INAUGURAL - DISSERTATION zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom- Ingenieur (FH) Marco Nici

aus: Speyer, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung:

IL-6 induzierte Signaltransduktion in HaCaT-ras A5 und Fibroblasten

Gutachter: Prof. Dr. Peter Angel

Prof. Dr. Margareta Müller

"Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat" Thorstein Bunde Veblen

> grazie mamma, perché sono così grazie a te e a quello che mi hai insegnato

I. Inhaltsverzeichnis

I.		Inhaltsve	erzeichniss	1
II.		Danksag	gung	5
III.		Zusamm	nenfassung	6
IV		Summar	٠ <u>y</u>	8
V.		Zielsetzı	ung	.10
1		Einleitur	ıg	.11
	1. ⁻	1 Der T	umor und seine Mikroumgebung	.11
	1.:	2 Intera	aktionen zwischen Tumor und stromalen Zellen	.12
	1.:	3 Rolle	von Fibroblasten im normalen Gewebe und bei Tumorprogression	.14
	1.4	4 Zellul	äre Kommunikation und Signaltransduktion	.15
	1.	5 Interle	eukin-6 Zytokine	.16
	1.(6 IL-6 F	Rezeptorkomplex und der JAK/STAT Signalweg	.17
	1.	7 Janus	s Kinasen (JAK)	.18
	1.8	8 Signa	Il transducer and activator of transcription (STAT)	.18
	1.9	9 Supp	ressor of cytokine signaling (SOCS)	.19
	1.1	10 Interle	eukin-6 und seine Rolle bei Krebs	.20
	1.	11 STAT	3 Regulation in Krebs	.21
	1.1	12 IL-6 ii	nduzierten Faktoren und deren Rolle in der Tumor- Stroma Interaktion	.22
	1.1	13 Squa	mous cell carcinoma antigen (SCCA)	.23
	1.	14 Syste	mbiologie	.24
2		Material	und Methoden	.26
	2.	1 Zellkı	ıltur	.26
		2.1.1	Verwendete Zelllinien	.26
		2.1.2	Auftauen der Zellen	.26
		2.1.3	Kultivierung der Zellen	.26
		2.1.4	Passagieren von Zellen	.27
		2.1.5	Einfrieren von Zellen	.28
		2.1.6	Zellzahlbestimmung mit dem CASY® Zählsystem	.28
		2.1.7	Mykoplasmentest	.28
		2.1.8	Hungern und stimulieren der Zellen mit IL-6	.29
		2.1.9	Proliferationsassay	.29
		2.1.10	Migrationsassay	.30
	2.2	2 Moleł	cularbiologie	.31

	2.2.1	Herstellung der Lysate	31
	2.2.2	BCA-Proteinbestimmung	33
	2.2.3	Immunopräzipitation	34
	2.2.4	SDS-Gelelektrophorese	35
	2.2.5	Western Blot und Immunodetektion	36
	2.2.6	Strippen der Membran	38
	2.2.7	RNA Isolation	39
	2.2.8	Reverse Transkription	39
	2.2.9	Real-Time PCR	40
	2.2.10	Microarray	41
	2.2.11	DNA-Gelelekrtophorese	41
	2.2.12	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation durch Hitzeschock	42
	2.2.13	Herstellung von rekombinantem GST-STAT3	43
	2.2.14	Isolierung und Aufreinigung von SBP-STAT3 Plasmid DNA aus E.coli	45
	2.2.15	Transfektion mit Lipofectamine2000	45
	2.2.16	Transfektion durch Elektroporation	45
	2.2.17	pSTAT3 Inhibierung	46
	2.2.18	Herstellung der konditionierten Medien	46
	2.2.19	Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA	46
3	Ergebni	sse	48
3	.1 Vergl	eich der Proteinkinetiken nach IL-6 Stimulation in MSU1.1 und primären	
	Fibro	blasten	48
3	.2 Einflu	uss unterschiedlicher IL-6 Konzentrationen auf Proliferation von HaCaT-ras A	5
	und N	/ISU1.1 Zellen	50
	3.2.1	HaCaT-ras A5	50
	3.2.2	MSU1.1	51
3	.3 Einflu	uss von IL-6 auf die Migration von HaCaT-ras A5 und MSU1.1	53
3	.4 Vergl	eich der Genexpression von HaCaT-ras A5 und MSU1.1 nach IL-6	
	Stimu	Ilation	54
	3.4.1	Genexpression von JAK1, JAK2, STAT3 und SOCS3 in HaCaT-ras A5 und	
		MSU1.1	54
	3.4.2	Zytokin-Genexpressionsanalyse von unterschiedlich geregelten Faktoren	56
3	.5 Effek	t von IL-6 Stimulation auf Zytokinproduktion in HaCaT-ras A5 und MSU1.1	59
	3.5.1	Keratinocyte Growth Factor (KGF)	59
	3.5.2	HGF	59
	3.5.3	Interleukin-8 (IL-8)	60

З	3.5.4	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	61
З	3.5.5	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	61
3.6	Cros	stalk zwischen HaCaT-ras A5 und MSU1.1	62
З	3.6.1	HaCaT-ras A5	63
З	3.6.2	MSU1.1	63
3.7	Analy	se der Aktivitätskinetik der am JAK/STAT-Signalweg beteiligten Proteine	64
3	8.7.1	Kinetik gp130	65
3	8.7.2	Zytosolisches pSTAT3	66
3	8.7.3	Nukleares pSTAT3	67
3	8.7.4	SOCS3	67
3.8	Umre	echnung der Signalintensität in die Proteinkonzentration	68
3.9	Vergl	leich der Konzentrationen von gp130, pSTAT3 und SOCS3 nach IL-6 Stimula	ition
21	III ⊓a 0 Etabl	iorung oines mathematischen Medells für den ge130 STAT3 SOCS3 Signalu	09
5.1		CaT ras A5 und MSU1.1	75y
2	1111a 2 10 1		71
- -	2 10 2		 72
- -	2 10 2	Implementierung der Expressionsrate von SOCS3 in das	12
L	0.10.5	mathematische Modell	73
2	101	Modell für HaCaT-ras A5 und MSI I1 1	73 74
- -	3 10 5	Experimentelle Validierung des mathematischen Modells für HaCaT-ras A5	und
		MSU1 1	76
31	1 STAT	13 Inhibierung durch STATTIC V- Inhibitor	79
3.1	2 Prolif	eration von HaCaT-ras A5 nach pSTAT3 Inhibierung	80
3.1	3 Über	expression von STAT3	
3.1	4 Effek	t von STAT3 Überexpression auf Proliferationsverhalten von MSU1.1	82
3.1	5 Serpi	inB4 Proteinexpression nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 und MSU1.1.	83
3	3.15.1	HaCaT-ras A5	84
3	3.15.2	MSU1.1	84
3.1	6 STAT	r3 abhängige SerpinB4 Regulation	85
3.1	7 Knoc	k Down von SerpinB4	85
3.1	8 Prolif	eration von HaCaT-ras A5 nach IL-6 Stimulation und SerpinB4	
-	Runte	erregulation	86
3.1	9 Char	akterisierung der differentiellen biologischen IL-6 Antworten in HaCaT-ras A5	
	und N	MSU1.1 durch Microarrayanalyse	87
4 C	Diskuss	ion	91

	4.1	IL-6 löst unterschiedliche physiologische Reaktionen in HaCaT-ras A5 Zellen und	
		MSU1.1 Zellen aus	92
	4.2	IL-6 induziert ein Netzwerk an Faktoren zur Förderung der Tumorprogression	94
	4.3	Das durch IL-6 induzierte Netzwerk führt zu einem Crosstalk zwischen Tumorzel	len
		und Zellen aus der Mikroumgebung	97
	4.4	HaCaT-ras A5 Zellen und MSU1.1 Zellen zeigen nach IL-6 Stimulation Untersch	iede
		in der STAT3 Konzentration	99
	4.5	Effekt von STAT3 Inhibierung auf die Proliferation von HaCaT-ras A5	101
	4.6	Überexpression von STAT3 in MSU1.1	103
	4.7	SerpinB4 und die seine Rolle in der Proliferation von HaCaT-ras A5	103
	4.8	Unterschiedliche Genregulation nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 und	
		MSU1.1	104
5	Li	teratur	107
6	Ar	nhang	115
	6.1	Abkürzungsverzeichnis	115
	6.2	Heatmap Diagramm der Signalwege nach IL-6 Stimulation in MSU1.1 und	
		HaCaT-ras A5	117

II. Danksagung

An dieser Stelle ist es mir wichtig, mich bei denjenigen zu bedanken, die einen erheblichen Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit hatten und mich während meiner Zeit als Doktorand begleitet und unterstützt haben.

Als ersten bedanke ich mich bei Prof. Dr. Margareta Müller, die durch meine Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe den Grundstein meiner Promotion gelegt hat. Bei Prof. Dr. Petra Boukamp bedanke mich sehr herzlich für die "Adoption" in Ihre Gruppe und mir somit in einer schweren Lage die Möglichkeit gab meine Promotion in Ihrem Labor zu beenden.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern meiner ehemaligen Arbeitsgruppe sowie meinen jetzigen Kollegen für die Unterstützung und die Freundschaft ohne die ich an manchen Tagen am liebsten das Handtuch geworfen hätte. Es wäre unfair einzelne Personen zu nennen denn ihr alle wart mir eine große Hilfe.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Sofia Depner für Ihre ausdauernde Unterstützung, Betreuung sowie auch der kritischen und inspirierenden Fachdiskussionen, die mich in Hinblick auf meine fachliche, berufliche und persönliche Weiterentwicklung stets gefördert hat. Ein großen Dank auch an Prof. Dr Peter Angel, der sich ohne großes Zögern bereit erklärte die Rolle des Doktorvaters zu übernehmen.

Danke an meine Kooperationspartner Lars Kaderali, Diana Clauritzer, Bhagwan Yadaf, Melanie Boerries und Hauke Busch für Ihre Hilfe und die gute Zusammenarbeit während der letzten Jahre.

Am meisten möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ohne die grenzenlose und uneingeschränkte Unterstützung meiner Familie wäre ich jetzt nicht an der Position in der ich glücklicherweise bin. Papa, Mama, Eleonora und Maurizio ich bin einfach nur froh dass es euch gibt!

Natürlich möchte ich mich bei meiner wunderbaren Freundin Vera bedanken, die mich während der letzten 10 Jahre sowie meiner gesamten Promotion in allen Lagen unterstützt hat und immer auf meiner Seite war. Du bist genau der Mensch den ich an meiner Seite brauche.

Es gibt noch so viele Menschen bei denen ich mich bedanken sollte und ich würde zu jedem einzelnen am liebsten eine ganze Seite schreiben. Sollte der eine oder andere hier nicht erwähnt worden sein, seid euch sicher, ich bin euch sehr dankbar!

III. Zusammenfassung

Die Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und ihrer Mikroumgebung spielen bei der Tumorprogression eine entscheidende Rolle. Tumorzellen können durch Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen Veränderungen in der Genexpression in stromalen Zellen induzieren. Aktivierte stromale Zellen, wie Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen, können ebenfalls Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen freisetzen, welche ihrerseits die Tumorzellen beeinflussen und dadurch die Tumorprogression fördern. Ein wichtiger Wachstumsfaktoren, der Tumor- und Stroma-Interaktion ist Interleukin-6. Der IL-6 Signalweg wird in vielen Krebsarten permanent aktiviert, einerseits durch eine Überexpression von IL-6 und andererseits durch die permanente Aktivierung von STAT3, einem Molekül der intrazellulären IL-6 Signalkaskade.

In der vorliegen Arbeit konnten wir zeigen, dass die IL-6 Stimulation nur in der benignen Tumor Keratinozyten Zelllinie HaCaT-ras A5 und nicht in der Fibroblasten-Zelllinie MSU1.1 zur Proliferationssteigerung führt. Diese Steigerung korreliert mit der Aktivierung des JAK/STAT Signalweges. Hier konnte gezeigt werden, dass STAT3 deutlich stärker in den HaCaT-ras A5 Zellen aktiviert wird, und eine Hemmung der STAT3 Aktivierung die Proliferation der HaCaT-ras A5 Zellen hemmt. Die STAT3 Aktivierung spielt somit eine zentrale Rolle in der Proliferation von HaCaT-ras A5 Zellen. In den Fibroblasten erklärt sich die geringere Aktivierung des JAK/STAT Signalweges durch eine erhöhte Hemmung des IL-6 Rezeptors durch SOCS3 im Vergleich zu den HaCaT-ras A5 Zellen. Auf Basis dieser Daten konnte mit Hilfe semiquantitativer Analysen der Aktivierungskinetiken des JAK/STAT Signalweges ein mathematisches Modell, welches das dynamische Verhalten der STAT3 und SOCS3 Proteine beschreibt etabliert werden.

Weiterhin kann IL-6 die Proliferation indirekt beeinflussen, indem es den HaCaT-ras A5 Zellen und Fibroblasten ein Netzwerk an Wachstumsfaktoren wie HGF, KGF, VEGF oder IL-8 aktiviert. Während IL-6 direkt keinen Einfluss auf die Proliferation von Fibroblasten hatte, konnte nach der Zugabe der konditionierten Medien von sowohl IL-6 stimulierten HaCaT-ras A5 als auch IL-6 stimulierten MSU1.1 zur jeweils anderen Zelllinie eine starke Erhöhung der Zellzahl detektiert werden.

Die vergleichende Genexpressionsanalyse zeigte deutlich, dass nach IL-6 Stimulation von etwa 16000 analysierten Genen nur 19 in HaCaT-ras A5 und Fibroblasten gleichsam hochreguliert werden. Dabei handelte es sich um Gene die eine Verbindung zum Interferon Signalweg haben was einen möglichen Hinweis auf die Ursache für die IL-6 induzierte Wachstumshemmung in Fibroblasten gibt.

Weitere Genexpressionsanalysen von IL-6 stimulierten HaCaT-ras A5 Zellen zeigten außerdem das der Proteinasen Inhibitor SerpinB4 dauerhaft hochreguliert wird. Eine Herunterregulation von SerpinB4 durch siRNA führte zu einer Reduktion der Proliferation in HaCaT-ras A5 Zellen, und gab so einen Hinweis darauf, dass SerpinB4 eine wichtige Rolle in der Regulierung der Proliferation spielt.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der genauen Regulation von IL-6 in Tumorund Stroma-Zellen sollte einen Aufschluss über den tumorfördernden Effekt von IL-6 geben und als mögliche Grundlage für neue therapeutische Interventionen dienen.

IV. Summary

The interactions between tumor cells and the microenvironment play a crucial role in tumor progression. Tumor cells secrete growth factors, cytokines and proteases and are thus able to affect the gene expression of stromal cells. Activated stromal cells like fibroblasts, immune cells and endothelial cells are able to promote tumor progression by releasing growth factors, cytokines and proteases. One of the factors which play a central role in this tumor- and stroma-interaction is interleukin-6. In many tumor entities, the IL-6 signal pathway is highly dysregulated by overexpression of IL-6 and otherwise by permanent activation of the STAT3 transcription factor.

In this work, we showed that IL-6 stimulation resulted in an increased proliferation of HaCaTras A5 benign tumor keratinocytes, but does not affect the fibroblast cell line MSU1.1.

This increase correlates with the activation of the JAK/STAT signaling pathway. We were able to demonstrate that the amount of activated STAT3 proteins after IL-6 stimulation in HaCaT-ras A5 cells is strongly up regulated and the inhibition of STAT3 activation also inhibits the proliferation of HaCaT-ras A5 cells. This showed the crucial role of the STAT3 activation in proliferation of HaCaT-ras A5 cells.

In contrast, fibroblasts showed a stronger inhibition of the JAK/STAT signal pathway by SOCS3 in comparison with the HaCaT-ras A5 cells.

All data where used to establish a mathematical model of JAK/STAT pathway which is able to describe the dynamic behavior of STAT3 and SOCS3 Proteins.

In addition to the effects shown, IL-6 is also able to affect the proliferation in an indirect manner. To this end, IL-6 stimulation activates a network of growth factors in HaCaT-ras A5 cells and fibroblasts like HGF, KGF, VEGF or IL-8. While IL-6 showed no direct influence of the proliferation of fibroblasts, the addition of the condition media of both IL-6 stimulated HaCaT-ras A5 and as well as IL-6 stimulated MSU1.1 resulted in strong up regulation of the cell numbers of the other cell line.

Comparative gene expression analyses clearly showed that upon IL-6 stimulation of over 16000 analyzed genes in HaCaT-ras A5 and Fibroblasts only a subset of 19 genes was up regulated in both cell types. The up regulated genes were found to be closely connected with the interferon signal pathway which gives a potential hint of the cause of the IL-6 induced inhibition of growth in fibroblasts.

Further gene expression analyses showed that the proteinase inhibitor SerpinB4, was permanently up regulated in IL-6 stimulated HaCaT-ras A5 cells. The down regulation of

SerpinB4 by siRNA knockdown indicated that SerpinB4 plays an important role in the proliferation of HaCaT-ras A5.

The observation of this work of the detailed regulation of IL-6 in tumor and stroma cells should give information about the tumor promoting effect of IL-6 and will ultimately serve as a basis for therapeutic therapies.

V. Zielsetzung

Das Tumorwachstum sowie die Tumorprogression wird stark durch die Wechselwirkung zwischen Mikroumgebung und Tumorzellen beeinflusst. Ein wichtiger Faktor der in der Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle spielen kann und in der Interaktion zwischen Tumorzellen und Zellen der Mikroumgebung von zentraler Bedeutung ist, ist IL-6 Um den Tumorfördernden Effekt von IL-6 zu untersuchen und die Erkenntnisse als mögliche therapeutische Grundlage zu nutzen sollte die Interaktion zwischen benignen Tumor

therapeutische Grundlage zu nutzen sollte die Interaktion zwischen benignen Tumor Keratinozyten (HaCaT-ras A5) und Fibroblasten unter dem Einfluss von IL-6 untersucht werden.

Hierbei wurde die direkte sowie indirekte Rolle von IL-6 der Proliferation und Migration auf HaCaT-ras A5 Zellen sowie auf die Fibroblastenzelllinine MSU1.1 sowie die Effekte von IL-6 auf die Genexpression in beiden Zelltypen untersucht.

Ziel war es, den proliferationsfördernden Effekt von IL-6 auf die HaCaT-ras A5 Zellen zu beschreiben sowie die Rolle der Fibroblasten in der Interaktion mit den HaCaT-ras A5 Zellen genau zu untersuchen.

Hierfür sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1. Welche Rolle hat IL-6 bezogen auf die Proliferation und Migration in HaCaT-ras A5 Zellen und in MSU1.1?
- 2. Beeinflußt IL-6 direkt durch bestimmte Veränderungen im Signalweg die Proliferation von HaCaT-ras A5 Zellen und MSU1.1 Zellen?
- 3. Kann IL-6 auch indirekt beeinflussen indem es f
 ür die Produktion bestimmter, proliferationsf
 ördernde Faktoren verantwortlich ist und wenn dem so ist, um welche Faktoren handelt es sich?
- 4. Kann die Proliferation von HaCaT-ras A5 Zellen nach IL-6 Stimulation durch gezielte Intervention im IL-6 Signalweg bzw. bei den IL-6 induzierten Genen gezielt gehemmt werden?

Die Daten dieser Arbeit sollten dazu noch als Grundlage für ein Mathematisches Model dienen, welches dynamische Veränderungen des IL-6 Signalweges in HaCaT-ras A5 und MSU Zellen beschreiben und vergleichen kann.

1 Einleitung

1.1 Der Tumor und seine Mikroumgebung

Unser Organismus ist ein komplexer Verbund aus Zellen und unterliegt mit seiner Vielzahl an Prozessen einer strikten Regulation. Dabei müssen solche Vorgänge, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose jeder einzelnen Zelle genau koordiniert werden. Um dieses Ziel zu erreichen können die Zellen auf verschiedene Weisen kommunizieren wie z.B. über Zell-Zell oder Zell-Matrix-Kontakte oder über lösliche Faktoren. Die Signaltransduktion, bei der Kommunikation über lösliche Faktoren wird durch Rezeptoren an der Zelloberfläche initiiert und durch intrazelluläre Signaltransduktionsproteine in ein Zusammenspiel unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren übersetzt, die die Genexpression regulieren. Die Signaltransduktionskaskaden sind in der Zelle in komplexen Netzwerken organisiert, um auf äußere Einflüsse Zell-spezifisch zu reagieren.

Krebs ist weltweit, hinter Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt 2013). Die Tumorprogression wurde 2000 von Hanahan und Weinberg in 6 Stadien untergliedert (Abbildung 1) [1]: (1) Tumorzellen entgehen dem programmierten Zelltod (Apopotse), (2) sie erringen eine unabhängige Eigenversorgung mit wachstumstimulierenden Signalen, (3) blockieren gleichzeitig wachstumshemmende Signalwege oder weichen diesen zumindest aus, (4) sie wandern in zellfremdes Gewebematerial ein (Metastase) beziehungsweise sterben nicht mehr in zellfremden Material (Anoikis). (5) Tumorzellen sorgen für eine ausreichende mit Nährstoffenzufuhr über den Blutkreislauf (Angiogenese) und geben (6) Information unbegrenzt, zum Beispiel an Tochterzellen, weiter.

Grundsätzlich, sind malignen Zellen charakterisiert durch unkontrolliertes Wachstum wobei die Tumorzellen in das gesunde Geweben eindringen und in weite Bereiche des Körpers gelangen können und Metastasen bilden [2, 3]. Eigenschaften wie die Selbstversorgung mit den Wachstumsfaktoren, das Invasions- und Metastasierungspotential, die Fähigkeit zur unlimitierten Proliferation und die Beeinflussung der Apoptose tragen zur Initiierung sowie zur Krankheitsprogression bei und stören somit die Homeostatse im gesunden Organismus [1]. Die wachstumsfördernden Stoffe können sowohl von der Tumorzelle selbst produziert werden (autokrin), als auch durch stromalen Nachbarzellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Entzündungszellen etc.) bereitgestellt werden (parakrin). Tumorzellen sind zudem fähig die anti-proliferativen Signale zu blockieren, die normalerweise die Zelle aus einem aktiven, proliferierenden Zustand in einen ruhenden Zustand (G0 Phase des Zellzyklus, quiescent) zwingen.



Abbildung 1: Die sechs Stadien von Krebszellen nach Hanahan und Weinberg, 2000 [1]

Schon 1889 formulierte Steven Paget die sogenannte "Seed and Soil Hypothesis", in der er postulierte, dass Zellen mit metastatischem Potential nur dort Metastasen ausbilden, wo sie auf eine Umgebung treffen, die ihr Wachstum fördert.

Mittlerweile werden die Tumorprogression und Invasion als Prozesse gesehen, die durch die Interaktionen zwischen Tumor und seiner Mikroumgebung, dem Tumorstroma, beeinflusst werden [4, 5].

1.2 Interaktionen zwischen Tumor und stromalen Zellen

In normalem Gewebe spielt eine komplexe Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Zelltypen, wie z.B. epithelialen Zellen und mesinchymalen Zellen, wie Fibroblasten, eine entscheidende Rolle für die Erhaltung einer normalen Gewebehomöostase. Im Tumorgewebe wird das Tumorwachstum sowie die Tumorprogression durch die Wechselwirkung zwischen Mikroumgebung und Tumorzellen stark beeinflusst [6].

Die Interaktion zwischen den Tumorzellen und der dazugehörigen Mikroumgebung verläuft beidseitig. Zum einen sind die Tumorzellen und von ihnen produzierten Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen fähig die Veränderungen in der Genexpression von stromalen Zellen hervorzurufen und beeinflussen somit phenotypsiche Eigenschaften dieser Zellen. Vice versa sind die stromalen Zellen, wie Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen, fähig durch Sezernierung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen des Tumorwachstum zu fördern (Abbildung 2) [7, 8].



Abbildung 2: Kommunikation zwischen Tumorzellen und Tumor Mikroumgebung [5]

Die Interaktionen von Tumor- und Mikroumgebung die sowohl parakrin, auf Zellen der unmittelbaren Umgebung, als auch autokrin, auf die Zelle selbst wirken, beeinflussen die Migration und Proliferation von Tumorzellen sowie Zellen aus der Mikroumgebung. Dabei können Zellen aus der Tumor-Mikroumgebung ihre phenotypsichen Eigenschaften ändern und zu tumorfördernden Zellen werden. Somit können letztendlich z.B. Fibroblasten die Migration von Tumorzellen in die Extrazelluläre Matrix (ECM) fördern [9].

Tumorzellen synthetisieren zahlreiche unterschiedliche Faktoren um eine Mikroumgebung zu schaffen, die die Tumorprogression fördert. Zu diesen Faktoren gehören "Basic Fibroblast Growth Factor" (bFGF), "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF), "Platelet-Derived Growth Factor" (PDGF), "Epidermal Growth Factor" (EGF), Interleukine, "Transforming Growth Factor- β " (TGF- β) und andere. Die Sekretion dieser Faktoren stört die normale Gewebehomöostase und aktiviert parakrin Zellen aus der Mikroumgebung wie Fibroblasten, Immunzellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Adipozyten die wiederum zusätzliche Wachstumsfaktoren und Proteasen ausschütten [8]. Die normale Organisation des Gewebes wird in dem durch den Tumor aktivierten Stroma durch eine funktionelle Unordnung ersetzt [10], wo Proteasen, die am Ab- und Umbau der Basalmembran und ECM wirken, die Voraussetzung für eine pro-migratorische und pro-invasive Umgebung schaffen (Abbildung 3) [5, 11].



Abbildung 3: Die natürliche Organisation des Gewebes wird durch das aktivierte Stroma durch eine funktionelle Unordnung ersetzt indem Proteasen am Ab- und Umbau der Basalmembran und ECM wirken und somit die Voraussetzung für eine pro-migratorische und pro-invasive Umgebung schaffen [5]

1.3 Rolle von Fibroblasten im normalen Gewebe und bei Tumorprogression

Im gesunden Gewebe haben Fibroblasten mehrere Funktionen, wie Bereitstellung der Extrazellulären Matrix (ECM), Regulation der epithelialen Differenzierung, Regulation von Entzündungsreaktionen und die Beteiligung am Heilungsprozess von Wunden [12, 13]. Fibroblasten spielen eine große Rolle bei der Synthese von Bestandteilen der ECM, wie Typ 1, Typ 2, Typ 5 Kollagen und Fibronektin [14], und tragen zur Bildung der Basalmembran durch Sezernieren von Kollagen 4 und Laminin bei [15]. Eine weitere wichtige Funktion haben Fibroblasten bei der Wundheilung, wo sie Wachstumsfaktoren ausschütten, die die Epithelzellen zur Migration und Proliferation anregen und die ECM bilden, die für andere Zellen als Gerüst dient und somit die Wundheilung fördert [12]. Die Fibroblasten werden durch die in der Wunde produzierten Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert und weisen dann einen höheren proliferativen Index auf und sezernieren eine höhere Menge an ECM Bestandteilen. Ist die Wunde geheilt, sinkt die Anzahl an aktivierten Fibroblasten wieder und die Fibroblasten nehmen wieder ihre normale Funktion auf.

Als wichtiger Bestandteil im Tumorstroma spielen Fibroblasten in allen Stadien der Tumorprogression und Invasion eine große Rolle, indem sie mit anderen stromalen Zellen und mit Tumorzellen durch Austausch von Mediatoren kommunizieren. Durch den Einfluss der von den Tumorzellen sezernierten Faktoren können Fibroblasten einer Änderung in der Morphologie und der Funktion unterliegen und sich in sogenannte cancer-activated Fibroblasten (CAF) wandeln (Abbildung 4 [16, 17]). Diese aktivierte Fibroblasten exprimieren

Vimentin, Desmin und Fibroblasten-Aktivierungs-Protein (FAP) sowie "Alpha Smooth Muscle Actin" (α SMA) [17] und verursachen eine Gewebekontraktion, die wiederum zu einer erhöhten Gewebehärte führen kann [18], die das Zellwachstum und die Zellmigration fördert. Die aktivierten Fibroblasten im verhärteten Gewebe entwickeln Stressfasern aus Aktin und Myosin und exprimieren dadurch erneut mehr α SMA. Hierdurch wird das Tumorstroma expandiert und es entsteht eine erhöhte Menge an ECM so dass sich eine dichte fibrotische Hülle um den Tumor entwickelt [17-19].



Abbildung 4: Transformation von Fibroblasten aus dem Gewebe in Tumor-aktivierten Fibroblasten (CAF) [17]

1.4 Zelluläre Kommunikation und Signaltransduktion

Die Zellen unseres Körpers müssen ihre Umgebung wahrnehmen und auf Änderungen reagieren können. Hierbei müssen Zellen fähig sein eine Vielzahl von Signalen, die sie von anderen Zellen erhalten, auszuwerten um innerhalb eines Organismus ihr Verhalten zu koordinieren. Die Zellen unterliegen dabei einem ständigen hoch komplexen Informationsaustausch. Die sezernierten Signalmoleküle werden von den Rezeptorproteinen der Zielzelle wahrgenommen, und in intrazelluläre Signale umgewandelt, die anschließend beantwortet werden können. Die Signaltransduktion beginnt dabei sobald das Rezeptorprotein ein Signal empfängt und somit intrazellulär eine Signalkaskade aktiviert, die das Zellverhalten ändert.

Bei enzymgekoppelten Rezeptoren fungiert die zytoplasmatische Seite des Rezeptors entweder selbst als Enzym oder bildet einen Komplex mit anderen Proteinen.

Bindet ein Signalmolekül an den Zytokin-Rezeptor, der in vielen Fällen aus mindestens zwei einzelnen Rezeptormolekülen besteht, bilden diese ein Dimer, das die Kinasefunktion aktiviert, was wiederum in einer intrazellulären Aktivierung durch Phosphorylierung resultiert. Diese Phosphorylierung vollzieht sich an spezifischen Tyrosinresten, weswegen die phosphorylierenden Enzyme auch Tyrosin-Kinasen genannt werden. Die Phosphorylierungskaskade ist so lange aktiv, bis ein aktiviertes Schlüsselprotein sich in den Zellkern bewegt und die Transkription spezifischer Zielgene aktiviert [20].

1.5 Interleukin-6 Zytokine

Zytokine repräsentieren eine große Familie von sezernierten Proteinen und Peptiden die an Zellrezeptoren binden und viele unterschiedliche biologische Antworten, wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose auslösen. Die Familie der Interleukin-6 (IL-6) Zytokine beinhalten Interleukin-11 (IL-11), Leukemia inhibitory factor (LIF), Oncostain M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1), Ciliary Neurotropic Factor (CNTF) und IL-6. Alle IL-6 Zytokine sind charakterisiert durch eine gemeinsame Struktur die sich durch vier lange α -Helixe Schleifen auszeichnet, die an bestimmten Regionen des Glykoproteinrezeptors 130 (gp130) binden können (Abbildung 5) [21].



