

Aus dem Lehrstuhl
für Chirurgie
Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Entwicklung eines Plasmids zur Expression von SOCS-3 in
Hepatozyten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Bernhard Josef Bauer

2012

Aus dem Lehrstuhl
für Chirurgie
Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Entwicklung eines Plasmids zur Expression von SOCS-3 in
Hepatozyten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Bernhard Josef Bauer

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Fichtner-Feigl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Florian Obermeier
Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Interleukin-6	3
1.1.1	Signalübertragung	3
1.1.2	Funktion	6
1.1.3	IL-6 als proliferatives und anti-apoptotisches Zytokin	7
1.2	Suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3)	8
1.3	IL-6, JAK/STAT und SOCS-3 bei pathologischen Prozessen	9
1.3.1	Insulinresistenz	10
1.3.2	Hepatoprotektion und -regeneration	10
1.4	IL-6, JAK/STAT und SOCS-3 in der Tumorgenese	11
1.4.1	Antitumorale oder kanzerogene Immunreaktion	12
1.4.2	Entzündung als Grundlage von Tumoren	14
1.4.3	Tumorbedingte Entzündungsreaktionen	16
1.4.4	Interaktion von STAT-3 und NF- κ B	17
1.4.5	IL-6	18
1.4.6	SOCS-3	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Geräte	22
2.1.2	Puffer und Zellkulturmedien	22
2.1.3	Selbst hergestellte Puffer und Gele	23
2.1.4	Chemikalien und Kits	24
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.6	Enzyme, Antikörper	26
2.1.7	Plasmide, Oligonukleotide	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellkultur	27
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.3	Westernblot	35
2.2.4	Colorimetric Kit	38

2.2.5	Durchflusszytometrie und Proliferationsmessung	38
3	Ergebnisse	40
3.1	PCR des SOCS-3 Gens	40
3.2	Klonierung des PCR Produkts in TOPO und pCI-neo Vektoren	41
3.3	Nachweis der SOCS-3 Synthese mittels Westernblot	43
3.4	Einbau des leberzellspezifischen Albumin Promotors	44
3.5	Nachweis von SOCS-3 in Leberzellen	45
3.6	Wirkung der SOCS-3 Überexpression auf STAT-3	46
3.7	Wirkung der SOCS-3 Überexpression auf die Zellproliferation	47
4	Diskussion	49
4.1	STAT-3	49
4.2	SOCS-3	50
4.3	Weiterführende Studien	52
5	Zusammenfassung	53
6	Summary	55
7	Abkürzungsverzeichnis	56
8	Abbildungsverzeichnis	57
9	Literaturverzeichnis	58

1 Einleitung

Malignes Wachstum steht momentan auf Platz zwei der häufigsten Todesursachen in Deutschland, in der Anzahl nur überboten von Herz- und Kreislauferkrankungen. Auch im Bewusstsein der Gesellschaft ist Krebs ein dauernd aktuelles Thema, unter anderem deshalb, weil zum Diagnosezeitpunkt eine kurative Behandlung häufig nicht mehr möglich ist. Medizinische Fortschritte der letzten Zeit, darunter spezifische Antikörper, verbessern bestehende Therapien und ermöglichen für viele ein längeres Überleben trotz schwerer Krankheit. Der erwartete Durchbruch ist jedoch ausgeblieben. Detailliertes Verständnis der Biologie maligner Zellen ist die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Ansätze, sie zu bekämpfen.

Krebserkrankungen sind in ihrer Ausprägung und ihrem Krankheitsbild sehr heterogen, da zahlreiche verschiedene Tumorarten aus unterschiedlichen Geweben hervorgehen können. Ebenso sind die Ursachen für die Genese von Krebs vielfältig und nicht immer einfach zu klären. In gewissem Maße, aber nicht zwangsläufig, ist die Entstehung eine Alterserscheinung, eine Zunahme der Inzidenz mit den Lebensjahren wird häufig beobachtet. Besonders deutlich wird dies beim Prostata Karzinom oder auch beim kolorektalen Karzinom.

Die normale Regulation des Wachstums, der Zellteilung und der Apoptose ist bei Krebszellen gestört. Dies geschieht gewöhnlich durch eine endogene oder exogene Schädigung der DNA, teilweise zusätzlich zu angeborenen genetischen Anomalien. Damit werden die genannten Funktionen oder deren Kontrolle gestört. Bereits bei der physiologischen Replikation des Erbguts ergeben sich Veränderungen in der Basenpaarabfolge, die jedoch größtenteils korrigiert werden können oder den programmierten Zelltod auslösen. Werden für die Reparatur zuständige Gene beschädigt, so häufen sich in den Folgegenerationen weitere Fehler an, die es den betroffenen Zellen erlauben, die physiologischen Grenzen zu durchbrechen und zu unreguliertem Wachstum und Apoptoseresistenz führen können.

Externe Einflüsse, wie physikalische und chemische Noxen, sind neben spontanen Mutationen als Ursachen bereits länger bekannt, radioaktive Strahlung und Zigarettenkonsum seien hier als Beispiele genannt. Adipositas als Risikofaktor ebenso wie Viruserkrankungen, etwa das humane Papillomvirus, sind erst seit kürzerer Zeit in diesem Zusammenhang im Gespräch. Dass nun auch Entzündungen mit Tumoren in Verbindung

gebracht werden müssen, geht bereits auf Beobachtungen von Galenos von Pergamon vor fast 2000 Jahren zurück. Aufgegriffen und ausgearbeitet wurde dieses Konzept vom deutschen Arzt Rudolf Virchow (1821 - 1902). Dieser Ansatz ist seit kurzem erneut in den Fokus der Wissenschaft geraten.

Akute Entzündungsreaktionen sind alltäglich, jedoch auch chronische Verläufe sind keine Seltenheit, und genau diese konnten unter anderem in klinischen Studien in Verbindung mit malignem Wachstum gebracht werden (siehe Tabelle 1).

Chronische Entzündung	Assoziierte Neoplasien
Asbestose, Silikose, Rauchen	Lungenkarzinom, Mesotheliom
Cystitis	Blasenkarzinom
Cholangitis	Cholangiokarzinom
Cholecystitis	Gallenblasenkarzinom
Colitis ulcerosa, Morbus Crohn	Kolorektales Karzinom
Cervicitis	Cervixkarzinom
Gastritis, Ulcus ventriculi	Magenkarzinom
Hepatitis	Hepatozelluläres Karzinom
Lichen sclerosus	Vulvares Plattenepithelkarzinom
Pankreatitis	Pankreaskarzinom
Prostatitis	Prostatakarzinom
Refluxösophagitis	Ösophaguskarzinom
Sjögren Syndrom, Hashimoto Thyreoiditis	MALT Lymphom
Thyreoiditis	Schilddrüsenkarzinom

Tabelle 1: Chronische Entzündungen assoziiert mit Neoplasien [1,2]

Als Beispiel sei hier die Colitis ulcerosa als chronisch entzündliche Darmerkrankung genannt, die ein erheblicher Risikofaktor für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms ist [1]. Für die Entdeckung des *Helicobacter pylori* wurde ein Nobelpreis vergeben. Mittlerweile ist bekannt, dass die Infektion mit diesen Bakterien die häufigste Ursache für Magentumore ist [3]. Hier wird der chronischen Inflammation der Mechanismus der Erbgutschädigung und die damit verbundene Entartung von Zellen angelastet [4].

Wegen dieses Zusammenhangs von entzündlichen Vorgängen und Krebserkrankungen steht unter anderem das proinflammatorische Zytokin IL-6 und die davon abhängige nachfolgende Signaltransduktion in der Zelle im Fokus. Es spielt bei Entzündungsvor-

gängen eine wichtige Rolle und wurde mittlerweile auch bei Tumorerkrankungen als beeinflussender Faktor gefunden.

1.1 Interleukin-6

Interleukine sind Botenstoffe des Immunsystems und vermitteln die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen. In ihrer Wirkung sind sie dabei höchst unterschiedlich. IL-6 (Interleukin-6) gehört zur Interleukin-6-Zytokinfamilie, der auch IL-11, IL-27, LIF (leukaemia inhibitory factor), OSM (oncostatin M), ciliary neurotrophic factor, cardiotrophin-1 und cardiotrophin-like cytokine angehören [5]. Allen gemeinsam ist die Nutzung des Co-Rezeptors Glykoprotein 130 (gp130) zur Signalübertragung. In vivo wird IL-6 hauptsächlich von Monozyten, Fibroblasten, T-Lymphozyten und Endothelzellen sezerniert [6, 7].

Reguliert wird die Ausschüttung des Zytokins durch eine Vielzahl von Faktoren. Stimulierend auf die Expression wirken unter anderem IL-1, IL-2, IFN- β (Interferon- β) in verschiedenen Zellen, PDGF (platelet derived growth factor), TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und LPS (Lipopolysaccharid) in Monozyten und Fibroblasten. Ebenso wirkt erhöhtes cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) positiv auf die Sezernierung, wie auch der Befall von Zellen mit manchen Viren. Die Reaktion auf diese Stimuli variiert dabei von Gewebe zu Gewebe. Die gegenteilige Funktion, die Reduktion der Produktion von IL-6, üben dagegen Glukokortikoide aus [6–8].

1.1.1 Signalübertragung

Der Interleukin-6 Rezeptor Komplex besteht aus zwei unterschiedlichen Bestandteilen. Diese sind der IL6-R (Interleukin-6 Rezeptor), ein Glykoprotein, das an der Signalübertragung nicht direkt teilnimmt und das Interleukin bindet, und der transmembranäre Co-Rezeptor gp130, der für die Weiterleitung des Signals zuständig ist [5].

Gp130 findet sich in allen Körperzellen, wohingegen IL6-R in nur wenigen Zellmembranen vorhanden ist, wie bei Monozyten, Hepatozyten, Neutrophilen, Granulozyten und manchen Leukozyten [9]. Bindet IL-6 an seinen Rezeptor, so werden zwei gp130 Monodimere rekrutiert und bilden mit dem Rezeptor einen Transmembrankomplex [5] (siehe Abb. 1).

Im Gegensatz zu diesem membranständigen und nur auf spezifischen Zellen befindlichen IL6-R steht der lösliche IL-6 Rezeptor (sIL6-R). Er entsteht entweder durch alternatives mRNA-Splicing oder teilweiser Proteolyse des bereits synthetisierten Produkts. Er zeichnet sich dadurch aus, dass sIL6-R der transmembranäre und zytoplasmatische Anteil fehlt und extrazellulär freigesetzt wird. Die Bindung dieses Rezeptors mit seinem

Liganden IL-6 findet deswegen außerhalb der Zelle und unabhängig davon statt. Der hierbei entstandene Komplex kann direkt mit einem membranständigen gp130-Dimer auf einer Zelle interagieren. Hierdurch können Gewebe auf IL-6 reagieren, die selber keinen IL6-R in ihrer Zellmembran besitzen. Da gp130 ubiquitär in Menschen vorhanden ist, ist der Wirkungsbereich des Interleukins nicht mehr auf nur wenige Zelltypen beschränkt. Dies nennt man Transsignalling und spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen (siehe Abb. 1).

Jedoch existiert nicht nur eine lösliche Form des IL-6 Rezeptors, sondern ebenso wird löslicher gp130 Rezeptor im Extrazellulärraum gefunden [5]. Dieser antagonisiert diese membranrezeptorunabhängige Art der Signaltransduktion, indem er an den sIL6-R/IL-6 Komplex bindet und dieser damit nicht mehr für eine zellgebundene Reaktion zur Verfügung steht. Der Rezeptorkomplex kann somit keine nachgeschaltete intrazytoplasmatische Signalkaskade mehr aktivieren [10].

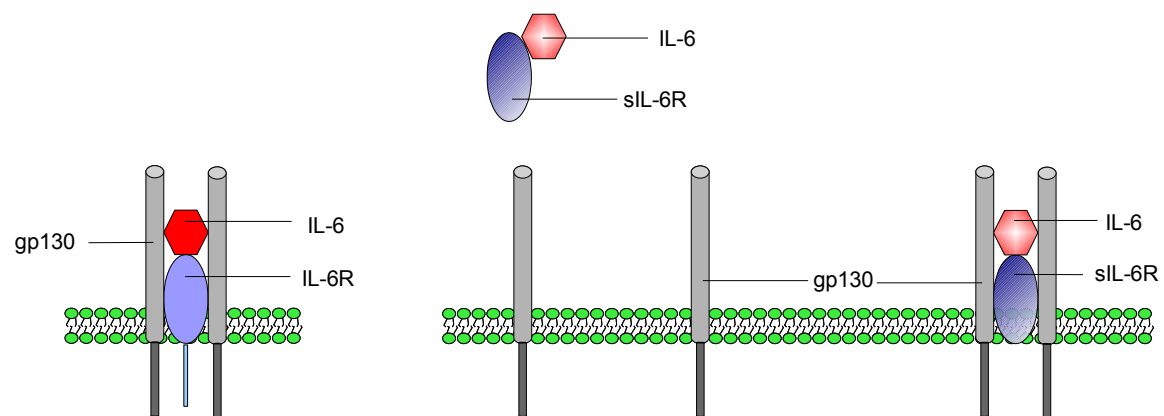


Abbildung 1: Links der membranständige IL-6/IL6-R Komplex gebunden an ein gp130 Dimer. Rechts sIL6-R mit gebundenem Ligand, der zwei gp130 Monomere an der Zellmembran rekrutiert

Ist der Transmembrankomplex aus IL-6, IL6-R und gp130 gebildet, so kann die Signaltransduktion intrazellulär erfolgen. Der Co-Rezeptor gp130 besitzt keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, sondern diese wird von einer am Rezeptor membrannah gebundenen JAK (Januskinase) bereitgestellt. Nach Rezeptoraktivierung durch einen Liganden phosphorylieren diese JAKs nun Tyrosinbestandteile des Transmembrankomplexes, wodurch eine Andockstelle für Proteine mit einer SH2-Domäne entsteht. SH2 steht für Src Homologie 2 und wird in vielen Zellen für Proteininteraktionen genutzt. Die beschriebene SH2-Domäne ist Bestandteil aller STATs (Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription), die nun damit an den Co-Rezeptor binden können. Auch diese werden nach der Bindung von einer JAK mit einem Phosphatrest versehen. In der Folge dissoziieren die beiden vorher an gp130 gebundenen STATs und dimerisieren miteinander, wobei jeweils die SH2-Domäne das phosphorylierte Tyrosin des

Gegenparts erkennt.

Das nun aktive Dimer wird sofort in den Zellkern aktiv transloziert und dort wirkt es als Transkriptionsfaktor, indem es Bindungsstellen in den Promoterregionen der Zielgene erkennt und diese verstärkt transkribiert werden [5,10] (siehe Abb. 2). Zielgene sind unter anderem Gene der Akute-Phase-Proteine sowie DNA Abschnitte von Proteinen, die das Überleben der Zellen regulieren, wie die anti-apoptotischen Proteine bcl-2 und bcl-xl [11]. Ebenso wird die Genexpression pro- und antiinflammatorischer Botenstoffe wie zum Beispiel IL-6, IL-10, IL-11, IL-17 aktiviert [12,13].

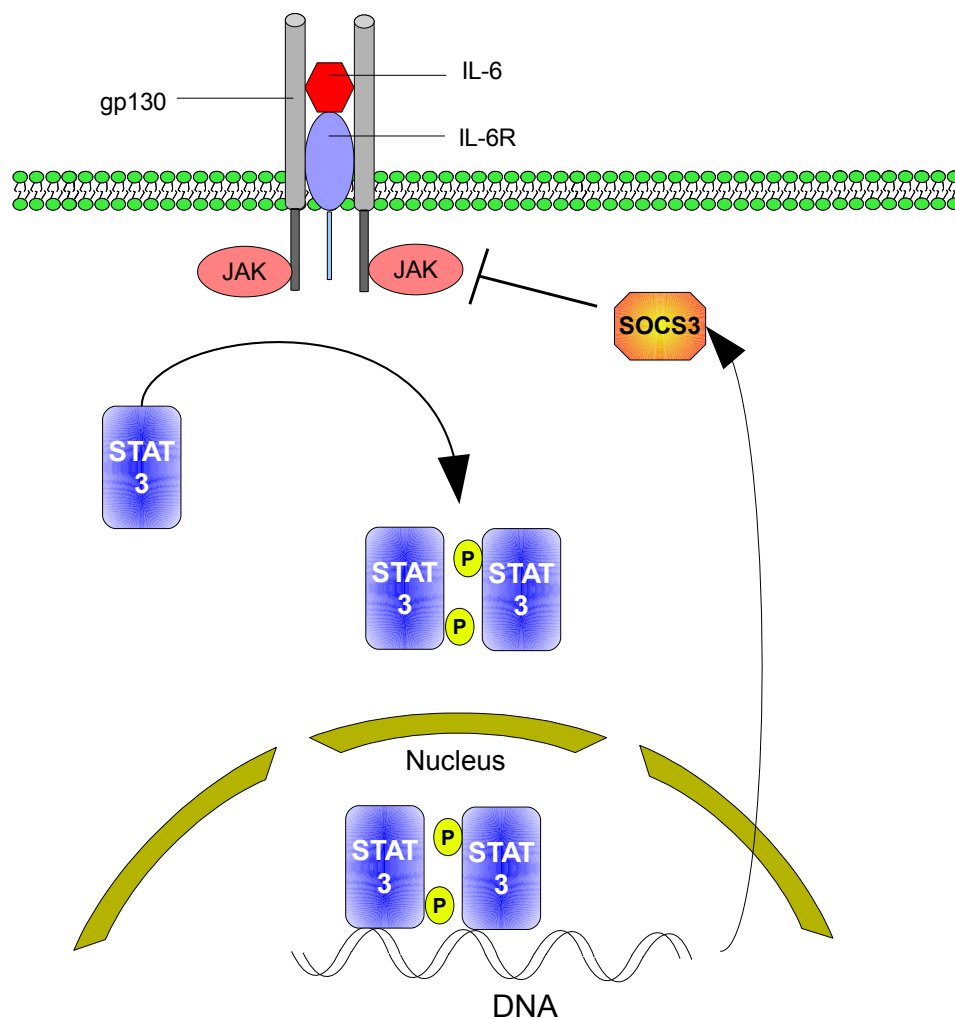


Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der JAK/STAT Signalkaskade bei IL-6 Stimulation und dessen Regulierung mittels SOCS-3

Bei Säugetieren existieren sieben verschiedene Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription, STAT-1 bis STAT-6, wobei STAT-5 in zwei sich sehr ähnliche Formen STAT-5A und STAT-5B untergliedert ist. Das besondere Merkmal dieser von

gleichnamigen Genen exprimierten Proteine ist ihre duale Rolle als Signaltransduktoren im Zytoplasma und als Transkriptionsfaktoren im Nukleus der Zelle. Ihre Aktivierung über Phosphorylierung bestimmter Proteinregionen ist physiologischerweise kurz und transient, da sie reguliert werden, um eine anhaltende und überschießende Signalantwort zu verhindern (siehe 1.2).

