wirkung (Starr, Willson *et al.* 1997), als Jak-bindendes Protein (JAB), welches mit der JH1-Domäne der Tyrosinkinase Jak2 interagiert und so die Stat-Aktivierung unterdrückt (Endo, Masuhara *et al.* 1997) und als Stat3-induzierbares die Stat3-Signaltransduktion inhibierendes Protein SSI-1 (Stat-induzierter Stat-Inhibitor) (Naka, Narazaki *et al.* 1997) entdeckt.

Spätere Untersuchungen haben gezeigt, dass Socs1 *in vitro* eine große Anzahl an Zytokinen in ihrer Wirkung inhibiert (Sakamoto, Yasukawa *et al.* 1998; Losman, Chen *et al.* 1999; Sporri, Kovanen *et al.* 2001). Neben dem IFN γ sind dies auch IL-2, IL-4, IL-6, Prolaktin, Erythropoietin, LIF und G-CSF. Die Expressionspeaks der quantifizierten mRNA lagen bei ein bis zwei Stunden und unterstreichen somit den Charakter einer schnellen und kurz anhaltenden Gegenregulation.

Durch die Untersuchung von *Socs1*-defizienten Mäusen wurde jedoch eine spezifischere physiologische Rolle des *Socs1* deutlich. *Socs1*^{-/-} Mäuse sterben neonatal an einer inflammatorischen Erkrankung, die durch gesteigerten Fettabbau in der Leber und eine abnormale T-Zell-Aktivierung gekennzeichnet ist (Naka, Matsumoto *et al.* 1998; Starr, Metcalf *et al.* 1998; Marine, Topham *et al.* 1999).

Der Krankheitsverlauf in *socs1*^{-/-} Mäusen ist durch einen erhöhten IFN γ -Spiegel und eine erhöhte Sensitivität gegenüber IFN γ gekennzeichnet. Dies unterstreicht die besondere Bedeutung des *Socs1* für die Regulation der IFN γ -Antwort (Brysha, Zhang *et al.* 2001). Im Gegensatz zu den *socs1*^{-/-} Mäusen überleben *socs1*^{-/-} ifn γ ^{-/-} Mäuse bis ins Erwachsenenalter und erscheinen gesund (Alexander, Starr *et al.* 1999). Neuere Untersuchungen an *socs1*^{-/-} Mäusen stellen eine unkontrollierte Antwort auf das inflammatorische Zytokin IL-12 fest, die zu der erhöhten IFN γ -Produktion und so zur Entwicklung der inflammatorischen Erkrankung führen (Eyles, Metcalf *et al.* 2002).

Es gibt bisher acht Socs-Proteine: *Socs1* – *Socs7*, sowie das zytokininduzierte SRC-Homologie-Protein CIS (Hilton, Richardson *et al.* 1998). Sie alle haben eine zentrale SH2-Domäne und eine carboxyterminal konservierte, 40 Aminosäuren umfassende Domäne, welche als Socs-Box bezeichnet wird (siehe Abb. 1.5.2). Beim *Socs1* ist die SH2-Domäne dabei für die Assoziation mit der Kinase-Domäne (JH1) des *Jak2* verantwortlich (Yasukawa, Misawa *et al.* 1999). Die Socs-Box ist nicht nur bei den Mitgliedern der Socs-Familie vorhanden, sondern bei mindestens 32 anderen Proteinen aus acht verschiedenen Proteinfamilien (Kile, Schulman *et al.* 2002). Die Rolle der Socs-Box ist noch nicht abschließend geklärt, obwohl mehrere Interaktionspartner und dazu passende Modelle gefunden wurden. Ein Modell stützt sich auf die Interaktion mit Elongin BC (siehe Abb. 1.5.1) und stellt eine Verbindung zur Ubiquitinylierung und dem Proteasom-Abbauweg her (Kamura, Burian *et al.* 2001; Giordanetto and Kroemer 2003).

Die Konsequenz aus dem theoretisch über Sequenzvergleiche berechneten Modell in Abb. 1.5.1 wäre demnach ein zweistufiger Inhibitionsmechanismus. Zum einen fände eine direkte sterische Inhibition des aktiven Zentrums der *Jak2* (Yasukawa, Misawa *et al.* 1999) und zum anderen eine Degradation der *Jak2* durch Elongin BC-Rekrutierung statt.

Naka *et al.* haben die Expression der *socs1*-mRNA in verschiedenen murinen Zellen untersucht. Sie wurde ubiquitär exprimiert, besonders stark jedoch in Lunge, Milz und Hoden. Starr *et al.* fanden eine konstitutive *socs1*-Expression im Thymus und in geringerem Ausmaß in Lunge und Milz (Starr, Willson *et al.* 1997).

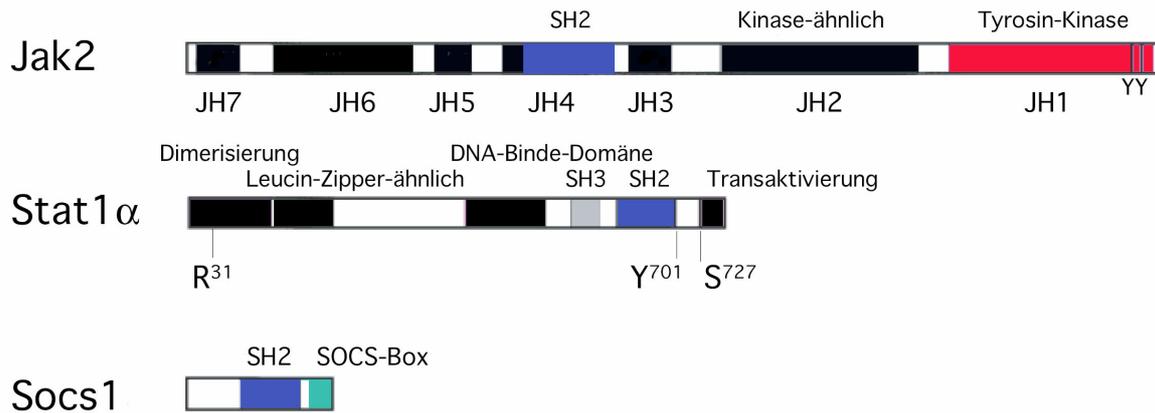


Abb. 1.5.2: schematische Darstellung der Signalmoleküle Jak2, Stat1 α und Socs1
(Jak2: 1132 AS, 130 kD; Stat1 α : 750 AS, 91 kD; Socs1: 211 AS)

Die *socs1*-mRNA-Induktion hängt von einer Aktivierung der Stat-Moleküle ab (Naka, Narazaki *et al.* 1997). In primären murinen Stat1^{-/-} Makrophagen wurde im Gegensatz zu Wildtypzellen kein regulatorischer Effekt von IFN γ auf die *socs1*-mRNA gemessen (Gil, Bohn *et al.* 2001).

Dadurch entsteht ein klassischer negative Rückkopplungsmechanismus, da Socs1 über die SH2-Domäne mit den Jaks wechselwirken und so die Phosphorylierung der Stat-Moleküle inhibieren kann.

Erkenntnisse über den *socs*-Promotor:

In der Maus enthält der Promotor des *socs*-Gens CIS (Matsumoto, Masuhara *et al.* 1997; Verdier, Rabionet *et al.* 1998) funktionale Bindungsstellen für Stat5. Der murine *socs3*-Promotor bindet Stat1 und Stat5 und unterliegt einer negativen Autoregulation durch das gebildete Socs3-Protein (Auernhammer, Bousquet *et al.* 1999).

Der *socs1*-Promotor enthält nach Naka *et al.* Bindungsstellen für Stat1, Stat3 und Stat6 (Naka, Narazaki *et al.* 1997; Saito, Morita *et al.* 2000), was die Induktion durch die verschiedenen Zytokine erklärt. Saito *et al.* haben die IFN γ -Induktion des murinen *socs1* auf ein neues IRF-E/ISRE-ähnliches Element, welches sie als VIRE bezeichneten, zurückgeführt (siehe Abb. 1.5.3, hellgrüner Kasten).

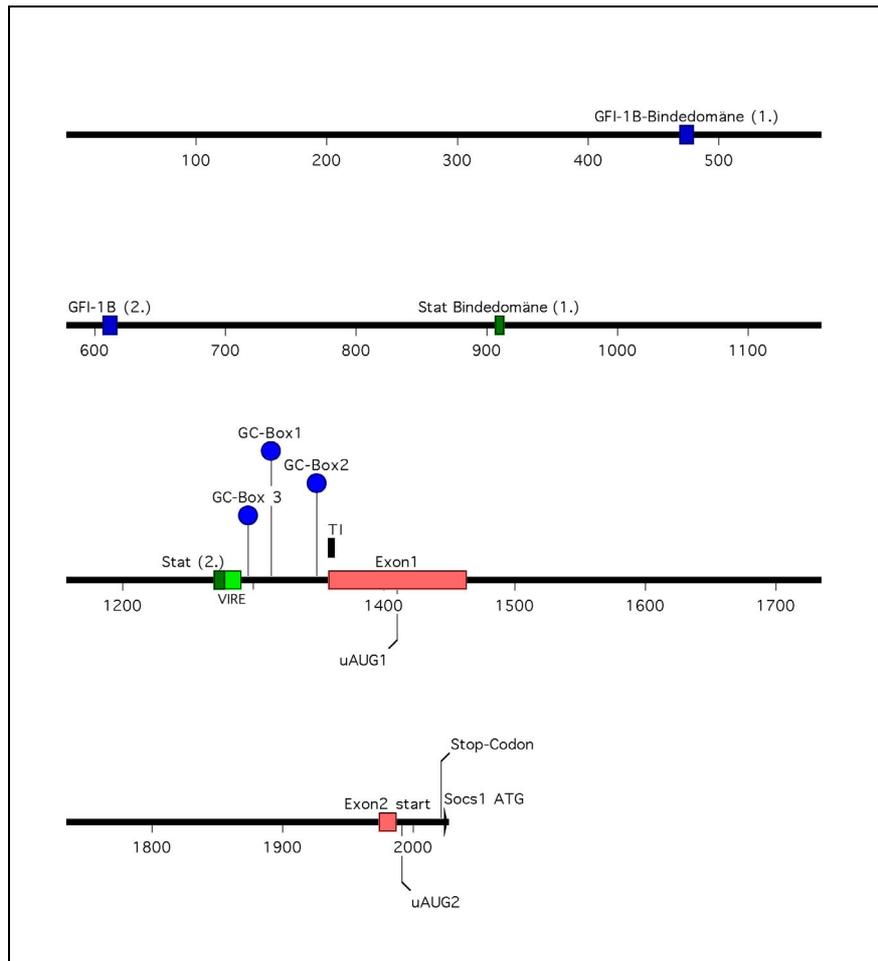


Abb. 1.5.3: schematische Darstellung des murinen *socs1*-Promotors (2026 bp upstream des *Socs1*-Translationsinitiationscodons; blaue Kästen: *Gfi-1B*-Bindeelemente 1 und 2, dunkelgrüne Kästen: *Stat5*-Bindeelemente 1 und 2, hellgrüner Kasten: *IRF-E*-Variante *VIRE*, blaue Kreise: *SP-1* Bindeelemente (*GC-Box 1* und *2* sowie *GC-Box* ähnliches Element *GC-Box*, schwarzer Kasten: sechs benachbarte Transkriptions-Initiationsstellen, rote Kästen: *Exon 1* und *2*, Startcodons *uAUG1* und *uAUG2* in der 5'UTR in Frame mit *Stop-Codon*)

Die theoretisch ermittelten GAS-ähnlichen *Stat1*-Bindungselemente wurden als für die $\text{IFN}\gamma$ -Induktion nicht essenziell beschrieben (Saito, Morita *et al.* 2000). Das neu identifizierte *VIRE*-Elemente bindet *IRF-1* und führte vor ein Luciferasegen kloniert zu einer 3-fachen Induktion nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation. Eine *TATA-Box* sowie eine Initiator-Konsensussequenz wurden nicht festgestellt. Die gemessene konstitutive Expression wurde durch drei theoretisch und funktional identifizierte *GC-Boxen* erklärt.

Für die murine *socs1*-Expression wurde eine Repression der Translation durch die 5'-UTR der mRNA beobachtet. Eine Fusion der *socs1* 5'-UTR und einer Luciferase-RNA führte zu einer 17-fach geringeren Luciferase-Translation (Gregorieff, Pyronnet *et al.* 2000).

Dabei wird vermutet, dass die Translation an den *upstream* AUG-Startcodons (siehe Abb. 1.5.3) initiiert und kurz vor dem *socs1*-AUG terminiert wurde. Dadurch würde eine effiziente Reinitiierung verhindert und die Translationseffizienz entsprechend verringert. Die 5'-UTR ist bei humanem und murinem *socs1* mit einer Sequenzidentität von 75% hochkonserviert. Diese Beobachtung wirft ein neues Licht auf die in vielen Publikationen angegebene starke Induktion der *socs1*-mRNA in ihrer Bedeutung für die zelluläre Socs1-Proteinkonzentration.

Eine Repression des murinen *socs1*-Promotors wurde durch das Proto-Onkoprotein Gfi-1B beschrieben (Jegalian and Wu 2002). Die Zytokininduktion durch EPO führt über eine Stat5-Aktivierung zum einen zu einer Induktion des *socs1*-Promotors über zwei putative Stat5-Bindungsstellen und zum anderen zu einer Derepression durch eine Verringerung der *gfi-1B*-Transkription. Durch die unterschiedliche Kinetik wird eine mehrschichtige Feineinstellung möglich. Die Stat5-Phosphorylierung ist bereits Minuten nach dem Zytokinstimulus maximal, während die Gfi-1B-Konzentration ein bis zwei Stunden später ihren Minimalwert erreicht.

An der murinen Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 wurde die *socs1*-Induktion durch verschiedene Zytokine untersucht. IFN γ zeigte eine starke, IL-6 und TNF- α nur eine geringe und IL-2, IL-4 und TGF- β keine Induktion der *socs1*-mRNA (Saito, Morita *et al.* 2000). Saito *et al* konnten an Stat1 $-/-$ -Fibroblasten zeigen, dass Stat1 für die *irf-1*-mRNA sowie die *socs1*-mRNA-Induktion durch IFN γ essenziell ist.

Eine in 60% der hepatozellulären Karzinom-Zelllinien vorgefundene Stummschaltung des *socs1* konnten Yoshikawa *et al* auf die Methylierung eines CpG-Motivs in der Promotorregion zurückführen. Diese Zelllinien waren zudem durch eine konstitutive Aktivierung des Jak/Stat-Weges gekennzeichnet (Yoshikawa, Matsubara *et al.* 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Socs1 ein nicht redundanter und wesentlicher Regulator der IFN γ -Antwort ist, der durch die Stat1-vermittelte Induktion und eine nachfolgende Inhibition des Jak2 die IFN γ -Signalgebung abzuschalten vermag.

Pias

Die Rolle der Protein-Inhibitoren der aktivierten Stats (Pias) in der negativen Signalgebung wirft zur Zeit noch viele Fragen auf. Im Gegensatz zum *socs1* gibt es noch keine Berichte über *pias1*-defiziente Zellen oder *knockout*-Mäuse. Zuerst wurde Pias3 als ein gegenüber dem ebenfalls durch IL-6 aktivierten Stat1 spezifischer Inhibitor des aktivierten Stat3 identifiziert (Chung, Liao *et al.* 1997). Ein Jahr später wurde Pias1 als das Pendant für die Stat1-Inhibition entdeckt (Liu, Liao *et al.* 1998). Ein Protein, welches N-terminal um neun AS verkürzt und in wenigen AS vom Pias1 abweichend ist, wurde bereits als GBP (Gu/RNA-HelicaseII-Bindeprotein) beschrieben (Valdez, Henning *et al.* 1997). Die im „Yeast-Two-Hybrid“-System nachgewiesene Interaktion mit der Gu/RNA-HelicaseII wurde ausserhalb der Hefe jedoch nicht beschrieben. Die Relevanz der ebenfalls im „Yeast-Two-Hybrid“-System festgestellten Interaktion zwischen Pias1 und Stat1 hingegen wurde durch mehrere Methoden in Säugerzellen bestätigt. Durch Koimmunopräzipitation wurde nach IFN γ -Stimulus die Spezifität für Stat1 gegenüber Stat2 oder Stat3, durch EMSA-Analyse die Inhibition der Stat1-DNA-Bindeaktivität durch Pias1 aber nicht Pias3 und durch einen GAS-Luciferase-Induktionstest durch Pias1 die Inhibition der Stat1-vermittelten Geninduktion belegt. Die Pias-Proteine teilen hochkonservierte Domänen wie eine Zink-Bindedomäne und eine hochazide Region. Liu *et al.* haben weiterhin festgestellt, dass Pias1 nur bei erfolgter Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung koimmunipräzierte und somit eine geringere Affinität zum inaktiven Stat1 aufweist. Im Northern-Blot wurde eine besonders starke testikuläre Expression der 2,2 kb *gbp*-mRNA nachgewiesen (Valdez, Henning *et al.* 1997).

Eine Stat1-Methylierung an Arg³¹ durch PRMT1 ist für die TypI-IFN-induzierte Geninduktion essenziell (Mowen, Tang *et al.* 2001). Der Methyltransferase-Inhibitor Methylthioadenosin (MTA) senkt die Stat1/DNA-Interaktion über eine verstärkte Bindung des Repressors Pias1 an den nichtmethylierten Transkriptionsfaktor Stat1.

In diesem Zusammenhang ist bedeutsam, dass MTA in vielen Tumorzellen und insbesondere Tumorzelllinien akkumuliert. Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) ist ein für den MTA-Katabolismus wichtiges Enzym. Eine dementsprechend verminderte Sensitivität für den IFN β -vermittelten antiproliferativen Effekt wird an *mtap* (-/-) A549-Zellen beobachtet. Nach IFN γ -Stimulus wäre eine Arg³¹-Methylierung des Stat1 in analoger Form vorstellbar. Diese wurde bisher jedoch nicht beschrieben.

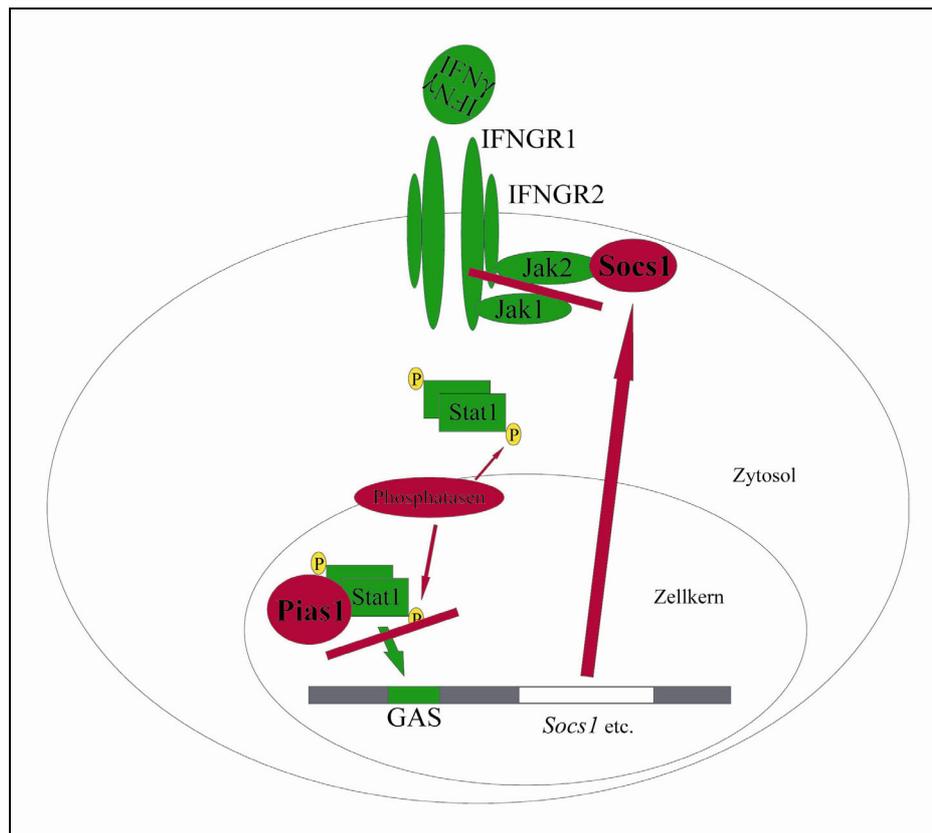


Abb. 1.5.4: schematische Darstellung der negativen $IFN\gamma$ -Signalgebung durch *Socs1*, *Pias1* und Phosphatasen (grün: Signalweiterleitung, rot: Signal-Stop)

Transkriptionsfaktoren

Interferone und andere Zytokine induzieren die Interferon-regulierenden Proteine IRF-1 und IRF-2, die die antivirale und die Immunantwort steuern. IRF-1 induziert die Transkription von IRF-2, MxA, 2'5'-OAS und vielen weiteren Genen. Das Maximum der mRNA-Produktion von IRF-1 wird bereits eine Stunde nach IFN-Stimulus erreicht. Für IRF-2 hingegen erst nach fünf bis acht Stunden. IRF-2 reprimiert die Transkription von IRF-1, 2'5'-OAS und weiteren IFN-stimulierten Genen auf den Basiswert unstimulierter Zellen (Decker 1997; Feng, Petraglia *et al.* 2002). Somit besteht ein zeitlich versetzter negativer Rückkopplungsmechanismus auch auf Ebene der Transkriptionsfaktoren. Die Identifizierung spezifischer niedermolekularer Regulatoren der Transkription ist eine vielversprechende Zielsetzung. Die meisten der zur Verfügung stehenden Transkriptioninhibitoren, wie beispielsweise Histon-Deacetylase-Inhibitoren, üben pan-genomische Effekte aus (Urnov and Rebar 2002) und die Frage, wie wahrscheinlich es ist, einen hochspezifischen niedermolekularen Transkriptioninhibitor zu identifizieren, lässt sich schwer beantworten.

1.6 Assoziation von $IFN\gamma$ mit inflammatorischen Erkrankungen

Die inflammatorische Antwort besteht aus einer sequenziellen Freisetzung von Mediatoren und der Rekrutierung zirkulierender Leukozyten, die am Herd der Entzündung aktiviert werden und weitere Mediatoren freisetzen. Das Abklingen der Entzündung erfolgt über anti-inflammatorische Zytokine und die Akkumulation intrazellulärer negativer Regulationsfaktoren. Die persistierende Aktivierung von Leukozyten ist ein wichtiges Merkmal chronischer Entzündungsreaktionen und legt den Funktionsverlust der negativen Regulationsmechanismen nahe.

Zur Zeit konzentrieren sich klinische Ansätze zur Behandlung inflammatorischer Erkrankungen überwiegend auf die Inhibition der Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren und die Unterdrückung der resultierenden entzündlichen Reaktion. Die positive Signalgebung pro-inflammatorischer Zytokine, wie des $IFN\gamma$, stellt jedoch nur die eine Hälfte – das Anschwellen - der Entzündung dar. Ebenso bedeutend aber bisher weit weniger verstanden, ist das Abklingen der Inflammation durch negative Rückkopplungsmechanismen.

Der insulinabhängige **Diabetes** mellitus ist eine Autoimmunerkrankung, die durch eine inflammatorische Reaktion in und um pankreatische Inselzellen gekennzeichnet ist, die zu einer selektiven Zerstörung von Insulin-sezernierenden β -Zellen führt. Im Tiermodell der NOD-Maus (*nonobese diabetic*) korreliert die *ifn γ* -mRNA-Expression mit der Entwicklung von Insulitis und Diabetes (Schloot, Hanifi-Moghaddam *et al.* 2002). Insulitis und Diabetes entwickelten sich ebenfalls bei transgenen Mäusen, welche $IFN\gamma$ unter der Kontrolle des Insulin-Promotors exprimierten. Mäuse mit einem *ifngr1-Knockout* hingegen entwickeln keinen Diabetes (Wang, Andre *et al.* 1997); ebensowenig mit $IFN\gamma$ -AK behandelte (Campbell, Kay *et al.* 1991). Als ein therapeutischer Ansatz wird daher die Inhibierung des $IFN\gamma$ -vermittelten Signals in Betracht gezogen. Beispielsweise durch die Überexpression des endogenen Inhibitors *Socs1* (Chong, Thomas *et al.* 2001). Ganz geklärt ist die Rolle des $IFN\gamma$ im Krankheitsverlauf des Diabetes mellitus Typ I jedoch nicht. *ifn γ* -knockout-NOD-Mäuse entwickeln – wenn auch verzögert - Diabetes (Hultgren, Huang *et al.* 1996).

Bei der auch als chronische Polyarthritis bezeichneten **Rheumatoiden Arthritis (RA)** handelt es sich um eine mesenchymale Entzündungsreaktion unbekannter Ätiologie. Ein Zusammenhang mit dem $IFN\gamma$ -Spiegel steht bei der RA schon seit langem unter Verdacht.

Vor 15 Jahren noch als mögliches Therapeutikum mit klinisch demonstriertem Nutzen (Lemmel, Brackertz *et al.* 1988) wurde kürzlich unter dem Verdacht des IFN γ als Krankheitsmediator durch die intramuskuläre Injektion von anti-IFN γ -AK gezeigt, dass bei 7 von 30 RA-Patienten bereits nach sieben Tagen eine signifikante Verbesserung des Krankheitsbildes eintrat (Sigidin, Loukina *et al.* 2001).

Die für die Wirtsabwehr gegen Pathogene wie Bakterien, Pilze, Viren und protozoische Parasiten wichtige Bildung der induzierbaren Isoform der NO-Synthase und die damit einhergehende Produktion großer Mengen an NO wird in ihrer Beteiligung am Verlauf der **Multiplen Sklerose (MS)** noch kontrovers diskutiert (Liu, Zhao *et al.* 2001).

Eine Induktion der iNOS ist neben IL-12, TNF α und LPS auch durch IFN γ möglich. Die IFN γ -Konzentrationen sind bei akuten Schüben der MS erhöht und viele bekannte Wirkmechanismen des IFN γ stehen in Einklang mit dem Voranschreiten der MS. Die Behandlung mit IFN β hingegen zeigt für die Patienten einen klaren klinischen Nutzen. Der Wirkmechanismus des IFN β konnte jedoch trotz langjähriger intensiver Bemühungen noch nicht geklärt werden. Es gibt allerdings eine ganze Reihe an Wirkungen, die dem entzündlichen Prozess der MS entgegengerichtet sind. Unter anderem vermindert IFN β die T-Zell-Aktivierung, hemmt die Expression von Adhäsionsmolekülen und inflammatorischen Zytokinen wie INF γ und vermindert die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Obert and Poehlau 2000).

Bei der Autoantikörper- und B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankung **Myasthenia Gravis** hängt der Krankheitsverlauf mit einer erhöhten Konzentration des IFN γ -induzierenden-Faktors IL-18 zusammen (Jander and Stoll 2002).

Ein Kennzeichen des **Systemischen Lupus Erythematodes (SLE)** ist die Bildung von anti-DNA-AK. Carvalho-Pinto *et al* konnten kürzlich zeigen, dass eine effiziente IFN γ -Produktion durch Makrophagen für den Krankheitsverlauf unabdingbar ist (Carvalho-Pinto, Garcia *et al.* 2002). IFN γ steuert dabei die Rekrutierung der Makrophagen ins Interstitium der Niere, induziert die *i-cam*- und *v-cam*-Expression und verstärkt die Inflammation.

Unklar bleibt bei den oben aufgeführten Krankheitsbildern, ob es sich beim erhöhten IFN γ -Spiegel um eine Ursache, oder ein Symptom der Erkrankungen handelt. Da Autoimmunerkrankungen sehr komplexe Veränderungen in der Signalgebung des Immunsystems sind, blieben die dahinterstehenden ursächlichen Mechanismen bisher weitestgehend verborgen, obwohl bereits viele wichtige Parameter als Maß der Deregulation bekannt sind.

1.7 Screeningstrategien

1.7.1 Testsystem

1.7.1.1 Primärassay

Bei der Wahl eines geeigneten ersten Tests auf IFN-modulierende Wirkungen der Prüfsubstanzen wurde nicht die Beschränkung auf einen Nachweis einer Interaktion mit einem der bekannten Mediatoren wie dem IFNGR, den Jaks, dem Stat1, dem Enhancer GAS oder ähnlichem gewählt. Stattdessen wurde ein zellbasierter Assay zur Erfassung der Gesamtheit an bekannten und noch unbekanntem Targets, die für die Weiterleitung des IFN-vermittelten Signals entscheidend sind, etabliert. Als Messparameter wurden aus Gründen einer Maximierung an Targets darum nicht nur Ereignisse, die in der Signaltransduktionskaskade weiter oben liegen, sondern der gesamte Signalisierungsprozess bis hin zur Expression von IFN-induzierten Genen betrachtet. Ein gut erfassbares Ereignis, welches diesen Anforderungen genügt, ist der IFN-vermittelte antivirale Schutzstatus einer Zelle. Dieser lässt sich nach Virusinkubation mit einer Vitalitätsbestimmung ermitteln.

1.7.1.2 Testsubstanzen

Bei etwa der Hälfte der zur Zeit eingesetzten Pharmazeutika handelt es sich um Naturstoffe, bzw. deren Derivate. Darunter sind die bekannteren Beispiele die Acetylsalicylsäure aus Weidenrinde, das Morphinium aus Mohnblumen und das Digoxin aus dem Fingerhut.

Mit etwa 10 Millionen Spezies auf der Erde steht eine einzigartige Bibliothek an Naturstoffen zur Verfügung. Schätzungen zufolge wurde gerade einmal 1 Prozent dieser Biodiversität in pharmakologischen Tests untersucht. Überlässt man die Probenauswahl dem Zufall, so findet man gemessen an bisher durchgeführten Screeningansätzen in etwa 20.000 untersuchten Proben gerade eine den Anforderungen entsprechende Leitstruktur. Durch chemische Variationen können daraufhin Faktoren wie Spezifität, Bioverfügbarkeit oder Toxikologie optimiert werden.

Eine zufallgesteuerte Probenwahl erfordert einen extrem hohen Durchsatz, der nur mit einer weitestgehenden Automatisierung des Testablaufes möglich wird. Eine derart große Probenanzahl ist mit einem halbautomatisierten zellbasierten Ansatz jedoch nicht abzarbeiten.

Damit gewinnt die Frage an Bedeutung, wie sich durch eine geschickte Probenwahl die Trefferwahrscheinlichkeit erhöhen lässt. Zum einen kann man sich durch die symptomatisch erfassten Wirkungen traditionell bei inflammatorischen Erkrankungen eingesetzter Pflanzen ein bereits stattgefundenes ethnopharmakologisches Vorscreening zu Nutze machen. Dabei erhöht sich die Wahrscheinlichkeit auf eine aktive Substanz zu stoßen auf Kosten der Wahrscheinlichkeit dabei neue Substanzklassen zu erschließen. Zum anderen kann man neue Strukturen identifizieren, und dabei eine geringere Trefferwahrscheinlichkeit in Kauf nehmen. Hierfür bieten sich bisher vergleichsweise wenig untersuchte extreme Habitate, wie das Polareis und seine Mikroorganismen als Lieferanten neuartiger Sekundärmetaboliten an.

Obwohl der Schwerpunkt auf dem Screening von Rohextrakten marinen Ursprungs lag, wurden auch einige Pflanzenextrakte mit beschriebener anti-inflammatorischer Wirkung sowie eine Peptid-Bibliothek auf eine mögliche Interaktion mit dem IFN-vermittelten Signaltransduktionsweg untersucht.

Im Allgemeinen ist es bei niedermolekularen Inhibitoren schwer, eine ausreichende Spezifität zu erreichen, da diese im Verhältnis zu den Proteinen sehr klein sind und häufig eine katalytisch aktive Struktur blockieren, welche in verwandten Proteinen häufig konserviert vorliegt. Dies führt dazu, dass die Spezifität derartiger Inhibitoren sich auf ein recht schmales Konzentrationsfenster beschränkt. Der endgültige Beweis der Spezifität, es werde also kein anderer zellulärer Mechanismus inhibiert, ist zudem - man denke an die Unbeweisbarkeit der Nichtexistenz der schwarzen Schwäne Karl Poppers - nicht zu erbringen. Es gilt also, Experimente zu entwickeln, die geeignet sind, immer neu erdachte Spezifitätshypothesen zu falsifizieren.

1.7.1.3 Mögliche Targets

Nahezu alle Aspekte der Zellregulation stehen mit der reversiblen Phosphorylierung entsprechender Proteine in Zusammenhang. Die Anzahl der Kinasen, die das humane Genom kodiert, wird auf etwa 500 geschätzt. Man geht davon aus, dass jede Kinase im Schnitt um die 30 Proteine phosphoryliert. Dies macht Kinase-Modulatoren (in der Regel Inhibitoren) aus pharmakologischer Sicht für eine Vielzahl an Erkrankungen interessant, zeigt aber zugleich die Notwendigkeit eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten.

Die große Auswahl an denkbaren Inhibitionsstellen auf dem Weg des Signals von der Rezeptorbindung bis zu dem entsprechenden IFN γ -modifizierten Proteom macht den Vorteil eines zellbasierten Screeningansatzes deutlich.

Entfernt man sich in der Signaltransduktionskaskade jedoch weiter von der direkten Rezeptor-Ligand-Interaktion, wächst die Wahrscheinlichkeit an Stelle einer spezifischen IFN γ -Modulation eine unspezifische Deregulation vitaler zellulärer Prozesse durch die Probe zu detektieren. Bei der Translation der IFN-induzierten Gene ist so beispielsweise ein Szenario für eine spezifische Inhibition schwerer vorstellbar als bei der Inhibierung des korrekten Rezeptorassemblings. Die mit größerer Wahrscheinlichkeit unspezifischen Zielstrukturen sind in einem zellbasierten Testsystem besonders dann ein großer Nachteil, wenn es sich bei den Proben um Substanzgemische handelt. Ein unspezifischer (zytotoxischer) Inhibitor vermag dabei die Wirkung eines spezifischen Inhibitors in derselben Probe zu maskieren.

Die Möglichkeit spezifisch distal vom IFN-Signal einen oder mehrere der wichtigen IFN-induzierten Mechanismen zu aktivieren oder zu inhibieren, ist durch eine direkte Modulation der entsprechenden Zielproteine wieder vorstellbar.

1.7.2 Reporter-Systeme

Eine veränderte Genexpression ist die Ursache vielfältiger Erkrankungen. Im Hinblick auf inflammatorische und Autoimmunerkrankungen ist es wünschenswert, die Wirkung proinflammatorischer Zytokine zu inhibieren bzw. antiinflammatorische Mechanismen zu aktivieren. Im zellbasierten Testsystem ist bei der Suche nach Inhibitoren jede zytotoxische Substanz zunächst ein Treffer, da sie neben der Schädigung der Zelle auch die Interferon-Antwort verhindert. Die Messung einer Induktion bietet somit den Vorteil, nur im Sinne der erwünschten Wirkung positive Substanzen zu detektieren. Dadurch wird der ansonsten ständig zu erfolgende Abgleich mit der Zellvitalität eingespart. Das Signal für zytotoxische Substanzen wird so nicht mehr zu den Treffern, sondern zu der großen Masse der inaktiven Proben gezählt.

Die Proteine, deren Induktion eine IFN γ -inhibierende Wirkung hat, sind für ein solches System eine interessante Zielgröße (siehe 1.5 Abschaltmechanismen des IFN γ -vermittelten Signals). Da der Nachweis ihrer Induktion auf mRNA- oder Proteinebene mit einem hohen Probendurchsatz in der Regel zu arbeitsintensiv ist, bietet sich eine indirektere aber zugleich leicht miniaturisier- und automatisierbare Alternative an. Die Kopplung des Promotors des interessierenden Proteins mit einem leicht detektierbaren Markerprotein wie dem GFP, der β -Galaktosidase oder der Luciferase stellt dabei ein denkbares Reportersystem für einen Primärtest dar.

1.7.3 Zielsetzung

IFN γ ist aufgrund seiner pleiotropen Wirkweise mit einer Vielzahl von Krankheitsverläufen assoziiert. Sowohl eine übermäßige Stimulation der IFN γ medierten Signaltransduktion, als auch deren Inhibition steht bei bestimmten Indikationen mit einer verminderten bei anderen mit einer erhöhten Pathogenität in Zusammenhang. Um betreffende Krankheiten in ihren molekularen Ursachen verstehen und behandeln zu können, ist eine gezielte Interaktion mit dem IFN γ -Signaltransduktionsweg ein wichtiges bisher pharmakologisch weitgehend unerreichtes Ziel.

Die vorliegende Doktorarbeit ist darauf ausgerichtet, geeignete Screening-Strategien zu entwickeln, mit deren Hilfe Substanzen identifiziert werden können, die sich durch eine Aktivierung oder Inhibierung der IFN γ -Antwort auszeichnen. Anknüpfend daran folgt die Charakterisierung der im Screening-Ansatz als aktiv identifizierten Substanzen.

Eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise das Insulin, das humane Wachstumshormon (hGH), Erythropoietin (Epo), der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) und die Interferone werden als sichere und therapeutisch wirkungsvolle Pharmaka eingesetzt (Arnason 1999; Crawford, Foote *et al.* 1999). Dennoch haben Proteine auch spezifische oftmals ihren Einsatz begrenzende Nachteile. So ist in der Regel keine orale Applikation möglich. Die Entstehung von neutralisierenden Antikörpern (Antonelli 1995), sowie Komplikationen an der Injektionsstelle und suboptimale pharmakokinetische Eigenschaften sind nicht selten. Ein weiterer Nachteil sind die relativ hohen Kosten.

Zur Überwindung dieser Hindernisse wird darum der Einsatz von niedermolekularen Wirkstoffen angestrebt, obwohl eine hochspezifische und zugleich hochaffine Interaktion kleiner Substanzen mit den relativ dazu sehr großen Proteinen weder gegenwärtig durch computergestütztes Design vorhersagbar noch durch rein zufallsgesteuerte Suche in Substanzbibliotheken mit höherer Wahrscheinlichkeit auffindbar ist. Das Ziel ist es dabei, durch die Schaffung geeigneter Testsysteme eine hinreichende Trefferwahrscheinlichkeit zu erreichen, ohne dabei eine fünfstellige Probenanzahl zu benötigen. Daran anschließend folgte die Charakterisierung und Spezifitätsprüfung der als aktiv identifizierten Proben mit zum Teil bereits publizierten zum Teil neu zu etablierenden Methoden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Agarose-Gelkammer	<i>Biometra</i>
Blotapparatur	Semidry Blotter, <i>Biometra</i>
Brutschrank (Zellkultur)	Brutschrank B5060, <i>Heraeus</i>
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot, <i>Zeiss</i>
Luminometer	MicroLumat LB 96, <i>Berthold</i> Fusion HTS, <i>CanberraPackard</i>
Netzgerät	ECPS 500/400, <i>Pharmacia</i>
PAGE-Gelkammer	Mini Twin, <i>Biometra</i>
Pipettierroboter	Biomek 1000, <i>Beckmann</i>
Schüttelinkubator	Modell G25, <i>New Brunswick Scientific Co</i>
Sequenzierautomat	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, <i>Applied Biosystems</i>
Spektralphotometer	Ultrospec 3.000, <i>Pharmacia Biotech</i>
Sterilwerkbank	Gelaire, <i>ICN Biomedicals</i>
Thermocycler	Peltier Thermal Cycler-200, <i>MJ Research</i>
Thermostat	Thermomixer 5436, <i>Eppendorf</i>
Ultraschallprozessor	UP 200H, <i>Dr. Hilscher GmbH</i>
UV-Transilluminator	TI 3, <i>Biometra</i>
Zentrifugen	Avanti J-25, <i>Beckman</i> ; Universal, <i>Hettich</i> Centrifuge 5417R, <i>Eppendorf</i> Minifuge RF, <i>Heraeus</i>

2.1.2 Allgemein verwendete Materialien und Reagenzien

Bakterienwachstumsmedien	<i>Invitrogen</i>
CulturPlate-96, weiss	<i>Packard-Bioscience</i>
DC-Platten	Alugram SIL G/UV ₂₅₄ , <i>Macherey-Nagel</i>
Einweg-Labormaterialien	<i>Sarstedt, Eppendorf</i>
Feinchemikalien, Biochemica	<i>AppliChem, Merck, Roth, Fluka, Riedel de Haën,</i> <i>Sigma-Aldrich, Pierce, Chemicon</i>
Lösungsmittel	<i>AppliChem</i>
DNA-Restriktionsendonukleasen	<i>New England Biolabs (NEB)</i>

DNA-Gewichtsstandard	<i>New England Biolabs (NEB)</i>
Oligonukleotide, HPLC gereinigt	<i>TIB MolBiol</i>
Protein-Molekulargewichtsstandard	<i>BioRad</i>
Nitrocellulosemembran	<i>Schleicher & Schuell</i>
Steriles Kunststoffmaterial	<i>Falcon, Nunc</i>
Sterilfilter	<i>Schleicher & Schuell</i>
Zellkulturmedien	<i>Life Technologies</i>

spezielle Materialien und Chemikalien sind bei den einzelnen Methoden aufgeführt.

2.1.3 Programme

Adobe Photoshop 7.0	<i>Adobe Systems Inc.</i>
Office X for Mac	<i>Microsoft</i>
MacVector 7.1.1	<i>Accelrys Inc.</i>
MatInspector Release professional 6.1 Algorithmus basierend auf:	<i>Genomatix Software GmbH (Frech, Herrmann et al. 1993)</i>
NIH-Image 1.62	<i>U.S. National Institutes of Health</i>
Netphos	<i>Center for Biological Sequence Analysis BioCentrum-DTU Technical University of Denmark</i>
ISIS Draw 2.4	<i>MDL Information Systems</i>

2.1.4 Zelllinien

A549	humane epitheliale Lungenkarzinomzellen adhärent, Propagation in RPMI + 10 % FCS (DSMZ-Nummer: ACC 107)
HepG2	humane epitheliale Leberkarzinomzellen adhärent, Propagation in RPMI + 10 % FCS (ATCC-Nummer: HB-8065)

- 293 humane embryonale Nierenzellen, die mit Adenovirus 5 DNA transformiert wurden
adhärent, Propagation in MEM + 10 % FCS
(ATCC-Nummer: CRL-1573)
- L929 murine Zellen aus subkutanem Bindegewebe
adhärent, Propagation in RPMI + 10 % FCS
Virussuszeptibilität: EMC, VSV
(ATCC: CCL-1)
- CHO-DHFR⁻ Ovarzelllinie aus dem chinesischen Hamster
adhärent, Propagation in MEM α + 10 % FCS
(DSMZ: ACC-126)
- Vero Nierenzelllinie aus der Grünen Meerkatze
(*Cercopithecus aethiops*)
adhärent, Propagation in MEM + 10 % FCS
Virussuszeptibilität: *Vaccinia*
(ATCC: CCL-81)

2.1.5 Viren

- EMC *Encephalomyocarditis Virus (Picornavirus)*, murin
lytisches umhülltes ssRNA-Virus, mRNA
Propagation in L929-Zellen
(ATCC-Nummer: VR-129B)
- VSV *Vesicular Stomatitis Virus (Rhabdovirus)*
lytisches umhülltes ssRNA-Virus, mRNA-komplemetär
Propagation in L929-Zellen
(ATCC-Nummer: VR-1239CAF)

Vaccinia Virus WR *Vaccinia* Virus Western Reserve (*Orthopoxvirus*)
 dsDNA- Virus ohne RNA-Stufe
 Propagation in Vero-Zellen
 (ATCC-Nummer: VR-119)

2.1.6 Bakterienstämme

Zur Klonierung und Präparation von Plasmiden wurden verschiedene Stämme von *E.coli* (*Escherichia coli*) K12 mit folgendem Genotyp verwendet:

JM 105 F' *traD36 lacI^q Δ(lacZ) M15 proA⁺B⁺/thi rpsL (Str^r) endA sbcB15*
hsdR4 (r_K⁻ m_K⁺) Δ(lac-proAB)

JM109 *thi, recA1, gyrA96, hsdR17,(r_K⁻ m_K⁺), relA1, supE44,*
Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^q ZΔM15]

TOP10 F', *ΔmcrA, (mrr-hsd RMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74,*
deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, ga/U, ga/K, rpsL,
endA1, nupG

SoloPack[®] Gold *Tet^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1*
 (Stratagene) *recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy*
Cam^R J'

Die Bakterien wurden in 2xYT-Medium bei 37°C und 300 Upm im Schüttelinkubator propagiert.

2.1.7 Vektoren

pEGFP1	<i>Clontech</i> promotorloser Reportervektor zur Expression von <i>enhanced green fluorescent protein</i> Resistenzen: Kanamycin prokaryotisch Neomycin eukaryotisch Größe: 4.151 bp
pEGFP-C1	<i>Clontech</i> zur Expression C-terminal mit EGFP fusionierter Proteine konstitutive Expression durch <i>CMV</i> -Promotor Resistenzen: Kanamycin prokaryotisch Neomycin eukaryotisch Größe: 4.731 bp
pBlue-TOPO	<i>Invitrogen</i> promotorloser Reportervektor zur Expression von β -Galaktosidase Resistenzen: Ampicillin prokaryotisch Neomycin eukaryotisch Größe: 7.793 bp
pTA-Luc	<i>Clontech, Mercury Pathway Profiling Luciferase System 5</i> promotorloser Reportervektor zur Expression von <i>Photinus</i> -Luciferase Resistenzen: Ampicillin prokaryotisch Größe: 4.871 bp

- pGAS-Luc *Clontech, Mercury Pathway Profiling Luciferase System 5*
 GAS-regulierte Expression von
Photinus-Luciferase
 in pTA-Luc eingefügte GAS-Promotor-Sequenz (2x):
 AGGTTTCCGGGAAAGCAGTAGGTTTCCGGGAAAGC
 Resistenzen:
 Ampicillin prokaryotisch
 Größe: 4.846 bp
- pISRE-Luc *Clontech, Mercury Pathway Profiling Luciferase System 5*
 ISRE-regulierte Expression von
Photinus-Luciferase
 in pTA-Luc eingefügte ISRE-Promotor-Sequenz (5x):
 CGAGCTCTTACGCGTGCTAGCGAAACTGAAACTGAAACTG
 AAAGCTGAAACTGAAACTGAAACTGAAACTGAAACTGAAACT
 Resistenzen:
 Ampicillin prokaryotisch
 Größe: 4.891 bp
- pAG60-neo Selektionsplasmid
 Resistenzen:
 Ampicillin prokaryotisch
 Neomycin eukaryotisch
 (Colbere-Garapin, Horodniceanu *et al.* 1981)
- pPuromycin Selektionsplasmid
 Resistenzen:
 Ampicillin prokaryotisch
 Puromycin eukaryotisch
 Größe: 4.200 bp
 (de la Luna, Soria *et al.* 1988)
 Die beiden Selektionsplasmide wurden freundlicherweise von
 PD Dr. H. Hauser (GBF, Braunschweig) zur Verfügung gestellt

2.1.8 Puffer und Lösung

SDS-PAGE Elektrodenpuffer

Anodenpuffer
25 mM Tris pH 8,0

Kathodenpuffer
25 mM Tris pH 8,0
250 mM Glycin
0,1 % SDS

SDS-PAGE Trenngel (10%)

10 % Acrylamid/Bisacrylamid
0,1 % SDS
375 mM Tris/HCl pH 8,8
0,1 % APS
0,05 % TEMED

SDS-PAGE Sammelgel (5 %)

5 % Acrylamid/Bisacrylamid
0,1 % SDS
125 mM Tris/HCl pH 6,8
0,19 % APS
0,05 % TEMED

Coomassie-Entfärbelösung

40 % Methanol
10 % Essigsäure
50 % Aqua bidest

Coomassie-Färbelösung

0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue
in Entfärbelösung aufgenommen

5x Laemmli-Puffer

250 mM Tris pH 6,8
10 % (w/v) SDS
10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
0,2 % (w/v) Bromphenolblau
50 % (w/v) Glycerin

DNA-Probenpuffer

0,25 % Bromphenol Blau
0,25 % Xylene Cyanol FF
30 % Glycerin
in Aqua bidest bei 4° C gelagert

PBS (*phosphate buffered salt solution*)

150 mM Natriumchlorid
20 mM Natriumdihydrogenphosphat
/Dinatriumhydrogenphosphat

Transferpuffer pH 8,3

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol

TAE-Puffer pH 7,4

40 mM Tris
1,0 mM EDTA
0,11 % (v/v) Essigsäure

TBE-Puffer pH 8,3

125 mM Tris
 40 mM Borsäure
 2,5 mM EDTA
 0,11 % (v/v) Essigsäure

TE-Puffer pH 8,0

10 mM Tris
 1,0 mM EDTA

TBST-Lösung

25 mM Tris-HCl pH 7,4
 125 mM Natriumchlorid
 5,0 mM Magnesiumchlorid
 0,05 % Tween20

AP-Puffer

100 mM Tris pH 9,5
 100 mM Natriumchlorid
 5,0 mM Magnesiumchlorid

DNA-Agarosepuffer

10 % Glycerin
 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
 0,025 % (w/v) Xylencyanol

2 x YT Medium

16 g Trypton,
 10 g Hefeextrakt
 5 g NaCl ad 1l H₂O

Das Medium wurde autoklaviert, bei RT gelagert. Nach Antibiotikazugabe Lagerung bei 4°C für bis zu 4 Wochen

SOCS Medium

2 % Trypton
 0,5 % Hefe-Extrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgSO₄
 20 mM Glukose

sterilfiltriert (0,2 µm) und bei RT gelagert

TSS (transformation and storage solution)

10 % (w/v) PEG 6.000
 5 % (v/v) DMSO
 50 mM MgCl₂

in 2 x YT Medium gelöst und autoklaviert

Selektivagar

12 g/Agar in 2 x YT Medium

nach dem Autoklavieren wurde der Agar durch Erhitzen auf 50° C verflüssigt, je nach Resistenzgen mit einer finalen Konzentration von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin versetzt und in Petrischalen gegossen. Lagerung bei 4° C für bis zu 4 Wochen

β-Galaktosidase-Assay:**Zell-Lyse-Puffer pH 8,0**

0,25 M Tris

Cleavage Buffer pH 7.0

60 mM Na₂HPO₄
 40 mM NaH₂PO₄
 10 mM KCl
 1 mM MgSO₄

ONPG

4 mg/ml ONPG

in 2 ml-Aliquots bei -20°C gelagert

β-Gal Stop-Puffer1 M Na₂CO₃**Transfektion:****2xHEPES-buffered saline (HBS) pH 7,05**

140 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄

50 mM HEPES

sterilfiltriert (0,2 μm) und bei -20°C gelagert

MTT oder MTS Lösung

2 mg/ml MTT bzw. MTS

in PBS gelöst, sterilfiltriert (0,2 μm) und bei 4°C gelagert

Luciferase-Substrat+Lysis-Puffer

60 mM Tricine (pH 7.8)

16 mM Magnesiumacetat

0,4 mM EDTA

250 μM Luciferin

20 % Triton X-100

1,4 % β-Mercaptoethanol

1,5 mM ATP

Zellfraktionierung:**Zytosol-Lysis-Puffer**

10 mM HEPES

10 mM KCl

0,1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

1 mM DTT

0,5 mM PMSF

Nukleus-Lysis-Puffer

20 mM HEPES

0,4 M NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

1 mM DTT

1 mM PMSF

2.2 Methoden

2.2.1 Antiviraler Assay

Der Antivirale *Assay* (AVA) basiert auf der Quantifizierung der Schutzwirkung von Zellen vor dem zytopathischen Effekt durch eine virale Infektion. Diese wird durch eine verminderte Zellyse detektierbar. Für den AVA wurde eine humane adhärente epitheliale Lungenkarzinomzelllinie (A549) mit dem *EMC*-Virus infiziert. Das biologisch aktive Interferon bewirkt einen antiviralen Schutz der Zellen. Per Definition entspricht die Konzentration, die 50 % der Zellen Schutz bietet, einer internationalen Einheit (IU) an IFN. 1 mg an rhuIFN γ entspricht dabei $2 \cdot 10^7$ IU.

Je 100 μ l einer Zellsuspension an A549-Zellen (2×10^5 Zellen/ml RPMI + 10 % FCS) wurde in einem *well* in einer 96-*well*-Mikrotiterplatte ü.N. bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Durch die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Interferon-haltigen Fraktionen für eine Stunde konnte sich ein antiviraler Schutzstatus der Zellen ausbilden bevor das *EMC*-Virus hinzugegeben wurde. Der Virustiter wurde so gewählt, dass nach einer 18 – 24-stündigen Inkubation, die nicht geschützten Zellen vollständig lysiert waren. Abschließend fand die Ermittlung der Zellvitalität entweder mittels der MTT-Reduktionsmethode (quantifizierend) oder beispielsweise zum Ausschluss einer Wechselwirkung einer Testsubstanz mit der MTT-Reduktion mit 0,1 % (*w,v*) Kristallviolett (qualitativ: vital-lysiert) statt. Als Standard mit bekannter biologischer Aktivität wurde laborintern hergestelltes rhuIFN γ verwendet, welches gegen den WHO-Standard abgeglichen worden ist. Als Negativkontrolle wurden A549-Zellen ohne IFN-Inkubation mit Virus versehen und somit nach 18 - 24 h lysiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen weder mit Interferon noch mit Virus inkubiert und blieben vital.

2.2.2 Modifizierter Antiviraler Assay (*Screening-Primärassay*)

Beim veränderten AVA wurde zusätzlich auf eine Inhibition der antiviralen Wirkung von IFN γ getestet. Dazu wurden die A549 Zellen mit den Proben für 2 h vorinkubiert, daraufhin mit 100 IU/ml IFN γ für 1 h inkubiert und dann mit einer EMC-Virus-Konzentration versehen, welche die IFN-unbehandelten, ungeschützten Zellen innerhalb von 18-22 h vollständig lysierte (siehe Abb. 2.2.1).