Abbildung 5: Die vier langen alpha-Helix-Schleifen A,B,C und D gekennzeichnet durch unterschiedliche Farben. Die Rezeptor Bindestelle I,II und III sind als Kreise dargestellt [21]

Zytokine der IL-6 Familie können sowohl eine positive als auch eine negative Auswirkung auf die Entzündungsreaktion des Immunsystems haben und sind wichtige Faktoren in der Hämatopoese sowie wichtige Schlüsselfaktoren in der Akuten-Phase Reaktion und Immunantwort des Organismus [21]. IL-6 regt die Produktion von Akute-Phase Proteinen an, sowie die Entwicklung von spezifischen zellulären und humoralen Immunantworten, wie die terminale B-Zellen Differenzierung, die Immunoglobin Sezernierung und die T-Zellen Aktivierung oder Inhibierung. Die Deregulierung der IL-6 Expression zeigt sich in vielen Krankheiten, wie z.B. in Rheumatoider Arthritis und in vielen Arten von Krebs [22, 23].

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das eine wichtigste Rolle in der Wundheilung, Infektionen und in der Immunantwort spielt und bei den Entzündungsreaktionen und der Hämatopoese beteiligt ist [24, 25]. Es stimuliert die Produktion vieler Proteine der akuten Phase der

Entzündung, regelt aber auch die spezifische und humorale Immunantwort durch Zelldifferenzierung, Antikörpersekretion und T-Zellaktivierung oder Hemmung [26].

IL-6 wird hauptsächlich von Fibroblasten und Endothelzellen synthetisiert aber auch von Monozyten, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Eosinophile, Mastzellen, Gliazellen und Astrozyten [27].

1.6 IL-6 Rezeptorkomplex und der JAK/STAT Signalweg

Der IL-6 Rezeptor ist ein Hexamer, das aus zwei Untereinheiten, IL-6Rα und gp130, besteht. IL-6 bindet an die α-Untereinheit des IL-6 Rezeptorkomplexes, was zur Dimerisierung von zwei gp130 Molekülen führt, die das induzierte Signal ins Innere der Zellen übertragen [21, 28]. IL-6 induziert unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden wie den JAK-STAT Signalweg, den MAPK Signalweg und den PI3K Signalweg (Abbildung 6)[29, 30].



Abbildung 6: IL-6 induzierte Signalwege. Nach Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor, werden die JAK Proteine aktiviert die wiederum den zytoplasmatischen Tyrosin Teil des gp130 Rezeptors aktiviert. Der anschließend direkteste Weg zur Effektbildung ist die Aktivierung der STAT Proteine. Aber die MAPK und PI3K Signalwege werden aktiviert.

Der JAK-STAT Signalweg wird überwiegend von Zytokinen aktiviert, einschließlich der IL-6 Familie [31]. Nach der Bildung des IL-6 Rezeptorkomplexes, werden die am gp130 assoziierten JAK (Janus)-Moleküle autophosphoryliert und diese phosphorylieren wiederum bestimmte Tyrosinreste im zytoplasmatischen Bereich von gp130, die dann als Bindungsstellen für STAT Moleküle fungieren. Die inaktivierten STAT Moleküle binden an den gp130 Rezeptor-Komplex und werden von den JAK-Kinasen Tyrosin-phosphoryliert, was nach Dissoziation vom Rezeptor in einer Dimerisierung der STAT3 Moleküle resultiert. Im dimerisierten Zustand translozieren die STAT Moleküle als Homodimere (STAT3/STAT3) oder Heterodimere (STAT3/STAT1) in den Zellkern und fungieren dort als Transkriptionsfaktoren [21, 32]. Um eine Überstimulation in der Signaltransduktion zu vermeiden, werden aktivierte STAT Proteine durch die Protein Tyrosine Phosphatasen (PTPs) dephosphoryliert. Eine weitere Form der Signalterminierung kann durch die PIAS stattfinden, welche mit aktivierten STAT3 Molekülen an der DNA Bindedomäne interagieren und somit die STAT-induzierte Transkription inhibieren. Schließlich können auch die SOCS Proteine das Signal beenden, indem sie durch Binden an den Rezeptorkomplex die Downstream Aktivierung der STAT Proteine verhindert.

1.7 Janus Kinasen (JAK)

Die Familie der Janus Kinasen beinhaltet die vier Proteine JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2 (Tyrosine Kinase 2) mit einem Molekulargewicht von 120-140 kDa. Sie weisen eine Strukturhomologie mit sieben Segmenten auf (JH1-JH7) [33]. Alle vier Mitglieder der Familie haben die Kinasedomäne, JH1, und die Pseudokinasedomäne, JH2, gemeinsam [21] (Abbildung 7).

Janus Kinasen sind in die Signaltransduktion von Zytokinen, Lymphokinen und Wachstumsfaktoren wie IL-2, IL-6 und GM-CSF, INFa oder INFß involviert [34]. Während JAK3 überwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird [35], werden die anderen JAKs ubiquitär exprimiert [36]. JAKs sind nicht STAT spezifisch, stattdessen wird die Spezifität der STAT Phosphorylierung durch bestimmte Bindestellen, die am Rezeptormolekül gp130 vorhanden sind bestimmt [37].

1.8 Signal transducer and activator of transcription (STAT)

STATs sind in einer Vielzahl von Signalwegen involviert, was daran liegt, dass sie nicht nur durch Zytokinrezeptoren wie gp 130 aktiviert werden können, sondern auch durch Rezeptortyrosinkinasen (z.B. EGF-Rezeptor) und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (z.B. Interleukin-8-Rezeptor alpha [38]) [21]. STATs spielen eine große Rolle bei der Übermittlung von Signalen von der Zellmembran zum Zellkern und sind als Transkriptionsfaktoren auch an der Regulation der Genexpression beteiligt [39, 40]. Die Familie der STATs beinhaltet in Säugetieren die sieben Mitglieder STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6.

Die STAT-Proteine haben eine Größe von ungefähr 800 Aminosäuren und weisen die gleiche Struktur von sechs konservierten Domänen auf, die N-terminale-Domäne, die coiled-coil-Domäne, die DNA-Bindungs-Domäne (DBD), eine Linker-Domäne, eine SH2-Domäne und eine Transaktivierungs-Domäne (TAD). In der Nähe des C-Terminus weisen alle STAT-

Transkriptionsfaktoren ein spezifisches Tyrosin auf, dessen Phosphorylierung Voraussetzung für die Aktivierung des Proteins ist [21, 41] (Abbildung 7).

Durch die Aktivierung der STATs und die dadurch gebildeten Dimere (Homodimer oder Heterodimer), bildet die DNA-Bindungs-Domäne einen Komplex, der an die Doppelhelix im Zellkern bindet [42]. STAT3 wird nicht nur durch IL-6-Typ-Zytokine aktiviert sondern kann auch durch IFN-IL-10 [43, 44], IL-21 [45] sowie durch Wachstumsfaktoren wie EGF oder PDGF aktiviert werden. Heinrich et al. zeigte 2003 das es sich bei den IL-6-Typ-Zytokinen um die potentesten physiologischen Aktivatoren von STAT3 handelt [21].



Abbildung 7: Domänen Organisation der im JAK/STAT involvierten Moleküle

1.9 Suppressor of cytokine signaling (SOCS)

Die SOCS-Familie besteht aus acht Mitgliedern (SOCS1-7 und CIS) und ist charakterisiert durch eine zentrale SH2-Domäne und eine C-terminale SOCS-Box (Abbildung 7). Unstimulierte Zellen weißen nahezu keine SOCS Proteine auf. Durch die Stimulation mit verschiedensten Zytokinen (IL-2, IL-3, IL-6-Typ Zytokine, EPO, IFNa, IFNg und andere) wird eine STAT abhängige SOCS-Expression induziert. Durch die hoch affine Interaktion von SOCS3 mit dem Rezeptormolekül gp130 und den JAKs findet eine spezifische Inhibition der gp130 Signaltransduktion und somit der STAT3 Aktivierung statt. Aus diesem Grund werden die SOCS-Proteine als Feedback-Inhibitoren der Zytokin-Signaltransduktion bezeichnet [46,

47]. Durch Zytokinstimulation wird die SOCS Expression schnell erhöht und wirkt im JAK-STAT Signalweg als klassischer Negativ-Regulator [48].

Die in Abbildung 7 gezeigte Struktur der SOCS Proteine zeigt die KIR-Region (Kinase Inhibitory Region). Durch Bindung als Pseudosubstrat an das aktive Zentrum der JAKs hemmt sie diese [49, 50].

Die IL-6 induzierte Signalkaskade wird hauptsächlich durch SOCS1 und SOCS3 negativ reguliert, wobei letzteres durch Bindung an die Phosphotyrosin-Bindestelle 759 des aktivierten gp130 die Aktivierung von JAKs verhindert [51].

1.10 Interleukin-6 und seine Rolle bei Krebs

In Krebs zeigt IL-6 ein kontroverses funktionelles Bild, da es zum einen tumorfördernd sein kann [22, 52, 53]; auf der anderen Seite kann IL-6 allerdings auch antitumorigene Effekte haben, wie die Aktivierung von Killerzellen [22].

Es ist bekannt, dass eine unkontrollierte Überexpression von IL-6 zu einer chronischen Entzündung führen kann, die eine starke Assoziierung mit vielen Krebsarten aufweist. So ist beispielsweise IL-6 ein autokriner Wachstumsfaktor bei vielen humanen Myelomen und anderen Tumorarten, welche IL-6 sezernieren. Auf der anderen Seite inhibiert IL-6 das Wachstum mancher solider Tumoren. Dieser Effekt ist allerdings nicht unbedingt ausschließlich positiv zu sehen, da inhibierende Effekte mit einer Abnahme der Zell-Zell-Interaktion verbunden sind, was ein erhöhtes Metastasierungspotential zu Folge hat [54-56].

In dem Netzwerk von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die Proliferation und Migration der Tumorzellen fördern können, scheint IL-6, besonders bei der Tumorprogression des Plattenepithelkarzinoms der Haut, eine übergeordnete Rolle als zentraler Regulator einzunehmen. So wurde gezeigt, dass durch die Transfektion von benignen HaCaT-ras A5 Zellen mit IL-6 die Progression von benignen zum malignen Tumorphänotyp induziert wurde [5, 6, 57, 58].

Die tumorhemmende Wirkung von IL-6 beinhaltet die Aktivierung von Makrophagen, eine Erhöhung der Produktion von Lymphokin-aktivierten Killerzellen und den Schutz der Neutrophile vor der Apoptose. Anderseits, konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass erhöhte Mengen an IL-6 im Serum mit dem Schweregrad der Krankheit, sowie mit schlechter klinischer Prognose korreliert [22, 52, 53, 59]. In Brustkrebszellen wurde gezeigt, dass IL-6 in vitro das Wachstum von Tumorzellen inhibiert [60], im weiteren Verlauf der Krankheit jedoch kann IL-6 durch die Regulation mehrere Faktoren wie z.B. der VEGF Expression die Metastasierung fördern. [61] In Brustkrebszellen wird die Förderung einer Medikamentenresistenz durch IL-6 gefördert, die durch die Aktivierung des Medikamentenresistenz Genes *mdr1* verursacht werden kann [25]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass IL-6 in Ovarialkarzinomen durch eine Migrationsförderung von Endothelzellen eine direkte Rolle in der Angiogenese spielt [62], bzw in Gebärmutterhalskrebs und Glioblastomzellen indirekt durch die Induktion des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Expression die Angiogenese fördert [63]. Untersuchungen zeigten außerdem, dass in IL-6 defizienten Mäusen eine geringere Angiogenese und eine langsamere Wundheilung stattfindet [64].

1.11 STAT3 Regulation in Krebs

Eine wichtige physiologische Aufgabe von Signalwegen ist die Regulation der Zellproliferation, der Entwicklung, Wiederherstellung und der Aufrechterhaltung des Änderungen des Signalprozesses sind die Hauptursache Gewebes. für die Tumorentwicklung. Eine erhöhte oder eine kontinuierliche Aktivierung der STAT Proteine spielt eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese und kann in vielen humanen Tumoren und Tumor-Zelllinien detektiert werden [65]. Eine ständige Aktivierung von STAT3 in Krebszellen verhindert die Apoptose von Tumorzellen und wurde erstmalig 1999 in Myelomzellen gezeigt, wobei die STAT3 Aktivierung das Überleben der Tumorzellen förderte, indem es das Anti-Apoptose Protein BCL-X₁ hochregulierte [66].

Mittlerweile weiß man, dass eine erhöhte STAT3 Aktivität in vielen Tumoren, von soliden Tumoren bis hin zu Leukämie und malignen Lymphomen, detektiert werden kann [67] (Tabelle 1).

Andauernde Aktivierung der STAT3 Proteine kann unterschiedliche Ursachen haben. Durchgehend aktive Janus Kinasen, fehlerhafte Funktion der Negativ-Regulatoren oder Überexpression von Signalkomponenten können zu einer kontinuierlichen STAT3 Aktivierung führen.

Viele Faktoren, die von Tumoren sezerniert werden, wie IL-6 oder VEGF, aktivieren STAT3 um eine Art "Feedforward" Mechanismus zu bilden, der durch ständige autokrine Stimulation zu einer erhöhten STAT3 Aktivierung in Tumorzellen sowie in tumorassoziierten Zellen führt [68].

In normalen Zellen ist die Aktivierung der STAT Proteine strikt durch Negativ-Regulatoren wie die SOCS Proteine oder die PIAS geregelt [21]. Eine Unterdrückung der SOCS3 Expression durch Hypermethylierung der Promoterregion wurde bei Lungenkrebs [69], Eierstockkrebs [70], Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches [71] und Leberzellkarzinom [72] beobachtet. In Brustkrebszellen ist eine erhöhte Menge an SOCS3 zu detektieren, jedoch ist die Funktionalität von SOCS3 beeinträchtigt, was darin resultiert, das SOCS3 seine Fähigkeit der STAT3 Terminierung verliert [73, 74] und somit die STAT3 Aktivierung ohne Regulation fortlaufend aktiv sein kann.

 Tabelle 1: Erhöhte STAT3 Aktivität in unterschiedlichen Tumorarten. (Tabelle Modifiziert von Hodge et al. 2005 [75])

Tumorart		
Multiple Myelome		
Solide Tumore:		
Brustkrebs		
Tumore des Kopf- und Nacken-Bereichs		
Nierenkrebs		
Darmkrebs		
Melanome		
Lungenkrebs		
Eierstockkrebs		
Pankreaskrebs		
Prostatakrebs		
Lymphome:		
Burkitt Lymphom		
Mycosis fungoides		
T-Zelllymphom		
Non-Hodgkin Lymphom		
Anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL)		
Leukämien:		
HTLV1-abhängig		
Akute-myeloische Leukämie (AML)		
Chronisch-lymphatische Leukämie (CLL)		
Akute-lymphatische Leukämie (ALL)		

1.12 IL-6 induzierten Faktoren und deren Rolle in der Tumor- Stroma Interaktion

IL-6 induziert sowohl in Tumorzellen als auch in Fibroblasten ein Netzwerk von Wachstumsfaktoren, die wiederum ihrerseits IL-6 und andere Faktoren in den Tumorzellen und den Zellen der Mikroumgebung induzieren können. Dieser Crosstalk spielt eine wichtige Rolle in der Tumorprogression. In Tumor-Keratinozyten wurde gezeigt, dass einige Faktoren die durch IL-6 reguliert werden, zur Tumorinvasion sowie zur Förderung von malignen und invasiven Tumoren führen können [76, 77]. Dazu gehören Interleukin 8 (IL-8), welches als Entzündungsmediator bei der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten in das entzündete Gewebe involviert und autokrin sowie parakrin eine tumorfördernde Rolle haben

kann [78-80], "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF), ein multifunktionales Zytokin mit zentraler Bedeutung sowohl in der Vaskulogenese als auch in der physiologischen und pathologischen Angiogenese, oder "Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor" (GM-CSF), ein regulatorisches Zytokin das in der Produktion, Differenzierung und Funktion von Granulozyten und Makrophagen eine entscheidende Rolle spielt.

In Fibroblasten induziert IL-6 die Expression von Hepatocyte Growth Factor (HGF), welches eine wichtige Rolle in der Wachstumskontrolle von Hepatozyten hat und ein Schlüsselfaktor in Leberregeneration ist und als Proliferations- und Migrationsfaktor für Epithelzellen wirken kann. HGF kann zudem invasives Krebswachstum induzieren [81, 82]. Auch der Keratinocyte Growth Factor (KGF) wird in Fibroblasten durch IL-6 induziert und spielt eine wichtige Rolle in der parakrinen Wachstumskontrolle von normalen Epithelzellen und stimuliert die Proliferation von humanen Keratinozyten [83-85]

IL-6 spielt also eine wichtige Rolle im Crosstalk zwischen Tumor und der Tumor-Mikroumgebung und beeinflusst die Expression unterschiedlicher Zytokine, die Tumorprogression fördern können.

1.13 Squamous cell carcinoma antigen (SCCA)

Das Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA) wurde zum erste Mal in Ovarialkarzinomen nachgewiesen [86] und daraufhin als Tumormarker für Plattenepithelkarzionome von unterschiedlichen Organen verwendet [87-89]. Die Analyse des SCCA Levels nach einer neoadjuvanten Chemotherapie wird verwendet, um Aufschluss über die Wirkung der Chemotherapie in Gebärmutterhalskrebs zu geben [90, 91].

SCCA wird von verschiedenen Plattenepithelkarzionomen, aber auch von normalem Plattenepithel exprimiert, und gehört zur Familie der Serine Proteinase Inhibitoren (Serpine), die in der Apoptose, Zellmigration und Invasion ein Rolle spielen. Die SCCA Proteine sind durch zweiGene, SCCA1 (SerpinB3) und SCCA2 (SerpinB4), codiert die eine hohe Homologie aufweisen [92].

Während SerpinB3 Serin-Proteinasen (z.B.: Chymotrypsin) und Cystein-Proteinasen (z.B.: Cathepsin K, S und L) inhibiert, ist SerpinB4 nur für die Inhibierung von Serin-Proteinasen zuständig (wie Chymase und Cathepsin G) [93-95]. Des Weiteren unterdrückt SerpinB4 in Krebszellen die Apoptose [96] und fördert durch die Inhibierung von E-Cadherin die Krebszellinvasion und Migration.

Eine erhöhte Konzentration an SCCA Proteinen kann am Anfang der Entzündungskrankheiten der Haut, wie Psoriasis und Neurodermitis, sowie in bei Menschen mit Plattenepithelkarzionomen in Gebärmutterhals, Kopf-Hals Bereich, und Lunge, detektiert werden, wobei die SCCA Konzentration mit dem Stadium der Tumorentwicklung korreliert [97-100].

1.14 Systembiologie

Mit Hilfe der Systembiologie möchte man ein umfassendes quantitatives Verständnis der dynamischen Interaktionen zwischen unterschiedlichen Faktoren, ihren Auswirkungen auf das Verhalten und die Wechselwirkungen aller Elemente in einem bestimmten biologischen System erreichen [101, 102]. Das daraus resultierende Wissen soll es ermöglichen, das Verhalten des Systems als Ganzes zu verstehen und vorher zu sagen. Durch die Interaktion zwischen den Laborexperimenten und Modellierung am Computer werden mathematische Modelle für ein bestimmtes System bzw. Netzwerk etabliert. Die Vorgehensweise vom Laborexperiment zum mathematischen Model ist vereinfacht in 5 Schritten definiert.

- 1. Die Auswahl des natürlichen Systems, wie der JAK-STAT Signalweg, das es zu modellieren gilt.
- 2. Definition des Modells. Hierbei werden die im System relevanten Faktoren bestimmt und experimentell auf quantitativer Ebene definiert.
- 3. Durch Beobachtung und Messung werden experimentelle Daten für die zu untersuchende Fragestellung gewonnen. Die erhaltenen Daten werden als mathematische Formel beschrieben und in Datenbanken gespeichert oder mit bereits bestehenden Datenbankeinträgen abgeglichen. Basierend auf den experimentellen Daten können somit mathematische Modelle erstellt sowie biochemische Hypothesen aufgestellt werden.
- 4. Durch ausreichende Validierung, die am Computer simulierte Szenarien experimentell bestätigt, kann das mathematische Modell zu weiteren Verwendung eingesetzt werden.
- Das validierte Model wird zur Analyse und Interpretation sowie zum Entwerfen neuer Experimente und Simulationen verwendet und kann auf weitere Faktoren expandiert werden.



Abbildung 8: 5 Schritte definieren den Prozess vom Laborexperiment zum mathematischen Model

Die temporären Dynamiken der im Signalweg involvierten Faktoren werden durch gewöhnliche Differenzialgleichungen beschrieben, welche die chemische Reaktion zeigen, die aus der Michaelis-Menten Gleichung abgeleitet wurden [103].

Durch die Arbeiten der Systembiologie ist es möglich jeden biologischen oder biochemischen Prozess zu modellieren, der aus einer fundierten Datengrundlage besteht oder für den eine solche erzeugt werden kann.

Ein weiterer positiver Aspekt der Modellierung ist die Unterstützung der Durchführung von Experimenten durch die Simulation von verschiedenen Szenarien. Beschriebene Dynamiken von definierten Faktoren können einfacher und genauer betrachtet werden ohne, dass veränderungen von anderen Systemkomponenten notwendig werden. Ziel der mathematischen Modellierung für biologische Prozesse ist es, vorab durch gezielte Fragestellung die Laborarbeit effektiver, zielgerichteter und schneller zu gestalten. Bei der Aufklärung von Signalmechanismen durch fehlregulierung in Krankheiten und bei der Identifikation von bestimmten Reaktionsschritten in Fehlerhaften Prozessen, ermöglicht die Systembiologie neue Perspektiven für Biomedizinische Wissenschaft und sollte in der Lage sein die sinnvolle Medikamentenentwicklung zu beschleunigen [101, 102].

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden unter konstanten Kulturbedingungen (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) steril kultiviert. Die Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Baker Company Inc., Maine, USA) durchgeführt.

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die benigne tumorigene Keratinozyten-Zelllinie HaCaT-ras A5 sowie die Fibroblasten Zelllinie MSU1.1 verwendet.

2.1.1.1 HaCaT-Zelllinie

Die spontan immortalisierte humane Keratinozyten-Zellinie HaCaT (Human adult, niedrig Calcium, hohe Temperatur) war in der Abteilung "Differenzierung und Carcinogenese" (DKFZ, Heidelberg) aus einer normalen Primärkultur menschlicher Epidermiszellen generiert worden. Die Primärkultur stammt aus dem Umfeld eines Melanoms eines männlichen Patienten [104]. Um die terminale Differenzierung zu reduzieren, wurden die Keratinozyten in Medium mit geringem Kalziumgehalt kultiviert. Durch das Einstellen der Kultivierungstemperatur auf 38,5° C, wurde die Proliferation verstärkt. Hierbei kam es zu einer spontanen Immortalisierung der Keratinozyten, die durch eine spontane Mutation des p53-Gens ausgelöst wurde. Durch eine stabile Transfektion mit H-Ras-Onkogen wurde die Zelllinie benigne tumorigene HaCaT-ras A5 etabliert.

2.1.1.2 MSU1.1-Zelllinie

Die nicht tumorigene Zelllinie MSU1.1 wurde an der Michigan State University etabliert. Hierbei wurden diploide humane Vorhaut-Fibroblasten mit dem v-myc Onkogene transfiziert.

2.1.2 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad für 10 Minuten erwärmt und die aufgetaute Zellsuspension in 10 cm Kulturschalen mit entsprechendem vorgewärmtem Kultivierungsmedium (9 ml) überführt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um das Glycerin, das die Funktion eines Gefrierschutzmittels hat, zu entfernen.

2.1.3 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der für die Untersuchungen verwendeten Zellen, wurde mit in Tabelle 2 aufgeführten Kulturmedien und Lösungen durchgeführt. Der Mediumwechsel erfolgte 3 mal wöchentlich.

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
DMEM	Dulbecco's MEM Medium	Cambrex
	Bovines Serumalbumin (FCS) 10 %	Biochrom
	Penicillin/Streptomycin (0,1 mg/ml)	Biochrom
4x MEM	4x MEM	Biochrom, Serva
	FCS (10 %)	Biochrom
	Penicillin/Streptomycin (0,1mg/ml)	Biochrom
	Geniticin 418 (0,2 mg/ml)	PAA
PhenoIrot	PBS –	Boehringer MA
	Phenolrot (0,5 %)	Biochrom
Ethylendiamintetraessigsäure-	EDTA in PBS – (0,05 %)	Serva
Lösung (EDTA)	Phenolrot (1 µg/ml)	Biochrom
Trypsin-Lösung	In PBS – (0,1 %)	Boehringer MA
	Phenolrot (1 µg/ml)	Biochrom
Trypsin / EDTA-Lösung	Trypsin (50 %)	Boehringer MA
	EDTA (50 %)	Serva
80 %iger Ethanol	Reinethanol (80 %)	Riedel-de Haën
	destilliertes H ₂ O (20 %)	
Phosphatgepufferte	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Serva
Salzlösung (PBS ⁻)		

Tabelle 2: Für die Kultivierung der Zellen verwendeten Kulturmedien und Lösungen

2.1.4 Passagieren von Zellen

Die konfluenten Zellen wurden mit EDTA gespült, um Mediumreste zu entfernen, da serumhaltige Medien die Wirkung der nachfolgenden Behandlung mit Trypsin hemmen.

Um kalziumabhängige Zell-Zell-Verbindungen zu lösen, wurden die HaCaT-ras A5 Zellen etwa 18 Minuten bei 37°C mit EDTA inkubiert. Danach wurde das EDTA abgesaugt und es folgte eine Behandlung mit Trypsin/EDTA (ca. 3-5 Minuten), wodurch die Zellen von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst wurden.

Die MSU1.1 Zellen wurden dagegen nur kurz mit EDTA gespült und anschließend mit Trypsin behandelt (ca. 3 Minuten). Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren der erhaltenen Zellsuspension konnten die Zellen vereinzelt werden. Danach wurde die Wirkung von Trypsin durch Zugabe von serumhaltigem Medium abgestoppt.

Die Zellzahl wurde anschließend mit einem CASY® Zählgerät und Analysesystem Modell TCC bestimmt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur (RT), 5000 rpm, 250g, für 5 Minuten

abzentrifugiert (Laborfuge400, Heraeus), der Überstand abgesaugt, die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in gewünschter Zellzahl ausgesät.

2.1.5 Einfrieren von Zellen

Bevor die Zellen in der Gasphase des Flüssigstickstofftanks (-172 °C) eingefroren werden konnten, mussten sie wie unter 2.1.4 beschrieben, trypsiniert und ihre Zellzahl bestimmt werden. 2x 10⁶ Zellen/ml wurden in kaltem Einfriermedium (Tabelle 3) resuspendiert. In jedem Einfriergefäß wurde 1 ml Zellsuspension eingefroren. Die Gefäße wurden anschließend in einem speziellen Einfriercontainer (Nalgene Nunc, USA), der mit 250 ml 2-Propanol gefüllt war, zunächst 1 h bei 4°C abgekühlt und dann bei -80°C eingefroren. Der Einfriercontainer war nötig, um die Zellen langsam mit einer Abkühlrate von 1°C/min einzufrieren, wodurch das im Einfriermedium enthaltene Glycerin, was als Frostschutzmittel dient und die Eisbildung verhindert, in die Zelle eindringen konnte. Nach 24 h wurden die Röhrchen in die Gasphase des Flüssigstickstoffs überführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Einfriermediums

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
	DMEM (70 %)	Cambrex
Einfriermedium	FCS (20 %)	Biochrom
	Glycerin (10 %)	Merck

2.1.6 Zellzahlbestimmung mit dem CASY® Zählsystem

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem CASY® Zählgerät und Analysesystem Modell TCC von Schärfe Systems. Die Messung beruht auf der Partikelmesstechnik mit Widerstandsmessung und wurde nach Angabe des Herstellers durchgeführt. 50 µl der Zellsuspension wurde zu 10 ml CasyTon-Lösung gegeben und durch invertieren gemischt. Die Zellzahl wird vom CASY® Zählgerät in Zellen/ml ausgegeben.

2.1.7 Mykoplasmentest

Die verwendeten Zelllinien wurden standardmäßig auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Die Analyse wurde mit dem Venor[®]GeM Classic Mykoplasmentest (Minerva Biolabs, Berlin) nach Hersteller-Protokoll durchgeführt.

Hierbei wurde 1 ml des Überstandes der zu untersuchenden Zelllinie bei RT, 10000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert um eine Anreicherung von Mykoplasmen zu erreichen. Anschließend wurden 900 µl des Überstandes verworfen und bei den verbleibenden 100 µl eine Hitzeinaktivierung der Proteine durch eine Inkubation bei 95°C für 10 Minuten durchgeführt. Nach weiterem Zentrifugieren wurden 2 µl für eine mykoplasmenspezifische PCR mit den Primern des Herstellers verwendet.

2.1.8 Hungern und stimulieren der Zellen mit IL-6

Um eine unspezifische Signaltransduktion, ausgelöst durch im FCS enthaltene Faktoren, auszuschließen und den Effekt von IL-6 auf die Signaltransduktion ohne diese unspezifische Stimulation zu analysieren, wurde das Kulturmedium in HaCaT-ras A5 Zellen für 24 Stunden durch FCS-freies Medium ersetzt, bei MSU1.1 Zellen - für 7 Stunden. Dieser Vorgang wird auch "hungern" bezeichnet. Anschließend wurden die Zellen mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert.

2.1.9 Proliferationsassay

Für die Analyse der Proliferation wurden 20.000 HaCaT-ras A-5 oder MSU1.1 Zellen pro Well auf eine 24-Well Platte (Nunclon Surface, Nunc, Roskilde, Dänemark) in Triplikaten ausgesät.

Die ausgesäten Zellen wurden über Nacht kultiviert bevor das Kulturmedium durch FCSfreies Medium ersetzt wurde. Nach 24 Stunden hungern wurden die Zellen, je nach Fragestellung, mit denen in Tabelle 4 angegeben Faktoren behandelt. Nach einer Inkubation von 24, 48 und 72 Stunden wurden jeweils Messplatten entnommen. Zellen wurden mit PBSgewaschen und die Zellkulturplatte bei -20 °C eingefroren um die Zellen aufzuschließen.

Zelllinie	Medium	Konzentration	Hersteller	
HaCaT-ras A5	4x MEM		R&D	Systems,
	rh IL-6	100 ng/mL	Minneapolis	, USA
	4x MEM		R&D	Systems,
	rh IL-6	100 ng/mL	Minneapolis	, USA
	STAT3 Inhibitor,		Merk	Millipore,
	SATTIC	20 nM	Darmstadt	
MSU1.1	DMEM		R&D	Systems,
	rh IL-6	100 ng/mL	Minneapolis	, USA
	DMEM		R&D	Systems,
	rhIL-6	100 ng/mL	Minneapolis	, USA
	STAT3 Plasmid aus	6 ng		
	2.2.14			

Tabelle 4: Stimulationskonditionen	für Proliferationsanalyse in H	laCaT-ras A5 und MSU1.1 Zellen

Die Analyse der Proliferation wurde mittels einer SYBR Green-I Färbung durchgeführt. SYBR Green-I ist ein DNA-interkalierender Cyanin-Farbstoff und wird zum Nachweis

doppelsträngiger DNA verwendet. Der Farbstoff bindet hierbei an die DNA und bildet einen DNA-Fluoreszensfarbstoff-Komplex welcher blaues Licht bei 494 nm absorbiert und grünes Licht bei 521 nm emittiert. Zur Analyse wurde die Platten für 10 Minuten bei RT aufgetaut, mit 1 ml/well SYBR Green-I Färbelösung (Tabelle 5) versetzt und eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert.