IL-6 sowie seine gesamte Zytokin-Familie aktiviert STAT-3 und in einem geringeren Ausmaß STAT-1, welches sonst hauptsächlich von Interferonen angesprochen wird. Doch nicht nur quantitativ, auch qualitativ ist zu einem großen Teil STAT-3 für die Funktion von IL-6 entscheidend [5, 10, 14–18]. Somit stellt gerade dieser Transkriptionsfaktor ein entscheidendes Element im Signalweg des Interleukins dar. STAT-3 kann jedoch nicht nur von dieser Zytokin-Familie aktiviert werden, sondern neben anderen Faktoren zum Beispiel durch den Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor), IL-22 und virale Proteine [19–21].

Das von IL-6 hauptsächlich angesprochene STAT-3 wird gewöhnlich als Onkogen gesehen, denn es fördert die Zellproliferation und verhindert Apoptose (siehe 1.1.3). Dazu gehört, dass es eine Schlüsselrolle spielt bei der Progression der Zelle im Zellzyklus von der G1- zur S-Phase [22].

Des Weiteren ist das Protein ein entscheidender Faktor bei entzündungsassoziierten Tumoren, sowohl in den neoplastischen Zellen, als auch in den Zellen des Immunsystems im umliegenden Gewebe.

Die Bindung des Liganden an IL6-R führt jedoch nicht nur zur Aktivierung des beschriebenen JAK/STAT Signalwegs, sondern auch zum Anstoß einer MAPK (Mitogen-activated protein kinase) Antwort, nämlich ERK1/ERK2 Kaskade, über RAS (rat sarcoma) Protein. NF-IL-6 (Nuclear Factor-IL-6) wird phosphoryliert und damit aktiviert und wirkt als Transkriptionsfaktor auf Zielgene, wie etwa verschiedene Akute-Phase Gene in der Leber [23, 24].

1.1.2 Funktion

IL-6 reguliert die Entzündungsreaktion des menschlichen Organismus, traditionell wird es als proinflammatorisch neben IL-1 β , IL-8 und TNF- α gesehen.

Ursprünglich wurde IL-6 als von T-Zellen sezerniertes Lymphokin entdeckt, welches bei der Reifung von B-Lymphozyten eine Rolle spielt. Es stellte sich jedoch heraus, dass es sowohl von verschiedenen Geweben produziert wird, als auch im Organismus vielfältige Wirkungen auf viele verschiedene Zelltypen hat. Die ursprünglich zehn unterschiedlichen Namen des Proteins unterstreichen seine Vielfalt.

Das Interleukin wirkt mitunter auf das Immunsystem. Beim Shift vom angeborenen zum erworbenen Immunsystem spielt IL-6 eine wichtige Rolle. Es induziert Makrophagen und Granulozyten, reguliert deren Apoptose und kontrolliert wichtige Funktionen

von Monozyten und Lymphozyten. Es ist somit entscheidend für den geregelten Ablauf einer akuten Entzündung [6,25]. IL-6 trägt bei zur Differenzierung von B-Lymphozyten, genauer der finalen Reifung von Antikörper produzierenden Zellen. Nicht auf ruhenden, sondern nur auf aktiven B-Zellen ist IL6-R exprimiert [6,26–28]. Das Interleukin stimuliert auch das Wachstum und die Differenzierung von T-Lymphozyten [6,29]. Es arbeitet hierbei synergistisch mit IL-1, indem es die Zellen vor allem empfindlicher für IL-2 macht, im Gegensatz zu IL-1, das hauptsächlich fördernd auf die IL-2 Produktion wirkt [8]. Ebenso wird die Proliferation und Differenzierung von zytotoxischen T-Lymphozyten und Thymozyten induziert [30].

Infektion und Trauma lösen im menschlichen Körper eine unspezifische Immunreaktion, die sogenannte Akute-Phase-Reaktion, aus. Gekennzeichnet ist dieser Zustand durch Fieber, Leukozytose, erhöhte vaskuläre Permeabilität, negative Stickstoff Bilanz, veränderte Plasma-Steroid-Konzentration und Produktion der Akute-Phase-Proteine in Hepatozyten. Hierfür sind systemisch zirkulierende Mediatoren verantwortlich. Die wichtigsten sind IL-1, IL-6 und TNF- α . IL-6 ist in vivo der entscheidende und hauptsächliche Regulator [6,8,10,31]. Als sogenannter endogener pyrogener Faktor ist IL-6 auch mitverantwortlich für die Entstehung von Fieber [32].

Außerdem wird IL-6 eine Wirkung bei der Hämatopoese zugeschrieben. Zusammen mit IL-3 wirkt es aktivierend auf Stammzellen des blutbildenden Systems und trägt somit zum Wachstum und zur Reifung neuer Zellen bei [6,8].

IL-6 spielt auch im Nervensystem eine Rolle. An einem Rattenmodell für neuronale Differenzierung wurde dem Protein ein ähnlicher Effekt wie der des nerve growth factor nachgewiesen [33].

Nicht nur in der Forschung, sondern auch klinisch wird die Messung der IL-6 Konzentration genutzt. So kann IL-6 ein prognostischer Faktor bei Intensivpatienten mit Sepsis sein [34]. Ebenso nutzt das Fachgebiet der Pädiatrie IL-6 als frühen Entzündungsmarker bei Neugeborenen, da es früher als C-reaktives Protein auf inflammatorische Geschehnisse reagiert [35].

1.1.3 IL-6 als proliferatives und anti-apoptisches Zytokin

Betrachtet man die einzelnen Funktionen von IL-6, so stellt es sich als insgesamt wachstumsfördernd heraus, wie etwa bei T-Zellen. Auch abseits immunologischer Gewebe unterstützt das Interleukin die Proliferation, unter anderem in der Leber. Bei Hepatozyten wird durch IL-6 Gabe in Modellen nicht nur deren Empfänglichkeit für Wachstumsfaktoren, wie HGF (hepatocyte growth factor), und dessen Produktion gefördert, sondern darüber hinaus ist das Zytokin selbst mitogen wirksam [36]. Erhöhte IL-6 Konzentration und der damit aktivierte Signaltransduktionsweg über JAK/STAT ist direkt assoziiert mit Hepatomegalie und hyperplastischen Hepatozyten bei Mäusen [36].

Eine proliferative Wirkung übt IL-6 aber nicht nur durch Induktion des Wachstums aus, sondern es verhindert auch den Zelltod. Dies ist bei Leberzellen zu beobachten. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine andauernde Aktivierung von STAT-3 den Hepatozyten bei Leberschaden, vermittelt durch das Oberflächenmolekül FAS, Schutz bietet. Das Fehlen des Transkriptionsfaktors bringt dagegen Überempfindlichkeit der Zellen gegenüber diese Art der Zellschädigung mit sich [11]. Da IL-6 ein sehr wichtiger Aktivator des genannten Transkriptionsfaktors ist, kann es den Zelltod reduzieren. Anti-apoptotische Proteine, die die Caspase vermittelte Apoptose blockieren, finden sich in erhöhter Konzentration sowohl in mit IL-6 behandelten Leberzellen, als auch in solchen, die sich durch anderweitige STAT-3-Überaktivität auszeichnen [11,37]. Diese Wirkung zeigt sich ebenso bei Darmepithelzellen in Mäusen. Die Gabe von IL-6 bewirkt gp130 vermittelt eine intestinale Hyperplasie, die durch vermehrte Proliferation und durch eine verlängerte Lebensspanne der Zellen entsteht [38–40].

All dies belegt, dass der antiapoptotische Effekt von IL-6 zu einem großen Teil von STAT-3 getragen wird. Der Transkriptionsfaktor wird damit zu einem wichtigen Element bei der Entstehung maligner Eigenschaften, Apoptoseresistenz und gesteigerte Proliferation.

1.2 Suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3)

SOCS-3 (Suppressor of cytokine signalling-3) ist nur ein Vertreter aus einer Familie von 8 verschiedenen intrazellulären Proteinen, SOCS-1 bis SOCS-7 und CIS (cytokine-inducible SH2-domain).

Funktionell wirken diese generell als Terminatoren einer Zytokinantwort (siehe Abb. 2) und sind damit unter anderem Schlüsselfaktoren sowohl der angeborenen, als auch der erworbenen Immunantwort, wie bei der Differenzierung von T-Lymphozyten [41]. SOCS-3 besitzt neben einer SH2-Domäne unter anderem auch eine sogenannte SOCS-Box, von der man annimmt, dass sie als E3 Ubiquitin Ligase funktioniert und damit zum Abbau intrazellulärer Proteine beiträgt [41]. Neben dieser durch Ubiquitin vermittelten Beeinflussung der Signaltransduktion zeichnen sich SOCS-1 und SOCS-3 noch durch einen weiteren Mechanismus aus. Beide besitzen eine KIR (kinase inhibitory region), womit SOCS-3 die Kinaseaktivität von JAK, also die Signaltransduktion von IL-6, als Pseudosubstrat hemmen kann [41,42]. Des Weiteren kann SOCS-3 direkt an IL-6R binden und spezifisch seine Signalweiterleitung unterdrücken [43,44]. Damit wirkt das Protein als Inhibitor von STAT-3 (siehe Abb. 2).

Neben IL-6 wird die Expression von SOCS-3 auch von etlichen anderen Stimuli, wie IL-10, LPS, TNF- α und IFN- γ induziert [43,45]. Da die Bildung des Proteins durch IL-6 über den JAK/STAT Weg angestoßen wird und SOCS-3 eben diesen Signalweg

hemmt, wirkt es in einer typischen negativen Rückkopplung und reguliert die zelluläre Antwort auf den Stimulus. Es konnte gezeigt werden, dass in Hepatozyten ohne SOCS-3 nach IL-6 Stimulation phosphoryliertes STAT-3 länger vorhanden ist und damit dessen Effekt auf die Genexpression verstärkt ist [46].

Die Aktivierung des IL-6 Signalweges steigert nicht nur die Bildung von SOCS-3, sondern auch SOCS-1 wird vermehrt gebildet. Dies ist ebenso der Fall bei einer Stimulation mit IFN- γ . In vivo Modelle zeigen jedoch, dass nicht beide Signalwege redundant sind, sondern dass durchaus Unterschiede bestehen. SOCS-1 reguliert hauptsächlich die Signalkaskade nach IFN- γ -Stimulation, wohingegen SOCS-3 mehr auf die von IL-6 induzierte Zellantwort wirkt [43, 47]. Diese Spezifität erklärt auch den funktionellen Unterschied zwischen IL-10 und IL-6. Ersteres wirkt antiinflammatorisch und kann bestimmte Genexpressionen über Toll-like Rezeptoren unterdrücken, wohingegen letzteres meist unterhaltend und unterstützend auf eine Entzündungsreaktion wirkt. Diese entgegengesetzte Wirkung existiert, obwohl bei beiden Zytokinen die Aktivierung von STAT-3 ein Hauptfaktor für ihre Funktionalität ist.

Die unterschiedlichen Rollen von IL-6 und IL-10 lassen sich zum Teil durch SOCS-3, welches durch beide Interleukine induziert wird, erklären. Es bindet nämlich direkt an IL-6R, wo es die Signalweiterleitung inhibiert, und nicht an den Rezeptor für IL-10. Eine mögliche Folgerung daraus ist, dass dadurch STAT-3 nach IL-10 Stimulation länger aktiviert ist und dies die unterschiedliche Wirkung der beiden Zytokine erklärt. Somit soll transiente STAT-3 Aktivierung pro-, konsistente Aktivierung antiinflammatorisch sein [43, 44]. Das Phänomen der unterschiedlichen Wirkung über den gleichen Transkriptionsfaktor scheint hierdurch jedoch nicht ausreichend geklärt, unter anderem auch deshalb, weil die spezifische Wirkung der beiden Interleukine sich bereits unterscheidet, bevor SOCS-3 ausreichend exprimiert wird. Die gleichzeitige Existenz differenter STAT-3 Proteine in der Zelle könnte eine passendere Erklärung hierfür sein [48].

1.3 IL-6, JAK/STAT und SOCS-3 bei pathologischen Prozessen

IL-6 aktiviert STAT-3 mit Hilfe von IL-6R und der gp130-Untereinheit über Januskinasen. Dieses wiederum wirkt im Zellkern als Transkriptionsfaktor. Anhaltende und unregulierte Aktivierung dieses Signalweges führt zu unerwünschten Effekten in den beteiligten Zellen. Zur Vermeidung überschießender proinflammatorischer Aktivität des Signalweges existiert ein klassischer negativer Feedback Mechanismus. Das SOCS-3 Gen ist unter anderem ein Ziel von STAT-3. Das daraufhin entstehende SOCS-3 Protein blockiert über die bereits oben genannten Mechanismen, Degradierung von si-

gnalweiterleitenden Proteinen und antagonisierende Wirkung an der Januskinase, die Weiterleitung des Signals von der Zellmembran in den Zellkern. Die korrekte Funktion dieses regulierenden Eingreifens stellt eine wichtige Barriere für verschiedene Pathologien dar.

1.3.1 Insulinresistenz

In Leberzellen löst IL-6 zum einen die Produktion von Akute-Phase-Proteinen bei systemisch entzündlichem Geschehen aus, zum anderen wirkt es auch auf andere Funktionsbereiche der Hepatozyten. Denn die Aktivierung des JAK/STAT Signalweges induziert die Bildung von SOCS-3, das nicht nur in einem negativen Feedback-Mechanismus auf die IL-6 Signaltransduktion wirkt, sondern auch den Insulin Rezeptor in den Zellen betrifft. Das Protein bindet an den Rezeptor und blockiert ihn damit. Eine Bindung des Liganden Insulin bleibt damit wirkungslos. Diese verminderte Rezeptoraktivität geht somit einher mit einer erhöhten Insulinresistenz der Zellen, was bei der Entwicklung von Diabetes Typ 2 eine wichtige Rolle spielt [49]. Vor allem chronische IL-6-Exposition, wie sie sich auch bei Adipositas findet, ist hier bedeutend [50, 51].

1.3.2 Hepatoprotektion und -regeneration

Eine wichtige Aufgabe der Leber im Organismus ist die Barrierefunktion. Sie stellt die erste Verteidigungslinie dar gegenüber schädlichen, über das Verdauungssystem aufgenommenen, Substanzen. Leberzellen können auf unterschiedliche Weise geschädigt werden. Medikamente oder Gifte wirken auf das Gewebe über oxidative Prozesse, während virale Hepatitiden und durch das Immunsystem vermittelte Defekte über Apoptose auslösende Signalwege wirken. Beide Wege sind aber nicht unabhängig voneinander zu sehen. Das Überleben der Zellen kann von Zytokinen und Wachstumsfaktoren einerseits über Hemmung der Apoptose, andererseits über Stimulation der Regeneration gefördert werden.

Neben anderen Leberschädigungen spielt Apoptose vermittelt über FAS auch bei viralen Hepatitiden eine wichtige Rolle [11, 52]. FAS ist ein Oberflächenmolekül, das nach Bindung eines Liganden den death-inducing signaling complex (DISC) bildet und damit über Caspasen den Zelltod induzieren kann. Da der FAS Rezeptor kontinuierlich in Hepatozyten exprimiert wird, sind diese besonders empfänglich für den darüber vermittelten Zelltod. In Modellen, bei denen der Einfluss eines FAS Liganden auf die Leber untersucht werden soll, wirkt STAT-3, als Effektorprotein von IL-6, in Hepatozyten anti-apoptotisch. Durch dauerhafte und verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors wird der zellschädigende Effekt der FAS-Rezeptor-Aktivierung reduziert, wohingegen ein Fehlen an STAT-3 das beobachtete Lebergewebe empfindlicher gegen-

über der Apoptose auslösenden Substanz macht. Dieser Schutz wird durch verstärkte Expression mehrerer anti-apoptotischer Proteine vermittelt, die Effektorproteine des FAS Rezeptors blockieren [11, 37].

Die Fähigkeit der Leber, verlorenes Gewebe zu ersetzen, ist besonders wichtig in der modernen Chirurgie. Nach partieller Hepatektomie spielt besonders IL-6 mit seinen proliferativen, anti-apoptotischen Eigenschaften und die damit verbundene Aktivierung von STAT-3 und die Expression seiner Zielgene eine Rolle [53, 54]. Um ein anhaltendes und überschießendes Wachstum zu verhindern, wirkt SOCS-3 in einem negativen Feedback-Mechanismus. In Mäusen, deren Leberzellen kein SOCS-3 besitzen, konnte gezeigt werden, dass nach partieller Hepatektomie die DNA-Replikation und die Mitoserate in den Hepatozyten größer war, als in der Kontrollgruppe. Als Folge war bei ersteren das ursprüngliche Lebergewicht früher wiederhergestellt [46]. Als Ursache konnte eine länger anhaltende Aktivierung von STAT-3 durch fehlende Inhibition durch SOCS-3 identifiziert werden. Außerdem verstärkt ein Fehlen von SOCS-3 die ERK1/ERK2 Kaskade, die zweite wichtige zelluläre Antwort auf IL-6 Stimulation, und die Empfindlichkeit für Wachstumsfaktoren [46].

1.4 IL-6, JAK/STAT und SOCS-3 in der Tumorgenese

Entzündliche Prozesse als Ursache und unterstützende Faktoren malignen Wachstums stehen seit einiger Zeit im Blickpunkt. Neben genetischen Veränderungen charakterisieren diese die Tumorumgebung und nehmen großen Einfluss auf die Entwicklung und das Fortschreiten einer Neoplasie. So sind Entzündung auslösende Infektionen für einen Großteil von magen- und lebereigenen Karzinomen verantwortlich, wie etwa bei chronischen Hepatitiden [3, 55]. Ebenso treten kolorektale Karzinome gehäuft im Zusammenhang mit den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn auf [56].

Dieser Zusammenhang wird jedoch auch in der umgekehrten Richtung beobachtet. Tumore ohne vorhergehende Inflammation als Basis weisen in der direkten Umgebung zahlreiche aktive Zellen des Immunsystems auf, die nicht nur ihre antitumorale Fähigkeiten verloren haben, sondern durch Interaktion mit den malignen Zellen deren Wachstum sogar fördern und die natürliche Apoptose verhindern. Somit können Neoplasien entzündliche Vorgänge in ihrem Umfeld selbst generieren, was die Progression der Erkrankung weiter unterhält. Daraus folgt, dass unabhängig von der ursprünglichen Ursache, ob Infektion oder chronisch entzündliche Erkrankungen, die Präsenz von Entzündungszellen und deren Botenstoffe ein Kennzeichen der meisten malignen Erkrankungen darstellt.