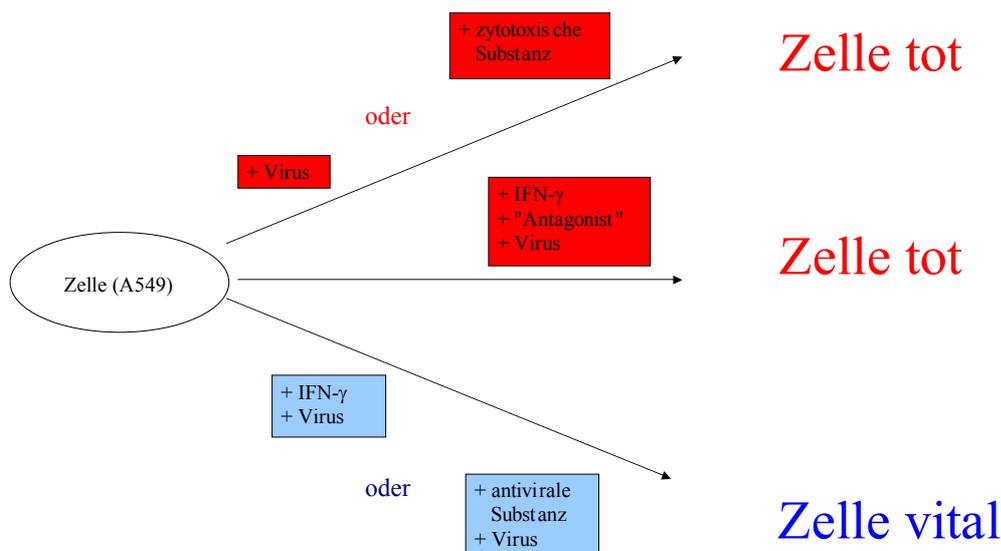


Abb. 2.2.1: schematische Darstellung des Primärscreenings

Der Primärassay, in dem dieser modifizierte AVA eine wesentliche Komponente bildet, wurde nach einem halbautomatisierten Pipettiervorgang vom Biomek1000 nach folgendem Schema durchgeführt:

Die zumeist in DMSO gelösten Proben wurden 1:20 in RPMI-Medium verdünnt auf 96-well-Mikrotiterplatten aufgetragen (2 Proben pro Platte). Die Spalten 1 bis 4 dienten einer Zytotoxizitätskontrolle. Dabei bilden die Reihen A und B ohne Substanzzugabe eine 8-fach-Bestimmung der Vitalkontrolle. Die Reihen C-E und F-H werden von Spalte 1 bis 4 mit jeweils um den Faktor 10 verringerter Substanzkonzentration zweier Testsubstanzen inkubiert und ergeben 3-fach-Bestimmungen für die Zytotoxizität über 4 Verdünnungsstufen (1:200, 1:2.000, 1: 20.000 und 1: 200.000).

Die Spalten 5-8 wurden zur Ermittlung der antiviralen Eigenschaft analog mit den beiden Proben beladen und zusätzlich nach einer dreistündigen Probeninkubation mit *EMC*-Virus versetzt. Das letzte Drittel der Mikrotiterplatte wurde nach dem gleichen Muster mit den Proben beladen, nach 2 h Probeninkubation für 1 h mit 100 IU/ml IFN γ geschützt und dann mit *EMC*-Virus über etwa 20 h bis zu einer möglichst vollständigen Zelllyse der ungeschützten Zellen (Viruskontrolle) bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Tab. 2.2.1: schematischer Belegplan des Primärscreenings (96-well-plate)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Zytotoxizitätsbestimmung				Viruslyse				IFN γ -Virusschutz			
A	Kontrolle				Kontrolle				Kontrolle			
B												
C	Probe 1				Probe 1				Probe 1			
D												
E												
F	Probe 2				Probe 2				Probe 2			
G												
H												
Verdünnung	1 zu 200	1 zu 2.000	1 zu 20.000	1 zu 200.000	1 zu 200	1 zu 2.000	1 zu 20.000	1 zu 200.000	1 zu 200	1 zu 2.000	1 zu 20.000	1 zu 200.000

Betrachtet man das Verhältnis von IFN γ -Molekülen im Verhältnis zur Testsubstanz in den einzelnen Verdünnungen, erhält man unter den Annahmen für eine getestete Reinsubstanz ($M_w = 250$ g/mol, $c = 10$ g/l bzw. 40 mM) und IFN γ ($M_w = 20$ kD, 2×10^7 IU/mg) in der geringsten 200-fachen Verdünnung einen molekularen Testsubstanzüberschuss von 800.000 Testmolekülen zu einem IFN γ -Molekül und in der höchsten 200.000-fachen Verdünnung von 800:1. Für den betrachteten Fall wird für die Testsubstanz ein Konzentrationsfenster von 200 μ M bis 200 nM getestet.

2.2.3 Extraktion von Medizinalpflanzen

Die entsprechend ihrer antiinflammatorischen Eigenschaft ausgewählten traditionellen Heilpflanzen aus Nepal lagen als fein zermahlene Pulver vor. 10 g des Pflanzenmaterials wurden mit 100 ml H₂O ü.N. bei 37°C bei 200 Upm in einem 1 l Erlenmeyerkolben extrahiert. Nach Zentrifugation über 45 min bei 10.000 Upm wurde der Überstand sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4°C gelagert. Dieser wässrige Rohextrakt wurde für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Tab. 2.2.2: getestete Medizinalpflanzen aus Nepal

Botanische Bezeichnung	Familie	zugeschriebene Aktivitäten gegen
Adhatoda vasica	Acanthaceae	Bronchitis, Husten, Fieber, Tbc
Boerhavia diffusa	Nyctaginaceae	Erysipelas
Asparagus racemosus	Liliaceae	Fieber, Glossitis, Rheumatismus
Tribulus terrestris	Zygophyllaceae	Inflammation, Psoriasis, Rheumatismus, Hepatitis
Azadirachta indica	Meliaceae	Verbrennungen, Fieber, Rheumatismus, Smallpox
Tinospora cordifolia	Menispermaceae	Asthma, bacterizid, Fieber, Inflammation, Gelbsucht, Rheumatismus, Tbc
Emblica officinalis	Euphorbiaceae	Inflammation
Convolvulus arvensis	Convolvulaceae	Fieber, Krebs
Trachyspermum ammi	Apiaceae	Asthma, Bronchitis, Fieber, Rheumatismus, Tbc
Aegle marmelos	Rutaceae	Fieber, Tumore

(Herkunft: Mana Bajra Bajracharya, Kathmandu, Nepal)

Die taiwanesischen Heilpflanzen wurden als getrocknete Pflanzenteile zugesandt und wurden zunächst noch weiter grob zerkleinert. 3g Pflanzenmaterial wurden mit 30 ml Ethanol ü.N. bei 37°C und 200 Upm Schütteln extrahiert. Die Suspension wurde bei 10.000 Upm 45 min zentrifugiert, der Überstand sterilfiltriert (0,2 µm) und ein 10 ml- Aliquot im N₂-Strom zur Trockne eingengt. Die Probe wurde in 500 µl DMSO gelöst, bei 4°C gelagert und für die weiteren Tests eingesetzt.

Tab. 2.2.3: getestete Medizinalpflanzen aus Taiwan

Botanische Bezeichnung	Familie	zugeschriebene Aktivitäten gegen
<i>Atractylodes macrocephala</i> koidz	Asteraceae	Bronchitis, virizid
<i>Dioscorea bulbifera</i> L.	Dioscoreaceae	Inflammation, Krebs
<i>Notopterygium incisum</i> .	Apiaceae	Arthritis, Rheumatismus
<i>Glutiana scabra</i> Bunge	Gentianaceae	Inflammation, Rheumatismus
<i>Rubia cordifolia</i>	Rubiaceae	Arthritis, Inflammation
<i>Clematis chinensis</i> Osbeck	Ranunculaceae	Arthritis, Rheumatismus
<i>Ephedra sinica</i> stapf.	Ephedraceae	Arthritis, Bronchitis, Heuschnupfen, Fieber
<i>Dipsacus japonicus</i> Mig	Dipsacaceae	Rheumatismus, Krebs
<i>Panax ginseng</i>	Araliaceae	Asthma
<i>Zizyphus spinosus</i>	Rhamnaceae	Inflammation

(Herkunft: Link Takeo Co., Ltd; Taipei, Taiwan)

Die angegebenen Aktivitäten sind in der *online*-Datenbank Ethnobotanical Databases von Dr. Duke beschrieben. Die Einteilung in taiwanesische und nepalesische Medizinalpflanzen entspricht nicht der jeweiligen Volksmedizin, sondern der Herkunft.

2.2.4 Dünnschichtchromatographie

Eine erste grobe Trennung von Aktivitäten sowie ein erster Aufschluss über die molekulare Zusammensetzung der komplexen Rohextrakte wurde mittels einer Dünnschichtchromatographie (DC) auf einer mit einem Fluoreszenzindikator versehenen kieselgelbeschichteten Aluminiumfolie in 80% MeOH erzielt. Die Visualisierung erfolgte unter UV oder mit entsprechenden Sprühreagenzien (5% Schwefelsäure in MeOH, Anisaldehyd etc.). Entsprechend visualisierte Substanzen konnten von den Platten isoliert und weitergehend untersucht werden. Für die weiteren Untersuchungen in biologischen Tests ist eine vorherige Behandlung mit Sprühreagenzien vermieden worden.

2.2.5 Gesamtzelllysate

4×10^5 Zellen (A549 oder 293) wurden in 1 ml RPMI-Medium mit 10 % FCS in eine 24-well-Platte ausgesät und ü.N. zum Adhären im Brutschrank inkubiert. Die Zellen hatten danach eine 100% ige Konfluenz und wurden mit RPMI ohne Serumzusatz nochmals ü.N. inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 h vor der Stimulierung das Medium nochmals erneuert, um den basalen Anteil des durch sekretierte Wachstumsfaktoren phosphorylierten Stat1 zu minimieren.

Die Zellen wurden mit den zu untersuchenden Substanzen stimuliert und nach Ablauf der Inkubationsdauer in einem geeigneten Volumen von in der Regel 500 μ l 5x-SDS-Probenpuffer unter Zuhilfenahme eines Zellschabers in ein 1,5 ml RG überführt.

Die Probe wurde durch Ultraschall und Erhitzen auf 95°C für 5 min solubilisiert und durch die Denaturierung vor enzymatischer Degradation oder Dephosphorylierung geschützt und entweder direkt für eine SDS-Gelelektrophorese eingesetzt oder bei -20°C verwahrt.

2.2.6 Zellfraktionierung

Vollständig konfluent gewachsene Zellen wurden in einer 60 mm Zellkulturschale über den gewünschten Zeitraum stimuliert und abschließend 3 mal mit zusatzfreiem Medium gewaschen und mit einem Zellschaber abgelöst. Nach Zentrifugation (2.000 Upm, 10 min, Minifuge RF) wurde das Zellpellet in 400 μ l Zytosol-Lysis-Puffer resuspendiert und zur hypotonen Lyse 15 min auf Eis inkubiert. Auf die Zugabe von 25 μ l Nonidet P-40 folgte Vortexen für 10 s und eine erneute Zentrifugation (14.000 Upm, 10 min, Centrifuge 5417R). Der Überstand wurde als zytosolische Proteinfraction bei -20°C verwahrt und das Pellet in 50 μ l Nukleus-Lysis-Puffer zur hypertonen Lyse resuspendiert. Nach 15 min kräftigem Schütteln auf Eis und Zentrifugation (14.000 Upm, 10 min, Centrifuge 5417R) wurde der Überstand als nukleäre Proteinfraction und das Pellet bei -20°C aufbewahrt.

2.2.7 SDS-PAGE

Die Analyse von Proteinlösungen erfolgte durch denaturierende, diskontinuierliche Elektrophorese (Laemmli, 1970). Es wurde das Gelsystem Minigel Twin G42 von Biometra benutzt. Die 8,0 × 6,5 cm großen Gele besaßen eine Schichtdicke von 1 mm.

Gelzusammensetzung für zwei 10%ige Gele:

Tab. 2.2.4: SDS-Gelzusammensetzung

Komponente	Sammelgel	Trenngel
H ₂ O	3,3 ml	10 ml
PAGE-Lösung A	1 ml	10 ml
PAGE-Lösung B	-	10 ml
PAGE-Lösung C	1,4 ml	-
APS (0.1 % w/v)	55 µl	160 µl
TEMED (1:2000 v/v)	2,5 µl	8 µl

Nach Zugabe von Polymerisationsinitiator und -katalysator wurden für das Trenngel 6 ml in die Elektrophoresekammer gefüllt und mit *iso*-Butanol überschichtet, um eine gleichmäßige Grenzschicht auszubilden. Nach 30-minütiger Polymerisation bei RT wurde das Butanol abgesaugt und das Trenngel (10 % Acrylamid/Bisacrylamid) mit 2 ml Sammelgel (5 % Acrylamid/Bisacrylamid) überschichtet. Abschließend wurde je nach Probenzahl ein 10er oder 16er-Probenkamm eingesetzt.

Das Probenvolumen betrug 5 - 15 µl. Bei sehr geringen Proteinkonzentrationen wurden die Proteine durch Zugabe von TCA auf 10% (w/v) und Stehenlassen auf Eis für 30 min gefällt. Nach Abzentrifugieren wurde das irreversibel präzipitierte Protein in 2xProbenpuffer resuspendiert und mit 1 M TrisHCl-Lösung ein basischer pH-Wert eingestellt, der am Farbumschlag des pH-Indikators Bromphenolblau im Probenpuffer von gelb nach blau erkennbar ist.

Zur vollständigen Denaturierung der Proben wurden sie für 5 min bei 95°C im Thermoblock erhitzt und danach in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese im Sammelgel fand bei 12 mA statt. Für die Trennung wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht. Die Auftrennung wurde abgebrochen, wenn der Farbmarker des Probenpuffers die untere Gelgrenze erreicht hatte.

Zur Abschätzung der Molekulargewichte wurden je nach zu detektierender Größe entsprechende Größenmarker aufgetragen.

2.2.8 Western-Blot

Um eine spezifische Färbemethode handelt es sich beim Western-Blot, bei dem die aufgetrennten Proteine (Burnette 1981) nach dem Semi-Dry-Blot-Verfahren elektrophoretisch auf Nitrocellulosemembran transferiert und so für die immunchemische Detektion fixiert wurden.

Die Blot-Apparatur besteht aus zwei parallel angeordneten Elektroden, zwischen die das Gel und die Nitrocellulosemembran gelegt werden. Der Elektrotransfer wurde mit dem Biometra-System (Fastblot B44; *Biometra*) durchgeführt. Der Transfer fand bei 100 mA über 30 min statt. Zur Überprüfung des Blotvorganges und Kennzeichnung des LMW-Markers mit einem weichen Bleistift wurde eine reversible 3 minütige Färbung mit Ponceaurot S (1:20 verdünnt) (*Sigma*, Deisenhofen) vorgenommen. Die Membran wurde bei -20°C gelagert oder direkt der Immunfärbung unterzogen.

2.2.8.1 Immunfärbung

Die Färbung der gekoppelten Immunreaktion entsteht durch Dephosphorylierung von BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat) durch alkalische Phosphatase (AP). Die sich anschließende Redox-Reaktion des Produktes mit NBT (Nitro Blue Tetrazolium) bewirkt eine lokale Präzipitation, die als blau-schwarze Bande erkennbar ist. Der sekundäre Antikörper ist AP-gekoppelt.

Die Immunfärbung fand unter Schwenken bei RT statt. Die Inkubationen wurden für jeweils 1 h durchgeführt. Zunächst wurde die Nitrocellulosemembran zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen in 10 ml 10 % Milchpulver/TBST-Puffer überführt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde der erste Antikörper zur Lösung gegeben (2 µl zu 10 ml TBST). Nach der Inkubation und dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer wurde mit dem zweiten Antikörper inkubiert (1 µl zu 10 ml TBST). Nach erneutem Waschen wurde der Blot zur Umpufferung mit AP-Puffer gespült. Die Färbung fand im Dunkeln in frisch hergestellter NBT/BCIP-Färbelösung bis zur ausreichenden Sichtbarwerdung der Banden statt und wurde durch intensives Spülen der Membran mit Wasser beendet.

verwendete Antikörper:

Primäre AK:

Anti-Jak2 pYpY^{1007/1008}, polyklonaler Kaninchenantikörper, 0,5 mg/ml, *BioSource*

Anti-Stat1 P-Y⁷⁰¹, polykloner Kaninchenantikörper, phosphospezifisch gegen Tyr⁷⁰¹,

Immunogen: synthetisches phospho-Tyr⁷⁰¹ Peptid analog den AS 694-705 (DGPKTGYIKTE) des huStat1, *Calbiochem*

Anti-Stat1, polyklonaler Kaninchenantikörper, 1 mg/ml,

Immunogen: Peptid analog den AS 712-750 des huStat1 α , keine Kreuzreaktivität mit murinem Stat1 α und dem 84 kDa huStat1 β , *Chemicon*

Anti-Phospho-Tyrosine (P-Tyr-102), muriner monoklonaler Antikörper, 1 μ g/ml, *Cell-Signaling Technology*

Pias 1/3 (N-18), polyklonaler Ziege-Antikörper, gegen aminoterminaler Sequenz des humanen Pias1 gerichtet, 200 μ g/ml, *Santa-Cruz Biotechnology*

Sekundäre AK (AP-gekoppelt):

Anti-rabbit IgG (Fc) AP-conjugate, 1 mg/ml; *Promega*

Anti-mouse IgG (Fc) AP-conjugate, 1 mg/ml; *Promega*

Anti-goat IgG (Fc) AP-conjugate, 1 mg/ml; *Promega*

2.2.9 Antiproliferativer Assay

Der wachstumshemmende Effekt von IFN γ bzw. putativ synergistisch wirkender Proben wurde ebenfalls an der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 untersucht.

Eine geringere Ausgangszellzahl sowie eine längere Inkubationszeit machen es anders als bei der Bestimmung der Zytotoxizität möglich, die wachstumshemmende Wirkung zu detektieren. Eine zytotoxische Wirkung macht sich in diesem Test jedoch ebenso bemerkbar und ist nur schwer von der antiproliferativen Wirkung zu trennen. Liegt die Zellvitalität unter der der zytostatischen Kontrolle (1 μ g/ml Actinomycin D), weist dies auf die über eine reine Proliferationshemmung hinausgehende Toxizität der Probe hin.

Eine einfache qualitative Unterscheidung ist auch durch die mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie vor der Vitalfärbung möglich.

Auf einer 96-well-Mikrotiterplatte wurden je Kavität 1×10^4 Zellen ausgesät. In einer separaten Mikrotiterplatte wurde eine Verdünnungsreihe für die entsprechenden Proben in 100 μ l RPMI-Medium mit 10% FCS erstellt. Diese 100 μ l der Probenverdünnung wurden zu den 100 μ l Zellsuspension pipettiert und für 72 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Als Wachstumskontrolle wurden Zellen nur mit Medium inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Bestimmung der relativen Zellzahl mittels MTT-Reduktionstest.

2.2.9.1 MTT-Reduktionstest

Bei dieser spektrophotometrischen Vitalitätsbestimmung macht man sich die Proportionalität zwischen Zellvitalität und der Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen zunutze, welche den Farbstoff MTT reduzieren (Mosmann 1983).

Betrachtungen zur Sensitivität der MTT-Methode zeigten die besondere Eignung zur IFN-Quantifizierung (Berg, Hansen *et al.* 1990). Beim Vergleich verschiedener Lösungsmittel wurde DMSO zur Formazan-Solubilisierung bevorzugt (Carmichael, DeGraff *et al.* 1987).

Nach Abschlagen des Zellkulturüberstandes wurden die Zellen mit 25 µl MTT-Lösung pro Kavität einer 96-well-Mikrotiterplatte versehen und für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Solubilisierung des wasserunlöslichen violetten Formazans wurden 125 µl DMSO zugesetzt und die Mikrotiterplatte bei 200 Upm für 5 min bei RT geschüttelt. Die Extinktionsmessung erfolgte im Mikrotiterplattenphotometer bei 490 nm abzüglich der Hintergrundextinktion bei 660 nm. Die Auswertung der mindestens dreifach bestimmten Proben erfolgte unter *Microsoft Excel*. Bei einigen Messungen wurde MTS als Farbstoff verwendet. 20 µl einer MTS-Lösung (2 mg/ml, *Promega*) wurden direkt zu 100 µl Medium gegeben und nach 1-3 h bei 490 nm direkt vermessen, da im Gegensatz zum MTT ein lösliches Formazan gebildet wird. Neben einer geringen Fehleranfälligkeit durch den Wegfall des Extraktionsschrittes, kann die Extinktionsmessung nach verschiedenen Zeitpunkten wiederholt werden.

2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Sowohl der Vektor, als auch das Insert wurden zunächst mit Restriktionsendonukleasen derart geschnitten, dass kompatible Enden entstanden und dann über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und extrahiert (Gelextraktionskit, *Qiagen*). Die Ligation wurde mit Hilfe der T4-Ligase (*New England Biolabs*) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde wie in Tab. 2.2.5 dargestellt gestaltet:

Tab. 2.2.5: Ligationsansatz

1 µg Vektor+Insert (im Verhältnis 1:3) 2 µl 10x Ligationspuffer ad 19 µl H ₂ O 1 µl T4-DNA-Ligase (2.000 U)
--

Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 16°C. 1-2 µl des Ligationsansatzes wurden direkt für die Transformation eingesetzt.

2.2.11 TOPO-Klonierung (Invitrogen)

Die Klonierung mit Hilfe des TOPO Reporter Kits ermöglichte eine effiziente Insertion der durch *Taq*-Polymerase amplifizierten Promotorsequenzen in den Reportervektor pBlue-TOPO. Der Vektor liegt linearisiert mit einem Thymidin-Überang am 3'-Ende und einer kovalent gebundenen Topoisomerase I vor. Die *Taq*-Polymerase hat eine matrizenunabhängige terminale Transferase-Aktivität, so dass ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produktes angefügt wird. Die Ligation von Vektor und PCR-Produkt wird durch die Aktivität der Topoisomerase I in einer 5 min Reaktion bei RT erreicht (Shuman 1994). Die Klonierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und ergab in der Regel mehrere hundert Klone. Da eine Insertion auf diese Weise die Orientierung nicht berücksichtigt, entsprachen jeweils nur 50 % der Klone dem gewünschten Produkt. Um diese zu identifizieren, wurde eine Kolonie-PCR (s.u.) durchgeführt.

2.2.12 Kolonie-PCR

Um die Orientierung bei der Insertion des PCR-Fragments in den Vektor zu ermitteln, wurde eine PCR direkt mit den erhaltenen Klonen durchgeführt, indem diese mit einer Pipettenspitze gepickt, kurz in ein RG für die PCR getaucht und dann in einem Kapsenbergkappenröhrchen mit dem entsprechenden Selektivmedium für eine Mini-Präparation und die Herstellung einer Glycerin-Dauerkultur kultiviert wurden.

Für die PCR wurde der vorwärts gerichtete *primer* so gewählt, dass er auf dem Vektor kurz vor dem Insert ansetzte und der rückwärts gerichtete *primer* so, dass er am Ende des Inserts ansetzte. Ein PCR-Produkt der dem Insert entsprechenden Größe kam somit nur zu Stande, wenn die gewünschte Orientierung des Inserts vorlag. Erfolgte die Insertion mit der entgegengesetzten Orientierung, so entstand das PCR-Produkt nicht.

2.2.13 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Für die Transformationsvorbereitung wurden Bakterien des *E. coli*-Stammes JM105 nach der CaCl₂-Methode behandelt. Für die Vermehrung wurden 10 ml YT-Medium mit einer ÜNK angeimpft und anschließend bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von etwa 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 15 min, 4 °C, Heraeus Minifuge RF) und der Überstand verworfen.

Das Pellet wurde in 5 ml eisgekühlter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, das Pellet in 500 µl eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die so behandelten Zellen waren transformationskompetent, wurden bei 4°C gelagert und innerhalb von 24 h für die Transformation verwendet.

2.2.14 Transformation von *E.coli* -Zellen

Zu 20 µl des Ligationsansatzes wurden 40 µl transformationskompetenter *E. coli* gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein 1-minütiger Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Nach einem anschließenden 2 minütigen Abschrecken auf Eis wurden 300 µl SOCS-Medium ohne Ampicillin zugesetzt und die Bakterien 1 h lang zur Internalisierung des Plasmides bei 37°C inkubiert.

Dann wurden sie bei 4.000 Upm pelletiert und der Überstand, bis auf etwa 100 µl dekantiert. Im verbleibenden Medium wurden die Bakterien resuspendiert und auf ampicillinhaltigem YT-Agar ausplattiert. Die Inkubation fand ü.N. bei 37°C statt.

Superkompetente SoloPack Gold-Zellen (Stratagene) wurden nach Angaben des Herstellers transformiert.

2.2.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion nach Sanger wurde mit dem *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* für das ABI PRISM-System (*Applied Biosystems*) durchgeführt. Für die DNA-Synthese wurde AmpliTaq-DNA-Polymerase eingesetzt.

Bei der eingesetzten DNA handelte es sich um Plasmide, die durch Mini- oder Midi-Präparationen (*Qiagen-kits*) isoliert wurden.

Ein 20 µl-Reaktionsansatz setzte sich neben Wasser entsprechend Tab. 2.2.6 zusammen.

Tab. 2.2.6: Sequenzieransatz

250 ng	Template-DNA
5 pmol	<i>primer</i>
2,5 µl	Terminator Ready Reaction Mix

Der Terminator Ready Reaction Mix enthält dabei in einem geeigneten Puffer die fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleotide und die AmpliTaq-DNA-Polymerase. Das Programm des Thermocyclers wurde nach den Angaben des Herstellers gestaltet:

Tab. 2.2.7: Sequenzierprogramm

25 PCR-Zyklen	Denaturierung	10 s	96°C
	Annealing	5 s	50°C
	Elongation	240 s	60°C
Kühlen		∞	4°C

Die Änderung der jeweiligen Temperaturen erfolgte in 2°C/s-Schritten.

Zur Vorbereitung auf die Fluoreszenzdetektion wurden die Reaktionsansätze in 1,5 ml-RG überführt, mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und einer sauren Ethanol-fällung unterzogen. Das DNA-Pellet wurde in 10 µl Template Suppression Reagent (*Applied Biosystems*) aufgenommen und 2 min bei 90°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde die Probe in RG für den Sequenzer überführt.

Zur Steuerung der Kapillargel-Elektrophorese und zur Darstellung der Elektrospherogramme wurde das Programm ABI Prism Sequencing 2.1.1 verwendet. Für eine gute Auswertbarkeit sollte die Signalstärke der Fluoreszenz für die einzelnen fluoreszenzmarkierten Basen im Bereich von 100 bis 400 liegen. So war eine Bestimmung einer Sequenzlänge von etwa 500 bp möglich. Die Auswertung der erhaltenen DNA-Sequenzen wurde mit dem Programm MacVector 7.1.1 (*Oxford Molecular Ltd*) durchgeführt.

2.2.16 PCR

Für die DNA-Amplifikation wurde das in Tab. 2.2.8 angegebene Programm je nach Primerpaar, Template und entsprechender Vorversuche in der Annealing-Temperatur (55 - 70 C) und der Mg^{2+} -Konzentration (0 bis 12 mM $MgSO_4$) variiert.

Tab. 2.2.8: PCR-Programm

Ziel	Temp	Zeitdauer
Aufschmelzen der DNA	95 °C	5 min
30 Zyklen Aufschmelzen	95 °C	30 s
Annealing	70 °C	40 s
Elongation	72 °C	1 min pro 1 kpb PCR-Produkt
Produktvervollständigung	72 °C	10 min
Kühlen	4 °C	∞

Eine Variante zur Erstellung von Mutationen, Deletionen oder kleinen Insertionen basiert auf der Amplifikation des Plasmids mit 5'-phosphorylierten Primern, die die gewünschte Veränderung tragen, einem nachfolgenden Verdau des methylierten *Templates* mit Dpn I, einer Gelextraktion der erwünschten Bande aus einem Agarosegel (Gelextraktionskit, *Qiagen*) und der Religation und Transformation des modifizierten Vektors. Hierfür wurde zur Minimierung der Rate an unerwünschten Mutationen durch die PCR die Menge des eingesetzten *Templates* auf 1 µg erhöht und die Zyklenzahl von 30 auf 11 erniedrigt.

Der PCR-Ansatz verlief zunächst unter Variation der Mg^{2+} -Konzentration nach Tab. 2.2.9. Bei "schwierigen" Amplifikationen wurde das FailSafe PCR System (*Epicentre*) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Tab. 2.2.9: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Template-DNA	100 ng
Primer fw + bw	je 1 µM
10 x-PCR-Puffer	10 µl
Nukleotid-Mix	500 µM
H ₂ O	ad 100 µl
Pwo-DNA-Polymerase	1 Unit

verwendete Primer:

Klonierung des huIFN β -Promotors:

Bezeichnung: IFN β -Promotor fw

Sequenz: 5' Ph GAA TTC TCA GGT CGT TTG CTT TCC TTT GC 3'

Bezeichnung: IFN β -Promotor bw

Sequenz: 5' Ph GTT GAC AAC ACG AAC AGT GTC GCC TAC 3'

Mutagenese-PCR des IFN β -Promotors:

Bezeichnung: β -Prom Mut fw

Sequenz: 5' Ph AGG CCA TAC CCA CGG AGA AAG GAC ATT C 3'

Bezeichnung: β -Prom Mut bw

Sequenz: 5' Ph ATT TAT ATG AGA TGG TCC TCT CTC TAT T 3'

Verkürzung der Region zwischen Promotor und ATG des EGFP-1:

Bezeichnung: kurz β -Prom fw

Sequenz: 5' Ph ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC A 3'

Bezeichnung: kurz β -Prom bw

Sequenz: 5' Ph GTT GAC AAC ACG AAC AGT GTC GCC TAC T 3'

Klonierung des Pias1-Promotors:

Bezeichnung: 442 bp fw

Sequenz: 5' GCC CAC TGG TAG CCT CGC AGG TAG CAG GTG C 3'

Bezeichnung: Pias1 rw

Sequenz: 5' CTT GCG TCT GTC AGC GCA AGC GCA GTG AAC T 3'

Verkürzung der MCS für Pias1-Luc:

Bezeichnung: Luc Ph fw

Sequenz: 5' Ph ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GGC 3'

Bezeichnung: Pias1 Ph bw

Sequenz: 5' Ph CTT GCG TCT GTC AGC GCA AGC GCA GTG AAC 3'

Verkürzungsvarianten des Pias1-Promotors:

Bezeichnung: 300 bp fw

Sequenz: 5' Ph GCA TCC CTC TCG CTC CGG CCC TTC CCG GGA 3'

Bezeichnung: 200 bp fw

Sequenz: 5' Ph GCG CCA TTA TTT AAA TGG AAC GTG CCT GTC 3'

Bezeichnung: 150 bp fw

Sequenz: 5' Ph GGC GGG GCT TCG AGC GCC CTG AGC GGG GCG 3'

Bezeichnung: 100 bp fw

Sequenz: 5' Ph GGG AAG GTG GAG GGG CGG GCC GGG GCG GGG 3'

Bezeichnung: 50 bp fw

Sequenz: 5' Ph CTA GCG GCG GCC CCC GGC GAA GTT CAC TGC 3'

Klonierung des Socs1-Promotors:

Bezeichnung: Socs1 2kb fw

Sequenz: 5' GGG CAC GGC TTC CAG GAG AGA AGC CGT 3'

Bezeichnung: Socs1 bw

Sequenz: 5' CCT ACA GAA GGG GCC AGC CGG AGG GGT GGG 3'

Verkürzung der MCS für Socs1-Luc:

Bezeichnung: Luc Ph fw

Sequenz: 5' Ph ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GGC 3'

Bezeichnung: Socs1 Ph bw

Sequenz: 5' Ph CCT ACA GAA GGG GCC AGC CGG AGG GGT GGG 3'

Verkürzung um das Repressorelement für Gfi-1B beim Socs1-Promotor:

Bezeichnung: Gfi fw

Sequenz: 5' PhGCA CCA TTT TTT CAC TGG GCT CCA ATT TGA 3'

Bezeichnung: Luc Ph bw

Sequenz: 5' Ph CCA ACA GTA CCG GAA TGC CAA GCT GGA ATT 3'

Verkürzung um die 5' UTR beim Socs1-Promotor:

Bezeichnung: Luc Ph fw

Sequenz: 5' Ph ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GGC 3'

Bezeichnung: Socs1 UTRbw

Sequenz: 5' ACG GCC GCA GCT CGC TCT GCT CGG CGC CCG 3'

Klonierung des CMV-Promotors.

Bezeichnung: CMV fw

Sequenz: 5' TAG TTA TTA ATA GTA ATC AAT TAC GGG 3'

Bezeichnung: CMV bw

Sequenz: 5' GAT CTG ACG GTT CAC TAA ACC A 3'

2.2.17 Transfektion

Zur Transfektion wurden die adhärenen Zelllinien A549 und 293 verwendet und in ihrer Transfektionseffizienz miteinander verglichen. Als sowohl preisgünstige als auch sehr effiziente Methode stellte sich die Calciumphosphat-vermittelte Transfektion heraus (Graham and van der Eb 1973). Diese Methode ist für transiente und stabile Transfektionen einsetzbar. Zusätzliche Schritte zur Erhöhung der Transfektionseffizienz sind ein Glycerinschock (Parker and Stark 1979) und eine Chloroquinbehandlung (Luthman and Magnusson 1983).

Am Tag vor der Transfektion wurde eine im exponentiellen Wachstum befindliche Zellkultur an 293 bzw. A549-Zellen trypsinisiert und die Zellen in einer Dichte von 2×10^6 Zellen in einer 60 mm-Zellkulturschale in 10 ml DMEM mit 10% FCS, oder in einer Dichte von 2×10^5 Zellen in einer 24 well- Platte in 500 μ l DMEM mit 10% FCS ausgesät.

Die Zellen hatten am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-80%. Das Medium wurde 30 min vor Zugabe der Transfektionslösung erneuert. Die Transfektionslösung bestand beim 24-well-Maßstab aus:

Lösung A:

2 μ g	Plasmid-DNA
2,5 μ l	2 M CaCl ₂ -Lösung
ad 25 μ l	H ₂ O

Lösung B:

25 μ l	2xHBS
------------	-------

Die Zugabe der Lösung A zu Lösung B erfolgte tropfenweise unter Vortexen. Zur Ausbildung der Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitate wurde 20 min bei RT inkubiert. Nach erneutem kurzen Vortexen wurde die Transfektionslösung tropfenweise unter Schwenken zu den Zellen gegeben. Nach Zugabe von 1 μ M Chloroquin wurde für 5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei A549-Zellen wurde danach ein 2 min-Glycerinschock (15%) durchgeführt. Bei 293-Zellen, die sich beim Glycerinschock von der Zellkulturschale ablösen, wurde dieser ausgelassen und die Zellen stattdessen gleich mit 500 μ l DMEM mit 10% FCS gewaschen und dann ü.N. mit 500 μ l diesem Medium regeneriert.

Am nächsten Morgen wurden die transfizierten Zellen trypsiniert und in der gewünschten Zelldichte für den entsprechenden Test ausgesät.

2.2.18 Selektion stabiler Klone

Zur Erzeugung stabil transfizierter eukaryotischer Zellen wurde als Selektionsantibiotikum entweder Geneticin (1 μ g/ml) oder Puromycin (2 μ g/ml) eingesetzt. Sofern die Resistenzgene nicht auf den entsprechenden Plasmiden vorhanden waren, wurde ein Selektionsplasmid im 10-fachen Überschuss kotransfiziert. Die Transfektion mit der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode wurde in 60 mm-Platten wie unter 2.2.17 beschrieben durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurde das Antibiotikum zur Selektion zugesetzt.

Nachdem sich innerhalb von etwa zwei bis drei Wochen Kolonien resistenter Zellen gebildet hatten, wurden diese mit einer Pipettenspitze abgelöst und in eine 24-well-Platte überführt. Die Klone wurden nach ausreichender Zellexpansion auf die gewünschten Eigenschaften getestet und geeignete Klone als Kryokultur verwahrt.

2.2.19 β -Galaktosidase-Assay

Es handelt sich hierbei um eine schnelle und kostengünstige Methode zur Quantifizierung des β -Galaktosidase-Gehaltes nach Transfektion eukaryotischer Zellen mit einem Plasmid zur *lacZ*-Expression. Beim Ausgangsvektor handelte es sich um pBlue-TOPO^R von *Invitrogen* (siehe Abb. 2.2.2), dessen Promotoren durch TOPO-TA-Klonierung eingebracht wurden.

Zur Transfektionsoptimierung wurde der starke konstitutive *CMV*-Promotor in den Vektor eingefügt. Die transfizierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein 1,5 ml Microzentrifugationsgefäß überführt.

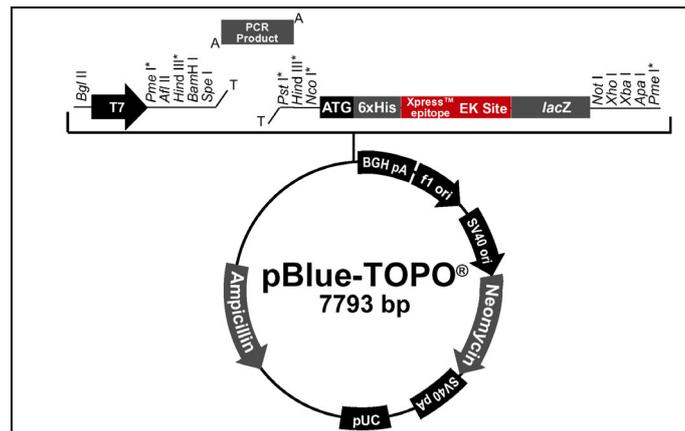


Abb. 2.2.2: Ursprungsvektor *lacZ* (Grafik: Invitrogen)

Nach 5 min Zentrifugation bei 14.000 Upm und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl Zell-Lysis-Puffer resuspendiert. Es erfolgte ein Ultraschallaufschluss der Zellen auf Eis und erneute Zentrifugation (10 min, 14.000 Upm, 4°C). 1-30 µl des Überstandes wurden mit 70 µl ONPG und 200 µl *Cleavage Buffer* kurz durchgemischt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch 500 µl Stop-Puffer beendet und die Extinktion bei 420 nm gemessen.

2.2.20 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Diese beruht auf der Adsorption des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G 250 an Proteine in Lösung. Es wurde ein Protein-Mikroassay der Firma BioRad verwendet. Eine direkte Proportionalität zwischen der Proteinkonzentration und der Extinktion liegt nur im Konzentrationsbereich von 1 bis 20 µg Protein / ml Lösung vor. Die Quantifizierung des gebildeten farbigen Komplexes erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm. Durch Erstellung einer Eichgeraden mit BSA konnten aus den Extinktionswerten Proteinkonzentrationen errechnet werden.

Die Proben wurden mit Natriumphosphat-Puffer auf ein Volumen von 800 µl verdünnt, mit 200 µl BioRad Farbreagenz vermischt und bei RT für 10 min inkubiert. Danach folgte die Extinktionsmessung.

2.2.21 Luciferase-Assay

Chemilumineszenz-Systeme sind in der Sensitivität im Vergleich zur Fluoreszenzdetektion oder Kolorimetrie um 100- bis 100.000-mal höher. Wenige tausend Moleküle können nachgewiesen werden, was auch die Messung nur schwach exprimierter Gene oder in mit geringer Effizienz transfizierbaren Zelllinien ermöglicht. Beim klassischen CAT-Assay liegt die Nachweisgrenze je nach Detektionsmethode bei 10 bis 500 Millionen Molekülen. In Hinblick auf das beabsichtigte Screening ermöglicht der Luciferase-Assay eine Miniaturisierung auf den 96-*well* bzw. sogar 384-*well*-Maßstab.

Es wurde eine 100 mm Zellkulturschale mit 8×10^6 A549-Zellen in DMEM mit 10% FCS ausgesät. Die Konfluenz am nächsten Tag betrug etwa 80%. Die Transfektion wurde mit 20fachen Volumina wie oben beschrieben durchgeführt. Dabei wurde der Vektor pGAS-TA-Luc oder pISRE-TA-Luc aus dem *MercuryTM Pathway Profiling Luciferase System* (Clontech) oder eines der daraus konstruierten Pias1-, Socs1-, oder IFN β -Promotorkonstrukte transfiziert.

Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, in RPMI + 10% FCS aufgenommen, bei 1000 Upm für 5 min zentrifugiert und in 11 ml RPMI mit 10 % FCS aufgenommen. Die durch Zählung mittels Neubauer-Kammer ermittelte Zellzahl betrug etwa 300.000/ml. 100 μ l dieser Zellsuspension wurde in eine weiße 96-*well* OptiPlate (Packard BioScience) aliquotiert. Die Zellen wurden mit den Proben für 2 h vorinkubiert und danach mit IFN stimuliert. Die Luciferase-Expression wurde durch Zugabe von 100 μ l Luciferase-Substrat+Lysis-Lösung gestoppt und ein langlebiges Lumineszenzsignal mit einer Halbwertszeit von etwa 1 h erzeugt ("glow type signal").

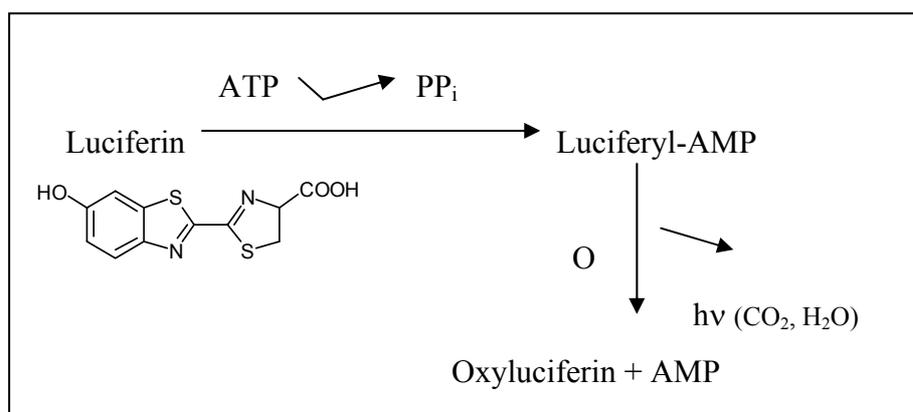


Abb. 2.2.3: schematische Darstellung der Luciferasereaktion

Das Photinusluciferin des Glühwürmchens *Photinus pyralis* ist die (S)-4,5-Dihydro-2-(6-hydroxy-2-benzo-thiazoloyl)-4-thiazolcarboxylsäure.

Zunächst entsteht unter Abspaltung der Diphosphatgruppe ein Säureanhydrid zwischen der Carboxylgruppe und dem AMP, dessen Oxidation zur Lichtemission führt. Die Quantenausbeute ist mit nahezu einem emittierten Photon für jedes oxidierte Luciferin-Molekül die höchste, die für Biolumineszenzreaktionen bekannt ist. Die Messung erfolgte durch einen Photomultiplier (*Fusion; Canberra Packard oder Microlumat; Berthold*).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Assays

Zur Etablierung des Primärassays für das Screening wurden im Vorfeld die einzelnen Parameter, wie Zellzahl, Inkubationszeiten, DMSO-Toxizität, Formazan-Extraktion, Virus sowie IFN γ -Konzentration etc. optimiert.

Zur besseren Auswertung und Archivierung der Daten wurde eine spektrophotometrische Erfassung der Zellvitalität angestrebt. Die ursprünglich publizierte Solubilisierung des gebildeten wasserunlöslichen Formazans im MTT-Reduktionstest mit DMF/SDS dauerte jedoch mehrere Stunden (Berg, Hansen *et al.* 1990). Die rasche Solubilisierung mittels DMSO ermöglicht eine direkt anschließende Extinktionsmessung bei einem auf eine Wellenlänge von 490 nm verschobenen Extinktionsmaximum gegen den bei 660 nm gemessenen Hintergrund (s. Abb. 3.1.1).

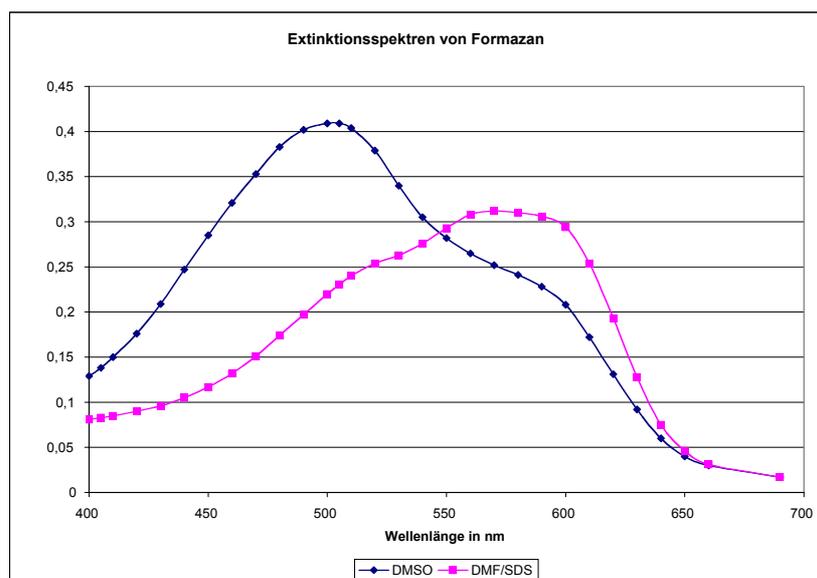


Abb. 3.1.1: Extinktionsspektren nach Formazan-Solubilisierung durch DMSO gegenüber DMF/SDS

Über den Testzeitraum von 24 h hat auch das Lösungsmittel der Testsubstanzen einen zytotoxischen Effekt. Bei einer Konzentration von 1% DMSO (v/v) spiegelt sich diese Zytotoxizität bei den eingesetzten A549-Zellen im MTT-Reduktionstest deutlich wieder. Darum wurde 0,5% als maximale DMSO-Konzentration für das Primärscreening eingesetzt.

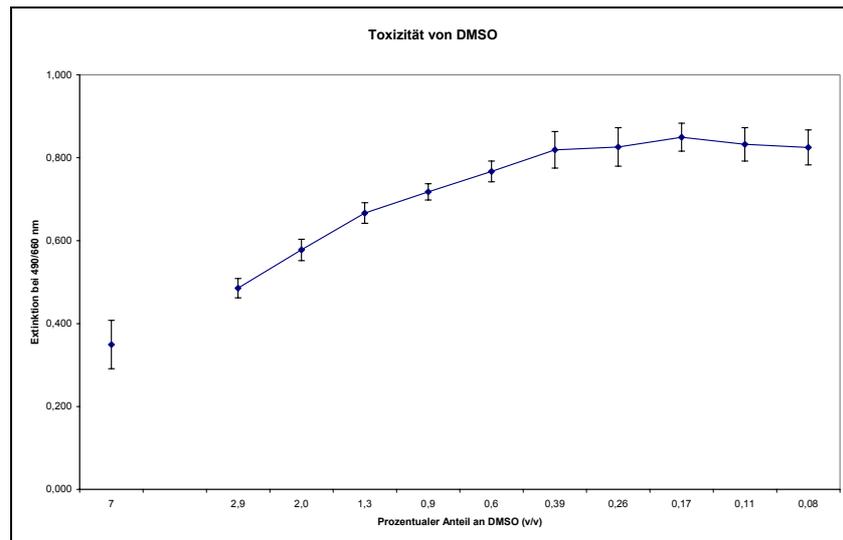


Abb. 3.1.2: Toxizitätsbestimmung für DMSO auf A549-Zellen
(Inkubation über 24 h, MTT-Reduktionstest zur Vitalitätsbestimmung)

Der MTT-Reduktionstest bietet eine Reihe möglicher Probleme. Beispielsweise eine chemische Reduktion des Tetrazoliums durch die Testsubstanz, eine Beeinflussung der zellulären Reduktion oder eine Veränderung des zellulären Metabolismus und somit z.B. des pH. Eine im MTT-Reduktions-Primärassay vorgefundene Aktivität wurde darum immer auch mikroskopisch und durch eine Kristallviolett-Vitalfärbung abgesichert.

Es ist besonders wichtig, über die gesamte Testphase Qualitätskontrollen zu haben, die Vergleichbarkeit und Aussagekraft der Messungen belegen. Als solche wurden die Vital-, die Virus- und die $\text{IFN}\gamma$ -Kontrolle, sowie die Differenzen dieser Kontrollwerte betrachtet und nur Tests mit korrekten Kontrollmessungen ausgewertet. Beeinträchtigt Zellwachstum (z.B. durch Mykoplasmeninfektion), verminderte Viruslyse oder Kontaminationen durch Hefen, die zu abweichenden Kontrollwerten führen, sind jedoch selten vorgekommen und sprechen für die nötige Robustheit des verwendeten Testsystems.

Zur Charakterisierung des Sekundärassays wurde das GAS-Luciferase-Konstrukt transient in A549-Zellen transfiziert und diese Zellen mit $\text{IFN}\alpha,\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ über 6 h mit 1.000 IU/ml stimuliert. Wie zu erwarten, ist die Induktion des GAS-Promotors durch die TypI-Interferone deutlich geringer (siehe Abb. 1.1.1). Unerwartet war hingegen der Befund, dass der ISRE-Promotor ebenfalls stärker durch $\text{IFN}\gamma$ induziert wird, als durch $\text{IFN}\alpha+\beta$. Beim ISRE-Promotor ist der Unterschied zwischen der TypI und der TypII-vermittelten Induktion weniger stark ausgeprägt als beim GAS-Promotor (siehe Abb. 3.1.3).

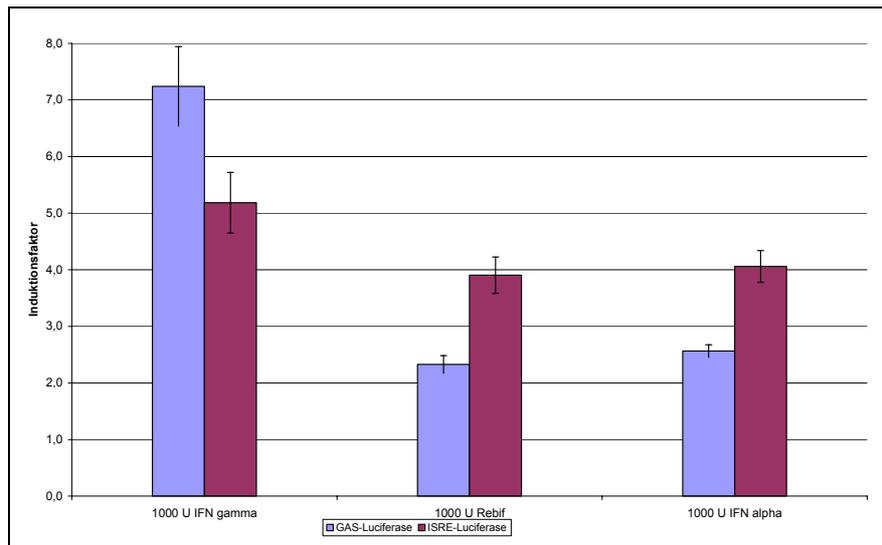


Abb. 3.1.3: Vergleich der Induktion des GAS- und des ISRE-Luciferase-Konstrukts (transiente Transfektion in A549-Zellen, 6 h Inkubation)

Die Konzentrationsabhängigkeit der GAS-Induktion wurde für IFN γ in einer stabil transfizierten A549-Zelllinie ermittelt.

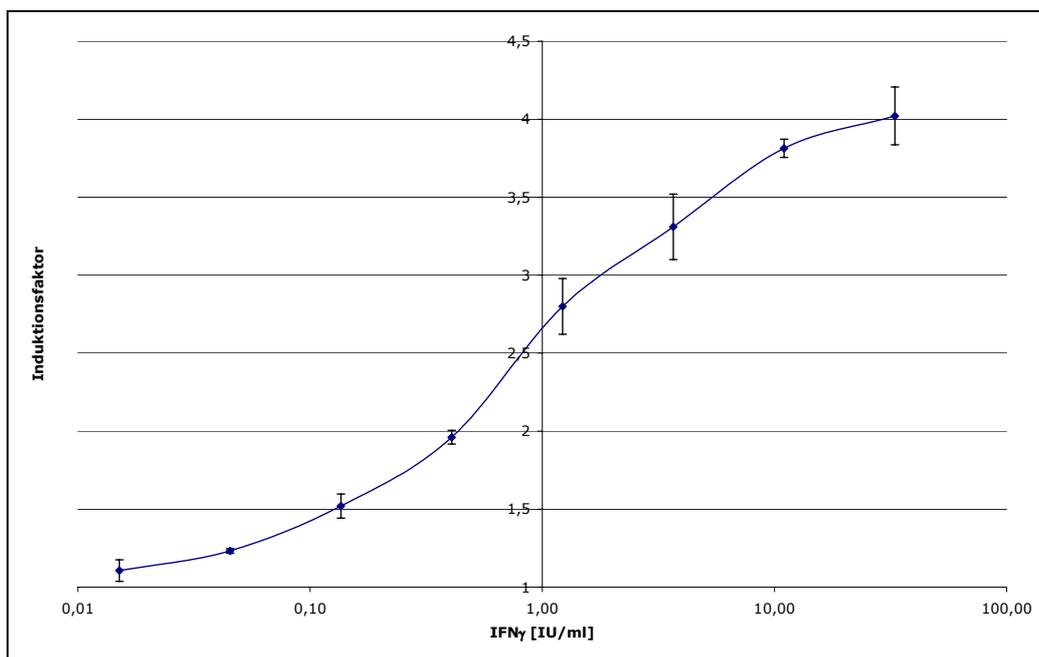


Abb. 3.1.4: IFN γ -Induktion des GAS-Luciferase-Konstrukts (stabil GAS-Luc/Puromycin transfizierte A549-Zelllinien, 6 h Induktion)

Vorzuziehen ist in der Regel eine stabil transfizierte Zelllinie aufgrund der auf längere Sicht gesehenen Arbeitersparnis und der besseren Reproduzierbarkeit der Messung, da die Induktion im Wesentlichen nur noch von der Zellzahl, der Inkubationsdauer und der IFN-Konzentration aber nicht mehr von der stark variierenden Transfektionseffizienz abhängt.

Zur Spezifitätsprüfung von Substanzen, welche die IFN γ -induzierte Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung inhibieren, wurde im Westernblot zum Vergleich der Einfluss der Inhibitoren auf eine ligandenunabhängige und allgemeine "Kinaseaktivierung" in Form einer Phosphatase-Inhibition durch 100 μ M Pervanadat untersucht. Diese Form der Stat1-Aktivierung ist sowohl bezüglich der antiviralen Wirkung, als auch bezüglich der GAS-Induktion funktional (siehe Abb. 3.1.5). Dabei wurde nach 6 h Inkubation durch 100 μ M Pervanadat eine GAS-Induktion erreicht, die mit der durch 100 IU/ml IFN γ vergleichbar war.