Tabelle 5: Zusammensetzung der SYBR-Green-I Lösung

Reagenz	Konzentration	Hersteller
PBS-	1x	Serva
SYBR-Green-I	1:2500	Molecular Probes
Triton X-100	0,1%	Sigma-Aldrich

Die Platten wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit einem Fluoreszenzplattenlesegerät (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 485/538 (Emission/Absorption) gemessen und ausgewertet.

Neben den Messplatten wurden bei jedem Versuch noch 3 weitere Platten angelegt. Eine Standard-Aussaatplatte, bei der unterschiedliche Menge an Zellen (von 10.000 bis 100.000 pro Well) ausgesät wurde. Direkt nach Absetzen der Zellen (12 – 16 Stunden) wurden die Platten entnommen, mit PBS gewaschen, eingefroren und nach Beendigung des Versuches mit den anderen Platten mit SYBR Green gefärbt. Die gemessene Fluoreszenzintensität war dabei proportional zur Zellzahl und ermöglichte eine Umrechnung der gemessenen Fluoreszenz zu der entsprechenden Zellzahl bei den übrigen Platten.

Die zweite Kontrollplatte mit der gleichen Zellzahl wie die Messplatten wurde vor dem hungern der Zellen entnommen und diente als Aussaatkontrolle.

Die dritte Kontrollplatte, die als Kontrolle für die Proliferation der gehungerten Zellen diente, wurde wie andere Messplatten mit FCS-freiem Medium, allerdings ohne stimulierenden Faktor, inkubiert und danach entnommen.

2.1.10 Migrationsassay

Die Migration von HaCaT-ras A5 sowie MSU1.1 Zellen nach IL-6 Stimulation wurde mit Hilfe eines Scratch-Assays untersucht. Um ein gleichmäßigen Scratch zu erzeugen wurden die speziellen Inserts der Firma Ibidi verwendet. Diese Inserts bestehen aus zwei Kammern, die durch eine 500µm Barriere getrennt sind (Abbildung 9). Die Kammern wurden am Boden der Wells von 24-well Platten positioniert (1 Kammer/Well). In jede Kammer wurden 70000 Zellen in 70 µL Kulturmedium gegeben, über Nacht inkubiert und danach gehungert (HaCaTras A5 24h, die MSU1.1 7h). Anschließend wurden die Inserts entfernt und die Wells mit 1 ml Medium aufgefüllt. Die entstandene zellfreie Fläche wurde direkt nach der Entnahme mit dem Olympus IX70 Mikroskop und einer Zeiss AxioCam ERc5s fotografiert und als Zeitpunkt "0" bezeichnet. Die Zellen wurden anschließend mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde erneut dieselbe Fläche fotografiert. Um die Reproduzierbarkeit des Versuches zu gewährleisten, wurde dieser Versuch 3 mal wiederholt. Die Bilder der Zeitpunkte 0 und 24 h wurden mittels Adobe Photoshop übereinander gelegt und die Migrationsfläche gemessen.



Abbildung 9: Links: IBIDI-Kultur Insert. In die zwei Kammern des Inserts wurden jeweils 70000 Zellen ausgesät. Rechts: Nach Entnahme des Insert entsteht eine 500 µm breite zellfreie Fläche. (Quelle der Bilder: www.ibidi.com)

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 Herstellung der Lysate

Zur biochemischen Untersuchung der Proteine war es erforderlich, die Zellen mittels Lysispuffer (IP-Lysispuffer) in Anwesenheit von Detergenzien aufzuschließen. Um einer Proteindegradation durch Proteasen vorzubeugen, wurden Protease-Inhibitoren zugesetzt und alle Schritte der Lyse auf Eis und mit gekühlten Lösungen durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 6 gegeben.

Die konfluenten Zellen wurden zunächst mit Kulturmedium ohne FCS einmal gespült und anschließend gehungert (HaCaT-ras A5 für 24 h und Fibroblasten für 7 h). Vor der Lyse wurden die Zellen mit IL-6 (100 ng/ml) für verschiedene Zeitintervalle stimuliert (Zusammensetzung der IL-6 Stocklösung ist in Tabelle 7 dargestellt). Als Kontrolle wurden nicht stimulierte Zellen verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen zur Lyse von Zellen

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
1 % NP-40-Lysispuffer	Tris-HCL pH 7,4 (20 mM)	Sigma
	NaCl (150 mM)	Sigma-Aldrich
	EDTA (1 mM)	Serva
	ZnCl ₂ (1 mM)	Serva
	MgCl ₂ (1mM)	Serva
	Glycerin (10%)	Sigma
	Nonidet P40 (1 %)	Roche Diagnostics
	destilliertes H ₂ O	
Nukleus-Lysispuffer	NaCl (420 mM)	Sigma-Aldrich
	KCI (10 mM)	Roth
	Hepes pH 7,9 (20mM)	Roth
	Glycerin (20 %)	Sigma
	DTT (1 mM)	Serva
	Nonidet P40 (0,1 %)	Roche Diagnostics
	destilliertes H ₂ O	
IP-Lysispuffer	NaCl (150 mM)	Fluka
	Tris, pH 7,4 (20 mM)	Sigma
	EDTA (1 mM)	Gerbu
	ZnCl ₂ (1 mM)	Serva
	MgCl ₂ (1 mM)	Serva
	NaF (10 mM)	Sigma
	Glycerin (10%)	Sigma
	Nonidet P40 (1 %)	Roche Diagnostics
	destilliertes H ₂ O	
Protease-Inhibitoren	Leupeptin (1 µg/ml)	Roche Diagnostics
	Pepstatin (1 µg/ml)	Roche Diagnostics
	Aprotinin (1 µg/ml)	Roche Diagnostics
	Natriumorthovanadat (500 mM)	Serva
	Pefablock (50 µM)	Roche Diagnostics

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
IL-6 Stocklösung	IL-6 Faktor (10µg/ml)	R&D
	PBS ⁻ (1x)	Serva
	BSA (0,1 %)	PAA

Tabelle 7: Zusammensetzung der IL-6 Stocklösung

Für die Isolation der gesamten Proteinfraktion wurden die Kulturschalen nach der Stimulation zuerst mit TBS (Tabelle 12) gespült. Danach wurden die adhärenten Zellen mechanisch mit einem Zellschaber in 0,5 ml IP-Lysispuffer abgelöst, die Lysate durch Pipettieren suspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 20 Minuten bei 4°C über Kopf rotiert. Durch anschließende Zentrifugation wurden die Zelltrümmer abgetrennt, der klare Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren.

Auch für die getrennte Isolation der cytosolischen und nukleären Proteinfraktion wurden die Kulturschalen nach der Stimulation zuerst mit TBS gespült. Danach wurden die adhärenten Zellen mechanisch mit einem Zellschaber in 0,5 ml 1% NP-40-Lysispuffer abgelöst, die Lysate durch Pipettieren suspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 20 Minuten bei 4°C über Kopf rotiert. Die nukleäre Fraktion wurde durch eine anschließende Zentrifugation (5 Minuten, 5000 rpm, 4°C) abgetrennt (Pellet), die cytosolische Fraktion (klarer Überstand) abgenommen und für die nachfolgenden Experimente weiterverwendet.

Die nukleäre Fraktion wurde mit 1% NP-40-Lysispuffer gewaschen, um restliche cytosolische Proteine zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, 5000 rpm, 4°C) wurde das Pellet in 150 µl Nukleus-Lysispuffer resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Für weitere Versuche wurde die nukleäre Fraktion auf Eis aufgetaut, mit Ultraschall homogenisiert (Bandelin Sonoplus, 4 s, 3 Zyklen) und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 Minuten, 13000 rpm, 4°C) worden waren, wurden die nukleären Lysate (Überstand) in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 1% NP-40-Lysispuffer auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt.

2.2.2 BCA-Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Pierce BCA Test von Thermo Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt.

Der Nachweis basiert darauf, dass die Aminogruppe von Proteinen in alkalischer Lösung Cu₂₊ zu Cu₊ reduziert. Dabei reagiert Cu₊ mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Komplex. Die Farbreaktion wird kolorimetrisch gemessen. Als Referenzprotein wird Rinderserumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich 0-2 mg/ml genutzt.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde die Referenzlösung sowie die zu analysierende Probe 1:10 verdünnt. 10 µl der Verdünnung wurde auf eine 96-well Platte mit 200 µl BCA-
Reagenz vermischt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen (Multiskan FC, Thermo Scientific) und die Proteinkonzentration der Proben anhand der für BSA erstellten Standardkurve berechnet.

2.2.3 Immunopräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine Methode, durch die einzelne Proteine aus einem Zell-Lysat isoliert werden können. Die Methode basiert auf der Bindung zwischen Proteinen und spezifischen Antikörpern. Die gebildeten Antikörper-Antigen Komplexe können dann durch Inkubation mit unlöslichen Formen von Antikörper-Bindungsproteinen, die an einen unlöslichen Träger gebunden sind, aus dem Lysat entfernt werden. Gängige Träger sind Agarose- oder Sepharose- "Beads" (Mikro-Kügelchen) als Gel-Suspension.

Für einen IP-Ansatz (Tabelle 8) wurden die "Beads" (Santa Cruz), der entsprechende Antikörper und ein GST-markiertes rekombinantes Protein, das als interner Standard fungierte, zu den Lysaten gegeben und über Nacht bei 4°C rotiert. Die Zusammensetzung der verschiedenen IP Ansätze ist in Tabelle 8 dargestellt.

Komponente	Menge	Komponente	Menge	Komponente	Menge
Lysat	500 µl	Lysat	500 µl	Lysat	500 µl
GST-STAT3	2 µl	GST-gp130	1 µl	SBP-SOCS3	5µl
STAT3-Ak	10 µl	gp130-Ak	50 µl	SOCS3-Ak	5 µl
"Beads"	30 µl	"Beads"	30 µl	"Beads"	30 µl

Tabelle 8: IP-Ansätze für STAT3, gp130 und SOCS3

Danach wurden die "Beads", an denen nun die Antikörper und das gesuchte Protein gekoppelt waren, abzentrifugiert (13000 rpm, 1 Minuten, 4 °C) und je einmal mit 1% NP-40-Lysispuffer und TNE-Puffer (Tabelle 9) gewaschen. Danach wurden die Proben mit 2x Ladepuffer (Tabelle 11) versetzt und aufgekocht (95 °C, 5 Minuten), wodurch die "Beads" vom Antikörper-Protein Komplex getrennt wurden. Diese Komplexe wurden dann auf ein 10 %iges Polyacrylmid-Gel aufgetragen.

Tabelle 9: Zusammensetzung des TNE-Puffer

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
TNE-Puffer	Tris-HCl ph 7,4 (10mM)	Sigma
	NaCl (100mM)	Flika
	EDTA (1mM)	Gerbu
	Natriumorthovanadat (50 mM)	Serva
	destilliertes H ₂ O	

2.2.4 SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung des Proteingemischs nach der Molekülgröße wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) durchgeführt. Hierzu wurden vertikale Gelapparaturen (BioRad Laboratories, München) verwendet. Die Zusammensetzung der Sammel- bzw. Trenngele ist in der Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Sammel- bzw. Trenngele für die SDS-Gelelektrophorese

Zusammensetzung	Sammelgel (2,8%)	Trenngel (10%)
Acrylamid (40%)	1 ml	7,5 ml
Methylenebisacrylamid	0,5 ml	1,95 ml
(2%)		
Tris-HCI (1M, pH 6,8)	1,25 ml	
Tris-HCI (1,5M, pH 8,8)		7,7 ml
Natriumlaurylsulfat	100 µl	300µl
(SDS) 10%		
H ₂ O	7,15 ml	12,75 ml
Ammoniumperoxodisulfat	100 µl	300 µl
(APS)		
N,N,N',N'-	10 µl	30 µl
Tetramethylethylendiamin		
(TEMED)		

Die Proteinlysate wurden bei 95°C in 2x Proben Puffer (Tabelle 11) denaturiert und anschließend auf das Sammelgel aufgetragen.

Reagenz	Zusammensetzung	Hersteller
2 x Probepuffer	2 ml Glycerol	
	1 ml ß-Mercaptoethanol	Sigma
	2,5 ml 0,125 M Tris-HCl pH	
	6,8	
	0,4 g SDS	
	0,4 µg Bromphenol Blau	
Laufpuffer	33 mM Tris	Sigma
	194 mM Glycin	Roth
	0,1 % SDS	Gebru
Transferpuffer	33 mM Tris	Sigma
	194 mM Glycin	Roth
	20 % Methanol	Baker

Tabelle 11: Benötigte Puffer für die SDS-Page und Western Blot

Im Trenngel werden die Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Regenbogen-Proteinmarker (GE Healthcare, Freiburg) aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 4°C im Laufpuffer (Tabelle 9) bei U =80-100 V und I_{max} = 45 mA.

2.2.5 Western Blot und Immunodetektion

Bei der Immunodetektion werden die zu untersuchenden, membrangebundenen Proteine mittels Primärantikörpern, die spezifisch an die Proteine binden, und substrat-gekoppelten Sekundärantikörpern, die wiederum an die Primärantikörper binden, nachgewiesen. Dabei wird das Substrat von einem Detektionsreagenz umgesetzt was zu einer Lichtemission führt, die detektiert werden kann. Die zur Immundetektion verwendeten Lösungen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Die über die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman GmbH, Dassel) mit einer Porengröße von 0,2 µm, übertragen. Das Blotten wurde in Semi-Dry Blottapparaturen (BioRad Laboratories, München) in Transferpuffer (Tabelle 11) für eine Stunde bei 12 V durchgeführt.

Nach der Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese 3 mal mit TBS-T gewaschen und anschließend wurden in TBS-T + 2 % BSA für 1 h bei RT die unspezifischen Bindestellen blockiert. Anschließend wurden die Membranen für 5 Minuten mit Ponceau Red gefärbt, um den erfolgreichen Transfer zu verifizieren, da der Ponceau Farbstoff sich unspezifisch an Proteine anlagert. Die Ponceau gefärbte Membran wurde anschließend mit TBS-T gewaschen. Um erneut unspezifische Bindungsstellen für

Antikörper zu maskieren, wurde die Membran in der Blockierlösung (1x TBS, 2 % BSA) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach der Blockierung wurde der entsprechende primäre Antikörper (Tabelle 13) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C rotiert.

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
10x Tris-buffered Saline	Tris-HCI (24,2 g/I)	Sigma
(TBS)	NaCl (80 g/l)	Fluka
	pH 7,6 bei 25 °C	
Blockierlösung	TBS 1x	
	BSA (2 %)	
	Tween-20 (0,1 %)	
Waschpuffer TBS-T	TBS	1x
	Tween-20 (0,2 %)	Merck
Prim. Antikörper	TBS	
Lösungspuffer	BSA (5%)	PAA
	Tween-20 (0,1%)	MERCK

Tabelle 12: Zur Immunodetektion verwendete Lösungen

Danach wurden die Membranen einmal mit bidest. H₂O und 3 mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Tabelle 14), der in TBS-T gelöst war, für 1 h bei RT inkubiert. Dann wurde 3 mal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte eine Nachweisreaktion ECL™ basierend auf Chemolumineszenz mit Western-Blot Detektionsreagenz (Amersham). Dabei wird das Detektionsreagenz Luminol durch die Peroxidase oxidiert und so in einen angeregten Zustand überführt. Unter Lichtemission fällt Luminol anschließend in seinen Grundzustand zurück, wobei das emittierte Licht durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fujifilm) oder alternativ durch Lumilmager (Roche Applied Science, Mannheim) detektiert wurde.

Tabelle 13: Primäre Anitkörper

Primäre Antikörper	Spezifikation	Verdünnung	Hersteller
STAT3	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Phospho-STAT3	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
(Tyr705)			
Phospho-STAT3	Maus	1:1000	Cell Signaling
(Tyr705)			
gp130	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
SOCS3	Maus	1:1000	Invitrogen

Tabelle 14: Sekundäre Antikörper

Sekundärer	Тур	Verdünnung	Hersteller
Antikörper			
Anti-Maus	POX	1:10000	Dianova
Protein-A	POX	1:10000	GE Healthcare

2.2.6 Strippen der Membran

Um die Primärantikörper von den Proteinen auf der Membran abzulösen und diese damit für neue (andere) Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Membranen gestrippt. Bei diesem Verfahren wurden die Membranen mit Strippuffer überschichtet und bei 56°C für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Membranen 6-8 mal mit TBS-T gewaschen und dann für 1 h bei RT mit Blockierlösung auf dem Schüttler inkubiert.

Nach dem Strippen kann die Western Blot Membran einer weiteren Detektion mit primären Antikörpern unterzogen werden.

Die Zusammensetzung des Strippuffers ist in Tabelle 15 aufgeführt.

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Strippuffer	Tris-HCl; pH 6,7 bei 25 °C (62,5 mM)	Sigma
	SDS (2 %)	Gerbu
	β-Mercaptoethanol (1%)	Serva

Tabelle 15: Zum Strippen verwendeter Puffer

2.2.7 RNA Isolation

Die Isolation von RNA aus Zellen ermöglicht eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt, da nur die Gene, die auch aktuell in der Zelle transkribiert werden, in diesem Moment als RNA vorliegen.

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit dem "RNeasy Mini Kit" von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Guanidin-Thiocyanat-Methode in Kombination mit einer spezifischen RNA-bindenden Säule. Bei dieser Methode werden RNA-Moleküle mit mindestens 200 Nukleotiden isoliert, wodurch neben ribosomaler RNA vor allem mRNA-Moleküle angereichert werden und die kleineren Moleküle (tRNAs, 8S rRNA, 5S rRNA) abgetrennt werden.

90 – 100% konfluente, in 6 cm Schalen kultivierten MSU 1.1 Fibroblasten und HaCaT-ras A5 wurden zuerst im Medium ohne FCS gehungert (Fibroblasten für 7 h und HaCaT-ras A5 für 24 h). Danach wurden die Zellen mit IL-6 stimuliert (100 ng/ml) und nach verschiedenen Zeitpunkten (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 Minuten) nach Angaben des Herstellers lysiert.

Das Lysat wurde mit einer QIAshredder Säule und Zentrifugation (Biofuge fresco, Heraeus) bei maximaler Geschwindigkeit (13000 rpm, 2 Minuten) homogenisiert. Durch die Scherkräfte wurde außerdem unerwünschte genomische DNA zerstört. Anschließend wurde zum Lysat gleiches Volumen von 70 % Ethanol gegeben und resuspendiert. Die entstandene Lösung wurde auf eine QIAmp-Säule überführt und für 15sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die auf der Säule gebundenen RNA wurde dann einmal mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen. Danach wurde auf die Säule 500 µl RPE-Puffer gegeben und 15 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Es wurde erneut mit 500 µl RPE-Puffer, jedoch für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit, zentrifugiert. Dann wurde mit 30 µl RNase-freies Wasser die RNA eluiert (1 Minuten, 10000 rpm). Die RNA Konzentration wurde anschließend spektrometrisch (GeneQuant pro RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech) bestimmt.

2.2.8 Reverse Transkription

Die reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Methode um die aus den zu untersuchenden Zellen isolierte RNA in cDNA umzuschreiben. Durch die Verwendung eines Oligo-dT-Primer- und eines Random-Hexamer-Primergemisches werden beliebige mRNA–Moleküle unspezifisch in cDNA umgeschrieben. Die isolierte RNA wurde mittels "Omniscript[™] Reverse Transcriptase Kit" (Qiagen) in cDNA umgeschrieben.

Gemäß des Protokolls wurden 5 µg RNA in 1x RT-Puffer mit 0,5 mM Nukleotid-Mix (dNTP-Mix), 2,5 units/µl Omniscript Reverse Transkriptase, 1 µM Oligo-dT Primern und Random-Hexameren, 1 U/µl RNase Inhibitor sowie RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl eingestellt. Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für 60 Minuten. Danach wurden die Produkte 5 Minuten bei 93°C denaturiert, auf 4°C abgekühlt und bei –20°C eingefroren oder direkt für die PCR eingesetzt.

2.2.9 Real-Time PCR

Die Real-time PCR ist eine sensitive Technik zur Amplifikation und gleichzeitigen Quantifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz, basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR.

Um die PCR-Amplifikation zu detektieren werden Hydrolysierungssonden eingesetzt. Diese bestehen aus einem doppelt fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid, das sequenzspezifisch an das PCR-Produkt bindet und in jedem Amplifikationszyklus durch die 5'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert wird. Die Zunahme der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge des PCR-Produkts.

Die Quantifizierung und Amplifikation der spezifischen cDNA erfolgte mit dem LightCycler 450 II (Roche, Mannheim). Hierbei wurden 50 ng cDNA, 0,2 µM spezifischer Primer (Tabelle 16), 0,1 µM primerspezifischer Sonde und 10 µI TaqMaster zu einem Ansatz vermischt und mit dem LightCycler bei dem in Tabelle 17 aufgelisteten Programm quantifiziert.

Gen	5'-3' Sequenz	Sondennummer	Hersteller
SOCS3 links	CTACTGGAGCGCAGTGACC	#17	Sigma-Aldrich
SOCS3 rechts	TCGCGGATCAGAAAGGTG	#17	Sigma-Aldrich
ß-Aktin links	CCAACCGCGAGAAGATGA	#64	Sigma-Aldrich
ß-Aktin rechts	CCAGAGGCGTAGAGGGATAG	#64	Sigma-Aldrich
HPRT links	GACCAGTCAACAGGGGACAT	#20	Sigma-Aldrich
HPRT rechts	GTGTCAATTATATCTTCCACAAG	#20	Sigma-Aldrich

Tabelle 16: Verwendeter Primer für qPCR Analyse

Tabelle 17: qPCR Programm zu Amplifikation von cDNA

	Temperatur in °C	Zeit	ΔT in °C/s	Zyklen
Vor-Inkubation	95	10min	4,4	1
Aplifikation	95	10s	4,4	
	60	30s	2,2	45
	72	1s	4,4	
Kühlung	40	10s	2,2	1

Bei der relativen Quantifizierung wurde die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten "Housekeeping" Gen, HRPT und ß-Aktin (Tabelle 16) normalisiert. Die

Expression wurde auf ein ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen und wie folgt berechnet:

$$Ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta CP_{Zielgen}(Kontrolle-Behandlung)}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta CP_{Referenzgen}(Kontrolle-Behandlung)}}$$

2.2.10 Microarray

Zur Bestimmung von Genexpressionsprofilen wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde die Illumina BeadChip Technolgie verwendet, bei der die spezifischen Oligonukleotide immobilisiert an einem Bead vorliegen.

Die Analyse wurde von der Core-Facility (Genom- und Proteomforschung) des DKFZ durchgeführt. Für die Analyse wurde 500 ng RNA der mit IL-6 stimulierten Zellen (MSU1.1 und HaCaT-ras A5) mit einer Mindestkonzentration von 50 ng/µl verwendet. Die Zellen wurden als Duplikate in 6 cm Schalen mit 100 ng/µl IL-6 stimuliert und die RNA nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h und 24 h isoliert. Des Weiteren wurde als Zeitpunkt 0, sowie als Kontrolle, die RNA von unstimulierten Zellen isoliert.

Die Datenausgabe erfolgte für jeden Bead, wobei Ausreißer mit >2.5 MAD (median absolute deviation) ausgeschlossen wurden. Aus den verbleibenden Datenpunkten wurde das Durchschnittssignal für jede Sonde und die dazugehörige Standardabweichung berechnet. Die Auswertung der Daten erfolgte durch Hauke Busch (DKFZ, Heidelberg) auf der Basis der freien Programmiersprache R für statistisches Rechnen und statistische Grafiken (http://www.r-project.org/).

2.2.11 DNA-Gelelektrophorese

Von den 25 µl der PCR-Reaktion wurden jeweils 10 µl mit 2 µl 6x-Probenpuffer (Novagen) verdünnt, auf ein 2 %-iges, ausgeliertes Agarose-TAE-Gel (Cambrex) mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) aufgetragen und elektrophoretisch bei 100 V für 30 Minuten in TAE (Tris-Essigsäure 40 mM, EDTA 1 mM) aufgetrennt. Als DNA-Marker diente dabei ein 100 Basenpaar-Standard (Novagen). Die Detektion der Banden erfolgte unter UV-Licht mittels eines Chemi-Imagers 4000 (Alpha Innotech Corporation). Die Zusammensetzung des Agarose-TAE-Gel ist aus Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Zusammensetzung Agarose-TAE-Gel

	Zusammensetzung	Hersteller
Agarose-TAE-Gel	TAE 1x	
	Agarose (2%)	Cambrex
	Ethidiumbromid (0,5 µg/ml)	Sigma

2.2.12 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation durch Hitzeschock

Zur Amplifikation von STAT3 Plasmid-DNA, die zur Überexpression von pSTAT3 diente, wurde der *E.coli* Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RP der Firma Stratagene verwendet. Die Bakterien wurden durch die Hitzeschock-Methode in einen kompetenten Zustand versetzt, der ihnen eine effektive Aufnahme von DNA ermöglicht.

100 µl der kompetenten Bakterien wurden mit 1 µg/µl SBP-STAT3 Plasmid DNA (Abbildung 10) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 20 Sekunden in ein 42° C warmes Wasserbad gestellt und danach für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde mit 900 µl SOC Medium versetzt und 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden 100 µl der Zellsuspension auf LB-Platten, die mit 100 mg/mL Ampicillin für die Selektion Plasmid-tragender Bakterien versetzt waren, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.



Abbildung 10: Genetische Karte des SBP-STAT3 Plasmid mit Ampizillinresistenz. Die Darstellung der genetischen Karte wurde mit Hilfe von SnapGene®Viewer erstellt.

2.2.13 Herstellung von rekombinantem GST-STAT3

Das rekombinante STAT3 Protein sollte für spätere Analysen als Kontrolle und als Normalisator dienen. Die cDNA für das GST-STAT3 wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Ursula Klingmüller zur Verfügung gestellt.

Um die cDNA zu vervielfältigen, wurden kompetente Bakterien mittels Hitzeschock-Methode, wie unter 2.2.12 beschrieben, transformiert.

Alle verwendeten Materialien und Lösungen sind in Tabelle 19 aufgelistet. Einige der entstandenen Kolonien der transformierten Zellen wurden von der Platte entnommen, in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB Medium, versetzt mit 50 µl Chloramphenicol, gegeben und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler bei 300 rpm inkubiert.

Die erhaltene Vorkultur wurde in 450 ml LB Medium transferiert und für 90 Minuten unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Zur Aktivierung des lac-Operons und somit zur Amplifizierung der gewünschten DNA wurde zur Zellsuspension IPTG in einer finalen Konzentration von 0,2 mM zugegeben und 4 h bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation für 20 Minuten, bei 4°C und 4400 rpm, wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 15 ml PBS gewaschen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach anschließender Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 4400 rpm, wurde der Überstand verworfen und Pellet über Nacht bei -20° C eingefroren.

Das Pellet wurde im Wasserbad bei 37°C kurz aufgetaut, in 15 ml Lysis Puffer, 70 µl Lysozym und 75 µl 1M DTT resuspendiert und anschließend für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde mit 2,25 ml 10% iger Sarcosyl versetzt und für 1 Minute gevortext. Anschließend wurden die Zellen in der Suspension mittels Ultraschall mit dem Sonicator 2 mal eine Minute Puls (0,1 Sekunde ON, 0,5 Sekunden OFF, 80% Amplitude) auf Eis aufgeschlossen. Nach anschließender Zentrifugation bei 4°C, 10000 rpm für 15 Minuten wurde der Überstand in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 2 % Triton X 100 sowie mit 500 µl Glutathion-Sepharose Beads versetzt und 1 h bei 4°C rotiert. Die Suspension wurde bei 4°C, 1000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde entnommen. Die Beads wurden 3 mal in 4 ml Wasch-Puffer 1 (Tabelle 19) resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Nach dem Waschen wurden die Beads in 15 ml Wasch-Puffer 2 (Tabelle 19) resuspendiert und zentrifugiert. Die Beads wurden in 500 µl Elutionspuffer resuspendiert und in Millipore Ultrafree-MC 0,45 µm Filter Säulen überführt. Diese wurden bei 4°C, 10000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Das im Durchlauf enthaltene rekombinante Protein wurde auf eine Konzentration von 30 ng/µl eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 19: Benötigte Materialien zur Herstellung von rekombinantem Protein

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
SOC Medium		Sigma-Aldrich
LB-Medium	10g Bactotrypton	
	5g Hefe Extrakt	
	10g NaCl	Sigma-Aldrich
	8g MgSo₄	Merk
	4,8g Tris	Roth
Chloramphenicol	50mg/ml Chloramphenicol in	Sigma-Aldrich
	EtOH	
LB Agar Kulturplatten		
lsopropyl-β-D-		Merck Millipore
thiogalactopyranosid		
(IPTG)		
100 mM		
Lysis Puffer	10 mM Tris pH 8,0	Roth
	100 mM NaCl	Sigma-Aldrich
	1 mM EDTA	Serva
Lysozym	50 mg/ml Lysozym in ssH ₂ O	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)		Serva
1 M		
10% N-Lauroylsarcosine	10 mg N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich
	10 ml ddH₂O	
Triton X 100		Sigma-Aldrich
Wasch-Puffer 1	9% PBS	Serva
	5 mM DTT	Serva
	1% NP40	Roche Diagnostic
	Auf 50 ml mit ddH ₂ O	
Wasch-Puffer 2	5 mM DTT	Serva
	15 ml PBS	Serva
Elutions-Puffer	75 mM Tris pH 8,0	Roth
	150 mM NaCl	Sigma-Aldrich
	0,1% SDS	Roth
	5 nM DTT	Serva
	20 nM Glutathion	Sigma-Aldrich

2.2.14 Isolierung und Aufreinigung von SBP-STAT3 Plasmid DNA aus E.coli

Die Plasmidaufreinigung für SBP-STAT3 Plasmid DNA im präparativen Maßstab erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

Hierbei wurde 250 ml LB-Medium, das mit zur Selektion benötigtem Ampicillin versetzt war, im Verhältnis 1:1000 mit einer Vorkultur beimpft und bei 37°C für ungefähr 15 Stunden bei ca. 300 rpm geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation bei 6000 x g für 15 Minuten und 4°C, wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers lysiert und das Lysat auf einer DEAE (Diethylaminoethanol)-Säule aufgetragen. Nach mehrmaligem Waschen wurde die gereinigte Plasmid-DNA eluiert. Zur Entsalzung und Konzentrierung des Eluats wurde eine Isopropanol-Präzipitation des Eluats durchgeführt. Die DNA wurde hierbei in 10,5 ml Isopropanol präzipitiert, anschließend zentrifugiert (15000 x g, 30 Minuten, 4°C), in 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und nach Zentrifugation (15000 x g, 10 Minuten) getrocknet und im TE Puffer resuspendiert.

Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.15 Transfektion mit Lipofectamine2000

Die Transfektion der MSU1.1 Zellen mit der aus 2.2.14 gewonnen Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung von Lipofectamine2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Hierbei bindet die DNA an kationische Lipide in Liposomen. Diese Komplexe werden von den Zellen aufgenommen, und ein Bruchteil der eingesetzten Vektor-DNA Menge gelangt in den Zellkern und integriert in die zelluläre DNA.