Viele der bedeutenden, in Krebszellen aktivierten, inflammatorischen Transduktions-

kaskaden, unter anderem stimuliert von epidermalen, vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktoren und Zytokinen der IL-6 und IL-10 Familie, laufen bei dem Protein STAT-3 zusammen. Dieser Regulator scheint eine zentrale Stellung im karzinogenen entzündlichen Geschehen einzunehmen. Obwohl viele Faktoren und auch genetische sowie epigenetische Mutationen mit einer irregulären STAT-3 Aktivität bei metaplastischer Transformation verknüpft sind, scheinen doch Mitglieder der IL-6 Familie die hauptsächlichste Verbindung zwischen Inflammation und Krebs darzustellen. Zudem stellt die JAK/STAT3 Signalübertragung in der Tumorumgebung einen essentiellen Faktor für die Entwicklung und das Überleben maligner Zellen dar. Somit nimmt STAT-3 eine Schlüsselrolle bei vielen bekannten Tumoren ein.

Eng damit verflochten ist NF- κ B, dem in seiner Rolle als Transkriptionsfaktor für viele Entzündungsmediatoren sowohl tumorinduzierende, als auch antitumorale Eigenschaften zugesprochen werden. In entarteten Zellen sind beide Proteine dauerhaft aktiv und regulieren neben verschiedenen Entzündungsparametern auch für das Tumorstadium wichtige Attribute, wie Neoangiogenese, Apoptoseresistenz und Invasivität. Diese beiden Faktoren STAT-3 und NF- κ B existieren nicht nur nebeneinander, sondern interagieren.

1.4.1 Antitumorale oder kanzerogene Immunreaktion

Das Immunsystem spielt eine große, aber dennoch keine klar definierte Rolle bei Krebserkrankungen. Einerseits bekämpft und zerstört es maligne Zellen [57], andererseits fördert es Tumorstadium und inhibiert die antitumorale Aktivität durch Immunzellen [58–60].

Zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen, zerstören maligne Zellen, solange sie entsprechend aktiviert werden [61]. Auch zytotoxische T-Zellen, die zum erworbenen Immunsystem gehören, können antitumoral wirken, wenn sie von T_H1 Zellen angeregt werden [62]. Diese Typ-1 Helferzellen unterstützen durch ausgeschüttete Faktoren hauptsächlich die zellvermittelte Abwehr, wohingegen Typ-2 Helferzellen durch Interaktion mit B-Lymphozyten für die humorale Abwehr wesentlich sind.

Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) unterstützen malignes Wachstum. Diese entstehen aus rekrutierten Monozyten, die durch das vorherrschende Milieu in Tumorumgebung, wobei STAT-3 und NF- κ B und deren Zielgene bestimmend sind, in eine bestimmte Entwicklungsrichtung getrieben werden [63]. So gepolt nehmen sie durch Ausschüttung angiogenetischer, inflammatorischer und wachstumsfördernder Faktoren [60, 63, 64] eine prokanzerogene Rolle ein.

MDSCs (myeloid-derived suppressor cells), eine sehr heterogene Population, werden gehäuft in Mäusen, aber auch in Menschen, die an Krebs erkrankt sind, gefunden [58]. Die

Entstehung dieser Zellen wird induziert durch von Tumorzellen und der entzündlichen Umgebung ausgeschüttete Botenstoffe. Darunter sind IL-6 und damit einhergehend eine Aktivierung von STAT-3 [60]. Da diese Faktoren meist inflammatorische Faktoren sind, geht man davon aus, dass die tumorassoziierte Umgebung für die Anhäufung der MDSCs verantwortlich ist und diese die antitumorale Aktivität des Immunsystems beeinträchtigen und direkt zum Wachstum neoplastischer Zellen beitragen [58, 60, 64].

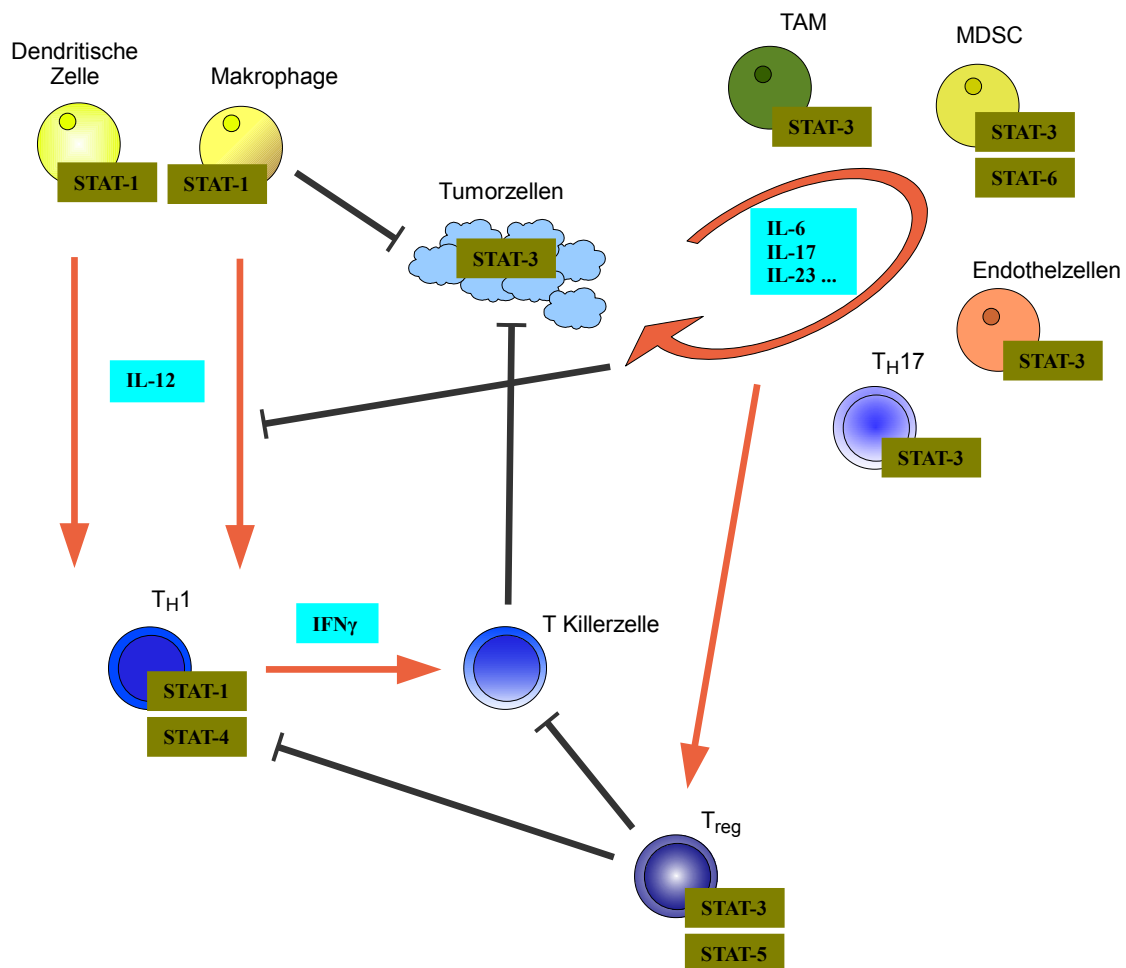


Abbildung 3: Zusammenspiel von Tumorzellen und immunologischen Zellen im umgebenden Gewebe: TAM (Tumorassoziiertes Makrophage), MDSC (myeloid derived suppressor cell), Endothelzellen und TH17 Zellen wirken gemeinsam mit den Tumorzellen an der positiven STAT-3 Rückkopplung. Die antitumorale Aktivität von Makrophagen und dendritischen Zellen über eine Ausbildung einer TH1 Antwort wird direkt über ausgeschüttete Mediatoren oder indirekt über Förderung von Treg Zellen gehemmt. Es sind die dabei hauptsächlich beteiligten STAT Signalwege angegeben.

Ein weiterer Faktor der tumorassoziierten Entzündung ist die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Sie hemmen eine Immunantwort durch Beeinflussung der Aktivität anderer Zellen. Damit wirken sie der antitumoralen Aktivität des Immunsystems, speziell von T_H1 Zellen und zytotoxischen T-Zellen, entgegen und tragen damit zum Fortschreiten malignen Wachstums bei [65]. Hierbei ist STAT-3, gemeinsam mit STAT-5, zu einem großen Teil verantwortlich für die Aktivität der Zellen [12]. Eine weitere T-Zell Population, T_H17 , wurde als begünstigender Faktor für Tumorentstehung und Wachstum ausgemacht [12]. Die Zellen benötigen zur Entwicklung die Stimulierung durch IL-6, $TGF\beta$ und IL-23, wodurch STAT-3 wiederum eine zentrale Rolle einnimmt [66]. Es ist nämlich ein IL-6 abhängiger Transkriptionsfaktor und Aktivator von Genen, die Teile von IL-23 kodieren [67]. Diese Subpopulation der T-Lymphozyten sind an Entzündungsreaktionen beteiligt und stehen somit im Zusammenhang mit malignen Prozessen und assoziierten inflammatorischen Bedingungen (siehe Abb. 3) [12, 66].

Wie das Immunsystem Einfluss nimmt, ist somit zum großen Teil durch STAT Proteine reguliert. Antitumorale Aktivität wird über STAT-1 und STAT-4 erzeugt. Hierbei führt IL-12 über eine positive Rückkopplung zum Etablieren einer T_H1 Antwort mit $IFN\gamma$ Produktion, welches wiederum über STAT-1 die Aktivierung natürlicher Killerzellen, Makrophagen und zytotoxischer T-Zellen fördert [12, 68]. Fehlt STAT-3 in den beteiligten immunologischen Zellen, wird der antitumorale Effekt, vermittelt über STAT-1, noch verstärkt, da STAT-3 normalerweise STAT-1 entgegenwirkt [68, 69]. Dieser antagonisierende Mechanismus ist bei Fehlen des Proteins nicht mehr vorhanden. STAT-3 wiederum ist, wie beschrieben, entscheidend für die Aktivität tumorfördernder und antitumoral hemmender Zellen und reguliert als Transkriptionsfaktor zusammen mit $NF-\kappa B$ die Produktion inflammatorischer Faktoren (siehe Abb. 3, Abb. 4).

1.4.2 Entzündung als Grundlage von Tumoren

Das Immunsystem hat einen starken Effekt auf die Entwicklung einer Neoplasie, es kann sowohl antitumoral, jedoch auch kanzerogen wirken. Besonders in der frühen Entwicklung bietet eine entzündliche Umgebung gute Bedingungen für die Transformation von Zellen im Zuge ihrer normalen Funktion als Abwehr gegen Infektionen. Wird diese natürlicherweise selbstlimitierende Reaktion nicht durch antiinflammatorische Prozesse beendet, so kann dieses Milieu aufrechterhalten werden und in eine chronische Entzündung übergehen. Solche Entzündungen bilden eine Ausgangslage für maligne Prozesse. Besonders deutlich wird dies in Leber und Magen, deren Tumore in der Mehrheit nicht ohne entzündliche Prozesse entstehen.

Viele Infektionen, die malignes Wachstum auf Basis inflammatorischen Geschehens auslösen, beeinflussen die intrazelluläre STAT-3 Aktivierung. Ihr onkogenes Potential ist von diesem Signaltransduktor abhängig. Eine Hepatitis-B Infektion, die ein stark

erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms darstellt, das die Mononukleose auslösende und für verschiedene Tumore verantwortliche Epstein-Barr Virus, oder auch das humane Papillomvirus aktivieren individuell STAT-3. Dazu spielt STAT-3 eine wichtige Rolle in der nicht-infektiösen entzündlichen Karzinogenese. Es gibt Hinweise, dass Krebsentstehung durch Zigarettenkonsum mit einer STAT-3 Aktivierung über unterschiedliche Membranrezeptoren assoziiert ist. Der IL-6 JAK/STAT Signalweg ist also relevant für entzündliche Vorgänge, die mit einem erhöhten Krebsrisiko einhergehen.

Zusammen mit NF- κ B ist wohl STAT-3 ein Schlüsselfaktor, dessen übermäßige Mobilisierung mit Entzündung und Tumorentstehung verknüpft ist (siehe 1.4.4). Es konnte in Mausmodellen mit chemisch induzierter Colitis ulcerosa gezeigt werden, dass das Transduktionsprotein ein obligater Faktor für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms ist [39, 40]. Dies ist möglich, da STAT-3 hauptsächlich Gene reguliert, die zur Proliferation und zum Überleben von Zellen beitragen. Beide Eigenschaften sind essentiell für die Entstehung maligner Zellen. Während die durch Karzinogene induzierte Entzündung weiterhin stattfinden konnte, ist bei STAT-3 Abwesenheit, spezifisch in gastrointestinalen Epithelzellen, die Tumorentstehung und dessen Wachstum unterbunden [39]. Dies lässt sich erklären durch die anti-apoptotische und proliferative Funktion des Transkriptionsfaktors, vermittelt unter anderem von IL-6 [39].

In diesem Modell spielt IL-6 als Stimulator von STAT-3 sowohl in den Entzündungszellen, als auch in malignen Zellen, eine große Rolle. In frühen Erkrankungsstadien ist das Zytokin weniger entscheidend, danach zeigt es um so mehr wichtigen regulatorischen Einfluss auf Wachstum und Größe der Colitis assoziierten Tumore [39, 70]. Weitere Hinweise, dass IL-6 bedeutend für eine irreguläre Aktivität der JAK/STAT-3 Signalübertragung bei menschlichen Krebserkrankungen ist, zeigt sich beim humanem CRC, wo das Interleukin gegenüber Gesunden in erhöhter Menge vorliegt [71].

Äußere Faktoren, wie Infektionen und chemische Karzinogene, sind nicht immer zur Karzinogenese notwendig. Genetische Mutationen im IL6/JAK/STAT Signalweg, welche eine verstärkte oder dauerhafte Aktivierung der Signalübertragung auch ohne Bindung des IL-Rezeptors an seine Liganden mit sich bringen, konnten sowohl in menschlichen Tumoren nachgewiesen werden, als auch in Mäusemodellen mit entzündungsinduzierten Krebsarten in Zusammenhang gebracht werden [72, 73].

All diese vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass bei vorliegenden Entzündungen die Stimulation der JAK/STAT-3 Signalkaskade über IL-6 einen entscheidenden Faktor für die Entstehung malignen Wachstums in dieser inflammatorisch geprägten Umgebung darstellt. Therapeutische Ansätze könnten bereits in der Vermeidung oder aber auch in der Behandlung der entzündlichen und damit karzinogenen Vorgänge gesucht werden.

1.4.3 Tumorbedingte Entzündungsreaktionen

Die eben dargestellte Entzündung als Basis und Ursache für Neoplasien ist jedoch nur ein Teil des Zusammenhangs zwischen STAT-3 und einer Krebsentstehung. Auch wenn keine vorhergehende Inflammation vorhanden war, findet sich in der direkten Umgebung eines Tumors häufig eine Vielzahl an aktiven Zellen des Immunsystems.

Zytokine, Chemokine und weitere Mediatoren sind wichtige Faktoren zur Schaffung und Aufrechterhaltung einer tumorfördernden Umgebung und STAT-3 mit NF- κ B als Transkriptionsfaktoren sind essenziell für deren Expression. Maligne Zellen tragen dabei weniger zur Expression dieser Faktoren bei als Entzündungszellen im umliegenden Gewebe. Liegt diese günstige Umgebung, wie etwa bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, nicht bereits vor, so tragen die transformierten Zellen selbst zur Etablierung inflammatorischer Prozesse bei.

Die dauerhafte Stimulation von STAT-3 wird meist nicht durch genetische Veränderungen bedingt, sondern durch in soliden Tumoren häufig überexprimierte oder überaktivierte Wachstumsfaktoren und Tyrosinkinase, welche dem Protein in Signalkaskaden vorgeschaltet sind [18, 74, 75]. Der damit angesprochene Transkriptionsfaktor STAT-3 bewirkt nun die Genexpression vor allem proinflammatorischer Botenstoffe (siehe Abb. 4). Diese Zytokine, Chemokine und wachstumsfördernden Stoffe, und damit auch ihr Transkriptionsfaktor STAT-3, sind entscheidend für Beginn und Aufrechterhaltung einer tumorassoziierten Entzündung [64].

Wie in Abb. 4 ersichtlich, induziert STAT-3 die Genexpression einiger Botenstoffe, darunter IL-6, die im Gegenzug die Fähigkeit haben STAT-3 zu aktivieren. Hier wird die Interaktion der Tumorzellen mit ihrer Umgebung deutlich. Die Ausschüttung der in Abb. 4 dargestellten Moleküle in transformierten Zellen spricht die JAK/STAT Signalkaskade der im umliegenden Stroma befindlichen Zellen an, darunter auch Zellen des Immunsystems. Daraus folgt eine Aktivierung der STAT-3 Zielgene, deren Proteine wiederum verstärkend auf denselben Signalweg in der Umgebung, unter anderem im Tumor, wirken. Diese positive Rückkopplung zwischen den neoplastischen Zellen und seiner direkten Umgebung wird vor allem von Entzündungszellen getragen, die einen Großteil der ausgeschütteten Mediatoren zu dieser Interaktion beitragen [76]. Exemplarisch für diese Wechselwirkung ist das multiple Myelom. IL-6 treibt über seinen bekannten Signalweg das Überleben entarteter Zellen an. Aktivierung von STAT-3 wird dann auch in Zellen im umgebenden Stroma beobachtet, die eine wichtige Quelle des Interleukins sind, welches wiederum auf die Tumorzellen wirkt [77]. Diese beschriebene positive Rückkopplung findet sich ebenso in weiteren Krebserkrankungen des Menschen, etwa im Cholangiokarzinom [78].