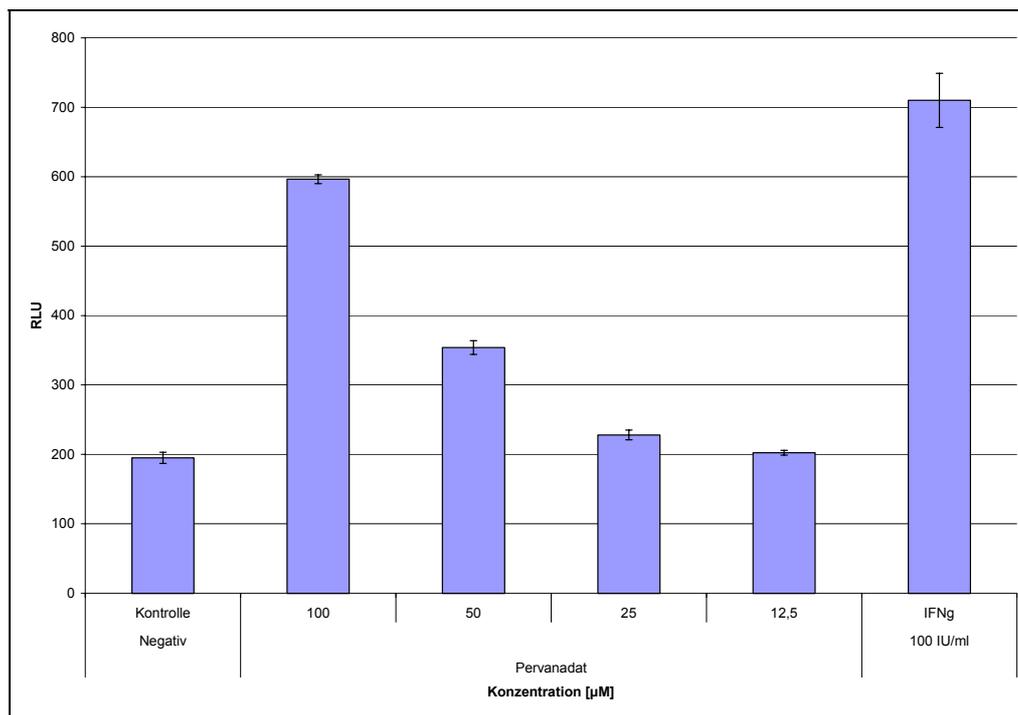


Abb. 3.1.5: GAS-Induktion durch Pervanadat
(stabil transfizierte GAS-Luciferase/Puromycin A549-Linie, 6 h Inkubation)

3.2 Bekannte Kinase-Inhibitoren im Vergleich

In der Literatur wurden bereits Substanzen als mehr oder minder spezifische Inhibitoren von Kinasen, welche an der IFN γ -vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind, beschrieben. Einige dieser Inhibitoren wurden mit den beschriebenen Methoden auf ihre Spezifität getestet, um eine Einschätzung der Funktionalität des Assays in Form einer Positivkontrolle vorzunehmen.

Als ein spezifischer Inhibitor wurde das aus einer Trichosporiella-Spezies isolierte Pyrandion Trichodion (Erkel 2000)(Abb. 3.2.1) untersucht, für welches eine Inhibition der IFN γ -medierten Stat1 α -Phosphorylierung in einer Konzentration von 10 μ M in murinen Makrophagen beschrieben wurde.

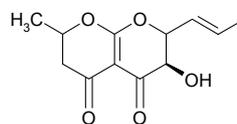


Abb. 3.2.1: Strukturformel für Trichodion

Im verwendeten Primärassay wurde diese Substanz jedoch nicht als IFN γ -Inhibitor identifiziert (siehe Abb. 3.2.2 und Abb. 2.2.1).

Substanz 2: Trichodion		Molmasse: 238,2 g/mol		Konzentration: 0,5 mg/100 μ l		Verdünnung: 20		zusätzliche Anmerkungen: anti-Stat1 Aktivität nach IFN-gamma Stimulus (20-40 μ M)	
Trichodion		Konzentration (mol/l)		Cytotoxizität		Antiviralität		Anti-IFN- g-Wirkung	
1,05E-04	1 zu 10	16	31	6	6	22	45		
1,05E-05	1 zu 100	9	37	-13	7	37	10		
1,05E-06	1 zu 1000	-6	29	2	18	20	19		
1,05E-07	1 zu 10 000	-9	43	17	15	15	26		
Vitalkontrolle		911	30	Differenzen		Vital-Virus	748		
Viruskontrolle		163	26			IFN-Virus	536		
Interferon- g-Kontrolle		699	19			Vital-IFN	212		

Abb. 3.2.2: Ergebnisse für Trichodion im Primärscreening

Ein entsprechend Abb. 3.2.2 erstelltes Ergebnisblatt mit den nach MTT-Reduktion erhaltenen und unter Excel ausgewerteten Extinktionsdaten, wurde für jede getestete Probe erstellt und archiviert. Die bei 490nm gemessenen Extinktionswerte wurden der Übersichtlichkeit halber mit dem Faktor 1000 multipliziert.

In den einzelnen Aktivitätsspalten wurden die Differenzen der Mittelwerte aus den Dreifachbestimmungen von den Kontrollwerten zu den entsprechenden Aktivitäten aufgetragen. Als Qualitätsmerkmal für die Messung wurde rechts daneben die Standardabweichung angegeben. Wie man dieser Messung entnehmen kann, liegen die Abweichungen von den Vergleichskontrollen im Rahmen der durch die Standardabweichungen repräsentierten durch das Messsystem erzeugten Schwankungsbreite. Für die höchste getestete Konzentration von 105 μM Trichodion ergibt sich rechnerisch eine Erniedrigung der Extinktion um 3% (von 0,699 auf 0,677). Da diese Abweichung niedriger liegt als der messbedingte Fehler wurde Trichodion im Primärscreening als nicht aktiv gewertet.

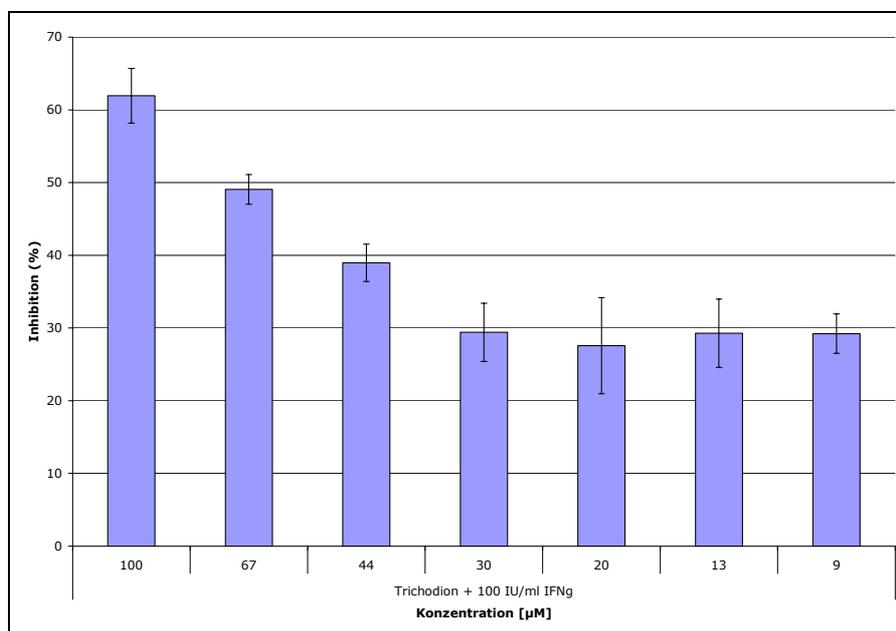


Abb. 3.2.3: Inhibition der $\text{IFN}\gamma$ -medierten GAS-Induktion durch Trichodion (stabil transfizierte A549-Linie, 6 h Induktion mit 100 IU/ml $\text{IFN}\gamma$)

Im GAS-Inhibitionstest in A549 Zellen wurde die beschriebene Inhibition der $\text{IFN}\gamma$ -medierten Stat1-Aktivierung für Trichodion mit einer IC_{50} von etwa 70 μM ermittelt (siehe Abb. 3.2.3). In einer Konzentration von 10 μM bewirkte Trichodion nur noch eine Inhibition um 30%.

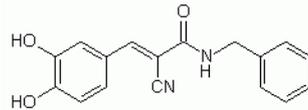


Abb. 3.2.4: Strukturformel von AG490

Das Tyrphostin AG490 (Meydan, Grunberger *et al.* 1996), wurde als Jak2-spezifischer Tyrosin-Kinase-Inhibitor beschrieben. Im Primärscreening wurde nur in einer hohen Konzentration von 200 μM eine zytotoxische Wirkung festgestellt. Bei einer genaueren Betrachtung mit einem feineren Verdünnungsraster wurde bis zu einer Konzentration von 100 μM keine Zytotoxizität (blaue Kurve in Abb. 3.2.5) am biologischen Marker der Antiviralität, aber ebenfalls keine Inhibition der $\text{IFN}\gamma$ -vermittelten Wirkung festgestellt.

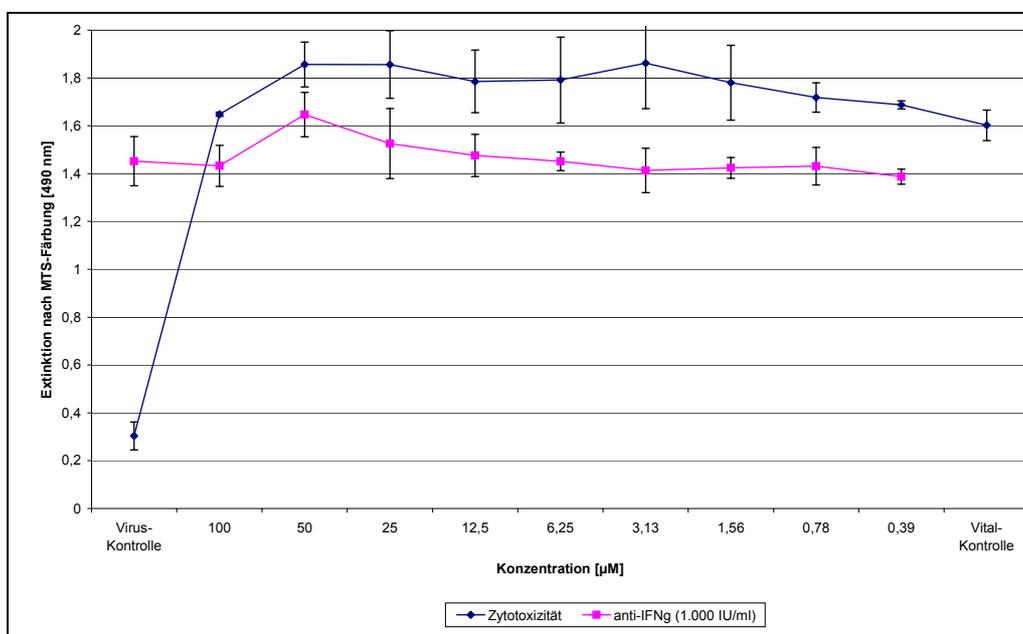


Abb. 3.2.5: anti-IFN γ -Wirkung von AG490

(A549-Zellen wurden analog zum Primärassay nur mit AG490 (Zytotoxizität) oder mit AG490, 1.000 IU/ml IFN γ , EMC-Virus (anti-IFN γ) für 1 d behandelt; Vitalitätsbestimmung erfolgte mittels MTS-Färbung und Extinktionsbestimmung bei 490 nm)

Meydan *et al.*, haben eine vollständige Inhibition der konstitutiven Jak2-Phosphorylierung für AG490 in G₂-Leukämiezellen in einer Konzentration von 1 μM nachgewiesen. Daraus sollte theoretisch eine Inhibition der Stat1-Aktivierung nach IFN γ -Stimulus folgen (siehe Abb. 1.4.1). Diese wurde jedoch auch in einer vergleichsweise hohen Konzentration von 25 μM in einer Western-Blot-Analyse der Gesamtzelllysate, der für 30 min IFN γ -stimulierten A549-Zellen nur in sehr geringem Maß detektierbar (siehe Abb. 3.2.6).

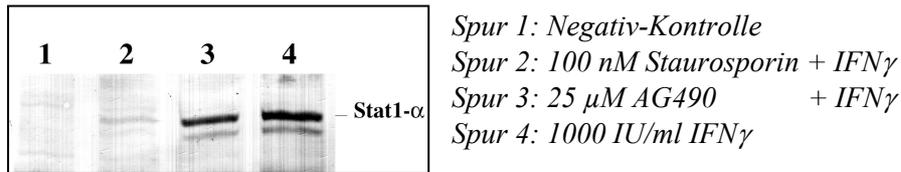


Abb. 3.2.6: Stat1-Tyr⁷⁰¹-phosphospezifischer Blot mit AG490 und Staurosporin (A549-Gesamtzelllysat nach 30 min Stimulus über SDS-PAGE getrennt)

Mit dem sensitiveren GAS-Inhibitionstest wurde für AG490 eine IC₅₀ zwischen 30 und 60 μ M (siehe Abb. 3.2.8) bei einer Induktion durch IFN γ verursacht. Beim analogen Test der IFN γ -Induktion des ISRE-Promotor-Luciferase-Konstruktes zeigte AG490 in einer Konzentration von 50 μ M an Stelle einer Inhibition einen geringfügigen zusätzlichen Induktionseffekt (siehe Abb 3.2.7).

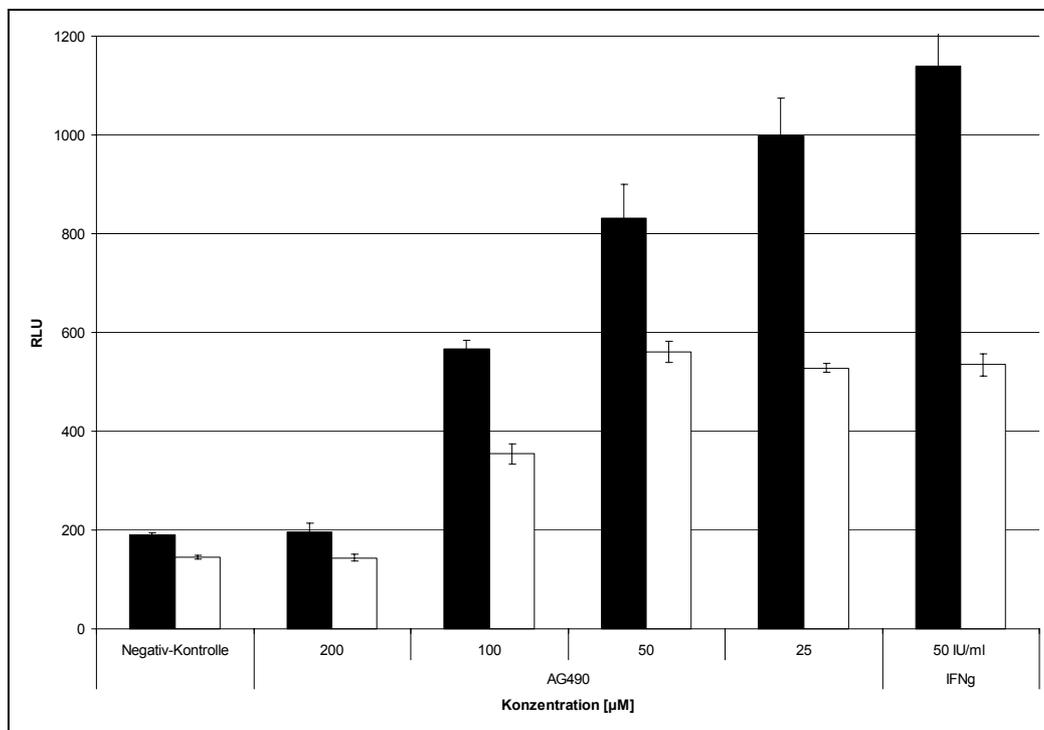


Abb. 3.2.7: GAS/ISRE-Induktionstest für Tyrphostin AG490 (stabil GAS-Luc transfizierte A549-Linie, stabil ISRE-Luc transfizierte HepG2-Linie, 6 h Induktionsdauer mit 50 IU/ml IFN γ)

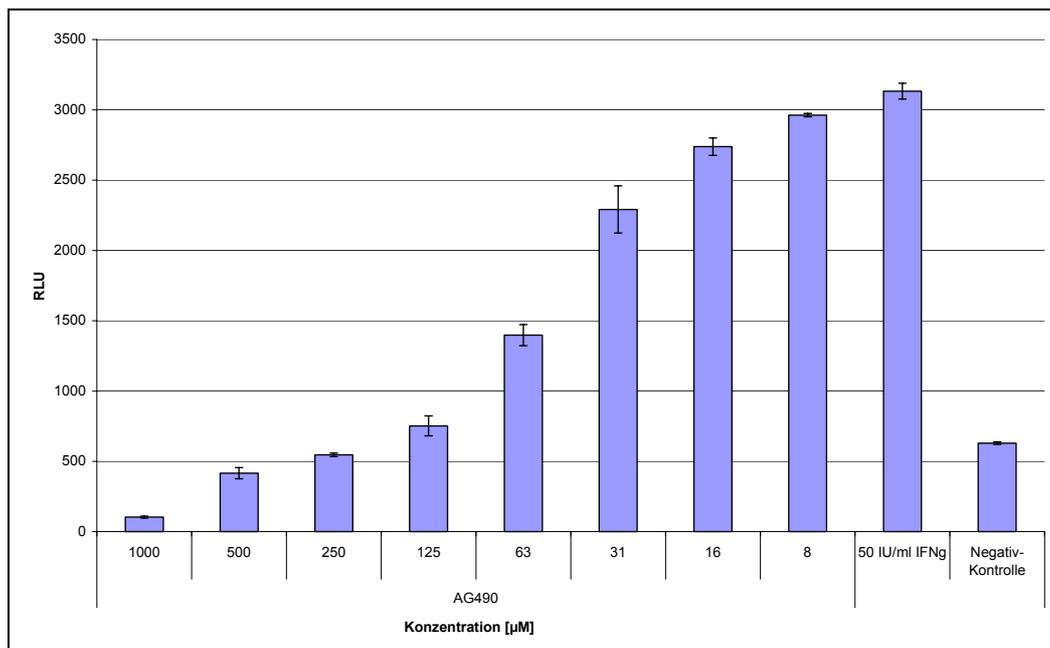


Abb. 3.2.8: Inhibition der IFN γ -medierten GAS-Induktion durch AG490
(stabil GAS-Luciferase/Puromycin transfizierte A549-Linie, 6 h Induktionsdauer)

Als eine weitere in der Literatur als Inhibitor inflammatorischer Prozesse beschriebene Substanz wurde das Epigallocatechingallat (EGCG, siehe Abb. 3.2.9) eingehender untersucht. EGCG stellt den polyphenolischen Hauptinhaltsstoff des grünen Tees dar. Menegazzi *et al.* haben eine direkte anti-IFN γ -Wirkung durch eine spezifische Inhibition der Stat1-Aktivierung beschrieben (Menegazzi, Tedeschi *et al.* 2001).

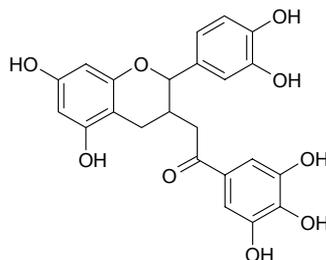


Abb. 3.2.9: Strukturformel von Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)

Eine IFN-inhibierende Wirkung in Form einer Verringerung der IFN-vermittelten antiviralen Aktivität durch eine Jak2-Inhibition wurde auch beim EGCG nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Im GAS-Induktionstest lässt sich jedoch über die verringerte Luciferase-Expression nach IFN γ -Stimulation eine IC₅₀ um die 50 µM ermitteln (siehe Abb. 3.2.10). Beim Test als Inhibitor der IFN γ -bedingten Repression des *pias1*-Promotor (siehe Kapitel 3.7.2) hob weder EGCG noch Trichodion die IFN-Wirkung auf (siehe Abb. 3.2.12).

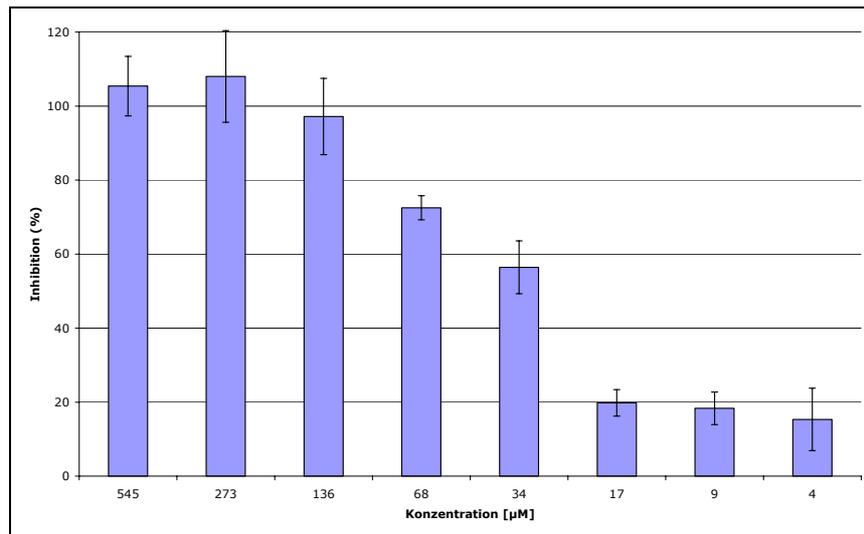


Abb. 3.2.10: Inhibition der $IFN\gamma$ -medierten GAS-Induktion durch EGCG (transiente A549-Zellen, 6 h Induktion mit 1.000 IU/ml $IFN\gamma$)

Die im GAS-Induktionstest vorgefundene anti-IFN-Aktivität ließ sich nicht durch Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierungs-Inhibition in A549-Zellen klären. Bei einer relativ hohen EGCG-Konzentration von 1 mM wurde eine vollständige Inhibition beobachtet. Bei 200 µM war die EGCG-vermittelte mutmaßliche Kinase-Inhibition nur noch gering (siehe Abb. 3.2.11).

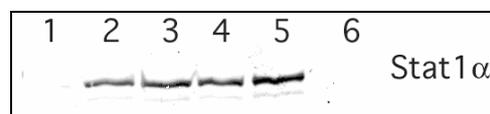


Abb. 3.2.11: phosphospezifischer Stat1-Blot mit EGCG
 1-4: EGCG plus 1.000 IU/ml $IFN\gamma$
 1: 1 mM; 2: 200 µM; 3: 40 µM; 4: 8 µM;
 5: 1.000 IU/ml $IFN\gamma$; 6: Negativ-Kontrolle

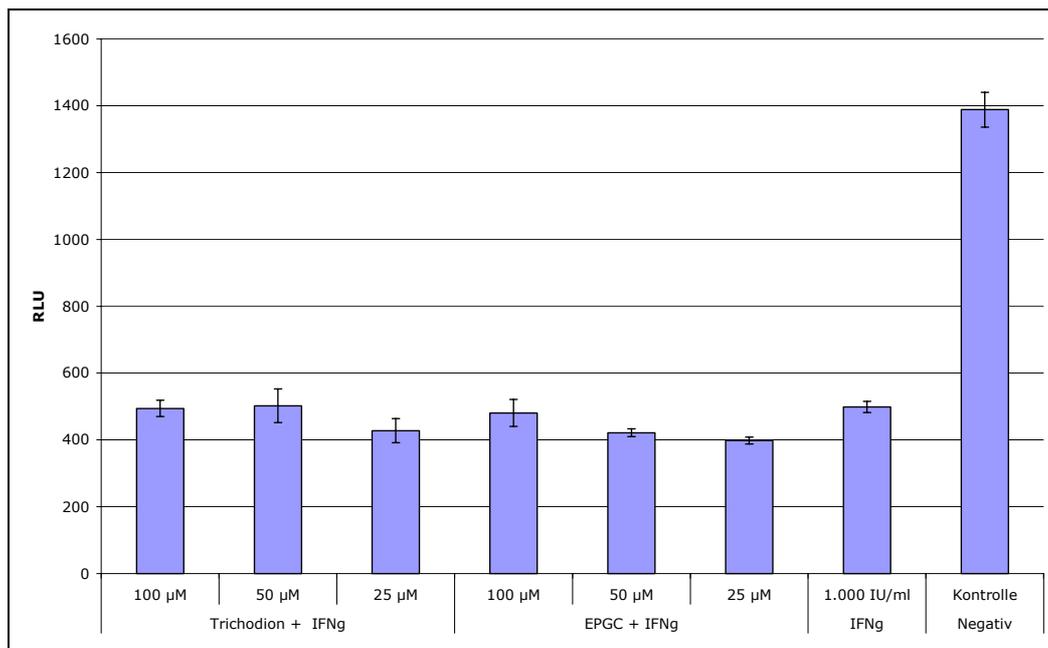


Abb. 3.2.12: *Pias1*-Promotor-Luciferase-Konstrukt mit Trichodion und EGCG (stabile Transfektion, A549, 18 h Inkubation, 1.000 IU/ml IFN γ)

Beim Übergang der Betrachtung der für den Jak/Stat-Signalweg als spezifisch beschriebenen Inhibitoren zu den „unspezifisch“ wirkenden Inhibitoren wurden die Phosphotyrosinkinase-Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs betrachtet (siehe Tab. 3.2.1), von denen einige im Zusammenhang mit dem *Rheum*-Extrakt untersucht wurden (siehe Kapitel 3.4).

Tab. 3.2.1: PTK-Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs

Substanzname	IC 50 (µM)	Mw (g/mol)	chemische Bezeichnung
Apigenin	10-100	270.2	4',5,7 Trihydroxyflavon
Emodin	k.A.	270.2	1,3,8 Trihydroxy-6-Methylantrachinon
Genistein	10-100	270.2	4',5,7 Trihydroxyisoflavon
Luteolin	10-100	286.2	3',4',5,7 Tetrahydroxyflavon
Quercetin	0,4-24	338.3	3,3',4',5,6 Pentahydroxyflavon
Piceatannol	k.A.	244.2	3,3',4,5' Tetrahydroxy-trans-Stilben
Resveratrol	110-263	228.2	3,4',5 Trihydroxy-trans-Stilben

Die Mehrheit der beschriebenen Kinaseinhibitoren pflanzlichen Ursprungs kann in drei Klassen unterteilt werden. Es handelt sich dabei um:

- Anthrachinone (Emodin)
- Stilbene (Resveratrol, Piceatannol)
- Flavonoide (EGCG, Quercetin)

Vertreter der Anthrachinone und der Stilbene wurden als Substanzen des *Rheum*-Extraktes (siehe Kapitel 3.4) auf ihre IFN γ -inhibierende Wirkung getestet.

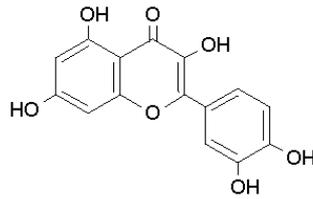


Abb. 3.2.13: Strukturformel von Quercetin

Als Repräsentant der dritten Gruppe wurde das Flavonoid Quercetin, welches auch in *Rheum*-Spezies vorkommt (siehe Tab. 3.4.1), gewählt und in den entsprechenden Tests auf eine möglicherweise spezifischere Rolle bei der Blockierung der IFN γ -Wirkung untersucht. Zunächst wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition im IFN γ -stimulierten GAS-Induktionstest ermittelt (Abb. 3.2.14).

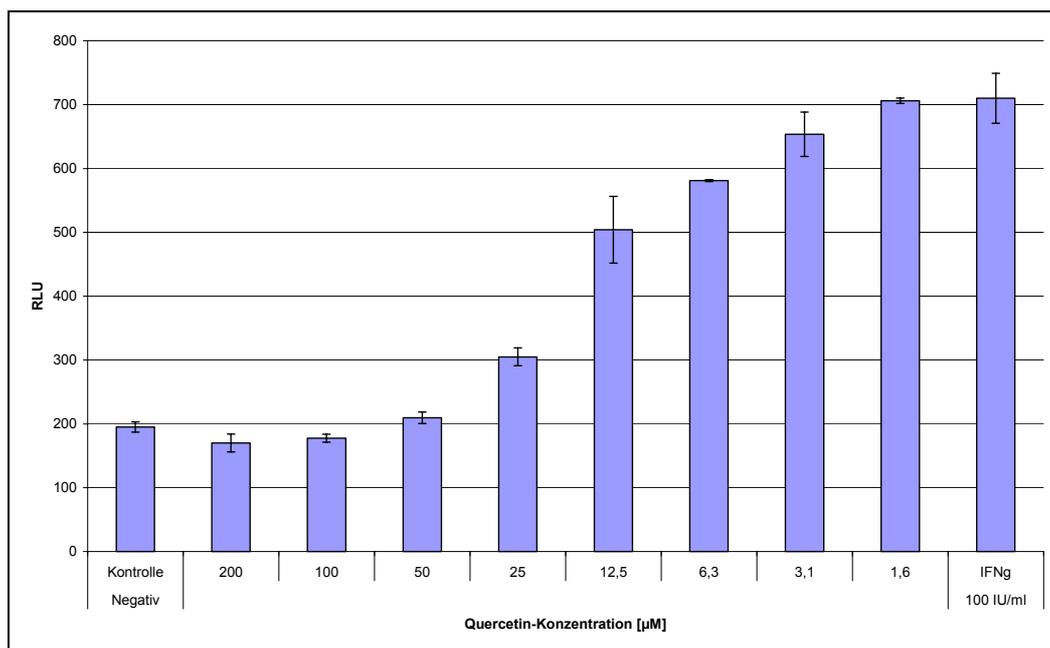


Abb. 3.2.14: GAS-Induktionstest mit Quercetin
(stabil GAS-Luc/Puromycin-transfizierte A549-Linie, Induktionsdauer 8 h,
100 IU/ml IFN γ)

Die IC_{50} von 12,5 μM liegt bei der $\text{IFN}\gamma$ -Inhibition in dem für die Proteinkinase-Inhibition bekannten Konzentrationsbereich (siehe Tab 3.2.1) Die Zytotoxizitätsuntersuchung für Quercetin über 40 h auf A549 Zellen zeigte in einer Konzentration von 50 μM eine Verringerung um 30% sowie bei 25 μM keine Verringerung der Vitalität (siehe Abb. 3.2.15). Bei niedrigeren Konzentrationen trat sogar eine geringfügige Steigerung der als Maß der Vitalität gemessenen Extinktion nach MTS-Färbung auf.

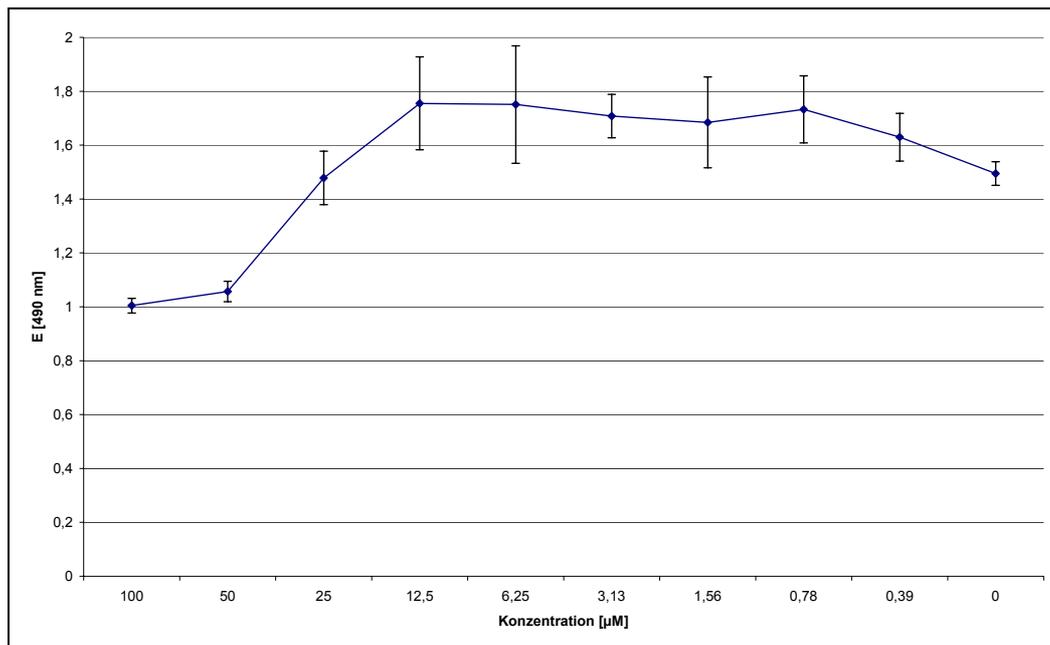


Abb. 3.2.15: Zytotoxizitätsbestimmung für Quercetin
(40 h Inkubation auf A549-Zellen, Vitalitätsbestimmung über MTS-Färbung und Extinktionsmessung bei 490 nm)

Liegt tatsächlich eine von der Zytotoxizität unabhängige Inhibition der $\text{IFN}\gamma$ -Antwort vor, sollte sich diese im Test auf die konstitutive *pias1*-Promotorgetriebene Luciferase-Expression (siehe Kapitel 3.7.2) dadurch bemerkbar machen, dass die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Repression verringert wird. Bei einer Konzentration von 12,5 μM war dieser Effekt gegen 100 IU/ml $\text{IFN}\gamma$ maximal und bis 3 μM signifikant. $\text{IFN}\gamma$ verursachte auch in Anwesenheit von 12,5 μM Quercetin eine Inhibition der Luciferase-Expression um etwa 50 %. Ohne die anti- $\text{IFN}\gamma$ -Wirkung des Quercetins ist diese jedoch um weitere 50 % verringert (siehe Abb. 3.2.16).

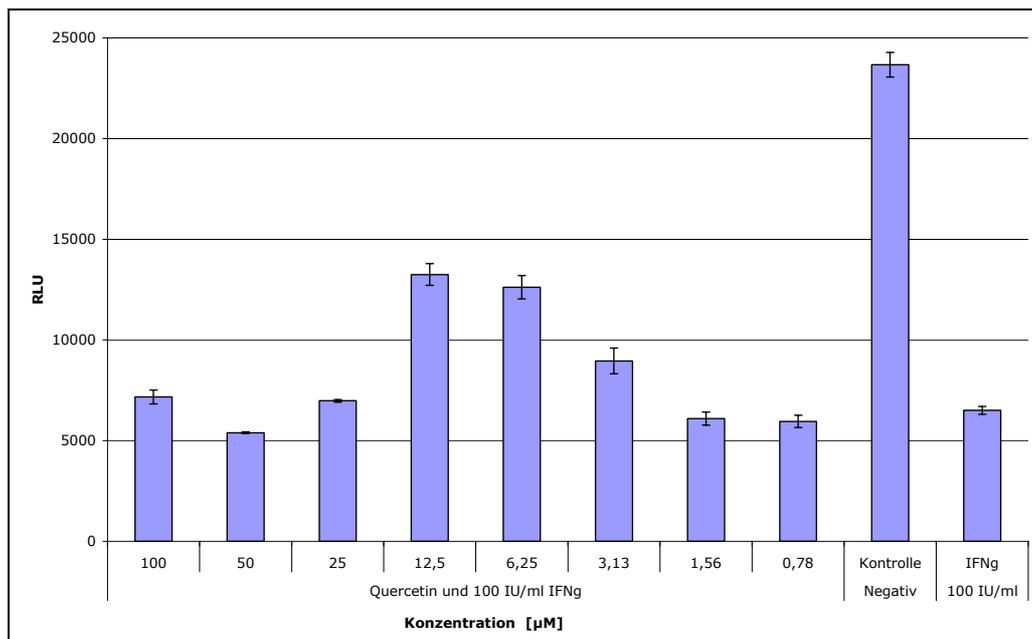


Abb. 3.2.16: Quercetin als Inhibitor der $IFN\gamma$ -induzierten *pias1*-Luciferase-Repression (stabile *pias1*-Luciferase/Puomycin A549-Linie, über 50 h mit 100 IU/ml $IFN\gamma$ und Quercetin stimuliert, Negativkontrolle bestehend aus RPMI mit 10% NBCS)

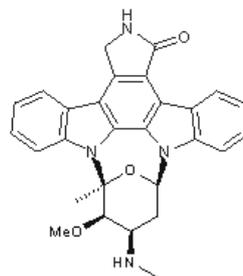


Abb. 3.2.17: Strukturformel des Staurosporin

Um einen potenten zellpermeablen Breitband-Proteinkinase-Inhibitor handelt es sich beim Staurosporin aus *Streptomyces sp* ($M_w=466.5$ g/mol) (freundliche Gabe von Prof. H. Laatsch). Staurosporin hat eine Vielzahl an Effekten auf zellulärer Ebene. Es ist als Apoptose-Induktor für Tumorzellen bekannt und arretiert nicht entartete Zellen am G_1 -Kontrollpunkt. Die Konzentrationen für eine Inhibition der einzelnen Kinasen sind unterschiedlich und liegen in der Regel im nanomolaren Bereich (siehe Tab. 3.2.2).

Hier diene Staurosporin als ein Kontrolle der Konsequenzen einer unspezifischen Kinaseinhibition für die einzelnen Messsysteme. Eine dosisabhängige Inhibition des GAS-Induktionstests wurde mit einer IC_{50} zwischen 25 - 50 nM bestimmt (siehe Abb. 3.2.18).

Tab. 3.2.2: Kinase-Inhibition durch Staurosporin

Kinase	IC ₅₀ [nM]
CaM	20
Myosin-Leichtketten-Kinase	1.3
PKA	7
PKC	0.7
PKG	8.5

Die Tyr⁷⁰¹-phosphospezifische Stat1-Aktivierung wurde durch 100 nM Staurosporin in IFN γ -stimulierten A549-Zellen nahezu vollständig inhibiert (siehe Westernblot Abb. 3.2.6)

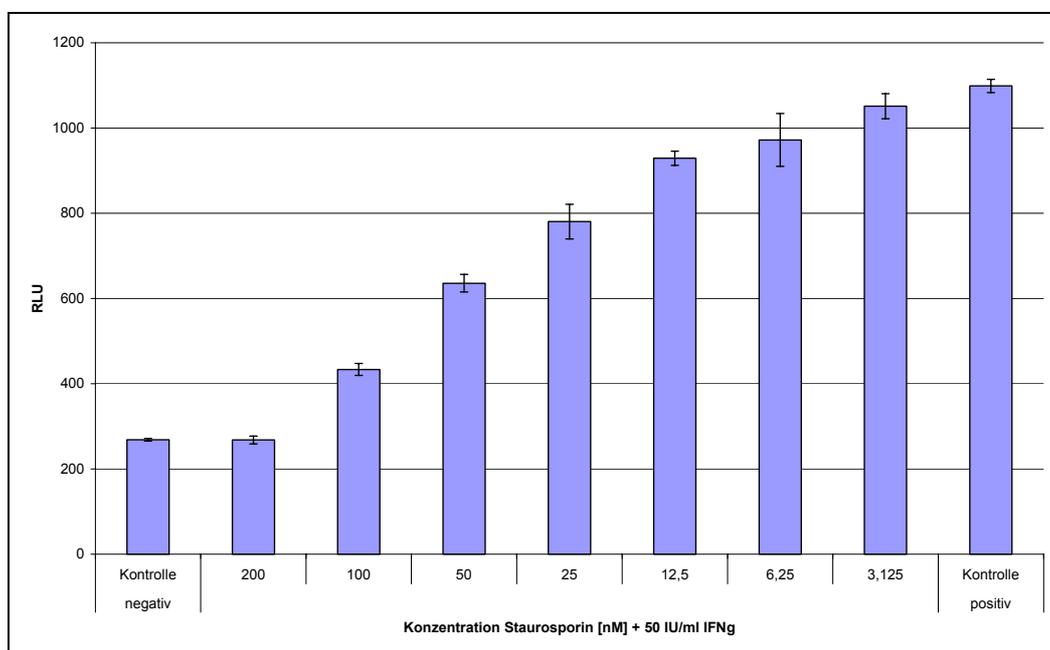


Abb. 3.2.18: Staurosporin im GAS-Induktionstest (stabil GAS-Luciferase/Puromycin transfizierte A549-Linie, 6 h Induktion mit 50 IU/ml IFN γ)

Wie für einen unspezifischen Kinase-Inhibitor zu erwarten, wurde keine anti-IFN γ -spezifische Wirkung im antiviralen Test (siehe Abb. 3.2.19) oder im IFN-reprimierten *pias1*-Promotor-Luciferase-Test (Daten nicht gezeigt) gemessen.

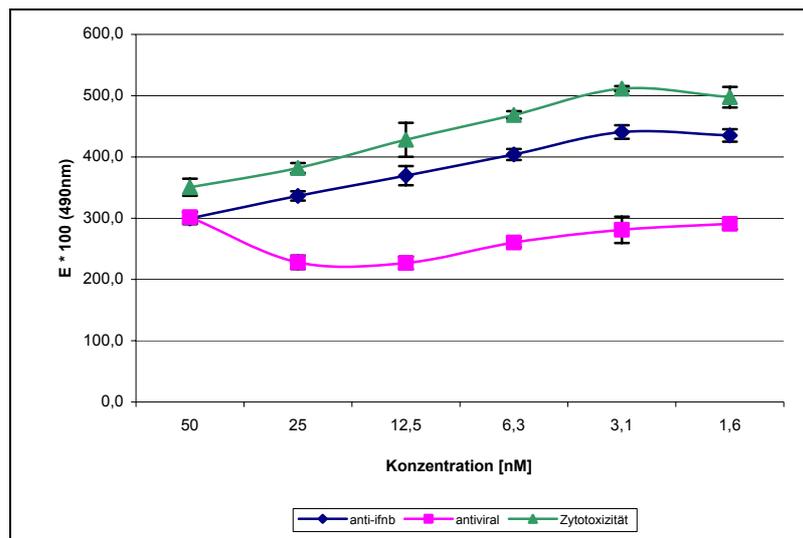


Abb. 3.2.19: anti-IFN-Aktivität von Staurosporin im antiviralen Test (A549 Zellen wurden mit/ohne 100 IU/ml IFN β der EMC-Viruslyse ausgesetzt: anti-IFN β /antiviral; als Zytotoxizitätskontrolle wurde Staurosporin über 24 h ohne Virus oder IFN getestet)

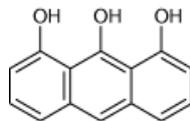


Abb. 3.2.20: Strukturformel für Dithranol (1,8,9-Anthracen-1,8,9-triol)

Das unter dem internationalen Freinamen Dithranol bekannte 1,8,9-Anthracen-1,8,9-triol wird gegen Psoriasis eingesetzt. Eine definitive Heilung der Schuppenflechte ist bis heute nicht möglich. Die Auslösung eines neuen Psoriasis-schubes durch bestimmte Provokationsfaktoren kann jederzeit wieder erfolgen. Ziel der Behandlung ist es, die Entzündung zu dämpfen und die gesteigerte Zellvermehrung und Schuppenbildung zu bremsen sowie einen neuen Schub hinauszuzögern.

Dithranol fiel bereits als Inhaltsstoff des *Rheum*-Extraktes als Inhibitor der IFN γ -vermittelten Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung auf (siehe Abb. 3.4.10). Im GAS-Induktionstest inhibierte Dithranol die IFN γ -Wirkung mit einer vergleichsweise niedrigen IC₅₀ von 500 nM (siehe Abb. 3.2.21).

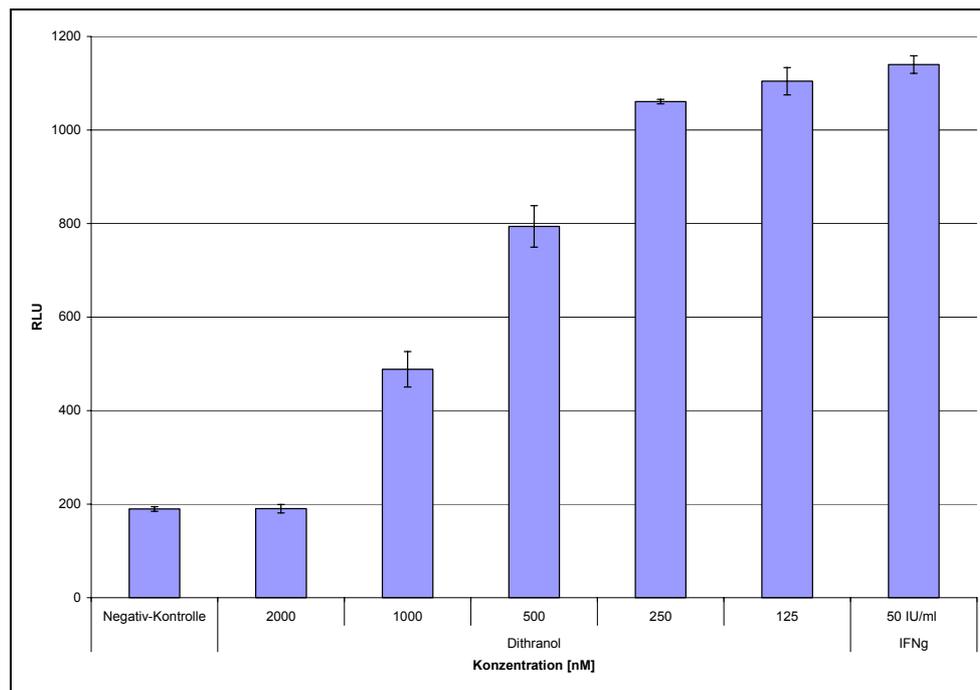


Abb. 3.2.21: GAS-Induktionstest mit Dithranol
(stabil transfizierte GAS-Luc A549-Linie, 6 h Induktionsdauer,
Induktion mit 50 IU/ml IFN γ)

Betrachtet man im Vergleich zur IC₅₀ von 500 nM die antiproliferative Eigenschaft des Dithranol auf A549-Zellen über einen Zeitraum von 72 h (Abb. 3.2.22), zeigte sich noch in einer Konzentration von 2 μ M keine Verminderung des Zellwachstums und der Zellvitalität.

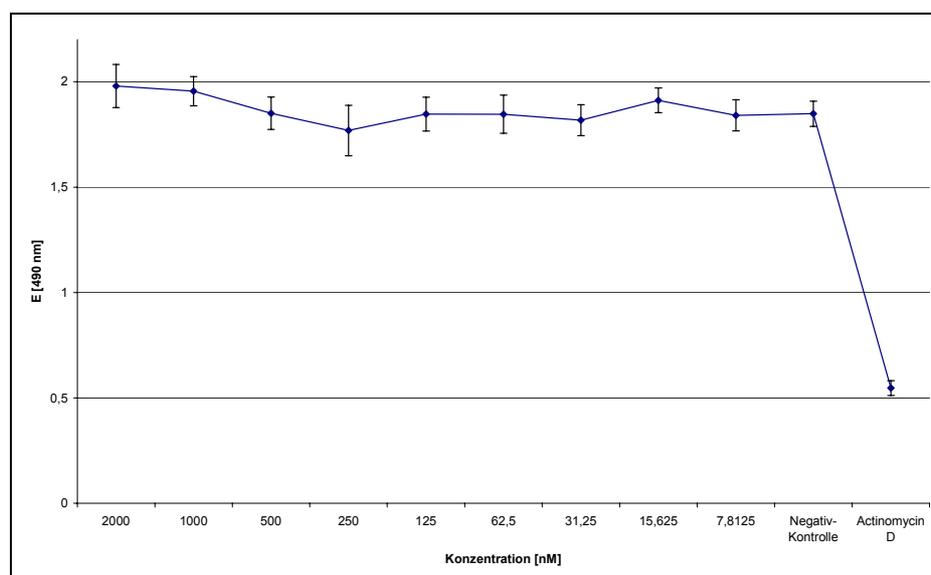


Abb. 3.2.22: Antiproliferationstest für Dithranol
(72 h Wirkstoffinkubation auf A549-Zellen, Vitalitätsbestimmung
über MTS-Färbung und Extinktionsmessung bei 490 nm)

3.3 Zusammenfassung des Screenings

Das Primärscreening auf antivirale und den IFN-Schutz aufhebende Aktivität wurde mit insgesamt über 1.000 Proben unterschiedlicher Provenienz durchgeführt. Das Probengut beinhaltet als größtem und biologisch aktivsten Anteil Reinsubstanzen und Mischpräparate aus dem „Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie“, eine recht umfangreiche Anzahl an Peptidfraktionen und einen mit 20 Substanzen kleinen ethnopharmakologischen Ansatz mit Medizinalpflanzen.

3.3.1 Substanzen aus dem „Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie“

Aus den drei Arbeitsgruppen im Verbund des Niedersächsischen Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie von Prof. Dr. Hartmut Laatsch und Prof. Dr. Axel Zeeck (Göttingen), sowie Prof. Dr. Gabriele M. König (Bonn) wurden insgesamt 602 Substanzen im Primärscreening in vier verschiedenen Konzentrationen als Dreifachbestimmung getestet. Bei einer eingegangenen Probenmenge von typischerweise etwa 1 mg, die in 100 µl DMSO aufgenommen wurden ergibt sich ein getestetes Konzentrationsfenster von 50 µg/ml bis 50 ng/ml.

Tab. 3.3.1: Zusammenfassung der Aktivitäten im Primärscreening

Arbeitsgruppe	Gesamtprobenzahl	zytotoxische Proben	antivirale Proben	anti-IFN γ -aktive Proben
Laatsch	348	171 (49%)	50 (14%)	3 (0,86%)
Zeeck	162	31 (19%)	16 (10%)	0
König	92	32 (35%)	22 (24 %)	0
Total	602	234 (39%)	88 (15%)	3 (0,5%)

Eine Probe wurde als zytotoxisch bewertet, wenn sie nach 24 h Inkubationszeit die Zellvitalität um mehr als 30% verringerte. Als antiviral wurde eine Verringerung der virusbedingten Vitalitätsabnahme um mindestens 30% bezeichnet.

Als anti-IFN γ -aktiv wurde eine Probe eingestuft, bei der trotz IFN-Schutz eine signifikante Vitalitätsverringering auftrat, welche sich nicht auf eine zytotoxische Wirkung zurückführen ließ.

Die Mehrzahl an antiviral wirkenden Proben war entweder nur in der höchsten getesteten Konzentration und/oder bei einer einhergehenden moderat zytotoxischen Wirkung aktiv. Eine klar von der Zytotoxizität trennbare antivirale Wirkung im nanomolaren Konzentrationsbereich wurde bei drei Proben festgestellt.

3.3.2 Screening mit Peptidfraktionen

Aus dem Niedersächsischen Institut für Peptidforschung (IPF) standen 453 Fraktionen aus der Hämofiltrat-Peptid-Bank zur Verfügung. Die getesteten Proben entsprachen je einem 2 L-Äquivalent an Hämofiltrat und wurden durch RP-HPLC aus acht verschiedenen pH-Pools gewonnen. Die Peptidkonzentration lag zwischen 200 μ g und 5 mg/ml. Es wurde eine 10-fache Verdünnung dieser Stammlösung als Dreifachbestimmung auf zytotoxische, anti-EMC und anti-IFN γ -Wirkung im Primärscreening getestet. Bei keiner der 453 Peptid-Proben wurde eine dieser Aktivitäten festgestellt.

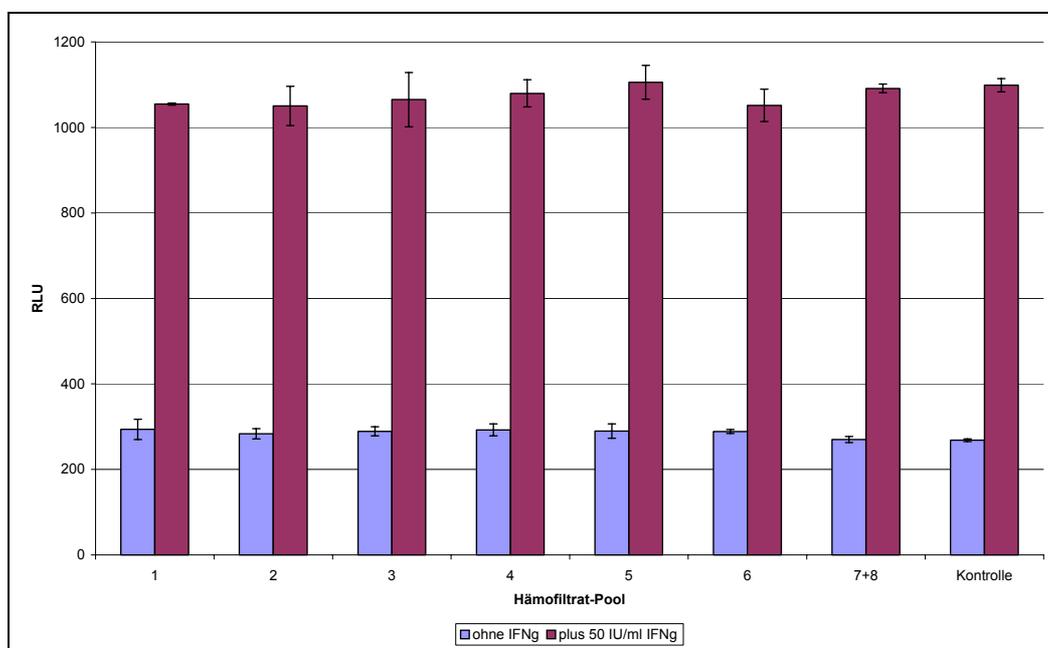


Abb. 3.3.1: GAS-Induktionstest mit Peptidfraktionen
(stabil GAS-Luciferase/Puromycin transfizierte A549-Linie, pH-Pools 1 bis 6, 7+8 lagen bereits vereint vor, jeweils 100 μ g/ml, 6 h Induktionsdauer)

Mit den acht verschiedenen pH-Pools, welche als Ursprung zur Erzeugung der weiteren Fraktionen dienten, wurde zusätzlich auf eine Induktion des GAS-Promotors ohne und eine Inhibition in Gegenwart von 50 IU/ml IFN γ getestet (siehe Abb. 3.3.1). Dafür wurde eine stabil GAS-Luciferase/Puromycinresistenz kotransfizierte A549-Linie mit 100 μ g/ml Peptidgemisch über 6 h inkubiert und anschließend die Luciferase-Expression gemessen (siehe Abb. 3.3.1). Auch hier konnte weder eine synergistische noch eine antagonistische Wirkweise zum IFN γ festgestellt werden.