Für die Transfektion von $5x10^5$ Zellen, ausgesät in 6 cm Platten wurden 3 µl Lipofectamine2000 mit 125 µl OptiMEM (Invitrogen) gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. 2 µg der zu transfizierenden DNA wurden in 25 µl OptiMEM aufgenommen und zu dem Lipofectamine2000-Mix pipettiert, durch Vortexen gemischt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Der fertige Mix wurde anschließend zu den Zellen gegeben. Nach etwa fünf Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch normales Kulturmedium ersetzt.

2.2.16 Transfektion durch Elektroporation

Um eine transiente Herunterregulierung eines bestimmten Gens zu ermöglichen, wurden die HaCaT-ras A5 Zellen mit einer spezifischen SerpinB4 siRNA transfiziert (Pharmacon). Hierbei handelt es sich um eine doppelsträngige siRNA mit einer Länge von 20-25 bp. Bei der siRNA-Methode soll die in die Zelle transfizierte siRNA in Einzelstränge getrennt und in einen RNA-induced-silencing-Komplex (RISC) integriert werden. Die intergrierten siRNA-Fragmente binden komplementär an die Ziel-mRNA und bauen diese ab, wodurch diese nicht mehr für die Translation zur Verfügung stehen.

Für die Herunterregulierung von SerpinB4 wurden HaCaT-ras A5 Zellen wie unter 2.1.4 trypsiniert und mit 100 nM SerpinB4 siRNA mit Hilfe des Neon™ Transfektionssystem

(Invitrogen[™]) nach den Angaben der Hersteller transfiziert. Zur Kontrolle der SerpinB4 Spezifität wurden die Zellen mit 120 nM unspezifisch bindender siRNA (Non-Targeting siRNA, Dharmacon) transfiziert. Das Neon[™] Transfektionssystem beruht auf dem Prinzip der Elektroporation, indem hohe elektrische Pulse kurzzeitig die Phospholipid-Doppelmemebran der Zelle umstrukturieren, so dass ein Eindringen polarer Moleküle, wie DNA oder doppelsträngiger RNA, möglich ist.

Die Transfektionsbedingungen bestanden aus 2 Pulsen mit je 1450 Volt V à 20 ms. Nach der Transfektion wurden die Zellen wie unter 2.1.9 in Bezug auf ihre Proliferation untersucht.

2.2.17 pSTAT3 Inhibierung

Für die Inhibierung der STAT3 Aktivierung wurde der STAT3 Inhibitor STATTIC V (Millipore) verwendet. STATTIC V ist ein zellpermeabler Inhibitor, der durch die Bindung an der SH2-Domäne von STAT3 dessen Aktivierung durch die JAKs verhindert. STATTIC V wurde in 10 mg/ml DMSO gelöst. Die konfluenten HaCaT-ras A5 Zellen wurden mit 5 nM und 10 nM STATTIC behandelt und anschließend mit 5 nM IL-6 stimuliert. Danach wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37° C inkubiert und auf Proliferation untersucht (siehe 2.1.9).

2.2.18 Herstellung der konditionierten Medien

Zur Detektion von sekretierten Wachstumsfaktoren, die in das Kulturmedium nach IL-6 Stimulation abgegeben wurden, wurden konditionierte Medien erstellt. Zur Analyse der sekretierten Wachstumsfaktoren wurden 100 000 Zellen (HaCaT-ras A5 oder MSU1.1) pro 6 cm Kulturschale ausgesät. Nach dem Anwachsen wurden die Zellen gehungert (HaCaT-ras A5 Zellen für 24 h, die MSU1.1 für 7 h) und mit 100 ng/µl IL-6 stimuliert. Zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde jeweils 1 ml Kulturmedium pro Schale abgenommen. Die Proben wurden bis zur Analyse via ELISA bei -20°C gelagert.

Um den Effekt der in das Medium sekretierten Wachstumsfaktoren auf die Proliferation zu untersuchen, wurden die HaCaT-ras A5 und die MSU1.1 wie oben beschrieben ausgesät und gehungert. Anschließend wurden die Zellen jeweils für 5 Stunden mit 100 ng/µl IL-6 in Hungermedium stimuliert. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und mit Hungermedium versetzt. Nach 24 Stunden wurden das Medium abgenommen und bis zur weiteren Verwendung via Proliferationsassay bei -20° C gelagert.

2.2.19 Enzyme Linkend Immunosorbent Assay – ELISA

Der Nachweis von Proteinen geringer Konzentration in konditionierten Medien erfolgte mit spezifischen ELISAs (Enzym linkend Immunosorbet Assay). ELISA basiert auf der Doppelantikörpertechnik. Diese Form des Proteinnachweises erfolgt über Bindung des nachzuweisenden Proteins an einen immobilisierten, monoklonalen Antikörper bzw. einen immobilisierten Rezeptor und nachfolgender Bindung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers. Der monoklonale Antikörper ist fest an eine Multiwellplatte gebunden.

Die zur Quantifizierung aufgetragenen definierten Standardproben und die zu analysierenden Proben wurden auf die Platte aufgetragen. Die enthaltenden Proteine binden an den immobilisierten Antikörper. Nach Zugabe des Sekundärantikörpers wurde der Antikörper-Protein-Antiköperkomplex mit Substrat versetzt, welches enzymatisch zu einer farbigen Verbindung umgesetzt wurde. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch (Multiskan FC, Thermo Scientific) bestimmt.

Der spezifische Nachweis erfolgte aus den konditionierten Medien (siehe 2.2.18) nach dem Protokoll des Herstellers (R&D Systems) in Duplikaten.

Die verwendeten ELISA-Assays sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Verwendete ELISAs

Spezifikation	Hersteller
Humanes IL-8	R&D Systems
Humanes HGF	R&D Systems
Humanes KGF	R&D Systems
Humanes GM-CSF	R&D Systems
Humanes VEGF	R&D Systems

3 Ergebnisse

Mehrere Studien der letzten Dekade zeigten, dass eine unkontrollierte Überexpression von IL-6 zu einer chronischen Entzündung führen kann, die eine starke Assoziation mit vielen verschiedenen Krebsarten aufweist [25, 53, 75, 77, 105]. Durch eine erhöhte IL-6 Konzentration kann ein breites Zytokin-Netzwerk aktiviert werden, welches autokrin sowie parakrin auf die Tumorzellen und auf die Zellen der Tumormikroumgebung wirkt und somit stark die Tumorprogression fördern kann.

Um die genaue Funktion von IL-6 im Tumor und seiner Mikroumgebung zu verstehen, wurde in dieser Arbeit der Effekt von IL-6 auf die benigne Tumorzelllinie HaCaT-ras A5 und auf die Fibroblastenzelllinie MSU1.1 untersucht. Hierbei wurde der IL-6 Effekt auff das Migrantionsverhalten und auf die Proliferation in beiden Zelllinien untersucht. Um diese, durch IL-6 hervorgerufenen, phenotypischen Eigenschaften mit der Aktivierung des JAK-STAT Signalweges zu verknüpfen, wurde das dynamische Verhalten der im JAK-STAT Signalweg enthaltenen Proteine gp130, STAT3 und SOCS3 zeitaufgelöst analysiert und die entstandenen Kinetiken der beiden Zelllinien verglichen. Zusätzlich wurde die Funktion von STAT3 bei der IL-6-induzierten Regulation der Proliferation in beiden Zelllinien genauer durch Inhibierungsexperimente in HaCaT-ras A5 sowie Überexpressionsversuche in MSU1.1 analysiert. Die Daten wurden quantifiziert und zur Etablierung eines mathematischen Models verwendet.

3.1 Vergleich der Proteinkinetiken nach IL-6 Stimulation in MSU1.1 und primären Fibroblasten

Zur Analyse der Aktivierungskinetiken der im IL-6 Signalweg involvierten Proteine wurde die immortale Fibroblasten Zelllinien MSU1.1 als Model für primäre Fibroblasten gewählt. Um die MSU1.1 als Ersatz für die primären Fibroblasten auf Signaltransduktionsebene zu bestätigen, wurden beide Zelltypen mit 100 ng/ml (5 nM) IL-6 stimuliert und die Aktivierungskinetiken von gp130, STAT3 und SOCS3 über 120 Minuten beobachtet und verglichen (Abbildung 11).



Abbildung 11: Verlgeich des dynamischen Verhaltens von gp130 (A), cytosolisches pSTAT3 (B), SOCS3 (C) und nukleares pSTAT3 (D) in MSU1.1 Zellen (rot) und primären Fibroblasten (grün) nach der Stimulation mit 100 ng/ml IL-6.

Die Aktivierungskinetiken in primären Fibroblasten und MSU1.1 Zellen waren bei allen analysierten Proteinen sehr ähnlich. Die Analyse der gp130 Aktivierungskinetik zeigte in beiden Zelltypen drei Phosphorylierungspeaks und zwar nach 5, 30-45 und 90 min nach IL-6 Stimulation.

Auch der Verlauf der Aktivierungskinetk des cytosolischen pSTAT3 war in beiden Zelltypen sehr ähnlich. Bei den primären Fibroblasten sowie bei den MSU1.1 stieg die Phosphorylierung innerhalb von 5 Minuten rasch an und nahm nach 20 Minuten wieder ab. Allerdings konnte bei den MSU1.1 Zellen ein zweiter Phosphorylierungsanstieg nach 25 Minuten detektiert werden, bei den Fibroblasten dagegen nach 45 Minuten. Nach diesem Zeitpunkt zeigten beide Zelltypen eine kontinuerliche Abnahme der Phosphorylierung bis auf den Anfangswert.

Die Expression von SOCS3 konnte in den beiden Zelltypen erst 20 min nach der IL-6 Stimulation detektiert werden. Die SOCS3 Level in MSU1.1 erreichte nach 25 min einen Peak, fiel dann nach 45 min wieder auf den "0"-Wert und stieg dann erneut nach 60 min auf ein Maximum. Die SOCS3 Expression in den primären Fibroblasten erreichte nach 45 Minuten ein Maximum, fiel anschließend wieder und erreichte nach 90 Minuten den Anfangswert, der sich bis zum Ende, nach 120 Minuten, konstant hielt.

Die STAT3 Phosphorylierung im Nukleus zeigte bei Fibroblasten sowie bei den MSU1.1 einen steilen Anstieg direkt nach IL-6 Stimulation. Bei den MSU1.1 konnte ein Aktivierungsmaximum nach 15 Minuten detektiert werden mit einer nachfolgenden kontinuierlichen Abnahme der Phosphorylierung bis zum Anfangswert (Zeitpunkt 60 min). Bei den primären Fibroblasten dagegen stieg die Phosphorylierung bis zum Zeitpunkt von 10 Minuten rasch an, zeigte aber bis zum Zeitpunkt von 20 Minuten keine große Veränderung. Erst nach 25 Minuten konnte das Maximum der STAT3 Aktivierung bei den Fibroblasten detektiert werden. Die Abnahme der Phosphorylierung war bei Fibroblasten im Vergleich zu den MSU1.1 Zellen langsamer und erreichte erst zum Zeitpunkt von 120 Minuten nahezu den Anfangswert.

Die erhaltenen Daten über die Aktivierung der wichtigsten IL-6 Signalproteine in beiden Zelltypen bestätigen, dass die Fibroblasten Zelllinie MSU1.1 als Ersatz für primäre Fibroblasten fungieren kann.

3.2 Einfluss unterschiedlicher IL-6 Konzentrationen auf Proliferation von HaCaT-ras A5 und MSU1.1 Zellen

Um einen Effekt von unterschiedlichen IL-6 Konzentrationen auf die Proliferation von HaCaTras A5 und MSU1.1 Zellen zu untersuchen, wurde mittels Sybr-Green-Assay die Proliferation in beiden Zelllininen analysiert, wobei die Zellen mit unterschiedlichen IL-6 Konzentrationen stimuliert und über eine Zeitspanne von 72 Stunden (in Triplikaten) beobachtet wurden.

3.2.1 HaCaT-ras A5

Bei den unstimulierten HaCaT-ras A5 stieg die Zellzahl nach 24 Stunden von etwa 30.000 auf 40.000 Zellen. Allerdings sank nach 48 Stunden war die Zellzahl auf den Anfangswert gesunken und blieb auch nach 72 Stunden unverändert.

Die mit 25 ng/ml und 50 ng/ml IL-6 stimulierten HaCaT-ras A5 zeigten nach 24 Stunden eine deutliche Erhöhung der Zellzahl auf etwa 60.000 Zellen, die über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant blieb. Auch bei den mit 75 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen konnte das gleiche Proliferationsmuster detektiert werden. Allerdings, war nach 72 Stunden eine weitere Erhöhung auf etwa 70.000 Zellen festzustellen.

Die mit 100 ng/ml stimulierten Zellen zeigten eine Verdoppelung der Zellzahl nach 24 Stunden, eine erneute Erhöhung auf 70.000 Zellen nach 48 Stunden und eine Reduzierung der Zellzahl auf 60.000 Zellen nach 72 Stunden.

Ein ähnlicher Effekt konnte bei den mit 150 ng/ml IL-6 stimulierten HaCaT-ras A5 Zellen beobachtet werden. Nach 24 Stunden stieg die Zellzahl von 20.000 Zellen auf etwa 55.000

Zellen. Nach 48 Stunden war Anzahl der Zellen auf 60.000 gestiegen, und sank nach 72 Stunden auf 55.000 Zellen.

Die Analyse des Effekts der IL-6 Stimulation auf die HaCaT-ras A5 Zelllinie zeigte, dass schon die IL-6 Konzentration von 25 ng/ml zu einer Steigerung der Proliferationsrate führt. Allerdings zeigte eine Erhöhung der Konzentration auf bis zu 150 ng/ml keinen weiteren Effekt auf die Proliferationssteigerung.



Abbildung 12: Proliferationsanalyse in HaCaT-ras A5 Zellen stimuliert mit unterschiedlichen IL-6 Konzentrationen (n=3) über einen Zeitraum von 72 Stunden. Kontr = Zeitpunkt 0

3.2.2 MSU1.1

Die MSU1.1 Zellen wurden mit einer Zelldichte von 30.000 Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden konnte bei den unstimulierten Zellen eine Erhöhung der Zellzahl auf 35.000 detektiert werden. Diese Zellzahl blieb nach 48 Stunden unverändert, erhöhte sich aber nach 72 Stunden auf etwa 45.000 Zellen.

Das Proliferationsverhalten der MSU1.1 Zellen, stimuliert mit 25, 50, 75 und 100 ng/ml zeigte nur geringe Abweichungen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Interessanterweise zeigten die mit 150 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen eine deutliche Reduktion der Zellzahl nach 48 und 72 Stunden.



Abbildung 13: Proliferationsanalyse in HaCaT-ras A5 mit unterschiedlichen IL-6 Konzentrationen (n=3) über einen Zeitraum von 72 Stunden. Kontr = Zeitpunkt 0.

Für alle weiteren Experimente wurden beide Zelltypen bei IL-6 Stimulation mit einer Menge von mit 100 ng/ml behandelt.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass IL-6 einen unterschiedlichen Effekt auf die zellulären Prozesse in Tumor- und stromalen Zellen ausüben kann. Während die HaCaT-ras A5 Zellen mit einer deutlichen Erhöhung der Zellzahl auf die IL-6 Stimulation reagieren, zeigen MSU1.1 Zellen keine Beeinflussung der Proliferation durch IL-6. Abbildung 14 zeigt zum direkten Vergleich die Proliferation von HaCaT-ras A5 Zellen und MSU1.1 Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml zur Kontrolle.



Abbildung 14: Proliferationanalyse nach IL-6 Stimulation (n=3). (A) Zellzahl der HaCaT-ras A5 nach II-6 Stimulation (schwarz) im Vergleich zu nicht stimulierten HaCaT-ras A5 (weiß). (B) Zellzahl der MSU1.1 nach II-6 Stimulation (schwarz) im Vergleich zu nicht stimulierten MSU1.1 (weiß). Kontr = Zeitpunkt 0. (n=3)

3.3 Einfluss von IL-6 auf die Migration von HaCaT-ras A5 und MSU1.1

IL-6 spielt eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und ist ein entscheidender Schlüsselfaktor in der Kommunikation zwischen Tumorgewebe und Mikroumgebung [5, 7]. Um unterschiedliche physiologische Auswirkungen der Stimulation mit IL-6 auf HaCaT-ras A5 und MSU1.1 Zellen zu untersuchen, wurden die beiden Zelllinien mit einer konstanten Konzentration von 100 ng/ml IL-6 stimuliert und anschließend der Effekt auf Proliferation und Migration über einen bestimmten Zeitraum wie beschrieben (2.1.10) untersucht. Die hier gezeigten Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

Fibroblasten sowie Keratinozyten sind durch amöboide Bewegung zur Migration fähig [106, 107]. Im Tumor migrieren Tumorzellen im Prozess der Invasion und Metastase durch das Gewebe. Die Zellmigration ist abhängig von einem multiplen Prozess der durch viele unterschiedliche Signalmoleküle beeinflusst wird [108].

Die für die Analyse der Zellmigration verwendete Kammer erzeugt einen sogennanten Scratch (siehe 2.1.10) bei dem die Zellfreie Fläche zum Zeitpunkt 0 gemessen wurde. Nach 24 Stunden wurde erneut dieselbe Fläche gemessen so dass die Migrationsrate durch das Messen der migriereten Fläche über 24 Stunden ermittelt wurde. Eine Stimulation der HaCaT-ras A5 Zellen mit IL-6 zeigte eine signifikante 3-fache Erhöhung der Migration im Vergleich zu den unstimulierten HaCaT-ras A5 (Abbildung 15-A). Auch bei den MSU1.1 war die Migrationsrate signifikant um das 9-fache im Vergleich zu den unstimulierten Zellen erhöht (Abbildung 15-B).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass IL-6 einen starken Effekt auf die Migration der beiden Zelllinien ausübt.



Abbildung 15: Migrationsanalyse nach IL-6 Stimulation (n=3): (A) HaCaT-ras A5 nach 24 Stunden mit II-6 Stimulation (schwarz) im Vergleich zu nicht stimulierten HaCaT-ras A5 (weiß). (B) MSU1.1 nach 24 Stunden II-6 Stimulation (schwarz) im Vergleich zu nicht stimulierten MSU1.1 (weiß).

Die Auswirkung der IL-6 Stimulation auf Proliferation und Migration der MSU1.1 wurden anschließend mit denen der in vorangegangenen Versuchen für primären Fibroblasten beschriebenen Effekten verglichen. Dabei zeigten die primären Fibroblasten das gleiche Verhalten in Bezug auf Proliferation und Migration nach IL-6 Stimulation [76, 77]. Das bestätigte die Wahl der MSU1.1 Zelllinie als Ersatz für primäre Fibroblasten.

3.4 Vergleich der Genexpression von HaCaT-ras A5 und MSU1.1 nach IL-6 Stimulation

Die unterschiedlichen biologischen Reaktionen der untersuchten Zelllinien (HaCaT-ras A5 und MSU1.1) auf die Stimulation mit IL-6 können auf eine mögliche differenzielle Genexpression zurückführen sein. Um auf transkriptioneller Ebene Aktivierungsprofile von bestimmten Zielgenen in HaCaT-ras A5 und MSU1.1 zu erstellen, wurden die absolute Genexpression in einem Zeitraum von 24 Stunden nach IL-6 Stimulation beobachtet und gegenüber gestellt.

3.4.1 Genexpression von JAK1, JAK2, STAT3 und SOCS3 in HaCaT-ras A5 und MSU1.1

Der JAK/STAT Signalweg spielt bei der IL-6 Stimulation eine entscheidende Rolle. Um mögliche Unterschiede in der Genexpression der im JAK/STAT Signalweg beteiligten Proteine zu untersuchen, wurde die Genexpression der im IL-6 JAK/STAT3 Signalweg aktiven Proteine analysiert. Auch der negativ-Regulator SOCS3 wurde auf transkriptioneller Ebene untersucht (Abbildung 16).

Die Analyse der JAK1 mRNA Experssionsrate in mit IL-6 stimulierten HaCaT-ras A5 zeigte im Vergleich zur Kontrolle in den ersten 6 Stunden eine deutliche Erhöhung. Allerdings lag im Zeitraum zwischen 8 und 12 Stunden die Genexpression unter dem Wert der unstimulierten Kontrolle. Nach 12 Stunden konnte eine erneute Erhöhung der Genexpression in den mit IL-6 stimulierten Zellen detektiert werden, die bis zum Zeitpunkt von 24 Stunden konstant blieb (Abbildung 16-A).

Im Gegensatz dazu zeigten die mit IL-6 stimulierten MSU1.1 Zellen in den ersten 8 Stunden eine starke Reduzierung der JAK1 Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Zwischen den Zeitpunkten 8 und 12 Stunden konnten keine Unterschiede zwischen den stimulierten und Kontrollzellen detektiert werden. Nach 12 Stunden konnte eine konstante Erhöhung der Genexpressionsrate von JAK1 in den stimulierten MSU1.1 beobachtet werden.

Die Expression von JAK2 bei den stimulierten HaCaT-ras A5 zeigte während des gesamten Beobachtungszeitraumes eine leichte Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle. Die MSU1.1 zeigten dagegen einen ähnlichen Verlauf wie bei JAK1. Hierbei konnte in den ersten 8 Stunden bei den stimulierten MSU1.1 im Vergleich zur Kontrolle eine Reduzierung der JAK2 Genexpression festgestellt werden, die dann anschließen bis nach 12 Stunden parallel zur Kontrolle verlief. Ab 12 Stunden konnte eine konstante Erhöhung der Genexpressionsrate von JAK1 in den stimulierten MSU1.1 detektiert werden (Abbildung 16-B). Die STAT3 Genexpression in unstimulierten HaCaT-ras A5 zeigte keine Veränderungen während der Beobachtungsperiode. Die IL-6 Stimulation führte nach 2 Stunden zu einer Erhöhung der STAT3 Expression, die auf diesem Niveau bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt blieb (Abbildung 16-C). Bei den MSU1.1 Zellen dagegen führte IL-6 Stimulation in den ersten 2 Stunden zu einer Reduktion der STAT3 Expression unter das Level der Kontrollzellen. Anschließend konnte jedoch im Vergleich zur Kontrolle ein Anstieg der STAT3 Expression bis zum Zeitpunkt von 10 Stunden, eine deutliche Reduktion im Zeitraum von 12 bis etwa 20 Stunden und einen erneuten Anstieg nach 24 Stunden festgestellt werden.

Die Genexpression von SOCS3 (Abbildung 16-D) zeigte nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 innerhalb von 12 Stunden einen höheren Wert als bei der Kontrolle. Nach 12 Stunden allerdings konnten keine Unterschiede in der SOCS3 Expression bei den stimulierten und unstimulierten Zellen festgestellt werden.

Im Kontrast zu den HaCaT-ras-A5 zeigten die IL-6 stimulierten MSU1.1 im Vergleich zur Kontrolle einen steilen Anstieg der SOCS3 Genexpression innerhalb von einer Stunde nach Stimulation, der danach wieder abfiel und erst nach 8 Stunden wieder anstieg um dann bis zum Ende des Beobachtungszeitraum konstant zu bleiben.



Abbildung 16: Genexpressionsanalyse via Microarray von JAK1 (A), JAK2 (B), STAT3 (C) und SOCS3 (D) in HaCaT-ras A5 und MSU1.1

3.4.2 Zytokin-Genexpressionsanalyse von unterschiedlich geregelten Faktoren

Zytokine spielen eine wesentliche Rolle in der Tumorentstehung, sowie wie in der Tumorprogression. IL-6 ist ein hierbei ein wichtiger Faktor, der die Progression von benignen zu malignen Tumorstadien durch Regulation eines Zytokin-Netzwerkes in Tumorzellen fördern kann [76, 77].

Um die Aktivierung eines Zytokin-Netzwerkes nach IL-6 Stimulation genauer zu untersuchen, wurde die Genexpression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in HaCaT-ras A5 und MSU1.1 nach IL-6 Stimulation analysiert. Die analysierten Wachstumsfaktoren wurden aufgrund ihrer Rolle in der Tumorprogression sowie bei der Förderung der Proliferation und Migration ausgewählt. Die Analyse wurde in beiden HaCaT-ra A5 und MSU1.1 Zellen durchgeführt und verglichen (Abbildung 17).

Die Auswertung der Mikroarray Daten zeigte, dass die Expression von HGF in HaCaT-ras A5 durch IL-6 Stimulation nicht beeinflusst wurde. In den MSU1.1 dagegen konnte nach 10 Stunden deutliche Erhöhung der HGF Expression im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 17-A).

Die Genexpression von VEGF in HaCaT-ras A5 (Abbildung 17-B) verlief nach IL-6 Stimulation bis zum Zeitpunkt von 8 Stunden annähernd parallel zur Kontrolle. Nach 8 Stunden blieb der Wert bei den stimulierten Proben konstant, während bei der Kontrolle eine Abnahme der VEGF Genexpression zu beobachten war. Die VEGF Expression bei MSU1.1 verlief in den ersten 4 Stunden analog zur Kontrolle. Anschließend wurde bis zum Zeitpunkt von 8 Stunden ein Anstieg detektiert, der jedoch innerhalb von 2 Stunden wieder auf den Level der Kontrolle sank. Erst ab 15 Stunden stieg die Genexpression von VEGF in den IL-6 stimulierten Zellen wieder über den des Kontrollwertes.

Bei der IL-8 Expression in IL-6 stimulierten HaCaT-ras A5 konnte eine rasche Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Erst ab dem Zeitpunkt von 12 Stunden sank die Genexpression und erreichte nach 24 Stunden das Level der Kontrolle. MSU1.1 Zellen zeigten nach IL-6 Stimulation eine über den gesamten Beobachtungszeitraum niedrigere Genexpression von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 17-C).

HaCaT-ras A5 zeigte bis 8 Stunden nach IL-6 Stimulation einen analogen Verlauf der GM-CSF Expression zur Kontrolle. Danach konnte eine Erhöhung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden, die erst ab dem Zeitpunkt von 24 Stunden wieder auf das Level der Kontrolle sank. Bei den MSU1.1 konnte nach der Stimulation mit IL-6 keine Veränderung der Genexpression von GM-CSF beobachtet werden (Abbildung 17-D).

Die Genexpression von SerpinB4 stieg (Abbildung 17-E) nach der IL-6 Stimualtion in den HaCaT-ras A5 rasch an, erreichte nach 12 Stunden ein Maximum und blieb konstant bis an das Ende des Beobachtungszeitraums. In den MSU1.1 Zellen dagegen konnte kein Effekt der IL-6 Stimulation auf SerpinB4 Genexpression detektiert werden.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die IL-6 Stimulation in beiden Zelltypen unterschiedliche Regulationen in der Genexpression hervorrufen.



Abbildung 17: Genexpressionsanalyse via Microarray unterschiedlich regulierter Gene. (A) HGF, (B) VEGF, (C) IL-8, (D) GM-CSF und (D) SerpinB4 in HaCaT-ras A5 und MSU1.1

3.5 Effekt von IL-6 Stimulation auf Zytokinproduktion in HaCaT-ras A5 und MSU1.1

Um einen Einfluss der IL-6 Stimulation auf die Sekretion von verschiedenen Zytokinen zu untersuchen, wurden die HaCaT-ras A5 und die MSU1.1 für einen Zeitraum von 96 Stunden mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert und alle 24 Stunden das konditionierte Medium abgenommen und per ELISA auf unterschiedliche Zytokine untersucht und miteinander verglichen.

3.5.1 Keratinocyte Growth Factor (KGF)

Die erhaltenen Daten demonstrierten, dass in den unstimulierten HaCaT-ras A5 die Produktion von KGF langsam, aber kontinuierlich anstieg. Die Stimulation mit IL-6 führte während der Zeitperiode von 72 Stunden zu keiner Veränderung der KGF Sekretion. Allerdings, verdoppelte sich die Sekretion von KGF nach 96 Stunden die IL-6 Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen (Abbildung 18, A).

Im Kontrast zu HaCaT-ras A5, konnte bei MSU1.1 ohne jegliche Stimulation zum Zeitpunkt 0 gar keine KGF Expression detektiert werden. Erst nach 24 Stunden wurde in den Zellen sowohl mit als auch ohne Stimulus KGF Sekretion detektiert. Stimulation mit IL-6 führte bei allen Zeitpunkten zu erhöhter KGF Sekretion, wobei bei den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden der Effekt nicht prominent war. Erst nach 96 Stunden, analog zu HaCaT Zellen, stieg die KGF Konzentration im konditionierten Medium auf den doppelten Wert im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abbildung 8, B).



Abbildung 18: KGF Expression nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 (A) und MSU1.1 (B)

3.5.2 Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Die Stimulation von HaCaT-ras A5 mit IL-6 (Abbildung 19) zeigte, dass HGF Produktion und Sekretion über den gesamten Beobachtungszeitraum von 96 Stunden nicht detektierbar war. Die Stimulation der MSU1.1 zeigte zum Zeitpunkt 0 keine Sekretion von HGF. Ab dem Zeitpunkt 24 Stunden konnte sowohl in der Kontrolle wie auch in den stimulierten Zellen eine HGF Produktion detektiert werden. Hierbei war die Menge an HGF in den stimulierten Zellen geringfügig höher als in der Kontrolle. Erst nach 96 Stunden war die Konzentration von HGF

bei den stimulierten MSU1.1, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, fast um das Doppelte gestiegen.



Abbildung 19: HGF Expression nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 (A) und MSU1.1 (B)

3.5.3 Interleukin-8 (IL-8)

Zum Zeitpunkt 0 konnte in allen HaCaT-ras A5 Zellen eine Produktion von IL-8 detektiert werden. Allerdings fiel die sekretierte IL-8 Menge unabhängig von IL-6 Stimulation nach 24 Stunden rapide ab. Nach diesem Minimum konnte erneut eine leicht aber stetige Erhöhung der IL-8 Produktion beobachtet werden. Bei den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden konnte kein Unterschied zwischen stimulierten und Kontrollzellen festgestellt werden. Bei den Zeitpunkten 72 und 96 Stunden dagegen führte IL-6 Stimulation zu einer deutlichen Steigerung der IL-8 Produktion im Vergleich zu den Kontrollen.

Auch die MSU1.1 Zellen zeigten zum Zeitpunkt 0 eine IL-8 Sekretion, die deutlich höher bei den unstimulierten Zellen war. Nach 24 Stunden reduzierte sich IL-8 Sekretion in Kontrollzellen, wohingegen bei den stimulierten Zellen die Menge an IL-8 deutlich gestiegen war. Nach 48 Stunden blieb die IL-8 Produktion in Kontrollen unverändert, sank aber in den stimulierten Zellen auf den Wert der Kontrollen ab. Nach 72 Stunden stieg die IL-8 Produktion in den Kontrollen erneut, blieb aber in den stimulierten Zellen unverändert. Nach 96 Stunden sank die IL-8 Produktion in den beiden Ansätzen erneut ab, wobei die Proteinmenge in den stimulierten Zellen deutlich niedriger als in Kontrollen war.