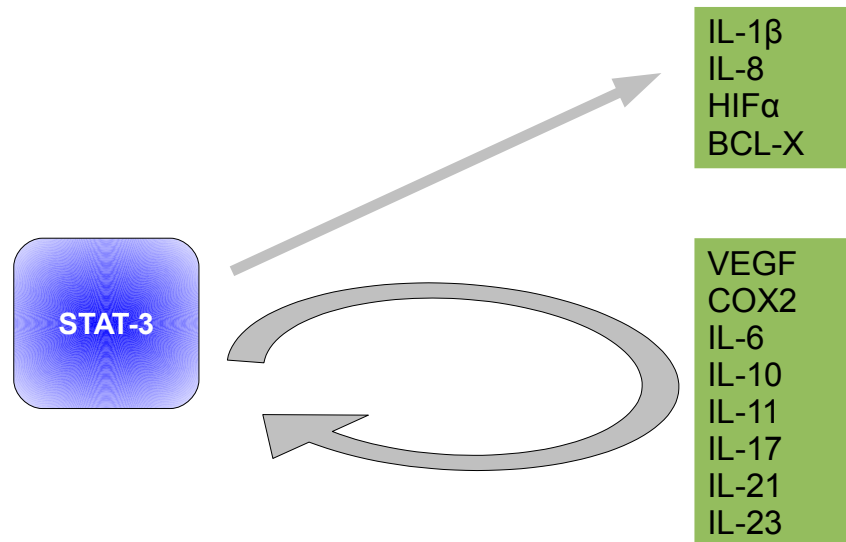


Abbildung 4: Eine Auswahl der von STAT-3 positiv regulierten Faktoren, die teilweise in einer positiven Rückkopplung wiederum als STAT-3 Aktivatoren wirken [12, 13]

1.4.4 Interaktion von STAT-3 und NF- κ B

STAT-3 ist ein wichtiges Element bei Tumorentstehung und der ursächlichen wie auch der folgenden Entzündung im umgebenden Gewebe. In enger Wechselwirkung damit und folglich ähnlich bedeutend steht der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Im Gegensatz zu STAT-3, das kanzerogene Entzündungsreaktionen vorantreibt und eine antitumorale Immunantwort unterdrückt, ist NF- κ B sowohl die Förderung, als auch die Unterdrückung von malignen Zellen zuzuschreiben [64, 76, 79–81].

Diese beiden Proteine sind nicht nur häufig gemeinsam aktiv in Tumoren und in assoziierten Immunzellen, sondern induzieren auch teilweise die Expression gleicher Gene und überlappen sich damit in ihrer Funktion. Dazu gehört die Vermittlung proliferativer, anti-apoptotischer, angiogenetischer und Metastasierung förnderer Eigenschaften. Durch vielschichtige Wechselwirkungen ist STAT-3 nicht nur für die persistierende Aktivität von NF- κ B notwendig, sondern ist im Gegenzug, besonders in Entzündungszellen in Tumorumgebung, vom Interaktionspartner abhängig. Denn viele der von NF- κ B induzierten Faktoren sind für eine dauerhafte Induktion von STAT-3 verantwortlich. Dazu gehören unter anderem IL-6 und andere Mitglieder der IL-6 Familie, deren Wirkmechanismus bereits in 1.1.1 dargestellt ist [82]. Weitere Faktoren, die NF- κ B vermittelt die Phosphorylierung von STAT-3 erhöhen, sind IL-17, IL-21 und IL-23, die über T_{H17} und T_{reg} Zellen zur Entstehung entzündungsassoziierter Neoplasien beitragen (siehe Abb. 3, Abb. 4). Für die Expression einiger dieser Faktoren wird STAT-3 als Co-Faktor benötigt [12]. Somit sind beide Elemente gleichzeitig aktiv in Tumorzellen und Umgebung und agieren gegenseitig stabilisierend in einer positiven Rückkopplung.

Erstaunlich dabei ist, dass unter tumorfördernden entzündlichen Bedingungen STAT-3 und NF- κ B gemeinsam prokanzerogen wirken, wohingegen die Expression von Genen, die eine antitumorale Reaktion via T_H1 Zellen bewirken, nicht mehr stattfindet. Offensichtlich wird ein Teil des NF- κ B Signalweges inhibiert, nämlich derjenige, der zur Expression von T_H1 stimulierenden Genen führt und damit wird die antitumorale Aktivität eingeschränkt. Dagegen ist unter STAT-3 Einfluss hauptsächlich die NF- κ B Untereinheit aktiv, die onkogene DNA Abschnitte anspricht [12].

1.4.5 IL-6

Der pathogenetische Einfluss von IL-6 wird bei vielen Krankheiten diskutiert. Es spielt eine Rolle bei inflammatorischem Geschehen und als Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem bei Autoimmunreaktionen. Rheumatoide Arthritis [83], Morbus Crohn [84] und Osteoporose [85] können hier als Beispiele genannt werden. Wie beschrieben (siehe 1.1.3), hat das Zytokin antiapoptotische und proliferative Wirkung, beides Zeichen malignen Wachstums. Bei vielen Tumorarten konnten hohe IL-6 Konzentrationen gemessen werden und scheinen für eine schlechte Prognose zu sprechen [24]. Dies ist ein deutlicher Hinweis für eine Verbindung zwischen dem Zytokin Interleukin-6, seiner Signalübertragung und dem Entstehen oder der Förderung von Neoplasien. Unter anderem werden folgende Krebsarten in Verbindung mit IL-6 gebracht (siehe Tabelle 2).

Bis auf wenige Ausnahmen hat IL-6 bei Neoplasien einen wachstumsfördernden Effekt. Das Wirken des Zytokins und die daran beteiligte Signalkaskade JAK/STAT und die Rolle des regulatorischen SOCS-3 werde ich an wenigen Beispielen aufzeigen.

Multiple Myelom

Das Multiple Myelom zählt zu den B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen. Der Ausgangspunkt ist eine gemeinsame Vorläuferzelle, von der alle malignen Plasmazellen abstammen. Diese zerstören den Knochen und verdrängen die normale Blutbildung. Wie in 1.1.2 gezeigt, spielt IL-6 physiologischerweise bei der Reifung von B-Lymphozyten eine Rolle. Auch bei den entarteten Lymphozyten ist das Zytokin ein essentieller Wachstums- und Überlebensfaktor [86]. Obwohl Myelomzellen den IL-6 Rezeptor exprimieren [87], scheint Transsignalling (siehe 1.1.1) ein entscheidender Faktor für die Proliferation der Zellen zu sein [88]. Die Konzentration des löslichen IL-6R im Serum korreliert mit der Krankheitsausbreitung und kann zur Prognosebestimmung verwendet werden [89].

Der zugrunde liegende Mechanismus für diesen Zusammenhang wird in einer Akti-

Art der Malignität	Rolle von Interleukin-6
Mamma	Wachstumshemmend
Gastrointestinaltrakt	Wachstumsfördernd
Gliom	Wachstumsfördernd
Leukämie	Wachstumsfördernd
Lunge	Wachstumshemmend
Lymphom	Wachstumsfördernd
Melanom	Anfangs wachstumshemmend, Fördert Metastasierung
Multiples Myelom	Wachstumsfördernd
Ovar	Wachstumsfördernd
Pankreas	Wachstumsfördernd
Prostata	Wachstumsfördernd
Niere	Wachstumsfördernd

Tabelle 2: IL-6 und malignes Wachstum [24]

vierung des JAK/STAT Signalwegs durch IL-6 gesehen. Phosphoryliertes STAT-3 induziert die Bildung antiapoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie [90] und trägt somit nicht nur zum Überleben der malignen Zellen bei, sondern auch zur Resistenz gegenüber einer Chemotherapie [91]. Eine Hemmung dieser Signalübertragung über JAK/STAT-3 unterbricht die antiapoptotische und proliferative Wirkung von IL-6 und führt zur Apoptose der Multiplen Myelomzellen *in vitro* [77].

Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist bei beiden Geschlechtern der zweithäufigste auftretende Tumor. Dessen Häufung bei vorliegender Colitis ulcerosa deutet auf eine Rolle des Immunsystems bei der Entstehung des CRC hin [1]. Es konnte gezeigt werden, dass die IL-6 Produktion im entzündeten Schleimhautgewebe und in Monozyten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht ist [92–94]. In der Folge konnte eine erhöhte, endoskopisch beurteilte, Entzündungsaktivität mit lokaler IL-6 Ausschüttung korreliert werden [95]. Es besitzen jedoch nur wenige T-Zellen des betroffenen Gewebes

den membranständigen IL-6 Rezeptor. Hier spielt der lösliche Zytokin Rezeptor (sIL-6R) eine große Rolle, er ermöglicht es, als Komplex mit seinem Ligand, über gp130 die IL-6 Signalkaskade in Zellen zu aktivieren, die ohne dieses Transsignalling (siehe 1.1.1) nicht angesprochen werden könnten [9,94]. Da Colitis ulcerosa ein Risikofaktor für das CRC ist, trägt IL-6 bereits durch die Aufrechterhaltung des entzündlichen Status zur Entstehung des Karzinoms bei.

Die Folge der Aktivierung des IL-6 Signalweges ist eine verstärkte Phosphorylierung und Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors STAT-3 in den T-Lymphozyten. Dies hat eine Resistenz gegenüber kontrolliertem Zelltod zur Folge, indem die Produktion antiapoptotischer Proteine, wie Bcl-2 und Bcl-xl, angestoßen wird (siehe 1.1.1, 1.1.3) [94]. Diese fehlende Kontrolle über die für die Entzündung mit entscheidenden Zellen trägt zur Aufrechterhaltung der chronisch entzündlichen Darmerkrankung entscheidend bei [96].

Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung des Zytokins an der Entstehung des CRC ist eine erhöhte IL-6 Konzentration und seine positive Korrelation mit der Größe der malignen Wucherung bei Patienten mit kolorektalem Karzinom [97]. Daneben konnte für IL-6 eine direkte Wachstumsförderung auf epitheliale Krebszellen *in vitro* nachgewiesen werden [98].

Mausmodelle zeigen eine Abhängigkeit des Tumorwachstums von IL-6, wobei insbesondere Transsignalling mit Hilfe des löslichen IL-6 Rezeptors eine wichtige Rolle bei der Entstehung des CRC spielt und einen mögliche Erklärung für den Einfluss von Immunzellen im umgebenden Gewebe auf neoplastische Zellen darstellt [99,100]. In einem der menschlichen Colitis ulcerosa besser angepassten Modell konnte der wichtige Einfluss von IL-6 auf die Tumorentstehung erneut gezeigt werden [70]. Bei vorliegendem Tumor konnte eine deutlich höhere IL-6 Sekretion gegenüber der Kontrolle ermittelt werden. Die Gabe eines anti-IL-6 Antikörpers verhinderte die Entwicklung von Karzinomen ohne die vorliegende Entzündung zu reduzieren. Diese Notwendigkeit von IL-6 für neoplastisches Wachstum konnte bestätigt werden, indem man genetisch veränderten Mäusen, die im Modell trotz Entzündung keine Tumore entwickelten, IL-6 zuführte, woraufhin sich Krebsformationen bildeten [70].

Diese Ergebnisse zeigen die essentielle Notwendigkeit einer IL-6 Signalreaktion für die Entstehung kolorektaler Tumore. Auch wenn andere tumorfördernde Faktoren sicherlich mit von Bedeutung sind, so trägt IL-6 doch eine herausragende Bedeutung und ist vielleicht verantwortlich für die Entstehung weiterer kanzerogener Botenstoffe.

1.4.6 SOCS-3

Aberrante Aktivität der JAK/STAT-3 Signalübertragung ist sehr häufig assoziiert mit Tumorerkrankungen. Dafür verantwortlich sind seltener genetische Mutationen, sondern häufiger ein Überangebot an stimulierenden Faktoren [74]. Bedeutung hierbei könnte jedoch auch die fehlende Funktionalität von Inhibitoren des Signalwegs, wie in diesem Fall SOCS-3, haben.

So konnte gezeigt werden, dass die Expression von SOCS-3 in menschlichen Lungenkarzinomzellen vermindert ist. Dies geschieht durch eine Hypermethylierung, also eine Inaktivierung, der Promoterregion für das Gen des Proteins. Dadurch entsteht eine übermäßige Phosphorylierung von STAT-3, da dessen negativer Regulator nicht mehr ausreichend vorhanden ist [101]. Die Wiederherstellung der SOCS-3 Produktion in den Krebszellen verringert nicht nur wie erwartet die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT-3, sondern beeinflusst damit die Zellen soweit, dass sich eine Wachstumsverzögerung und eine stark erhöhte Apoptoserate feststellen lässt [101].

Dieser Zusammenhang, SOCS-3 als antitumoraler Faktor in malignen Zellen, konnte ebenso in Lebergewebe nachvollzogen werden. Mäuse, deren Leberzellen SOCS-3 defizient sind, zeigen nach partieller Hepatektomie erhöhte DNA-Synthese und Mitoserate und damit gesteigertes Zellwachstum und Zytokinaktivität, sowie hohe Proliferation in Kultur, auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren [46]. Hierbei konnte in einem Modell chemisch induzierter Tumorentstehung in der Leber desweiteren eine gesteigerte Hepatokarzinogenese gefunden werden. Passend hierzu konnte eine Ausschaltung der SOCS-1 und SOCS-3 Gene in Hepatom Zelllinien und HCC Geweben nachgewiesen werden [102–104]. Vor allem das Fehlen des Regulators SOCS-3 führt zur andauernden Aktivierung von STAT-3 in den untersuchten Hepatozyten [103, 105]. Damit verbunden ist eine erhöhte Expression von Zielgenen, die antiapoptotisch, wie Bcl-2, sowie wachstumsfördernd wirken, was in einer verstärkten Fibrose und Hepatitis induzierter Karzinogenese resultiert [106, 107]. Induktion von SOCS-3 durch demethylierende Agentien wirkt sich ebenso wie direkte Inhibitoren von STAT-3 negativ auf Wachstum und Überleben von Tumorzellen aus [103, 105].

Diese epigenetische Beeinträchtigung, wie Hypermethylierung von Promoterregionen, der SOCS-3 Produktion scheint verantwortlich für die anhaltende STAT-3 Aktivierung durch IL-6 in Zellen des Cholangiokarzinoms, welche sich durch Wachstumsförderung und Apoptosehemmung auszeichnet [78, 108]. Auch in Kolontumorzellen konnten verminderte SOCS-3 Spiegel bei gleichzeitig verstärkter Phosphorylierung von STAT-3 gezeigt werden [109]. Dieser Zusammenhang zeigt sich ebenso in malignem Prostatagewebe [110] und beim Glioblastoma multiforme [111]. Analog dazu scheinen höhere SOCS Spiegel (SOCS-1,-3,-4,-7) in Brustkrebszellen mit einer besseren Prognose der Erkrankung verbunden zu sein [112].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Blot-Entwickler M35 X-Omat Processor	Kodak, Stuttgart
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau
Chemikalienmischer Automixer II Plus	Kodak, Stuttgart
ELISA-Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
FACS Calibur	BD, Heidelberg
Fastblot B34	Biometra, Göttingen
Intravitalmikroskop	Zeiss, Göttingen
Nucleofector Gerät	Lonza, Basel, Schweiz
Peltier Thermal Cycler PTC 200	GMI, Ramsey, USA
Quarzküvette Suprasil 10mm Schichtdicke	Hellma, Müllheim
Spannungsgeber Power Pac 300	Bio-Rad, München
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 1	Scientific Industries, New York, USA
X-Ray Kassette 13 x 18	Kisker, Steinfurt
Zählkammer Neubauer improved	Schubert und Weiss, München
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Puffer und Zellkulturmedien

DMEM Glutamax	Gibco, Paisley, UK
DMEM High Glucose with L-Glutamine	PAA, Pasching, Österreich
E. coli Fastmedia AMP TB	Invivogen, Toulouse, Frankreich
E. coli Fastmedia AMP Agar	Invivogen, Toulouse, Frankreich
RPMI 1640	Gibco, Paisley, UK
S.O.C. Medium	Invitrogen, Paisley, UK
Phosphate buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich

2.1.3 Selbst hergestellte Puffer und Gele

- Westernblot

TBS (10x): (pH 7,5)	H ₂ O	
	0,5M Tris	Merck, Darmstadt
	1,5M NaCl	Merck, Darmstadt
TTBS:	TBS (1x)	
	0,1% Tween 20	Sigma, Steinheim
RIPA:	PBS	
	1% NP40 Alternative	Merck, Darmstadt
	0,5% Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt
	0,1% SDS	
Transferpuffer: (pH 8,3)	H ₂ O	
	25mM Tris	
	192mM Glycerin	Merck, Darmstadt
	20% Methanol	Merck, Darmstadt
Laufpuffer:	1,92M Glycerin	
	0,5M Tris	
	1% SDS	
SDS-Sample-Puffer:	H ₂ O	
	62,5mM Tris-HCl(pH 6,8)	
	10% Glycerin	
	2% SDS	
	1% β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
	0,001% Bromphenolblau	Merck, Darmstadt

Trenngel:	Sammelgel:	
H ₂ O	H ₂ O	
375mM (pH 8,8)	125mM (pH 6,8)	Tris
0,1%	0,1%	SDS
7,5%	3,9%	Bis-Acrylamid
1g/l	0,8g/l	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
0,1%	0,1%	Temed

• Gel-Elektrophorese

TAE (10x):	H ₂ O
	0,4M TRIS
	0,01M Essigsäure
	0,2M EDTA-Na ₂

Agarosegel (1%):	H ₂ O
	67% TAE (1x)
	1% (w/v) Agarose
	0,007% Ethidiumbromid

2.1.4 Chemikalien und Kits

Albumin bovine serum (BSA)	Biomol, Hamburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
BC Assay Protein Quantitation Kit	Uptima, Montlucon, Frankreich
Bis-Acrylamid	Merck, Darmstadt
Click-iT EdU Alexa Fluor	
488 Cell Proliferation Assay Kit	Invitrogen, Paisley, UK
DEPC Wasser	Ambion, Foster City, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
ECL Detection Reagents	GE Healthcare
	Buckinghamshire, UK
EDTA 500mM	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethanol 75%	Merck, Darmstadt
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glutamin	Biochrom, Berlin

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, Paisley, UK
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mini Elute Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
Natrium-Acetat 3M	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Nucleotide Solution Mix	NEB, Ipswich, UK
Nucleofector Solution 5	Lonza, Basel, Schweiz
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, UK
PeqGold Universal Agarose	Peqlab, Erlangen
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Darmstadt
Platinum PCR Supermix	Invitrogen, Paisley, UK
Pmax GFP	Lonza, Basel, Schweiz
Prestained Proteine Marker	NEB, Ipswich, UK
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Darmstadt
Quiaprep Spin Miniprep	Quiagen, Hilden
Quickload 100bp DNA Ladder	NEB, Ipswich, UK
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
ReBlot Plus Mild Ab Stripping Solution	Millipore, Billerica, USA
Temed	Sigma, Steinheim
Topo TA Cloning (PCR2.1 Topo Vektor)	Invitrogen, Paisley, UK
Trackit 10bp DNA Ladder	Invitrogen, Paisley, UK
TransIT Neural Transfection Reagent	Mirus, Madison, USA
TransIT LT1 Transfection Reagent	Mirus, Madison, USA
TransFactor Extraction Kit	Clontech, Mountain View, USA
TransFactor Colorimetric Kit STAT-3	Clontech, Mountain View, USA
Trypanblau 0,5%	Biochrom, Berlin

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

1,5ml Eppendorfgefäße	Corning, Kaiserslautern
2,0ml Eppendorfgefäße	Corning, Kaiserslautern
6-Well Platte	Corning, Kaiserslautern
96-Well Platte	Corning, Kaiserslautern
Cell Lifter	Corning, Kaiserslautern
Cell Scraper 25mm	TPP, St. Louis, USA
Chromatography Paper 3MM Chr	Whatman, Maidstone, UK
Cryotube	Nunc, Langenselbold
Petrischale 100mm x 20mm, Non-pyrogenic	Corning, Kaiserslautern

PP Röhrchen 15ml (Falcon)	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
PP Röhrchen 50ml (Falcon)	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Protran Nitrocellulose Membran 0,45 μ m	Whatman, Maidstone, UK
Zellkulturflasche 75cm ²	Corning, Kaiserslautern

2.1.6 Enzyme, Antikörper

Bgl2 Restriktionsendonuklease	NEB, Ipswich, UK
EcoR1 Restriktionsendonuklease	NEB, Ipswich, UK
Hind3 Restriktionsendonuklease	NEB, Ipswich, UK
Mlu1 Restriktionsendonuklease	NEB, Ipswich, UK
Nco1 Restriktionsendonuklease	NEB, Ipswich, UK
Nhe1 Restriktionsendonuklease	NEB, Ipswich, UK
Sac1 Restriktionsendonuklease	NEB, Ipswich, UK
Sma1 Restriktionsendonuklease	NEB, Ipswich, UK
NEBuffer 1,2,3,4	NEB, Ipswich, UK
Klenow DNA Polymerase I	NEB, Ipswich, UK
Rapid Alkaline Phosphatase	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	NEB, Ipswich, UK
Anti SOCS3 Antikörper (Rabbit)	Acris, Herford
Goat anti rabbit IgG-HRP Antikörper	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Donkey anti goat IgG-HRP Antikörper	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

2.1.7 Plasmide, Oligonukleotide

pORF9-mSOCS3	Invivogen, Toulouse, Frankreich
pcr2.1-Topo	Invitrogen, Paisley, UK
pCI-neo Mammalian Expression Vector	Promega, Mannheim
psa Vektor	Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Axel Doenecke, Regensburg
mSOCS-3 5'-Ende	TIB Molbiol, Berlin
mSOCS-3 3'-Ende	TIB Molbiol, Berlin
T7EEV	Promega, Mannheim
T3	Promega, Mannheim

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

- Allgemein

Sämtliche verwendete eukaryote Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit in 75cm² oder 150cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Um einer Kontamination vorzubeugen wurden alle Arbeiten steril unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Dabei verwendete Werkzeuge und Arbeitsflächen wurden mit Alkohol (70%) gereinigt oder es wurden sterilisierte Materialien verwendet. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Medien oder sonstige Lösungen vor Gebrauch auf 37° C vorgewärmt.

- Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl einer Kultur wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. 10µl der Zellsuspension wurden mit derselben Menge Trypanblau versetzt, um tote Zellen zu markieren und diese von der Zählung auszuschließen. 10µl wurden davon in die Kammer gegeben und daraufhin vier Zählkammern ausgewertet.

- Langzeitlagerung der Zellen

Zur längeren Lagerung der Zellen wurde vorbereitend das Medium durch Zentrifugation entfernt und die Zellzahl bestimmt. 3-4 Millionen Zellen wurden in 1ml Medium aus 90% FCS und 10% DMSO aufgenommen und in Cryotubes bei -80° C aufbewahrt. Zur Wiederverwendung wurde der Inhalt langsam erwärmt, das Einfriermedium verdünnt und durch Zentrifugation entfernt, worauf das Pellet in normalem Medium resuspendiert und die Zellen wieder in Kultur gebracht wurden.

- Splitting

Die Zellen wurden bei Erreichen von Subkonfluenz alle 48-72 Stunden gesplittet, um kontinuierliches Wachstum zu gewährleisten und ein Absterben der Zellen zu verhindern. Dabei wurde die Flasche mit PBS gespült, dieses abgesaugt und daraufhin die Zellen gelöst. Dies erfolgte bei COS 7 Zellen enzymatisch mit 1ml Trypsin, Einwirkzeit

bis zum Ablösen der Zellen, woraufhin FCS-haltiges Medium zum Stoppen der Reaktion und zur Verhinderung irreversibler Zellschädigungen hinzugefügt wurde. RAW, Hepa 1-6 und HepG2 Zellen wurden mit einem Cell Scraper vorsichtig mechanisch gelöst und dann in Medium aufgenommen. Vollständig resuspendiert wurden die Zellen in insgesamt 10ml Medium und dann 1:5 bis 1:20 verdünnt in neue Kulturflaschen verteilt.

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

Zelllinie	Medium	Zusätze
RAW 264.7	DMEM Glutamax	
COS 7	DMEM High Glucose	Allen Medien wurde 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin hinzugefügt.
HepG2	DMEM Glutamax	
Hepa 1-6	DMEM High Glucose	
CT 26	RPMI 1640	

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien und Medien

- Aussähen der Zellen und Transfektion

Die Zellen wurden, wie in *Splitting* beschrieben, vom Flaschenboden gelöst und in Suspension gebracht. Die Zellzahl wurde daraufhin bestimmt (siehe *Zellzahlbestimmung*). Entsprechend der jeweiligen Erfordernis wurde ein bestimmtes Volumen mit den darin enthaltenen Zellen entnommen und in 6-Well Platten ausgesät.

Zelllinie	Transfektion	Zellen/Well
RAW 264.7	Nucleofector D-32	$1,5 \times 10^6$
COS 7	TransIT LT1	$2,5 \times 10^5$
HepG2	Nucleofector T-28	$1,5 \times 10^6$
Hepa 1-6	Lipofectamine 2000	$6-8 \times 10^5$
CT 26	TransIT LT1	$2,5 \times 10^5$

Tabelle 4: Transfektion der Zelllinien

Zellen, die mit TransIT LT1 von Mirus transfiziert wurden, mussten vor der Transfektion adhären werden. Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in einer 6-Well Platte ausgesät. Medium wurde jeweils bis zu einem Endvolumen von 2ml hinzugefügt. Nach 5 - 24 Stunden konnten die Zellen transfiziert werden. Pro Well wurden $0,79\mu\text{l}$ TransIT LT1 Transfection Reagent und $26\mu\text{l}$ serumfreies Medium in einem Eppendorf Cup für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde diesem Mix pro Well $2\mu\text{g}$ DNA hinzugefügt und weitere 30 Minuten belassen. Der Ansatz konnte dann tröpfchenweise auf die Zellkultur gegeben werden, wobei durch sanftes Hin- und Herbewegen eine gute Verteilung der Lösung ermöglicht wurde.

Transfektionen mit Lipofectamine 2000 verlaufen nach einem ähnlichen Protokoll. $6-8 \times 10^5$ Zellen wurden ausgesät und 5-24 Stunden zur Erreichung der Adhärenz kultiviert. Getrennt voneinander wurden nun $250\mu\text{l}$ serumfreies Medium einmal mit $4\mu\text{g}$ DNA und einmal mit $10\mu\text{l}$ der Transfektionslösung fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Beides wurde daraufhin vermischt und weitere 20 Minuten stehen gelassen. Danach wurden $500\mu\text{l}$ der fertigen Lösung tröpfchenweise auf die Zellen gegeben.

Bei Verwendung des Nucleofector Gerätes, RAW und HepG2, wurden die Zellen direkt nach dem Zählen und noch vor dem Aussähen transfiziert. Hierzu wurden 1,5 Millionen Zellen bei 90G 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt, sodass nur das Pellet übrig blieb. Dieses wurde in $100\mu\text{l}$ Nucleofector Solution 5 gut resuspendiert, jedoch niemals länger als 15 Minuten in der Chemikalie belassen, um die Vitalität der Zellen und die Transfektionsrate nicht zu verringern. Zu dieser Suspension wurden $2\mu\text{g}$ DNA hinzugefügt und direkt mit Hilfe einer sterilen Pipette in eine ebenso beiliegende Küvette überführt. Die Elektroporation der Zellen wurde mit der Programmstufe D-32 oder T-28 des Nucleofector Gerätes durchgeführt. Daraufhin wurde die Küvette zweimal mit jeweils $500\mu\text{l}$ Medium gespült und damit die Zellen in ein Well, das bereits 37°C warmes Nährmedium enthielt, überführt.

Bei allen Transfektionen wurden die Zellen 24h bei Standardkulturbedingungen bebrütet und dann geerntet. Dies war genügend Zeit, um die Expression der eingebrachten Gene zu gewährleisten und sie in nachweisbarer Menge vorliegen zu haben.

Bei der Etablierung einer Transfektionsmethode wurde zur Kontrolle und Abschätzung der Effizienz den Zellen ein GFP (green fluorescent protein) Vektor anstatt der SOCS-3 DNA eingeführt. Da das hergestellte Protein unter ultraviolettem Licht grün fluoresziert, kann man unter einem Intravitalmikroskop die Relation erfolgreich transfizierter gegenüber nativen Zellen annäherungsweise bestimmen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

- Vervielfältigung von DNA in *Escherichia coli*

Der pORF9-mSOCS3 Vektor wurde in gefriergetrockneten transformierten *E. coli* geliefert. Um das Plasmid zu vermehren und es danach zu isolieren, wurden die Bakterien in 1ml S.O.C. Medium eine halbe Stunde bei 37° C geschüttelt und dann durch einen 3-Ösen-Ausstrich auf Agarplatten verteilt. Das Nährmedium enthielt ein Selektionsantibiotikum (Ampicillin), um zu gewährleisten, dass nur *E. coli* wachsen, die mit einem Resistenzgen, wie es auf pORF9-mSOCS3 zu finden ist, transformiert worden sind. Nach 24h wurden mit einer sterilen Spitze Einzelkulturen gepickt und in 2ml Flüssigmedium über Nacht bei 37° C in einem Schüttler inkubiert, um darauffolgend die DNA zu extrahieren.

- Transformation und Selektion

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden chemisch kompetente Top10 und DH5 α Zellen von Invitrogen verwendet. Diese wurden bei -80° C aufbewahrt. Pro Transformationsvorgang wurden 50 μ l der Zellen auf Eis aufgetaut, 20ng DNA hinzugefügt und 30 Minuten bei 4° C inkubiert. Um Poren in der Zellmembran zum Eindringen der DNA zu schaffen, wurden die Zellen für 30 Sekunden bei 42° C Hitze geschockt und danach für 1-2 Minuten auf Eis gestellt. Daraufhin wurden 250 μ l S.O.C. Medium auf Raumtemperatur hinzugefügt. Bei 37° C wurde das Behältnis eine Stunde lang geschüttelt, um die Expression von Antibiotikumresistenzen zu ermöglichen.

Zur Selektion wurde ein Teil dieser Bakterienkultur auf eine vorgewärmte und mit Ampicillin versetzte Agarplatte durch einen 3-Ösen-Ausstrich verteilt. Somit konnten hier nur Kolonien mit einem auf den Plasmiden kodierten Ampicillin Resistenzgen heranwachsen. Zur DNA Isolierung wurden Einzelkolonien genommen und in 2ml Flüssigmedium über Nacht bei 37° C gezüchtet.

- Isolierung und Quantifizierung von DNA

Für die DNA Gewinnung aus *E. coli* Bakterien wurden diese zunächst mit Hilfe von Zentrifugation, 1300rpm (Umdrehungen pro Minute) bei 4° C über 15 Minuten, und Abschütten vom Flüssigmedium befreit. Der QIAprep Spin Miniprep Kit wurde dann laut beiliegendem Protokoll angewandt und die DNA, die in 50ml EB Puffer gelöst wurde, bei -20° C gelagert. Um nur einen Teil der durch eine Agarosegel-Elektrophorese

aufgetrennten und mit Ethidiumbromid markierten DNA zu erhalten, wurde die gewünschte Bande gezielt unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelextraktion wurde dann nach dem beiliegenden Protokoll mit dem Mini Elute Gel Extraction Kit durchgeführt, die daraus gewonnene DNA in $50\mu\text{l}$ EB Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

Die Messung der DNA Konzentration nach der Isolation wurde in einer Quarzküvette mit einem UV-Spektrometer von Eppendorf durchgeführt. Hierzu wurde ein Teil der zu messenden Lösung 1:50 verdünnt und bei 260nm Wellenlänge gemessen. Aus der Extinktion konnte die Konzentration der DNA bestimmt werden.

- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine PCR dient der Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments, in diesem Fall des Abschnitts, der SOCS-3 kodiert. Mit Hilfe zweier Startermoleküle (Primer) kann der gewünschte DNA-Abschnitt festgelegt werden. Die synthetischen Oligonukleotide hatten dabei folgende Sequenz:

5' Ende GCG CCT ACC TGA GAT CACC

3' Ende CCC TCT GAC CCT TTT GCTC

Bei einer PCR steht anfangs die **Denaturierung** der DNA, die Trennung des Doppelstrangs. An die beiden Einzelstränge können sich nun beim **Annealing** die Primer an die ihnen komplementären Stellen anlagern. In der darauffolgenden Phase, der **Elongation**, synthetisiert dann eine DNA-Polymerase, hier Taq Polymerase, den neuen DNA Strang als Verlängerung der Primer. Diese Schritte werden mehrere Male durchlaufen, um eine entsprechende Menge des gewünschten Abschnitts zu erhalten. Die **Finale Elongation** dient hierbei der Sicherstellung, dass die PCR Produkte einen Adenin-Überhang an ihrem 3-Strich Ende zur TA Klonierung besitzen.

Die Taq Polymerase, Mg^{++} und dNTPs in einem wässrigen Millieu waren in dem benutzten Platinum PCR Supermix bereits enthalten. Zu $22,5\mu\text{l}$ dieses Ansatzes wurde jeweils ungefähr 40ng des DNA Templates in Form des Plasmids und jeweils $0,75\mu\text{l}$ der beiden Primer hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde bei der PCR steriles Wasser mitgeführt. Folgende Temperatur-Sequenz wurde über 30 Zyklen verwendet:

PCR Schritt	Temperatur (° C)	Zeit	
Primary Denaturation	95	120s	
Denaturation	95	135s	
Annealing	57	30s	30 Zyklen
Elongation	72	50s	
Final Elongation	72	20min	

Das Produkt wurde kurzzeitig bei 4° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

- Gel-Elektrophorese

Der Nachweis der gelungenen PCR, sowie Kontrollen von Behandlung mit Restriktionsenzymen, wurden mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Zu 0,75g PeqGold Universal Agarose wurde 20ml Wasser und 50ml TAE Puffer hinzugegeben, in einer Mikrowelle 90s erhitzt und mit 5 μ l Ethidiumbromid versetzt. Dieser rote Phenanthridin-Farbstoff interkaliert zwischen die Basen der DNA und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht. Da die Lichtintensität proportional zur vorhandenen DNA Menge ist, treten spezifische Banden auf. Nach der Aushärtung der Flüssigkeit in einer speziellen Kammer konnte die DNA aufgetragen werden. Zur elektrophoretischen Auftrennung nach Molekulargewicht wurde die Kammer mit TAE als Laufpuffer aufgefüllt und eine Spannung von 50 Volt angelegt.

Mit Hilfe eines aufgetragenen Längenmarkers konnte die Größe der DNA unter Fluoreszenzlicht abgeschätzt werden.

- Klonierung

Das PCR Produkt wurde in einen Topo Vektor mit Hilfe einer TA Klonierung eingebaut. Der im Topo TA Cloning Kit enthaltene Vektor ist linearisiert und hat an den jeweiligen Enden einen einzelnen 3' Thymin Überhang. An spezifischen Stellen, nach 5' CCCTT, des DNA Doppelstrangs ist eine virale Topoisomerase I an die DNA gebunden. Die Energie dieser kovalenten Bindung zwischen dem Enzym und der DNA kann unter Freisetzung der Topoisomerase dazu genutzt werden, einen Strang mit komplementärem Überhang und den linearisierten Vektor zu ligieren. Somit kann ein PCR Produkt in den offenen linearisierten Vektor ohne weitere Enzymaktivität integriert werden, da es an beiden Enden einen 5' Adenin Überhang besitzt.

Dazu wurde $1\mu\text{l}$ des PCR Produkts, $1\mu\text{l}$ einer Salzlösung, bestehend aus $1,2\text{M}$ NaCl und $0,06\text{M}$ MgCl_2 , $3\mu\text{l}$ Wasser und $1\mu\text{l}$ der Topo Vektor Lösung zusammen 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Gemisch wurde kurzzeitig bei 4°C aufbewahrt und anschließend direkt zur Transformation verwendet (siehe *Transformation und Selektion*). Das hier neu hergestellte Topo Plasmid wurde aus transformierten E. coli isoliert.

Um den SOCS-3 Genabschnitt mit passenden Schnittstellen vorliegen zu haben, wurde der Vektor mit der Restriktionsendonuklease EcoR1 geschnitten.

	pORF9-mSOCS3	pCI-neo
Plasmid (μl)	25 ($625\mu\text{g}$)	2 ($2\mu\text{g}$)
Puffer (μl)	5	2
EcoR1 (μl)	2 (200 Units)	1 (100 Units)
Wasser (μl)	18	15
Gesamtvolumen (μl)	50	20

Die Ansätze wurden jeweils vier Stunden bei 37°C inkubiert und mit einer Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Der Gelbestandteil, der nur das SOCS-3 Gen enthielt, wurde gezielt ausgeschnitten und die DNA daraus gewonnen (siehe *Gelelektrophorese*). Der pCI-neo Vektor wurde ebenso mit EcoR1 behandelt, um den Einbau des SOCS3 Abschnitts zu ermöglichen. Zusätzlich wurde diese Lösung nach dem Enzymverdau 20 Minuten bei 65°C inkubiert, um das Restriktionsenzym zu deaktivieren. Um die freiliegenden überhängenden Enden zu dephosphorylisieren und damit einen selbstständigen Ringschluss des Plasmids zu verhindern, wurde der Lösung $2\mu\text{l}$ Alkalische Phosphatase und $2,5\mu\text{l}$ des dazugehörigen Puffers (20x) beigegeben und das Ganze bei 37°C eine Stunde aufbewahrt. Dies ist beim pORF9-mSOCS3 Ansatz nicht nötig, da das Enzym durch die Verwendung im Agarosegel und die nachfolgende DNA Extraktion bereits deaktiviert wird.

Das SOCS-3 Insert wurde dann in den PCI-neo Vektor kloniert, wobei der Rapid DNA Ligation Kit von Roche verwendet wurde. Es wurden von beiden vorbereiteten Lösungen jeweils 100ng DNA benutzt und dieser Ansatz mit Wasser und DNA Dilution Buffer (5x) auf $10\mu\text{l}$ Volumen aufgefüllt, sodass der Puffer auf 1x verdünnt wurde. Es wurde weiterhin $1\mu\text{l}$ T4 DNA-Ligase und $10\mu\text{l}$ des dazugehörigen Puffers hinzugefügt. Inkubiert wurde das Gemisch fünf Minuten bei Raumtemperatur. Damit wurden DH5 α Zellen transformiert.