3.3.3 Screening mit Medizinalpflanzen

Die Medizinalpflanzen zeigten zum Teil eine dem *Rheum*-Extrakt vergleichbare moderate Antiviralität. Diese zeigten die Extrakte von *Boerhavia diffusa*, *Asparagus racemosus*, *Tinospora cordifolia*, *Trachyspermum ammi*, *Aegle marmelos*, *Dioscorea bulbifera* L, und *Zizyphus spinosus*. Im GAS-Induktionstest aktivierte keine der genannten Substanzen in den antiviral wirksamen Konzentrationen die Luciferase-Expression.

Eine anti-IFN γ -Wirkung wurde im antiviralen Primärscreening für keine der extrahierten Medizinalpflanzen detektiert. Ausgehend von der moderaten Antiviralität wurde exemplarisch eine genauere Charakterisierung des *Rheum palmatum*-Extraktes durchgeführt (siehe Kapitel 3.4).

3.4 *Rheum palmatum*-Extrakt

10 g pulverisierten *Rheums* wurden analog den taiwanesischen Medizinalpflanzen mit 30 ml Ethanol ü.N. unter Schütteln extrahiert und ein 10 ml-Aliquot bis zur Trockne eingeengt und in 500 µl DMSO aufgenommen ($c = 0,8 \text{ g/ml}$). Diese Probe zeigte beim Screening-Primärassay eine antivirale Aktivität, welche nachfolgend konzentrationsabhängig bestimmt und mit der Zytotoxizität verglichen wurde (siehe Abb. 3.4.1).

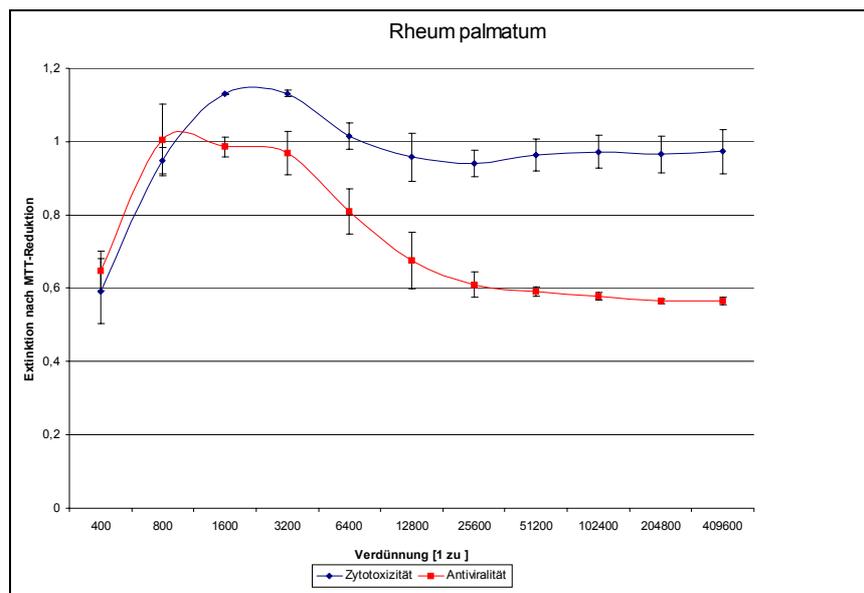


Abb. 3.4.1: Antivirale und zytotoxische Eigenschaft des Rheum-Extrakts (A549-Zellen; 20 h EMC-Lyse, MTT-Reduktion)

Aufgrund der antiviralen Aktivität mit einer EC_{50} in einer Verdünnung von 1 zu 6.000 wurde im Stat1-phosphospezifischen Western-Blot getestet, ob durch das *Rheum*-Extrakt eine IFN-analoge Stat1-Aktivierung erfolgt. Stattdessen wurde jedoch eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung nach Probeninkubation und 30-minütiger IFN γ -Stimulierung (1.000 IU/ml) der A549-Zellen festgestellt (siehe Abb. 3.4.2). Bei Auswertung der Bandenintensitäten (NIH-Image) wurde bestimmt, dass bei einer 1:1.600-fachen Verdünnung nur knapp 30% der Stat1-Menge der Positivkontrolle phosphoryliert wurden. Bei 3.200-facher Verdünnung sind es etwa 60% und bei 6.400 facher tritt keine detektierbare Inhibierung der Phosphorylierung mehr auf (siehe Abb. 3.4.2).

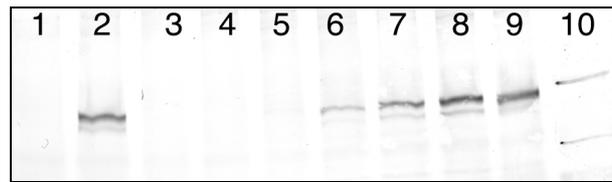


Abb. 3.4.2: konzentrationsabhängige Inhibition der Stat1-Phosphorylierung nach $IFN\gamma$ -Stimulation durch Rheum-Extrakt (in DMSO); Western-Blot von A549-Gesamtzelllysate mit anti-Stat1-AK (obere Bande: Stat1 α , untere: Stat1 β)

1: -Kontrolle; 2: +Kontrolle (1000 U $IFN\gamma$)

3: Rheum 1: 200; 4: Rheum 1: 400; 5: Rheum 1: 800; 6: Rheum 1: 1.600; 7: Rheum 1: 3.200;

8: Rheum 1: 6.400; 9: Rheum 1: 12.800; 10: LMW (97,4 kD, 66,2 kD)

Durch eine erste grobe Fraktionierung des Rohextraktes durch Dünnschichtchromatographie anhand der vorgefundenen Aktivität als Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierungsinhibitor war die aktive Substanz bei 80% Methanol als mobiler Phase durch einen R_f -Wert von 0,82 gekennzeichnet (siehe Fraktion 3 in Abb. 3.4.3). Das Rheum-Extrakt wurde dazu über die DC aufgetrennt und drei Bereiche (unterer: Fraktion 1, mittlerer: Fraktion 2 und oberer: Fraktion 3) von der DC-Platte isoliert und zur Kontrolle erneut über DC getrennt und unter UV visualisiert.

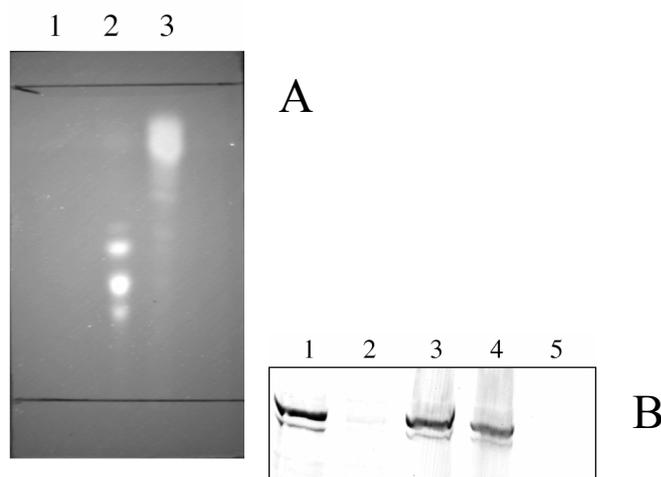


Abb. 3.4.3: A: Trennung der Fraktionen 1-3 des Rheum-Extraktes über DC

Visualisierung bei 254nm, Linien markieren Auftrag und obere Lauffront

B: Stat1-Phosphospezifischer Western-Blot der Rheum-Fractionen 1 bis 3

1: 1.000 IU/ml $IFN\gamma$; 2: RPMI-Negativkontrolle;

3: Rheum Fraktion 1 plus $IFN\gamma$; 4: Fraktion 2 ; 5: Fraktion 3

Wurden mit dem GAS-Luciferase-Reporterkonstrukt transfizierte A549-Zellen mit verschiedenen Rheum-Extrakt-Verdünnungen 2 h vor $IFN\gamma$ -Stimulus vorinkubiert, so konnte man nach achtstündiger IFN -Stimulation eine konzentrationsabhängige Inhibition der Expression des Reportergens feststellen (Abb. 3.4.4).

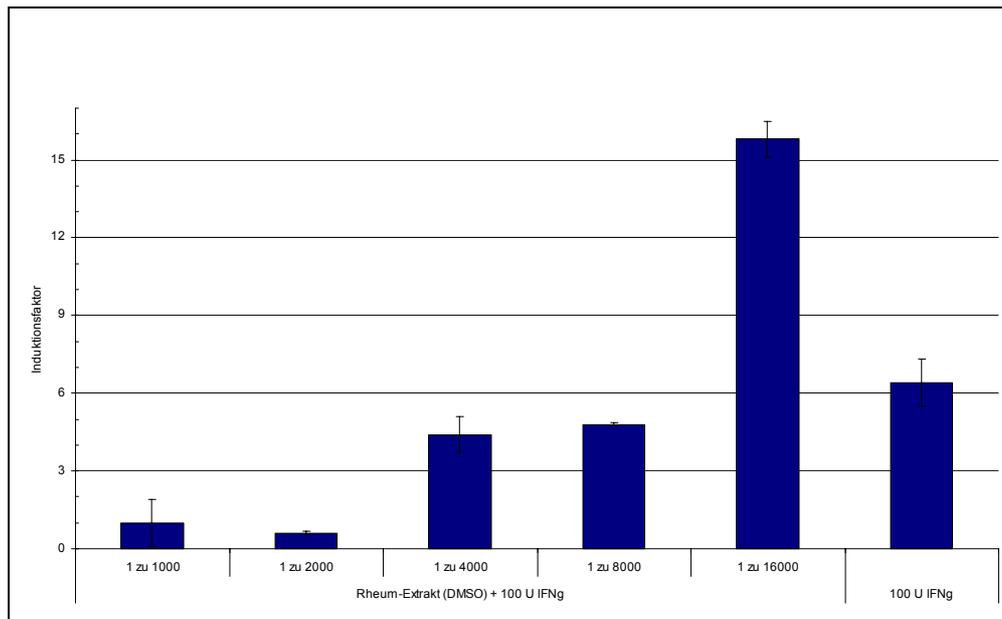


Abb. 3.4.4: Inhibition der GAS-Luciferase Induktion durch Rheum-Extrakt (transiente Transfektion von A549-Zellen, 8 h Induktion)

Unerwartet war jedoch die Erhöhung der Chemolumineszenz, die bei einer *Rheum*-Verdünnung von 1 zu 16.000 gemessen wurde (Induktionsfaktor 15,8). Damit liegt sie um mehr als das Doppelte über der Positivkontrolle (Induktionsfaktor 6,4). Eine weitere Variable bei dieser Messung war die DMSO-Konzentration. Testete man zur Kontrolle eine DMSO-abhängige GAS-Induktion zeigte sich keine entsprechende Induktion (Daten nicht gezeigt).

Um die Frage der Spezifität der Inhibition der Stat1-Phosphorylierung zu klären, wurden A549-Zellen mit dem *Rheum*-Extrakt für 10 min inkubiert und dann über 30 min mit einer 100 μ M Natriumpervanadatlösung unspezifisch die Phosphatasen inhibiert. Da der Phosphorylierungsstatus eines Proteins vom Gleichgewicht zwischen Kinase- und Phosphatase-Aktivität abhängt, liegt das Gleichgewicht im Fall einer Phosphataseinhibition für phosphorylierbare Proteine auf der Seite der phosphorylierten Form. Inhibiert man jedoch vorher durch einen allgemeinen Kinase-Inhibitor die Phosphorylierungsreaktion, so bleiben die Proteine unphosphoryliert. Der Tyrosin-Phosphorylierungs-Status wurde dabei mit einem Phosphotyrosin-spezifischen AK im Western-Blot detektiert.

Aus Abb. 3.4.5 ist ersichtlich, dass das *Rheum*-Extrakt die Phosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen inhibierte. Dies zeigte, dass es sich bei der Inhibierung der Stat1-Phosphorylierung in der getesteten Konzentration nicht um die spezifische Inhibition einer Tyrosinkinase des Jak/Stat-Signalweges handelt, sondern einer großen Zahl und damit unspezifisch erfolgte.

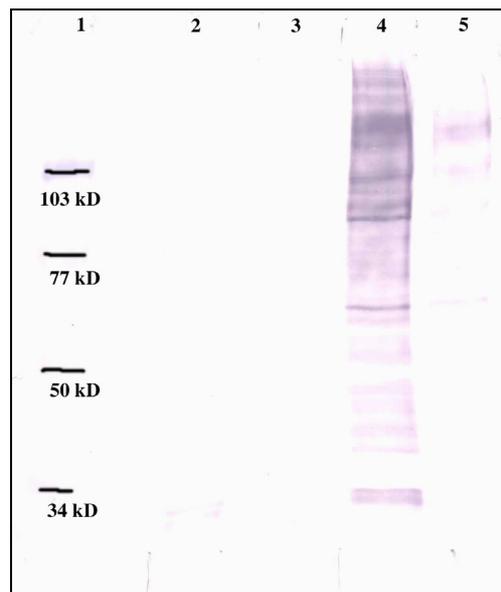


Abb. 3.4.5: Phosphorylierungsinhibition durch Rheum
 1: LMW, 2: 10.000 IU/ml IFN γ + Rheum (1:1.000)
 3: 10.000 IU/ml IFN γ , 4: 100 μ M Pervanadat,
 5: 100 μ M Pervanadat + Rheum (1:1.000)
 A549-Gesamtzell-Lysat nach 30 min Stimulus über
 SDS-PAGE getrennt und im Western mit einem
 anti-Phosphotyrosin-AK detektiert

Um die Spezifität der Inhibition/Induktion des GAS-Luciferase-Systems durch das *Rheum*-Extrakt beurteilen zu können, wurde eine analoge Versuchsanordnung für das mit *VSV* induzierte humane *ifn β* -Promotor-Luciferase-System (siehe Kapitel 3.7.1) durchgeführt. Die Induktionsdauer betrug ebenfalls 8 h.

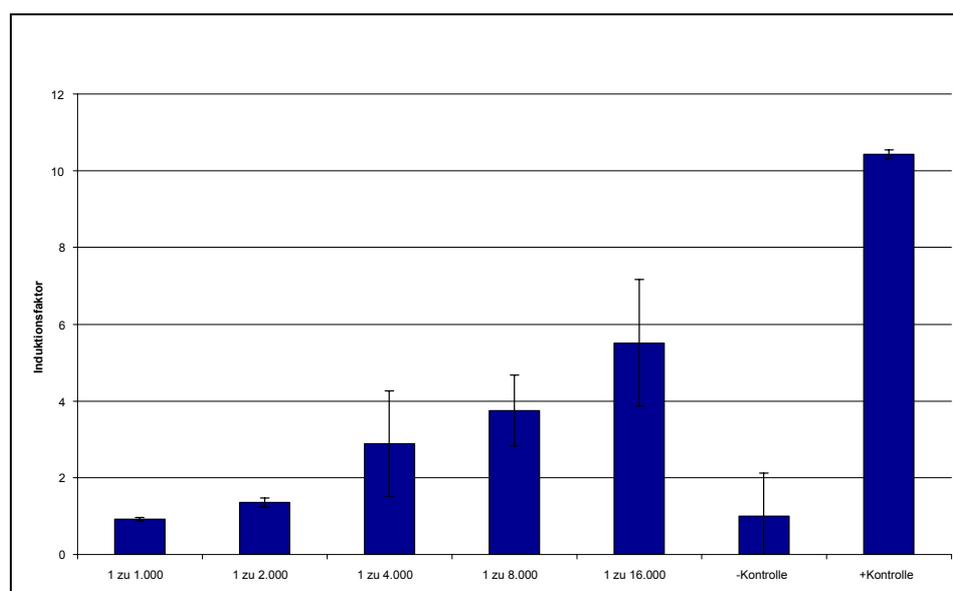


Abb. 3.4.6: Inhibition der huIFN β -Promotor-Luciferase-Induktion durch Rheum-Extrakt
 (transiente Transfektion des IFN β -Promotor-Luciferase-Konstruktes in A549-Zellen, 8h Induktion mit VSV)

Bei der Induktion des humanen *ifn β* -Reporterkonstruktes (siehe Kapitel 3.7.1) in A549-Zellen war bei einer *Rheum*-Extrakt-Verdünnung von 1 zu 1.000 nach 8 h *VSV*-Stimulation eine vollständige Inhibition der Luciferase-Expression zu sehen (Abb. 3.4.6). Bei einer 16.000-fachen Verdünnung betrug die Inhibition noch 50 %. Auch dieser Befund spricht dafür, dass es sich bei der im *Rheum*-Extrakt vorgefundenen Aktivität nicht um die Wirkung eines IFN γ -spezifischen Inhibitors handelt. Die gefundenen Interaktionen in Form von Repression in hoher und Induktion des GAS-Promotors in geringer Konzentration, der Repression des *ifn β* -Promotors und der breiten Inhibition der Pervanadat-induzierten Tyr-Phosphorylierung, schloss jedoch einen spezifischen IFN γ -Inhibitor im Gemisch mit weiteren aktiven Substanzen nicht aus. In Tab. 3.4.1 sind bekannte Substanzen des *Rheum*-Extrakts aufgelistet.

Tab. 3.4.1: In *Rheum palmatum* (*Polygonacea*) nachgewiesene Substanzen
(nach Dr. Duke's Phytochemical Database)

Substanz	Konzentration [ppm]
Aloe-Emodin	
Aloe-Emodin-8- β -D-Glucosid	
3,5,4'-Trihydroxystilben-4'-O- β -D-Glucopyranosid	
4-(P-Hydroxyphenyl)-2-Butanon- β -D-Glucosid	
Chrysophanol	690 - 3,190
Eisen	100 - 180
Emodin	
Gallensäure	
Glukose	
Hyperin	
Kalium	6,330 - 21,600
Kalzium	9,630 - 12,400
D-Katechol	6 - 10
Kupfer	
Magnesium	1,980 - 2,560
Mangan	19 - 46
Natrium	140 - 175
Physcion	
Physcion-8-O- β -D-Gentiobiosid	
Physcion-Diglukosid	
Quercitin	
Rhein	
Rheinosid	
Rheosmin	12,900
Sennosid-A	2,000 - 8,740
Sennosid-B	
Tannine	50,000 - 100,000
Tetralin	
Zimtsäure	
Zink	9 - 10

Die Unterschiede in der Zusammensetzung und den absoluten Gehalten der einzelnen Substanzen sind je nach Anbaugebiet, Erntezeit, Aufbereitung etc. zum Teil beträchtlich (*Shang and Yuan 2001*). Auch das Vorhandensein zusätzlicher pflanzlicher Sekundärmetabolite konnte in dieser Probe nicht ausgeschlossen werden.

Beim Vergleich dieser Substanzen mit bekannten pflanzlichen Kinase-Inhibitoren (siehe Tab 3.2.1) fiel das Augenmerk zunächst auf das Emodin. Das als Kinase-Inhibitor beschriebene Anthrachinonderivat (Kumar, Dhawan *et al.* 1998; Yim, Lee *et al.* 1999; Zhang, Lau *et al.* 1999) wurde als Kandidat der Inhibition der IFN γ -vermittelten Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung getestet (siehe Abb. 3.4.10). Eine Inhibition trat in Konzentrationen auf, die zugleich eine starke zytotoxische Wirkung aufwiesen (siehe Abb. 3.4.7). Die EC₅₀ nach 24 h auf A549-Zellen lag für Emodin bei 25 μ M.

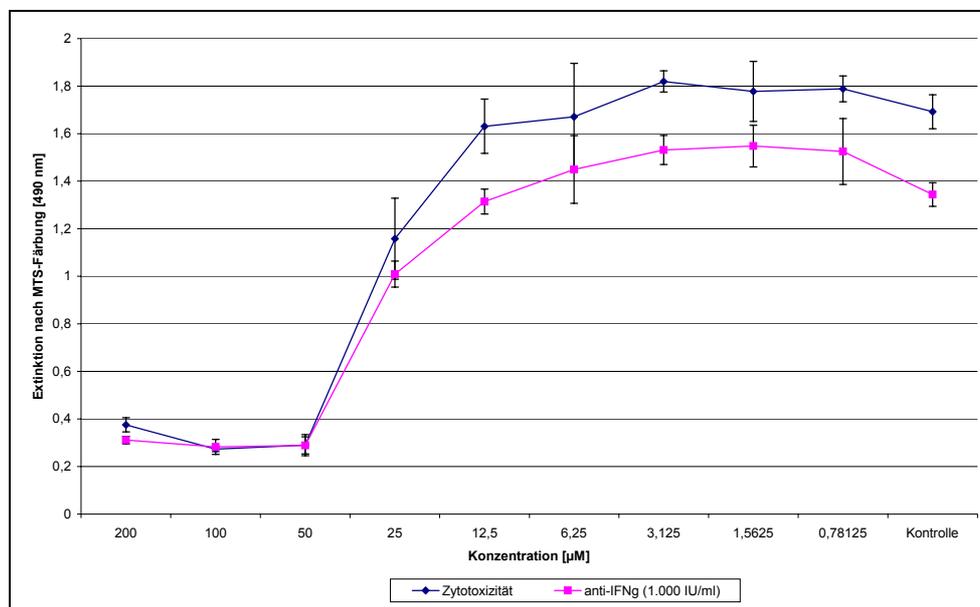


Abb. 3.4.7: *anti-IFN γ -Wirkung von Emodin im antiviralen Test (A549-Zellen wurden analog zum Primärassay nur mit Emodin (Zytotoxizität) oder mit Emodin, 1.000 IU/ml IFN γ , EMC-Virus (anti-IFN γ) für 1 d behandelt; Vitalitätsbestimmung erfolgte mittels MTS-Färbung und Extinktionsbestimmung bei 490 nm)*

Die IC₅₀ von 25 μ M ergab sich für Emodin auch im GAS-Induktionstest (siehe Abb. 3.4.8). Bei 12,5 μ M trat keine IFN γ -inhibitorische Wirkung durch Emodin mehr auf. Der Konzentrationsverlauf der Inhibition der GAS-Induktion war demnach mit dem der zytotoxischen Wirkung übereinstimmend. Ein Einsatz als spezifischer IFN γ -Inhibitor ergab sich somit für Emodin nicht.

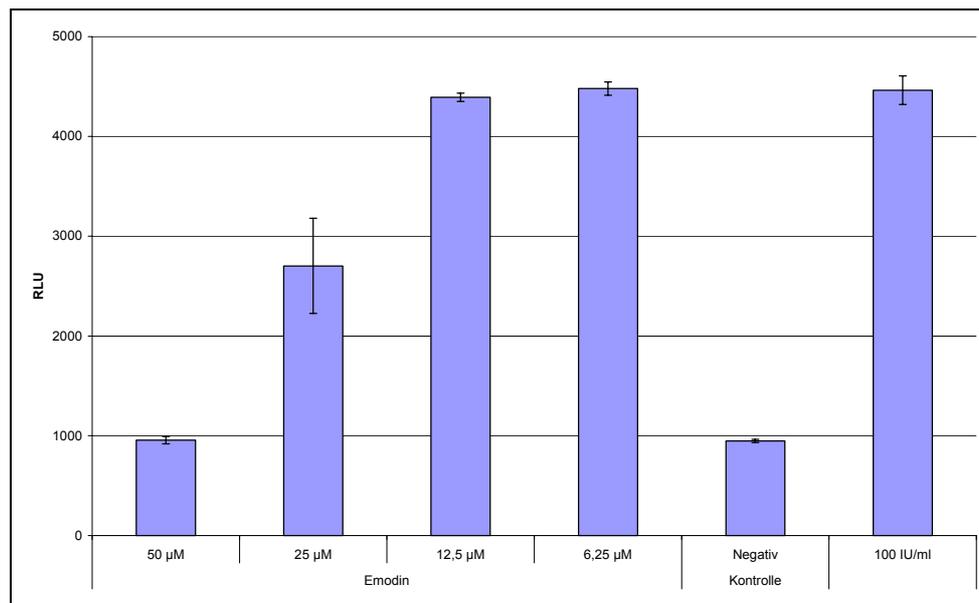
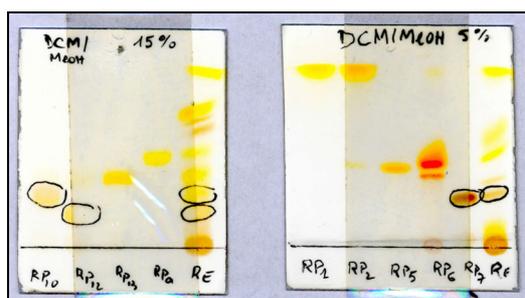


Abb. 3.4.8: Emodin als Inhibitor im GAS-Induktionstest
(stabil GAS-Luciferase/Puromycin transfizierte A549-Linie,
8 h Inkubationsdauer, 100 IU/ml IFN γ)

Um die widersprüchlichen biologischen Aktivitäten des *Rheum*-Extraktes (siehe Abb. 3.4.1) mit einer antiviralen auf der einen und der Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierungsinhibierenden Aktivität (siehe Abb. 3.4.2) auf der anderen Seite sowie der Repression und Induktion des GAS-Promotors in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Abb. 3.4.4) molekular zuordnen zu können, wurden 10g des *Rheum*-Extraktes von der AG Professor Laatsch chromatographisch in Reinsubstanzen getrennt (Abb. 3.4.9) und bestimmt.



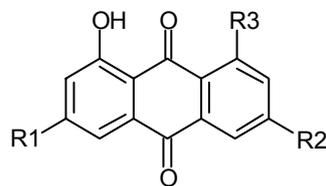
- RP1: Chrysophanol
- RP2: Physcion
- RP5: Aloe-Emodin
- RP6: Emodin
- RP7: Rhapontigenin
- RP10: Deoxyrhaponticin
- RP11: Rhaponticin
- RP13: Emodin-1-o- β -D-glukosid
- RPa: Pulmatin

Abb. 3.4.9: DC Auftrennung in Reinsubstanzen des *Rheum*-Extraktes

Die strukturellen Variationen der getesteten Anthrachinonderivate (Tab 3.4.2) sind zum Teil mit denen der Stilbenderivate (Tab. 3.4.3) vergleichbar und umfassen Substitutionen an den variablen Positionen durch Hydroxylgruppen, sowie Glykosylierungen. Dies ließ einen Vergleich der funktionalen Gruppen der Substanzklassen auf die Kinase-Inhibition am Beispiel der Stat1-Phosphorylierung zu.

Für die Verbindungen Pulmatin und Emodin-1-Glukosid, bei denen die Hydroxylreste durch einen Zucker ersetzt wurden, wurde die Kinase-Inhibition nicht festgestellt.

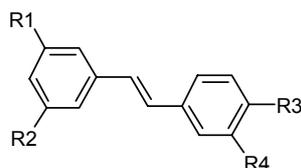
Tab. 3.4.2: Strukturformeln der Anthrachinonderivate



Substanzname	R1	R2	R3
Emodin	OH	CH ₃	OH
Aloe-Emodin	H	CH ₂ OH	OH
Emodin-1-Glukosid	OH	CH ₃	O-Glc
Pulmatin	H	CH ₃	O-Glc
Physcion	OCH ₃	CH ₃	OH
Rhein	H	COOH	OH
Chrysophanol	H	CH ₃	OH

Die in Abb. 3.4.9 aufgeführten Reinsubstanzen wurden auf die Eigenschaft der IFN γ -induzierten Stat1-Phosphorylierungsinhibition getestet. Im Konzentrationsbereich um die 500 μ M zeigten mehrere Substanzen eine Inhibition. Darunter waren das Anthrachinonderivat Emodin, Dithranol und Rhapontigenin (siehe Abb. 3.4.10). Interessant war dabei die unterschiedliche Inhibitionskompetenz der strukturell ähnlichen Stilben-Derivate Rhapontigenin und Piceatannol (siehe Tab. 3.4.3). Für die Glukoside Rhaponticin und Deoxy-Rhaponticin wurde darüber hinaus bis 1 mM keine Inhibition der Stat1-Phosphorylierung beobachtet.

Tab. 3.4.3: Strukturformeln der Stilbenderivate



Substanzname	R1	R2	R3	R4
Rhapontigenin	OH	OH	OCH ₃	OH
Resveratrol	OH	OH	OH	H
Piceatannol	OH	OH	OH	OH
Rhaponticin	OH	O-Glc	OCH ₃	OH
Deoxy-Rhaponticin	OH	O-Glc	OCH ₃	H
<i>trans</i> -Stilben	H	H	H	H

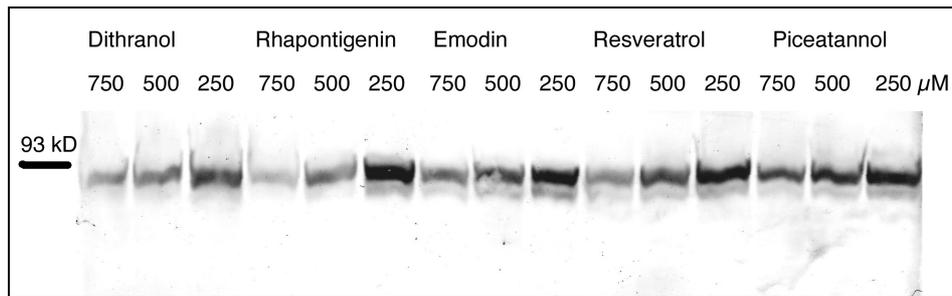


Abb. 3.4.10: Stat-Tyr⁷⁰¹-phosphospezifischer Blot mit Rheum-Einzelsubstanzen (A549-Gesamtzelllysat, 30 min Stimulation mit 1.000 IU/ml, Substanzkonzentrationen in µM, links: 93 kD Größenmarker nachgezeichnet)

Im GAS-Induktions-Test zeigten die Stilbene Resveratrol, Piceatannol und Rhapontigenin eine IC₅₀ um die 100 µM (siehe Abb. 3.4.11).

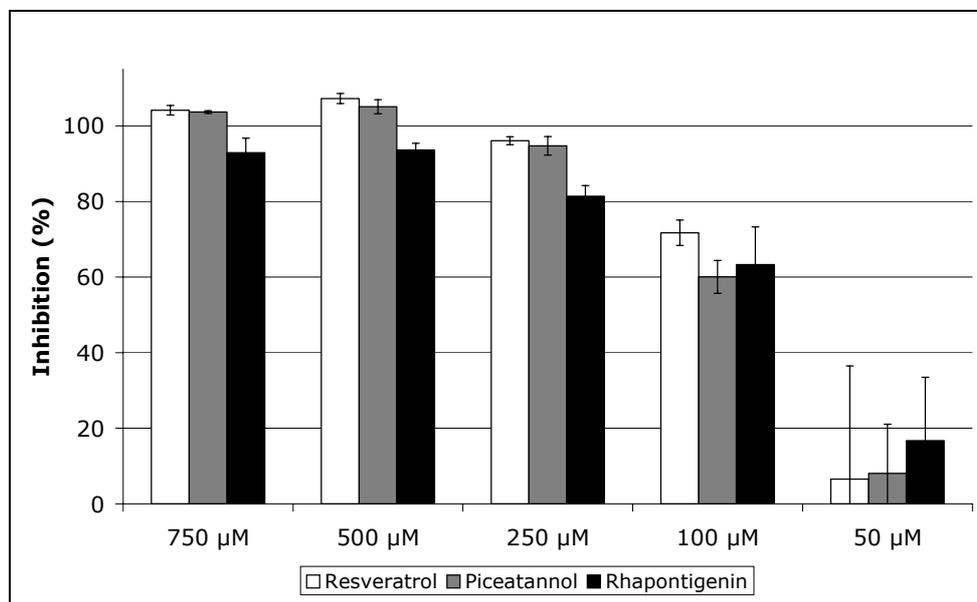


Abb. 3.4.11: Stilbenderivate im Vergleich als Inhibitoren der GAS-Induktion (transiente Transfektion von A549-Zellen, 6h Induktion mit 1000 IU/ml IFN γ)

Der unspezifische Phosphorylungsnachweis nach 30 min Pervanadatinkubation (100 µM) wurde im Westernblot mit dem Gesamtzelllysat von A549-Zellen mit einem Phosphotyrosin-AK durchgeführt (siehe Abb. 3.4.12). Er diene als Spezifitätstest gegenüber der Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung. Die ligandenunabhängige Pervanadat-Stimulation führte dabei zu einer starken Phosphorylierung einer Vielzahl an Proteinen. Dies wird aus dem Unterschied der detektierten Bandenanzahl und -intensität zur Negativkontrolle deutlich (siehe 3.4.12). Durch Ko-Inkubation mit den Stilbenderivaten könnte bei einer spezifischen Inhibition von nur einer der an der IFN γ -Signaltransduktion beteiligten Tyrosinkinasen die Mehrzahl der übrigen Phosphorylierungsereignisse ungehindert stattfinden.

Dies ließe ein Bandenmuster nach Art der Positivkontrolle erwarten und träfe nur für die 250 μM -Konzentration von Rhapontigenin und Resveratrol zu. Beide Substanzen zeigen in dieser Konzentration jedoch bereits keine Inhibition auf die Stat1-Phosphorylierung mehr (siehe Abb. 3.4.10). Im GAS-Luciferase-Assay sind die Stilbene bei 250 μM jedoch mit einer Reduktion um mehr als 80% noch sehr potente Inhibitoren der IFN γ -vermittelten Aktivierung (Abb. 3.4.11).

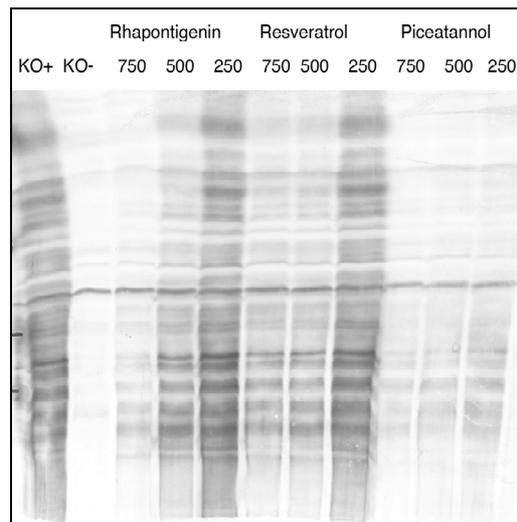


Abb. 3.4.12: Tyr-Phosphorylierung nach Stilben + Pervanadat-Stimulation (anti-Phosphotyrosin-Western Blot des A549-Zellen Gesamtzell-Lysats, 30 min Stimulation mit 100 μM Pervanadat und den angegebenen Stilbenderivaten in den jeweiligen Konzentrationen [μM])

Die Spezifität der gesuchten und oben nachgewiesenen Aktivität einer Inhibition von Kinasen, die am IFN γ -Signaltransduktionsweg beteiligt sind, durch die Stilbene Rhapontigenin, Resveratrol und Piceatannol, wurde durch den Primärtest an A549-Zellen überprüft.

IFN γ -stimulierte Zellen wurden in Abhängigkeit der Substanzkonzentration auf Viruslysierbarkeit untersucht und mit der zytotoxischen Wirkung verglichen (siehe Abb. 3.4.13). Rhapontigenin zeichnete sich dabei im Vergleich mit Resveratrol und besonders mit Piceatannol durch eine geringere Zytotoxizität aus. Eine spezifische Aufhebung des IFN γ -vermittelten Virusschutzes konnte weder für Rhapontigenin, noch Resveratrol noch Piceatannol gezeigt werden. Die Divergenz der Kurve der Zytotoxizität und der anti-IFN γ -Wirkung des Rhapontigenin (Abb. 3.4.13) bei 250 μM stellte eine nicht reproduzierte Schwankung (siehe Fehlerbalken) im Messsystem dar.

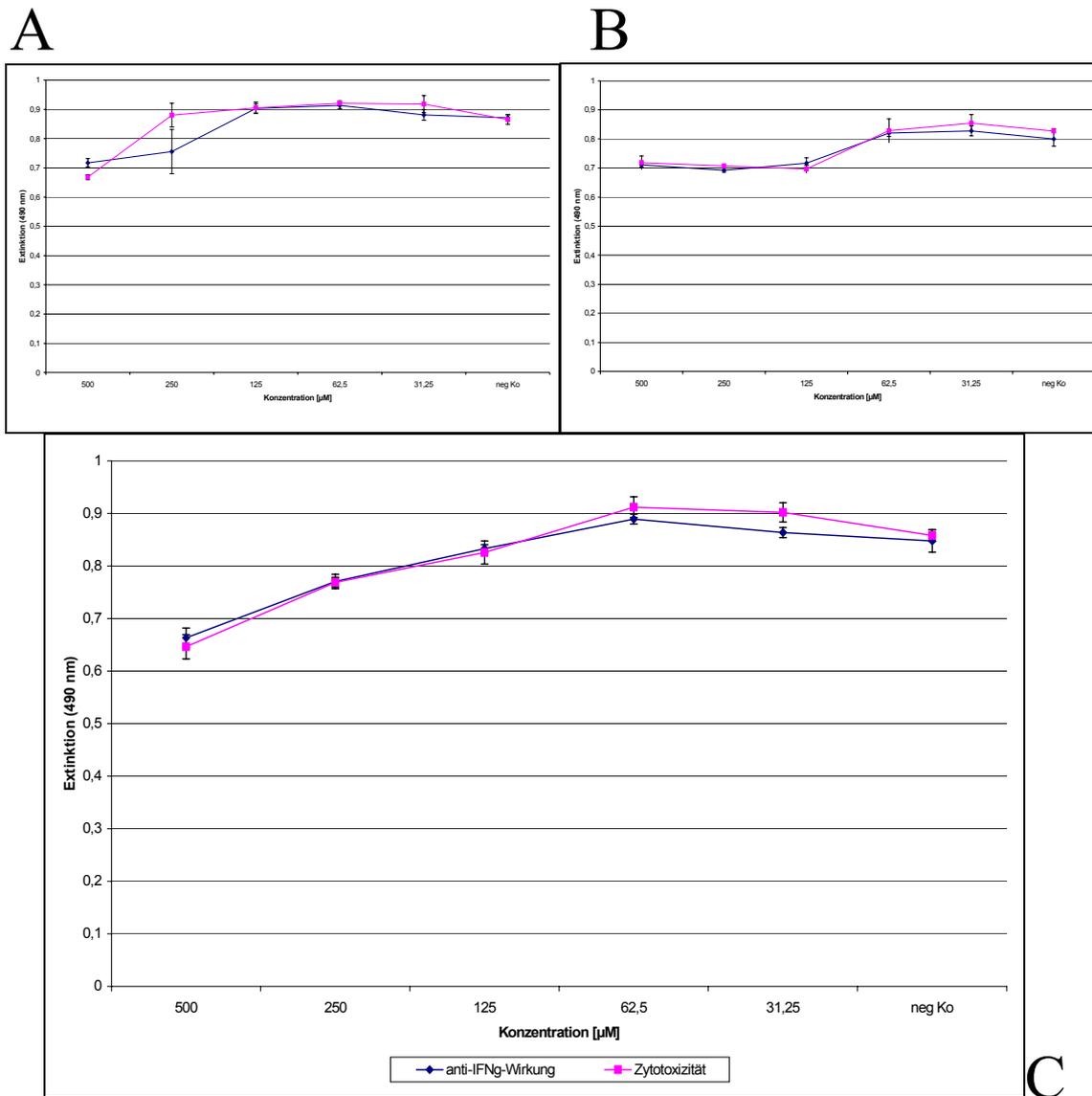


Abb. 3.4.13: anti-IFN γ -Wirkung der Stilben-Derivate
A: Rhapontigenin, **B:** Piceatannol, **C:** Resveratrol
 (A549-Zellen über 24 h mit Probe+100 IU/ml IFN γ +EMC als anti-IFN-Wirkung oder nur mit Probe als Zytotoxizitätsbestimmung inkubiert; Vitalitätsnachweis über MTT-Reduktionstest)

Beim Kontroll-Test auf eine Inhibition der CMV-promovierten Luciferase-Expression in Analogie zur GAS-Inhibition durch Stilbenderivate wurde überraschend ein Anstieg der gemessenen Photonenzahl gegenüber unstimulierten Zellen gemessen (Abb. 3.4.14). Bei 100 μ M ist für Rhapontigenin, Resveratrol und Piceatannol die Luciferaseaktivität geringer als bei 50 μ M, sie liegt jedoch noch immer um etwa den Faktor 4 höher als bei unstimulierten transfizierten Zellen.

Im Gegensatz zur inhibitorischen Wirkung der Stilbenderivate bei der IFN-induzierten GAS-Induktion wurde der entgegengerichtete Effekt einer erhöhten Luciferase-Aktivität bei konstitutiver Expression auch durch das unsubstituierte *trans*-Stilben erreicht.

Diese Wirkung ist also nicht von der für die inhibitorische Wirkung essenziellen Hydroxylgruppe abhängig. Der Effekt ist ebenso unabhängig vom Lösungsmittel DMSO (Daten nicht gezeigt).

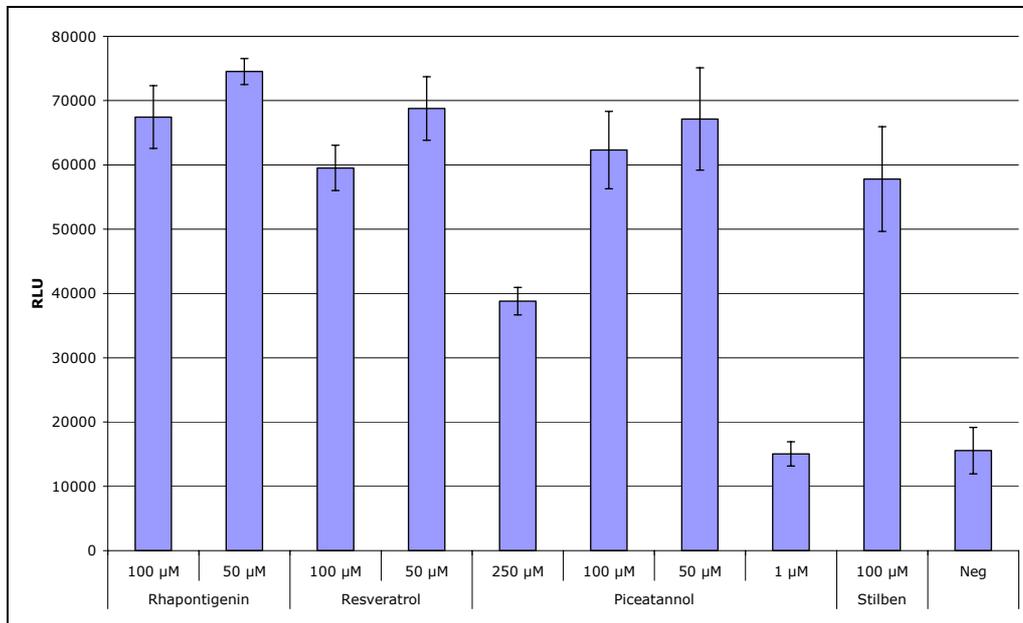


Abb. 3.4.14: Stilben-Effekt auf CMV-promovierte Luciferase-Expression (transiente Transfektion in A549, 24 h Wirkstoffinkubation)

Beim Konzentrationsvergleich zeigt sich, dass für die GAS-inhibitorische Aktivität wesentlich höhere Konzentrationen erforderlich sind als für die CMV-Promotor-aktivierende. Um den Einfluss geringer Stilbenkonzentrationen auf den stimulierten und nicht stimulierten GAS-Promotor zu ermitteln wurde eine stabil transfizierte A549-Linie über 43 h mit Resveratrol von 100 µM bis 1,6 µM inkubiert (siehe Abb. 3.4.15). Die maximale Aktivierung ergibt sich bei Stimulation mit IFN γ und 12,5 µM Resveratrol mit dem Induktionsfaktor 10 gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Gegenüber der IFN γ -Induktionskontrolle (100 IU/ml) ergibt sich eine Induktion um den Faktor 3. Eine Konzentration von 12,5 µM Resveratrol alleine bewirkte einen Anstieg der Luciferase-Expression auf das dreifache der Negativ-Kontrolle und erreichte damit nahezu den Wert der IFN γ -Induktion. Sowohl gegenüber der geringen konstitutiven Luciferase-Expression, als auch gegenüber der erhöhten stimulierten Expression wurde durch die Stilben-Derivate dieselbe Induktion um den Faktor drei bewirkt.

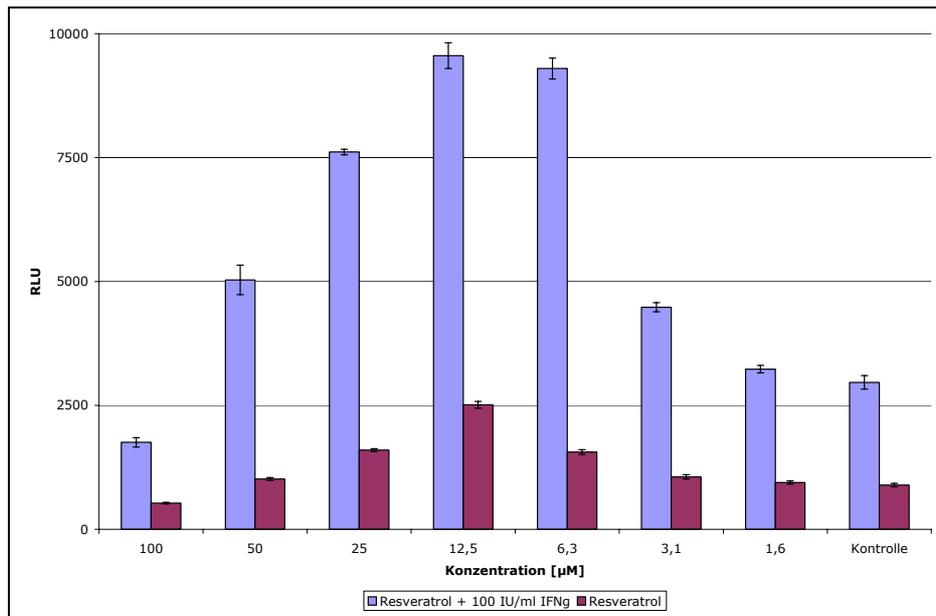


Abb. 3.4.15: Resveratrolwirkung auf GAS-Aktivierung in und ohne Gegenwart von IFN γ (stabil mit GAS-Luciferase/Puromycin transfizierte A549-Linie, 43 h Inkubation, 100 IU/ml IFN γ)

Die zuerst aufgefallene Aktivität des *Rheum*-Extraktes, die antivirale Wirkung gegen EMC-Lyse, wurde bei der Betrachtung der Reinsubstanzen nicht durch die Stilbene, sondern durch das Anthrachinonderivat Emodin vermittelt (siehe Abb. 3.4.16).

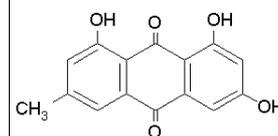
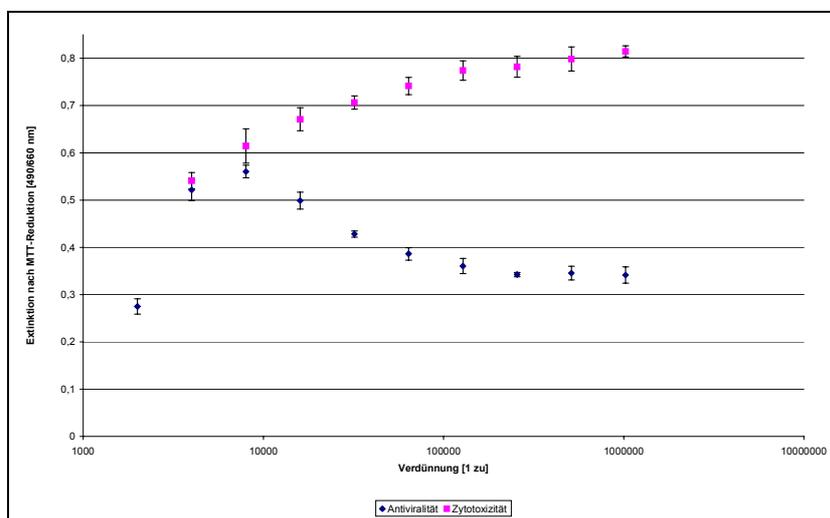


Abb. 3.4.16: antivirale Aktivität von Emodin

3.5 Charakterisierung der putativen $IFN\gamma$ -Inhibitoren

Die drei im Primärassay als anti- $IFN\gamma$ -wirksam identifizierten Proben zeigten diese Wirkung in einem feineren Konzentrationsraster noch deutlicher. Es handelte sich bei den Proben um die Rohfraktion eines Streptomyceten und zwei Reinsubstanzen.

Für den Zytotoxizitätsnachweis des Rohextraktes GW22/1326 wurden A549-Zellen für einen Tag mit verschiedenen Probenverdünnungen des Streptomyceten, inkubiert und danach die Zellvitalität mittels MTT-Reduktionstest bestimmt (siehe Abb. 3.5.1). Zur Messung der $IFN\gamma$ -Inhibition wurden die Zellen für 2 h mit den Probenverdünnungen vorinkubiert und danach für 1 h durch 1.000 U $IFN\gamma$ stimuliert. Wie an der blauen Kurve zu ersehen ist, vermochte eine Probenverdünnung von 1:16.000 den $IFN\gamma$ -vermittelten Virusschutz nahezu vollständig auszuschalten ohne dabei eine zytotoxische Wirkung zu haben. Eine IC_{50} lag für die IFN -Inhibition bei 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1 zu 20.000-fach verdünnt).

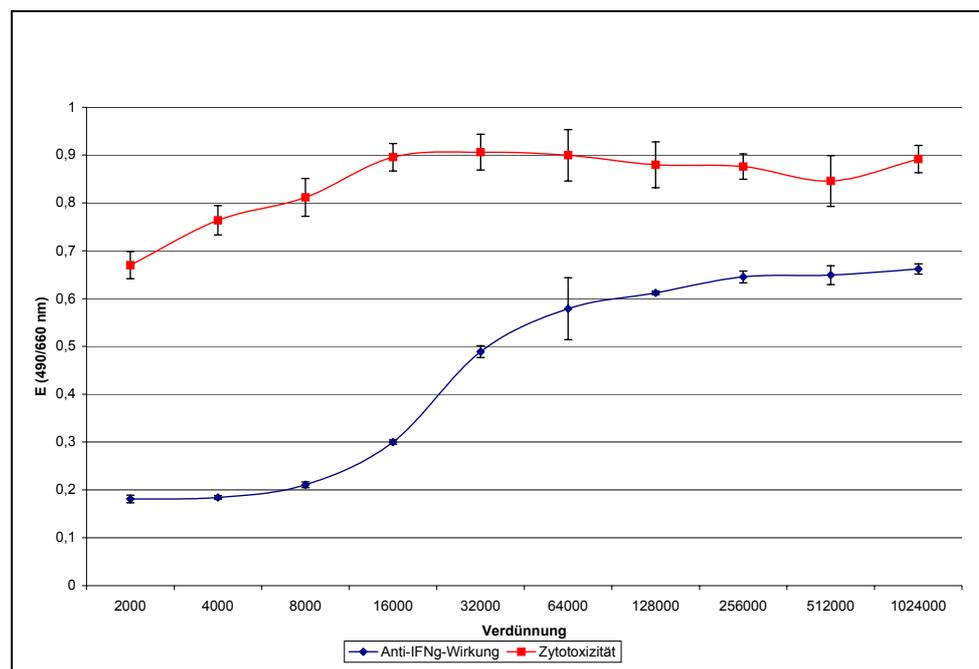


Abb. 3.5.1: zytotoxische und $IFN\gamma$ -inhibierende Aktivität des Rohextraktes des Streptomyceten-Stammes GW22/1326 (A549-Zellen über 24 h mit Probe (Zytotoxizität) oder Probe+1.000 IU/ml $IFN\gamma$ +EMC-Virus behandelt, Vitalitätsbestimmung durch MTT-Reduktion)

Um zu prüfen, ob die Inhibition des vermittelten Virusschutzes spezifisch gegen $IFN\gamma$ ist, wurde der Test analog auch mit den TypI-Interferonen $IFN\alpha$ und $IFN\beta$ durchgeführt.

Dabei zeigte sich eine gleichermaßen auftretende Inhibition des Virusschutzes durch TypI und TypII-Interferone (Daten nicht gezeigt). Eine Spezifität für IFN γ war bei der Aufhebung des vermittelten Virusschutzes nicht vorhanden.

Bei der Ermittlung der antiproliferativen Potenz des Streptomyceten-Rohextraktes an A549-Zellen nach drei Tagen Wirkstoffinkubation zeigte sich eine stärkere Zellschädigung als beim 24 h Zytotoxizitätstest. Unter dem Mikroskop war anhand der Zellmorphologie erkennbar, dass die zugehörige Kurve (Abb. 3.5.2) nicht durch einen antiproliferativen Effekt, sondern durch Zelltoxizität bedingt war. Die EC₅₀ liegt nach 72 h bei einer Verdünnung von 1 zu 32.000 (4,4 μ g/ml).

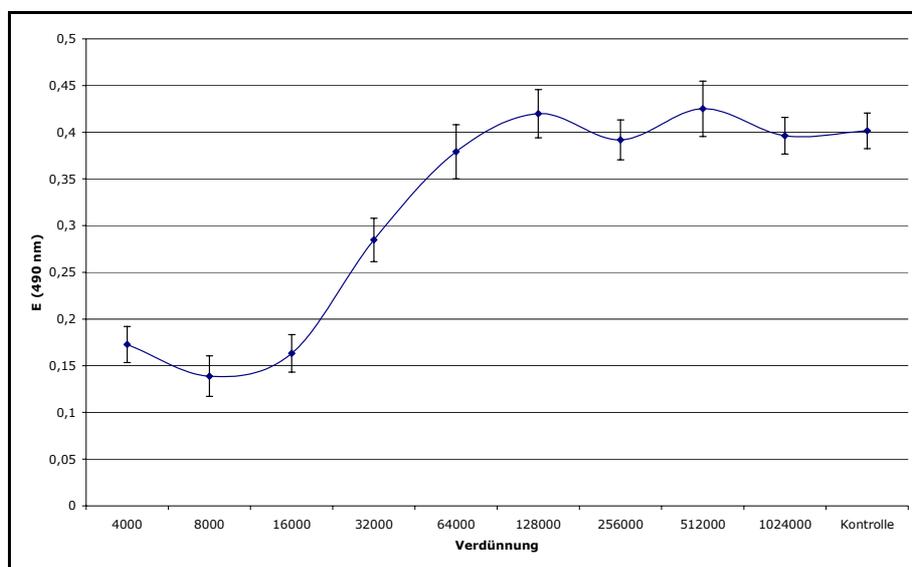


Abb. 3.5.2: antiproliferativer Test des Rohextrakts GW22/1326
(A549-Zellen, 72 h Wirkstoffinkubation, Kontrolle: RPMI+10% NBCS)

Die Wirkung des Rohextraktes aus GW22/1326 wurde auch auf das Inhibitionspotential der Stat1-Phosphorylierung (Abb. 3.5.8), im GAS-Induktionstest (Abb. 3.5.9) und in dem neu entwickelten IFN γ -vermittelten Repressionstest (Abb. 3.5.11) untersucht.