Abbildung 20: IL-8 Expression nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 (A) und MSU1.1 (B)

3.5.4 Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)

Die HaCaT-ras A5 Zellen zeigten zum Zeitpunkt 0 eine geringe Sekretion von GM-CSF, die in der Kontrolle sowie in den stimulierten Zellen gleich war. Allerdings war 24 und 48 Stunden nach IL-6 Stimulation war fast kein GM-CSF Sekretion zu detektieren. Nach 72 Stunden konnte eine erneute geringe GM-CSF Produktion beobachtet werden, die allerdings in den stimulierten Zellen deutlich höher, als in den Kontrollen war. Nach 96 Stunden war die Menge an GM-CSF in den stimulierten HaCaT-ras A5 Zellen um etwa das 4-fache höher als in den Zellen ohne IL-6 Stimulation.

Bei den MSU1.1 konnte zum Zeitpunkt 0 in den mit IL-6 stimulierten Zellen, sowie in der Kontrolle GM-CSF Produktion detektiert werden, wobei die Kontrolle eine etwas höhere Menge zeigte. Bis zum Zeitpunkt von 48 Stunden konnte eine deutliche Reduktion der GM-CSF Sekretion in den beiden Ansätzen beobachtet werden. Diese Sekretionsrate an GM-CSF hielt sich dann bis zum Zeitpunkt von 96 Stunden konstant und zeigte kein Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen.





3.5.5 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF wurde in den HaCaT-ras A5 schon zum Zeitpunkt 0 sekretiert mit ähnlicher Menge an Protein in stimulierten Zellen sowie in der Kontrolle. Die Produktion von VEGF fiel nach 48 Stunden ab, war in den stimulierte Zellen jedoch fast doppelt so hoch wie in der Kontrolle. Die VEGF Menge stieg konstant über den Zeitpunkte 48, 72 und 96 Stunden, wobei die Kontrolle im Vergleich zu den stimulierten Zellen immer einen geringeren Wert an Proteinkonzentration zeigte.

MSU 1.1 Zellen zeigten zum Zeitpunkt 0 keine Sekretion von VEGF. Nach 24 Stunden stieg die Menge an VEGF in den stimulierten Zellen bis zum Zeitpunkt von 48 Stunden an und blieb unverändert bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. In den Kontrollen konnte keine Sekretion von VEGF nachgewiesen werden.



Abbildung 22: VEGF Expression nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 (A) und MSU1.1 (B)

Beide Zelllinien, HaCaT-ras A5 sowie MSU1.1, zeigten nach IL-6 Stimulation einen ähnlichen Verlauf in der Verstärkung der KGF Sekretion über einen Beobachtungszeitraum von 96 Stunden. Das Expressionslevel von HGF zeigte bei MSU1.1 einen klaren Zunahme nach IL-6 Stimulation während die HaCaT-ras A5 Zellen keine Expression an HGF nach IL-6 Stimulation zeigten.

Die IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 hemmte die IL-8 Sekretion, während die Stimulation in MSU1.1 einen kurzzeitigen Anstieg von IL-8 auslöste.

GM-CSF scheint durch die IL-6 Stimualtion in den MSU1.1 Zellen nicht beeinflusst zu werden, währen bei den HaCaT-ras A5 Zellen nach 72 Stunden eine deutlich höhere Sekretion von GM-CSF nach IL-6 Stimulation zu detektieren war.

Die Expression von VEGF zeigte in beiden Zelllinien eine Erhöhung nach IL-6 Stimulation. Jedoch zeigten die HaCaT-ras A5 Zellen selbst in den Kontrollen ein vorhandenes Level an VEGF während in den unstimulierten MSU1.1 Zellen keine Expression von VEGF zu detektieren war.

Die Ergebnisse der ELISA Auswertung bestätigten die unterschieldiche Genexpression der weiter oben beschrieben Ergebnisse.

3.6 Crosstalk zwischen HaCaT-ras A5 und MSU1.1

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten, dass HaCaT-ras A5 und MSU1.1 nach IL-6 Stimulation unterschiedliche Faktoren exprimieren und sekretieren, die in der Kommunikation, bzw. dem Crosstalk, zwischen dem Tumor und umliegenden Stroma eine wichtige Rolle spielen. Um die Frage zu beantworten ob IL-6 nur eine direkte Auswirkung auf die Proliferation der Zellen hat oder ob auch die von IL-6 induzierten Faktoren einen stimulierenden Effekt haben, wurden die HaCaT-ras A5 Zellen mit dem konditioniertem Medium der MSU1.1 nach IL-6 Stimulation, sowie vice versa behandelt und anschließend die Proliferation von HaCaT-ras A5 und MSU beobachtet.

3.6.1 HaCaT-ras A5

Die Behandlung der HaCaT-ras A5 mit konditioniertem Medium der MSU1.1 Zellen führte zu einer deutlichen kontinuierlichen Erhöhung der Zellzahl von 15000 Zellen am Zeitpunkt 0 bis 72000 Zellen nach 96 Stunden. Im Kontrast dazu, blieb die Zellzahl der unbehandelten Zellen nahezu unverändert und stieg nach 96 Stunden nur auf 25000 Zellen (Abbildung 23).



Abbildung 23: Proliferationsanalyse der HaCaT-ras A5 Zellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium der MSU1.1. (n=3)

3.6.2 MSU1.1

Die mit dem konditionierten Medium der HaCaT-ras A5 behandelten MSU1.1 zeigten eine deutliche kontinuierliche Erhöhung der Zellzahl von anfänglich 10000 (Zeitpunkt 0) auf 88000 Zellen nach 96 Stunden. Im Gegensatz dazu zeigten die unbehandelten Zellen keine große Veränderung in der Zellzahl. Sie stieg von 10000 zum Zeitpunkt 0 auf insgesamt 36000 Zellen.



Abbildung 24: Proliferationsanalyse der MSU1.1 Zellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium der HaCaT-ras A5. (n=3)

Sowohl die HaCaT-ras A5 sowie die MSU1.1 Zellen zeigten nach Zugabe von konditionierten Medien der jeweils anderen Zellinie eine starke Erhöhung der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollen. MSU1.1 zeigte keinen Effekt nach direkter Stimulation mit IL-6, jedoch werden die Zellen von den durch IL-6 induzierten Faktoren stark zur Proliferation stimuliert, was wie die Relevanz der Kommunikation zwischen Tumor und Mikroumgebung verdeutlicht.

3.7 Analyse der Aktivitätskinetik der am JAK/STAT-Signalweg beteiligten Proteine

Die Analyse des IL-6 Einflusses auf HaCaT-ras A5 und MSU1.1 zeigte einen eindeutigen Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen den beiden Zelllinien. Um die mögliche Ursache auf die Signaltransduktionebene zurückzuführen, wurden die im IL-6 Signalweg beteiligten Moleküle auf ihre Aktivität nach IL-6 Stimulation untersucht.

Die Aktivitätskinetiken von gp130, pSTAT3 und SOCS3 als Antwort auf IL-6-Stimualtion in HaCaT-ras A5 und MSU1.1 wurden mittels Immunpräzipitation und anschließendem Western Blot untersucht und an einem LumiImager densitrometrisch ausgewertet und grafisch dargestellt (Abbildung 25). Alle Versuche wurden dreimal wiederholt.



Abbildung 25: Western Blots für gp130, cytosolisches STAT3, nukleares STAT3 und SOCS3 von HaCaTras A5 und MSU1.1. Die Auftragung der einzelnen Zeitpunkte findet willkürlich statt um einen systematischen Fehler zu minimieren

Die Signalstärke der zu analysierenden Proteine wurde auf die im Versuch jeweils mitgeführten zugehörigen rekombinanten Proteine normalisiert und anschließend die Kinetik grafisch in einem Diagramm dargestellt.

3.7.1 Kinetik gp130

Das transmembrane Glykoprotein gp130 ist ein wichtiger Bestandteil des IL-6 Rezeptor-Komplexes, welches die Signale von IL-6 in die Zielzellen weitervermittelt.

Die Analyse der Aktivierungskinetik von gp130 (Abbildung 26) in HaCaT-ras A5 zeigte schon nach 5 Minuten einen raschen Anstieg auf ein Maximum mit einer schnellen Abnahme nach 10 Minuten. Nach 20 Minuten konnte erneut ein leichter Anstieg detektiert werden. Vom Zeitpunkt 25 Minuten bis 120 Minuten sank die Signalintensität fast linear auf ein Minimum ab (Abbildung 26-A).

MSU1.1 Zellen (Abbildung 26-B) zeigten nach 5 Minuten ebenfalls einen Anstieg der Phosphorylierung, der dann bis zum Zeitpunkt von 20 Minuten wieder abfiel und sich bis zum Zeitpunkt von 30 Minuten konstant hielt. Nach 30 Minuten konnte eine rasche Erhöhung der Signalintensität beobachtet werden, die sich bis 45 Minuten nach der IL-6 Stimulation konstant hielt, jedoch bis zum Zeitpunkt von 60 Minuten wieder abfiel. Von 60 Minuten bis 120 Minuten konnte eine relativ konstante Signalintensität von gp130 detektiert werden.



Abbildung 26: Graphische Darstellung des dynamischen Verhalten von gp130 nach IL-6-Stimulation in HaCaT-ras A5 (A) und MSU1.1 (B) in einem Beobachtungszeitraum von 120 Minuten. (n=3)

3.7.2 Zytosolisches pSTAT3

STAT-Proteine sind die wichtigsten Mediatoren der IL-6 Signaltransduktion. Nach der Phosphorylierung werden STAT Proteine aktiviert und bilden dadurch Homo- bzw Heterodimere, die anschließend in den Zellkern transportiert werden und dort als Transkriptionsfaktoren fungieren.

Nach IL-6 Stimulation von HaCaT-ras A5 war die STAT3 Phosphorylierung bis zum Zeitpunkt von 30 Minuten kontinuierlich bis auf ein Maximum gestiegen. Danach sank das pSTAT3 Level bis zum Zeitpunkt 120 Minuten stetig auf den Anfangswert ab (Abbildung 27-A).

In MSU1.1 konnte ein rapider Anstieg von pSTAT3 nach 5 Minuten IL-6 Stimulation detektiert werden mit einem Maximum bei etwa 15 Minuten. Anschließend nahm die Menge an pSTAT3 kontinuierlich ab, fiel nach 45 Minuten auf den Anfangswert ab und hielt sich bis zum Zeitpunkt von 120 Minuten nahezu konstant (Abbildung 27-B).



Abbildung 27: Graphische Darstellung der Aktivitätskinetik von cytosolischen pSTAT3 nach IL-6-Stimulation in HaCaT-ras A5 (A) und MSU1.1 (B) in einem Beobachtungszeitraum von 120 Minuten. (n=3)

3.7.3 Nukleares pSTAT3

In der nuklearen Fraktion von HaCaT-ras A5 Zellen führte IL-6 Stimulation zu einem deutlichen Anstieg von der STAT3 Phosphorylierung mit einem Maximum nach 30 Minuten. Anschließen sank die Menge an pSTAT3 stetig ab und erreichte zum Zeitpunkt von 90 Minuten den Anfangswert, der sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht änderte (Abbildung 28-A). Auch in Nuclei von MSU1.1 stieg der Level der STAT3-Phosphorylierung stetig an und erreichte nach 20 Minuten ein Maximum. Anschließend wurde eine kontinuierliche Abnahme der von pSTAT3 bis nahezu zum Anfangswert (60 Minuten nach IL-6 Stimulation) detektiert, die über den restlichen Beobachtungszeitraum konstant blieb (Abbildung 27-B).



Abbildung 28: Graphische Darstellung der Aktivitätskinetik von nuklearem pSTAT3 nach IL-6-Stimulation in HaCaT-ras A5 (A) und MSU1.1 (B) in einem Beobachtungszeitraum von 120 Minuten. (n=3)

3.7.4 SOCS3

SOCS3 ist ein Negativ-Regulator im IL-6-Signalweg und verhindert durch die Bindung an die Phosphotyrosin-Bindestelle 759 des aktivierten gp130 den Downstream-Prozess der Signalkaskade.

HaCaT-ras A5 zeigten in der 30-minutigen Zeitperiode nach IL-6 Stimulation (Abbildung 29-A) kein Expression von SOCS3. Danach stieg die SOCS3 Proteinmenge rasch an und erreichte nach 45 Minuten ein Maximum. Anschließend fiel die Menge an SOCS3 stetig ab. Allerdings wurde auch nach 120 Minuten der Anfangswert noch nicht wieder erreicht.

MSU1.1 Zellen (Abbildung 27-B) zeigten keinen Anstieg der Proteinmenge von SOCS3 bis zum Zeitpunkt von 20 Minuten. Danach stieg der SOCS3-Level (bis 25 Minuten) und blieb bis zum Zeitpunkt 45 Minuten konstant. Anschließend konnte ein steiler Anstieg detektiert werden, der nach 60 Minuten ein Maximum erreichte. Anschließend sank das SOCS3-Level bis zum Zeitpunkt von 90 Minuten. Nach 90 Minuten konnte ein erneuter Anstieg bis zum Ende des Beobachtungszeitraums detektiert werden.



Abbildung 29: Graphische Darstellung der SOCS3 Expression nach IL-6-Stimulation in HaCaT-ras A5 (A) und MSU1.1 (B) in einem Beobachtungszeitraum von 120 Minuten. (n=3)

3.8 Umrechnung der Signalintensität in die Proteinkonzentration

Die Zugabe eines entsprechenden rekombinaten Proteins in definierter Konzentration ermöglicht die Berechnung der absoluten Proteinkonzentration. Hierdurch konnte man nicht nur die Differenzen in der Dynamik der einzelnen Proteine erkennen, sondern auch die Unterschiede in der Proteinkonzentration zwischen den HaCaT-ras A5 und MSU1.1 Zellen bestimmen.

Hierfür wurde das gemessene relative Signal des zu untersuchenden Proteins ins Verhältnis zur Signalintensität des rekombinatem Proteins gesetzt. Der daraus erhaltene relative Wert wurde in Konzentrationen umgerechnet, da ein linearer Zusammenhang zwischen dem gemessenen Signal und der Konzentration besteht. Die Berechnung der Konzentration der Signalproteine erfolgte nach folgender Formel:

$$Protein \ Konz. = \frac{Signal \ Protein}{Signal \ rekombinates \ Protein} \times Konz. \ rekombinantes \ Protein$$

Das Ermitteln der Proteinkonzentrationen (Tabelle 21, Tabelle 22), bezogen auf die Zellzahl, ermöglichte den Vergleich der im IL-6 Signalweg involvierten Moleküle zwischen HaCaT-ras A5 und MSU1.1 auf der Ebene der Molekülkonzentration.

HaCaT-ras A5	Mittelwert der Konzentration [nM]				
Zeit in min	gp130	STAT3 - Zytoplasma	STAT3 - Zellkern	SOCS3	
0	20,13	198,55	18,82	5997,35	
5	27,50	1574,11	48,57	7109,76	
10	15,16	4174,58	176,40	4352,92	
15	16,79	3561,22	261,49	5803,89	
20	20,04	6402,46	254,94	7690,15	
25	15,88	6468,38	322,53	8125,44	
30	15,21	9119,59	478,31	7206,49	
45	15,89	5170,03	315,89	26359,32	
60	15,24	2811,14	117,63	48365,72	
90	12,36	671,55	35,39	23747,57	
120	9,14	337,68	32,23	13880,96	

Tabelle 21: Errechnete Mittelwerte der Proteinkonzentration in HaCaT-ras A5

Tabelle 22: Errechnete Mittelwerte der Proteinkonzentration in HaCaT-ras A5

MSU1.1	Mittelwert der Konzentration [nM]			
Zeit in				
min	gp130	STAT3 - Zytoplasma	STAT3 - Zellkern	SOCS3
0	16,77	204,92	3,88	4836,26
5	24,35	1354,39	40,40	4050,84
10	19,34	1582,19	52,29	2109,22
15	15,79	1953,35	53,11	3792,49
20	11,34	1015,38	48,87	3333,24
25	11,47	969,35	45,89	9208,23
30	22,75	994,32	33,76	9868,95
45	21,26	292,66	34,97	7746,02
60	11,66	326,45	4,30	22484,79
90	15,88	187,86	3,60	4787,41
120	12,71	485,15	4,77	12638,67

3.9 Vergleich der Konzentrationen von gp130, pSTAT3 und SOCS3 nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 und MSU1.1

Um die dynamische Aktivierung der im JAK-STAT Signalweg involvierten Proteine zwischen HaCaT-ras A5 und MSU1.1 Zellen zu vergleichen, wurden die Konzentrationen der entsprechenden Proteine für beide Zelllinien gegenübergestellt (Abbildung 30).


Abbildung 30: Unterschiedliche Proteinkonzentration in HaCaT-ras A5 (rot) und MSU1.1 (grün) bei gp130, pSTAT3 (B+C) und SOCS3 (D) nach IL-6 Stimulation

Die Konzentration von gp130 hatte in beiden Zelltypen eine ähnliche Dynamik. Im Zeitraum von 30 bis 45 Minuten konnte bei den MSU1.1 eine um 10 nM erhöhte Konzentration im Vergleich zu den HaCaT-ras A5 detektiert werden. Im Zeitraum zwischen 90 und 120 Minuten war die Konzentration von gp130 in MSU1.1 etwa 5 nM höher als in den HaCaT-ras A5.

Ein deutlicher Unterschied der Protein Konzentration zeigte pSTAT3 in der cytosolischen Fraktion. Die zeitaufgelöste Dynamik war bei beiden Zelltypen ähnlich, jedoch konnte bei HaCaT-ras A5 Zellen eine bis zu 10-fach höhere Konzentration an pSTAT3 beobachtet werden als in MSU1.1 Zellen. Auch die nukleare Fraktion zeigte eine 10-fach höhere Konzentration an pSTAT3 in HaCaT-ras A5 im Vergleich zu den MSU1.1. Die Konzentration der SOCS3 Proteine war bis zum Zeitpunkt von 45 Minuten ähnlich gering in den beiden Zelltypen. Allerdings konnte im Zeitraum von 45 bis 120 Minuten bei HaCaT-ras A5 eine 2,5-fache höhere Konzentration an SOCS3 beobachtet werden als in MSU 1.1.

3.10 Etablierung eines mathematischen Modells für den gp130-STAT3-SOCS3 Signalweg in HaCaT-ras A5 und MSU1.1

Mathematische Modelle ermöglichen die Beschreibung von Signalwegen und die Identifikation von nicht bekannten experimentellen Parametern. Die Etablierung eines mathematischen Modells für den IL-6 induzierten gp130-STAT3-SOCS3 Signalweg in HaCaT-ras A5 und MSU1.1 wurde von unserem Kooperationspartner (Lars Kaderali, Dresden) mit den von uns erstellten Daten realisiert. Das Modell beschreibt die Aktivierungskaskade von gp130, STAT3 und dem negativen Feedback von SOCS3.

Hierbei wurden die Immunoblots für gp130, pSTAT3 und SOCS3 quantifiziert. Da beim Immunoblot nur relative Signale detektiert werden, wurde durch die Zugabe einer definierten Menge an rekombinatem Proteins die Quantifizierung bzw. Umrechnung der Proteinkonzentrationen erreicht (3.8). Die Quantifizierungen wurden in Triplikaten bestätigt (Abbildung 31). Für die mathematische Modellierung war es essentiell zu zeigen, dass die erhaltenen Dynamiken reproduzierbar waren und somit die Daten als Grundlagen für das mathematische Modell dienen konnten.

3.10.1 HaCaT-ras A5

Die Dynamik der für das mathematisches Modell relevanten Proteine über einen Zeitraum von 120 Minuten für HacaT-ras A5 nach IL-6 Stimulation ist im Abbildung 31 dargestellt. Abbildung 31-A zeigt die aus drei Versuchen analysierten Kinetiken des Rezeptormoleküls gp130 nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5. Die Triplikate zeigten einen ähnlichen Verlauf der Kinetik, allerdings mit einer Oszillation in den ersten 60 Minuten. Diese Oszillation lässt sich auf das starke Hintergrundrauschen zurückführen, das bei den Immunoblots für die Analyse der Rezeptorproteine gp130 auftrat.

In Abbildung 31-B wird die Analyse des cytoplasmischen pSTAT3 in Triplikaten gezeigt. Hier konnte ganz klar die Reproduzierbarkeit gezeigt werden, da in allen drei Versuchen eine ähnliche Aktivierungskinetik detektiert wurde. Abbildung 31-C zeigt die Aktivierung der pSTAT3 Moleküle im Nukleus als Triplikate.

Die Dynamiken zeigten untereinander ein Rauschen was auch durch starkes Hintergrundrauschen zu erklären ist, da klar zu erkennen ist das nach 30 Minuten in allen drei Kinetiken die Menge an pSTAT3 abnimmt und sich die Proben sehr ähnlich sind. Die SOCS3 Proteine zeigten in allen drei Versuchen ein nahezu identisches Dynamikverhalten.



Abbildung 31: Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Proteindynamiken für gp130 (A), pSTAT3 im Zytosol (B), pSTAT3 im Zellkern und SOCS3 nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5

Diese Daten waren ausreichend um ein Modell auf Basis von Differenzialgleichungen (ODE) für das dynamische Verhalten von pSTAT3 und SOCS3 Proteine in HaCaT-ras A5 zu entwickeln.

3.10.2 MSU1.1

Die Dynamiken der untersuchten Proteine für MSU1.1 nach IL-6 Stimulation werden in Abbildung 32 gezeigt. Abbildung 32-A zeigte in drei Versuchen einen ähnlichen Verlauf der Rezeptorproteine gp130 über einen Beobachtungszeitraum von 120 Minuten. Hierbei zeigten alle drei Versuche ein oszillierendes Verhalten, was sich jedoch wie bei den HaCaT-ras A5 Zellen ebenfalls auf das starke Hintergrundrauschen der Immunoblots zurückführen lässt. In Abbildung 32-B war zu erkennen, dass die Aktivierung der STAT3 Proteine reproduzierbar in den ersten 30 Minuten stattfindet und anschließend bis nahezu zum Anfangswert wieder absinkt. Die Menge an pSTAT3 im Nukleus (Abbildung 32-C) zeigte in den ersten 30 Minuten einen Anstieg der anschließen in allen drei Versuchen bis zum Anfangswert wieder abfiel. Das dynamische Verhalten von SOCS3 (Abbildung 32-D) konnte ebenfalls reproduzierbar detektiert werden. Hierbei war ein erster kleiner Anstieg nach etwas 30 Minuten zu detektieren, der anschließen wieder fiel. Bei allen drei Versuchen konnte das Maximum des SOCS3 Levels nach 60 Minuten beobachtet werden und zeigte bis zu 90 Minuten wieder



einen Abfall. Bis Zum Zeitpunkt von 120 Minuten war in allen Versuchen ein erneuter Anstieg zu erkennen.

Abbildung 32: Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Proteindynamiken für gp130 (A), pSTAT3 im Zytosol (B), pSTAT3 im Zellkern und SOCS3 nach IL-6 Stimulation in MSU1.1

3.10.3 Implementierung der Expressionsrate von SOCS3 in das mathematische Modell

Der negative Regulator SOCS3 verhindert die Downstream-Aktivierung des JAK-STAT Signalweges. Die SOCS3 Regulation wird von IL-6 beeinflusst, da IL-6 STAT3 aktiviert und STAT3/STAT3 Dimere im Zellkern als Transkpritionsfaktoren die SOCS3 Transkription beeinflussen, wodurch die Menge an SOCS3 Proteinen zunimmt, sobald die Zellen mit IL-6 stimuliert werden.

Um die Transkriptionsrate in das mathematische Modell zu integrieren, wurde diese mittels qPCR ermittelt und anschließend als ein weiterer Parameter ins Model eingerechnet.

In Abbildung 33 wird die Transkriptionsrate von SOCS3 nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 und MSU1.1 dargestellt.



Abbildung 33: qPCR von SOCS3 nach IL-6 Stimualtion in HaCaT-ras A5 (A) und MSU1.1 (B). (n=2)

Die erhaltenen Daten zeigen, dass die Transkription von SOCS3 in HaCaT-ras-A5 nach etwa 20 Minuten konstant zu steigen anfing und nach 45 Minuten ein Maximum erreichte, dass sich bis 60 Minuten hielt und anschließend bis zum Zeitpunkt von 120 Minuten auf den Anfangswert fiel (Abbildung 33-A).

Bei den MSU1.1 stieg die Transkription von SOCS3 schon nach 15 Minuten an und erreichte nach 25 Minuten ihr Maximum. Nach 45 Minuten begann ein Absinken der SOCS3 Transkription und erreichte nach 120 Minuten den Anfangswert (Abbildung 33-B).

Die erhaltenen Daten wurden in das mathematischen Modell für die IL-6 induzierte JAK/STAT Signaltransduktion in HaCaT-ras A5 und MSU1.1 integriert (Kooperation mit Bhagwan Yadaf (FIMM, Helsinki)).

3.10.4 Modell für HaCaT-ras A5 und MSU1.1

Beim mathematischen Modell für HaCaT-ras A5 und MSU1.1 wurde die Annahme in Betracht gezogen, dass sich die Zelllinien nur in wenigen Punkten des Signalweges unterscheiden. Somit konnte aus systembiologischer Sicht mithilfe weniger differenzieller Parameter zwischen den Zelllinien die Datensätze gleichzeitig beschrieben werden. Die Datensätze wurden hierbei durch folgende gewöhnliche Differenzialgleichungen (ODE) (in Kooperation mit Bhagwan Yadaf, FIMM, Helsinki), wie in Abbildung 34 beschrieben.

$\frac{d(gp130)}{dt} = -\frac{(k1 \times gp130 \times lL6)}{(1 + k2 \times SOCS3)n^1)} + (k3 \times pgp130)$	Parameter k1	gn130 Aktivierung üher II6
$\frac{d(pgp130)}{dt} = -\frac{(k1 \times gp130 \times lL6)}{(1 - (k2 \times SOCS3)n^1)} - (k3 \times pgp130)$	k2 k3	gp130 Inhibierung durch SOCS3 gp130 Deaktivierung
$\frac{d(STAT3)}{dt} = -\frac{(k4 \times STAT3 \times pgp130)}{(1 + (k5 \times SOCS3)n^2)} - (k7 \times pSTAT3n)$	k4 k5	STAT3 Aktivierung durch gp130 STAT3 Inhibierung durch SOCS3
$\frac{d(pSTAT3c)}{dt} = -\frac{(k4 \times STAT3 \times pgp130)}{(1 + (k5 \times SOCS3)n^2)} - (k6 \times pSTAT3c)$	k6 k7	STAT3 Import STAT3 Export
$\frac{d(pSTAT3n)}{dt} = (k6 \times pSTAT3c) - (k7 \times pSTAT3n)$	k9 k10	SOCS3 Translation SOCS3 Abbau
$\frac{d(SOCS3rna)}{dt} = (k8 \times pSTAT3n) - (k9 \times SOCS3rna)$		
$\frac{d(SOCS3)}{dt} = (k9 \times SOCS3rna) - (k10 \times SOCS3)$		

Abbildung 34: Parameter und mathematische Beschreibung analysierten Kinetiken durch ODE's für HaCaT-ras A5 und MSU1.1. In Kooperation mit Bhagwan Yadaf (FIMM, Helsinki)

Abbildung 34 zeigt die mathematische Beschreibung der gp130, STAT3 und SOCS3 Proteine, sowie die Transkription von SOCS3 über die Zeit (120 Minuten) mit entsprechenden Parametern, die experimentell ermittelt oder als Annahme festgelegt wurde. Die Ergebnisse wurden anschließen grafisch dargestellt (Abbildung 35).



Abbildung 35: Grafische Darstellung des mathematischen Modells für HaCaT-ras A5 und MSU1.1. In Kooperation mit Bhagwan Yadaf (FIMM, Helsinki)

Die grafische Darstellung des Modells beschreibt, wie durch IL-6 die Rezeptormoleküle gp130 durch eine Dimerisierung aktiviert werden (k1). Anschließend wird STAT3 durch Phosphorylierung aktiviert (k4) wodurch die STAT3 Dimere in den Zellkern transportiert werden (k6) wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken. Anschließend findet ein STAT3 Export ins Zytoplasma statt (k7). Die Aktivierung von SOCS3 durch STAT3 wird durch den

Parameter k8 beschrieben. Anschließend findet die SOCS3 Translation statt (k9) und SOCS3 bindet an den Rezeptorkomplex (k2) und inhibiert damit die STAT3 Phosphorylierung (k5) und somit die STAT3 Aktivierung. Als letzter Schritt wird im Modell der SOCS3 Abbau beschrieben (k10).

3.10.5 Experimentelle Validierung des mathematischen Modells für HaCaT-ras A5 und MSU1.1

Das erstellte Modell beschreibt die experimentellen Beobachtungen für die am IL-6 Signalweg beteiligten Proteine. Ziel des Modells war es, unabhängig vom Experiment das Verhalten von pSTAT3 und SOCS3 zu beschrieben und vorherzusagen. Hierzu war es notwendig, das Modell experimentell zu validieren.

Hierfür wurde zunächst dem Modell ein Szenario vorgegeben, bei welchem angenommen wurde, dass eine Konzentration von 100 ng/ml IL-6 nur 5 Minuten, als Puls, auf die Zellen wirkte. Die vom Modell erhaltenen Dynamiken für STAT3 und SOCS3 wurden anschließend mit den experimentellen Ergebnissen verglichen.

3.10.5.1 HaCaT-ras A5

Die Vorhersage des Modells für die IL-6 Puls-Wirkung auf die STAT3 Aktivierung im Zytoplasma beinhaltete die Annahme, dass die Menge an pSTAT3 gleich nach der Stimulation rapide ansteigen würde und ein Maximum nach 10 Minuten erreicht werden sollte. Anschließend sollte ein rapider Abfall an pSTAT3 statt finden und nach etwa 100 Minuten den Anfangswert erreichen (Abbildung 36-B). Das Validierungsexperiment (Abbildung 36-C) bestätigte die Simulation des dynamischen Verhaltens von pSTAT3 und zeigte einen nahezu identischen Verlauf über den Zeitraum von 200 Minuten.

Die Simulation für die IL-6 Pulse-Wirkung auf SOCS3 (Abbildung 36-D) in HaCaT-ras A5 sagte einen Anstieg nach 5 Minuten voraus, der sein Maximum nach 60 erreichte und anschließend konstant bis zum Zeitpunkt von 200 Minuten fiel. Das Experiment zeigte ein ähnliches dynamisches Verhalten, jedoch konnte der Anstieg von SOCS3 erst nach etwa 30 Minuten beobachtet werden, der aber dann, wie bei der Vorhersage, ein Maximum nach 60 Minuten erreichte. Anschließend fiel die Menge an SOCS3 ab und erreichte nach 110 Minuten nahezu den Anfangswert und hielt sich für die restliche Zeit konstant. Die Vorhersage sagt einen raschen Anstieg der SOCS3 Proteine voraus, der experimentell so nicht bestätigt werden konnte, jedoch zeigte der allgemeine Verlauf des Experimentes eine ähnliche Dynamik wie die mathematisch ermittelte Vorhersage.