Das fertige Plasmid wurde sequenziert, durchgeführt von Geneart, um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen (siehe *Sequenzierung*).

Um eine leberspezifische Expression des SOCS-3 Proteins zu erreichen, wurde der ursprünglich vorhandene CMV Promotor, der als ubiquitär aktiv gilt, durch einen Albumin Promoter ausgetauscht. Letzterer ist auf dem verwendeten psa Vektor vorhanden (bereitgestellt durch Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Axel Doenecke). Die beiden auszutauschenden DNA Abschnitte konnten nicht durch identische Restriktionsenzyme herausgeschnitten werden, was eine einfachere sticky-end Ligation unmöglich machte. So wurde in beiden Plasmiden nach einer Restriktion entstehende einzelsträngige DNA-Sequenzen, erzeugt durch Bgl2 und Sac1, mit Klenow Enzym (1 Unit/ μ g DNA) am 5'-Ende aufgefüllt und am 3'-Ende abgebaut. Dies dient der Herstellung von blunt-ends, die mittels einer T4 Ligase verbunden werden können. Das Klenow Enzym wurde durch EDTA deaktiviert.

Die zweite Restriktionsendonuklease Sac1 konnte bei beiden Plasmiden eingesetzt werden, wodurch sowohl der gewünschte Albumin Promoter, als auch der pCI-neo Vektor ohne CMV Promotor jeweils ein blunt-end und ein sticky-end hatten. Diese gemischte Ligation erhöht die Effizienz und gewährleistet den korrekten Einbau des DNA Stücks in das Plasmid. Um einen vorzeitigen Ringschluss zu verhindern, wurde den Ansätzen noch Alkalische Phosphatase hinzugegeben.

Die gespaltenen Plasmide wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, die gewünschten DNA Stücke anhand ihrer Größe identifiziert, ausgeschnitten und mit Hilfe des Mini Elute Gel Extraction Kit aus dem Gel extrahiert. In einer 1:1 Konzentration wurden die DNA Abschnitte mit einer T4 DNA Ligase verbunden. Das Produkt wurde in DH5 α Zellen transformiert, die Überprüfung mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt.

- Sequenzierung

Die Sequenzierung des Plasmids wurde von Geneart durchgeführt. Hierfür durfte das die DNA enthaltende Lösungsmittel nicht mit EDTA versetzt sein, wie es beim EB Puffer aus dem Quiaprep Spin Miniprep Kit der Fall ist. Deswegen musste die DNA mit Isopropanol ausgefällt und in EDTA freiem Wasser gelöst werden. Hierfür wurde zu 70 μ l (220ng/ μ l) DNA 14 μ l Natriumacetat und 70 μ l Isopropanol gegeben. Die ausgefällte DNA wurde in einem Zentrifugationsschritt sedimentiert und mit 500 μ l Ethanol (75%) in einer weiteren Zentrifugation gewaschen. Das Sediment wurde getrocknet und die darin enthaltene DNA in 8 μ l Wasser gelöst.

Zur Sequenzierung wurden folgende Primer verwendet:

T7EEV	5' Ende AAG GCT AGA GTA CTT AAT ACG A
T3	5' Ende AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG

- Restriktionsendonukleasen

Sowohl zur Überprüfung des PCR Produkts, als auch zur Kontrolle von Klonierungen wurde erhaltene DNA von Restriktionsendonukleasen geschnitten. Dabei wurden 10-20 Units des benötigten Enzyms für 1-10 μ g DNA verwendet. Inkubiert wurden die Ansätze nach Tabelle 5. Die Puffer (10x) wurden mit Wasser soweit verdünnt, sodass im Ansatz eine 1x Konzentration erreicht wurde.

Enzym	NEB Puffer	Temperatur (° C)	Kombination
EcoR1	EcoR1	37	
Hind3	2	37	4, 37° C
Sma1	4	25	
Mlu1	3	37	2, 37° C
Bgl2	3	37	
Sac1	1 + BSA	37	
Nhe1	2 + BSA	37	
Nco1	3	37	

Tabelle 5: Restriktionsenzyme

2.2.3 Westernblot

- Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung der Proteine wurde den ausgesäten Zellen zuerst das Medium abgesaugt, dann der Zellrasen mit 4° C PBS gespült. Schnelles Arbeiten und Kühlhalten des Ly-sats ist wichtig, um den Einfluss zelleigener Proteasen, die bei Manipulationen an den Zellen aktiv werden, möglichst gering zu halten und die Proteine zu erhalten. Die verschiedenen Zellen wurden, wie in 2.2.1 *Splitting* beschrieben, vom Boden gelöst.

Mehrfaches Spülen und Überführen der Zellsuspension in ein Eppendorf Cup ermöglichte eine weitgehend vollständige Gewinnung aller Zellen. Die Plastikgefäße wurden daraufhin bei 2500rpm 8 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Sämtliche weitere Arbeiten an den Zellen wurden auf Eis durchgeführt.

Der Überstand wurde verworfen, sodass nur ein Zellpellet übrig blieb. Im Falle einer Ablösung der Zellen mit Trypsin und eines Stoppens der enzymatischen Reaktion mit

Medium wurde das Zellpellet nochmal in PBS resuspendiert und der Zentrifugations-schritt wiederholt.

Zur Gewinnung zytosolischer Proteine wurde zu jedem Zellpellet dann je nach Größe $20\mu\text{l}$ - $50\mu\text{l}$ RIPA Puffer und $1\mu\text{l}$ des Protease Inhibitors von Calbiochem hinzugefügt. Bei der Gewinnung von Proteinen zur Messung von STAT-3 auch $1\mu\text{l}$ des Phosphatase Inhibitors, um den Phosphorylierungszustand des Proteins zu bewahren. Das Pellet wurde darin resuspendiert und 30 Minuten auf Eis gestellt, wobei das Lysat alle zwei Minuten gevortext wurde, um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Cups bei 14.000rpm 15 Minuten bei weiterhin 4°C zentrifugiert. Die zytosolischen Proteine, die sich daraufhin im Überstand befanden, wurden in neue Eppendorf Cups überführt, während das entstandene Pellet aus Zellbestandteilen verworfen wurde. Die gewonnen Proben wurden daraufhin auf ihren Proteingehalt gemessen. Gelagert wurden sie bei -20°C .

Um nukleäre Proteine zu gewinnen, wurde das Zellpellet nach dem Waschen mit PBS und der darauffolgenden Zentrifugation mit Lyse Puffer aus dem TransFactor Extraction Kit resuspendiert. Die Bereitung der Puffer und weitere Schritte zur Gewinnung des zytosolischen und anschließend des nukleären Extrakts wurden laut beiliegendem Protokoll durchgeführt, wobei zur Zerstörung der Zellen und der Zellkerne Spritzen mit einer 27 Gauge Nadel verwendet wurden.

- Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Um die Proteinkonzentration aus Zellen gewonnener Proben zu bestimmen, wurde jeweils ein kleiner Teil davon 1:10 in RIPA Puffer verdünnt. Hiervon wurden jeweils $9\mu\text{l}$ auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Daneben wurde der beim BCA Assay beiliegende Albumin Standard laut Protokoll aufgetragen, um eine höhere Genauigkeit zu erzielen jeweils zweifach zur Doppelbestimmung. Die Reaktionslösungen A und B wurden wie empfohlen im Verhältnis 50:1 gemischt und davon jeweils $200\mu\text{l}$ pro Well den Proben hinzugefügt. Die Platte wurde 30 Minuten bei 37°C aufbewahrt und dann zügig mithilfe eines Photometers bei 540nm ausgelesen. Von den doppelbestimmten Proben und Standards wurde der Mittelwert der gemessenen Werte benutzt. Anhand der Standardkurve und den bekannten Konzentrationen konnte die Proteinmenge der Proben bestimmt werden.

- Westernblot

Die Technik des Westernblot dient dem immunologischen Nachweis von Proteinen, hier aus eukaryotischen Zellen.

Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden immer $20\mu\text{g}$ Protein benutzt. SDS wurde im Verhältnis 4:1 der zu messenden Lösung hinzugegeben und das Ganze 10 Minuten bei 95°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen und die Ladungsunterschiede der Eiweiße weitgehend aufzuheben. So präpariert wurden die Proben und auch ein Proteinlängenmarker auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Beim folgenden Blotting wird ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Dies lässt die Proteine auf eine Membran wandern, die Verteilung nach der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten. Das hier angewandte Verfahren ist das Semidry-Blotting, das den schnellen und homogenen Transfer zwischen zwei Plattenelektroden erlaubt.

Hierfür wurde das Gel nach der Elektrophorese aus der Kammer entfernt und zusammen mit einer Nitrozellulosemembran und Blottingpapier, beides in Puffer getränkt, auf die Auflagefläche des Blotting Geräts überführt. Hierbei ist die Entstehung von Luftblasen zwischen den Schichten zu vermeiden, um ein gleichmäßiges Wandern der Proteine zu ermöglichen. Es wurde eine Stromstärke von $0,15$ Ampere über 47 Minuten angelegt. Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Nitrozellulosemembran eine Stunde in einer aus Trockenmilchpulver ($50\mu\text{g}/\text{ml}$ TTBS) hergestellten Lösung gewaschen. Dies dient dazu, freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, da an diese ansonsten Antikörper binden und ein Antigennachweis mit ausreichender Spezifität nicht mehr möglich ist.

Darauffolgend wurde die Membran mit einem Antikörper behandelt.

Der Primärantikörper bindet spezifisch an sein Antigen, in diesem Falle das Protein SOCS-3. Der Sekundärantikörper ist gegen den ersten Antikörper gerichtet und bindet daran. Jedoch ist er mit einem Enzym konjugiert, hier eine Peroxidase aus Meerrettich (HRP). Dieses setzt ein zugegebenes Substrat, Luminol, um, woraufhin man die Chemilumineszenz der oxidierten Form detektieren kann. Die Stärke des Signals hängt von der Menge der vorhandenen Enzyme ab, die wiederum direkt proportional ist mit dem auf der Membran vorhandenem Antigen. Somit findet man bei der Auswertung nur dort Banden, wo sich das Protein nach seiner elektrophoretischen Auftrennung befindet und die Bandenstärke variiert mit der Menge an vorhandenem Antigen.

Der Primärantikörper gegen SOCS-3 von Acris wurde in einer Konzentration von $2\mu\text{g}/\text{ml}$ in einer BSA Lösung verdünnt. Die Membran wurde darin 8-12 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde nun der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in Trockenmilchlösung hinzugegeben, die Einwirkzeit betrug

eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschgang wurde die Membran 1 Minute mit ECL Entwicklungslösung behandelt.

In einer Dunkelkammer wurden daraufhin Röntgenfilme auf die Membran gelegt, um die Chemilumineszenz sichtbar zu machen. Nach 1-15 Minuten, je nach Stärke und Sichtbarkeit der Banden, wurde der Film im Blot-Entwickler M35 X-Omat von Kodak entwickelt.

2.2.4 Colorimetric Kit

Zur Messung der DNA Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors STAT-3 wurde der Colorimetric Kit von Clontech verwendet. Die im Kit enthaltenen 96-Well Platten sind mit DNA Abschnitten, an die pSTAT-3 spezifisch bindet, präpariert. Wird nukleäres Extrakt aus Zellen hinzugefügt, bindet nur der phosphorylierte und damit aktive Transkriptionsfaktor an die DNA. Daran kann nun der gegen pSTAT-3 gerichtete primäre Antikörper binden. Mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, der mit HRP konjugiert ist, wird das hinzugegebene Substrat umgesetzt. Dies ruft eine Farbänderung hervor und ist proportional zum vorhandenen Antikörper, womit eine Aussage über die Menge an vorhandenem pSTAT-3 und damit seiner Bindungskapazität getroffen werden kann. Es wurde laut beiliegendem Protokoll verfahren, wobei $10\mu\text{g}$ nukleären Extrakts pro Well verwendet wurden. Zur Auswertung wurde TMB Substrat hinzugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Ausgelesen wurde die Absorption von einem ELISA Reader bei 650nm Wellenlänge.

2.2.5 Durchflusszytometrie und Proliferationsmessung

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, um Zellen in hoher Geschwindigkeit nach unterschiedlichen Eigenschaften zu analysieren und falls gewünscht auch zu sortieren. Es kann verwendet werden, verschiedene Zellarten zu unterscheiden oder Unterschiede in einer Zellpopulation aufzuzeigen. Hier wurde die Proliferationsrate unterschiedlich transfizierter und stimulierter Zellen gemessen.

Ein sehr genauer Proliferationsparameter ist die DNA-Synthese, welche in der S-Phase des Zellzyklus stattfindet. Um diese zu analysieren ist die Markierung der neu gebildeten DNA notwendig. Das ist möglich durch die Bereitstellung eines Nukleosidanalogons im Nährmedium, in diesem Fall EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) als Analogon zu Thymin. Das EdU wird anstelle von Thymin in die neu synthetisierte DNA eingebaut und beinhaltet ein Azid. Es reagiert bei Zugabe von Ethin und macht das nun fluoreszierende markierte Erbgut in der Durchflusszytometrie sichtbar. Je mehr Zellen den Farbstoff beinhalten, desto größer ist die Proliferationsrate.

Es wurden Hepa 1-6 Zellen mit einem Kontrollvektor (pCI Vektor) oder mit dem herge-

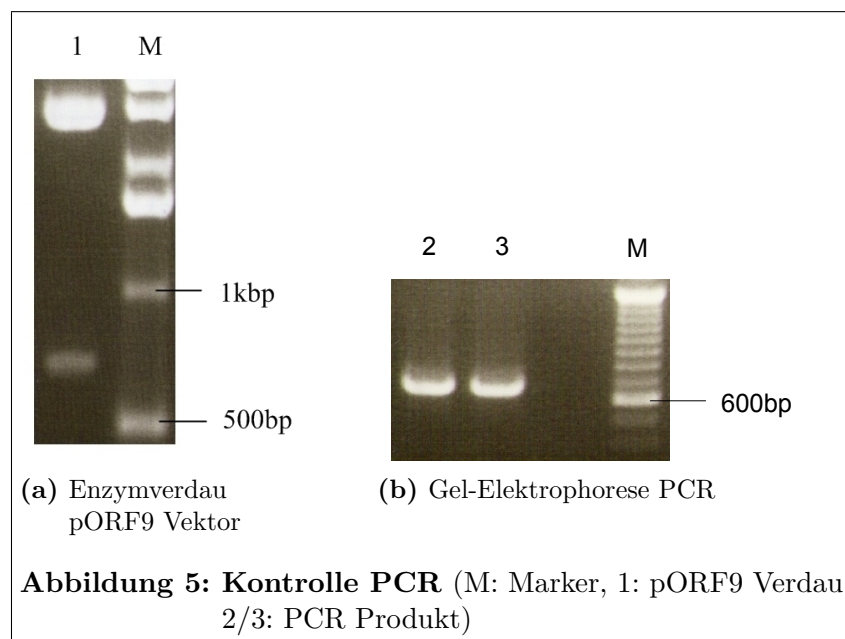
stellten pCI-Alb-SOCS-3 transfiziert und das Proliferationsverhalten ohne und mit IL-6 Stimulation bestimmt. Nach 120 Minuten Stimulation wurde der Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit nach beiliegendem Protokoll verwendet, um die Proliferationsrate mittels Durchflusszytometrie der unterschiedlich transfizierten und nativer Zellen zu messen.

3 Ergebnisse

3.1 PCR des SOCS-3 Gens

Um das SOCS-3 Gen auf einem geeigneten Plasmid zu erhalten, wurde der gewünschte Genabschnitt des pORF9-mSOCS3 Vektors mit einer PCR vervielfältigt, in einen hierfür passenden Vektor kloniert und dann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wieder extrahiert und in den gewünschten pCI-neo Vektor integriert.

Die von der Maus stammende DNA Sequenz von SOCS-3 befindet sich auf dem pORF9-mSOCS3 Vektor von Invivogen. Das Vorhandensein des SOCS-3 Plasmids in den Zellen wurde mit Restriktionsendonukleasen und anschließender Gel-Elektrophorese überprüft (siehe Abb. 5a).



Ein passenderes Plasmid zur weiteren Verwendung ist jedoch pCI-neo von Promega, welches sich durch einen CMV (Zytomegalie-Virus) Promoter und einem Neomycin Phosphotransferase Gen zur Selektion mit dem Antibiotikum G418 auszeichnet. Da keine passenden Schnittstellen für Restriktionsenzyme für die Überführung des Gens in den neuen Vektor vorhanden waren, musste der Umweg über den TOPO Vektor von Invitrogen gewählt werden. Dieser ist für den Einbau von PCR Produkten, die ein

überhängendes Adenin am 3'-Ende besitzen, durch TA Klonierung geeignet. Angrenzend an die Insertionsstelle finden sich zahlreiche Schnittstellen, wodurch der Transfer des SOCS-3 DNA Abschnitts in den pCI-neo Vektor vereinfacht wird.

Die für die PCR verwendeten Primer

5' Ende GCG CCT ACC TGA GAT CACC

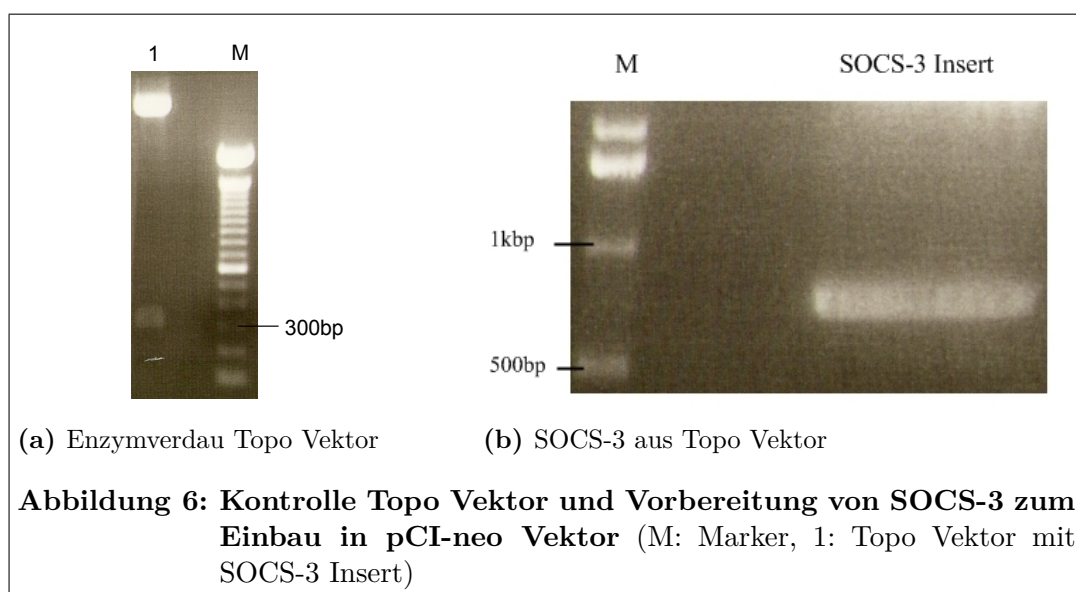
3' Ende CCC TCT GAC CCT TTT GCTC

wurden bei TIB Biomol bestellt. Die PCR wurde mittels Gel-Elektrophorese überprüft, das Produkt sollte 726bp lang sein und stimmte in der Größe mit dem SOCS-3 Abschnitt aus dem pORF9-mSOCS3 Vektor überein (siehe Abb. 5a, 5b).