Eine weitere Probe, bei der im Primärassay eine anti-IFN γ -Aktivität festgestellt wurde, war das Cinerubin R aus der AG Prof. Laatsch. Bei einer höheren Auflösung der Konzentrationsabhängigkeit bestätigte sich dieser Befund (Abb. 3.5.3). Bei einer 3.000-fachen Verdünnung war eine nahezu vollständige Viruslyse trotz IFN-Schutz zu beobachten. Als IC₅₀ ergab sich eine Cinerubin R-Konzentration von 500 ng/ml (1:8.000). Für die Zytotoxizität wurde eine EC₅₀ von 10 μ g/ml (1:400) ermittelt. Dennoch war in den anti-IFN-aktiven Konzentrationen bereits ein geringer aber signifikanter zytotoxischer Einfluss erkennbar.

Eine Spezifität für das TypII-IFN γ lag auch für Cinerubin R nicht vor. Gezeigt wurde dieses anhand der Induktion des Virusschutzes durch IFN β und die Inhibition des Schutzes durch Cinerubin R (Abb. 3.5.3).

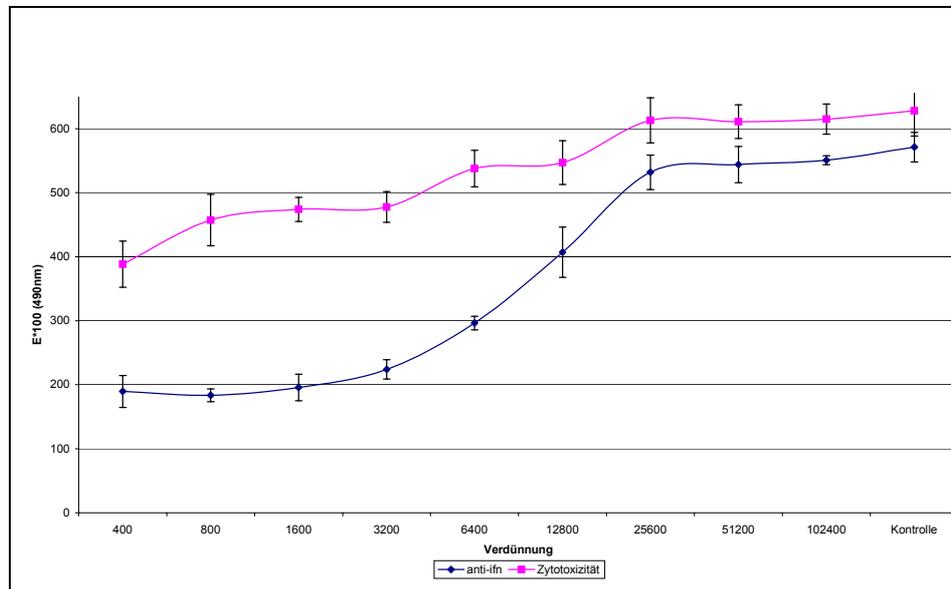


Abb. 3.5.3: anti-IFN-Wirkung von Cinerubin R
(antiviraler Assay mit A549-Zellen, EMC-Virus, 1.000 IU/ml IFN β
anti-IFN-Kontrolle: 1.000 IU/ml IFN β ,
Zytotoxizitätskontrolle: RPMI+10% NBCS; Stammlösung: 4 mg/ml DMSO)

Beim antiproliferativen Test wurde eine geringe doch signifikante Beeinträchtigung von Zellwachstum und/oder Zellvitalität in einer IFN-inhibierenden 4.000-fachen Verdünnung festgestellt (1 μ g/ml) (Abb. 3.5.4).

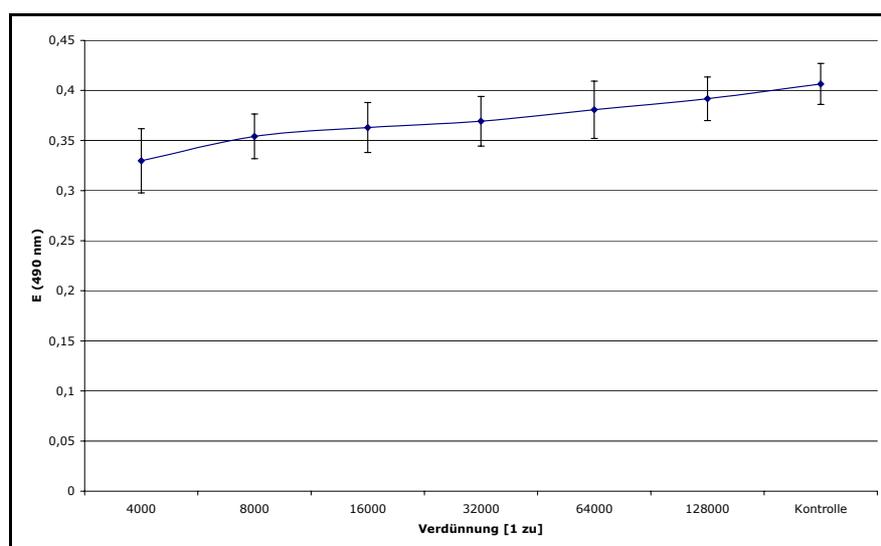


Abb. 3.5.4: antiproliferativer Test von Cinerubin R
(A549-Zellen, 72 h Wirkstoffinkubation, Kontrolle: RPMI+10% NBCS
Stammlösung: 4 mg/ml DMSO)

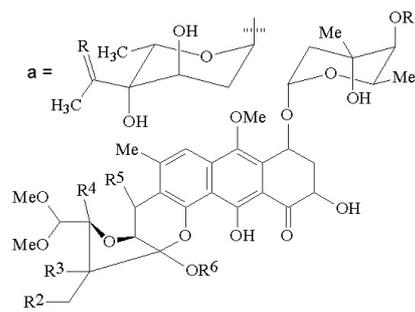


Abb. 3.5.5: Strukturformel der Trioxacarcine C und D
 (C: $R^1 = \text{COCH}_3$; $R^2\text{-}R^3 = R^4\text{-}R^5 = \text{O}$; $R^6 = a$: $R = \text{OH}, \text{H}$
 D: $R^1 = \text{H}$; $R^2\text{-}R^3 = R^4\text{-}R^5 = \text{O}$; $R^6 = a$: $R = \text{O}$)

Eine dritte Probe, die ebenfalls aus der AG Prof. Laatsch stammte, zeigte eine anti-IFN γ -Aktivität, welche einen von der Zytotoxizität unterscheidbaren Konzentrationsverlauf aufwies. Im Primärassay zeigte sich für Trioxacarcin D neben einer zytotoxischen Aktivität bis zu einer Verdünnung von 1 zu 2.000 eine Inhibition der IFN γ -Wirkung bei 1 zu 20.000 ohne vergleichbaren zytotoxischen Effekt (Abb. 3.5.6).

Substanz 1: Trioxacarcin D					
Molmasse:					
Konzentration: 2 mg/ml					
Vorverdünnung: 20					
zusätzliche Anmerkungen: Laatsch: F934 R8					
Trioxacarcin D					
Verdünnung	Cytotoxizität	Antiviralität		Anti-IFN-g-Wirkung	
1 zu 200	-372	26	-105	5	-262
1 zu 2.000	-279	14	-137	3	-306
1 zu 20.000	-61	4	-17	18	-149
1 zu 200.000	-47	16	-4	16	-59
Differenzen					
Vitalkontrolle	621	21		Vital-Virus	268
Viruskontrolle	353	19		IFN-Virus	147
Interferon- g-Kontrolle	500	23		Vital-IFN	121

Abb. 3.5.6: Primärscreening für Trioxacarcin D

Bei einer Betrachtung des Trioxacarcin D im Antiproliferationstest verursachte die anti-IFN γ -wirksame Konzentration von 100 ng/ml aber zugleich eine Verminderung der Zellzahl/Zellvitalität um über 50% (Abb. 3.5.7).

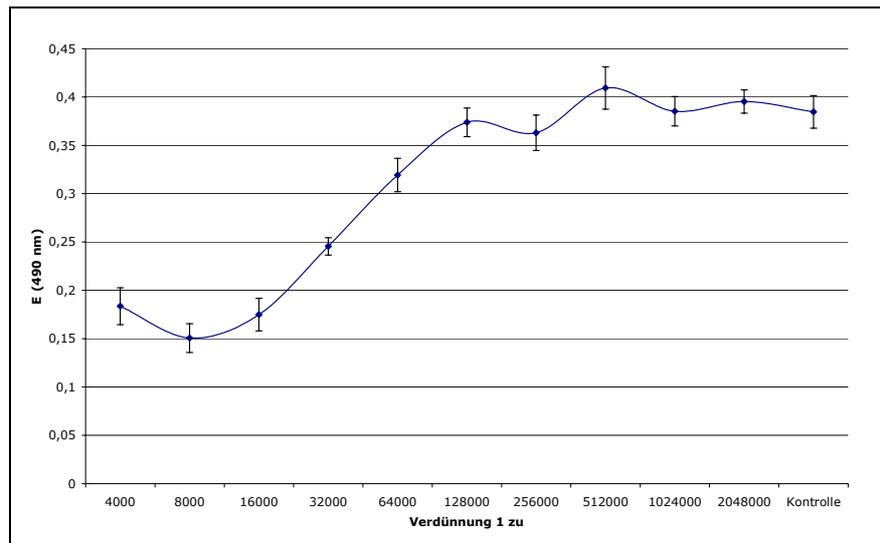
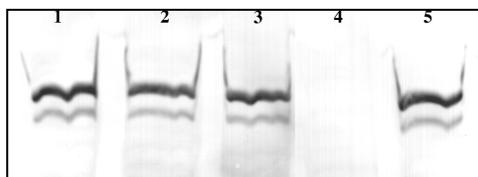


Abb. 3.5.7: antiproliferativer Test von Trioxacarcin D
(A549-Zellen, 72 h Wirkstoffinkubation, Kontrolle: RPMI+10% NBSC
Stammlösung in DMSO: 2 mg/ml)

Um einen Hinweis auf die Lokalisation des molekularen Ziels der drei Proben in ihrer IFN- γ -inhibierenden Wirkung zu erhalten, wurden A549-Zellen 2 h mit den Proben vorinkubiert, 30 min mit je 1.000 IU/ml IFN γ stimuliert und die Zellysate nach SDS-Page mit einem anti-Tyr⁷⁰¹-phosphospezifischen AK auf den Aktivierungsstatus überprüft (Abb. 3.5.8).



Spur 1: GW22/1326 1: 4.000 + IFN γ
Spur 2: Trioxacarcin D 1: 2.000 + IFN γ
Spur 3: Cinerubin R 1: 2.000 + IFN γ
Spur 4: Negativ-Kontrolle (RPMI+10% NBSC)
Spur 5: 1.000 IU/ml IFN γ

Abb. 3.5.8: anti-phospho-Stat1-Westernblot mit anti-IFN γ -aktiven Proben
(A549-Gesamtzellysate nach 30 min IFN-Stimulus über SDS-PAGE getrennt,
obere Bande: Stat1 α , untere Bande: Stat1 β)

Der Western-Blot zeigte, dass die IFN γ -induzierte Stat1-Phosphorylierung durch das Rohextrakt GW22/1326 in einer 4.000-fachen Verdünnung, welche eine signifikante Inhibition der antiviralen Aktivität des IFN γ bewirkt, nicht beeinflusst wird. Ebenso zeigte sich bei den beiden Reinsubstanzen Trioxacarcin D und Cinerubin R in einer 2.000-fachen Verdünnung, dass das IFN γ -vermittelte Signal in der Signaltransduktionskette nicht aufwärts dieses wichtigen Stat1-Aktivierungsmechanismus unterbrochen wird.

Bewegt man sich in der Signaltransduktionskette mit Hilfe des GAS-Inhibitionstests abwärts bis zur Ebene der DNA, lässt sich eine Inhibition durch das Trioxacarcin D (IC₅₀ = 50 ng/ml, 1:8.000) und das Streptomyceten-Extrakt (IC₅₀ = 1:8.000) nachweisen (siehe Abb. 3.5.9). Für Cinerubin R tritt eine mehr als 50%ige Inhibition der GAS-Induktion in einer Konzentration von 4 μ g/ml (1:1.000) auf.

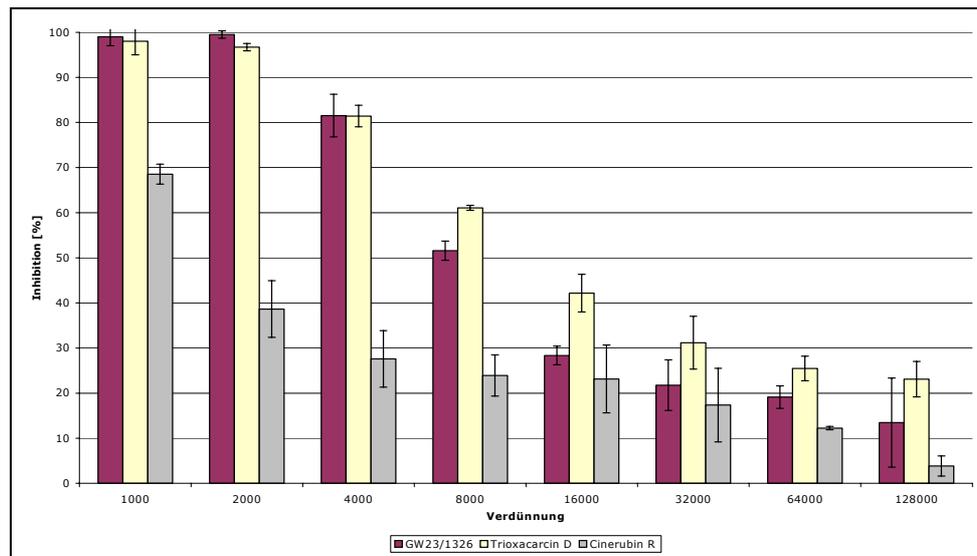


Abb. 3.5.9: GAS-Inhibitionstest mit Streptomycetenextrakt(GW22/1326), Trioxacarin D und Cinerubin R (stabil GAS-Luc/pPuromycin-transfizierte A549-Linie, 100 IU/ml IFN γ 6 h Induktion)

Aus dem Streptomyceten-Rohextrakt wurden in der AG Prof. Laatsch weitere Reinigungsschritte unternommen, die zu den angereicherten aktiven Fraktionen 10 und 12 führten.

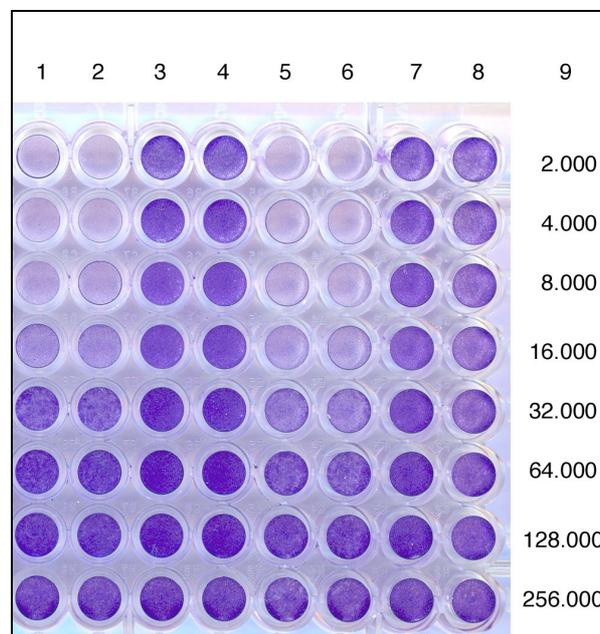


Abb. 3.5.10: anti-IFN γ - und zytotoxische Wirkung zweier Fraktionen aus dem Streptomyceten GW22/1326, (antiviraler Assay mit A549-Zellen, Kristallviolett-Vitalfärbung)
 Spur 1+2 : Frakt. 10 +IFN γ +EMC; Spur 3+4 : Frakt. 10;
 Spur 5+6 : Frakt. 12 +IFN γ +EMC; Spur 7+8 : Frakt. 12
 Spur 9 : Verdünnung [1 zu]

Aus Abb. 3.5.10 kann man anhand der eher qualitativen Kristallviolett-Vitalfärbung sehen, dass in einer 16.000-fachen Verdünnung die A549-Zellen bei Inkubation mit den aktiven Streptomyceten-Fractionen trotz vermeintlichem Virusschutz durch 100 IU/ml IFN γ vollständig lysiert wurden, ohne dass sich dieses Bild in der Zytotoxizitätsbetrachtung widerspiegelt. Diese Darstellung beruht jedoch zum einen auf der eher qualitativen Färbemethode (vital/lysiert) und zum anderen auf einer Wirkstoffinkubation über einen vergleichsweise kurzen Zeitraum von 24 h. Zur Spezifitätsbeurteilung der Inhibition wurde der IFN-Repressionstest durchgeführt (siehe Kapitel 3.7.2). Keine der Proben bewirkte eine spezifische Abschaltung der IFN γ -vermittelten Repression (Abb. 3.5.11). Die Proben mit IFN führten im Gegenteil zu einer stärkeren Inhibition der konstitutiven Expression als IFN allein.

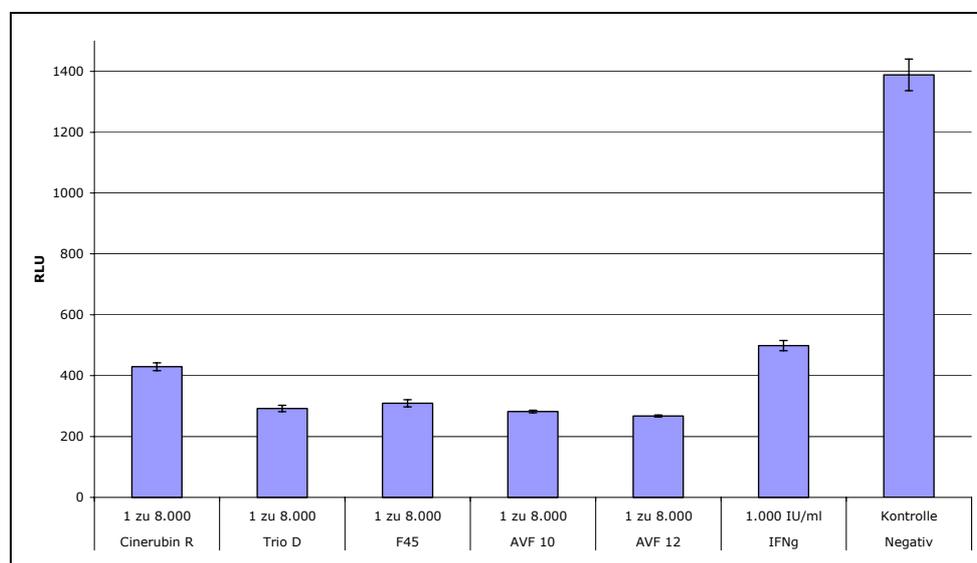


Abb. 3.5.11: *pias1*-Promotor-Luciferase-Assay mit Cinerubin R, Trioxacarcin D, GW22/1326-Rohextrakt, und den aus GW22/1326 angereicherten Fraktionen AVF10 und AVF12 (stabil transfizierte A549-Zellen, 18 h Wirkstoffinkubation)

Die angereicherten Fraktionen AVF10-AVF12 wurden von der AG Prof Laatsch weiter fraktioniert und die Reinsubstanzen Cosmomycin A und Cosmomycin B isoliert. Dabei zeigte Cosmomycin A noch in einer mehr als dreifach niedrigeren Konzentration als Cosmomycin B eine 50%-Inhibition der GAS-Induktion durch IFN γ (siehe Abb. 3.5.12).

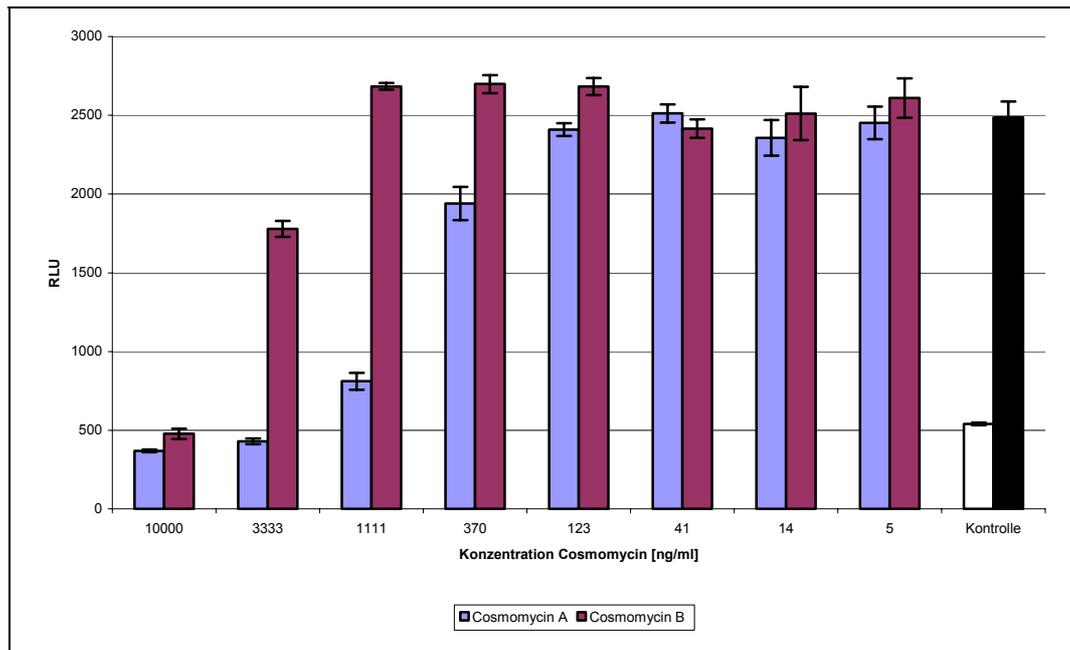


Abb. 3.5.12: Inhibition der GAS-Induktion durch Cosmomycin A und B (stabil transfizierte A549-Linie, 6 h Induktion mit 100 IU/ml IFN γ , Kontrolle ohne und mit 100 IU/ml IFN γ)

Zur Spezifitätsprüfung der Inhibition wurde die Veränderung der CMV-promovierten Luciferase-Expression nach einem Tag Wirkstoffinkubation gemessen. Dabei zeigte sich besonders durch das Cosmomycin B unerwartet ein drastischer Anstieg der Luciferase-Expression (siehe Abb. 3.5.13).

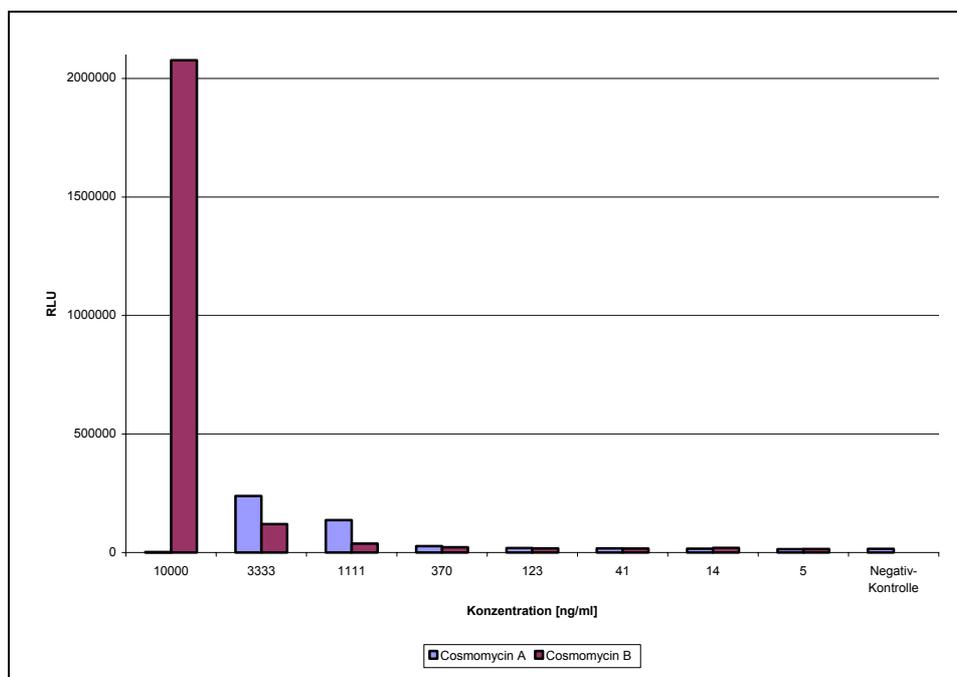


Abb. 3.5.13: Induktion der CMV-Luciferase-Expression durch Cosmomycin A und B (stabile CMV-Luc/Puromycin transfizierte HepG2-Linie, 24 h Induktion)

Cosmomycin B führte in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zu einer Induktion des stark konstitutiven *CMV*-Promotors um den Faktor 130. Cosmomycin A hingegen reduzierte in dieser Konzentration die Expression auf 10 % der unbehandelten *CMV*-promovierten Luciferase-Kontrolle. In einer Konzentration von 33 $\mu\text{g/ml}$ führte Cosmomycin A zu einer Induktion um den Faktor 15, Cosmomycin B verursachte in dieser Konzentration eine Induktion um den Faktor 8 gegenüber der Negativ-Kontrolle.

Eine unter dem humanen *Pias1*-Promotor (siehe Kapitel 3.7.2) ebenfalls konstitutiv Luciferase exprimierende A549-Linie wurde auf Induzierbarkeit durch Cosmomycine überprüft. Es wurde keine Induktion, sondern eine Inhibition um 70% in der Konzentration 10 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet.

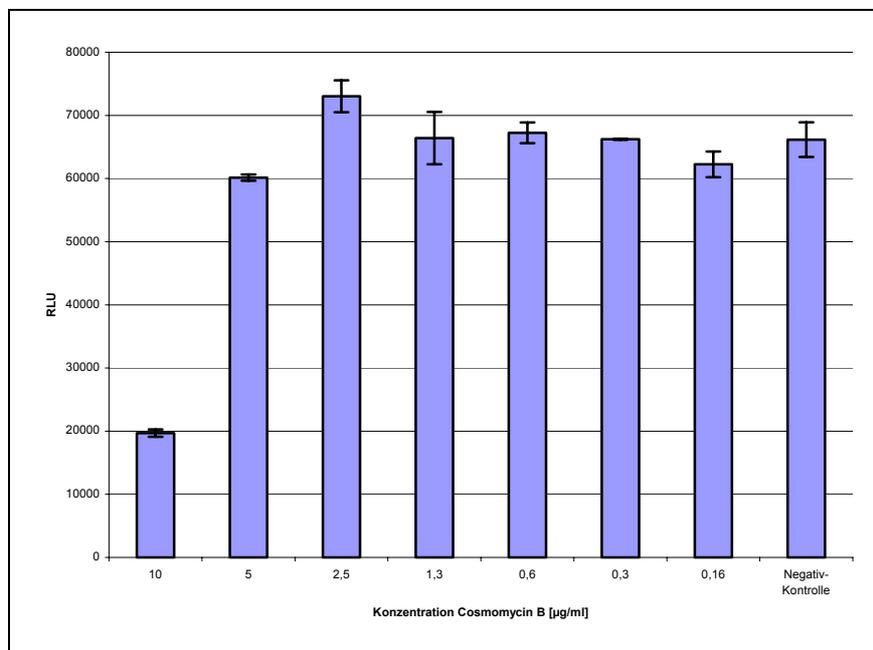


Abb. 3.5.14: Cosmomycin B-Wirkung auf das *pias1*-Promotor-Luc-Konstrukt (stabil *pias1*-Luc-tranfizierte A549-Linie, 29 h Inkubation)

Um die Induktion des *CMV*-Promotors durch Cosmomycin B an einem weiteren Reporter zu testen, wurde eine unter dem *CMV*-Promotor stabil humanes IFN β produzierende CHO-Zelllinie in einer Dichte von 30.000 Zellen/100 μl in eine 96-well-Platte ausgesät. Es folgte eine Inkubation für 29 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Cosmomycin B und als Negativkontrolle nur mit Medium (RPMI mit 10% NBCS).

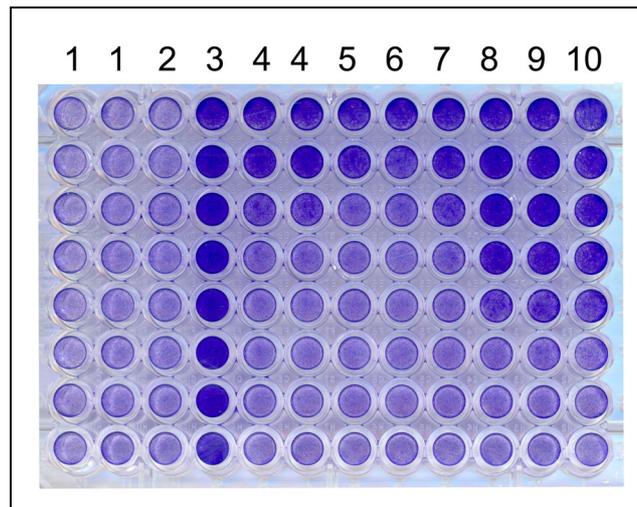


Abb. 3.5.15: AVA mit Überständen CMV-IFN β -transfizierter CHO
(Verdünnung erfolgte 1 zu 3 von oben nach unten,
1: 100 ng/ml Cosmomycin-Kontrolle
2: Virus-Kontrolle, 3: Vital-Kontrolle
4: 100 IU/ml IFN β -Standard
5-7: Überstände CHO: Negativ-Kontrolle, 29 h, 1:100
8-10: Überstände CHO: 10 μ g/ml Cosmomycin B,
29h Inkubation mit CHO-Zellen, 1:100 vorverdünnt)

Die Konzentration des produzierten IFN β wurde im AVA bestimmt. Bei einer Vorverdünnung von 1 zu 100 errechnet sich für die Kontrolle nicht stimulierter CHO-Zellen eine Konzentration von etwa 10^4 IU/ml und für die Cosmomycin B-stimulierte IFN β -Produktion eine Konzentration von etwa 10^5 IU/ml. Durch Cosmomycin B allein wurde kein antiviraler Schutz vermittelt (siehe Abb. 3.5.15, Probe 1). Eine Kinetik für die CMV-Induktion durch Cosmomycin B wurde mit dem leichter durchführbaren CMV-Luciferase-System aufgenommen (siehe Abb. 3.5.16).

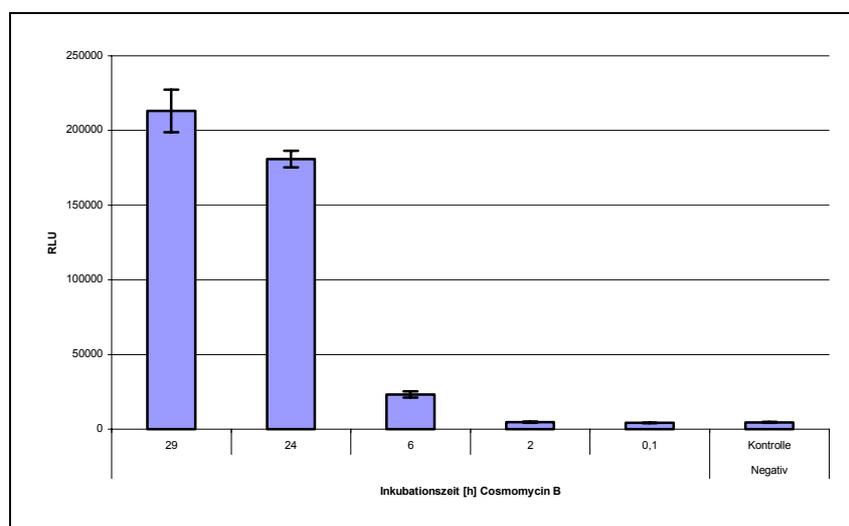


Abb. 3.5.16: Induktionskinetik des CMV-Promotors durch Cosmomycin B
(stabil CMV-Luc/Puromycin-Resistenz-transfizierte HepG2-Linie,
10 μ g/ml Cosmomycin B)

3.6 Charakterisierung antiviraler Aktivitäten

Von den 88 im Primärscreening als antiviral wirksam befundenen Proben war bei der Mehrzahl eine Trennung von zytotoxischer und antiviraler Aktivität auf einen sehr kleinen, eine pharmakologische Nutzung ausschließenden Konzentrationsbereich eingeschränkt. Es gab jedoch auch anti-EMC-Virus-aktive Proben, die in einem signifikant geringeren als dem in A549-Zellen zytotoxisch wirkenden Konzentrationsbereich Zellschutz vermittelten.

Im Primärscreening wurde der größte Konzentrationsbereich, der zwischen antiviraler und zytotoxischer Wirkung lag, für die Concanamycine A und C aus der AG Prof. Zeeck gemessen (siehe Abb. 3.6.1, und zur allgemeinen Tabellenerklärung Abb. 2.2.1 und Abb. 3.2.2).

Substanz 1: Zee-39							
Molmasse:	866						
Konzentration:	1						
Verdünnung:	20						
zusätzliche Anmerkungen:	Con A						
Substanz 2: Zee-40							
Molmasse:	823						
Konzentration:	1,1						
Verdünnung:	20						
zusätzliche Anmerkungen:	Con C						
Zee-39							
Konzentration (mol/l)		Cytotoxizität	Antiviralität	Anti-IFN-g-Wirkung			
5,77E-05 1 zu 10		-495	22	-151	5	-343	8
5,77E-06 1 zu 100		40	9	278	11	162	14
5,77E-07 1 zu 1000		3	9	230	9	149	8
5,77E-08 1 zu 10 000		-19	9	221	13	184	7
Zee-40							
Konzentration (mol/l)		Cytotoxizität	Antiviralität	Anti-IFN- g-Wirkung			
6,68E-05 1 zu 10		-25	17	268	4	72	15
6,68E-06 1 zu 100		36	54	255	24	160	10
6,68E-07 1 zu 1000		35	18	204	11	153	5
6,68E-08 1 zu 10 000		17	29	206	3	178	4
Vitalkontrolle		633	24	Differenzen		Vital-Virus 361	
Viruskontrolle		271	9			IFN-Virus 186	
Interferon- g-Kontrolle		457	17			Vital-IFN 175	

Abb. 3.6.1: Concanamycine A und B im Primärscreening

Die antivirale Aktivität war dabei in gegenüber der Zytotoxizität um den Faktor 10^4 niedrigeren Konzentrationen vorhanden. Bei den Concanamycinen handelt es sich um Substanzen aus der Gruppe der Plecomacrolide (siehe Abb. 3.6.2). Die Concanamycine werden mit den strukturell eng verwandten Bafilomycinen als spezifische Inhibitoren der V-Typ ATPase eingesetzt.

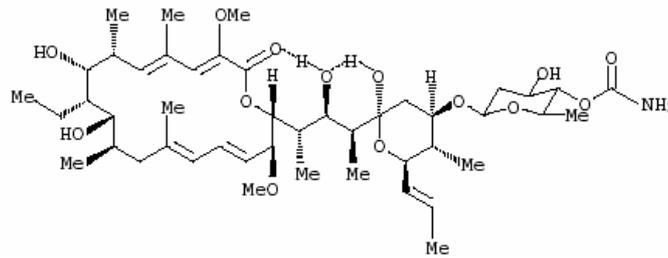


Abb. 3.6.2: Strukturformel für Concanamycin A

Zur Bestimmung der antiviralen Aktivität der aus Streptomyceten von der AG Zeeck isolierten Concanamycine wurde die Konzentrationsabhängigkeit im nanomolaren Bereich untersucht (siehe Abb. 3.6.3). Für die Concanamycin A und C ergab sich dabei ein Virusschutz bis 2 nM. In einem anti-HIV-1 Test (Zellen: MT4, Virus: HIV-1 IIIB) haben die Concanamycine A und C unterhalb der zytotoxischen Konzentration für Concanamycin A von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und C von 50 $\mu\text{g/ml}$ keine antivirale Wirkung gezeigt (persönliche Mitteilung Dr. Bach, Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen)

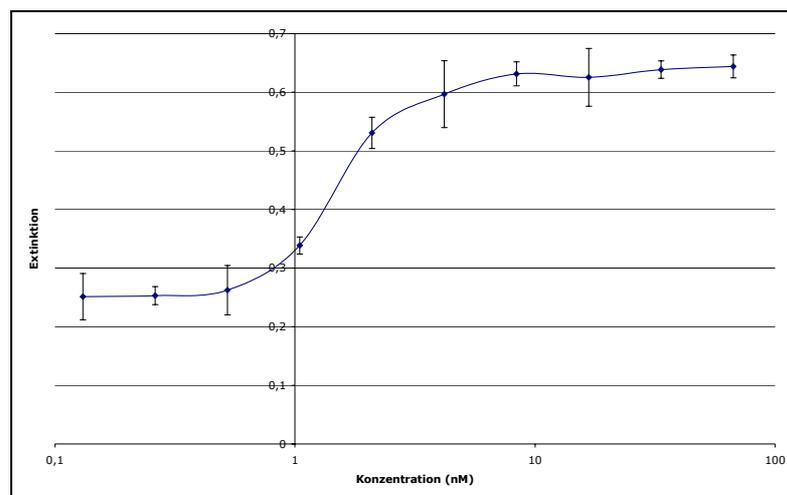


Abb. 3.6.3: antivirale Aktivität von Concanamycin C
(A549-Zellen, EMC-Lyse über 20 h, MTT-Reduktion)

Das Rohextrakt des Streptomyceten GW 24/1828 aus der AG Laatsch zeigte ebenfalls eine starke antivirale Aktivität. Die enthaltenen Reinsubstanzen dieses Stammes wurden daraufhin von der AG Laatsch isoliert und Streptorubin A im Primärscreening unter dem laborinternen Kürzel Sch5 als antiviral aktiv identifiziert. In einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ war das Prodigiosin Streptorubin A durch einen starken zytotoxischen Effekt charakterisiert, welcher sich auch als eine scheinbare anti-IFN γ -Aktivität darstellt (siehe Abb. 3.6.4 und zur allgemeinen Tabellenerklärung Abb. 2.2.1 und Abb. 3.2.2).

Substanz 1: Sch5						
Molmasse:						
Konzentration: 0,5 mg/100 µl						
Verdünnung: 20						
zusätzliche Anmerkungen: Laatsch: Schiebel: StreptorubinA GW 24/1828						
Sch5						
Konzentration (mol/l)	Cytotoxizität	Antiviralität	Anti-IFN-g-Wirkung			
1 zu 10	-679	7	100	14	-464	21
1 zu 100	-105	11	585	13	0	19
1 zu 1000	-83	16	139	40	19	10
1 zu 10 000	-57	3	20	8	26	7

Abb. 3.6.4: Streptorubin A im Primärscreen

Bei Durchführung des Antiproliferationstests mit Streptorubin A mit A549-Zellen über drei Tage, zeigte sich eine Wachstumshemmung zu 50% bei einer 50.000-fachen Verdünnung (100 ng/ml) (siehe Abb. 3.6.5). Die antivirale Wirkung zeigte sich ebenfalls bis zu dieser Konzentration. Im Antiviralen Assay ergab sich nach 20 h Viruslyse und Kristallviolett-Färbung hingegen eine deutliche Trennung von zytotoxischer Aktivität bei 10 µg/ml und einer antiviralen bis 100 ng/ml.

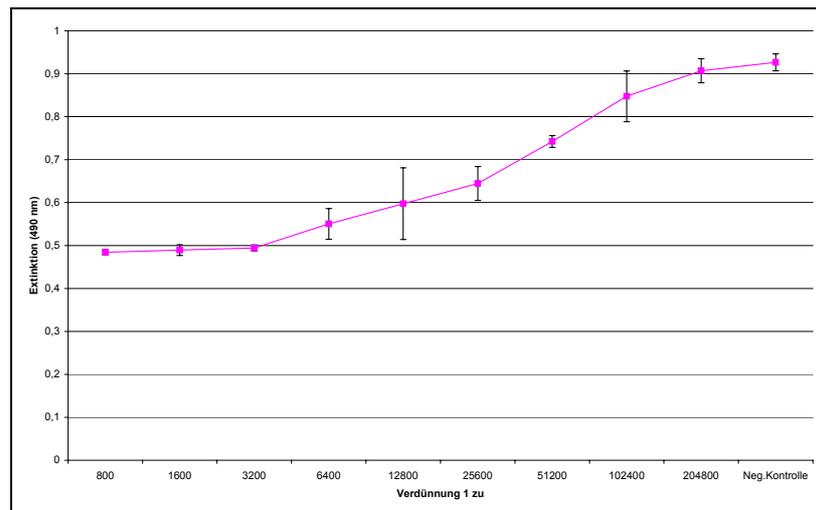


Abb. 3.6.5: antiproliferativer Test mit Streptorubin A (A549-Zellen; Inkubation über 3 d; MTT-Reduktionstest)

3.7 Reporterkonstrukte

3.7.1 Klonierung der *huifn* β -Promotor-Reporterkonstrukte

Eine 442 bp lange Promotorsequenz *upstream* vom Translations-Initiationscodon des humanen *ifn* β -Gens auf Chromosom 9 wurde zunächst mit den 5'-phosphorylierten Primern IFN β -Promotor fw und IFN β -Promotor bw (siehe Kapitel 2.2.16) aus genomischer DNA, welche mit dem Qiagen DNA-Extraktionskit aus A549-Zellen isoliert wurde, amplifiziert.

Dabei entstand ein Fragment, welches in den *Sma*I (*blunt end*) geschnittenen und dephosphorylierten Reportervektor pEGFP1 ligiert wurde (siehe Abb. 3.7.1). Zur Transformation wurden kompetente *E. coli*-Zellen vom Stamm JM 109 verwendet. Die Wahrscheinlichkeit für die gewünschte Orientierung liegt bei diesem Insertionsereignis bei 50%. Ein richtig orientierter Klon wurde durch die entstandenen Fragmente nach *Hinc* II-Restriktion nachgewiesen. Vorwärts und rückwärts gerichtet wurde mit den beiden *Primern*, die auch für die Amplifikation verwendet wurden, das Insert sequenziert.

Die Sequenzierung zeigte, dass an Position 348 im Vektor 10 bp nach der TATA-Box ein ATG an Stelle eines ACG vorlag. Dieses mögliche Startcodon lag darüber hinaus in einem anderen Leseraster als jenes des EGFP. Durch Mutagenese-PCR wurde diese Base zurückmutiert (Primer: β -Prom Mut fw/bw).

Von diesem als *huifn* β -Promotor-EGFP bezeichneten Klon wurde eine Glycerindauerkultur angelegt und bei -80°C verwahrt. Zur Untersuchung der Induzierbarkeit des Konstruktes wurde die DNA durch Midi-Präparation (Qiagen-Kit) isoliert und in eukaryotische Zelllinien transfiziert. Es wurden dazu A549-Zellen auf runden Glasobjektträgern in 24-well-Platten ausgesät und das Reporterkonstrukt durch Calciumphosphattransfektion in die Zellen eingebracht. Die Zellen wurden durch EMC-Virus und VSV für verschiedene Zeiten stimuliert (8 h, 16 h, 24 h). Die Zellen wurden danach mit Paraformaldehyd (4% in PBS) fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem FITC-Filtersatz auf EGFP-Expression untersucht. Es konnte keine induzierte EGFP-Expression festgestellt werden. Als eine Systemkontrolle diente die Transfektion des Vektors pEGFP-C1 bei dem die Expression unter dem starken konstitutiven *CMV*-Promotor zu einem deutlich erkennbaren Fluoreszenzsignal führte. Die Transfektionseffizienz des Vektors pEGFP-C1 lag in A549-Zellen bei 20-30 % in 293-Zellen bei 40-50 %.

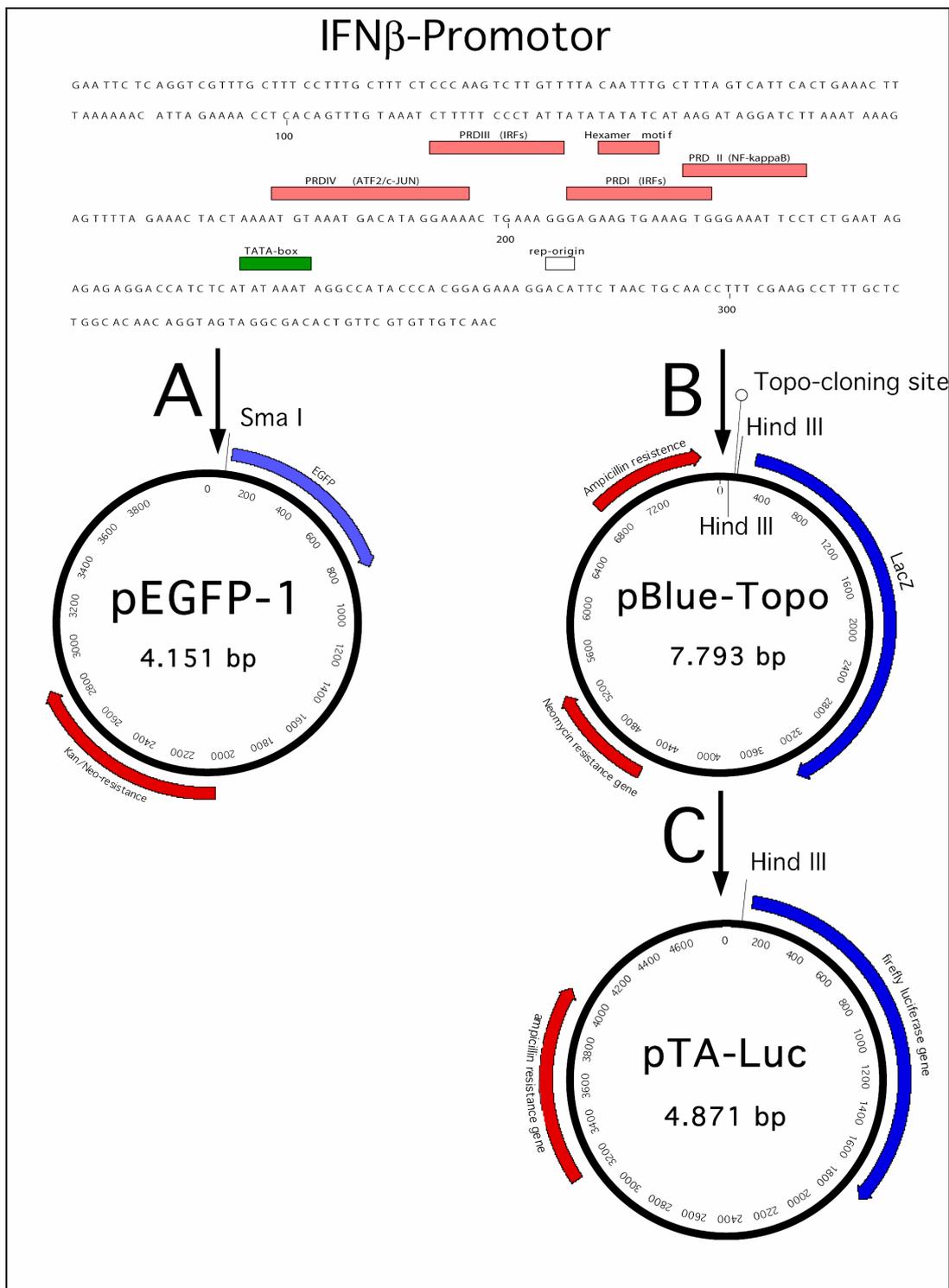


Abb. 3.7.1: Klonierschema für drei Reportersysteme mit dem humanen $ifn\beta$ -Promotor
A: Ligation des PCR-Produktes (primer: IFN β -Promotor bw IFN β -Promotor fw) über die Sma I- Schnittstelle in pEGFP-1 (Quantifizierung über Fluoreszenzintensität)
B: Ligation des PCR-Produktes über Topo-TA-Klonierung in pBlue-Topo (Quantifizierung über β -Galaktosidase-Assay)
C: Ligation des Hind III-Fragments aus B in pTA-Luc (Quantifizierung über Luciferase-Aktivität)

Auch eine weitere Modifikation, die Verkürzung des zwischen Promotor und dem Translationsinitiationscodon des *egfp* liegenden Bereiches durch Deletion mit den *Primern* kurz β -Prom fw/bw (siehe Kapitel 2.2.16) führte zu keiner detektierbaren Induktion.

Da EGFP als Reporterprotein unter diesen Messbedingungen für den *ifn β* -Promotor nicht sensitiv genug war, wurde der Promotor vor ein β -Galaktosidase- und ein Luciferase-Gen als Reporter kloniert. Für das β -Galaktosidase-Konstrukt wurde eine TopoTA-Klonierung des Promotors über die Primer huIFN β -Promotor fw/ huIFN β Promotor bw (siehe Kapitel 2.2.16) in den Vektor pBlue-TOPO und eine Transformation in Top10-Zellen durchgeführt. Mit einer Orientierungs-PCR sollten richtig orientierte Klone identifiziert werden.

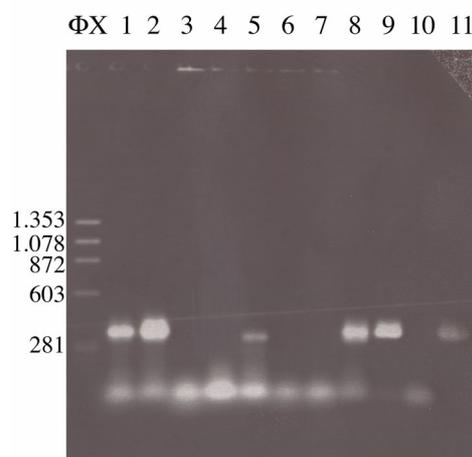


Abb. 3.7.2: Orientierungs-PCR von Klonen nach Transformation mit der Ligation des IFN β -Promotor- β -Galaktosidase-Konstrukts in JM109-Zellen (Klone 1,2,5,8,9 und 11 tragen das Insert in der richtigen Orientierung)

Die Transformation in TOP10-Zellen lieferte jedoch bei 40 getesteten nur verkehrt orientierte Klone. Eine daraufhin erfolgte Transformation des TOPO-klonierten Produktes in JM109-Zellen hingegen lieferte das gewünschte Ligationsergebnis zu etwa 50 % (siehe Abb. 3.7.2).

Dieser Befund deutet darauf hin, dass ein zytotoxisches Produkt in TOP10-Zellen bei gewünschter Insertorientierung gebildet wird, obwohl der Vektor in diesem Bereich keinen prokaryotischen Promotor enthält. Zwei unwahrscheinliche Ereignisse, das Vorhandensein eines hinreichend starken Promotors und die Toxizität des gebildeten Genprodukts scheinen dabei zusammengetroffen zu sein. Da beide Ereignisse oder zumindest eines nur in TOP10 nicht jedoch in JM109-Zellen stattfindet, obwohl beide *E. coli* K12-Derivate sind, handelte es sich hierbei um ein sehr seltenes Ereignis, welches bei keiner der nachfolgenden Klonierungen mehr auftrat.

Im 24-well-Maßstab transfizierte A549-Zellen führten nach Virusstimulation des *ifn β* -Promotors mit VSV über 8 bis 24 h und anschließender Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität nur zu einer Induktion um den Faktor 2 bis 3.

Darum wurde eine weitere Umklonierung mittels HindIII-Restriktion vom *lacZ*-codierenden Vektor in den Luciferase-Vektor vorgenommen (siehe Abb. 3.7.1). Ein richtig orientierter Klon wurde wiederum durch die Orientierungs-PCR ermittelt und sequenziert. Im 96-well-Maßstab (30.000 bis 100.000 ausgesäte Zellen pro well) wurde eine Induktion des *ifn β* -Promotor-Luciferase-Reporters nach Virusstimulation über 24 h in A549-Zellen um den Faktor größer als 1.000 gemessen (Abb. 3.7.3).

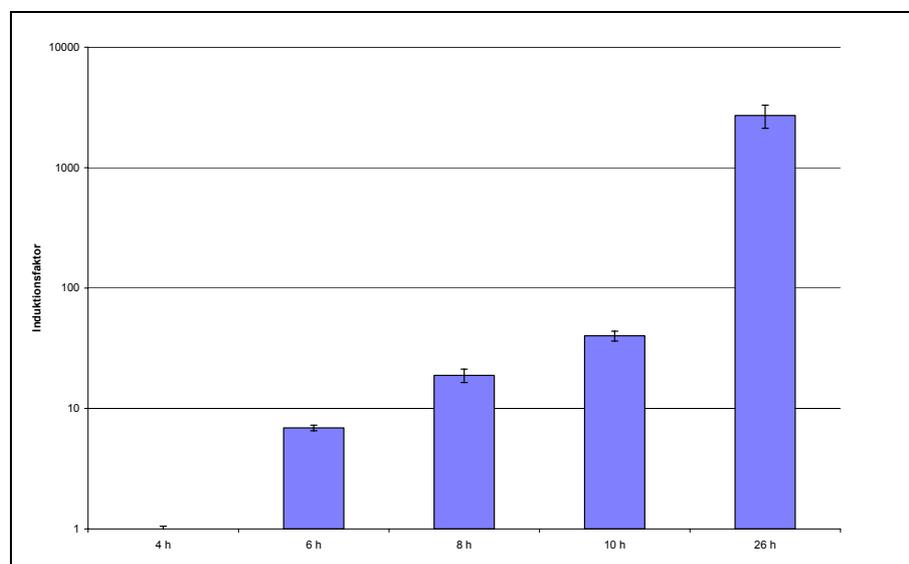


Abb. 3.7.3: Induktionskinetik des *ifn β* -Promotors

(transiente Transfektion in A549-Zellen, Induktor: Vaccinia-Virus)

Auch VS-Virus- nicht jedoch EMC-Virus-Inkubation führte in A549-Zellen zur Induktion des *hifn β* -Promotorkonstruktes (Daten nicht gezeigt).