Abbildung 36: Simulation der pSTAT3- (B) und SOCS3 Dynamik (D) durch 5 Minuten IL-6 Stimulation (A) und dazugehörige experimentielle Bestätigung der pSTAT3- (C) und SOCS3 Dynamik in HaCaT-ras A5

3.10.5.2 MSU1.1

Die Simulation der pSTAT3 Dynamik in MSU1.1 zeigte als Antwort der 5 minutigen IL-6 Stimulation einen starken Anstieg mit einem Maximum bereits nach 5 Minuten. Anschließend sagte das Modell voraus, dass die Menge an pSTAT3 bis zum Zeitpunkt von 90 Minuten konstant sinkt und den Anfangswert erreicht. Die Experimente zeigten einen rapiden Anstieg bis zu einem Maximum der STAT3 Phosphorylierung schon nach 5 Minuten mit anschließender Absenkung und dem Erreichen des Anfangswertes nach 60 Minuten (Abbildung 27).

Die Vorhersage des mathematischen Modells für die SOCS3 Dynamik sagte voraus, dass ein Anstieg von SOCS3 nach 5 Minuten zu detektieren ist und konstant ansteigt bis zum Erreichen des Maximums nach 60 Minuten. Laut Simulation fällt anschließend SOCS3 stetig ab und erreicht bis zum Zeitpunkt von 180 Minuten den Anfangswert. Das Validierungsexperiment zeigte einen Anstieg von SOCS3 erst nach 30 Minuten an, der anschließend ein Maximum nach 60 Minuten erreichte, wieder abfiel und nach 110 Minuten den Anfangswert erreichte, der sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraum konstant hielt. Auch bei den MSU1.1 Zellen zeigte die SOCS3 Dynamik im Versuch einen nicht ganz so raschen Anstieg wie durch das Modell beschrieben. Die grundsätzliche Dynamik von SOCS3 spiegelt sich jedoch in der Vorhersage wieder.

Das Modell konnte also validiert werden und die Dynamiken der MSU1.1 verhielten sich annähernd identisch zu den Vorhersagen.



Abbildung 37: Simulation der pSTAT3- (B) und SOCS3 Dynamik (D) durch 5 Minuten IL-6 Stimulation (A) und dazugehörige experimentielle Bestätigung der pSTAT3- (C) und SOCS3 Dynamik in MSU1.1

3.11 STAT3 Inhibierung durch STATTIC V- Inhibitor

Es ist bekannt, dass in vielen Krebsarten eine stetige erhöhte Menge an pSTAT3 zu detektieren ist [67].

HaCaT-ras A5 Zellen zeigten nach IL-6 Stimulation ca. die 5-fache Konzentration an pSTAT3 im Vergleich zu den MSU1.1 Zellen. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der

erhöhten Proliferation und die erhöhte Menge an pSTAT3 in HaCaT-ras A5 Zellen zu analysieren, wurden die Zellen mit dem STATTIC V Inhibitor (Millipore) behandelt, der durch die Bindung der SH2-Domäne der STATs seine Aktivierung durch die JAKs verhindert.

Für dieses Experiment wurden die Zellen mit dem STAT3 Inhibitor behandelt und anschließend direkt mit IL-6 stimuliert. Nach 24 Stunden wurde ein möglicher Effekt auf die STAT3 Aktivierung durch Western Blot untersucht (Abbildung 38).

Die HaCaT-ras A5 Zellen, die mit IL-6 stimuliert, aber nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden, zeigten nach 24 Stunden eine Aktivierung von STAT3. Die Zellen, die mit 5 nM Inhibitor behandelt wurden, zeigten nach 24 Stunden eine nahezu vollständige Inhibierung von STAT3 Phosphorylierung. Auch die Behandlung mit 10 nM STATTIC zeigte nach 24 Stunden eine vollständige Inhibierung der STAT3 Aktivierung. Die Expression von totalem STAT3 wurde bei allen drei Behandlungsszenarien nicht beeinflusst. Die erhaltenen Daten beweisen, dass in den HaCaT-ras-A5 Zellen der gewählte STAT3-Inhibitor gezielt die Phosphorylierung der vorhandenen STAT3 Moleküle verhindert (Abbildung 38).

Um eine mögliche Reaktion von STATTIC auf STAT1 auszuschließen (laut Hersteller in einigen Zelllinien möglich) wurde die Aktivierung von STAT1 nach Behandlung mit STATTIC untersucht. Phosphorylierung von STAT1 zeigte nach 24 Stunden Behandlung mit dem Inhibitor keine Veränderung, womit ein möglicher Effekt von STATTIC auf STAT1 Aktivierung in HaCaT-ras A5 ausgeschlossen werden konnte.



Abbildung 38: Effekt von 5 nM und 10 nM STAT3 Inhibitor (STATTIC) und anschließender IL-6 Stimulation auf STAT3 und STAT1 Phoshorylierung in HaCaT-ras A5.

3.12 Proliferation von HaCaT-ras A5 nach pSTAT3 Inhibierung

Um zu überprüfen, ob die STAT3 Aktivierung für die Erhöhung der Proliferation von HaCaTras A5 nach IL6 Stimulation unentbehrlich ist, wurden die Zellen zunächst mit dem STAT3 Inhibitor behandelt, anschließend direkt mit IL-6 stimuliert und dann einem Proliferationsassay unterzogen und über 72 Stunden beobachtet.



Abbildung 39: Proliferationsanalyse nach pSTAT3 Inhibierung und anschließender IL-6 Stimulation

Die Stimulation der HaCaT-ras A5 mit IL-6 führte nach 24 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung der Zellzahl von etwa 15.000 auf 37.000 Zellen, die nach 48 Stunden unverändert blieb und nach 72 Stunden auf etwa 45.000 Zellen anstieg.

Da der STAT3 Inhibitor als DMSO Lösung vorlag, wurden die Zellen, als zusätzliche Kontrolle, mit 10 mg/ml DMSO behandelt und mit IL-6 stimuliert. Die so behandelten Zellen verhielten sich analog zu den nur mit IL-6 stimulierten HaCaT-ras A5. Nach 24 Stunden stieg die Zellzahl von 15.000 Zellen auf 40.000, blieb nach 48 Stunden unverändert und erreichte nach 72 Stunden die Zellzahl von 52.000 Zellen.

Als weitere negative Kontrolle wurden die Zellen ohne IL-6 Stimulation nur mit dem Inhibitor behandelt. Hierbei konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Steigerung der Zellzahl beobachtet werden. Als Hungerkontrolle wurden die Zellen in 4xMEM (ohne FCS) und ohne IL-6 beobachtet. Auch hier konnte keine Veränderung der Zellzahl detektiert werden.

Die mit IL-6 stimulierten und mit STATTIC behandelten Zellen zeigten nach 24 Stunden einen leichten Anstieg der Zellzahl, der sich anschließend aber nicht fortsetzte. Die weiteren Zeitpunkte zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Zunahme der Zellzahl und verhielten sich analog zu der Negativkontrolle (Zellen ohne Stimulus in MEM) (Abbildung 39).

Die erhaltenen Daten zeigen, dass eine Inhibierung der STAT3 Phosphorilierung zu einer deutlichen und starken Reduktion der Zellproliferation in HaCaT-ras A5 Zellen führt.

3.13 Überexpression von STAT3

Die Inhibierung der STAT3 Phosphorylierung nach IL-6 Stimulation zeigte einen eindeutigen Effekt auf die Proliferation der HaCaT-ras A5. Da MSU1.1, deren Proliferation sich durch IL-6 nicht stimulieren lässt, eine sehr viel niedrige STAT3 Aktivierung als HaCaT-ras A5 Zellen aufweisen, wurden MSU1.1 Zellen mit einem STAT3 Plasmid transfiziert um einen möglichen Effekt auf die Proliferation zu untersuchen. Nach der Transfektion und Stimulation mit IL-6, wurden nach 24 und 48 Stunden die STAT3 sowie die pSTAT3 Menge gemessen (Abbildung 40).

In den Kontrollzellen konnte ohne IL-6 Stimulation (Zeitpunkt 0) keine Phosphorylierung von STAT3 detektiert werden. 24 Stunden nach IL-6 Zugabe konnte allerdings eine leichte Erhöhung des pSTAT3 Levels beobachtet werden, die nach 48 Stunden noch prominenter wurde. Das Level an totalem STAT3 blieb dabei unverändert. Auch in den Zellen mit STAT3 Überexpression konnte zum Zeitpunkt 0 ohne IL-6 keine STAT3 Phosphorylierung beobachtet werden. Nach 24 und 48 Stunden dagegen wurde eine starke Erhöhung des pSTAT3 Levels im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert. Auch das Level an totalem STAT3 erhöhte sich deutlich nach IL-6 Stimulation im Vergleich zu dem Zeitpunkt 0.



Abbildung 40: Detektion von pSTAT3 und totalem STAT3 nach IL-6 Stimulation in MSU1.1 Kontrollzellen und Zellen mit STAT3 Überexpression

3.14 Effekt von STAT3 Überexpression auf Proliferationsverhalten von MSU1.1

Wie in dieser Arbeit demonstriert wurde, zeigen die MSU1.1 nach IL-6 Stimulation keinen proliferativen Effekt, im Gegesatz zu den HaCaT-ras A5 Zellen, die auf IL-6 Zugabe mit einer erhöhten Proliferation reagieren. Um zu analysieren, ob die Erhöhung der STAT3 Aktivierung einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten in MSU1.1 ausübt, wurden STAT3

überexpremierende MSU1.1 mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert und via Proliferationsassay untersucht. Als Kontrolle wurden MSU1.1 Zellen verwendet, die ebenfalls STAT3 überexprimierten, aber nicht mit IL-6 stimuliert wurden.



Abbildung 41: Proliferationsanalyse mit STAT3 überexpimierten MSU1.1 Zellen nach IL-6 Stimulation

Die erhaltenen Ergebniss zeigten, dass bei den Kontrollzellen die Zellzahl nach 24 Stunden leicht absank. Danach stieg allerdings die Zellzahl langsam, aber kontinuierlich bis zu dem Endzeitpunkt von 120 Stunden an.

Bei den mit dem IL-6 behandelten Zellen konnte schon nach 24 Stunden eine deutliche Reduktion der Zellzahl (von 10.000 auf 5000 Zellen) detektiert werden. Diese Zellzahl erhöhte sich nur leicht auf 7500 Zellen und blieb bis zum Endzeitpunkt von 120 Stunden nahezu konstant. Bei allen untersuchten Zeitpunkten lag die Zellzahl der stimulierten Zellen signifikant unter der Zellzahl der Kontrollzellen (Abbildung 41).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Erhöhung der STAT3 Aktivierung keinen positiven Effekt auf die Proliferation bei MSU1.1 ausübt, sondern mit einer Reduktion der Zellzahl einhergeht.

3.15 SerpinB4 Proteinexpression nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 und MSU1.1

STAT3 spielt in der Aktivierung von SerpinB4, welches für die Inhibierung von Serin-Proteinase zuständig ist, eine entscheidende Rolle [109] [93, 95]. Die Ergebnisse der Microarrays zeigten, dass nach IL-6 Stimulation die mRNA Expression von SerpinB4 in HaCaT-ras A5 hochreguliert wird, während bei den MSU1.1 Zellen keine Veränderung der Genexpression von SerpinB4 zu detektieren war. Um einen Effekt der IL-6 Stimulation auf die SerpinB4 Proteinexpression zu untersuchen, wurden die Zellen mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert, über 24 Stunden beobachtet und mittels Western Blot die Proteinexpression analysiert.

3.15.1 HaCaT-ras A5

Die Analyse der SerpinB4 Proteinexpression in den unstimulierten HaCaT-ras A5 Zellen zeigte, dass SerpinB4 auch ohne IL-6 Stimulation exprimert wurde.

Die IL-6 Stimulation von HaCaT-ras A5 bewirkte nach 2 Stunden eine leichte Erhöhung des SerpinB4 Levels im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. In der Zeitperiode von 4 Stunden bis 24 Stunden stieg die Menge an Protein konstant an.



Abbildung 42: SerpinB4 Expression in HaCaT-ras A5. Links: Proteinexpression von SerpinB4 nach IL-6 Stimulation. Rechts: Proteinexpression von SerpinB4 ohne IL-6 Stimulation. Als Kontrolle wurde alpha-Tubulin verwendet

3.15.2 MSU1.1

MSU1.1 Zellen zeigten über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden eine geringe Menge an SerpinB4, die sich auch nach IL-6 Stimulation nicht änderte. Sowohl in den mit IL-6 stimulierten Zellen als auch in den Kontrollzellen konnte keine Veränderung des SerpinB4 Levels über den Beobachtungszeitraum detektiert werden.



Abbildung 43: SerpinB4 Expression in MSU1.1 A5. Links: Proteinexpression von SerpinB4 nach IL-6 Stimulation. Rechts: Proteinexpression von SerpinB4 ohne IL-6 Stimulation. Als Kontrolle wurde alpha-Tubulin verwendet

3.16 STAT3 abhängige SerpinB4 Regulation

Die Korrelation der Erhöhung der STAT3 Aktivierung nach IL-6 Stimulation und der ebenfalls erhöhten Menge an SerpinB4 ließ einen Zusammenhang zwischen beiden Effekten vermuten.

Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurde die zuvor mit dem STAT3 Inhibitor behandelten und mit IL-6 stimulierten HaCaT-ras A5 Zellen auf eine Veränderung der SerpinB4 Proteine untersucht (Abbildung 44).



Abbildung 44: Behandlung der HaCaT-ras A5 mit STATTIC (5 nM, 10 nM). Die Inhibierung der STAT3 Aktiverung wirkte sich auch auf die Expression von SerpinB4 aus.

Es ist deutlich zu erkennen, dass mit Inhibierung von pSTAT3 die Menge an SerpinB4 analog abnimmt. Nach 24 Stunden der Behandlung mit 5 nM STATTIC ist kaum noch STAT3 Aktivität zu detektieren und auch die Intensität von SerpinB4 hat 24 Stunden nach der Behandlung stark abgenommen. Bei der Behandlung mit 10 nM STATTIC konnte nach 24 Stunden beinahe keine STAT3 Aktivierung detektiert werden und analog dazu war auch die Menge an SerpinB4 Protein stärker reduziert.

3.17 Knock Down von SerpinB4

In dieser Arbeit konnte demonstiert werden, dass die Stimulation mit IL-6 einen positiven Effekt auf die Proliferation der HaCaT-ras A5 hat. Des weiteren wurde gezeigt dass nach IL-6 Stimulation die Menge an SerpinB4 sowohl auf mRNA wie auch auf Proteinebene rasch ansteigt. Zudem führte die Inhibierung der STAT3 Phosphorylierung zu einer deutlichen Reduktion des SerpinB4 Levels, was auf eine mögliche Verbindung zwischen diesen beiden Proteinen hinweist. Parallel zur Abnahme des SerpinB4 Levels wurde nach Inhibierung der STAT3 Phospohorylierung auch eine Reduktion der IL-6 induzierten Proliferation beobachtet. In MSU1.1 Zellen, die keinen Einfluss von IL-6 auf die Proliferation zeigten, war auch die Expression von SerpinB4 nach IL-6 Stimulation nicht verändert. Um zu analysieren, ob

SerpinB4 bei der Regulation der IL-6 induzierten Proliferation eine Rolle spielt, wurde in den HaCaT-ras-A5 Zellen die Expression von SerpinB4 mittels siRNA Methode herunterreguliert und die Zellproliferation untersucht (Abbildung 45).



Abbildung 45: Knockdown von SerpinB4 mittels Elektroporation

Die mit der SerpinB4 siRNA transfizierten Zellen zeigten nach 24 und 48 Stunden eine leichte Reduktion des SerpinB4 Level im Vergleich zum Anfangswert (Nullpunkt). Nach 72 Stunden konnte eine erneute leichte Abnahme des SerpinB4 Levels detektiert werden (Abbildung 45).

Die Kontrollzellen die mit der Non-Taregting siRNA transfiziert wurden, zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Veränderung im SerpinB4 Level.

3.18 Proliferation von HaCaT-ras A5 nach IL-6 Stimulation und SerpinB4 Runterregulation

Nachdem beobachtet wurde, dass SerpinB4 analog zu bzw. durch pSTAT3 reguliert wurde, wurde die Proliferation von HaCaT-ras A5 analysiert, nachdem SerpinB4 durch siRNa herunterreguliert wurde. Hierbei sollte die Frage beantwortet werden, ob die pSTAT3 Expression direkt im Zusammenhang mit der Zellproliferation steht oder ob durch pSTAT3 regulierte Proteine wie SerpinB4 eine funktionelle Rolle spielen.

Nach der Runterregulation von SerpinB4 durch siRNA in HaCaT-ras A5 wurden die Zellen mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert und anschließend der Effekt auf die Proliferation über 96 Stunden beobachtet.



Abbildung 46: Proliferationsanalyse nach IL-6 Stimualtion mit SerpinB4 Knock Down (A). Als Kontrolle wurden die Zellen mit Non-Targeting siRNA transfiziert und ebenfalls mit IL-6 stimuliert (B).

Die mit SerpinB4-siRNA transfizierten Zellen zeigten nach IL-6 Stimulation über der ganzen Beobachtungsperiode keine signifikante Veränderung der Proliferationsrate. Die unstimulieren Zellen mit SerpinB4 Herunterregulation zeigten dagegen nach 48 Stunden einen deutlichen Anstieg der Zellzahl, die bis zum Endzeitpunkt von 96 Stunden konstant blieb. In der Zeitperiode von 48 bis 96 Stunden war die Zellzahl der unstimulierten Zellen deutlich höher als bei den Zellen, die mit IL-6 behandelt wurden (Abbildung 46-A).

Die mit "Non-Targeting siRNA" transfizierten Kontroll-HaCat-ras-A5 zeigten 24 Stunden nach IL-6 Stimulation eine Reduktion der Zellzahl, die über 48 Stunden konstant blieb. 72 Stunden nach IL-6 Stimulation konnte eine deutliche Erhöhung der Zellzahl beobachtet werden, die nach 96 Stunden noch prominenter wurde. Die im Vergleich zu vorherigen Versuchen späte Proliferation der HaCaT-ras A5 Zellen nach IL-6 Stimulation in der Kontrolle lässt sich auf die Elektroporation zurückführen, welche für die Zellen mit einem erhöhtem Stress verbunden ist.

Auch die Zellzahl der unstimulierten Kontrollzellen reduzierte sich deutlich nach 24 Stunden, blieb unverändert nach 48 Stunden, stieg erneut leicht an nach 72 Stunden und blieb wieder konstant bis zum Endzeitpunkt. Dies zeigt, dass die Zellen nach der Elektroporation eine gewisse Zeit zur Regeneration benötigen.

Die Ergebnisse zeigten einen Trend, der vermuten lässt, dass SerpinB4 direkt an der Regulation der durch IL-6 Stimulation erhöhten Proliferation beteiligt ist.

3.19 Charakterisierung der differentiellen biologischen IL-6 Antworten in HaCaT-ras A5 und MSU1.1 durch Microarrayanalyse

Als pleiotropes Zytokin ist IL-6 fähig unterschiedliche biologische Effekte auszulösen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass IL-6 Stimulation zu einer Aktivierung von STAT3 Proteinen führt, die wiederum die Transkription von verschiedenen Faktoren

regulieren. Für eine genaue Analyse, welchen Effekt die STAT3 Aktivierung auf die Expression verschiedener Proteine ausübt und für Charakterisierung der induzierten biologischen Antworten von HaCaT-ras A5 versus MSU1.1 wurden die bereits in 2.2.10 beschriebenen Microarray Daten erneut analysiert. Die Analysen wurden von Hauke Busch und Melanie Boerries (DKFZ Heidelberg) mit dem Statistik Programm R durchgeführt (http://www.r-project.org/).

Hierbei wurden die mit 100 ng/ml IL-6 stimulierten sowie unstimulierten Kontroll-HaCaT-ras A5 und die MSU1.1 Zellen für 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden stimuliert, sowie Zellen ohne Stimulation verglichen.

Von insgesamt 16266 gemessen Genen waren nach IL-6 Stimulation 795 Gene in den HaCaT-ras A5 Zellen hochreguliert, in den MSU1.1 Zellen waren es 225 Gene. Es konnten 19 Gene detektiert werden, die in beiden Zelllinien gleichermaßen hochreguliert wurden. Die restlichen 15227 Gene zeigten keine signifikante Hochregulation nach IL-6 Stimulation Abbildung 47.





Bei den herunterregulierten Genen wurden 796 Gene in HaCaT-ras A5 Zellen detektiert, bei den MSU1.1 Zellen waren es 202 Gene. 13 Gene wurden in den beiden Zelltypen gleichermaßen herunterreguliert. Diese Ergebnisse machten deutlich, dass MSU1.1 und HaCaT-ras A5 wenige gemeinsam regulierte Gene nach IL-6 Stimulation haben.

Um einen Zusammenhang der gleichermaßen hochregulierten Gene in HaCaT-ras A5 und MSU1.1 zu untersuchen, wurden diese Gene per GeneMania (http://www.genemania.org/) analysiert. Hierbei konnten die Verbindungen der Gene als Netzwerk dargestellt werden.



Abbildung 48: Hochregulierte Targetgene nach IL-6 Stimulation gleichsam in HaCaT-ras A5 und MSU1.1. In Kooperation mit Hauke Busch (DKFZ, Heidelberg)

Abbildung 48 zeigt die Verbindung der Target-Gene, die gleichermaßen nach IL-6 Stimualtion in HaCaT-ras A5 und MSU1.1 hochreguliert werden. Die Abbildung bezieht sich auf mathematische Abstimmungen die GeneMania anhand von vorhandener Literatur vorliegt.

Die Target-Gene in schwarz zeigen die gemeinsamen hochregulierten Gene in MSU1.1 und HaCaT-ras A5. Die grauen Gene zeigen Gene, die in der Interaktion eine Rolle spielen und in manchen Fällen sogar als notwendig erscheinen, wenn zwei Target-Gene durch solch ein Gen verbunden sind. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Grafik ist die Entfernung der einzelnen Gene. Die Gene, die grafisch nah beieinander liegen, beeinflussen sich gegenseitig stark. Je weiter ein Gen entfernt ist, desto geringer ist die Beinflussung. Die Betrachtung der einzelnen Target-Gene und ihrer Funktionen sowie eine weitere Auswertungen der GeneMania Daten zeigten, dass die analysierten Target-Gene alle in Verbindung mit dem Interferon Signaling sind.

Die Ergebnisse zeigten, dass wenige Gene in HaCaT-ras A5 und MSU1.1 gleichermaßen hochreguliert sind. Die vorangegangenen Versuchen zeigten ebenfalls, dass es phänotypische Unterschiede nach der IL-6 Stimulation in der Proliferation und Sekretion von Zytokinen zwischen HaCaT-ras A5 und MSU1.1 gibt. Um diesen Unterschied auf eine vermutliche spezifischen Genregulation nach IL6 Stimulation zurückzuführen, wurde die Daten der Microarrayanalyse auf unterschiedliche Aktivierung von Signalwegen untersucht. Die Auswertung der hochregulierten Signalwege zeigte, dass die HaCaT-ras A5 Zellen stärker auf IL-6 reagieren als MSU1.1 Zellen. Insbesondere war zu erkennen, dass das JAK-STAT Signaling und NF-kB Signaling in den HaCaT-ras A5 nach IL-6 Stimulation stärker aktiviert wird als in den MSU1.1 Zellen. In den MSU1.1 ist einzig das Interferon Signaling nach IL-6 Stimulation stark hochreguliert.

Bei den Runterregulierten Signalwegen nach der IL-6 Stimulation konnte detektiert werden, dass MSU1.1 Zellen im Vergleich zu HaCaT-ras A5 Zellen in den Zellwachstumsprozessen, insbesondere nach 24 Stunden, stark herunterreguliert waren (6.2). Die Ergebnisse machten deutlich, dass HaCaT-ras A5 Zellen und die MSU1.1 Zellen deutlich unterschiedlich auf die IL-6 Stimulation reagieren.

4 Diskussion

Über viele Jahre ist die Wissenschaft davon ausgegangen, dass das körpereigene Immunsystem Tumore ausschließlich bekämpft. Es ist jedoch mittlerweile bekannt, dass das Immunsystem dieser Aufgabe häufig nicht gerecht wird sondern das Tumorwachstum und die Progression sogar vorantreibt. Stoßen Immunzellen auf Tumorzellen, können sie eine Entzündung auslösen, die, im Gegensatz zu einer normalen Verletzung, nicht in ihrem zeitlichen Ablauf strikt reguliert ist und sich relativ rasch wieder auflöst, sondern bei der Abwehrzellen durch Produktion bestimmter Faktoren, wie Zytokine, eine andauernde, chronische Entzündung verursachen. Aus diesem Grund werden Tumore auch als "Wunden, die niemals heilen" bezeichnet.

Die Tumorprogression hängt hierbei wesentlich von der Interaktion der Tumorzellen mit dem gesunden Gewebe ab, das den Tumor umgibt.

Der Chirurg Steve Paget stellte schon 1889 eine Hypothese auf, die besagt, dass Krebszellen nur dort Metastasen bilden können, wo sie auf eine wachstumsfördernde Umgebung treffen - "seed and soil hypothesis" - [110]. Mittlerweile weiß man, dass die tumorfördernde Umgebung auch für das lokale Wachstum und die Progression primärer Tumore eine entscheidende Rolle spielen.

Das Zytokin IL-6, welches in der Wundheilung und in Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle für die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen spielt, findet sich auch in Tumoren verstärkt exprimiert [22, 52] und steht dort im direkten Zusammenhang zur Entwicklung maligner Tumore. Eine erhöhte IL-6 Expression konnte in unterschiedlichen Tumoren, wie Adenokarzinomen der Brust, des Dickdarms und in Ovarien nachgewiesen werden [27].

Die Überexpression von IL-6 führt, wie inzwischen gezeigt werden konnte, zur autokrinen bzw. parakrinen Stimulation der Tumor- und Stromazellen [5] durch deren Wechselwirkung eine Vielzahl weiterer Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt werden [76, 77].

Hierbei stellt sich die Frage ob IL-6 direkt an der Tumorprogression beteiligt ist oder nur als Initiator eines stark vernetzen Zytokinnetzwerkes dient.

Die Analyse des JAK-STAT Signalweges in Tumorzellen und stromalen Fibroblasten, sowie die Untersuchung der Rolle von IL-6 im Crosstalk zwischen diesen unterschiedlichen Zelltypen könnte einen Aufschluss über die tumorfördenden Funktionen von IL-6 geben und war Thema dieser Arbeit. Durch die Analyse und den Vergleich der unterschiedlichen zellulären Reaktionen, wie Proliferation und Migration von Tumorzellen und Fibroblasten kann damit letzlich eine Grundlage geschaffen werden um den tumorfördernden Effekt von IL-6 zu kontrollieren bzw. zu unterdrücken.

4.1 IL-6 löst unterschiedliche physiologische Reaktionen in HaCaT-ras A5 Zellen und MSU1.1 Zellen aus

Tumorzellen exprimieren große Mengen an Zytokinen wie IL-6, die stromale Zellen parakrin stimulieren, sowie die Proliferation und Migration der Tumorzellen autokrin fördern [53, 106]. Der genaue Mechanismus hierfür ist jedoch noch nicht bekannt. Dessen Untersuchung war daher Thema dieser Arbeit.

Hierbei diente die Zelllinie HaCaT-ras A5 als Modell für Plattenepithelkarzinome der Haut. Die Zelllinie MSU1.1 ersetzte primäre Fibroblasten, Zellen die in der Etablierung eines tumorfördernden Stromas einen entscheidende Rolle spielen. MSU 1.1 Zellen wurden gewählt, da die Verwendung von primären Zellen für die geplanten Experimente eine gewisse Schwierigkeit darstellte. Primäre Zellen mussten für ein Experiment so schnell wie möglich nach Isolation verwendet werden. Auch sollten die isolierten Fibroblasten idealerweise wegen der genauen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse vom gleichen Donor stammen und aus der gleichen Gewebestruktur. Um diese Schwierigkeiten zunächst zu umgehen und um die Versuchsplanung zu erleichtern, wurde die Zelllinie MSU1.1 verwendet.

Durch die Stimulation der beiden Zelllinien HaCaT-ras A5 und MSU1.1 mit IL-6, konnte eine verstärkte Migration der HaCaT-ras A5 Zellen und der MSU1.1 Zellen ausgelöst werden. Beim Effekt von IL-6 auf die Proliferation ergab sich jedoch ein kontroverses Bild. HaCaT-ras A5 Zellen zeigten schon bei der Stimulation mit 25 ng/ml IL-6 eine maximale Förderung der Proliferation. Eine Erhöhung der IL-6 Konzentration bewirkte keine weitere Steigerung der Proliferationsrate. Dies lässt auf eine Sättigung der maximalen Aktivierung bei 25 ng/ml IL-6 schließen. In der Literatur variierten die verwendete Konzentration für IL-6 abhängige Versuche zwischen 50 ng/ml – 100 ng/ml [76, 77], was über der hier ermittelten Konzentration liegt.

Badache et al. zeigte, dass bei einigen Zelltypen, wie M1 myeloische Leukämie-Zellen, Melanomzellen im frühen Stadium und Tumorzellen aus Lungen- oder Brustkarzinomen die IL-6 Stimulation einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation hatten. Die Proliferationsinhibierung wurde dabei durch eine STAT3 abhängige Aktivierung verursacht, während die Migration durch den MAPK/PI3K Signalweg gefördert wird [111].

Im Gegensatz dazu zeigten andere Autoren, dass in humanen Melanomzellen, die Proliferation nach IL-6 Stimulation ansteigt und diese Erhöhung durch eine erhöhte STAT3 Aktivierung verursacht wird [112] und sich bei konstanter Aktivierung wie ein Onkogen verhält [113].

Die zelluläre Antworten von HaCaT-ras A5 Zellen auf IL-6 Stimulation, die in dieser Arbeit gezeigt wurden, stimmen mit den Literaturangaben überein, die belegen, dass durch IL-6 Stimulation die Proliferation sowie die Migration dieser Zellen gefördert wird [77].

In diesem Zusammenhang ist es auch interessant, dass in unterschiedlichen Studien gezeigt werden konnte, dass die Migration von HaCaT-ras A5 Zellen abhängig vom MAPK Signalweg oder PI3K Signalweg sind, und eine Inhibierung der Migration nach Blockierung dieser Signalwege beobachtet werden kann [114, 115].

Während die epithelialen HaCaT-ras A5 Tumorzellen durch IL-6 zur Proliferation und Migration angeregt wurden, zeigten die mesenchymalen MSU1.1 Fibroblasten ein deutlich anderes Verhalten. Die Proliferation dieser Zellen wurde durch IL-6 Stimulation nicht beeinflusst. Schon 1996 wurde von Mihara et al. gezeigt, dass die Zugabe von IL-6 zu dermalen Fibroblasten zu einer Inhibierung der Proliferation führt [116] wobei bereits in dieser Arbeit vermutet wurde, dass dieser Effekt nicht nur durch IL-6 hervorgerufen wird, sondern weitere Faktoren eine Rolle spielen, die durch IL-6 aktiviert werden und einen regulierenden Mechanismus antreiben [116]. Zang et al. zeigte 2011, dass die Proliferation von humanen Lungenfibroblasten durch die Expression von IL-6 und IL-8 autokrin inhibiert wird [117], allerdings wurde auch in dieser Arbeit ein genauer Mechanismus nicht beschrieben.