3.2 Klonierung des PCR Produkts in TOPO und pCI-neo Vektoren

Der Topo TA Cloning Kit enthält einen linearisierten Vektor mit angehängter Topoisomerase. Zur Integration des PCR Produkts in den Vektor genügt somit die Addierung der beiden Komponenten in geeignetem Milieu (siehe 2.2.2).

Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurde die aus Einzelkolonien gewonnene DNA mit Restriktionsenzymen behandelt. Eine Schnittstelle wurde innerhalb des Vektors gewählt, die zweite innerhalb des einzuführenden SOCS-3 Gens. Somit lassen sich auf der nachfolgenden Gel-Elektrophorese nur zwei Banden erkennen, wenn die Klonierung erfolgreich war. Zu diesem Zweck wurden die Enzyme Hind3 und Sma1 verwendet. Die Größe der DNA Bruchstücke von ca. 300bp und ca. 4300bp stimmen mit der vorher berechneten Größe der zu erwartenden Banden überein (siehe Abb. 6a).



Direkt an der Klonierungsstelle befinden sich im Topo Vektor zwei EcoR1 Schnittstellen, zum Entfernen des Inserts. Dies eignet sich zum Einbau in den pCI-neo Vektor, der nach seinem Promoter ebenso einen einzelnen Angriffspunkt für dieses Enzym besitzt. Es wurde ausreichend TOPO Plasmid mit integriertem SOCS-3 mit EcoR1 inkubiert, ebenso der pCI Vektor, um den Ring zu öffnen und den Einbau zu ermöglichen. Mittels Gelextraktion wurde spezifisch der SOCS-3 Genabschnitt gewonnen (siehe Abb. 6b) und zur Ligation mit dem behandelten pCI Plasmid verwendet.

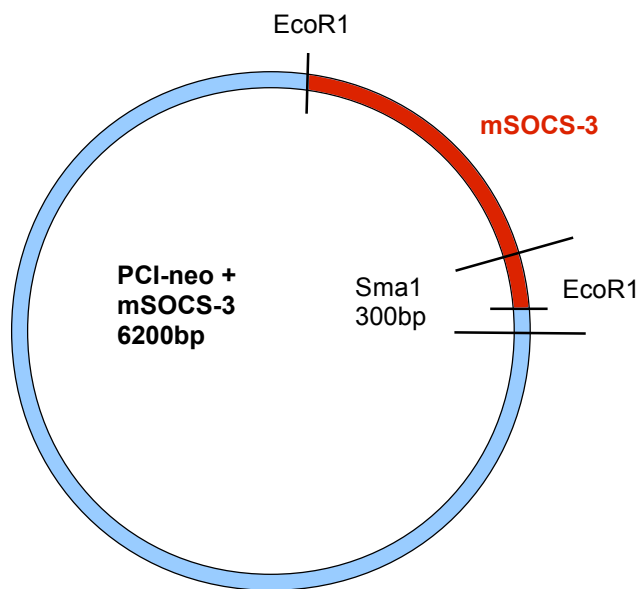
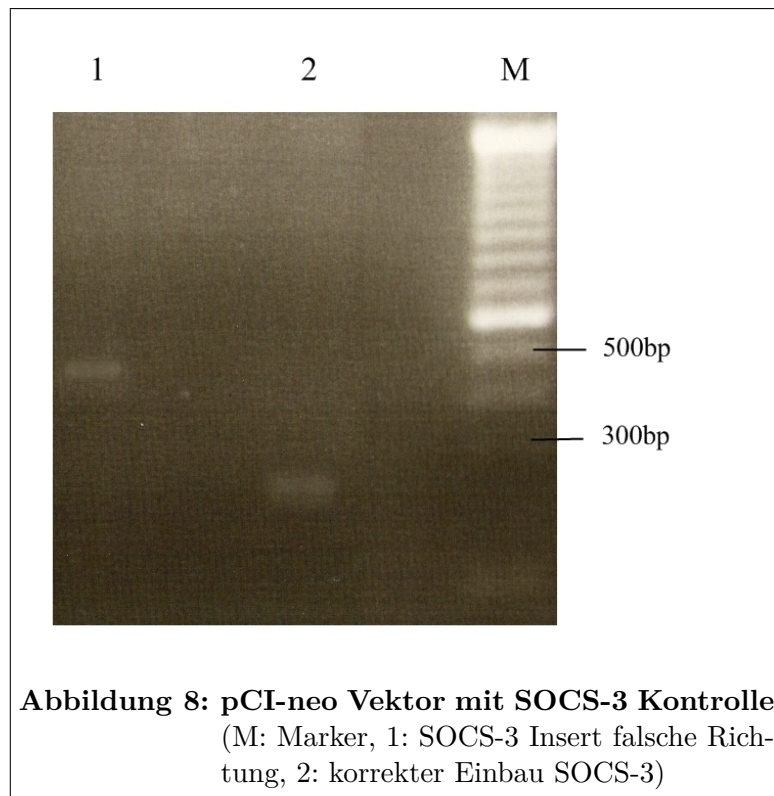


Abbildung 7: pCI-neo Vektor mit SOCS-3 Insert

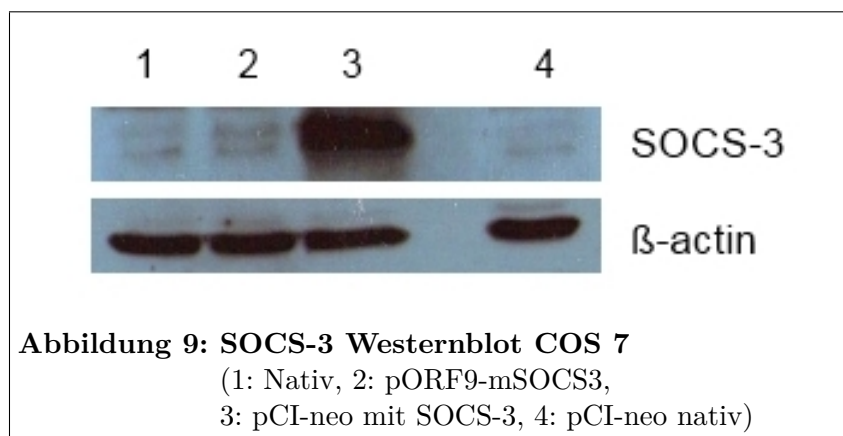
Die Kontrolle der Ligation erfolgte wieder mit Hilfe von Restriktionsenzymen, in diesem Falle Sma1, da es sowohl auf dem Vektor, als auch im Insert nur einmal schneidet (siehe Abb. 7). Dies ist in diesem Falle wichtig, da hiermit überprüft werden kann, ob das SOCS-3 Gen in der richtigen Richtung eingebaut ist. Der kleinere DNA Abschnitt der zwei zu erwartenden Banden in der Gel-Elektrophorese muss hier ca. 300bp groß sein, und nicht ca. 500bp (siehe Abb. 7, 8). Anschließend wurde das hergestellte Plasmid noch sequenziert. Hierzu wurde es mit den beiden

Primern T7EEV und T3 der Firma Geneart geschickt. Das Ergebnis der Sequenzierung stimmte mit den bereitgestellten Daten des pORF9-mSOCS3 Vektors überein.



3.3 Nachweis der SOCS-3 Synthese mittels Westernblot

Um nachzuweisen, dass das SOCS-3 Gen im hergestellten Plasmid durch den CMV Promotor *in vitro* exprimiert wird, wurden COS7 Zellen damit transient transfiziert. Hierfür wurde TransIT LT1 verwendet. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und deren Proteine gewonnen. In einem Westernblot wurden jeweils 20 μ g der Proben verwendet und mit Antikörper gegen SOCS-3 von Acris behandelt.



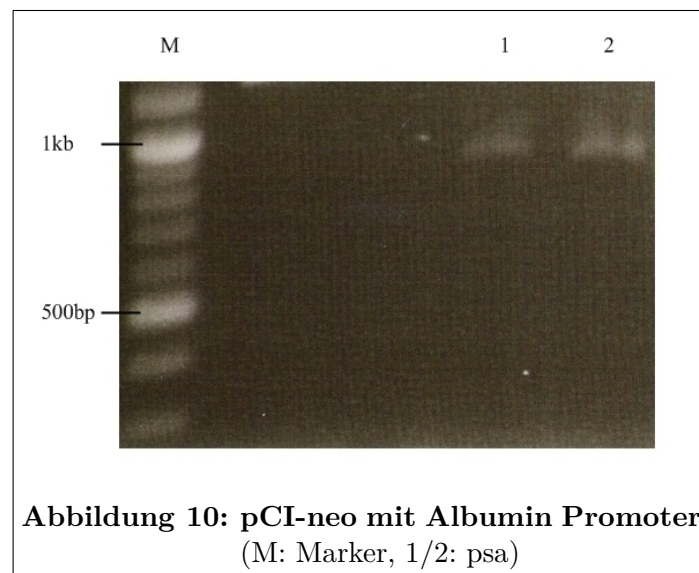
Es konnte hier gezeigt werden, dass das Protein spezifisch in mit SOCS-3 Gen enthaltenen Plasmiden transfizierten Zellen vorhanden war, wohingegen nicht in unbehandelten Zellen, sowie nicht in Zellen, die nur mit dem nativen pCI-neo Vektor ohne Einbau des SOCS-3 Gens versehen wurden (siehe Abb. 9).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression in COS7 Zellen mit dem selbst hergestellten pCI-neo Vektor mit CMV Promotor im Vergleich zu dem ursprünglichen pORF9-mSOCS3 Plasmid verstärkt war.

3.4 Einbau des leberzellspezifischen Albumin Promotors

Der auf dem pCI-neo Vektor vorhandene CMV Promotor ist ubiquitär in Zellen vorhanden und auch aktiv. Eine gewebsspezifische Genexpression ist damit nicht möglich. Um jedoch den Einfluss von SOCS-3 nur in Leberzellen zu untersuchen und äußere Einflüsse zu verhindern, wurde der ursprünglich vorhandene Promoter mit Restriktionsendonukleasen und einer DNA Ligase enzymatisch durch einen Albumin Promotor ersetzt. Dieser ist spezifisch für Leberzellen.

Der korrekte Einbau des Promoters wurde durch einen Enzymverdau mit EcoR1 überprüft. Das erwartete Ergebnis der kleineren DNA Bande von ca. 950bp konnte bei der Gel-Elektrophorese bestätigt werden (siehe Abb. 10).



Das jetzt entstandene Plasmid wird in Abb. 11 als Schema gezeigt.

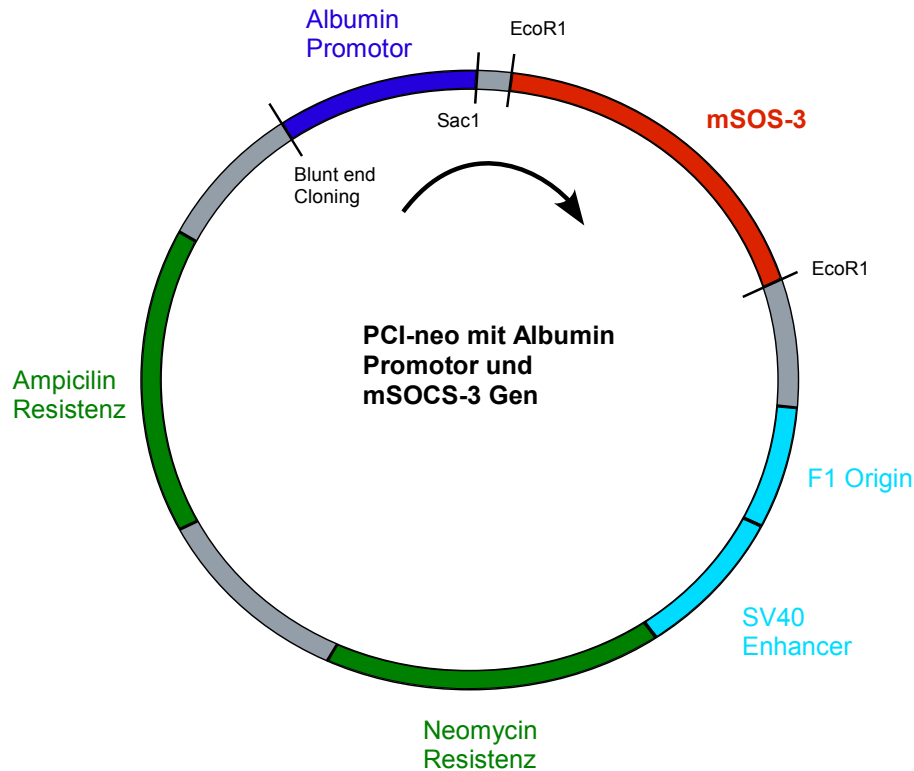
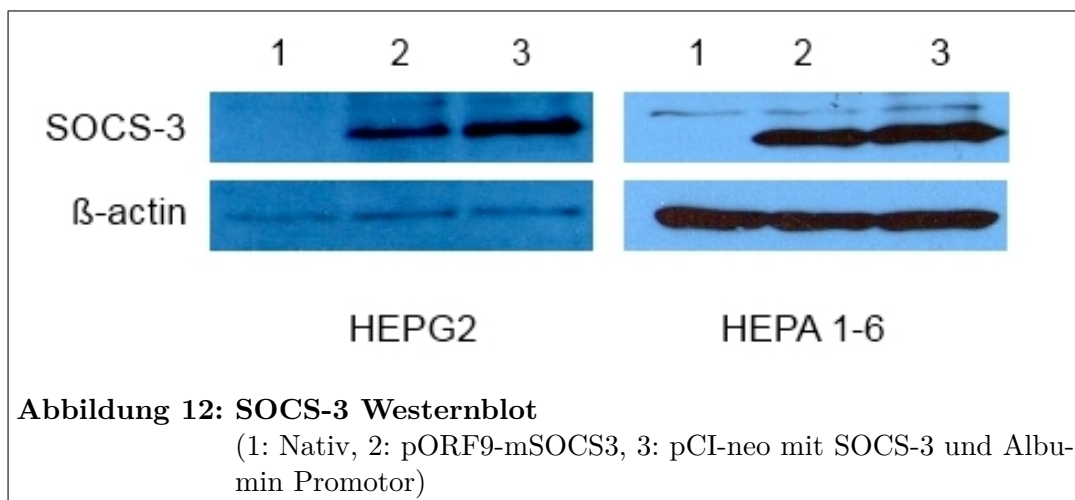


Abbildung 11: Fertiges Plasmid

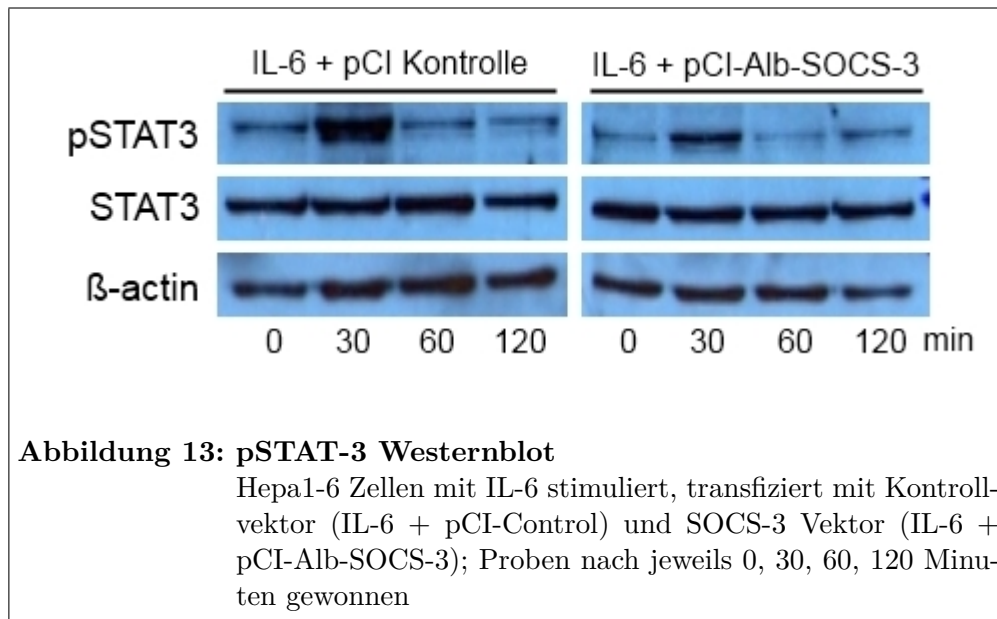
3.5 Nachweis von SOCS-3 in Leberzellen

Die Funktionalität des Albumin Promotors wurde in den Leberzellen HepG2 und Hepa 1-6 mittels Westernblot nachgewiesen (siehe Abb. 12). In diesen Leberzellen scheint die Genexpression hierbei gegenüber dem CMV Promoter gesteigert zu sein.



3.6 Wirkung der SOCS-3 Überexpression auf STAT-3

Dass SOCS-3 vermehrt in Zellen vorliegt, die mit dem SOCS-3 Vektor transfiziert waren, und dass die eingeschleuste DNA funktionell ist, konnte bereits gezeigt werden. Ob das vermehrte Vorliegen des Proteins in Hepa1-6 Leberzellen auch Auswirkung auf den zu regulierenden Transkriptionsfaktor STAT-3 hat, konnte sowohl im Westernblot, als auch mit Hilfe des Colorimetric Kit gezeigt werden.



Sowohl in der Kontrolle, die nur mit dem nativen pCI-neo Vektor ohne Einbau des SOCS-3 Gens versehen wurde, als auch in SOCS-3 transfizierten Zellen konnte nach Stimulation mit IL-6 ein Anstieg von pSTAT-3 im Westernblot nachgewiesen werden. In der Kontrolle war die pSTAT-3 Konzentration jedoch deutlich höher, als in den Zellen, in denen vermehrt vorliegendes SOCS-3 der Phosphorylierung entgegenwirkt. Ebenso scheinen der Ausgangswert und damit auch der Wert nach Rückgang der pSTAT-3 Spiegel im Gegensatz zu den Kontrollzellen im Westernblot vermindert zu sein (siehe Abb. 13).