3.7.2 Klonierung des humanen *pias1*-Promotor-Luciferasekonstrukts

Nachdem anhand der Funktionalität des *ifn β* -Promotor-Luciferase-Reporters gezeigt werden konnte, dass das System prinzipiell zum Screening verwendet werden kann, wurde der Ansatz auf zwei weitere weniger ausführlich charakterisierte putative Promotorelemente ausgedehnt. Dank der Sequenzierung des menschlichen Genoms ließ sich ohne die aufwändige Identifizierung und Sequenzierung der entsprechenden Elemente direkt die Untersuchung der biologischen Funktion der *upstream* der Gene gelegenen Regulationssequenzen durchführen.



Abb. 3.7.4: 442 bp - Sequenz des amplifizierten humanen *pias1*-Promotors
 vorhergesagte Regulationselemente (Programme in Klammern)
 blau: Promotorbereich (Genomatix, PromotorInspector);
 rot: Bindungselementen für Transkriptionsfaktoren (Genomatix, MatInspector);
 Transkriptions-Start-Sites (Eponine); TSS1, TSS2

Elektronische Promotorvorhersageprogramme (z.B.: PromotorInspector, Genomatix) beschränken sich in der Regel auf einen Bereich +400 bp/-100 bp vom Transkriptionsstartpunkt aus. Eine Sequenz von 442 bp *upstream* vom *pias1*-Start-Codon wurde analog dem oben beschriebenen *huifnβ*-Promotor über Topo-TA-Klonierung in pBlue-TOPO kloniert und aus diesem über die HindIII-Schnittstelle in den Vektor pTA-Luc kloniert (siehe Abb. 3.7.1). Eine Messung der Luciferase-Aktivität nach transienter Transfektion in A549-Zellen belegte eine konstitutive Expression unter dem *Pias1*- Promotor.

Die Luciferase-Expression erfolgte auch in anderen Zellarten konstitutiv. Getestet wurde dies ebenso für humane 293, HepG2, Caco, MCF7 und murine L929-Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Induktion des *pias1*-Promotors wurde mit diesem System weder durch die Interferone α, β, γ noch durch LPS, pIC, Virus oder IL-6 festgestellt. Dagegen führte die IFN-Inkubation, unabhängig ob TypI oder TypII-Interferon, zu einer drastischen Verringerung der Luciferase-Expression unter dem *pias1*-Promotor. Diese IFN γ -medierte Repression verlief jedoch speziesspezifisch. Humanes IFN γ führte nur in humanen Zelllinien, nicht jedoch in der murinen L929-Linie zu einer Reduktion der Luciferase-Expression. Die Kinetik der Repression durch die Wirkung von 1.000 IU/ml IFN γ auf eine mit dem *pias1*-Promotor-Luciferase und dem Puromycin-Vektor stabil transfizierte A549-Linie über einen Zeitraum von drei Tagen zeigte eine Verminderung der Luciferase-Expression um nahezu 90% gegenüber der unstimulierten Kontrollinkubation (Abb. 3.7.5).

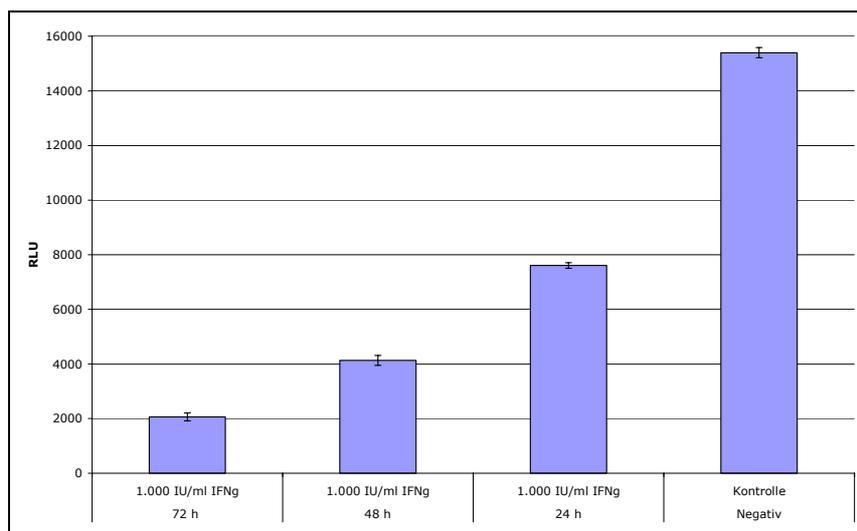


Abb. 3.7.5: Kinetik der Luciferase-Expression unter dem *pias1*-Promotor nach IFN γ -Inkubation (stabil *Pias1*-Luciferase/Puromycin transfizierte A549-Linie)

Zur Identifizierung der für die IFN-medierte Repression spezifischen DNA-Sequenz wurden konsekutiv verkürzte Promotorkonstrukte (Abb. 3.7.6) erstellt und auf Repression getestet. Unabhängig von der Länge des untersuchten Promotors bis hin zur 50 bp langen Variante, einhergehend mit einem nahezu vollständigen Verlust der konstitutiven Expression (Pias1 50bp, Faktor 1,4 gegenüber TA-Luciferase-Ursprungsvektor), wurde jedoch eine Interferon-vermittelte Repression ähnlichen Ausmaßes um etwa 50 % nach 24 h beobachtet (1000 IU/ml IFN γ , Daten nicht gezeigt).

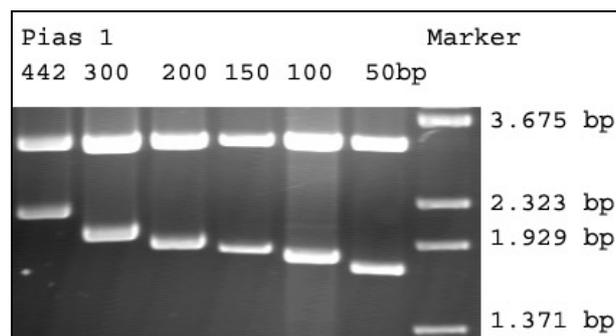


Abb. 3.7.6: Agarose-Gel mit je 500 ng *XbaI*-verdauter *pias1*-Promotorkonstrukte (die Länge für das obere Fragment beträgt 3.115 bp die unteren Banden betragen für *Pias1* 50: 1.739 bp; *Pias1* 100: 1.814 bp, *Pias1* 150: 1.860, *Pias1* 200: 1.910 bp, *Pias1* 300: 2.009 bp, *Pias1* 442bp: 2.208 bp)

Dies weist darauf hin, dass an der IFN-vermittelten Inhibition der Luciferase-Expression nicht ein spezifischer Transkriptionsfaktor beteiligt ist, sondern es sich um ein promotorunabhängiges Phänomen im Messsystem handelt. Um diese Hypothese zu testen, wurde ein anderer, bekannter konstitutiver Promotor mit Hilfe des gleichen Testprinzips auf einen Einfluss von IFN auf die Luciferaseaktivität getestet. Dazu wurde der virale *CMV*-Promotor an Stelle der *pias1*-Promotorfragmente vor das Luciferase-Gen (analog Abb. 3.7.1) kloniert und transient in A549-Zellen transfiziert.

Der Einfluss von IFN γ nach Stimulation über einen Tag auf die Luciferaseaktivität wurde gemessen. Dabei zeigte sich, dass auch beim *CMV*-Luciferase-Konstrukt eine Repression um 30 % vorlag (siehe Abb. 3.7.7.). Diese Repression war unabhängig vom Interferon-Typ (hier IFN γ und IFN β). Noch bis zu einer Konzentration von 0,1 IU/ml ließ sich eine signifikante Inhibition von 9 % messen.

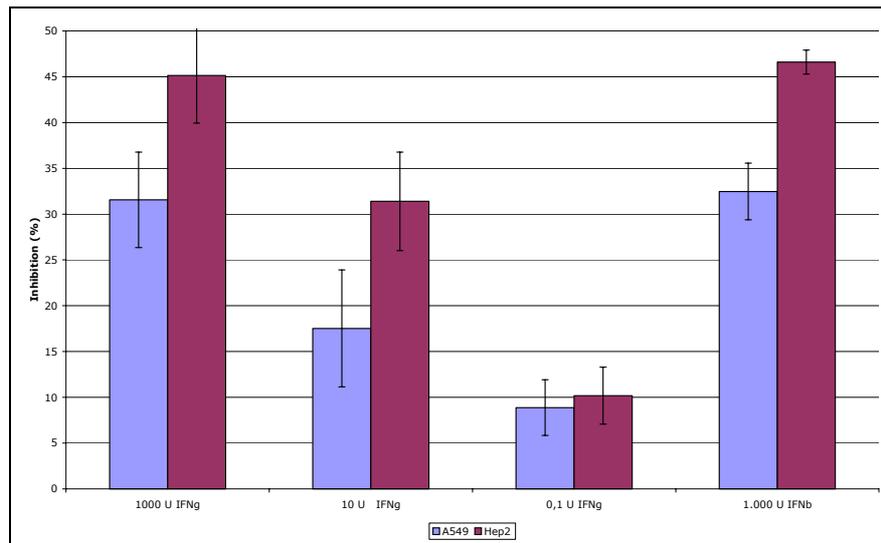


Abb. 3.7.7: IFN-medierte Inhibition des CMV-Luciferase-Konstrukts (transiente Transfektionen in A549-Zellen und HepG2-Zellen, 24 h Inkubation)

Die Repression der CMV-Luciferase-Expression durch humanes IFN α , IFN β und IFN γ tritt bei der Transfektion muriner L929-Zellen nicht auf (siehe *pias1*-Promotor). Dies weist darauf hin, dass es sich hierbei um eine speziesspezifische und somit rezeptormedierte Wirkung des IFN handelt.

Bei der Betrachtung der verschiedenen Promotor-Luciferasekonstrukte des *hupias1* zeigte sich unerwartet ein starker Anstieg der konstitutiven Expression einer von 442 bp auf 300 bp *upstream* des Translationstartcodons verkürzten Variante (siehe Abb. 3.7.8). Eine maximale konstitutive Expression, welche um den Faktor 47 über dem Wert für den promotorlosen TA-Luciferase-Ausgangsvektor lag, wurde bereits mit einem 150 bp langen *pias1*-Promotorkonstrukt erreicht. Eine Verkürzung um 50 bp auf 100 bp verminderte die konstitutive Expression um die Hälfte. Eine Verlängerung bis hin zu 300 bp hatte nur einen geringen Einfluss auf die Luciferase-Expression. Das 442 bp lange Promotorfragment hingegen führte nur noch zu einem Zehntel der konstitutiven Expression. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit 5 μ g CMV-*lacZ*-Vektor zur konstitutiven β -Galaktosidase-Expression kotransfiziert und die jeweilig Transfektionseffizienz ermittelt.

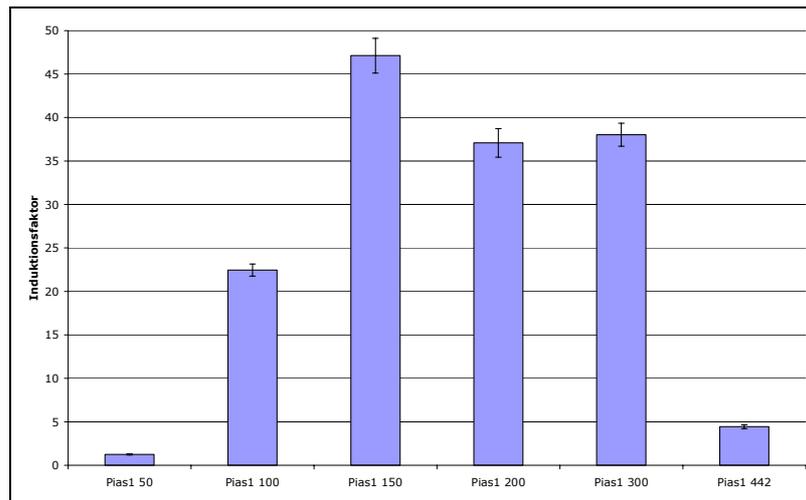


Abb. 3.7.8: konstitutive Expression der *plac1*-Promotorkonstrukte (transiente Transfektion in A549-Zellen, Induktionsfaktor gegenüber der Transfektion mit dem promotorlosen TA-Luc-Kontrollvektor)

Als Erklärung wäre das Vorhandensein einer Bindungsstelle für einen reprimierenden Transkriptionsfaktor denkbar. Untersucht man die 142 bp *in silico* mit Hilfe einer Datenbank und einem entsprechenden Algorithmus (Frech, Herrmann *et al.* 1993) ist die Zahl der identifizierten Transkriptionsfaktoren mit 14 bereits relativ überschaubar (siehe Abb. 3.7.9). Für die zu Beginn als Promotorsequenz klonierten 442 bp wurden hingegen 189 möglicherweise bindende Transkriptionsfaktoren ermittelt. Die hohe Ergebnisanzahl unterstreicht nochmals den hypothetischen Charakter der einzelnen Treffer.

Inspecting sequence *plac1*_repressor (1 - 142):

Family/matrix	Further Information	Opt.	Position		Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
			from - to	anchor				
VSMYOD/LMO2COM_01	complex of Lmo2 bound to Tal-1, E2A proteins, and GATA-1, half-site 1	0.98	21 - 35	28	(+)	1.000	0.989	gtagCAGGgctgaa
VRSORV/SOXS_01	Sox-5	0.87	60 - 76	68	(-)	1.000	0.987	agaaaCAATgctgtccc
VSCIZF/NMP4_01	NMP4 (nuclear matrix protein 4) / CIZ (Cas-interacting zinc finger protein)	0.97	32 - 42	37	(+)	1.000	0.970	tgAAAagcct
VSWHZF/WHN_01	winged helix protein, involved in hair keratinization and thymus epithelium differentiation	0.95	83 - 93	88	(-)	1.000	0.953	tcgACGcctac
VSECAT/NFY_01	nuclear factor Y (Y-box binding factor)	0.90	43 - 57	50	(-)	1.000	0.920	aaccccCAaagca
VSPCAT/ACAAT_01	Avian C-type LTR CCAAT box	0.86	46 - 56	51	(-)	1.000	0.879	acccCAaiaa
VSFKHD/HFH1_01	HNF-3/Fkh Homolog 1	0.85	65 - 81	73	(-)	1.000	0.864	gtcaCaAAACaatgct
VSCLOX/CDP_01	cut-like homeodomain protein	0.75	36 - 52	44	(-)	1.000	0.848	caAATAagCaaggcttt
VSEGRF/EGR3_01	early growth response gene 3 product	0.77	79 - 93	86	(+)	0.753	0.845	gaCCGTaggcgTcga
VFAST/FAST1_01	FAST-1 SMAD interacting protein	0.81	40 - 54	47	(+)	1.000	0.838	ccttctTATTgggg
VSRREB/RREB1_01	Ras-responsive element binding protein 1	0.79	47 - 61	54	(-)	1.000	0.829	cCCCAacCCCaaata
VSBEL1/BEL1_01	Bel-1 similar region (defined in Lentivirus LTRs)	0.78	25 - 47	36	(-)	1.000	0.803	aagcaaggctttTCAGaccg
VSMOKF/MOK2_01	Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (mouse)	0.74	21 - 41	31	(-)	0.750	0.797	ggcttttcaagcaCCTcctac
VSNRSF/NRSE_01	neural-restrictive-silencer-element	0.67	103 - 123	113	(-)	1.000	0.695	CgagGcccGCGAacCgQtc

Abb. 3.7.9: Ergebnis möglicherweise an die *plac1*-"Repressorsequenz" bindender TF

Die aufgelisteten Transkriptionsfaktoren sind nach der Übereinstimmungsgüte ihrer bekannten Bindungssequenzen mit der *Plac1*-Promotorsequenz geordnet. Lmo2, der Transkriptionsfaktor mit der höchsten Ähnlichkeit, ist als Transkriptionsaktivator bekannt (Wadman, Osada *et al.* 1997).

Auch für Sox-5 (Denny, Swift *et al.* 1992), CIZ (Nakamoto, Yamagata *et al.* 2000), das *winged helix* Protein (Denny, Swift *et al.* 1992), NFY (Mantovani 1998) und die weiteren in Abb. 3.7.9 genannten Transkriptionsfaktoren wurden in der Literatur keine weiteren Hinweise auf eine Repression der Transkription gefunden.

Die IFN-Repression einer stabil mit dem *hupias1*-(442 bp)-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfizierten A549, konnte sowohl für eine IFN-Quantifizierung (siehe Abb. 1.1.1), als auch die Detektion spezifischer anti-IFN-Aktivität (Abb. 3.2.16, am Beispiel des Quercetin) eingesetzt werden.

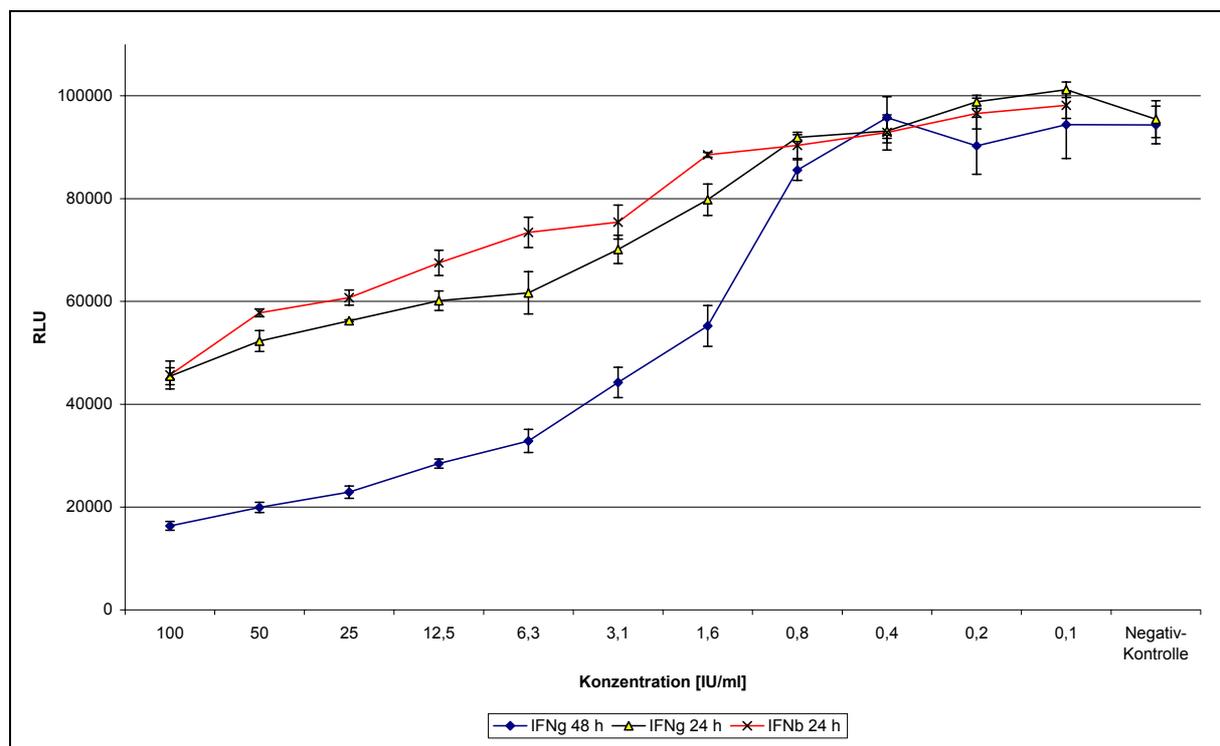


Abb. 3.7.10: Konzentrationsabhängigkeit der IFN γ und IFN β -vermittelten *pias1*-Reporter-Inhibition (stabile *pias1*-Luc/Puromycin-transfizierte A549-Linie, für IFN β erfolgte die Messung nach 24 h Inkubation, für IFN γ nach 24 h und 48 h)

Der Kurvenverlauf für TypI und TypII-IFN nach 24 h zeigt, dass die anhand der antiviralen Aktivität definierte biologische Aktivität auch in diesem Luciferase-Repressionstest ein akkurates Konzentrationsverhältnis der Wirkung der IFN-Typen zueinander widerspiegelt.

Nach 48 h ist der Repressionseffekt wesentlich stärker ausgeprägt und für IFN γ eine IC₅₀ von etwa 2 IU/ml feststellbar. Damit liegt die IFN-Sensitivität in der Größenordnung, die auch im GAS-Induktionstest erreicht wird (siehe Abb. 3.1.4).

Aufgrund der Fähigkeit des Pias1 die IFN γ -vermittelte Signaltransduktion zu unterbinden, schloss sich die Frage nach einem möglichen Feedback-Mechanismus auf genregulatorischer Ebene als eine Möglichkeit dazu an. Ein positives Beispiel hierfür stellt das Socs1 dar. Die Untersuchungen der oben aufgeführten Promotorkonstrukte haben jedoch auf eine *pias1*-Induktion durch Interferone keine Hinweise geliefert.

Untersuchungen des Pias1-Protein nach IFN-Stimulus

Als weitere Möglichkeit zur Autoregulation des IFN γ -Signals über die Pias1-Modulation ließe sich eine Erhöhung des Pias1-Gehaltes auf Proteinebene denken. Eine IFN γ -medierte Stabilisierung der mRNA, eine Verringerung der Proteindegradation o.ä. könnte dies bewirken. Zu diesem Zweck wurden Zellfraktionen von IFN γ -behandelten und unbehandelten serumfrei kultivierten A549-Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe des Westernblot auf Änderungen im Pias-Proteingehalt untersucht (nach t =24 h, siehe Abb. 3.7.11)

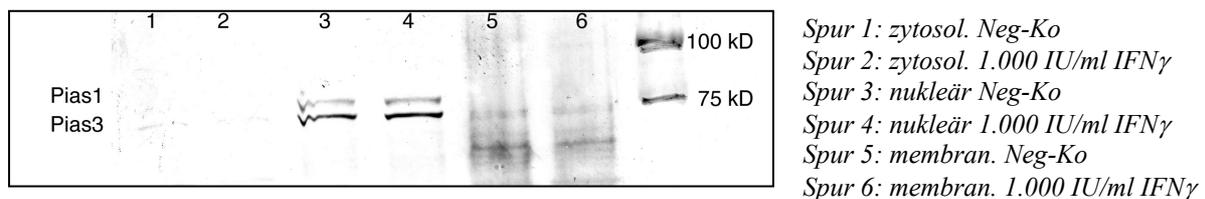


Abb. 3.7.11: Pias1/3 Westernblot nach IFN γ -Stimulus
 (A549-Zellen, 24 h Inkubation)

Diese Methode ist nicht hinreichend sensitiv, um eine endgültige Aussage über eine Konzentrationsänderung des Pias1 durch IFN γ -Inkubation zu treffen. Es ist jedoch anders als bei den Promotoruntersuchungen im Westernblot keine signifikante Änderung der Pias1-Konzentration nach einem Tag Stimulation mit IFN γ sichtbar (siehe obere Bande in Abb. 3.7.11.).

Eine Auswertung der relativen Bandenintensitäten von Pias1 und Pias3 mit dem Programm NIH-Image ergibt ein Verhältnis von ungefähr 1 zu 3. Die Intensitätsunterschiede zwischen IFN-stimulierten und nicht stimulierten Zellen sind hingegen nicht signifikant.

Die hohe Geschwindigkeit der Signaltransduktion basiert bei den Interferonen auf einer komplexen Aktivierung verschiedener Kinasen und ihrer Kaskaden. Für die Regulation der Pias1-Aktivität ist daher auch eine Phosphorylierung vorstellbar.

Um zu testen, ob humanes Pias1 überhaupt Phosphorylierungsstellen aufweist, wurde die Phosphatase-Aktivität durch 100 μ M Pervanadat unspezifisch blockiert, so dass das Gleichgewicht der Proteine in der Zelle auf Seiten der phosphorylierten Form lag.

Als Nachweis eines spezifischen Phosphorylierungsereignisses wurden über 30 min mit 1.000 IU/ml IFN γ stimulierte A549-Zellen mit unstimulierten verglichen. Als Separationsmöglichkeit phosphorylierter und unphosphorylierter Proteine wurde das „PhosphoProtein Purification Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Zur Überprüfung der erfolgten Separation wurden Stat1 α (siehe Abb. 2.2.1) und Jak2 (siehe Abb. 3.7.13) in den entsprechenden Proben im Westernblot nachgewiesen. Stat1 α lag in serumfrei gehaltenen unstimulierten Zellen (Spur 1 und 4) fast ausschließlich im nicht phosphorylierten Zustand (Spur 4) vor. Bei Stimulation mit 100 μ M Pervanadat lag entsprechend NIH-Image-Auswertung eine geringe, etwa zehnfach erhöhte Menge Stat1 α (Spur 1) bei IFN γ -Stimulus eine 50-fach höhere Menge an Stat1 α (Spur 3) in seiner phosphorylierten Form vor. Der Anteil des unphosphorylierten Stat1 α überwog jedoch auch in den stimulierten Zellen bei weitem.

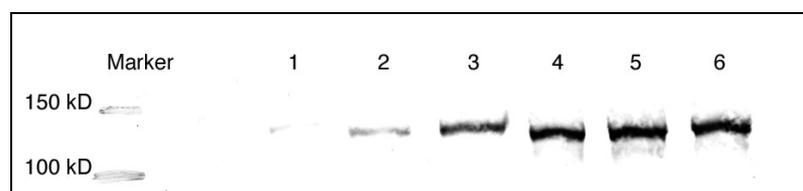


Abb. 3.7.12: Stat1 α -Westernblot nach Phosphoseparation (A549-Zellen)
(1: Eluat unstimuliert, 2: Eluat PV, 3: Eluat IFN γ , 4: Durchfluss unstimuliert, 5: Durchfluss PV, 6: Durchfluss IFN γ)

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für die Tyrosinkinase Jak2. In unstimulierten Zellen ist nur ein sehr geringer Anteil phosphoryliert, während eine Stimulation mit Pervanadat und IFN γ zur einer phosphorylierungsbedingten Bindung an die Säule führt (Spuren 2 und 3; siehe Abb. 3.7.13).

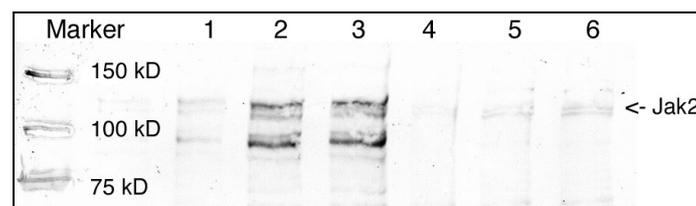


Abb. 3.7.13: Jak2-Western nach Phosphoseparation
(1: Eluat unstimuliert, 2: Eluat PV, 3: Eluat IFN γ , 4: Durchfluss unstimuliert, 5: Durchfluss PV, 6: Durchfluss IFN γ)

Eine IFN γ -induzierte Jak2- und Stat1 α -Phosphorylierung entspricht dem bekannten Signaltransduktionsweg (siehe Abb. 1.4.1). Der Nachweis diente lediglich als eine methodische Kontrolle.

Die Fähigkeit des Pias1 nach unspezifischer Stimulation mit Pervanadat und auch nach spezifischer mit IFN γ an die phosphospezifische Säule zu binden wies hingegen auf eine neue Möglichkeit der Pias-Regulation hin. Da der anti-Pias-Ak Pias1 (obere Bande in Abb. 3.7.14) sowie Pias3 (untere Bande) erkennt, war die induzierte Phosphorylierung für beide Proteine detektierbar. Die eluierten Fraktionen (Spur 1 bis 3) enthielten dabei phosphorylierte Proteine und der Durchfluss (Spur 4 bis 6) den unphosphorylierten Proteinanteil. Ein geringer Anteil an Pias3 lag in der IFN γ -unstimulierten Zelle bereits phosphoryliert vor. Zum Pias1 lässt sich bezüglich eines ohne IFN γ -Stimulus phosphorylierten Anteils keine Aussage treffen, da er im Falle eines Pias3-vergleichbaren Verhaltens unter der Nachweisgrenze läge (siehe Bandenintensitätsverhältnis Pias1/3 stimuliert/unstimuliert, Abb. 3.7.14). Ob Pias1 und welche Aminosäure phosphoryliert wurde, ließe sich anhand einer Immunpräzipitation mit dem Pias1/3-AK und Detektion mit entsprechenden phosphospezifischen Antikörpern nachweisen. Der verwendete Pias1/3-Antikörper war für eine Immunpräzipitation jedoch nicht geeignet.

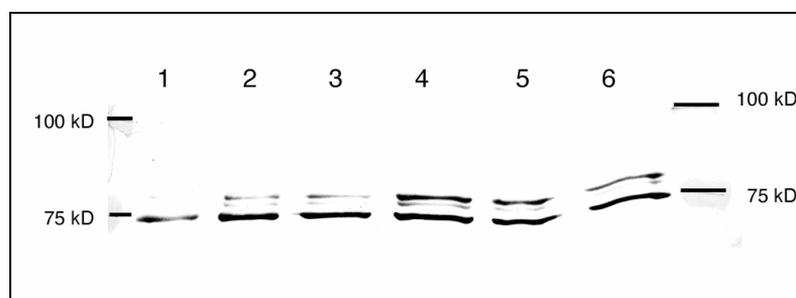


Abb. 3.7.14: Pias1/3-Western nach Phosphoseparation, obere Bande = Pias1
 1: Eluat unstimuliert, 2: Eluat PV, 3: Eluat IFN γ ,
 4: Durchfluss unstimuliert, 5: Durchfluss PV, 6: Durchfluss IFN γ

Betrachtete man die AS-Sequenz des humanen Pias1 mit Hilfe eines Algorithmus zur Bestimmung wahrscheinlicher Phosphorylierungsstellen wie Netphos 2.0 (Blom, Gammeltoft *et al.* 1999) ergaben sich anhand der umgebenden Sequenz für die 81 Serin, 46 Threonin und 16 Tyrosin-Reste bei den in Abb. 3.7.15 aufgeführten 32 Ser, 7 Thr und 3 Tyr signifikante Wahrscheinlichkeitswerte (siehe Anhang).

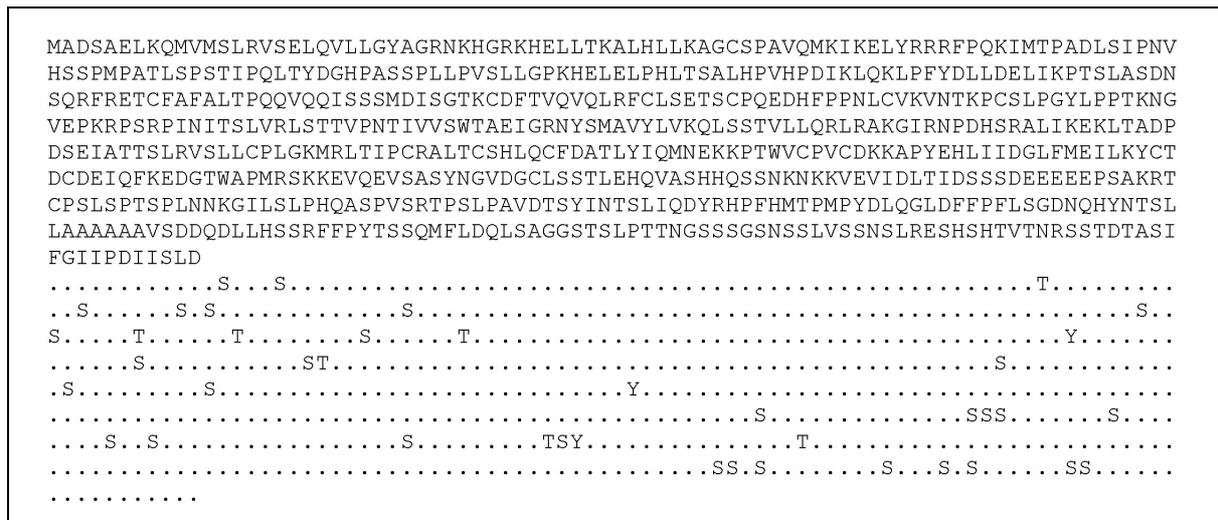


Abb. 3.7.15: Phosphorylierungstellen für humanes Pias1 theoretisch ermittelt mit Netphos 2.0 (obere Sequenz: 651 AS lange Sequenz des huPias1, untere Sequenz: mögliche Phosphorylierungsstellen; S = Serin (31), T = Threonin (7), Y = Tyrosin (3); zu den Wahrscheinlichkeitswerten siehe Anhang)

An Stelle der IFN-abhängigen Modifikation des Pias1-Proteins selbst ist als Regulationsmechanismus aber auch die veränderte Assoziationseigenschaft zu dem IFN-aktivierten bzw. inaktiven Transkriptionsfaktor GAF vielleicht ausreichend (siehe Kapitel 1.5, Pias1). Auch andere Modifikationen des Bindungspartners Stat1 wie die Arg³¹-Methylierung modulieren die Bindungsaffinität zum Pias1.

Die Bedeutung der Arg³¹-Methylierung wurde für die Induktion durch TypI-IFN beschrieben. Durch den Methyltransferase-Inhibitor MTA wurde als Bestätigung dieses Mechanismus die Intensität der TypI-IFN-Antwort signifikant inhibiert. Abb. 3.7.16 bestätigte zum einen die Inhibition des TypI-IFN-Signals und zeigte zum anderen, dass MTA auch den TypII-IFN-Signalweg inhibiert. Dies stützt die Vermutung, dass die am IFN β beschriebene Beobachtung, eine verstärkte Pias1-Bindung an das nichtmethylierte Stat1 verringere die ISRE-Induktion, auf das IFN γ übertragbar sei.

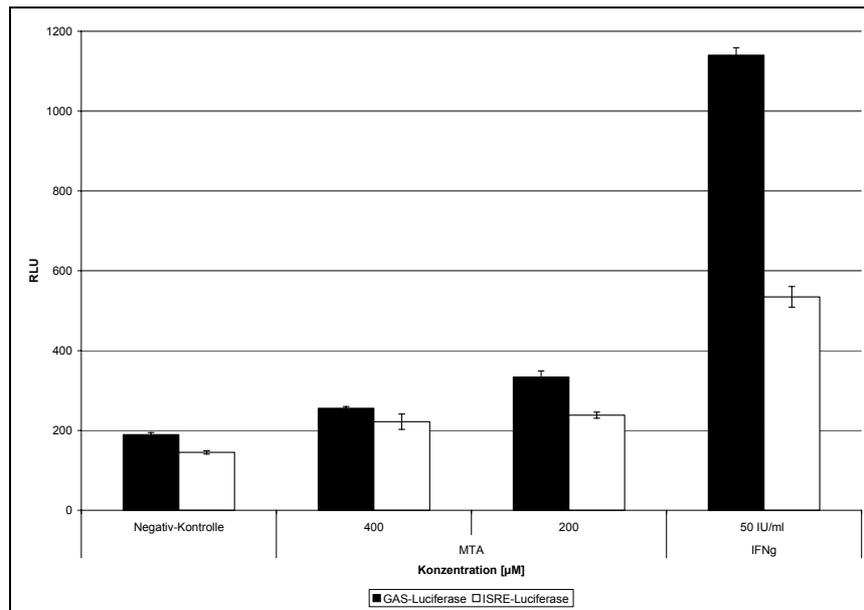


Abb. 3.7.16: GAS/ISRE-Induktionstest für MTA
(stabil transfizierte Zell-Linien GAS-Luc in A549, ISRE-Luc in HepG2;
6h Induktion mit MTA und 50 IU/ml IFN γ)

Als Kontrolle wurde die Konzentrationsabhängigkeit der MTA-vermittelten Zytotoxizität betrachtet. Eine geringfügige Vitalitätsabnahme wurde erst in einer Konzentration von 1 mM im MTS-Reduktionstest an A549-Zellen nach 24 h Inkubation festgestellt (Abb. 3.7.17).

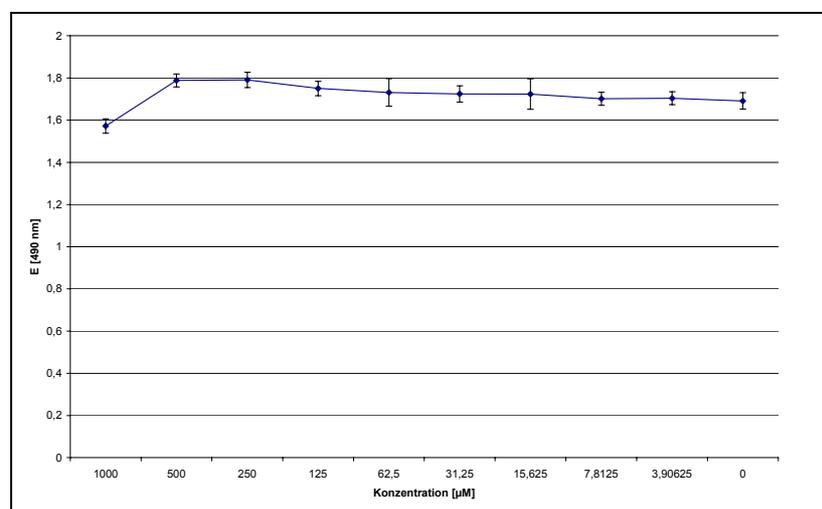


Abb. 3.7.17: Zytotoxizitätsbestimmung von MTA auf A549-Zellen
(24 h Wirkstoffinkubation,
MTS-Färbung mit Extinktionsmessung bei 490 nm)

3.7.3 Klonierung des humanen *socs1*-Promotor-Luciferase -Konstrukts

Entsprechend der Klonierung des humanen *pias1*-Promotors wurde eine 2 kbp umfassende putative Promotorsequenz *upstream* vom Translationsinitiationscodon des *socs1*-Gens (siehe Abb. 3.7.18) durch PCR mit den Primern Socs1 2kb fw/Socs1 bw (siehe Kapitel 2.2.16) amplifiziert.

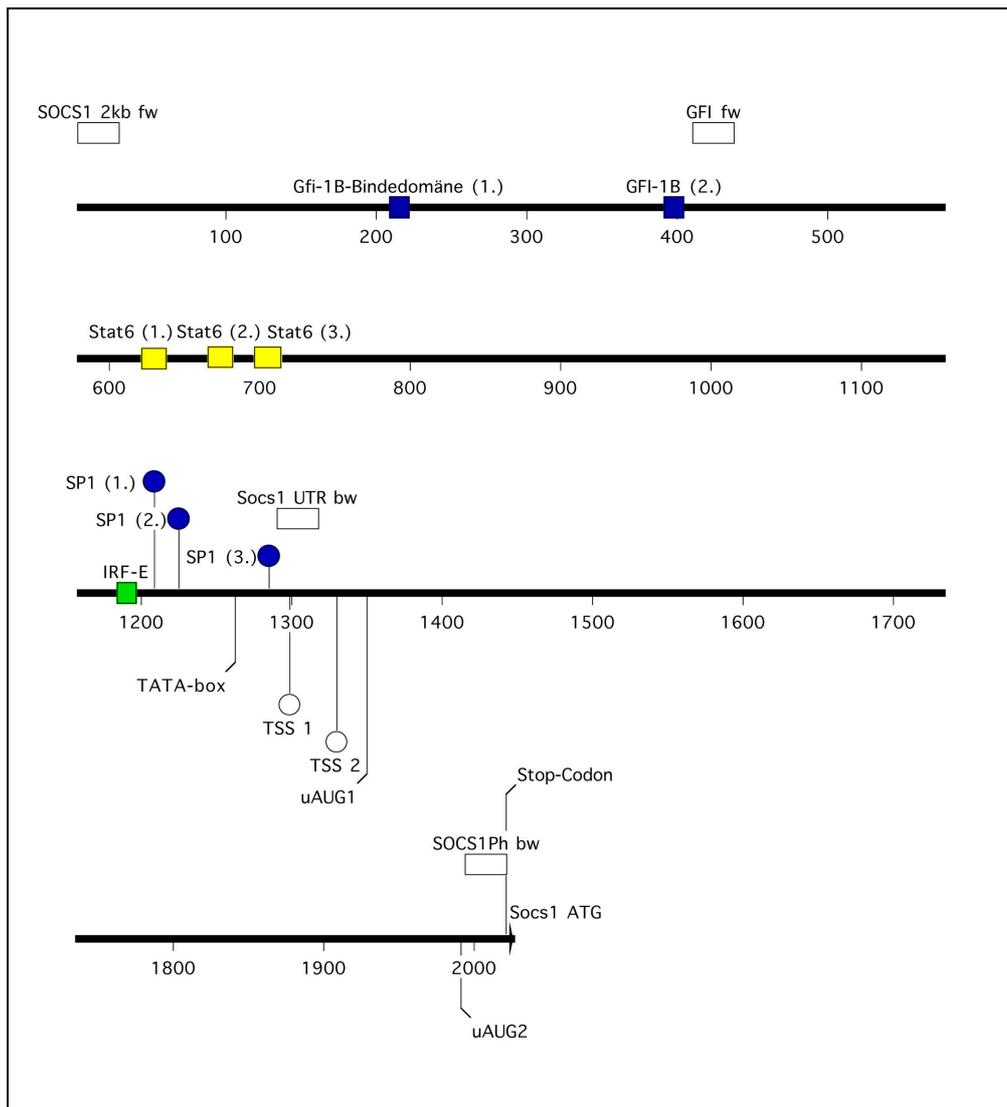


Abb. 3.7.18: schematische Darstellung des humanen *socs1*-Promotors
 farblose Kästen: Primer, mit denen die entsprechenden PCRs durchgeführt wurden,
 blaue Kästen: Gfi-1B-Repressor-Bindeelemente, gelbe Kästen: Stat6-Bindeelemente, welche
 im murinen und humanen *socs1*-Promotor konserviert vorliegen, grüner Kasten: IRF-E-
 Bindeelement, blaue Kreise: SP-1-Bindeelemente (Genomatix-Vorhersage, entsprechend den
 GC-Boxen des murinen *socs1*-Promotors (Abb. 1.5.3), farblose Kreise:
 Transkriptionsstartpunkt 1 und 2 (Eponine-Vorhersage), TATA-Box: nach Genomatix-
 Vorhersage überlappen sich eine muscle- und eine mammalian C-type LTR-TATA-Box
 (MatInspector, Genomatix), die translationsinhibierenden uAUG1 und 2 samt Stop-Codon
 sind zwischen humanem und murinem *socs1*-Promotor konserviert)

Die anschließende TA-Klonierung in den Vektor pBlue-Topo ergab ein Konstrukt, welches nach Transfektion in A549-Zellen auch nach IFN γ -Stimulation keine β -Galaktosidase mengen exprimierte, die im 96-well-Mikrotiter-Maßstab nachweisbar waren. Durch Hind III-Restriktion wurde daher die Promotorsequenz vor das *Photinus-luciferase*-Gen in den Vektor pTA-Luc kloniert (siehe als Analogie Abb. 3.7.1).

Als Positivkontrolle für die Funktionalität des klonierten *socs1*-Promotor-Luciferase-Reporterkonstruktes wurde eine Induktion mit IFN γ nach transients Transfektion in A549-Zellen ermittelt (Abb. 3.7.19). Diese war dabei verglichen mit der Induktion des GAS-Promotors sehr gering. Im Unterschied zum GAS- und zum hier getesteten ISRE-Promotor wurde der *socs1*-Promotor deutlich stärker durch TypI-Interferone induziert.

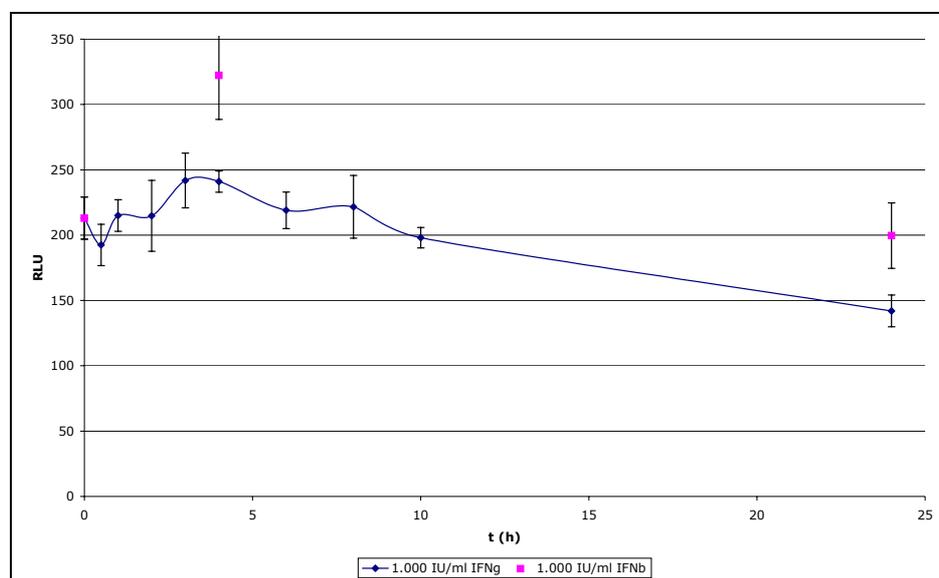


Abb. 3.7.19: *socs 2kb*-Promotor-Luciferase-Expressions-Kinetik nach (transiente Transfektion in A549-Zelle; n Induktion mit je 1.000 IU/ml IFN β/γ)

Wie aus Abb. 3.7.19 zu ersehen ist erfolgt durch IFN β eine stärkere Induktion der *socs1*-Promotorgesteuerten Luciferase-Expression als durch IFN γ . Die Unterschiede in der Induktion durch die Interferone α/β und γ werden auch beim Vergleich der jeweiligen Konzentrationsabhängigkeit deutlich (siehe Abb. 3.7.20). Im Gegensatz zu Literaturangaben (Saito, Morita *et al.* 2000) wurde durch TypI-Interferone eine stärkere Induktion des *socs1*-Promotors beobachtet als durch IFN γ . Auffällig sind die niedrigen IFN-Konzentrationen, bei denen eine statistisch nicht signifikante aber reproduzierbare Reduktion der Luciferaseaktivität auftritt.

Wie oben beschrieben (siehe Abb. 3.7.7) inhibieren Interferone in diesem Messsystem die gemessene Luciferaseaktivität auch bei konstitutiven Promotoren. Neben der Stimulation durch IFN wird also gleichzeitig eine Reduktion der Luciferaseaktivität bewirkt. Kompensierten sich beide Effekte, ergäbe sich dabei das falsche Bild einer fehlenden Genregulation. Bei der geringen gemessenen Induktion ist dieser Kompensationseffekt mit zu berücksichtigen.

Ab einer Konzentration von 10 IU/ml für IFN α und ab 100 IU/ml für IFN β und IFN γ war eine Induktion messbar, die das Maß der Aktivitätsreduktion überstieg. Testete man eine geringere IFN-Konzentration (0,1 IU IFN β in Abb. 3.7.20), war keine Repression des konstitutiven Expressionslevels zu beobachten. Unter diesem Aspekt betrachtet sind die gemachten Beobachtungen immer als resultierender Effekt aus spezifischer IFN-Induktion und unspezifischer IFN-Repression zu betrachten. Diese beiden Prozesse verlaufen mit einer unterschiedlichen Kinetik und zeigen eine schnelle Induktion und eine sich über längere Zeit verstärkende Repression (siehe Abb. 3.7.19 und Abb. 3.7.5).

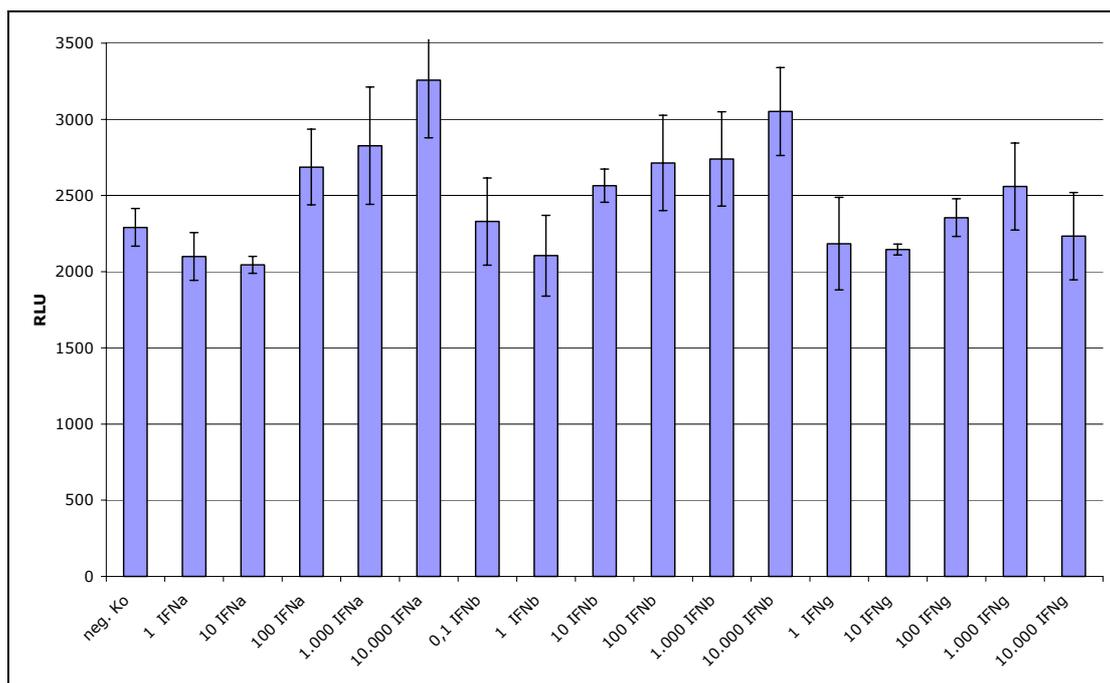


Abb. 3.7.20: *socs1*-Promotor-Luciferase-Induktion bei verschiedenen IFN-Konzentrationen (transiente Transfektion in A549; 5 h Induktionsdauer)

Um eine den GAS-Luciferase-Vektoren vergleichbare Induktionsstärke erzielen zu können, wurde der *Socs1*-Promotor um zwei für das Mausmodell als negative Regulationselemente beschriebene Sequenzen verkürzt. Hierzu wurde eine Deletions-PCR mit dem 5'-phosphorylierten Primerpaar Gfi fw/LucPh bw und ein *Template*-Verdau mit DpN I durchgeführt.

Ligation und Transformation ergaben ein nur um das Gfi 1B-Repressorelement verkürztes humanes *socs1*-Promotorkonstrukt. Aus diesem wurde mit dem Primerpaar LucPh fw/Socs1 UTR bw die um die translationsreprimierende 5'UTR und das Gfi 1B-Repressorelement verkürzte Promotorvariante erzeugt.

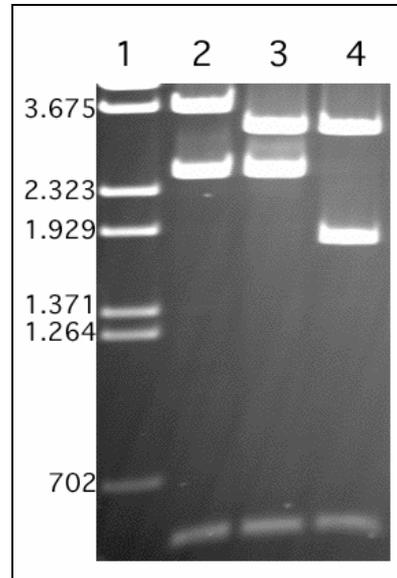


Abb. 3.7.21: Agarosegel der *socs1*-Promotorvarianten

1: λ -Marker

HincII-Restriktion der *socs1*-Luciferase-Varianten:

2: ungekürzter 2kb-Promotor Σ 6.882 (Fragmente: 110, 510, 2.548, 3.714 bp)

3: *socs1* -Gfi Σ 6.446 (Fragmente: 110, 510, 3.010, 2.548 bp)

4: *socs1* -Gfi/5'-UTR Σ 5.731 (Fragmente: 110, 510, 3.278, 1.815 bp)

Durch *HincII*-Restriktion und Analyse über ein Agarosegel (Abb. 3.7.21) ließen sich die erfolgten Verkürzungen sowie die spektrophotometrische DNA-Konzentrationseinstellung anhand der gleichen Bandenintensitäten (510 bp – Bande) bestätigen. Zusätzlich wurden die Vektoren durch Sequenzierung der Ligationsstellen überprüft.

Die drei humanen *socs1*-Promotorvarianten wurden mit dem *CMV-lacZ*-Konstrukt in A549-Zellen kotransfiziert und die konstitutive Expression in Form der Luciferase-Aktivität gemessen und mit der *CMV*-promovierten β -Galaktosidase-Expression normalisiert. Das Expressionsverhalten entsprach dabei nicht dem für den murinen *socs1*-Promotor beschriebenen (siehe Abb. 3.7.22). Die Verkürzung um das Gfi 1B-Repressorelement alleine verursachte keine Abnahme der konstitutiven Expression nach transients Transfektion in A549-Zellen. Die Verkürzung um die 5'UTR hingegen bewirkte, wie aufgrund der hohen Homologie der humanen und murinen 5'UTR bereits zu erwarten, eine deutliche Zunahme der konstitutiven Luciferaseaktivität. Einen Einfluss auf die Induktion durch IFN β hatte keine der Verkürzungen.