Einen Aufschluss über die molekularen Mechanismen, die der unterschiedlichen Reaktion von Tumorkeratinozyten und Fibroblasten auf die IL-6 Stimulation zugrunde liegen, könnte eine Analyse der intrazellulären Regulation/Signaltransduktion nach IL-6 Stimulation geben. Die Abnahme der Zellzahl bei einer Stimulation von 150 ng/ml IL-6 legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine durch SOCS induzierte Seneszenz handeln könnte [118, 119]. Die in dieser Arbeit beschriebene erhöhte STAT3 Aktivierung in den Fibroblasten resultierte auch in einer erhöhten SOCS3 Expression. Aktuelle Studien zeigten, dass durch eine hohe SOCS Expression, vor allem von SOCS1, eine p53 abhängige Seneszenz in Fibroblasten induziert werden kann [118, 119]. In den Brustkarzinom-Zellinien MCF-7 und HCC1937 wird SOCS1 durch INFy stark hochreguliert, während SOCS3 herunterreguliert wird [73]. Mikroarray Daten aus dieser Arbeit zeigen, dass in MSU1.1 Zellen durch IL-6 Stimulation das INF-Signaling auf mRNA Ebene stark hochreguliert wurde. Es wäre demnach möglich, dass auch in MSU1.1 Zellen die Aktivierung von INF-Signaling zu einer Hochregulation von SOCS1 führt, was eine Seneszenz in den Zellen induziert und einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation hervorruft. Da in der hier vorgelegten Arbeit der Fokus jedoch auf den Analysen des Negativregulators SOCS3 lag müsste dieser Frage in gesonderten Experimenten nachgegangen werden.

Zusammen gefasst zeigen die Ergebisse klar, dass die unterschiedliche physiologischen Eigenschaften in HaCaT-ras A5 Zellen und MSU1.1 Zellen nach IL-6 Stimulation unterschiedliche Reaktionen auslösen. Unterschiedliche Zelltypen können unterschiedlich

auf Faktoren wie IL-6 reagieren und dadurch unterschiedliche Signalwege aktivieren, die sich wiederum auf Unterschieden in der Proliferation und Migration auswirken können [120].

4.2 IL-6 induziert ein Netzwerk an Faktoren zur Förderung der Tumorprogression

Auch im Bezug auf die Expressionsanalsyse der Zytokine via ELISA zeigten HaCaT-ras A5 und MSU1.1 Zellen eine unterschiedliche Antwort auf die IL-6 Stimulation.

Während VEGF auch in unstimulierten HaCaT-ras A5 Zellen exprimiert wird, konnte in den MSU1.1 die Expression von VEGF nur nach IL-6 Stimulation detektiert werden. Normalerweise wird VEGF unter physiologischen Bedingungen überwiegend von mesenchymalen Zellen exprimiert und hat neben seiner physiologischen auch eine zentrale Rolle in pathologischen Prozessen wie der Tumorangiogenese [121]. In Übereinstimmung mit unseren Befunden zeigen Daten aus der Literatur, dass durch IL-6 die Induktion von VEGF auch *in vivo* beobachtet werden kann. IL-6 aktiviert hierbei die stimulierten Fibroblasten und induziert die Expression von VEGF. Die so aktivierten Fibroblasten initiieren eine Erhöhung der mikrovasculären Permeabilität und eine Produktion von Plasmaproteinen, wie Fibrin, welche wiederum einen Einfluss auf Fibroblasten, Entzündungszellen und Endothezellen haben [122].

In den HaCaT-ras A5 Zellen wurde die basale VEGF Expression, die auch ohne IL-6 Stimulation vorhanden war, durch die Stimulation mit IL-6 deutlich erhöht. Diese Zunahme in der VEGF Expression befindet sich im Einklang mit der Beobachtung, dass Tumorzellen in der Interaktion mit anderen Zellen im Tumorgewebe hohe Mengen an VEGF exprimieren, was wiederum parakrin die Proliferation und Migration von Endothelzellen der Umgebung und die Rekrutierung von z.B. Makrophagen in die Tumorumgebung fördern kann [123-125]. Tumor- und Stromazellen wie Fibroblasten exprimieren also in der Tumormikroumgebung unter den entsprechenden Stimulationsbedingungen große Mengen an VEGF. Daher ist VEGF auch als therapeutisches Target in der Tumortherapie interessant und eine Blockade von VEGF mittels Antikörper wird z.B. in der Therapie von Colonkarzinomen eingesetzt [126].

Im Gegensatz zur Induktion von VEGF zeigte die IL-6 Stimulation keinen Effekt auf die Expression von GM-CSF in MSU1.1 Fibroblasten. Die Zellen zeigten unahängig von der IL-6 Behandlung eine relativ konstante Expression von GM-CSF. Dies entspricht der Situation in normaler Haut wo die Expression von GM-CSF durch aktivierte Fibroblasten Keratinozyten zum Wachstum und zur Differenzierung anregten [58].

In HaCaT-ras A5 Zellen dagegen wurde durch die Stimulation mit IL-6 nach 72 Stunden eine Erhöhung der GM-CSF Expression detektiert. Dieser relativ späte Effekt könnte auf einen autokrinen Mechanismus hindeuten der sekundär nach der IL-6 Stimulation abläuft. Die

Zellen, initiiert durch IL-6, produzieren als Antwort auf die Stimulation ein breites Netzwerk an Zytokinen und Faktoren, die dann wiederum autokrin wirken können. Eine verstärkte Expression von IL-6 und GM-CSF induziert eine Progression von benignen HaCaT-ras Zellen zur einem malignen Phenotyp und ist u.a. assoziiert mit einer verstärkten Proliferation und Migration der Tumorzellen [58], was mit Beobachtungen an SCC's korreliert [127]. Aktuelle Studien zeigen, dass auch Zellen von Glioblastomen eine erhöhte Menge an GM-CSF produzieren, welches im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren, wie IL-2 und IL-4, die Überlebenschancen der Tumorzellen zu erhöhen scheint [128]. Zudem konnte für humane Kopf-Hals-Karzinome gezeigt werden, dass ein invasives Wachstum der Tumorzellen in organtypischen Kulturen (OTK) und malignes Tumorwachstum in Mäusen durch GM-CSF gefördert wird. Dabei kann die Tumorzellinvasion in der OTK durch Behandlung mit einem GM-CSF blockierenden Antikörper unterbunden werden [129].

Betrachtet man die Sekretion von IL-8 in Abhängigkeit von der IL-6 Stimulation so ergibt sich ein ähnlicher Verlauf wie für die Expression von GM-CSF. MSU1.1 Zellen zeigten eine nahezu konstante Expression von IL-8 nach IL-6 Stimulation. Erst nach 72 und 96 Stunden konnte eine geringe Erhöhung von IL-8 detektiert werden, die auf einen möglichen autokrinen Effekt hinweist. Die Rolle von IL-8 in der Proliferation von Keratinozyten und Fibroblasten wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum einen wird IL-8 ein inhibierender Effekt auf die Proliferation von Keratinozyten zugesprochen [130] auf der anderen Seite wurde durch *in vitro* Versuche gezeigt, dass IL-8 einen stimulierenden Effekt auf die Proliferationzyten hat [131], was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Aktuelle Studien zeigten, dass IL-8 sowie IL-6 an der Proliferation von Keratinozyten in der Wundheilung und im Tumor beteiligt sind [79] und dass IL-8, das durch HaCaT Zellen exprimiert wird, wiederum Fibroblasten zur Proliferation anregen kann [80].

Auch die KGF Expression wird durch IL-6 stimuliert und zeigt dabei in beiden Zelltypen einen ähnlichen Verlauf. In den ersten 72 Stunden hat die IL-6 Stimulation keinerlei Einfluss auf die Expression von KGF. Nach 96 Stunden allerdings produzieren beide Zelllinien in Gegenwart von IL-6 fast die doppelte KGF Menge im Vergleich zu den Kontrollen. Wieder läßt dieser späte Einfluss von IL-6 auf die KGF Expression vermuten, dass ein autokriner Effekt vorliegt, bei dem ein durch IL-6 rasch induzierter Faktor letztlich zur verstärkten Expression von KGF in HaCaT-ras A5 und MSU 1.1 Zellen führt.

Ein ähliches Phänomen wird auch bei der Interaktion von Tumor und Stroma in Pakreaskarzinomen beobachtet. Hier wird KGF durch einen ständigen Crosstalk, der ein aktiviertes Zytokin Netzwerk induziert, stark überexprimiert, wirkt auf Fibroblasten migrationsfödernd und fördert letztlich die Tumorprogression [84]. Die Rolle von KGF in Tumorwachstum und Progression wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In Pankreaskarzinomen korreliert die KGF Expression mit der Invasion der Tumorzellen [132]. In Adenokarzinomen und SCC's der Lunge liegt ebenfalls eine stark erhöhte Expression von KGF vor [133]. Interessanterweise konnte in der Arbeit von Ning et al. 1998 nachgewiesen werden, dass die Proliferation von Kopf-Hals SCC's durch KGF nicht stimuliert wird, obwohl es sich bei diesen Zellen ebenfalls, wie bei den HaCaT-ras Zellen sowie den Pankreas- und Lungenkarzinomen, um Tumorzellen epithelialen Ursprungs handelt [134].

Die Expression von HGF konnte nur in MSU1.1 Fibroblasten detektiert werden. Die HaCaTras A5 Zellen zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Expression von HGF, was mit den Ergebnissen von Depner et al übereinstimmt [76]. HGF ist ein Wachstumsfaktor, der überwiegend von mesenchymalen Zellen exprimiert wird und diverse biologische Aktivitäten in Epithelzellen auslöst [82]. In der Tumorprogression beeinflusst HGF, welches von Fibroblasten exprimiert wird, die Proliferation und die Mobilität von Epithelzellen [135].

Die MSU1.1 Zellen zeigten in den ersten 72 Stunden nach IL-6 Stimulation eine leicht erhöhte Expression von HGF im Vergleich zur Kontrolle, nach 96 Stunden ist die HGF Sekretion fast auf die doppelte Menge an angestiegen.

Jia et al. zeigte 2013, dass aktivierte Fibroblasten die Proliferation von Tumorzellen aus hepatozellulärem Karzinomen fördern können, indem sie Wachsutmsfaktoren wie HGF, FGF oder IL-6, verstärkt sezernieren [81]. Dies könnte einen Hinweis auf eine parakrine Funktion des von den Fibroblasten nach IL-6 Stimulation verstärkt sezernierten HGF sein, das möglicherweise in einer multizellulären Umgebung Zellen aus der Nähe stimulieren kann.

Die Interaktion zwischen dem Tumor und der Tumormikroumgebung spielt in der Tumorprogression eine entscheidende Rolle. In vielen Tumorarten ist eine erhöhte Konzentration an IL-6 zu detektieren, das wie die Ergebnisse zur Induktion verschiedener Wachstumsfaktoren in Fibroblasten und epithelialen Tumorzellen zeigen, sicher eine Rolle im Crosstalk zwischen dem Tumor und tumorassoziierten Fibroblasten spielt und damit möglicherweise einen tumorfördernden Effekt hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die durch IL-6 sezernierten Faktoren ein wichtiger Bestandteil eines Zytokinnetzwerkes darstellen, welche einen wesentlichen Beitrag zur Proliferation und zur Migration von epithelialen Tumorzellen aber auch zur Aktivierung der Fibroblasten selbst leisten. Hierbei sollte der Fragen nachgegangen werden, welche Faktoren direkten Einfluss auf die Zellen haben oder welchen Mechanismus die exprimierten Faktoren in den Tumorzellen und den Zellen aus der Mikroumgebung auslösen.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, das Fibroblasten durch IL-6 nicht in ihrer Proliferation stimuliert werden, stellte sich die Frage, ob Fibroblasten indirekt durch ein IL-6 induziertes Zytokinnetzwerk zur Proliferation angeregt werden können.

4.3 Das durch IL-6 induzierte Netzwerk führt zu einem Crosstalk zwischen Tumorzellen und Zellen aus der Mikroumgebung

Um den Crosstalk zwischen den Keratinozyten und den Fibroblasten zu simulieren und dessen Effekt genauer zu beobachten, wurden die Zellen, HaCaT-ras A5 sowie MSU1.1, jeweils für 5 Stunden mit IL-6 stimuliert und anschließend das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und mit Hungermedium für 24 Stunden inkubiert. Das konditionierte Medium der HaCaT-ras A5 bzw. MSU1.1 Zellen wurde anschließend auf die jeweils andere Zelllinie gegeben und die Proliferation beobachtet. Während die MSU1.1 durch direkte Zugabe von IL-6 keine Proliferation über einen Zeitraum von 96 Stunden zeigten, war bei der Stimulierung mit konditioniertem Medium der IL-6 stimulierten HaCaT-ras A5 Zellen eine deutliche Erhöhung der Proliferation bereits nach 24 Stunden zu erkennen. Auch die HaCaT-ras A5 Zellen eine starke Erhöhung der Proliferation nach Zugabe des konditionierten Mediums der IL-6 stimulierten MSU1.1 Zellen.

Aktuelle Studien zeigen, dass in Experimenten mit Kokulturen von Keratinozyten und Fibroblasten ein parakriner Loop von Zytokinen etabliert wird, der unter anderem durch IL-1 und KGF eine gegenseitige Aktivierung beider Zelltypen hervorruft [136, 137]. Es wurde außerdem gezeigt, dass Fibroblasten durch die von den Keratinozyten synthetisierten Faktoren, wie TGFβ, EGF, PDGF, FGF2, IL-1 und TNF-α, aktiviert werden können, was zu einer erhöhten Migration und Proliferation führt [19, 138]. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit, wird ein ähnlicher Effekt in der Interaktion zwischen den HaCaT-ras A5 Zellen und den MSU1.1 vermutet, bei dem die von den HaCaT-ras A5 Zellen exprimierten Faktoren die MSU1.1 in Proliferation beeinflussen und vice versa. Aktuelle Studien von Räsänen et al. zeigten, dass konditioniertes Medium von nemotischen Fibroblasten, eine Art von aktivierten Fibroblasten, die bei den Entzündungsherden und bei Tumoren vorliegen, die Proliferation und die Migration von HaCaT-ras A5 erhöhen [139, 140]. Dabei werden HaCaT-ras A5 Zellen durch das von Fibroblasten abgegebene KGF, HGF und VEGF zur Proliferation stimuliert [139]. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnten wir nach IL-6 Stimulation eine erhöhte Expression von HGF, KGF sowie VEGF in MSU1.1 Zellen nachweisen, was auf einen ähnlichen Mechanismus der Interaktion zwischen malignen HaCaT-ras Zellen, die im Tumor große Mengen an IL-6 sezernieren, und Tumorassoziierten Fibroblasten hinweist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zudem, dass im Vergleich zu den HaCaT-ras A5 nach IL-6 Stimulation eine erhöhte Expression von GM-CSF in MSU1.1 vorliegt, welches, wie wir

in früheren Arbeiten zeigen konnten, die Proliferation der HaCaT-ras Zellen ebenfalls stimuliert [127]. Auch HGF, welches nach IL-6 Stimulation ausschließlich in Fibroblasten und nicht in HaCaT-ras A5 Zellen exprimiert wird, ist ein Faktor der ebenso wie GM-CSF eine starke proliferations-, migrations- und invasionsfördernde Rolle für viele epitheliale Tumorzellen spielt und darüber hinaus z.B. auch eine IL-8 Expression in Magenkarzionomen Zellen induziert [141]. Gleichermaßen fördert KGF, das in MSU1.1 Zellen nach IL-6 Stimulation verstärkt exprimiert wird, die Proliferation der epithelialen Tumorzellen und spielt zusammen mit IL-8 bei der Tumorprogression von SCCs eine wesentliche Rolle [142] . Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass IL-6 nicht nur direkt die Proliferation der HaCaT-ras A5 Zellen erhöht, sondern auch durch die Induktion eines komplexen Zytokinnetzwerkes in HaCaT-ras A5 Tumorkeratinozyten und Fibroblasten, die Proliferation und möglicherweise auch die Migration der HaCaT-ras A5 Zellen fördert.

Obwohl IL-6 keine direkte Auswirkung auf die Proliferation in MSU1.1 hat, werden die Fibroblasten jedoch durch Zytokine, deren Expression IL-6 in den HaCaT-ras A5 Zellen induziert aktiviert, und in ihrer Proliferation angeregt. Abbildung 49 fasst die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, die darauf hinweisen, dass die Tumorzellen und Fibroblasten durch eine parakrine Stimulation einen starken Einfluss aufeinander ausüben, der letztlich zu einer Aktivierung beider Zelltypen und damit verbunden verstärkter Proliferation und Migration sowohl der Tumorkeratinozyten als auch der stromalen Fibroblasten führt. Damit liefern die Ergebnisse einen weiteren Hinweis für die essentielle Rolle des Crosstalks zwischen dem Tumor und seiner Mikroumgebung für die Tumorprogression.



Parakrine Stimulation durch IL-6 induziertes Zytokin Netzwerk

Abbildung 49: Tumorzellen und Fibroblasten üben durch eine parakrine Stimulation einen starken Einfluss aufeinander aus, der letztlich zu einer Aktivierung beider Zelltypen und zu einer vestärkten Proliferation und Migration der Tumorkeratinozyten als auch der stromalen Fibroblasten führen kann

4.4 HaCaT-ras A5 Zellen und MSU1.1 Zellen zeigen nach IL-6 Stimulation Unterschiede in der STAT3 Konzentration

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-6 eine entscheidende Rolle in der Interaktion zwischen stromalen Fibroblasten und Tumorkeratinozyten spielt. IL-6 aktiviert ein Netzwerk von Zytokinen, welche die Tumorprogression fördern, dabei sind die zellulären Reaktionen von MSU1.1 Fibroblasten und HaCaT-ras A5 Keratinozyten jedoch deutlich unterschiedlich. Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich nun die Frage, welche Mechanismen in den Tumorzellen und den Zellen der Mikroumgebung durch IL-6 ausgelöst werden, die eine solche differentielle Zellantwort verursachen. Diese Erkenntnisse sollten Aufschluss über die tumorfördernden Effekte von IL-6 geben und Wege zur therapeutischen Intervention aufzeigen, um gezielt IL-6 fördernde Mechanismen in der Tumorprogression zu unterbinden. Hierbei wurde der Fokus auf die durch II-6 induzierte Signaltransduktion speziell auf den JAK/STAT Signalweg gelegt.

Von besonderem Interesse waren dabei auch die Mengen der einzelnen Komponenten der Signalkaskade, da diese u. U. bereits eine Aussage über unterschiedliche zelluläre Antworten von Fibroblasten und Tumorkeratinozyten auf den IL-6 Stimulus erlauben. Beide Zelltypen, HaCaT-ras A5 und MSU1.1, zeigten eine ähnliche Konzentration von gp130 Molekülen. Vergleicht man die Menge an gp130 Molekül mit der Menge an aktivierten STAT3, ist diese bei den HaCaT-ras A5 Zellen um etwa 330 mal höher was auf eine sehr hohe Effizienz der Aktivierung durch die vier STAT3 Bindungsstellen von gp130 schließen lässt [143]. Im Vergleich zu HaCaT-ras A5 unterscheidet sich die Menge an gp130 zu aktiviertem STAT3 in MSU1.1 um einen Faktor 80, wobei die aktivierte Menge an STAT3 nach IL-6 Stimulation immer noch deutlich höher ist als in unstimulierten Zellen. Dieser Vergleich macht deutlich, dass trotz gleicher Menge an gp130 die Aktivierung von STAT3 in HaCaT-ras A5 Zellen deutlich effizienter ist. Auch die Menge an pSTAT3, welches in den Zellkern transportiert wird, zeigt in beiden Zellen unterschiedliche Verhältnisse. Während bei den HaCaT-ras A5 etwa 5% des aktivierten STAT3 im Zellkern detektiert werden konnten, finden sich bei den MSU1.1 nur 2,5% der aktivierten STAT3 Moleküle im Zellkern. Die geringe Menge an pSTAT3, die sich im Zellkern von MSU1.1 Zellen nachweisen lässt, kann ein Hinweis auf eine rasche Dephosphorylierung und dadurch einen schnellen Export der Moleküle ins Zytoplasma sein, da die Bindung der STAT3 Moleküle an die DNA im Zellkern diese vor der Dephosphorylierung schützt [144]. Im Zellkern agieren die pSTAT3 Moleküle als Transkriptionsfaktoren und regulieren dadurch auch ihren eigenen endogenen Inhibitor, SOCS3, der einen negativen Feebackloop bildet [145]. In diesem Zusammenhang konnte interessanterweise beobachtet werden, dass bei HaCaT-ras A5 die Menge an SOCS3 im vergleich zu pSTAT3 um etwa den Faktor 5 größer ist, während bei den MSU1.1 die Menge an SOCS3 um den Faktor 10 höher ist als pSTAT3. Dies macht deutlich, dass trotz höherer Konzentration an pSTAT3 in HaCaT-ras A5 Zellen die negative Feedback Regulierung des Signalweges durch SOCS3 in den MSU1.1 etwa doppelt so effizient ist wie bei den HaCaTras A5. Durch die pSTAT3 abhängige Transkription von SOCS3 und die anschließende SOCS3 Translation ins Zytoplasma erklärt sich die verzögernde Aktivität von SOCS3, die bei beiden Zelltypen erst etwa 30 Minuten nach IL-6 Stimulation detektiert werden konnte [146].

Fibroblasten unterliegen bei Aktivierung einer strengen Regulation um beschädigtes Gewebe schnellstmöglich zu erneuern [12]. Die geringere Aktivierung von STAT3 nach IL-6 Stimualtion, sowie die starke Regulierung von SOCS3 in den MSU1.1 deutet darauf hin, dass Fibroblasten nur so viel Faktoren produzieren wie benötigt wird, um das Gewebe zu regenerieren und dass anschließend die Fibroblasten wieder in eine Art Ruhezustand oder Grundzustand versetzt werden[17].

Die zeitaufgelöste Analyse der Aktivierungskinetiken der STAT3 und SOCS3 Proteine sollte nun im Weiteren dazu dienen ein mathematisches Modell für die JAK/STAT Signaltransduktion in MSU1.1 Fibroblasten und HaCaT-ras A5 Tumorkeratinozyten zu etablieren. Das Modell wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Kaderali (Dresden) etabliert. Durch die Beschreibung der Kinetiken durch gewöhnliche Differenzialgleichungen in Zusammenhang mit bekannten Mechanismen aus Literatur [21] erhielten wir ein Modell zur Beschreibung des JAK/STAT3 Verhaltens nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 und MSU1.1. Die zur Validierung des Systems durchgeführten Experimente bestätigten das Modell zur Beschreibung des Verhaltens der STAT3 Aktivierung im Zytoplasma und im Zellkern, sowie der SOCS3 Expression in beiden Zelltypen. Das hierdurch etablierte Modell soll als Grundgerüst dienen, um phenotypische Effekte, wie das unterschiedliche Proliferationverhalten beider Zelltypen nach IL-6 Stimulation zu beschreiben. Hierfür ist es erforderlich, die Regulierung der Proliferation in beiden Zelllinien weiter zu analysieren und die zu Grunde liegenden Mechanismen genau zu beschreiben. In den letzten Jahren wurden quantitative experimentelle Daten und anschließende mathematische Modellierung dazu verwendet die Regulation und Struktur des JAK/STAT Signalweges zu beschreiben [147, 148]. Swameye et al. beschrieb 2003 in einem mathematischen Modell den molekularen Mechanismus für Aktivierung und Regulierung der JAK2/STAT5 Signaltransduktion in der Knochenmarkzelllinie BaF3 [148]. Dieser wurde 2008 von Vera et al. um den Aktivierungsfaktor Epo und seinen Rezeptor EpoR erweitert, welches den JAK2/STAT5 aktiviert [147]. Somit war es möglich den Signalweg unter verschieden Annahmen, bezogen auf das dynamische Verhalten der im Signalweg beschriebenen Moleküle, zu simulieren und anhand der vorhergesagten Ergebnisse gezielt experimentelle Validierungsversuche zu gestalten.

Die Etablierung eines mathematischen Modells zur Beschreibung des Verhaltens des JAK/STAT3 Signalweges in MSU1.1 und HaCaT-ras A5 soll eine Basis schaffen, die es ermöglicht Interaktionen zwischen beiden Zelltypen sowie physiologische Effekte der IL-6 Stimulation zu beschreiben und besser zu verstehen.

4.5 Effekt von STAT3 Inhibierung auf die Proliferation von HaCaT-ras A5

Eine erhöhte Aktivierung von STAT3 korreliert in viele Krebszellen mit erhöhter Proliferation [113, 149, 150]

Die Korrelation zwischen der verstärken Proliferation und der erhöhten STAT3 Aktivierung in HaCaT-ras A5 nach IL-6 Stimulation ließ vermuten das STAT3 bei der Aktivierung zellulärer Prozesse beteiligt ist, die letztlich proliferationsfördernd auf die HaCaT-ras A5 Zellen wirken. IL-6 stimulierte HaCaT-ras A5 Zellen zeigten etwa eine 10-fache Menge an aktiviertem STAT3 im Vergleich zu den MSU1.1 sowie eine Steigerung der Zellzahl nach 24 Stunden um etwa das 2,5-fache. Es stellte sich die Frage in wieweit die STAT3 Aktivierung an der Regulation der Proliferation beteiligt ist. Aktiviertes STAT3 agiert im Zellkern als Transkriptionsfaktor. Durch die erhöhte Aktivierung der STAT3 Moleküle in HaCaT-ras A5 Zellen kann es zur erhöhten Expression von proliferationsfördernden Genen kommen, die anschließend autokrin sowie parakrin auf die Zellen der Mikroumgebung wirken können.

Sollte die Aktivierung von STAT3 eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Proliferation spielen, so ließe sich durch die Inhibierung der STAT3 Phosphorylierung ein negativer Effekt auf die Proliferation erreichen. Um dieser Frage nachzugehen wurde der STAT3 Inhibitor STATTIC verwendet, welcher selektiv die Aktivierung und Dimerisierung der STAT3 Proteine und ihren Transport in den Zellkern inhibiert, indem er die Funktion der SH2 Domäne der STAT3 Moleküle inhibiert und damit eine STAT3/STAT3 Homodimer Bildung verhindert [151].

Tatsächlich ließ sich nach STAT3 Inhibierung keine IL-6 induzierte Proliferation der HaCaTras A5 Zellen detektieren. Dies deutet darauf hin, dass die in HaCaT-ras A5 Zellen nach IL-6 Stimulation nachgewiesene hohe Menge an aktiviertem STAT3 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Proliferation dieser Zellen spielt (Abbildung 50).

In Übereinstimmung mit unseren Daten für HaCaT-ras A5 Zellen wurde von Corvinus et al. für Colonkarzinomzellen gezeigt, dass erhöhte STAT3 Aktivierung zu einer erhöhten Proliferation und Tumorprogression führt [149].

In Fortführung dieser Arbeiten zeigte Lin et al., dass durch das Blockieren der STAT3 Signaltransduktion die Apoptoserate von Colonkarzinomzellen zunahm [150]. Zudem führt in Colonkarzinomzellen die Aktivierung von STAT3 zu einer erhöhten Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMPs), was eine Steigerung des invasiven Wachstums nach sich zieht [152]. Vergleichbar mit diesen Befunden konnte in der Arbeit von Lerdele et al. gezeigt werden, dass HaCaT-ras A5 Zellen nach IL-6 Stimulation eine erhöhte MMP-1 Exprimieren aufweisen [77].

Die entscheidende Rolle der STAT3 Aktivierung für das Wachstum von Tumorzellen wird auch durch Untersuchungen unterstützt, die belegen, dass durch Inhibierung der STAT3 Aktivität mit STATTIC die Strahlenempfindlichkeit von Kopf-Hals SCC's erhöht werden kann [153], bzw. die Effektivität der Chemo-Strahlentherapie von kolorektale Tumoren erhöht werden kann [154]. Dies lässt der STAT3 Inhibierung eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von zukünftigen Behandlungstherapien zukommen.

Leider konnte der Effekt der pSTAT3 Inhibierung in MSU1.1 Zellen nicht analysiert werden, da die Menge an DMSO, die benötigt wird um den Inhibitor STATTIC zu lösen, einen toxischen Effekt auf die Fibroblasten hat und diese innerhalb kürzester Zeit starben.



Proliferation

Abbildung 50: STAT3 Aktivierung steht im Zusammenhang mit der Proliferation der HaCaT-ras A5 Zellen

4.6 Überexpression von STAT3 in MSU1.1

Wenn durch erhöhte eine Aktivierung von STAT3 in HaCaT-ras A5 ein proliferationsfördernder Effekt ermittelt werden kann, stellt sich die Frage, ob dieser Effekt auch bei MSU1.1 Zellen beobachtet werden kann, wenn STAT3 in ausreichenden Mengen aktiviert wird. Um dieser Frage nachzugehen sollte nach einer Überexpression von STAT3 das proliferative Verhalten der MSU1.1 Zellen in Gegenwart von IL-6 beobachtet werden. Überraschenderweise zeigten die mit STAT3 überexprimierten MSU1.1 Zellen nach IL-6 Stimulation keinen proliferationsfördernden Effekt, sondern im Gegenteil sogar, eine Verminderung der Zellzahl schon nach 24 Stunden. Allerdings deckt sich dieses Ergebnis mit den Ergebnissen von Ren et al., die zeigen konnten, dass die STAT3 Aktivierung in Fibroblasten durch IL-6 stark erhöht wird und dadurch eine Seneszenz in Fibroblasten induziert wird. [155].

4.7 SerpinB4 und die seine Rolle in der Proliferation von HaCaT-ras A5

Die Auswertung der Genexpressionsanalyse von IL-6 stimulierten und unstimulierten HaCaT-ras A5 Zellen machte auf das Protein SerpinB4 aufmerksam, für das nach IL-6 Stimulation eine anhaltend erhöhte Genexpression zu detektieren war.

SerpinB4 gehört zur Familie der Serin Protease Inhibitoren. Schon seit seiner Entdeckung wurde vermutet, dass SerpinB4 eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung spielt, da die Menge an SerpinB4 mit der Progression von Plattenepithelkarzinomen steigt [86]. Es wurde gezeigt, das SerpinB4 SCC's vor der Apoptose schützt und *in vivo* das Tumorwachstum fördert [156]. Interessanterweise führt eine Bestrahlungstherapie zu einer rapiden Erhöhung von SerpinB4 was die Annahme nahe legte, dass die Expression von SerpinB4 die Überlebenschance von SCC Zellen erhöht [88].

Wir konnten zeigen, dass die IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 Zellen die Transkription von SerpinB4 andauernd hochreguliert, während bei den MSU1.1 Zellen kein Effekt auf die SerpinB4 Transkription festzustellen war. Die Hochregulation von SerpinB4 in HaCaT-ras A5 nach IL-6 Stimulation konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden. Schon nach 2

Stunden IL-6 Stimulation war bei den HaCaT-ras A5 Zellen ein deutlicher Anstieg des Proteingehalts von SerpinB4 zu detektieren, der kontinuierlich weiter zunahm.