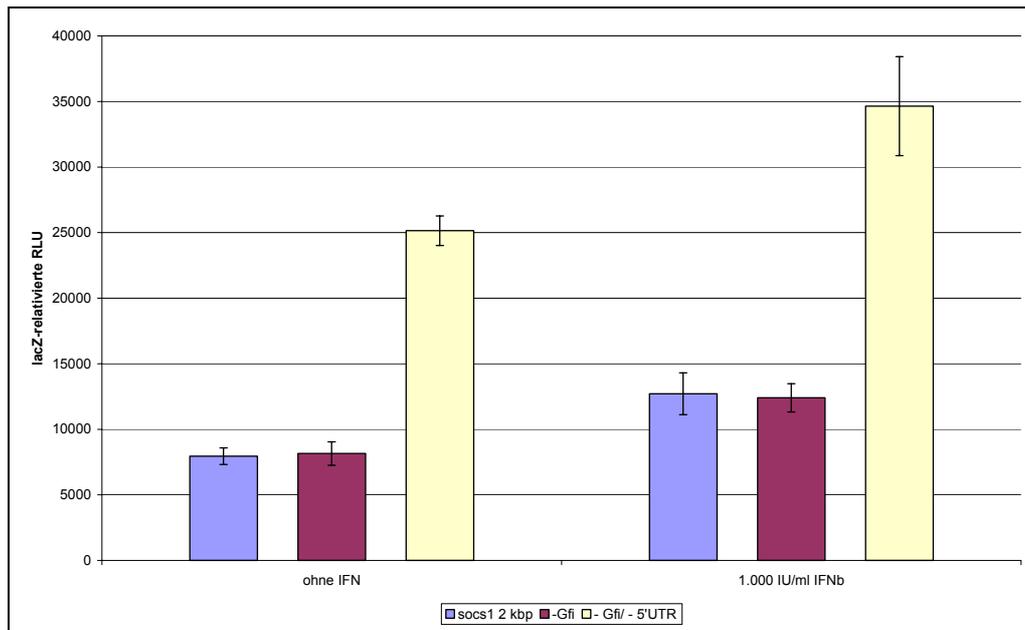


Abb. 3.7.22: Expressionscharakteristika der *socs1*-Promotorvarianten (transiente Transfektion von A549-Zellen, Stimulation mit 1.000 IU/ml IFN β , 7 h Induktionsdauer, links: konstitutive, rechts: induzierte Expression)

4 Diskussion

4.1 Das zellbasierte Screeningsystem

Beim Testen auf eine IFN γ -bezogene Wirkung von mehr als 1.000 Proben mit der humanen Zelllinie A549 anhand des biologischen Markers der Antiviralität hat sich gezeigt, dass es sich um ein sehr robustes und reproduzierbares Messsystem handelt. Eine wesentliche Limitierung war hingegen der relativ geringe Probendurchsatz.

Die Wahl des Konzentrationsfensters und der Verdünnungsstufen stellte einen Kompromiss aus Aufwandserwägungen und Trefferwahrscheinlichkeit für die gesuchten Aktivitäten dar. Um die nötige Robustheit des Messsystems zu gewährleisten, war eine Dreifachbestimmung erforderlich. Die Kontrollwerte wurden auf jeder Platte als direkte Vergleichsgröße mitgeführt. Bei vier Konzentrationswerten von je 10-fach erniedrigter Konzentration wurde eine 96-well-Platte für die Bestimmung von Zytotoxizität, anti-IFN γ -Wirkung und antiviraler Wirkung somit mit nur zwei Proben beladen. Obwohl durch das Konzentrationsfenster und insbesondere das Verdünnungsraster von 1:10 Aktivitäten unter Umständen nicht erfasst wurden, konnten im Primärassay eine Vielzahl an primären Treffern ermittelt werden. Der größte Anteil war dabei zytotoxischer Natur. Dies stellt unter Umständen eine Ursache für eine Reduktion an vorgefundenen IFN-bezogenen Aktivitäten dar. Bei Rohfraktionen, also Substanzgemischen, konnte durch eine zytotoxische die antivirale und auch die anti-IFN γ -Wirkung maskiert werden. Mit 39% zeigte sich bei den Substanzen aus dem „Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie“ ein vergleichsweise hoher Anteil zytotoxischer Proben. Jedoch besteht bei Rohfraktionen der Vorteil, eine große Menge an Substanzen in einem einzigen Schritt gleichzeitig testen zu können. Bei vorhandener Aktivität des Rohextraktes konnte die entsprechende Reinsubstanz anhand der Wirkung isoliert werden. Dieses Vorgehen konnte durch die Zusammenarbeit mit der AG Prof. Laatsch am Beispiel der Isolierung des Streptorubin A, des Cosmomycin B und für die Aktivitäten des *Rheum*-Extrakts erfolgreich demonstriert werden.

4.2 Screening auf IFN γ -Inhibition

Bei zwei der im Primärassay als IFN γ -inhibitorisch identifizierten Proben handelt es sich mit Cinerubin R und Trioxacarcin D um in der Literatur beschriebene Substanzen. Trioxacarcine sind komplexe Antibiotika, die zuerst von Tomita *et al* isoliert wurden (Tomita, Tamaoki *et al.* 1981). Bei der Suche bioaktiver Substanzen aus marinen Streptomycceten isolierten Maskey *et al* das neue Derivat Trioxacarcin D (Maskey, Helmke *et al.* 2002). Für Trioxacarcin D wurde eine anti-Tumor-Wirkung mit einer IC₅₀ von 380 ng/ml ermittelt. Das Cinerubin R ist als Anthracyclin-Antibiotikum beschrieben worden (Nakata, Saito *et al.* 1992).

Bei dem aktiven Streptomycceten-Substanzgemisch wurden die Untersuchungen anfangs mit dem Rohextrakt durchgeführt, später auf zwei angereicherte Fraktionen mit der entsprechenden Aktivität weiter spezifiziert, aus denen letzten Endes die Reinsubstanzen Cosmomycin A und Cosmomycin B isoliert werden konnten.

Bei der Aufhebung des IFN-vermittelten Virusschutzes betrug die IC₅₀ für Cinerubin R 500 ng/ml (1:8.000-fache Verdünnung der Stammlösung), für das Trioxacarcin D 100 ng/ml (1:20.000) und für das Streptomycceten-Extrakt 7 μ g/ml (20.000-fache Verdünnung). Eine Spezifität bezüglich des TypI-Interferons wurde durch die Aufhebung des IFN β -vermittelten Virusschutzes durch die drei anti-IFN γ -wirksamen Proben widerlegt. Es wurde daraufhin der Frage der Spezifität einer allgemeinen IFN-Inhibition am Beispiel des Signalwegs des IFN γ nachgegangen.

Für die Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung wurde auch in einer deutlich über der jeweiligen IC₅₀ (IFN-Virusschutz) liegenden Konzentration keine Inhibition festgestellt (siehe Abb. 3.5.8). Für die GAS-Induktion, wurde für alle drei Proben eine Inhibition nach IFN γ -Stimulus festgestellt. Die IC₅₀ der GAS-Inhibition war für Cinerubin R mit 3 μ g/ml jedoch in einer gegenüber der im virusbasierten System ermittelten IC₅₀ von 500 ng/ml um das Sechsfache erhöht. Bei der Cinerubin R-Konzentration, die 50% Aufhebung des IFN-vermittelten Virusschutzes bewirkte (500 ng/ml), wurde die GAS-Induktion nur um etwa 20% inhibiert. Für Cinerubin R erklärt die Inhibition der GAS-Aktivierung damit nicht die Aufhebung des IFN-vermittelten Schutzstatus.

Für Trioxacarcin D ergibt sich im GAS-Inhibitionstest eine IC₅₀ von 250 ng/ml und für das Streptomycceten-Extrakt von 17,5 μ g/ml (8.000-fache Verdünnung) (siehe Abb. 3.5.9).

Zur Beurteilung eines wachstumshemmenden Potenzials der Proben wurde ein antiproliferativer Test mit einer geringeren Anfangszellzahl und einer dreimal längeren Inkubationsdauer (72 h) durchgeführt. Für die Substanz Trioxacarcin D ergab sich dabei eine EC_{50} von 40 ng/ml und beim Rohextrakt des Streptomyceten GW22/1326 von 4,4 µg/ml (32.000-fache Verdünnung). Die starke Abnahme der im MTT-Reduktionstest ermittelten Vitalität konnte auch morphologisch unter dem Mikroskop nachvollzogen werden. Es zeigte sich dabei in den höheren Konzentrationen an Trioxacarcin D und dem Streptomyceten-Extrakt eine vollständige Zerstörung der A549-Zellstruktur, so dass es sich in diesem Zusammenhang an Stelle eines Antiproliferationstests vielmehr um einen Zytotoxizitätstest über einen verlängerten Zeitraum von drei Tagen handelt.

In Hinblick auf die verwendete A549-Tumor-Zelllinie, ließe sich die antiproliferative/zytotoxische Wirkung unter Umständen auch als eine Antitumorwirkung beschreiben. Inhibitoren des Jak/Stat-Signalweges wie das Tyrphostin AG490 (siehe Kapitel 3.2 Bekannte Kinase-Inhibitoren im Vergleich) gelten als mögliche Antitumorwirkstoffe (Meydan, Grunberger *et al.* 1996; Blume-Jensen and Hunter 2001). Diese Annahme schliesse eine Spezifität für die Inhibition der IFN-Antwort gerade wegen der Zytotoxizität nicht aus. Der Einfluss auf die A549-Tumorzelllinie ließe sich auch in Hinblick auf die beschriebene anti-Tumor-Wirkung der Trioxacarcine interpretieren.

Anhand der Toxizitätsdaten ließ sich für Trioxacarcin D und das Rohextrakt GW22/1326 zeigen, dass die in den anti-IFN γ -Assays (sowohl GAS-Induktion, als auch Aufhebung des Virusschutzes) aktiven Konzentrationen bereits zu einer IFN-unabhängigen zellulären Deregulation führen. Der zytotoxische Effekt entwickelt sich dabei verglichen mit dem 24 h AVA langsam.

Beim Cinerubin R trat auch bei einer Konzentrationen von 1 µg/ml keine 50%-Vitalitätsreduktion auf. Auch mikroskopisch war der Anteil der zytotoxischen und/oder antiproliferativen Wirkung des Cinerubin R schwer zu beurteilen. Nach 24 h ist auch die Zytotoxizität des Streptomyceten-Extrakts in der 8.000-fachen Verdünnung (17,5 µg/ml) mit einer 10%igen Vitalitätsabnahme gering (siehe Abb. 3.5.1). Es ist daher schwierig, eine geeignete Bezugsgröße für die Beurteilung der Spezifität zu wählen.

Um die Spezifität abschließend zu klären, wurde mit den Erkenntnissen der Analyse des *pias1*-Promotor-Luciferase-Konstrukts (siehe Abb. 3.7.10) ein neues Messsystem konzipiert. Mit diesem wurde nicht mehr das substanzvermittelte Abschalten einer IFN-vermittelten Aktivierung erfasst (Aufhebung des Virusschutzes bzw. Inhibition der GAS-Induktion), sondern ein Abschalten der IFN-spezifischen Repression des Messsignals.

Da so die zytotoxische Wirkung ebenso wie die IFN-Wirkung zu einer Verringerung des Messsignals führt, wurde eine Trennung von zytotoxischer und anti-IFN γ -Wirkung möglich. Dieser Test zeigte, dass die im Primärtest identifizierten IFN γ -inhibitorischen Proben keine spezifische Unterbindung der IFN γ -vermittelten Signalabnahme bewirkten (siehe Abb. 3.5.11). Damit blieb jedoch die Frage nach den Wirkmechanismen, nämlich zum einen die EMC-Viruslyse nicht zu inhibieren, zum anderen aber die wirtseigenen Abwehrmechanismen zu verringern, weiterhin unbeantwortet.

Nach weiterer Fraktionierung des Streptomyceten-Extraktes wurde für die Reinsubstanzen Cosmomycin A und besonders Cosmomycin B eine starke Induktion eines CMV-Promotor-Luciferase-Konstruktes festgestellt (siehe Abb. 3.5.13). Eine Induktion des ohnehin stark konstitutiven Promotors konnte auch unabhängig vom Detektionsprinzip der Biolumineszenzmessung an einem stabil in CHO-Zellen transfizierten CMV-Promotor-*hufn β* -Konstrukt über einen antiviralen Assay zur IFN β -Quantifizierung gezeigt werden. Als Spezifitätskontrolle wurde die Wirkung von Cosmomycin B auf die konstitutive Expression unter dem humanen *pias1*-Promotor untersucht. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Repression der Expression. Eine Repression zeigte sich auch beim IFN γ -induzierten GAS-Induktionstest.

Eine Möglichkeit zur Erklärung der Viruslyse trotz IFN γ -Schutz im Falle des Cosmomycin B durch eine Induktion viraler gegenüber eukaryotischer Promotoren führt zu einem einfachen Modell für die im Primärtest für das Streptomyceten-Extrakt GW 22/1326 gefundene Aktivität. Die Antwort auf die Frage nach den tatsächlichen Wirkmechanismen der nach den obigen Erkenntnissen nicht spezifisch IFN-inhibitorischen Wirkungen der Substanzen Cinerubin R, Trioxacarcin D und des Cosmomycin B müssen jedoch weitere Experimente klären.

4.3 Screening auf antiviralen Schutz

Die von der AG Zeeck isolierten Concanamycine A und C zeigten im Primärscreening und nachfolgenden Tests einen antiviralen Schutz der A549-Zellen gegen *EMC*-Virus. Diese antivirale Wirkung beruhte weder auf einer Stat1-Aktivierung durch Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung noch auf einer GAS-Induktion. Die Concanamycine bewirken demnach keine IFN γ -analoge Aktivierung des Jak/Stat-Weges. Dennoch handelt es sich bei einer der IFN-induzierten antiviralen Wirkmechanismen um eine verminderte Azidifizierung des trans-Golgi-Netzwerkes, welche durch Inhibition von V-ATPasen erreicht wird (Sidhu, Singh *et al.* 1999). Genau diese Wirkung wird auch den Concanamycinen und den verwandten Bafilomycinen zugeschrieben (Drose, Bindseil *et al.* 1993; Yoshimoto, Jyojima *et al.* 2002). Am Beispiel der Concanamycine läßt sich anhand der publizierten Eigenschaften somit ein Szenario erstellen, in dem eine antivirale Substanz auch unabhängig von einer überlappenden Geninduktion Gemeinsamkeiten zum IFN-Signaltransduktionsweg aufweisen kann. Dabei übt sie ihren biologischen Effekt auf die gleichen molekularen Zielstrukturen aus. Dieser Zusammenhang ist relevant im Hinblick auf die große Anzahl der für Interferone bekannten Mechanismen, die gezielt die Viruspropagation vermindern und gleichzeitig zelluläre Funktionen aufrechterhalten.

Bei den meisten anderen antiviralen Proben war eine klare Unterscheidung zwischen einer antiviral und einer zytotoxisch wirksamen Konzentration nicht möglich. Ein Rohextrakt das in einer 80-fach unter der zytotoxischen Konzentration liegenden Verdünnung noch antiviral wirkte, wurde weiter fraktioniert. Die Einzelsubstanzen wurden auf ihr antivirales Potenzial getestet. Dabei zeigte sich Streptorubin A als die gegen das *EMC*-Virus aktive Substanz. Eine Aktivierung des Jak/Stat-Signalweges durch Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung oder GAS-Induktion wurde nicht festgestellt. Im antiproliferativen Test über drei Tage zeigte sich Streptorubin A in der Konzentration von 100 ng/ml, die einen antiviralen Schutz vermittelt, zugleich als antiproliferativ. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind nicht geklärt.

4.4 Tyrosinkinase-Inhibitoren und die Frage der Spezifität

Insgesamt wurden sechs Substanzen aufgrund ihrer bekannten Eigenschaft, mit dem Jak/Stat-Signalweg spezifisch (Trichodion, AG490 und EGCG) oder als allgemeine Proteinkinase-Inhibitoren eher unspezifisch (Staurosporin, Quercetin und Dithranol) zu interferieren, ausgewählt.

In HeLa S3-Zellen wurde die IFN γ -Inhibition eines GAS-SEAP-Reportersystems durch ein Extrakt des Deuteromyceten *Trichosporiella sp.* festgestellt und das aktive Pyrandion Trichodion mit einer IC₅₀ von 21-42 μ M isoliert (Erkel 2000). Im GAS-Induktionstest einer stabil transfizierten A549-Linie mit Luciferase als Reporter gen ergab sich nach IFN γ -Induktion eine IC₅₀ von etwa 70 μ M (Abb. 3.2.3). Im Primärassay ließ sich in einer Konzentration von 100 μ M keine Verringerung des IFN γ -vermittelten Virusschutzes feststellen (Abb. 3.2.2). Dies zeigt die höhere Sensitivität der Detektion einer anti-IFN γ -Wirkung durch GAS-Promotor-Reporter-Systeme und weist darauf hin, dass sich die Antiviralität als biologische IFN-Antwort der Zelle auch bei einer geringen Restaktivierung aufbaut. Zusätzlich mag es von Bedeutung sein, dass neben der Stat-vermittelten antiviralen Antwort auch Stat-unabhängige IFN-induzierte Mechanismen existieren (Ramana, Grammatikakis *et al.* 2000; Gil, Bohn *et al.* 2001; Ramana, Gil *et al.* 2001). Für Trichodion fand G. Erkel als eine Ursache der GAS-Inhibition, dass eine vollständige Inhibition der Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung noch in einer Konzentration bis 42 μ M auftrat. Zusätzlich wurde jedoch auch die NF- κ B und die AP-1 induzierte Genexpression inhibiert. Der Wirkmechanismus der Trichodion-vermittelten Inhibition und die primäre(n) Zielstruktur(en) sind noch nicht bekannt.

Beim Tyrphostin AG490, welches in der Literatur als spezifischer Inhibitor der Jak2-Phosphorylierung beschrieben wird, zeigte sich im Primärscreening ebenfalls keine anti-IFN γ -Aktivität. Nach dem gängigen Modell der IFN γ -Signaltransduktion (Abb. 1.4.1) hat eine vollständige Jak2-Inhibition nach IFN γ -Stimulus eine Inhibition der Stat1-Aktivierung zur Folge. Eine Stat1-Inhibierung wurde im Western-Blot auch in einer gegenüber der Literatur deutlich erhöhten Konzentration von 25 μ M gegenüber 1 μ M AG490, die bei der konstitutiven Jak2-Phosphorylierung in G₂-Leukämiezellen zu einer vollständigen Inhibition führten, nicht beobachtet.

Bei der GAS-Inhibition konnte eine IC_{50} für AG490 zwischen 50 – 60 μM bei Induktion mit 50 IU/ml $\text{IFN}\gamma$ über sechs Stunden ermittelt werden (siehe Abb. 3.2.7, Abb. 3.2.8). Interessanterweise findet bei der Induktion des ISRE-Promotors mit $\text{IFN}\gamma$ in einer Konzentration von 50 μM AG490 keine Repression der Expression statt. Zum einen wird die Vergleichbarkeit aber dadurch erschwert, dass es sich bei der Betrachtung des ISRE-Konstrukts um eine andere stabil transfizierte Zelllinie handelt (HepG2 anstatt A549), zum anderen ist nicht ganz klar, inwiefern es sich bei dem Phänomen einer stärkeren Induktion des transfizierten ISRE-Promotor-Luciferase-Konstrukts durch $\text{IFN}\gamma$ (siehe Abb. 3.1.3), anstatt wie erwartet durch TypI-Interferone, um ein Artefakt des Promotorkonstruktes an sich handelt. Weiterhin befindet man sich bei einer Konzentration um 50 μM AG490 nicht mehr in dem Bereich für den die Spezifität der Inhibition der Jak2-Phosphorylierung beschrieben wurde. Zöge man dennoch die Möglichkeit einer Inhibition der $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten GAS- nicht aber der ISRE-Induktion durch eine spezifische Jak2-Inhibition in Betracht, stellte sich die interessante Frage (vergleiche Abb. 1.1.1), inwieweit die Aktivierung eines Stat-Mediatorkomplexes durch $\text{IFN}\gamma$ trotz Jak2-Inhibition kompensiert werden kann.

Zusätzlich zur Inhibition der Jak2-Kinase-Aktivierung (Meydan, Grunberger *et al.* 1996) wurde eine Inhibition der Jak3-Autophosphorylierung (Kirken, Erwin *et al.* 1999) und eine Inhibition einer in bestimmten Tumoren auftretenden konstitutiven Stat3-Aktivierung (Nielsen, Kaltoft *et al.* 1997; Eriksen, Kaltoft *et al.* 2001) durch AG490 beschrieben.

Beim dritten getesteten Inhibitor, mit dem Literaturangaben zufolge eine spezifische $\text{IFN}\gamma$ -Inhibition erzielt wird, handelt es sich um Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) (Menegazzi, Tedeschi *et al.* 2001). Die publizierte IC_{50} von 5 – 10 μM ist dabei nahe an den Blut- und Gewebekonzentrationen, die für EGCG nach dem Konsum einiger Tassen grünen Tees erreicht werden und spiegelt gleichzeitig das Fehlen unerwünschter Nebenwirkungen *in vivo* wider. Für starke Konsumenten grünen Tees kann die Dosis an EGCG 1 g pro Tag erreichen (WHO-Angaben). Im GAS-Induktionstest verringerte EGCG die Luciferase-Expression mit einer IC_{50} von etwa 30 μM (siehe Abb. 3.2.10). Menegazzi *et al.* haben festgestellt, dass die IC_{50} der $\text{IFN}\gamma$ -induzierten Stat1-Aktivierung in Abhängigkeit von der Zellart sehr variabel ist. Für MDA MB 468 und HeLa ermittelten sie 10 μM , für MCF7 20 μM , und für HepG2-Zellen 50 μM . Weiterhin wurde die Spezifität der Stat1-Inhibition gegenüber der IL-6-induzierten Stat3-Aktivierung beschrieben. Im Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierungstest wurde die beschriebene vollständige Inhibition durch EGCG nur in hohen Konzentrationen von 1 mM festgestellt. Im antiviralen Primärttest zeigte sich durch EGCG ebensowenig eine Aufhebung der $\text{IFN}\gamma$ -Wirkung wie im *pias1*-Promotor-Luciferase-Repressionstest (siehe Abb. 3.2.12).

Die verbleibende IFN γ -Aktivität kumuliert bei einer kontinuierlichen Stimulation über einen Zeitraum von 24 h möglicherweise zu einer hinreichenden Aktivierung der entsprechenden biologischen Antwort. Bei einer Verlängerung der Testdauer von 6 h (GAS-Induktionstest) auf 24 h (antiviraler Assay, *pias1*-Promotor-Luciferase-Repressionstest) könnte auch eine Inaktivierung der Testsubstanz stattfinden, so dass die inhibierende EGCG-Konzentration unterschritten wird. Chan *et al* zeigten allerdings eine Inhibition der IFN γ /LPS-induzierten NO-Produktion durch 10 μ M EGCG um 86% noch über eine Testdauer von drei Tagen auf murine Peritoneal-Zellen (Chan, Ho *et al.* 1995).

Als ein weiterer mutmaßlich unspezifischer Kinase-Inhibitor pflanzlichen Ursprungs wurde das Quercetin gewählt. Es bildet etwa 5% des mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoidanteils und wird unter anderem im Zusammenhang mit dem „Französischen Paradoxon“ genannt. Es handelt sich dabei um eine geringere Inzidenz für koronare Herzerkrankungen bei einer gleichzeitig sehr fetthaltigen Ernährung (Soleas, Diamandis *et al.* 1997; Lissin and Cooke 2000). Als ein Erklärungsansatz wurde als ein signifikanter Ernährungsunterschied der mediterranen Bevölkerung ein moderater Rotwein-Konsum angesehen (Boffeta, p 342-348, gaziano, jm 1829-1834). Als wirksame Komponenten des Rotweins wurden neben Quercetin verschiedene Komponenten wie auch das Resveratrol (siehe Kapitel 3.4) und sogar Ethanol (Baum-Baicker 1985) beschrieben. Für Quercetin wurden auch anti-inflammatorische, antivirale, Anti-Tumorwirkungen und viele weitere ermittelt. Als wichtige Wirkprinzipien werden dabei die Modulation des Redoxstatus und die Inhibition von Proteinkinasen genannt (Bito, Roy *et al.* 2002).

Im GAS-Induktionstest zeigte sich bei Stimulation mit 100 IU/ml eine IC₅₀ von etwa 12,5 μ M (siehe Abb. 3.2.14). Die IC₅₀ liegt für Quercetin damit niedriger als bei den drei oben beschriebenen „spezifischen“ Inhibitoren AG490, Trichodion und EGCG. Es zeigte sich in dieser Konzentration kein zytotoxischer Effekt. Im Gegenteil schien eine geringfügige Steigerung der zellulären Vitalität, bzw. der gemessenen mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität, bei 12,5 μ M in dem verwendeten MTS-Reduktionstest nach 40 h aufzutreten. Im *pias1*-Promotor-Luciferase-Repressionstest zeigte sich eine IC₅₀ der Inhibition der IFN γ -vermittelten Abnahme der Luciferase-Expression von ebenfalls 12,5 μ M. Eine vollständige Inhibition des IFN γ -Signals durch Quercetin wurde nicht gemessen (siehe Abb. 3.2.16). Dies spricht dafür, dass in höheren Konzentrationen die unspezifische Inhibition überwiegt.

Neuere Untersuchungen des mittleren Quercetin-Plasmaspiegels im Menschen ergaben 5 μM nach Verzehr von Quercetin-Glukosiden (Olthof, Hollman *et al.* 2000). In diesen Konzentrationsbereichen wurde an A549-Zellen im GAS-Induktions- und im *pias1*-Promotor-Luciferase-Repressionstest eine signifikante Inhibition der $\text{IFN}\gamma$ -Antwort gezeigt (siehe Abb. 3.2.14; Abb. 3.2.16).

Im Zusammenhang mit einer Vielzahl beschriebener Quercetin-Wirkungen ist der Einfluss der vorgefundenen Inhibition auf komplexe immunologische Erkrankungen schwer abschätzbar. Kürzlich wurde berichtet, dass Quercetin eine Steigerung der $\text{IFN}\gamma$ - sowie eine Inhibierung der IL-4-Produktion bewirkt (Singh, Seth *et al.* 2002). Ebenso wurde berichtet, dass in humanen Keratinozyten Quercetin die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte ICAM-1-Expression inhibiert (Bito, Roy *et al.* 2002).

Das als Breitband-Kinase-Inhibitor untersuchte Staurosporin zeigte im GAS-Induktionstest verglichen mit anderen Proteinkinasen (siehe Tab. 3.2.2) eine relativ hohe IC_{50} von 25 bis 50 nM. Eine Aufhebung des IFN -vermittelten Virusschutzes ließe sich somit nur in Zusammenhang mit einer Inhibition weiterer für die Zellregulation vitaler Kinasen erreichen. Der parallele Verlauf zwischen der Zytotoxizität und der anti- IFN -Wirkung stützt diese Interpretation (siehe Abb. 3.2.19).

Da zum einen Dithranol in der Behandlung der Psoriasis eingesetzt wird, zum zweiten die Entwicklung der Schuppenflechte besonders mit $\text{IFN}\gamma$ in engem Zusammenhang zu stehen scheint und zum dritten Dithranol als Kinase-Inhibitor bekannt ist, wurde es hier auf seine Wirkung im GAS-Induktionstest untersucht. Es ergab sich eine relativ niedrige IC_{50} von 500 nM. Bei dieser Konzentration wurde im MTT-Reduktionstest auch über einen längeren Zeitraum von drei Tagen keine Zytotoxizität/Antiproliferation festgestellt.

Die Psoriasis gehört zu den häufigsten Hautkrankheiten (12% der Bevölkerung). Die Veranlagung zur Psoriasis wird multifaktoriell vererbt. Auslöser einer Schuppenflechte-Manifestation können beispielsweise Infektionen und Verletzungen sein. Es wurde jedoch auch eine Ausbildung der Psoriasis durch eine $\text{IFN}\alpha$ -Therapie beschrieben (Taylor, Burns *et al.* 2000).

Bonnekoh *et al.* zeigten eine Betrachtung zur Wirkweise des Dithranol gegen Psoriasis. Diese bezieht sich auf das Zytokeratin 17, welches in psoriatischen Plaques durch das dort in stark erhöhten Konzentrationen gemessene $\text{IFN}\gamma$ induziert wird.

Ein Epitop des Zytokeratin 17 wurde als mögliches Autoantigen beschrieben (Gudmundsdottir, Sigmundsdottir *et al.* 1999), welches womöglich über autoreaktive T-Zellen zur Inflammation und Hyperproliferation führt. Durch die dadurch erhöhte IFN γ -Produktion wird wiederum die Induktion des Zytokeratin 17 bewirkt.

Eine Inkubation mit der untoxischen Dithranol-Konzentration von 300 nM vor IFN γ -Stimulus führte zu einer signifikanten Verringerung der Zytokeratin 17-Expression (Bonnekoh, Bockelmann *et al.* 2001).

4.5 Viele Wirkungen - ein Extrakt: Das Beispiel *Rheum palmatum*

Als Beispiel der extrahierten Medizinalpflanzen wurde nach Feststellung einer moderaten antiviralen Potenz (siehe Abb. 3.4.1) das *Rheum*-Extrakt weiter analysiert. In hohen Konzentrationen zeigten auch andere hergestellte Extrakte eine antivirale Wirkung. Der Konzentrationsbereich zwischen antiviraler und zytotoxischer Konzentration war jeweils gering.

Bei der Analyse des antiviralen Wirkmechanismus des *Rheum*-Extraktes zeigte sich an Stelle einer Stat1-Induktion eine Inhibition der IFN γ -vermittelten Stat1-Aktivierung (siehe Abb. 3.4.4). Diese Inhibition zeigte sich auch bei der GAS-Induktion. Bei der Klärung der Spezifität der anti-IFN γ -Wirkung des *Rheum*-Extraktes zeigte sich jedoch eine unspezifische Inhibition der Tyrosinkinase nach ligandenunabhängiger Pervanadat-Stimulation (siehe Abb. 3.4.5). Auch die Inhibition des VSV-induzierten *ifn β* -Promotor-Konstrukts deutete auf eine unspezifische Inhibition hin. Auffallend war eine deutliche Induktion des untersuchten GAS-Promotors bei höheren *Rheum*-Verdünnungen.

Um die Frage der molekularen Mechanismen zu klären, wurde das *Rheum*-Extrakt anhand der Inhibition der Stat1 vermittelten Stat1-Aktivierung zunächst grob und dann freundlicherweise vollständig von der AG Laatsch bis zu den Reinsubstanzen fraktioniert. Dabei zeigten eine Vielzahl von Kinase-Inhibitoren wie das Antrachinonderivat Emodin, das Dithranol und die Stilben-Derivate Rhapontigenin, Resveratrol und Piceatannol eine Inhibition der Stat1-Aktivierung nach IFN γ -Stimulus.

Die Glukoside sowohl der Anthrachinon-, als auch der Stilben-Derivate zeigten in vergleichbaren Konzentrationen keine Kinase-Inhibition. Da dieser Test in einem zellulären System stattfindet, sind neben der Eigenschaft als Kinase-Inhibitor zusätzliche Faktoren wie die Zellpermeabilität relevant. Eine verringerte Aktivität der Glukosid-Derivate wurde für die Inhibition der NO-Produktion LPS aktivierter Makrophagen beschrieben (Matsuda, Kageura *et al.* 2000). Eine neuere Untersuchungen des *Rheum palmatum*-Extraktes auf die NO-Produktion an LPS aktivierten Makrophagen bestätigte die Inhibition mit IC₅₀-Werten für Emodin und Rhein um die 60 μ M (Wang, Huang *et al.* 2002).

Bei einer Untersuchung der IC₅₀ der Stilbenderivate Rhapontigenin, Resveratrol und Piceatannol im sensitiveren GAS-Inhibitionstest ergab sich für alle drei Substanzen eine Konzentration zwischen 50 und 100 μ M (siehe Abb. 3.4.13).

Bei der Spezifitätsprüfung über die IFN-unspezifische Pervanadat-induzierte Tyrosinphosphorylierung zeigte sich für Rhapontigenin und Resveratrol in einer Konzentration von 250 μM , die im GAS-Induktionstest zu einer vollständigen Inhibition führte, keine Inhibition. In einer Konzentration von 250 μM wurde jedoch auch keine Inhibition der Stat1-Phosphorylierung beobachtet, so dass eine Inhibition der GAS-Induktion auf einem anderen Mechanismus als der Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierungsinhibition zu beruhen scheint. Piceatannol inhibierte die IFN γ -induzierte Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung auch in hohen Konzentrationen (750 μM) kaum. Gleichzeitig wurde die Pervanadat-stimulierte allgemeine Tyr-Phosphorylierung stark inhibiert. Anhand der antiviralen Antwort wurde für die Stilben-Derivate keine spezifische anti-IFN γ -Aktivität nachgewiesen.

Bei der Betrachtung der Wirkung auf die allgemeine Proteinsynthese am Beispiel der *CMV*-promovierten Luciferase-Expression wurde keine Verringerung nach Maßgabe der geringeren Vitalität beobachtet (siehe Abb. 3.4.13), sondern eine konzentrationsabhängige weitere Induktion festgestellt (Abb. 3.4.14). Diese unterschied sich jedoch sowohl im Ausmaß, als auch in der fehlenden Spezifität von der Induktion durch Cosmomycin B (Abb. 3.5.13). Die Steigerung der Luciferase-Expression war zudem nicht an die für die Inhibition der GAS-Induktion essenziellen Hydroxylgruppen gekoppelt, sondern zeigte sich auch bei Stimulation durch das unsubstituierte Stilben. Ebenso war es nicht auf eine konstitutive Expression beschränkt, sondern zeigte sich auch, wie am Beispiel des Resveratrol gezeigt (Abb. 3.4.15), beim GAS-Induktionstest mit und auch ohne Stimulation durch IFN γ . Dieser Stimulationseffekt verstärkte sich mit einer verlängerten Inkubationszeit, welche für diese Messung von 6 h auf 43 h verlängert wurde. Bei 100 μM überwog die Inhibition der IFN γ -Aktivierung um über 50 %. Bei niedrigeren Konzentrationen Resveratrol trat eine Steigerung der Luciferasemenge mit einem Maximum bei 12,5 μM auf. Dieser Induktionseffekt trat ebenso bei den Stilbenderivaten Piceatannol und Rhapontigenin auf und erklärt die beim *Rheum*-Extrakt vorgefundene Aktivität in höheren Verdünnungen (1:16.000, siehe Abb. 3.4.4).

In der Literatur wurde die Aktivierung eines Luciferasereporterkonstruktes durch das „Phytoestrogen“ Resveratrol über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor geschildert und als spezifische Induktion beschrieben (Amakura, Tsutsumi *et al.* 2003). Hinweise auf entsprechend spezifische Genregulation geben zwei Untersuchungen des veränderten Genexpressionsmusters durch Resveratrol über *cDNA-Microarrays*.

Für eine humane Krebszelllinie des Eierstockes (PA-1) zeigten bei einer Resveratrolkonzentration von 50 μM 118 der 7.448 untersuchten Gene (1,6%) eine mehr als zweifache Änderung ihrer Expression (Yang, Kim *et al.* 2003).

Für die Prostata-Krebszelllinie LNCaP zeigte Resveratrol in einer Konzentration von 10 μM eine Herabregulierung für das prostatata-spezifische Antigen (PSA), den Androgen-Rezeptor-Koaktivator ARA24 und NF- κB . Diese wurde durch RT-PCR, Westernblot und Immunfluoreszanalysen bestätigt. Verstärkt exprimiert wurden p53, p16, p21(Waf1-Cip1), p300/CBP und Apaf-1. Der Effekt auf p300/CBP wird dabei als besonders wichtig für den krebspräventiven Mechanismen von Resveratrol auf LNCaP-Zellen angesehen (Narayanan, Narayanan *et al.* 2003).

Gegen eine spezifische Rolle einer Resveratrol-medierten GAS-Induktion spricht zum einen, dass die gesteigerte Luciferase-Expression auch unter dem *CMV*-Promotor beobachtet wurde und zum anderen, dass für Resveratrol keine IFN-analoge Aktivierung der Antiviralität ermittelt wurde. Die antivirale Aktivität des *Rheum*-Extraktes könnte hingegen auf der ermittelten und beschriebenen Wirkung des Emodin beruhen. Beim Vergleich von antiviraler und zytotoxischer Wirkung zeigt sich beim *Rheum*-Extrakt allerdings ein etwas deutlicher ausgeprägter Schutz, der vermuten lässt, das Emodin eine wichtige, aber möglicherweise nicht die einzige antiviral wirkende Substanz war.

Der zunächst widersprüchliche Befund einer antiviralen und zugleich IFN-inhibierenden sowie einer im GAS-Induktionstest inhibierenden und in höherer Verdünnung aktivierenden Wirkung des *Rheum palmatum*-Extraktes ließe sich bei Betrachtung der Reinsubstanzen aufklären. Es konnte im GAS-Induktionstest eine Inhibition durch das Stilbenderivat Rhapontigenin in einer Konzentration bis 100 μM und eine Stimulation bei einer Konzentration um 10 μM sowie eine antivirale Wirkung des Anthrachinonderivats Emodin ermittelt werden.

4.6 Promotor-Luciferase Reporterkonstrukte

Das Beispiel des *huifn* β -Promotors zeigt, dass die Kombination aus einem geeigneten Promotor und einem geeigneten Reporter gen ein Messsystem bildet, welches in miniaturisierter Form zum Screening auch großer Substanzbibliotheken geeignet ist.

Da es sich beim *ifn* β -Promotor um ein durch eine Vielzahl an viralen Agenzien induzierbares und bereits ausgiebig charakterisiertes Regulationselement handelt, wurde es als Kontrolle für die induzierte Expression der Reporterproteine verwendet. Eine Induktion des Fluoreszenzsignals nach Transfektion des Konstruktes *ifn* β -Promotor-EGFP oder der β -Galaktosidasenachweis nach Transfektion des Konstruktes *ifn* β -Promotor-*lacZ* waren im 96-well-Format nach Virusstimulation als Messsystem nicht sensitiv genug.

Das *ifn* β -Promotor-Luciferase-Konstrukt hingegen erreichte durch *Vaccinia*-Virus-Stimulation einen Induktionsfaktor größer als 1.000. Dieses System ist zum Screening selbst durchaus geeignet, da eine spezifische Induktion von IFN β als Zielgröße sowohl bei virologischen und onkologischen Erkrankungen als auch bei der Multiplen Sklerose erwünscht ist. Dennoch diente dieses Konstrukt in der vorliegenden Arbeit in erster Linie als eine Kontrolle für die Tauglichkeit und Handhabbarkeit eines miniaturisierten Screeningansatzes in Hinblick auf die Erstellung eines humanen *pias1*- und eines *socs1*-Promotor-Reporter gen-Konstruktes zur weiteren Suche nach IFN γ -Antwort-Modulatoren.

4.6.1 Pias1

Die Klonierung des putativen humanen *pias1*-Promotors führte zu der erwarteten konstitutiven Luciferase-Expression. Eine Induktion durch TypI oder TypII-Interferone dieses Promotor-Konstruktes wurde nicht beobachtet. Im Gegenteil wurde konzentrationsabhängig eine Repression der Expressionsleistung spezifisch durch IFN gegenüber weiteren getesteten Zytokinen wie IL-6, IGF-I, IGF-II oder den TLR-Induktoren LPS und pIC festgestellt.

Die Suche nach einem IFN-spezifischen Repressorelement über verkürzte *pias1*-Promotorkonstrukte zeigte, dass die Repression auch noch mit einer 50 bp-Sequenz *upstream* vom Translationsstartcodon bei einer bereits drastisch reduzierten konstitutiven Expression auftrat. Um zu untersuchen, ob es sich bei der Repression um ein IFN-spezifisches aber Promotor-unspezifisches Messsignal handelt, wurde der *CMV*-Promotor analog dem *pias1*-Promotor vor das Luciferase-Reporter gen kloniert. Auch hier wurde eine IFN-induzierte Repression beobachtet.

Die Regulation kann theoretisch vor, nach oder zwischen transkriptionaler und translationaler Ebene erfolgen. Das Phänomen IFN-reprimierter Reporterkonstrukte ist in der Literatur überwiegend als promotorspezifisch beschrieben. In diesem Fall würde diese sowohl auf den *CMV*-Promotor, als auch die *pias1*-Promotorfragmente wirken.

Eine spezifische IFN-vermittelte Repression des *CMV*-Promotors wäre als weiterer antiviraler Mechanismus denkbar. Unter dieser Hypothese testeten Griboudo *et al* den murinen *CMV*-Promotor auf IFN-Repression (Griboudo, Ravaglia *et al.* 1993). Sie fanden heraus, dass die *immediate early* Gentranskription gegenüber der nicht reprimierten β -*aktin*-mRNA-Synthese sowohl durch IFN α als auch durch IFN γ um etwa den Faktor fünf reduziert wurde. Dabei wurden Aufnahme und Transport der viralen DNA in den Nukleus nicht gehemmt. Die Repression wiesen sie auch anhand eines *CMV*-CAT-Reporterkonstrukts nach. Deletionsmutanten für dieses Konstrukt führten jedoch nicht zu einer Identifizierung der für die Interaktion essenziellen Elemente. Als Kontrolle wurde ein virales SV40-Promotor-CAT-Konstrukt auf IFN-Sensitivität geprüft, wobei Griboudo *et al* keine IFN-vermittelte Repression feststellten.

Eine weitere Untersuchung einer IFN γ -medierten Reporter-genrepression (Ghazizadeh, Carroll *et al.* 1997) beschreibt eine um 75-80% verringerte Konzentration der *lacZ*-mRNA nach 16 h und der β -Galaktosidase-Konzentration nach 24 h. Die Beobachtung wurde zunächst an transduzierten Fibroblasten unter einem viralen Promotor nach IFN γ -Behandlung gemacht. Auch beim Austausch des viralen Promotors gegen einen eukaryotischen wurde die IFN-vermittelte Verringerung der *lacZ*-mRNA-Konzentration ermittelt. Die Inhibierbarkeit durch Cycloheximid zeigte, dass dieser Effekt über eine Proteinneusynthese ausgeübt wurde. Durch „Nuclear-Runoff“-Tests, welche zeigten, dass keine Verringerung der mRNA-Synthese durch IFN γ auftrat, wurde die Repression zudem als posttranskriptional erkannt. Am Beispiel des β -*aktins* wurde gezeigt, dass die zelluläre mRNA-Synthese durch IFN γ nicht inhibiert wurde. Die Spezifität der mRNA-Herabregulierung bei den transfizierten Konstrukten erklärten Ghazizadeh *et al* über die gemeinsamen 3'UTR-Sequenzen viralen Ursprungs.

Hammerling *et al* beschrieben ein GFAP(*glial fibrillary acidic protein*)-Promotor-*LacZ*-Reporterkonstrukt, welches stabil in eine humane Glioblastoma-Linie transfiziert wurde. Durch IFN γ trat über 30 h eine Inhibition mit einer IC₅₀ von 0,38 IU/ml (0,19 ng/ml) ein (Hammerling, Bongcam-Rudloff *et al.* 1998). Andere Stimuli wie die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, G-CSF, GM-CSF sowie die Mitogene Insulin, Somatotropin, EGF und Substanz P zeigten keine Repression.

TNF α hingegen zeigte eine Repression mit einer IC₅₀ von 100 pM. Dies entspricht einer 100-fachen molaren Konzentrationserhöhung gegenüber IFN α und einer 10-fachen gegenüber IFN γ . Hammerling *et al* vermuteten eine reprimierte GFAP-Genexpression als IFN/TNF α -vermittelten Immunmodulationseffekt in Glia-Zellen.

Übereinstimmendes Motiv bei den in der Literatur beschriebenen (Ghazizadeh, Carroll *et al.* 1997) und der im Rahmen der Doktorarbeit klonierten Reporterkonstrukte sind virale 3'UTRs, die der Reporter-mRNA gleichsam als Marker viraler Herkunft angefügt sind. Ein mit den bisherigen Beobachtung in Einklang stehender Erklärungsansatz ist eine IFN-induzierte Herabregulierung der als viral erkannten mRNA. Ein derartiger Mechanismus stünde in Analogie zur antiviralen Wirkung der IFN-induzierbaren dsRNase. Experimentell ließe sich das Vorhandensein eines derartigen Mechanismus durch Austausch gegen eine eukaryotische 3'UTR überprüfen.

Für weitere Untersuchungen der IFN γ -Antwort war die IFN-vermittelte Inhibition der *pias1*-Promotor-Luciferase-Expression ein wertvoller zusätzlicher Test, der sowohl eine akkurate IFN-Quantifizierung (siehe Abb. 3.7.10), als auch die Detektion einer anti-IFN γ -Wirkung (siehe Abb. 3.2.16) ermöglichte. Während der *pias1*-Luciferase-Repressionstest zur IFN-Quantifizierung mit dem GAS-Induktionstest vergleichbar war, wurde bei der Suche nach anti-IFN γ -aktiven Substanzen durch die Inhibition der Repression das Wiederherstellen des konstitutiven Signals erfasst. Dadurch läßt sich im Gegensatz zum antiviralen und zum GAS-Induktionstest die zytotoxische von der anti-IFN γ -Aktivität trennen.

Bei Betrachtung der IFN-unabhängigen Expression der *pias1*-Promotor-Varianten zeigte sich eine starke Verringerung der konstitutiven Luciferase-Expression durch ein 142 bp langes Promotorfragment. Dieses putative Repressorelement enthielt bei einer *in silico*-Analyse keine Bindeelemente für reprimierende Transkriptionsfaktoren. Eine weitergehende molekularbiologische Analyse des putativen konstitutiven Repressorelements wurde nicht durchgeführt.

Da sich für den *pias1*-Promotor keine Aktivierung durch Interferone nach dem Muster des *socs1* zeigen ließ, wurde als weitere Regulationsebene der Einfluss der IFN-Stimulation auf die Lokalisation und Menge des Pias1-Proteins untersucht. Die unveränderte nukleäre Lokalisation des Pias1 wurde im Westernblot gezeigt (siehe Abb. 3.7.11). Die auf Ebene des *pias1*-Promotors im Luciferase-System vorgefundene Repression durch IFN γ wurde auf Proteinebene nicht beobachtet.

Obwohl mit dem Western-Blot nur große Veränderungen der Pias1-Konzentration erfasst werden konnten, zeigte diese Untersuchung, dass auf Proteinebene weder die Reduktion um 50% (siehe Luciferase-Expression) noch eine deutliche Zunahme nach IFN γ -Stimulus stattfand. Dies deutet darauf hin, dass ein negativer Rückkopplungsmechanismus nach Beispiel des Socs1 in A549-Zellen nicht stattfindet.

Als weiterer möglicher Regulationsmechanismus einer IFN-vermittelten Inhibierung der IFN γ -Aktivität sollte der Phosphorylierungsstatus des Pias1 untersucht werden. Dazu wurden Zelllysate nach Pervanadat- und nach IFN γ -Stimulus über eine selektiv nur phosphorylierte Proteine bindende Säule getrennt (siehe Abb. 3.7.14). Nach beiden Stimuli band Pias1 an die Säule. Dies ließe sich jedoch sowohl durch eine Phosphorylierung des Pias1 selbst, als auch durch die Assoziation mit dem aktivierten phosphorylierten Stat1 erklären (Liu, Liao *et al.* 1998).

Ein weiterer Regulationsmechanismus, für den allerdings eine verringerte Pias1-Assoziation beschrieben wurde, ist die Arg³¹-Methylierung. Eine Verringerung der Ansprechbarkeit einiger Tumorzellen auf die antiproliferative Wirkung der TypI-Interferone wurde durch eine erhöhte MTA-Konzentration erklärt. MTA führt zur Inhibition der PRMT1 und somit zur Inhibition der Stat-Arg³¹-Methylierung. Die Arg³¹-Methylierung bewirkt im Gegensatz zur Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung eine verringerte Assoziation des Stat1 mit dem Pias1. Für MTA wurde dieser Weg der Repression am TypI-IFN-Signal gezeigt (Mowen, Tang *et al.* 2001). Für die TypII-Signaltransduktion wurde diese Wirkung des MTA bisher nicht beschrieben.

Analog zur publizierten Inhibition der TypI-IFN-induzierten ISRE-Induktion inhibierte MTA auch die IFN γ -induzierte GAS-Induktion in untoxischen Konzentrationen von 200 und 400 μ M (siehe Abb. 3.7.16). Dies ist ein Indiz für eine zum TypI-IFN analoge Verringerung der Pias1-Stat1-Assoziation bei fehlender Arg³¹-Methylierung des Stat1 auch für den IFN γ -Signalweg. Dieser Mechanismus könnte dem Pias1 demnach eine Kontrollfunktion vollständig aktivierter Stat1 an Stelle eines induzierbaren Abschaltmechanismus zuschreiben.

4.6.2 Socs1 Promotor

Entsprechend den Promotoren für *pias1* und *ifn β* wurde die *upstream*-Sequenz des *socs1*-Gens (2 kbp vom Translationsinitiationsstartcodons) vor das *luciferase*-Gen als Reporter kloniert. Anders als in der Literatur beschrieben (Saito, Morita *et al.* 2000) zeigte sich eine relativ geringe Induktion durch IFN und eine stärkere Induktion durch TypI als durch TypII-IFN. Um den Einfluss zweier unterschiedlicher in der Literatur für den murinen *socs1*-Promotor beschriebener reprimierender Regulationselemente auf die geringe Induzierbarkeit zu untersuchen, wurden um diese Regulationselemente verkürzte Promotorkonstrukte erstellt. Die Induzierbarkeit wurde in A549-Zellen untersucht.

Jegalian und Wu (Jegalian and Wu 2002) haben beschrieben, dass kleinere Promotorfragmente eines murinen Socs1-Luciferase-Reporters eine höhere Aktivität aufwiesen als größere. Sie schlossen daraus auf mögliche Repressoren *upstream* vom proximalen Promotor. Für das als Repressor der Transkription bekannte *Growth factor independence1*-Zinkfinger-Protein Gfi-1B wurden *in silico* Bindeelemente ermittelt. Auch im humanen Promotor finden sich *in silico* diese Gfi-Bindeelemente (siehe Abb. 3.7.18). Für eine einzelne oder gekoppelte Substitution der Bindungsstellen wurde eine Steigerung der Transkription um den Faktor 2,2 bis 3,1 beschrieben (Jegalian and Wu 2002). Die relativ großen Entfernungen der Gfi-1B-Bindungsstellen von den entsprechenden Transkriptionsstartstellen von 1,5 kb beim p21^{Waf1}, 0,8 - 0,9 kb beim Socs1 und 2,1 kb beim Socs3 wurden als Hinweis auf eine Assoziation mit einer komplexen *Silencer*-Region gewertet.

Als weiteren Mechanismus, der zu einer geringeren Proteinexpression führte, charakterisierten Gregorieff *et al* die Rolle der 5'UTR des murinen *socs1* und stellten eine Verringerung der Translationseffizienz um den Faktor 17 fest (Gregorieff, Pyronnet *et al.* 2000)(siehe Kapitel 1.5). Dies weist darauf hin, dass posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen im Reportersystem womöglich durch das Reporter-gen/protein nicht oder sogar falsch repräsentiert werden (siehe hypothetische Rolle der viralen 3'UTR).

Die für den murinen *socs1*-Promotor an murinen Gfi-1B-exprimierenden Zellen ermittelte Repression durch die Gfi-Bindeelemente wurde für den humanen *socs1*-Promotor in A549-Zellen nicht festgestellt (siehe Abb. 3.7.22).

Die Expression der Transkriptionsfaktoren Gfi-1 und Gfi-1B in A549-Zellen ist dabei für die Beurteilung einer analogen Repression zwischen murinem und humanem *socs1*-Promotor entscheidend. Eine Gfi-1- und Gfi1B-Expression wurde hauptsächlich für hämatopoetische Zellen beschrieben (Tong, Grimes *et al.* 1998). Die Untersuchung der humanen Promotorvarianten in Gfi-1/Gfi-1B exprimierenden Zellen oder der Expressionsnachweis von Gfi-1/Gfi-1B in A549-Zellen sind zur Klärung notwendig.

Einen erkennbaren Einfluss auf die IFN β -induzierte *socs1*-Promotor-Luciferase-Expression hatten die Gfi-Bindeelemente nicht. Auch die Entfernung der 5'UTR des humanen *socs1*-Promotors vermittelte keine Veränderung des Induktionsfaktors. Analog zur Entfernung der murinen 5'UTR zeigte sich auch für die humane ein deutlicher Anstieg der konstitutiven Luciferaseaktivität.

4.7 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die Suche nach spezifischen Modulatoren der IFN γ -Antwort ist in Hinblick auf eine Fülle an Erkrankungen bedeutsam. In dieser Arbeit wurden drei Proben identifiziert, welche im Primärscreening eine von der Zytotoxizität trennbare anti-IFN γ -Wirkung entfalteten. Bei der Charakterisierung zeigten diese Proben neben ihrer Wirkung gegen IFN γ auch unspezifische zelluläre Wirkungen in den entsprechenden Konzentrationsbereichen.

Die aus dem anti-IFN γ -aktiven Streptomycetenextrakt isolierte Substanz Cosmomycin B zeigte eine starke, gegenüber dem konstitutiven humanen *pias1*-Promotor selektive Induktion des konstitutiven viralen *CMV*-Promotors. Von Interesse wäre an dieser Stelle die Identifizierung der an der durch Cosmomycin B bewirkten Induktion beteiligten Bindeelemente und der entsprechenden Transkriptionsfaktoren. Eine Untersuchung der Wirkung von Cosmomycin B auf weitere konstitutive Promotoren könnte klären, ob es sich um eine differenzielle Induktion von viralen gegenüber eukaryotischen Promotoren handelt.

Wie die Verteilung der Trefferanzahl der im Primärscreening identifizierten Substanzen zeigt, spielt neben dem Testprinzip die Wahl eines geeigneten Probenguts eine entscheidende Rolle. So waren die aus Hämofiltrat gewonnenen Peptidfraktionen in diesem Testsystem inaktiv. Die Frage, ob der Test von Reinsubstanzen oder von Substanzpools, die ein Rohextrakt natürlicherweise darstellt, ergiebiger ist, ließ sich nicht beantworten. Beide Probenarten lieferten einen vergleichbaren Anteil gewünschter Aktivitäten im Primärassay.

Die im Primärscreening antiviral wirksamen Substanzen bewirkten weder eine Stat1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung, noch eine Induktion des IFN γ -spezifischen GAS-Promotors. Am Beispiel der Concanamycine läßt sich zeigen, dass theoretisch auch ohne eine IFN-vergleichbares Signal ein antiviraler, auch durch IFN induzierbarer Mechanismus aktiviert werden kann. Der Mechanismus der Streptorubin A-vermittelten Antiviralität zeigte weder eine experimentelle, noch eine theoretische Verbindung zum IFN-vermittelten Virusschutz.

Diese beiden Beispiele weisen darauf hin, dass bei der Suche nach selektiven Interferon-Antwort-Modulatoren als Reportersystem eine spezifischere zelluläre Antwort als die antivirale oft geeigneter ist. Als ein vergleichsweise direkter Nachweis der IFN γ -Aktivierung wurden A549-Zellen stabil mit dem GAS-Luciferase-Konstrukt transfiziert.