Um eine mögliche Rolle von SerpinB4 in der IL-6 induzierten Proliferation von HaCaT-ras A5 Zellen zu beleuchten wurde die Regulation von SerpinB4 in Abhängigkeit von der STAT3 Aktivierung analysiert. Interessanterweise konnte nach Inhibierung der STAT3 Aktivierung durch den Inhibitor STATTIC eine Herunterregulierung von SerpinB4 detektiert werden. Die Ergebnisse ließen die Hypothese zu, dass STAT3 als Transkriptionsfaktor für das Protein SerpinB4 dient. Durch einer erhöhte Aktivierung von STAT3 wird die Transkription und später auch die Translation von SerpinB4 erhöht. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit den Ergebnissen von Ahmend et al., die zeigten, dass in HN13 Zellen durch eine Blockierung der STAT3 Aktivierung die Menge an mRNA von SerpinB3 und SerpinB4 stark abnahm [109]. Es stellte sich nun die Frage, inwiefern dieses Ergebnis mit dem Proliferationsverhalten der HaCaT-ras A5 Zellen zusammenhängt. Da SerpinB4 Tumorzellen vor der Apoptose schützt, könnte die kontinuierliche Aktivierung von STAT3 und damit die erhöhte Translation von SerpinB4 in HaCaT-ras A5 Zellen ebenfalls zu verringerter Apoptose und möglicherweise damit zu erhöhter Proliferation und Migration führen.

Für IL-22 wurde schon gezeigt, dass es in oralen SCC's die STAT3 Aktivierung über den MAPK Signalweg induziert und dies zu einer erhöhten Menge an SerpinB4 Protein führt [157]. Calabrese et al zeigte, das in Vorstufen des Lungenkarzinoms eine erhöhte SerpinB4 Expression in Zusammenhang mit einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen steht [158].

Um den Effekt von SerpinB4 auf die Proliferation von HaCaT-ras A5 Zellen genauer zu analysieren, wurde die Expression von SerpinB4 mittels siRNA herunterreguliert und das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht. Leider erwiesen sich die HaCaT-ras A5 Zellen als sehr schwer transfizierbar, so dass nur eine geringfügige Reduktion der SerpinB4 mittels siRNA erreicht werden konnte. Entsprechend Expression zeigte die Proliferationsanalyse auch, dass diese geringfügige Herunterregulation der SerpinB4 Expression in den HaCaT-ras A5 Zellen keinen Effekt auf die Proliferationsrate der Zellen hatte. Dennoch gehen wir davon aus, dass SerpinB4 eine essentielle Rolle in der Proliferation der HaCaT-ras A5 Zellen hat.

4.8 Unterschiedliche Genregulation nach IL-6 Stimulation in HaCaT-ras A5 und MSU1.1

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass IL-6 unterschiedliche zelluläre Antworten in den HaCaT-ras A5 Zellen und MSU1.1 Zellen induziert. Auch die Genexpressionsprofile beider Zelltypen nach IL-6 Stimulation zeigen deutliche Unterschiede. Aus rund 16000 analysierten Genen waren nach IL-6 Stimulation nur 19 Gene gleichermaßen in HaCaT-ras A5 Zellen und MSU1.1 Zellen hochreguliert. Diese hängen interessanterweise alle mit der Interferon Signaltransduktion zusammen. STAT1 war hierbei ein stark hochreguliertes Gen in beiden Zelltypen. Interferone agieren hauptsächlich über den JAK/STAT Signalweg wobei im Typ I IFN-Signalweg STAT1 und STAT2 phosphoryliert werden, welche Homo- oder Heterodimere bilden können [159]. Bei der Aktivierung des IFN Typ 2 Signalwegs wird dagegen nur STAT1 phosphoryliert, welches dann Homodimere bildet [160].

In vorangegangen Versuchen unserer Arbeitsgruppe (nicht veröffentlichte Daten) konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten im Vergleich zu HaCaT-ras A5 Zellen eine erhöhte Menge an STAT1 Protein nach IL-6 Stimulation aufweisen, während bei HaCaT-ras A5 die Menge an STAT3 im Vergleich zu Fibroblasten erhöht ist. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigen MSU1.1 Zellen im Gegensatz zu HaCaT-ras A5 nach IL-6 Stimulation keinen proliferationsfördenden Effekt. Die könnte auch mit dem erhöhten Interfon Signaling zusammenhängen, da Interferone wachstumsinhibierende Effekte aufweisen und die Proliferation hemmen können [161-163].

Die HaCaT-ras A5 Zellen zeigten nach IL-6 Stimulation eine ausgeprägte Aktivierung des JAK/STAT Signalweges sowie des NF-κB Signalweges. Der Transkriptionsfaktor NF-κB spielt eine wichtige Rolle in Immun- sowie Entzündungsantworten und kann in diesem Zusammenhang über 200 Gene regulieren [164]. In verschiedenen malignen Tumoren aus unterschiedlichen Geweben wurde eine erhöhte NF-κB Aktivität detektiert [165]. STAT3 und NF-κB sind in einer Großzahl an Tumorzellen anhaltend erhöht und beide agieren als Transkriptionsfaktoren für zahlreiche Gene die zur Proliferation, Anti-Apopotose, Metastasierung, Tumorentwicklung und zum Tumorwachstum beitragen [145].

Durch die Interaktion von NF-κB mit STAT3, die auf der genregulatorischen Ebene sowohl in normalen Gewebe, bei Entzündungsgewebe und auch in Tumoren stattfindet, werden unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine, zu denen unter anderem auch IL-6 gehört, verstärkt exprimiert und können ihrerseits wieder STAT3 aktivieren [145]. Diese Interaktion kann damit eine Aktivierung des JAK/STAT Signalweges mit sich bringen und korreliert somit auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Ren et al. beobachtete, dass durch die Überexpression der NF-κB p65 Untereinheit in immortalisierten HaCaT Keratinozyten eine Tumorigenität in immundefizienten Mäusen induziert werden kann [166]. Grivennikov et al. beschreibt, dass NF-κB und STAT3 durch Interaktion eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression epithelialer Tumore spielen [167]. Interaktionen zwischen NF-κB und STAT3 in Immunzellen kontrollieren die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, die die Entzündung aufrecht erhalten und somit das Tumorwachstum fördern.
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass IL-6 in HaCaT-ras A5 durch eine starke Aktivierung von STAT3 einen direkten Einfluss auf die Proliferation ausübt, aber auch indirekt agieren kann, da durch IL-6 die verschiedenen Wachstumsfaktoren aktiviert werden, welche dann wiederum autokrin die Proliferation regulieren können. Die Inhibierung der STAT3 Aktivierung konnte klar belegen, dass STAT3 eine entscheidende Rolle in der Proliferationsförderung von HaCaT-ras A5 Zellen spielt, die möglicherweise durch die Hochregulation von SerpinB4 vermittelt wird.

MSU1.1 Zellen zeigten keinen proliferativen Effekt nach IL-6 Stimulation. Interessanterweise scheinen die MSU1.1 Zellen durch eine hohe Menge an SOCS3 die STAT3 Aktivierung stärker negativ zu regulieren und aktivieren außerdem nach IL-6 Stimulation den Interferon Signalwege, der proliferationshemmend wirken kann.

Schaut man jedoch auf die Interaktion zwischen beiden Zelllinien, die die Kommunikation zwischen Tumor und Mikroumgebung wiederspiegelt, so erkennt man, dass durch Austausch der Signale die von HaCaT-ras A5 Zellen und MSU1.1 als Antwort auf die IL-6 Stimulation synthetisiert werden, eine Beeinflussung des physiologischen Verhaltens in beiden Zelltypen detektiert werden kann. MSU1.1 zeigte nämlich nach Stimulation mit konditionierten Medien IL-6 stimulierter HaCaT-ras A5 Zellen eine stark erhöhte Proliferation. IL-6 spielt somit eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und kann Tumorzellen direkt und indirekt über die Interaktion mit stromalen Zellen zum Wachstum anregen. Dabei werden die Fibroblasten aus der Mikroumgebung indirekt durch IL-6 beeinflusst.

5 Literatur

- 1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
- 2. Cairns, R.A., R. Khokha, and R.P. Hill, *Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view.* Curr Mol Med, 2003. **3**(7): p. 659-71.
- 3. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
- 4. TIsty, T.D. and P.W. Hein, *Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(1): p. 54-9.
- 5. Mueller, M.M. and N.E. Fusenig, *Friends or foes bipolar effects of the tumour stroma in cancer.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 839-49.
- 6. Mueller, M.M. and N.E. Fusenig, *Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells.* Differentiation, 2002. **70**(9-10): p. 486-97.
- 7. Witz, I.P., *Tumor-microenvironment interactions: dangerous liaisons.* Adv Cancer Res, 2008. **100**: p. 203-29.
- 8. Zigrino, P., S. Loffek, and C. Mauch, *Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion.* Biochimie, 2005. **87**(3-4): p. 321-8.
- 9. Gaggioli, C., et al., *Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells.* Nat Cell Biol, 2007. **9**(12): p. 1392-400.
- 10. Bissell, M.J. and D. Radisky, *Putting tumours in context.* Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 46-54.
- 11. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 422-33.
- 12. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
- 13. Parsonage, G., et al., *A stromal address code defined by fibroblasts.* Trends Immunol, 2005. **26**(3): p. 150-6.
- 14. Rodemann, H.P. and G.A. Muller, *Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis.* Am J Kidney Dis, 1991. **17**(6): p. 684-6.
- 15. Chang, H.Y., et al., *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12877-82.
- 16. Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses, *Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression.* Nature, 2004. **432**(7015): p. 332-7.
- 17. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
- 18. Ng, M.R. and J.S. Brugge, *A stiff blow from the stroma: collagen crosslinking drives tumor progression.* Cancer Cell, 2009. **16**(6): p. 455-7.
- 19. Angeli, F., et al., *Role of stromal fibroblasts in cancer: promoting or impeding?* Tumour Biol, 2009. **30**(3): p. 109-20.
- 20. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science. xxxiv, 1548 p.
- 21. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.* Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
- 22. Trikha, M., et al., *Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(13): p. 4653-65.
- 23. Keller, E.T., J. Wanagat, and W.B. Ershler, *Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor.* Front Biosci, 1996. **1**: p. d340-57.

- 24. Hong, D.S., L.S. Angelo, and R. Kurzrock, *Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics.* Cancer, 2007. **110**(9): p. 1911-28.
- 25. Conze, D., et al., Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. Cancer Res, 2001. **61**(24): p. 8851-8.
- 26. Gabay, C., *Interleukin-6 and chronic inflammation.* Arthritis Res Ther, 2006. **8 Suppl 2**: p. S3.
- 27. Kishimoto, T., *The biology of interleukin-6*. Blood, 1989. **74**(1): p. 1-10.
- 28. Taga, T., et al., *Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130.* Cell, 1989. **58**(3): p. 573-81.
- 29. Levy, D.E. and J.E. Darnell, Jr., *Stats: transcriptional control and biological impact.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 651-62.
- 30. Rose-John, S., et al., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer.* J Leukoc Biol, 2006. **80**(2): p. 227-36.
- 31. Schindler, C. and I. Strehlow, *Cytokines and STAT signaling.* Adv Pharmacol, 2000. **47**: p. 113-74.
- 32. Kisseleva, T., et al., *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges.* Gene, 2002. **285**(1-2): p. 1-24.
- 33. Horvath, C.M. and J.E. Darnell, *The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 233-9.
- 34. Imada, K. and W.J. Leonard, *The Jak-STAT pathway.* Mol Immunol, 2000. **37**(1-2): p. 1-11.
- 35. Leonard, W.J. and J.J. O'Shea, *Jaks and STATs: biological implications.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 293-322.
- 36. Huang, L.J., S.N. Constantinescu, and H.F. Lodish, *The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor.* Mol Cell, 2001. **8**(6): p. 1327-38.
- 37. Rane, S.G. and E.P. Reddy, *Janus kinases: components of multiple signaling pathways.* Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5662-79.
- 38. Park, S.H., et al., *Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers*. Nature, 2012. **491**(7426): p. 779-83.
- 39. Darnell, J.E., Jr., STATs and gene regulation. Science, 1997. 277(5332): p. 1630-5.
- 40. Ihle, J.N. and I.M. Kerr, *Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily.* Trends Genet, 1995. **11**(2): p. 69-74.
- 41. Schindler, C., D.E. Levy, and T. Decker, *JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines.* J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20059-63.
- 42. Decker, T. and P. Kovarik, *Transcription factor activity of STAT proteins: structural requirements and regulation by phosphorylation and interacting proteins.* Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(12): p. 1535-46.
- 43. Finbloom, D.S. and K.D. Winestock, *IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes.* J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1079-90.
- 44. Weber-Nordt, R.M., et al., *Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain.* J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27954-61.
- 45. Asao, H., et al., *Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex.* J Immunol, 2001. **167**(1): p. 1-5.
- 46. Fischer, P., et al., *The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling.* Biochem J, 2004. **378**(Pt 2): p. 449-60.
- 47. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo, SOCS proteins, cytokine signalling and *immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 454-65.
- 48. Valentino, L. and J. Pierre, *JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies.* Biochem Pharmacol, 2006. **71**(6): p. 713-21.

- 49. Sasaki, A., et al., *Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain.* Genes Cells, 1999. **4**(6): p. 339-51.
- 50. Yasukawa, H., et al., *The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop.* EMBO J, 1999. **18**(5): p. 1309-20.
- 51. Stahl, N., et al., *Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosinebased motifs in cytokine receptors.* Science, 1995. **267**(5202): p. 1349-53.
- 52. Bachelot, T., et al., *Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients.* Br J Cancer, 2003. **88**(11): p. 1721-6.
- 53. Grivennikov, S. and M. Karin, *Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis?* Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 7-9.
- 54. Dalgleish, A.G. and K.J. O'Byrne, *Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer.* Adv Cancer Res, 2002. **84**: p. 231-76.
- 55. Schwartsburd, P.M., Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(1): p. 95-102.
- 56. Nelson, W.G., et al., *The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer.* J Urol, 2004. **172**(5 Pt 2): p. S6-11; discussion S11-2.
- 57. Mueller, M.M. and N.E. Fusenig, *Constitutive expression of G-CSF and GM-CSF in human skin carcinoma cells with functional consequence for tumor progression.* Int J Cancer, 1999. **83**(6): p. 780-9.
- 58. Mueller, M.M., et al., *Tumor progression of skin carcinoma cells in vivo promoted by clonal selection, mutagenesis, and autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.* Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1567-79.
- 59. Lin, W.W. and M. Karin, *A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer.* J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1175-83.
- 60. Danforth, D.N., Jr. and M.K. Sgagias, *Interleukin-1 alpha and interleukin-6 act additively to inhibit growth of MCF-7 breast cancer cells in vitro.* Cancer Res, 1993. **53**(7): p. 1538-45.
- 61. Benoy, I., et al., Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. Clin Breast Cancer, 2002. **2**(4): p. 311-5.
- 62. Nilsson, M.B., R.R. Langley, and I.J. Fidler, *Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine.* Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10794-800.
- 63. Cohen, T., et al., *Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor.* J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 736-41.
- 64. Lin, Z.Q., et al., *Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice.* J Leukoc Biol, 2003. **73**(6): p. 713-21.
- 65. Turkson, J., *STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery.* Expert Opin Ther Targets, 2004. **8**(5): p. 409-22.
- 66. Catlett-Falcone, R., et al., *Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells.* Immunity, 1999. **10**(1): p. 105-15.
- 67. Bowman, T., et al., STATs in oncogenesis. Oncogene, 2000. 19(21): p. 2474-88.
- 68. Yu, H., M. Kortylewski, and D. Pardoll, *Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 41-51.
- 69. He, B., et al., SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14133-8.
- 70. Sutherland, K.D., et al., *Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas.* Oncogene, 2004. **23**(46): p. 7726-33.
- 71. Weber, A., et al., SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. Oncogene, 2005. **24**(44): p. 6699-708.

- 72. Niwa, Y., et al., *Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma.* Oncogene, 2005. **24**(42): p. 6406-17.
- 73. Evans, M.K., et al., *Expression of SOCS1 and SOCS3 genes is differentially regulated in breast cancer cells in response to proinflammatory cytokine and growth factor signals.* Oncogene, 2007. **26**(13): p. 1941-8.
- 74. Gritsko, T., et al., *Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(1): p. 11-9.
- 75. Hodge, D.R., E.M. Hurt, and W.L. Farrar, *The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer.* Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2502-12.
- 76. Depner, S., et al., *Cell type specific interleukin-6 induced responses in tumor keratinocytes and stromal fibroblasts are essential for invasive growth.* Int J Cancer, 2012.
- 77. Lederle, W., et al., *IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines.* Int J Cancer, 2011. **128**(12): p. 2803-14.
- 78. Boxman, I.L., et al., *Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1.* Arch Dermatol Res, 1996. **288**(7): p. 391-8.
- 79. Kolar, M., et al., Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. Biol Cell, 2012. **104**(12): p. 738-51.
- 80. Szabo, P., et al., *Comparative Analysis of IL-8 and CXCL-1 Production by Normal and Cancer Stromal Fibroblasts.* Folia Biol (Praha), 2013. **59**(3): p. 134-7.
- 81. Jia, C.C., et al., *Cancer-associated fibroblasts from hepatocellular carcinoma promote malignant cell proliferation by HGF secretion.* PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63243.
- 82. Morimoto, A., et al., *Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. **179**(2): p. 1042-9.
- 83. Finch, P.W., et al., *Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth.* Science, 1989. **245**(4919): p. 752-5.
- 84. Niu, J., et al., *Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors.* J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6001-11.
- 85. Gilchrest, B.A., et al., *Characterization and partial purification of keratinocyte growth factor from the hypothalamus.* J Cell Physiol, 1984. **120**(3): p. 377-83.
- 86. Kato, H. and T. Torigoe, *Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma.* Cancer, 1977. **40**(4): p. 1621-8.
- 87. Kato, H., et al., *Prognostic significance of the tumor antigen TA-4 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix.* Am J Obstet Gynecol, 1983. **145**(3): p. 350-4.
- 88. Maruo, T., et al., *Tumor-associated antigen, TA-4, in the monitoring of the effects of therapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Serial determinations and tissue localization.* Cancer, 1985. **56**(2): p. 302-8.
- Brioschi, P.A., et al., Squamous-cell carcinoma antigen (SCC-A) values related to clinical outcome of pre-invasive and invasive cervical carcinoma. Int J Cancer, 1991.
 47(3): p. 376-9.
- 90. Scambia, G., et al., Squamous cell carcinoma antigen: prognostic significance and role in the monitoring of neoadjuvant chemotherapy response in cervical cancer. J Clin Oncol, 1994. **12**(11): p. 2309-16.
- 91. Hashimoto, K., et al., *Use of squamous cell carcinoma antigen as a biomarker of chemotherapy response in patients with metastatic cervical carcinoma.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011. **159**(2): p. 394-8.
- 92. Suminami, Y., et al., *Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. **181**(1): p. 51-8.

- 93. Schick, C., et al., Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. J Biol Chem, 1997. **272**(3): p. 1849-55.
- 94. Nawata, S., et al., *Electrophoretic analysis of the "cross-class" interaction between novel inhibitory serpin, squamous cell carcinoma antigen-1 and cysteine proteinases.* Electrophoresis, 1997. **18**(5): p. 784-9.
- 95. Nawata, S., et al., Serine protease inhibitor activity of recombinant squamous cell carcinoma antigen towards chymotrypsin, as demonstrated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis, 1995. **16**(6): p. 1027-30.
- 96. Murakami, A., et al., *Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death.* Br J Cancer, 2001. **84**(6): p. 851-8.
- 97. Torre, G.C., SCC antigen in malignant and nonmalignant squamous lesions. Tumour Biol, 1998. **19**(6): p. 517-26.
- 98. Hefler, L.A., et al., Squamous cell carcinoma antigen serum levels as prognostic parameter in patients with early stage vulvar cancer. Gynecol Oncol, 2005. **97**(3): p. 904-7.
- 99. Lara, P.C. and J.M. Cuyas, *The role of squamous cell carcinoma antigen in the management of laryngeal and hypopharyngeal cancer*. Cancer, 1995. **76**(5): p. 758-64.
- 100. Molina, R., et al., *Prognostic significance of SCC antigen in the serum of patients with head and neck cancer.* Tumour Biol, 1996. **17**(2): p. 81-9.
- 101. Kitano, H., *Computational systems biology*. Nature, 2002. **420**(6912): p. 206-10.
- 102. Kitano, H., Systems biology: a brief overview. Science, 2002. 295(5560): p. 1662-4.
- 103. Tyson, J.J., K. Chen, and B. Novak, *Network dynamics and cell physiology.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(12): p. 908-16.
- 104. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.* J Cell Biol, 1988. **106**(3): p. 761-71.
- 105. Bromberg, J. and T.C. Wang, *Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link.* Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 79-80.
- 106. Gallucci, R.M., et al., *Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration.* J Invest Dermatol, 2004. **122**(3): p. 764-72.
- 107. Schreier, T., E. Degen, and W. Baschong, *Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. A quantitative comparison between various growth factors and a low molecular weight blood dialysate used in the clinic to normalize impaired wound healing.* Res Exp Med (Berl), 1993. **193**(4): p. 195-205.
- 108. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back.* Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
- Ahmed, S.T. and J.E. Darnell, Jr., Serpin B3/B4, activated by STAT3, promote survival of squamous carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 378(4): p. 821-5.
- 110. Paget, G., *Remarks on a Case of Alternate Partial Anaesthesia.* Br Med J, 1889. **1**(1462): p. 1-3.
- 111. Badache, A. and N.E. Hynes, *Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells.* Cancer Res, 2001. **61**(1): p. 383-91.
- 112. Kortylewski, M., et al., *Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1.* Oncogene, 1999. **18**(25): p. 3742-53.
- 113. Bromberg, J.F., et al., *Stat3 as an oncogene.* Cell, 1999. **98**(3): p. 295-303.
- 114. Yadav, V. and M.F. Denning, *Fyn is induced by Ras/PI3K/Akt signaling and is required for enhanced invasion/migration.* Mol Carcinog, 2011. **50**(5): p. 346-52.
- 115. Song, J., et al., *PKD prevents H2O2-induced apoptosis via NF-kappaB and p38 MAPK in RIE-1 cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **378**(3): p. 610-4.
- 116. Mihara, M., Y. Moriya, and Y. Ohsugi, *IL-6-soluble IL-6 receptor complex inhibits the proliferation of dermal fibroblasts.* Int J Immunopharmacol, 1996. **18**(1): p. 89-94.

- 117. Zhang, J., L. Wu, and J.M. Qu, *Inhibited proliferation of human lung fibroblasts by LPS is through IL-6 and IL-8 release.* Cytokine, 2011. **54**(3): p. 289-95.
- 118. Calabrese, V., et al., SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. Mol Cell, 2009. **36**(5): p. 754-67.
- 119. Mallette, F.A., et al., SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogeneinduced senescence. Aging (Albany NY), 2010. **2**(7): p. 445-52.
- 120. De Donatis, A., F. Ranaldi, and P. Cirri, *Reciprocal control of cell proliferation and migration*. Cell Commun Signal, 2010. **8**: p. 20.
- 121. Furuya, M. and Y. Yonemitsu, *Cancer neovascularization and proinflammatory microenvironments*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(4): p. 253-65.
- 122. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.* Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 835-70.
- 123. Brown, L.F., et al., *Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing.* J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1375-9.
- 124. Nissen, N.N., et al., *Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing.* Am J Pathol, 1998. **152**(6): p. 1445-52.
- 125. Linde, N., et al., Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. J Pathol, 2012. **227**(1): p. 17-28.
- 126. Geva, R., et al., *Biologic modulation of chemotherapy in patients with hepatic colorectal metastases: the role of anti-VEGF and anti-EGFR antibodies.* J Surg Oncol, 2010. **102**(8): p. 937-45.
- 127. Obermueller, E., et al., Cooperative autocrine and paracrine functions of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the progression of skin carcinoma cells. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7801-12.
- 128. Albulescu, R., et al., *Cytokine patterns in brain tumour progression.* Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 979748.
- 129. Gutschalk, C.M., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte*macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas in vivo. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 8026-36.
- 130. Iocono, J.A., et al., *Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds.* Wound Repair Regen, 2000. **8**(3): p. 216-25.
- 131. Rennekampff, H.O., et al., *Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing.* J Surg Res, 2000. **93**(1): p. 41-54.
- 132. Cho, K., et al., *Enhanced expression of keratinocyte growth factor and its receptor correlates with venous invasion in pancreatic cancer.* Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1964-74.
- 133. Yamayoshi, T., et al., *Expression of keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7 and its receptor in human lung cancer: correlation with tumour proliferative activity and patient prognosis.* J Pathol, 2004. **204**(1): p. 110-8.
- 134. Ning, S., et al., *Effects of keratinocyte growth factor on the proliferation and radiation survival of human squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **40**(1): p. 177-87.
- 135. Gherardi, E. and M. Stoker, *Hepatocytes and scatter factor.* Nature, 1990. **346**(6281): p. 228.
- 136. Maas-Szabowski, N., H.J. Stark, and N.E. Fusenig, *Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts.* J Invest Dermatol, 2000. **114**(6): p. 1075-84.
- 137. Szabowski, A., et al., *c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin.* Cell, 2000. **103**(5): p. 745-55.
- 138. Waelti, E.R., et al., *Co-culture of human keratinocytes on post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells: production of large amounts of interleukin 6.* J Invest Dermatol, 1992. **98**(5): p. 805-8.

- 139. Rasanen, K. and A. Vaheri, *Proliferation and motility of HaCaT keratinocyte derivatives is enhanced by fibroblast nemosis.* Exp Cell Res, 2010. **316**(10): p. 1739-47.
- 140. Rasanen, K., et al., *Nemosis of fibroblasts is inhibited by benign HaCaT keratinocytes but promoted by malignant HaCaT cells.* Mol Oncol, 2008. **2**(4): p. 340-8.
- 141. Lee, K.H., S.A. Koh, and J.R. Kim, *Hepatocyte growth factor-mediated gastrinreleasing peptide induces IL-8 expression through Ets-1 in gastric cancer cells.* Oncol Res, 2013. **20**(9): p. 393-402.
- 142. Ogura, M., et al., *Clinical significance of CXCL-8/CXCR-2 network in esophageal squamous cell carcinoma*. Surgery, 2013. **154**(3): p. 512-20.
- Schmitz, J., et al., SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. J Biol Chem, 2000. 275(17): p. 12848-56.
- 144. McBride, K.M., C. McDonald, and N.C. Reich, *Nuclear export signal located within theDNA-binding domain of the STAT1transcription factor.* EMBO J, 2000. **19**(22): p. 6196-206.
- 145. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove, *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 798-809.
- 146. Starr, R., et al., *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling.* Nature, 1997. **387**(6636): p. 917-21.
- 147. Vera, J., et al., *A systems biology approach to analyse amplification in the JAK2-STAT5 signalling pathway.* BMC Syst Biol, 2008. **2**: p. 38.
- Swameye, I., et al., Identification of nucleocytoplasmic cycling as a remote sensor in cellular signaling by databased modeling. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(3): p. 1028-33.
- 149. Corvinus, F.M., et al., *Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth.* Neoplasia, 2005. **7**(6): p. 545-55.
- 150. Lin, Q., et al., Constitutive activation of JAK3/STAT3 in colon carcinoma tumors and cell lines: inhibition of JAK3/STAT3 signaling induces apoptosis and cell cycle arrest of colon carcinoma cells. Am J Pathol, 2005. **167**(4): p. 969-80.
- 151. Schust, J., et al., *Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization.* Chem Biol, 2006. **13**(11): p. 1235-42.
- 152. Tsareva, S.A., et al., Signal transducer and activator of transcription 3 activation promotes invasive growth of colon carcinomas through matrix metalloproteinase induction. Neoplasia, 2007. **9**(4): p. 279-91.
- 153. Adachi, M., et al., *Targeting STAT3 inhibits growth and enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma.* Oral Oncol, 2012. **48**(12): p. 1220-6.
- 154. Spitzner, M., et al., STAT3 inhibition sensitizes colorectal cancer to chemoradiotherapy in vitro and in vivo. Int J Cancer, 2013.
- 155. Ren, C., et al., Activation of interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 by human papillomavirus early proteins 6 induces fibroblast senescence to promote cervical tumourigenesis through autocrine and paracrine pathways in tumour microenvironment. Eur J Cancer, 2013.
- 156. Suminami, Y., et al., Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 1776-80.
- 157. Naher, L., et al., *STAT3 signal transduction through interleukin-22 in oral squamous cell carcinoma.* Int J Oncol, 2012. **41**(5): p. 1577-86.
- 158. Calabrese, F., et al., Serpin B4 isoform overexpression is associated with aberrant epithelial proliferation and lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis. Pathology, 2012. **44**(3): p. 192-8.
- 159. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
- 160. Decker, T., et al., *Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor.* EMBO J, 1991. **10**(4): p. 927-32.

- 161. Klimpel, G.R., W.R. Fleischmann, Jr., and K.D. Klimpel, *Gamma interferon (IFN gamma) and IFN alpha/beta suppress murine myeloid colony formation (CFU-C)N: magnitude of suppression is dependent upon level of colony-stimulating factor (CSF).* J Immunol, 1982. **129**(1): p. 76-80.
- 162. Neumann, H.A. and A.A. Fauser, *Effect of interferon on pluripotent hemopoietic progenitors (CFU-GEMM) derived from human bone marrow.* Exp Hematol, 1982. **10**(7): p. 587-90.
- 163. Raefsky, E.L., et al., *Studies of interferon as a regulator of hematopoietic cell proliferation.* J Immunol, 1985. **135**(4): p. 2507-12.
- 164. Aggarwal, B.B., et al., *Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine.* Indian J Exp Biol, 2004. **42**(4): p. 341-53.
- 165. Aggarwal, B.B., *Nuclear factor-kappaB: the enemy within.* Cancer Cell, 2004. **6**(3): p. 203-8.
- 166. Ren, Q., et al., *Malignant transformation of immortalized HaCaT keratinocytes through deregulated nuclear factor kappaB signaling.* Cancer Res, 2006. **66**(10): p. 5209-15.
- 167. Grivennikov, S.I. and M. Karin, *Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer.* Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(1): p. 11-9.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
hâ	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μΜ	Micromolar
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Rinderserumalbumin
CAF	Cancer associated fibroblasts
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNTF	Ciliary Neurotropic Factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT-1	Cardiotrophin-1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAP	Fibroblasten-Aktivierungs-Protein
FCS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
gp130	Glykoprotein gp130
h	Stunde
НаСаТ	Human adult low Calcium high Temperature
HGF	Hematopoetic Growth Factor
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinasen
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LIF	Leukemia inhibitory factor
mA	Milliamper
MAD	median absolute deviation
min	Minuten
ml	Milliliter

MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
MSU	Michigan State University
ng	Nanogramm
ODE	gewöhnliche Differenzialgleichungen
OSM	Oncostain M
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
pg	Pikogramm
qPCR	quantitative PCR
rh	Recombinant Human
RISC	RNA-induced-silencing-Komplex
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SCCA	Squamous Cell Carcinoma Antigen
siRNA	Small interfering Ribonucleic Acid
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TBS	Tris-buffered Saline
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel
αSMA	Alpha Smooth Muscle Actin

6.2 Heatmap Diagramm der Signalwege nach IL-6 Stimulation in MSU1.1 und HaCaT-ras A5



Abbildung 51: Heatmap Diagramm der Signifikanzen der herunterregulierte Signalwege nach IL-6 Stimulation





Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in dieser oder anderer Form weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet, noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt. An keiner anderen Stelle ist ein Prüfungsverfahren beantragt.

Heidelberg, den

Marco Nici