Der Spezifitätsvorteil wurde anhand der Medizinalpflanzen-Extrakte und weiterer Proben mariner Mikroorganismen deutlich. Diese hatten zum Teil in hohen Konzentrationen eine moderate antivirale Aktivität, bewirkten jedoch keine GAS-Induktion.

Ein weiteres sehr nützliches Testsystem zur Fortführung des Screenings auf IFN-Inhibitoren wurde aus den Erkenntnissen über das *pias1*-Promotor-Luciferase-Konstrukt entwickelt. Der Test auf eine Aufhebung der IFN-vermittelten Verringerung der Luciferaseaktivität ermöglicht die Trennung von anti-IFN γ -Aktivität und Zytotoxizität. Durch das Einsparen der Zytotoxizitätskontrolle wird dabei zum einen die Aktivitätsermittlung erleichtert und zum anderen ein höherer Probendurchsatz ermöglicht. Durch weitere Automatisierung ließe sich dieses Screeningsystem zudem vom 96-*well*- auf das 384-*well*-Format miniaturisieren. Damit könnte die wichtigste Limitierung des durchgeführten Screenings, nämlich die mit 1.000 Substanzen vergleichsweise geringe Probenanzahl durch eine entsprechende Erweiterung der Substanzbibliothek beseitigt werden.

Auch für das 2 kbp lange humane *socs1*-Promotorkonstrukt wäre ein Screening der bereits angelegten gegebenenfalls vergrößerten Substanzbibliothek eine denkbare Fortführung. Durch zusätzliche Regulationselemente stellt der *socs1*-Promotor eine Erweiterung gegenüber dem GAS- oder dem ISRE-Promotor dar. Die Wahrscheinlichkeit für die Identifizierung eines spezifischen *socs1*-Induktors, hängt zwar entscheidend von der Probenanzahl ab, läßt sich aber insgesamt nur schwer einschätzen. Die Suche nach *socs1*-Induktoren und somit eines wichtigen endogenen Abschaltmechanismus für eine IFN γ -Antwort weist wiederum den entscheidenden Vorteil auf (siehe IFN-reprimiertes *pias1*-Promotor-Konstrukt), dass die gesuchten Substanzen eine Induktion und zytotoxische eine Verminderung der Luciferase-Expression bewirken.

5 Zusammenfassung

Die gewählte Strategie zur Identifizierung von Modulatoren der IFN γ -Antwort über den Einfluss auf die antivirale Aktivität hat sich bei der Analyse von über 1.000 Proben als robust und reproduzierbar bewährt. Bei der Charakterisierung der aktiven Proben zeigten sich jedoch neben der Inhibition der IFN γ -Signaltransduktion auch IFN γ -unabhängige zelluläre Wirkungen. Durch ein neues Testprinzip, welches auf einer IFN γ -induzierten Repression der konstitutiv exprimierten Luciferase basiert, konnte dabei zwischen unspezifischer und IFN γ -spezifischer Repression unterschieden werden. Eine spezifische anti-IFN-Wirkung wurde in diesem System ebenfalls nicht festgestellt. Stattdessen zeigte sich für die Substanz Cosmomycin B eine spezifische und starke Induktion des *CMV*-Promotors.

Für die im Screening ermittelten antiviralen Substanzen wurde keine Induktion eines IFN γ -Signals ermittelt. Der Fall des Concanamycin zeigte dabei, dass auch ohne eine IFN γ -analoge Signalgebung gemeinsame antivirale Mechanismen aktiviert werden können.

Die zur Charakterisierung verwendeten Tests wurden zusätzlich mit bekannten Kinase-Inhibitoren durchgeführt. Dabei zeigten sich für die spezifischen Inhibitoren des Jak/Stat-Signalweges AG490 und Trichodion im GAS-Induktionstest gegenüber der Literatur deutlich erhöhte IC₅₀-Werte in den hier untersuchten A549-Zellen. Für EGCG steht die ermittelte IC₅₀ der GAS-Inhibition in Einklang mit publizierten Daten. Eine spezifische Inhibition der antiviralen Wirkung wurde für keine der drei Substanzen festgestellt. Am Beispiel des Breitband-Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin ließ sich der Zusammenhang einer unspezifischen GAS-Inhibition und einer gleichzeitigen Zytotoxizität ermitteln.

Bei der Analyse der konzentrationsabhängig zugleich antiviralen, Stat1-inhibierenden und GAS-induzierenden Eigenschaft des *Rheum*-Extraktes wurden die daraus isolierten Kinase-Inhibitoren auf ihre Spezifität untersucht. Auffallend war dabei das Verhalten des Stilbenderivats Rhapontigenin und seiner Strukturverwandten Piceatannol und Resveratrol, welche in höheren Konzentrationen mit einer IC₅₀ um 100 μ M die GAS-Induktion inhibierten und in niedrigen Konzentrationen um 10 μ M die GAS-promovierte Luciferase-Expression steigerten. Diese Induktion erfolgte unspezifisch und wirkte sich vergleichbar auf das konstitutive *CMV*-Promotor-Luciferase-Konstrukt aus.

Die Promotoren dreier Gene wurden als eine Erweiterung des Primärscreens auf den IFN-vermittelten antiviralen Schutzstatus kloniert. Die entsprechenden Genprodukte haben eine dem IFN γ in inflammatorischen Prozessen entgegengerichtete Wirkung. Ausgehend vom bereits gut charakterisierten *ifn β* -Promotor zur Systemetablierung wurden der humane *pias1*- und der *socs1*-Promotor vor eine Luciferase als Reporter gen kloniert und auf ihr Induktionsverhalten untersucht. Beim *pias1*-Promotorkonstrukt wurde dabei an Stelle einer Induktion durch Interferone eine Verringerung der Luciferase-Expression festgestellt. Diese scheint IFN-spezifisch jedoch promotorunspezifisch zu sein und wurde zur Entwicklung eines neuen Testsystems auf anti-IFN γ -aktive Substanzen genutzt.

Das humane *socs1*-Promotor-Luciferase-Konstrukt wurde als ein weiteres potenzielles Screeningsystem kloniert und zeigte neben einer Induzierbarkeit durch IFN γ den im murinen Modell beschriebenen Einfluss einer Repression durch die 5'UTR.

6 Literaturverzeichnis

- Alexander, W. S., R. Starr, *et al.* (1999). "SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine." Cell **98**(5): 597-608.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, *et al.* (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.
- Amakura, Y., T. Tsutsumi, *et al.* (2003). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using in vitro reporter gene assay." Biol Pharm Bull **26**(4): 532-9.
- Anderson, K. V. (2000). "Toll signaling pathways in the innate immune response." Curr Opin Immunol **12**(1): 13-9.
- Antonelli, G. (1995). "Antibodies to interferon in patients undergoing IFN therapy: an update." J Biol Regul Homeost Agents **9**(4): 123-31.
- Arakawa, T., T. P. Horan, *et al.* (1990). "Effect of amino-terminal processing by *Staphylococcus aureus* V-8 protease on activity and structure of recombinant human interferon-gamma." J Interferon Res **10**(3): 321-9.
- Arnason, B. G. (1999). "Treatment of multiple sclerosis with interferon beta." Biomed Pharmacother **53**(8): 344-50.
- Auernhammer, C. J., C. Bousquet, *et al.* (1999). "Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6964-9.
- Awad, M., V. Pravica, *et al.* (1999). "CA repeat allele polymorphism in the first intron of the human interferon-gamma gene is associated with lung allograft fibrosis." Hum Immunol **60**(4): 343-6.
- Bach, E. A., S. J. Szabo, *et al.* (1995). "Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets." Science **270**(5239): 1215-8.
- Bach, E. A., J. W. Tanner, *et al.* (1996). "Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells." Mol Cell Biol **16**(6): 3214-21.
- Baum-Baicker, C. (1985). "The health benefits of moderate alcohol consumption: a review of the literature." Drug Alcohol Depend **15**(3): 207-27.
- Bazzigher, L., J. Pavlovic, *et al.* (1992). "Mx genes show weaker primary response to virus than other interferon-regulated genes." Virology **186**(1): 154-60.
- Begitt, A., T. Meyer, *et al.* (2000). "Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10418-23.
- Ben-Asouli, Y., Y. Banai, *et al.* (2002). "Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR." Cell **108**(2): 221-32.
- Berg, K., M. B. Hansen, *et al.* (1990). "A new sensitive bioassay for precise quantification of interferon activity as measured via the mitochondrial dehydrogenase function in cells (MTT-method)." Apmis **98**(2): 156-62.
- Bito, T., S. Roy, *et al.* (2002). "Flavonoids differentially regulate IFN gamma-induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action." FEBS Lett **520**(1-3): 145-52.
- Blom, N., S. Gammeltoft, *et al.* (1999). "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites." J Mol Biol **294**(5): 1351-62.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature **411**(6835): 355-65.

- Bluyssen, A. R., J. E. Durbin, *et al.* (1996). "ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors." Cytokine Growth Factor Rev **7**(1): 11-7.
- Bonnekoh, B., R. Bockelmann, *et al.* (2001). "Dithranol and dimethylfumarate suppress the interferon-gamma-induced up-regulation of cytokeratin 17 as a putative psoriasis autoantigen in vitro." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol **14**(4): 217-25.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Branca, A. A. and C. Baglioni (1981). "Evidence that types I and II interferons have different receptors." Nature **294**(5843): 768-70.
- Bromberg, J. F., C. M. Horvath, *et al.* (1996). "Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7673-8.
- Brysha, M., J. G. Zhang, *et al.* (2001). "Suppressor of cytokine signaling-1 attenuates the duration of interferon gamma signal transduction in vitro and in vivo." J Biol Chem **276**(25): 22086-9.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Campbell, I. L., T. W. Kay, *et al.* (1991). "Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice." J Clin Invest **87**(2): 739-42.
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, *et al.* (1987). "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing." Cancer Res **47**(4): 936-42.
- Carvalho-Pinto, C. E., M. I. Garcia, *et al.* (2002). "Autocrine production of IFN-gamma by macrophages controls their recruitment to kidney and the development of glomerulonephritis in MRL/lpr mice." J Immunol **169**(2): 1058-67.
- Cavet, J., A. M. Dickinson, *et al.* (2001). "Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation." Blood **98**(5): 1594-600.
- Chan, M. M., C. T. Ho, *et al.* (1995). "Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production." Cancer Lett **96**(1): 23-9.
- Chang, Y. E. and L. A. Laimins (2000). "Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31." J Virol **74**(9): 4174-82.
- Chatterjee-Kishore, M., K. L. Wright, *et al.* (2000). "How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene." Embo J **19**(15): 4111-22.
- Chesler, D. A. and C. S. Reiss (2002). "The role of IFN-gamma in immune responses to viral infections of the central nervous system." Cytokine Growth Factor Rev **13**(6): 441-54.
- Chong, M. M., H. E. Thomas, *et al.* (2001). "gamma-Interferon signaling in pancreatic beta-cells is persistent but can be terminated by overexpression of suppressor of cytokine signaling-1." Diabetes **50**(12): 2744-51.
- Chung, C. D., J. Liao, *et al.* (1997). "Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3." Science **278**(5344): 1803-5.
- Coccia, E. M., G. Marziali, *et al.* (1995). "Cells resistant to interferon-beta respond to interferon-gamma via the Stat1-IRF-1 pathway." Virology **211**(1): 113-22.

- Colbere-Garapin, F., F. Horodniceanu, *et al.* (1981). "A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells." J Mol Biol **150**(1): 1-14.
- Crawford, J., M. Foote, *et al.* (1999). "Hematopoietic growth factors in cancer chemotherapy." Cancer Chemother Biol Response Modif **18**: 250-67.
- Dalton, D. K., S. Pitts-Meek, *et al.* (1993). "Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes." Science **259**(5102): 1739-42.
- Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr, *et al.* (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." Science **264**(5164): 1415-21.
- Davidson, N. J., S. A. Hudak, *et al.* (1998). "IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice." J Immunol **161**(6): 3143-9.
- de la Luna, S., I. Soria, *et al.* (1988). "Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker." Gene **62**(1): 121-6.
- Decker, T. (1997). "The molecular biology of type I interferons (gene activation, promoters, proteins induced)." Interferon Therapy in Multiple Sclerosis: 41-76.
- Deguchi, M., H. Sakuta, *et al.* (1995). "Exogenous and endogenous type I interferons inhibit interferon-gamma-induced nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in murine peritoneal macrophages." J Interferon Cytokine Res **15**(11): 977-84.
- Denny, P., S. Swift, *et al.* (1992). "An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein." Embo J **11**(10): 3705-12.
- Der, S. D., A. Zhou, *et al.* (1998). "Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15623-8.
- Derynck, R., D. W. Leung, *et al.* (1982). "Human interferon gamma is encoded by a single class of mRNA." Nucleic Acids Res **10**(12): 3605-15.
- Drose, S. and K. Altendorf (1997). "Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases." J Exp Biol **200** (Pt 1): 1-8.
- Drose, S., K. U. Bindseil, *et al.* (1993). "Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases." Biochemistry **32**(15): 3902-6.
- Duhe, R. J. and W. L. Farrar (1995). "Characterization of active and inactive forms of the JAK2 protein-tyrosine kinase produced via the baculovirus expression vector system." J Biol Chem **270**(39): 23084-9.
- Durbin, J. E., R. Hackenmiller, *et al.* (1996). "Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease." Cell **84**(3): 443-50.
- Ealick, S. E., W. J. Cook, *et al.* (1991). "Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma." Science **252**(5006): 698-702.
- Elenkov, I. J. and G. P. Chrousos (2002). "Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity." Ann N Y Acad Sci **966**: 290-303.
- Endo, T. A., M. Masuhara, *et al.* (1997). "A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases." Nature **387**(6636): 921-4.
- Eriksen, K. W., K. Kaltoft, *et al.* (2001). "Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: typhostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells." Leukemia **15**(5): 787-93.
- Erkel, G. (2000). "Trichodion, a new inhibitor of inflammatory signal transduction pathways from a Trichosporiella species." FEBS Lett **477**(3): 219-23.
- Estrov, Z., R. Kurzrock, *et al.* (1993). "Interferons, basic principles and clinical applications." Austin: Landes RG: 1-113.

- Eyles, J. L., D. Metcalf, *et al.* (2002). "Negative regulation of interleukin-12 signaling by suppressor of cytokine signaling-1." J Biol Chem.
- Farrar, M. A. and R. D. Schreiber (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." Annu Rev Immunol **11**: 571-611.
- Feng, X., A. L. Petraglia, *et al.* (2002). "Low expression of interferon-stimulated genes in active multiple sclerosis is linked to subnormal phosphorylation of STAT1." J Neuroimmunol **129**(1-2): 205-15.
- Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). "Human natural interferon-alpha producing cells." Pharmacol Ther **60**(1): 39-62.
- Fleischmann, W. R., Jr. and L. A. Schwarz (1981). "Demonstration of potentiation of the antiviral and antitumor actions of interferon." Methods Enzymol **79**(Pt B): 432-40.
- Frech, K., G. Herrmann, *et al.* (1993). "Computer-assisted prediction, classification, and delimitation of protein binding sites in nucleic acids." Nucleic Acids Res **21**(7): 1655-64.
- Fujita, T., S. Ohno, *et al.* (1985). "Delimitation and properties of DNA sequences required for the regulated expression of human interferon-beta gene." Cell **41**(2): 489-96.
- Fujita, T., L. F. Reis, *et al.* (1989). "Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 9936-40.
- Fujita, T., J. Sakakibara, *et al.* (1988). "Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements." Embo J **7**(11): 3397-405.
- Gajewski, T. F., S. R. Schell, *et al.* (1989). "Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets." Immunol Rev **111**: 79-110.
- Garotta, G., K. W. Talmadge, *et al.* (1986). "Functional antagonism between type I and type II interferons on human macrophages." Biochem Biophys Res Commun **140**(3): 948-54.
- Ghazizadeh, S., J. M. Carroll, *et al.* (1997). "Repression of retrovirus-mediated transgene expression by interferons: implications for gene therapy." J Virol **71**(12): 9163-9.
- Gil, M. P., E. Bohn, *et al.* (2001). "Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6680-5.
- Giordanetto, F. and R. T. Kroemer (2002). "Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7." Protein Eng **15**(9): 727-37.
- Giordanetto, F. and R. T. Kroemer (2003). "A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1)." Protein Eng **16**(2): 115-24.
- Goodbourn, S. and T. Maniatis (1988). "Overlapping positive and negative regulatory domains of the human beta-interferon gene." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(5): 1447-51.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5." Virology **54**(2): 536-9.
- Gray, P. W. and D. V. Goeddel (1982). "Structure of the human immune interferon gene." Nature **298**(5877): 859-63.
- Gregorieff, A., S. Pyronnet, *et al.* (2000). "Regulation of SOCS-1 expression by translational repression." J Biol Chem **275**(28): 21596-604.
- Gribaudo, G., S. Ravaglia, *et al.* (1993). "Interferons inhibit onset of murine cytomegalovirus immediate-early gene transcription." Virology **197**(1): 303-11.
- Gudmundsdottir, A. S., H. Sigmundsdottir, *et al.* (1999). "Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis?" Clin Exp Immunol **117**(3): 580-6.
- Hammerling, U., E. Bongcam-Rudloff, *et al.* (1998). "The beta-gal interferon assay: a new, precise and sensitive method." J Interferon Cytokine Res **18**(7): 451-60.

- Hardy, K. J. and T. Sawada (1989). "Human gamma interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes." J Exp Med **170**(3): 1021-6.
- Heinzel, F. P., R. M. Rerko, *et al.* (1994). "Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon." Infect Immun **62**(10): 4244-9.
- Hilton, D. J., R. T. Richardson, *et al.* (1998). "Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 114-9.
- Horvath, C. M. and J. E. Darnell, Jr. (1996). "The antiviral state induced by alpha interferon and gamma interferon requires transcriptionally active Stat1 protein." J Virol **70**(1): 647-50.
- Huang, S., W. Hendriks, *et al.* (1993). "Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor." Science **259**(5102): 1742-5.
- Hultgren, B., X. Huang, *et al.* (1996). "Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice." Diabetes **45**(6): 812-7.
- Ibarra-Sanchez, M. J., P. D. Simoncic, *et al.* (2000). "The T-cell protein tyrosine phosphatase." Semin Immunol **12**(4): 379-86.
- Irie-Sasaki, J., T. Sasaki, *et al.* (2001). "CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling." Nature **409**(6818): 349-54.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1987). "Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957." J Interferon Res **7**(5): 429-38.
- Jacobs, B. L. and J. O. Langland (1996). "When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA." Virology **219**(2): 339-49.
- Jander, S. and G. Stoll (2002). "Increased serum levels of the interferon-gamma-inducing cytokine interleukin-18 in myasthenia gravis." Neurology **59**(2): 287-9.
- Janeway CA, T. P. W. M., Capra JD (1999). "The Immune System in Health and Disease." New York: Garland **4th ed.**
- Jegalian, A. G. and H. Wu (2002). "Regulation of Socs gene expression by the proto-oncoprotein GFI-1B: two routes for STAT5 target gene induction by erythropoietin." J Biol Chem **277**(3): 2345-52.
- John, J., R. McKendry, *et al.* (1991). "Isolation and characterization of a new mutant human cell line unresponsive to alpha and beta interferons." Mol Cell Biol **11**(8): 4189-95.
- Kamijo, R., H. Harada, *et al.* (1994). "Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages." Science **263**(5153): 1612-5.
- Kamura, T., D. Burian, *et al.* (2001). "Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase." J Biol Chem **276**(32): 29748-53.
- Kelker, H. C., Y. K. Yip, *et al.* (1983). "Effects of glycosidase treatment on the physicochemical properties and biological activity of human interferon-gamma." J Biol Chem **258**(13): 8010-3.
- Kerr, I. M. and G. R. Stark (1992). "The antiviral effects of the interferons and their inhibition." J Interferon Res **12**(4): 237-40.
- Khani-Hanjani, A., D. Lacaille, *et al.* (2000). "Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis." Lancet **356**(9232): 820-5.
- Kile, B. T., B. A. Schulman, *et al.* (2002). "The SOCS box: a tale of destruction and degradation." Trends Biochem Sci **27**(5): 235-41.
- Kim, T. K. and T. Maniatis (1996). "Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway." Science **273**(5282): 1717-9.

- Kirken, R. A., R. A. Erwin, *et al.* (1999). "Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells." J Leukoc Biol **65**(6): 891-9.
- Kohlhuber, F., N. C. Rogers, *et al.* (1997). "A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses." Mol Cell Biol **17**(2): 695-706.
- Kovarik, P., M. Mangold, *et al.* (2001). "Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression." Embo J **20**(1-2): 91-100.
- Kovarik, P., D. Stoiber, *et al.* (1999). "Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13956-61.
- Kovarik, P., D. Stoiber, *et al.* (1998). "Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation." Embo J **17**(13): 3660-8.
- Kumar, A., M. Commane, *et al.* (1997). "Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases." Science **278**(5343): 1630-2.
- Kumar, A., S. Dhawan, *et al.* (1998). "Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells." Oncogene **17**(7): 913-8.
- Lai, C. F., J. Ripperger, *et al.* (1995). "Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130." J Biol Chem **270**(25): 14847-50.
- Lederer, J. A., V. L. Perez, *et al.* (1996). "Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation." J Exp Med **184**(2): 397-406.
- Lehtonen, A., S. Matikainen, *et al.* (1997). "Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages." J Immunol **159**(2): 794-803.
- Lemmel, E. M., D. Brackertz, *et al.* (1988). "Results of a multicenter placebo-controlled double-blind randomized phase III clinical study of treatment of rheumatoid arthritis with recombinant interferon-gamma." Rheumatol Int **8**(2): 87-93.
- Lissin, L. W. and J. P. Cooke (2000). "Phytoestrogens and cardiovascular health." J Am Coll Cardiol **35**(6): 1403-10.
- Liu, B., J. Liao, *et al.* (1998). "Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10626-31.
- Liu, J. S., M. L. Zhao, *et al.* (2001). "Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions." Am J Pathol **158**(6): 2057-66.
- Losman, J. A., X. P. Chen, *et al.* (1999). "Cutting edge: SOCS-1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction." J Immunol **162**(7): 3770-4.
- Luo, H., P. Rose, *et al.* (1997). "Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways." Mol Cell Biol **17**(3): 1562-71.
- Luthman, H. and G. Magnusson (1983). "High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells." Nucleic Acids Res **11**(5): 1295-308.
- Madyastha, P. R., S. Yang, *et al.* (2000). "IFN-gamma enhances osteoclast generation in cultures of peripheral blood from osteopetrotic patients and normalizes superoxide production." J Interferon Cytokine Res **20**(7): 645-52.
- Mahboubi, K. and J. S. Pober (2002). "Activation of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) is not sufficient for the induction of STAT1-dependent genes in endothelial cells. Comparison of interferon-gamma and oncostatin M." J Biol Chem **277**(10): 8012-21.
- Maniatis, T., L. Whittermore, *et al.* (1992). "Positive and negative control of human interferon- β gene expression." Transcriptional Regulation Part 2: 1193 - 1220.

- Mantovani, R. (1998). "A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes." Nucleic Acids Res **26**(5): 1135-43.
- Marine, J. C., D. J. Topham, *et al.* (1999). "SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality." Cell **98**(5): 609-16.
- Martensen, P. M., T. M. Sogaard, *et al.* (2001). "The interferon alpha induced protein ISG12 is localized to the nuclear membrane." Eur J Biochem **268**(22): 5947-54.
- Maskey, R. P., E. Helmke, *et al.* (2002). "Parimycin: isolation and structure elucidation of a novel cytotoxic 2,3-dihydroquinizarin analogue of gamma-indomycinone from a marine streptomycete isolate." J Antibiot (Tokyo) **55**(12): 1031-5.
- Massa, P. T. and C. Wu (1996). "The role of protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the regulation of IFN-gamma signaling in neural cells." J Immunol **157**(11): 5139-44.
- Matsuda, H., T. Kageura, *et al.* (2000). "Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages." Bioorg Med Chem Lett **10**(4): 323-7.
- Matsumoto, A., M. Masuhara, *et al.* (1997). "CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation." Blood **89**(9): 3148-54.
- Menegazzi, M., E. Tedeschi, *et al.* (2001). "Anti-interferon gamma action of epigallocatechin-3-gallate mediated by specific inhibition of STAT1 activation." Faseb J **15**(7): 1309-11.
- Meraz, M. A., J. M. White, *et al.* (1996). "Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway." Cell **84**(3): 431-42.
- Meydan, N., T. Grunberger, *et al.* (1996). "Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor." Nature **379**(6566): 645-8.
- Min, W., J. S. Pober, *et al.* (1998). "Interferon induction of TAP1: the phosphatase SHP-1 regulates crossover between the IFN-alpha/beta and the IFN-gamma signal-transduction pathways." Circ Res **83**(8): 815-23.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Mowen, K. A., J. Tang, *et al.* (2001). "Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription." Cell **104**(5): 731-41.
- Naka, T., T. Matsumoto, *et al.* (1998). "Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15577-82.
- Naka, T., M. Narazaki, *et al.* (1997). "Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor." Nature **387**(6636): 924-9.
- Nakamoto, T., T. Yamagata, *et al.* (2000). "CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases." Mol Cell Biol **20**(5): 1649-58.
- Nakata, M., M. Saito, *et al.* (1992). "A new anthracycline antibiotic, cinerubin R. Taxonomy, structural elucidation and biological activity." J Antibiot (Tokyo) **45**(10): 1599-608.
- Narayanan, B. A., N. K. Narayanan, *et al.* (2003). "Differential expression of genes induced by resveratrol in LNCaP cells: P53-mediated molecular targets." Int J Cancer **104**(2): 204-12.
- Navarro, A., B. Anand-Apte, *et al.* (2003). "A PI-3 kinase-dependent, Stat1-independent signaling pathway regulates interferon-stimulated monocyte adhesion." J Leukoc Biol **73**(4): 540-545.

- Naylor, S. L., A. Y. Sakaguchi, *et al.* (1983). "Human immune interferon gene is located on chromosome 12." J Exp Med **157**(3): 1020-7.
- Nguyen, L. H., L. Espert, *et al.* (2001). "The human interferon- and estrogen-regulated ISG20/HEM45 gene product degrades single-stranded RNA and DNA in vitro." Biochemistry **40**(24): 7174-9.
- Nielsen, M., K. Kaltoft, *et al.* (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**(13): 6764-9.
- Obert, H. J. and D. Poehlau (2000). "Beta-Interferon Schwerpunkt Multiple Sklerose." (3. Auflage).
- O'Brien, K. B., J. J. O'Shea, *et al.* (2002). "SH2-B family members differentially regulate JAK family tyrosine kinases." J Biol Chem **277**(10): 8673-81.
- Olthof, M. R., P. C. Hollman, *et al.* (2000). "Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans." J Nutr **130**(5): 1200-3.
- Orkin, S. H. (1989). "Molecular genetics of chronic granulomatous disease." Annu Rev Immunol **7**: 277-307.
- Parker, B. A. and G. R. Stark (1979). "Regulation of simian virus 40 transcription: sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA." J Virol **31**(2): 360-9.
- Patterson, J. B. and C. E. Samuel (1995). "Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase." Mol Cell Biol **15**(10): 5376-88.
- Paucker K, C. K., Henle W (1962). "Quantitative studies on viral interference in suspended L cells." Virology **17**: 324-334.
- Perussia, B. (1991). "Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines." Curr Opin Immunol **3**(1): 49-55.
- Pfefferkorn, E. R. (1984). "Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(3): 908-12.
- Politis, A. D., J. Sivo, *et al.* (1992). "Modulation of interferon consensus sequence binding protein mRNA in murine peritoneal macrophages. Induction by IFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha, dexamethasone, and protein kinase inhibitors." J Immunol **148**(3): 801-7.
- Pravica, V., A. Asderakis, *et al.* (1999). "In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene." Eur J Immunogenet **26**(1): 1-3.
- Ramana, C. V., M. Chatterjee-Kishore, *et al.* (2000). "Complex roles of Stat1 in regulating gene expression." Oncogene **19**(21): 2619-27.
- Ramana, C. V., M. P. Gil, *et al.* (2001). "Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6674-9.
- Ramana, C. V., N. Grammatikakis, *et al.* (2000). "Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways." Embo J **19**(2): 263-72.
- Rinderknecht, E., B. H. O'Connor, *et al.* (1984). "Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation." J Biol Chem **259**(11): 6790-7.
- Rodriguez, J. J., J. P. Parisien, *et al.* (2002). "Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation." J Virol **76**(22): 11476-83.
- Ronni, T., S. Matikainen, *et al.* (1997). "Regulation of IFN-alpha/beta, MxA, 2',5'-oligoadenylate synthetase, and HLA gene expression in influenza A-infected human lung epithelial cells." J Immunol **158**(5): 2363-74.

- Ronni, T., T. Sareneva, *et al.* (1995). "Activation of IFN-alpha, IFN-gamma, MxA, and IFN regulatory factor 1 genes in influenza A virus-infected human peripheral blood mononuclear cells." J Immunol **154**(6): 2764-74.
- Ryals, J., P. Dierks, *et al.* (1985). "A 46-nucleotide promoter segment from an IFN-alpha gene renders an unrelated promoter inducible by virus." Cell **41**(2): 497-507.
- Sad, S., R. Marcotte, *et al.* (1995). "Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines." Immunity **2**(3): 271-9.
- Saito, H., Y. Morita, *et al.* (2000). "IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma." J Immunol **164**(11): 5833-43.
- Sakai, I., L. Nabell, *et al.* (1995). "Signal transduction by a CD16/CD7/Jak2 fusion protein." J Biol Chem **270**(31): 18420-7.
- Sakamoto, H., H. Yasukawa, *et al.* (1998). "A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons." Blood **92**(5): 1668-76.
- Sakatsume, M., L. F. Stancato, *et al.* (1998). "Interferon gamma activation of Raf-1 is Jak1-dependent and p21ras-independent." J Biol Chem **273**(5): 3021-6.
- Samuel, C. E. (1991). "Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities." Virology **183**(1): 1-11.
- Sato, M., H. Suemori, *et al.* (2000). "Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction." Immunity **13**(4): 539-48.
- Schlott, N. C., P. Hanifi-Moghaddam, *et al.* (2002). "Serum IFN-gamma and IL-10 levels are associated with disease progression in non-obese diabetic mice." Diabetes Metab Res Rev **18**(1): 64-70.
- Shang, X. and Z. Yuan (2001). "Determination of Active Components in Rhubarb by Cyclodextrin-modified Capillary Zone Electrophoresis." Sensors: 229-235.
- Shuman, S. (1994). "Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase." J Biol Chem **269**(51): 32678-84.
- Sidhu, G. S., A. K. Singh, *et al.* (1999). "Role of vacuolar H(+)-ATPase in interferon-induced inhibition of viral glycoprotein transport." J Interferon Cytokine Res **19**(11): 1297-303.
- Sigidin, Y. A., G. V. Loukina, *et al.* (2001). "Randomized, double-blind trial of anti-interferon-gamma antibodies in rheumatoid arthritis." Scand J Rheumatol **30**(4): 203-7.
- Sims, S. H., Y. Cha, *et al.* (1993). "A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter." Mol Cell Biol **13**(1): 690-702.
- Singh, A. K., P. Seth, *et al.* (2002). "Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenic differentiation of human endothelial cells." Arch Biochem Biophys **401**(1): 29-37.
- Slodowski, O., J. Bohm, *et al.* (1991). "Carboxy-terminal truncated rhuIFN-gamma with a substitution of Gln133 or Ser132 to leucine leads to higher biological activity than in the wild type." Eur J Biochem **202**(3): 1133-40.
- Soleas, G. J., E. P. Diamandis, *et al.* (1997). "Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention." J Clin Lab Anal **11**(5): 287-313.
- Sporri, B., P. E. Kovanen, *et al.* (2001). "JAB/SOCS1/SSI-1 is an interleukin-2-induced inhibitor of IL-2 signaling." Blood **97**(1): 221-6.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, *et al.* (1998). "How cells respond to interferons." Annu Rev Biochem **67**: 227-64.

- Starr, R., D. Metcalf, *et al.* (1998). "Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14395-9.
- Starr, R., T. A. Willson, *et al.* (1997). "A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling." Nature **387**(6636): 917-21.
- Streuli, M., S. Nagata, *et al.* (1980). "At least three human type alpha interferons: structure of alpha 2." Science **209**(4463): 1343-7.
- Takenaka, H., S. Maruo, *et al.* (1997). "Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4." J Leukoc Biol **61**(1): 80-7.
- Talas, M., L. Batkai, *et al.* (1983). "Results of space experiment program "Interferon". II. Influence of spaceflight conditions on the activity of interferon preparations and interferon inducers ("Interferon II")." Acta Microbiol Hung **30**(1): 63-7.
- Tanaka, N., T. Kawakami, *et al.* (1993). "Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system." Mol Cell Biol **13**(8): 4531-8.
- Taniguchi, T. (1988). "Regulation of cytokine gene expression." Annu Rev Immunol **6**: 439-64.
- Taniguchi, T., K. Ogasawara, *et al.* (2001). "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." Annu Rev Immunol **19**: 623-55.
- Taniguchi, T. and A. Takaoka (2002). "The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors." Curr Opin Immunol **14**(1): 111-6.
- Taylor, C., D. A. Burns, *et al.* (2000). "Extensive psoriasis induced by interferon alfa treatment for chronic hepatitis C." Postgrad Med J **76**(896): 365-7.
- Tomita, F., T. Tamaoki, *et al.* (1981). "Trioxacarcins, novel antitumor antibiotics. I. Producing organism, fermentation and biological activities." J Antibiot (Tokyo) **34**(12): 1519-24.
- Tong, B., H. L. Grimes, *et al.* (1998). "The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation." Mol Cell Biol **18**(5): 2462-73.
- Trinchieri, G. (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity." Annu Rev Immunol **13**: 251-76.
- Ullman, K. S., J. P. Northrop, *et al.* (1990). "Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link." Annu Rev Immunol **8**: 421-52.
- Urnov, F. D. and E. J. Rebar (2002). "Designed transcription factors as tools for therapeutics and functional genomics." Biochem Pharmacol **64**(5-6): 919-23.
- Valdez, B. C., D. Henning, *et al.* (1997). "Cloning and characterization of Gu/RH-II binding protein." Biochem Biophys Res Commun **234**(2): 335-40.
- Verdier, F., R. Rabionet, *et al.* (1998). "A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with two associated STAT5A dimers: a distinct biochemical difference between STAT5A and STAT5B." Mol Cell Biol **18**(10): 5852-60.
- Wadman, I. A., H. Osada, *et al.* (1997). "The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins." Embo J **16**(11): 3145-57.
- Walter, M. R., W. T. Windsor, *et al.* (1995). "Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor." Nature **376**(6537): 230-5.
- Wang, B., I. Andre, *et al.* (1997). "Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13844-9.

- Wang, C. C., Y. J. Huang, *et al.* (2002). "Inducible nitric oxide synthase inhibitors of Chinese herbs III. Rheum palmatum." Planta Med **68**(10): 869-74.
- Waschütza, G. (1995). "Disulfidbrücken und Proteinstabilität - Mutagenesestudien zur Stabilität und Struktur des rhu-IFN γ ." Dissertation.
- Watanabe, N., J. Sakakibara, *et al.* (1991). "Activation of IFN-beta element by IRF-1 requires a posttranslational event in addition to IRF-1 synthesis." Nucleic Acids Res **19**(16): 4421-8.
- Weissmann, C. and H. Weber (1986). "The interferon genes." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **33**: 251-300.
- Wen, Z., Z. Zhong, *et al.* (1995). "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." Cell **82**(2): 241-50.
- Wheelock, E. (1965). "Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phythemagglutinin." Science **149**: 310-311.
- Wilks, A. F., A. G. Harpur, *et al.* (1991). "Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase." Mol Cell Biol **11**(4): 2057-65.
- Wong, L. H., I. Hatzinisiriou, *et al.* (1998). "IFN-gamma priming up-regulates IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) components, augmenting responsiveness of IFN-resistant melanoma cells to type I IFNs." J Immunol **160**(11): 5475-84.
- Yang, S., P. Madyastha, *et al.* (2002). "Characterization of interferon gamma receptors on osteoclasts: effect of interferon gamma on osteoclastic superoxide generation." J Cell Biochem **84**(3): 645-54.
- Yang, S. H., J. S. Kim, *et al.* (2003). "Genome-scale analysis of resveratrol-induced gene expression profile in human ovarian cancer cells using a cDNA microarray." Int J Oncol **22**(4): 741-50.
- Yasukawa, H., H. Misawa, *et al.* (1999). "The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop." Embo J **18**(5): 1309-20.
- Yim, H., Y. H. Lee, *et al.* (1999). "Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of Rheum palmatum, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor." Planta Med **65**(1): 9-13.
- Yoshida, A., Y. Koide, *et al.* (1994). "IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774." Biochem Biophys Res Commun **198**(3): 857-61.
- Yoshikawa, H., K. Matsubara, *et al.* (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**(1): 29-35.
- Yoshimoto, Y., T. Jyojima, *et al.* (2002). "Vacuolar-type H(+)-ATPase inhibitory activity of synthetic analogues of the concanamycins: Is the hydrogen bond network involving the lactone carbonyl, the hemiacetal hydroxy group, and the C-19 hydroxy group essential for the biological activity of the concanamycins?" Bioorg Med Chem Lett **12**(24): 3525-8.
- Yoshimura, A., T. Ohkubo, *et al.* (1995). "A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors." Embo J **14**(12): 2816-26.
- Youngner, J. S. and S. B. Salvin (1973). "Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity." J Immunol **111**(6): 1914-22.
- Yuan, W. and R. M. Krug (2001). "Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein." Embo J **20**(3): 362-71.

- Zhang, L., Y. K. Lau, *et al.* (1999). "Tyrosine kinase inhibitor emodin suppresses growth of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells in athymic mice and sensitizes these cells to the inhibitory effect of paclitaxel." Clin Cancer Res **5**(2): 343-53.
- Zhou, A., J. M. Paranjape, *et al.* (1999). "Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways." Virology **258**(2): 435-40.
- Ziesche, R., E. Hofbauer, *et al.* (1999). "A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." N Engl J Med **341**(17): 1264-9.

Anhang

Kooperationspartner

- Prof. Dr. H. Laatsch

Universität Göttingen
Institut für Organische Chemie
Tammannstrasse 2
37077 Goettingen
Tel. 0551 393 211
Fax 0551 399 660
email: hlaatsc@gwdg.de

- Prof. Dr. Axel Zeeck

Universität Göttingen
Institut für Organische Chemie
Abteilung Biomolekulare Chemie
Tammannstraße 2
37077 Göttingen
Tel. 0551-39-3263
Fax. 0551-39-12593
e-mail: azeeck@gwdg.de

- Prof. Dr. Gabriele M. König

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Institut für Pharmazeutische Biologie
Nußallee 6
53115 Bonn
Fax.: 0228- 733-250
e-mail: G.Koenig@uni-bonn.de

- Dr. Ludger Ständker

Niedersächsisches Institut für
Peptidforschung (IPF)
Feodor-Lynen-Strasse 31
30625 Hannover
Tel. 0511-5466-329
Fax. 0511-5466-102
e-mail: L.standker@gmx.net

- Dr. Hans Jörg Hauser
Gesellschaft für
Biotechnologische Forschung (GBF)
Abteilung Genregulation und Differenzierung
Mascheroder Weg 1,
38124 Braunschweig
Tel.: 0531-6181-250
Fax. 0531-6181-262
e-mail: hha@gbf.de

Internet-Verweise

International Union of Biochemistry and Molecular Biology

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>

Dr. James A. Duke's Phytochemical Database

USDA - ARS - NGRL, Beltsville Agricultural Research Center

<http://www.ars-grin.gov/duke>

Zugang zu MatInspector und PromotorInspector

<http://www.genomatix.de/>

Zugang zu Netphos 2.0

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Zugang zu Eponine TSS-Prediction (Down and Hubbard 2002)

<http://servlet.sanger.ac.uk:8080/eponine/>

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Vortrag: Search for Interferon-Interference.

Signal Transduction Society

5th Joint Meeting

08-10. November 2001, Weimar

Alignment des humanen und murinen *socs1*-Promotors(jeweils 2 kbp *upstream* des Translationsinitiationscodons)

	10	20	30	40	50	60
humaner promotor	GGGATGGAGTTTCAACCAACCCAGTACTACTATAAAATAGGCTGGTACAAGGCCCTGTGTTTAA					
muriner promotor	GGGATGGAGTTTCAACCAACCCAGTACTACTATAAAATAGGCTGGTACAAGGCCCTGTGTTTAA					
	70	80	90	100	110	120
humaner promotor	G T C C C C A G C A C T T G C A A A C A A G C A T C G T G A T G C T T G C C A G A C C A G A A A G C C G T C T G A G A G C					
muriner promotor	G T C C C C A G C A C T T G C A A A C A A G C R K S C R Y S A K G S Y T K C C A G R M S A G A A R S M S Y Y K R A G R S C					
	130	140	150	160	170	180
humaner promotor	T G T C T T G T A G A G G C A G T G T T G T C C C A G T G T G A G - G C C A G T A A C C A A G T G C C C A G C C T A G C C					
muriner promotor	W G T C T R K R S W G R G M M G Y G Y K W S M S R G W G K S A G T G C Y A S W A A C C M A G Y S Y Y A K C S Y M S M C					
	190	200	210	220	230	240
humaner promotor	A G G T T T T T A T G T G C C C A T T G T G T A T G C T G G G G C T C C - - T C A C A T G C C T T C A T C C A A A A T					
muriner promotor	M R R K K K T T A K R Y K G M C M T K G Y K R Y R C Y R S R R C Y M C A G Y C A C A Y R M M T T C A W S C A M M A M W					
	250	260	270	280	290	300
humaner promotor	A C A C G G A G C - A G C C A G G C A C C T A C T C A T A T G G C C T C G C A C G A C A A T C G G A A T C A C T A A A T C					
muriner promotor	A S A Y R R R K Y T R G Y Y R K G C W Y M K R M T S M A W K R Y S K C G C W C K R Y R M T C K G W M T S R S K A R A Y C					
	310	320	330	340	350	360
humaner promotor	A C A A A C A C G T G T G C A A A T T A C A G C C C C G A C C A C C G A C C G A C C G A C C C A A C C A A G C C C C					
muriner promotor	A S R A M Y W S G Y S T S M R A R Y T W C A G M S S M G M C S M C Y G A C M G C Y M A C M G A G A W M C C W R K M S M S					
	370	380	390	400	410	420
humaner promotor	G G C C G T G T G T G T G G - T G G A A G G C A G T C T T T T G A A G G C A G A T G C C T G A C G G A G C A G T A G G					
muriner promotor	G G C M G T G T G Y G T S R C T G K G A R S R C A G K S W W K S M W G S R C R S R W R C C T S A Y S S R S C W K Y A K K					
	430	440	450	460	470	480
humaner promotor	A G G G G G A A A T C T A T G A G G A A G G G T C G G G G G A G A G G A G G C T A G G A A A C A G G T T T G G G C					
muriner promotor	C A T A A A C A - - T C G T C A G C C A G G C A C C C A C T C C T G G C C T T C A G A G A C T G A A T C A C G A					
	490	500	510	520	530	540
humaner promotor	A T T T A T C A C G T C T G A G A A T G C A C C A T T T T T T C A C T G G C T C C A A A T T T G A T G T C C C A G C					
muriner promotor	A W Y A Y M M M G T S T S M K A A T G M W M S R T Y T K W Y Y R C Y K G G M T C C W A W K Y S A W G K Y G T C C A G C					
	550	560	570	580	590	600
humaner promotor	T G C A C C T C T C C C A A A T G A A G A C G G G G A A G G C G A G A T C A G A T C C A A G A G C T C C A A T C T					
muriner promotor	T S S R S S Y C Y C Y S W A M A K G M A G A Y G S K G A W G S Y G R R R T C Y W G R Y C M A R A G Y T Y S S R R W Y T					
	610	620	630	640	650	660
humaner promotor	G C A A G C C A T T T G C A - A A T C C A C A G C C C C C C C C A G - C C T C A G T T T C T T C C G C A G C C G G - G T A					
muriner promotor	R C A R S Y Y W T T K Y R G A A T C M C A G C C C C K C C S R G G C C T C A G T T T C T Y C S G C W G C C S R C G T A					
	670	680	690	700	710	720
humaner promotor	G T G G A G T G C A G A G A G T G - A G T C A G G C C C C T G G G A A C C C A G C C A G C C C C G C C A G T T T					
muriner promotor	G T R G A G Y G C A G R G A G K G C A G T C S A G G C C M C Y R G G R A C C Y W G C C R R C C C G C C R G T T T					
	730	740	750	760	770	780
humaner promotor	C C G A G G A A C T A G G C C G G G - G T G G A G G C G C C C - - - G C G C C G C C A G G G G - T T C C T C T G A A					
muriner promotor	C C G A G G A A C T R G G C C G G G A G Y G G R G G C G C C C T C C C G C R C C G C C W K R G G C T T C C T Y T G A A					
	790	800	810	820	830	840
humaner promotor	G C C T - - G T G G T C A G G C C A C C G C T T C C T G G G A A G C C C A G C C A A G A C C A G A G A C C C G G C C					
muriner promotor	G C C T C T G C G G T C A G G C C A C C G C T T C C T G G G A A G C C C A A G C C A G C C A G G C C G A A T G G C C					
	850	860	870	880	890	900
humaner promotor	G G C G G G G C T T C G G A C A G G A G G C G G G C G A C T G A G G G C G T C G A C G G C G G G T G A G C A G G					
muriner promotor	R R C S G G R G S K K C S S G M M M G C R G S K K G G M G A C T G A G G G C G K C G R C S S C R S R K G K M K C W R G					
	910	920	930	940	950	960
humaner promotor	G G C T A G G - A G G G G T T C A G G G T G G G G T C A G C A T - - - C A G G G T T G G G A C A C C T - - - T C T					
muriner promotor	G R C T A G S T A G C C G G G T T C A G A A A G G G T C A G A T T G C C A G G C C T T C G G T C C T G G G C A G					
	970	980	990	1000	1010	1020
humaner promotor	G T G C C T C C T A G G G A T C T G G C T G C A - G G G G A G A G A G A G G A - - - - C A G G G C T C T G C C C					
muriner promotor	G W R G S M Y C C T R G S R G G R W S K R G C T G C W T G G G G A G S A S A G G R T C C A G G C R R G G C K S W G C C C					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
humaner promotor	C C G G C G G G T G - - T G G A G A C A G C C T G G G A G G G A G G A G G G T G T G T C A G G G C G C G T C C A A G A G					
muriner promotor	T A A C C A G A G A A T G C A G A C A C C C G G A G G G A G G G A G G G - C G T G T C A G - - C C C G C C T A G C A G					
	Y M R S C R G R W G A A T G S A G A C A S C Y G R G S G G A G A G G Y G T G T C A G G C S C S K C S C W A G M R					



NetPhos 2.0 Server - prediction results

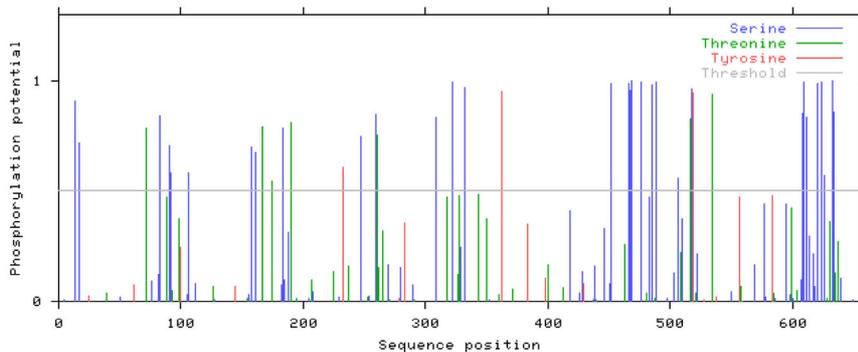
Technical University of Denmark

651 Sequence
MADS AELKQMVMSLRVSELQVLLGYAGR NKHGRKHELLTKALHLLKAGCSPAVQMKIKELYRRRFPQKIMTPADLSIPNV 8
HSSPMPATLSPSTIPQLTYDGH PASSPLLPVSLGPKHELELPHLTSALHPVHPDIK LQKLPFYDLLDELIKPTS LASDN 16
SQRFRETCFAFALTPQQVQQISSMDISG TKCDFTVQVQLRFCLSETSCPQEDHFPNLCVKVNTKPCSLPGYLPPTKNG 24
VEPKRPSRPINITSLVRLSTTVPNTIVVSWTAE IGRNYSMAVYLVKQLSSTVLLQRLRAKGIRNPDHSRALIKEKLTADP 32
DSEIATSLRVSLCPLGKMRLTIPCRALTC SHLQCFDATLYIQMNEKKPTWVCPVCDKKAPYEHLIIDGLFMEILKYCT 40
DCDEIQFKEDGTWAPMRSKKEVQEV SASYNGVDGCLSSTLEHQVASHHQSSNKNKVEVIDLTI DSSSDEEEEEPSAKRT 48
CPSLSPTSPLNKGILSLPHQASPVSRTPSLPAVDTSYINTSLIQDYRHPFHMT PMPYDLQGLDFFPFLSGDNQHYNTSL 56
LAAAAAVSDDQDLLHSSRFFPYTSSQMFLDQLSAGGSTSLPTTNGSSSGSNSLSLVSSNSLRSHSHVTVNRSSDTASI 64
FGIIPDIISLD 72
.....S...S.....T..... 8
..S.....S.S.....S.....S..... 16
S.....T.....T.....S.....T.....Y..... 24
.....S.....ST.....S..... 32
.S.....S.....Y..... 40
.....S.....SSS.....S..... 48
...S..S.....S.....TSY.....T..... 56
.....SS.S.....S...S.S.....SS..... 64
..... 72
..... 72
Phosphorylation sites predicted: Ser: 31 Thr: 7 Tyr: 3

Tyrosine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
Sequence	25	VLLGYAGR N	0.023	.
Sequence	61	IKELYRRRF	0.072	.
Sequence	99	PQLTYDGH P	0.243	.
Sequence	144	KLFFYDLL D	0.066	.
Sequence	233	SLPGYLPPT	0.605	*Y*
Sequence	278	IGRNYSMAV	0.012	.
Sequence	283	SMAVYLVKQ	0.356	.
Sequence	362	DATLYIQMN	0.949	*Y*
Sequence	383	KKAPYEHLI	0.351	.
Sequence	398	EILKYCTDC	0.103	.
Sequence	429	VSASYNGVD	0.080	.
Sequence	518	VDTSYINTS	0.947	*Y*
Sequence	527	LIQDYRHPF	0.007	.
Sequence	538	TPMPYDLQG	0.017	.
Sequence	556	DNQHYNTSL	0.471	.
Sequence	583	RFFPYTSSQ	0.481	.
		^		

NetPhos 2.0: predicted phosphorylation sites in Sequence



Lebenslauf

Name		Andreas Busche
Geburtsdatum/-ort		30.4.1974 in Höxter
Nationalität		deutsch
Familienstand		ledig
Schulbildung	1980 – 1984 1984 – 06/1993	Grundschule Boffzen Gymnasium Höxter
Zivildienst	07/1993 – 09/1994	Eberhardt-Karls-Universität Tübingen Hygiene-Institut, Abteilung Virologie
Studium	09/1994 – 10/1999	Biochemie-Studium, Universität Hannover
Studienabschluss	10/1999	Dipl. Biochem. Thema der Diplomarbeit: Expression und Reinigung von humanem rekombinantem Interferon $\alpha 2$ aus <i>E. coli</i>
Promotion	01/2000 – 07/2003	

Zu guter Letzt noch eine Sache,
die ich besonders gerne mache.
Es geht da nicht um schlechte Dichtung,

sondern um eine:

Danksagung

an die Menschen, die mir während der Erstellung dieser Arbeit wissenschaftlich und persönlich mehr als nur eine große Hilfe waren.
Insbesondere danke ich

Prof. Dr. Bernd Otto für die Möglichkeit, unter ausgezeichneten Rahmenbedingungen an dem mir überlassenen Thema arbeiten zu können, das mir entgegengebrachte Vertrauen und das hervorragende Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe.

Prof. Dr. Walter Müller, der uns als Biochemie-Studenten beim Wechsel an die MHH damit begrüßte, wir seien nun daheim und mit unermüdlichem Einsatz dafür sorgte, dass dem auch so war, danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Dr. Hayssam Zakaria danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen Anregungen, die treffsicheren Analysen und seinen verlässlichen Beistand auch im Kampf gegen die schier endlose Zahl immer neuer Boshaftigkeiten diverser Computerprogramme.

Dr. Marco Kresin danke ich neben der freundschaftlichen und angenehmen Zusammenarbeit im Labor für das Teilen seiner fundierten Kenntnisse über das behandelte Thema.

Florian Battermann und Christian Schmalz danke ich als zwei Kollegen, wie man sie sich nur wünschen kann und für ihr großes Engagement, das es ermöglichte, gemeinsam auch schwierige Fragen zu lösen.

Frau Reinhild Bähr danke ich für ihre große Laborerfahrung und ihre verlässliche Unterstützung in Rat und Tat, die dieser Arbeit sehr zu Gute kamen.

Den Mitarbeitern der AG Braun des ITEM möchte ich für ihre Unterstützung bei diversen Messungen, für die freundliche Gabe von Zelllinien und für ihre unkomplizierte Art zu helfen danken.

Dr. Hans Jörg Hauser danke ich dafür, dass er so viel über das behandelte Thema weiß und seine freundliche Weise, mit der er mir dieses Wissen uneingeschränkt zu Hilfe kommen ließ.

Prof. Dr. Hartmut Laatsch danke ich für eine besonders lebendige und angenehme Zusammenarbeit.

Meinem Bruder Markus danke ich für seine direkte und indirekte Unterstützung dieser Arbeit Neben den Medizinalpflanzen aus Nepal, dem Korrekturlesen war die Gewissheit, mich immer auf seine Hilfe verlassen zu können, für mich sehr wichtig.

Meiner Freundin Montserrat Rojas danke ich aus tiefstem Herzen. Die Zeit mit ihr wird durch sie einzigartig und wunderbar.

Auch ohne die bereits seit längerem publizierten Verhaltensvorschläge (Moses *et. al*, Exodus, 20.12) möchte ich auch an dieser Stelle meiner Mutter Angelika und meinem Vater Johannes in ganz besonderem Maß danken. Ihre Liebe und ihr Vertrauen haben mich mein Leben lang begleitet und mir Kraft gegeben.