Das durch den Westernblot erhaltene Ergebnis, dass das vermehrt vorliegende Protein SOCS-3, in mit SOCS-3 Vektor transfizierten Zellen, die Phosphorylierung von STAT-3 im Vergleich zur Kontrolle deutlich mindert, wurde mithilfe des Colorimetric Kit überprüft. Da dieser auf einem anderen Detektionsverfahren beruht, sind die Ergebnisse verständlicherweise nicht identisch, aber das Resultat ähnlich. Während die Bindungskapazität von pSTAT-3 sich in den Zellen mit erhöhtem SOCS-3 nicht ändert, so ist in der Kontrolle ein starker Anstieg zu sehen. Daraus lässt sich folgern, dass SOCS-3 die Aktivierung von STAT-3 erheblich mindert (siehe Tabelle 6, Abb. 14).

IL-6 Stimulation (min)	SOCS-3 Vektor	Kontrollvektor
0	324	260
30	322	260
60	271	236
120	256	1251

Tabelle 6: pSTAT-3 Bindungskapazität

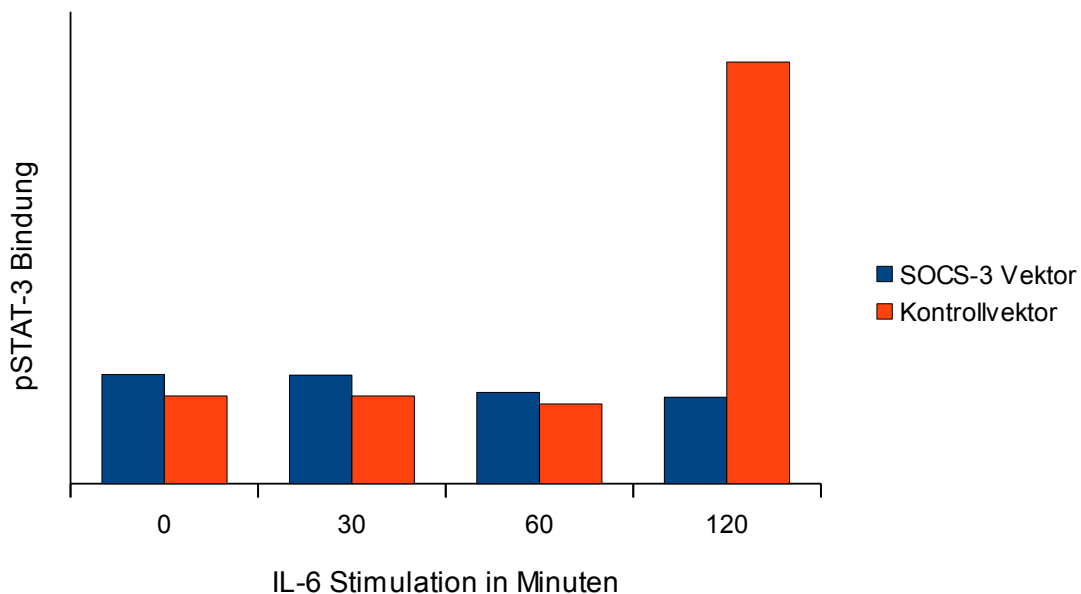


Abbildung 14: pSTAT-3 Bindungskapazität

3.7 Wirkung der SOCS-3 Überexpression auf die Zellproliferation

Die Tatsache, dass eine SOCS-3 Überexpression mit Hilfe des pCI-Alb-SOCS-3 Vektors supprimierend auf die Phosphorylierung von STAT-3 wirkt, beweist noch keine Auswirkung auf das Wachstum von Zellen. Deshalb wurde die Proliferation von Hepa 1-6 Zellen unter IL-6 Stimulation nach Transfektion der Zellen mit den verschiedenen Vektoren mittels Durchflusszytometrie untersucht (siehe 2.2.5). Während ohne IL-6 Stimulation nur ein geringer Proliferationsindex vorgefunden wurde, so konnte nach Stimulation ein erhöhter Index gezeigt werden. Dies entspricht der erwarteten Wirkung des verwendeten Interleukins. In Zellen, die mit dem SOCS-3 tragenden Vektor

transfiziert wurden und somit vermehrt SOCS-3 produzieren, stieg der Marker des Zellwachstums im Vergleich deutlich geringer an (siehe Abb. 15).

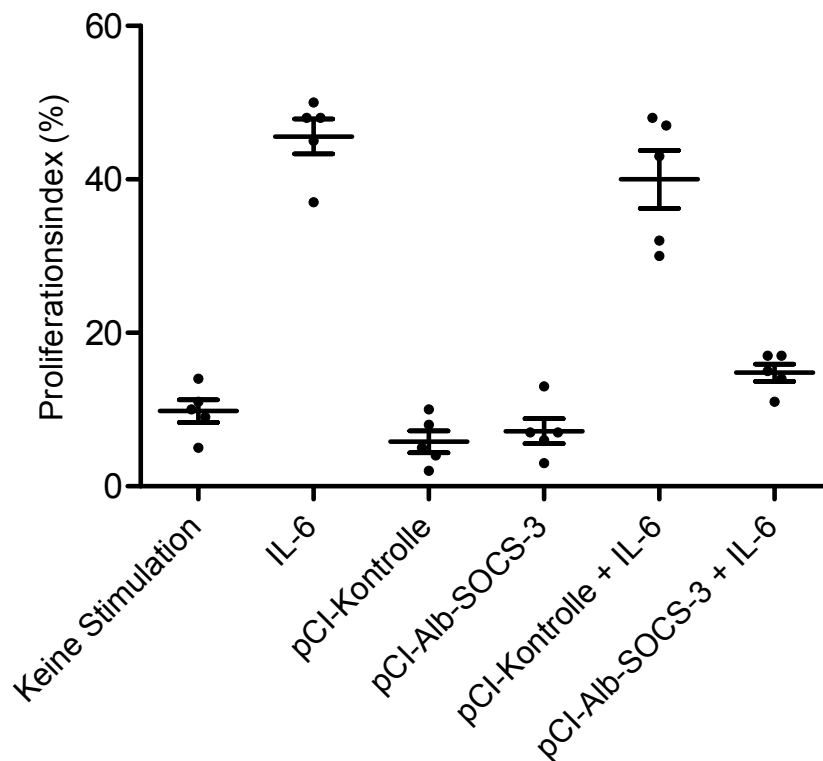


Abbildung 15: Zellproliferation ohne und mit IL-6 Stimulation

Eine Steigerung der Proliferationsrate der Zellen unter IL-6 Stimulation ist zu erwarten, was durch die nativen Hepa 1-6 Zellen belegt wird. Die mit dem Kontrollvektor (pCI) transfizierten Zellen verhalten sich sehr ähnlich und werden auch zum Wachstum angeregt. Die Zellen, die SOCS-3 überexprimieren zeigen im Vergleich auch unter Stimulation einen nur geringen Anstieg der Proliferationsrate. Dies ist auf die regulatorische Wirkung von SOCS-3 auf STAT-3, welches angeregt von IL-6 proliferativ wirkt, zurückzuführen.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass der hergestellte pCI-Alb-SOCS-3 Vektor, welcher spezifisch in Hepatozyten abgelesen wird, einen Einfluss auf das durch IL-6 angeregte Wachstum hat. Diese Wirkung entsteht auf Grund der Interaktion des SOCS-3 Proteins mit dem Transkriptionsfaktor STAT-3. Dessen proliferative und damit auch potenziell kanzerogene Aktivität kann durch vermehrte SOCS-3 Produktion reduziert werden.

4 Diskussion

Entzündliche Prozesse im menschlichen Körper sind immer wieder mit Tumorentstehung assoziiert, sodass es nahe liegt malignes Wachstum mit antiinflammatorischen Medikamenten zu reduzieren. Mehrere Studien konnten belegen, dass die langfristige Einnahme von nicht steroidalen Antirheumatika (sogenannte NSARs), darunter auch Aspirin, die Inzidenz diverser Krebsarten verringert. Dazu gehören Tumore des Kolons, Magens, Speiseröhre und Hodgkin Lymphome [113–116]. Auch wenn diese Ergebnisse noch nicht zu einer Empfehlung zur prophylaktischen Einnahme von Aspirin geführt haben, unter anderem weil etwaige Nebenwirkungen hier nicht berücksichtigt sind, so zeigen diese Studien trotzdem den Zusammenhang zwischen malignem Wachstum und Entzündungen und dass Krebsprävention oder Bekämpfung auch über eine Verhinderung inflammatorischer Geschehnisse führen kann. Bei dieser Betrachtung spielt STAT-3, und dabei vor allem die Signalübertragung der Zytokine der IL-6 Familie, eine entscheidende Rolle. Dies ist nicht nur der Fall bei der Entstehung von entzündlich verursachten Tumoren, sondern darüber hinaus bei Aufrechterhaltung und Fortschreiten malignen Wachstums. Hier sind nicht nur die neoplastischen Zellen von Bedeutung, sondern auch tumorassoziierte Immunzellen, die Einfluss auf die Progression transformierten Gewebes nehmen. Damit bietet sich besonders bei diesem Signalweg ein Angriffspunkt für Prävention oder sogar Behandlung von Krebs, vor allem wenn dieser auf Basis von chronisch-entzündlichen Erkrankungen entsteht, wie etwa bei Colitis ulcerosa und kolorektalem Karzinom.

4.1 STAT-3

STAT-3 und NF- κ B gehören zu den Signalvermittlern, deren DNA als Onkogene häufig in malignen Zellen aktiviert sind [74, 76, 79, 117, 118]. Während STAT-3 als alleinig kanzerogen gilt, zeigt NF- κ B sowohl tumorfördernde als auch antitumorale Eigenschaften (siehe 1.4.4). Der Versuch NF- κ B therapeutisch zu inhibieren, um Einfluss auf das Entstehen und Wachstum von Neoplasien zu nehmen, schränkt somit auch die antitumorale Fähigkeiten des Transkriptionsfaktors ein und könnte sogar die Progression von malignen Zellen fördern. Mehrfach konnte bereits gezeigt werden, dass das genetische Ausschalten von STAT-3 in malignen Zellen oder tumorassoziierten Immunzellen die Kar-

zinogenese und das Wachstum vorhandener Neoplasien hemmt [12, 39, 77, 105, 119, 120]. Es gibt verschiedene Arten von Hemmstoffen, die auf STAT-3 wirken. Es sind Peptide oder Moleküle, die die zur Signalweiterleitung essenzielle Dimerisation an der SH2-Domäne von STAT-3 unterbinden [121, 122] und zusätzlich die Aktivität als Transkriptionsfaktor reduzieren [123, 124], oder bereits bekannte therapeutisch genutzte Stoffe, wie Platinverbindungen [125]. Nicht nur theoretisch und praktisch unterbinden diese die Wirkung von STAT-3, sondern zeigen auch funktionelle Auswirkungen auf verschiedene neoplastische Zellen. Unter anderem malignes Gewebe der Maus und des Menschen aus der Brust, der Lunge und des Dickdarms zeigt unter Behandlung mit diesen STAT-3 Inhibitoren einen Wachstumsstopp und Apoptose der betroffenen Tumorzellen [122–125]. Alternative Wege den Transkriptionsfaktor zu blockieren, wie Oligonukleotide und nicht künstliche Moleküle, zeigen ähnliche Erfolge [120, 126]. Der direkte Zusammenhang von Tumorentstehung, Progression der Erkrankung und Entzündung im umliegenden Gewebe konnte auch darin gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von STAT-3 in tumorassoziierten Immunzellen zu einer antitumoralen Antwort führte, anstelle der häufig vorhandenen kanzerogenen Aktivität [127].

Länger andauerndes und komplettes Fehlen von STAT-3 führt bei Mäusen zu Autoimmunität, auch bei Menschen mit Hyper-IgE Syndrom konnte ein Zusammenhang zwischen einer genetischen Aberration von STAT-3 und der Krankheit festgestellt werden. Dies zeigt, dass das endgültige Ausschalten der Signaltransduktion schwere unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringt, jedoch offenbart sich ein therapeutischer Ansatz, der, wenn das Eingreifen in die STAT-3 Signalweiterleitung zeitlich oder auch in der Ausprägung begrenzt ist, tumorfördernde Entzündungen zu antitumoralen Antworten verändern kann, ohne normale Körperfunktionen gravierend zu beeinträchtigen.

4.2 SOCS-3

Neben den genannten Möglichkeiten existiert jedoch auch ein physiologischer und relativ spezifischer STAT-3 Regulator, nämlich SOCS-3. Er wird ebenso über den JAK/STAT Signalweg aktiviert und führt zu einer Limitierung desselben (siehe 1.2). An diesem Punkt anzusetzen und eine übermäßige STAT-3 Aktivierung durch Stimulation des Gegenspielers SOCS-3 zu verhindern, könnte ein physiologischer Weg zur Verhinderung von Entzündungen und Tumoren sein.

Niedrige SOCS-3 Proteinspiegel können in mehreren Krebsarten gefunden werden und diese scheinen auch Auswirkung auf die Prognose der Erkrankung zu haben und in Modellen das Tumorwachstum begünstigen (siehe 1.4.6). In HCC sowie Cholangiokarzinom Zellen spielt der über IL-6 aktivierte JAK/STAT-3 Signalweg eine wichtige Rolle [105, 107, 108]. Bei diesen Pathologien konnte häufig die Hypermethylierung eines

SOCS-3 Promoters, und auch anderer Inhibitoren einer Zytokinantwort, festgestellt werden, was zu einer verringerten Produktion des Proteins führt. Eine Folge hieraus ist die stärkere und länger andauernde Phosphorylierung von STAT-3, das somit eine vermehrte Aktivität als Transkriptionsfaktor für wachstumsfördernde und antiapoptotische Gene zeigt. Wird hierbei die SOCS-3 Menge in der Zelle erhöht, durch demethylierende Stoffe oder exogene Zufuhr des Proteins, so zeigt sich nicht nur eine verringerte Konzentration und geringere Lebensdauer von phosphoryliertem STAT-3 [78], sondern in der Folge auch verringertes Wachstum und verstärkte Apoptose der Tumorzellen [103, 105]. Auch in malignem Lungengewebe konnte eine Hypermethylierung von SOCS-3 Promoterregionen nachgewiesen werden, weshalb in diesen Zellen im Vergleich dieses Protein weniger exprimiert wird [101]. Wiederherstellung der SOCS-3 Produktion führt nicht nur zu einer Reduktion an vorliegendem aktiven STAT-3, sondern darüber hinaus auch zu verstärkter Apoptose und damit zu einer Hemmung des Wachstums der Zellen [101]. Desweiteren konnte in intestinalen Epithelzellen gezeigt werden, dass fehlendes SOCS-3 in einem Modell für chronisch entzündliche Darmkrankheiten akut zu vermehrter Proliferation und Hyperplasie und langfristig zu vermehrter Tumorentstehung und zu stärkerem malignen Wachstum führt [128]. Hierbei spielt die von IL-6 vermittelte Aktivierung von STAT-3 eine große Rolle (siehe 1.4.5). Therapeutisch interessant ist die Tatsache, dass eine Überexpression von SOCS-3 das basale Wachstum von neoplastischen wie auch gesunden Zellen verhindern kann und somit antiproliferativ und damit potentiell antitumoral wirken kann [128].

Es gibt noch weitere Hinweise auf eventuelle therapeutische Anwendungen von SOCS-3 bei Krebserkrankungen. So führt eine exogene SOCS-3 Zufuhr bei Schilddrüsenkarzinomen, deren Konzentration des Proteins in der Zelle verringert ist, in vivo nicht nur zu einer Reduktion des Wachstums, sondern auch zur Sensibilisierung des malignen Gewebes gegenüber einer Chemotherapie [129]. In Versuchen mit Brustkrebszellen zeigte eine Erhöhung von SOCS-1 und vor allem SOCS-3, durch einen aus Pflanzen gewonnen sekundären Inhaltsstoff, eine deutliche Reduktion der Proliferation und erhöhte Apoptose der neoplastischen Zellen [130]. Diese apoptosefördernde und antiproliferative Wirkung in den Tumorzellen konnte sogar in vivo bei Mäusen beobachtet werden [130]. Entzündliche Prozesse, wie bei *Helicobacter pylori* Infektionen, und maligne Erkrankungen des Magens sind eng miteinander verknüpft. Mäuse, denen die Fähigkeit fehlt den JAK/STAT Signalweg über gp130 durch SOCS-3 zu regulieren, zeigen chronische Magenentzündungen und werden als Modell für gastrische Karzinome verwendet [73]. Erhöhung der Zellkonzentration von SOCS Proteinen, SOCS-2 und SOCS-3, kann zur Reduktion der Entzündungsmediatoren führen und antiinflammatorisch wirken. Da damit manchen Krebsarten im Magengewebe entzündliche Vorgänge als Entstehungsgrundlage genommen wird, kann dieser Mechanismus antitumoral wirken [131].

Der Einfluss von STAT-3 auf eine Vielzahl von Pathologien, vor allem neoplastischer Art, wurde bereits in Studien von vielen Seiten beleuchtet, ebenso etwaige therapeutische Ansätze. SOCS-3 als Suppressor einer Zytokinantwort und natürlicher Inhibitor von pSTAT-3 und damit seiner Rolle in der Entstehung oder Aufrechterhaltung einer Dysregulation des Transkriptionsfaktors wurde dagegen bis jetzt weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Wie bereits dargestellt, gibt es jedoch deutliche Hinweise darauf, dass dieses Protein vor allem bei malignen Erkrankungen großen Einfluss besitzt (siehe 1.4.6, 4.2). Mit dem im Zuge dieser Arbeit hergestellten SOCS-3 Vektor kann seine Bedeutung in verschiedenen Vorgängen, hauptsächlich in Lebergewebe, weiter differenziert und herausgehoben werden. Hierbei ist vor allem der Mechanismus von entzündlichen Prozessen im Zusammenhang mit Tumoren zu erwähnen, jedoch auch physiologische Vorgänge, wie die enorme hepatozelluläre Regenerationsfähigkeit. Wie in Ansätzen bereits gezeigt, besitzt SOCS-3 das Potential für eine Prophylaxe oder therapeutische Eingriffe in entzündliche oder maligne Erkrankungen. Ob dies auch beim Menschen unter Berücksichtigung der möglichen Nebenwirkungen Anwendung finden kann, ist abhängig vom Verständnis der Vorgänge auf molekularem Level, wozu dieser Vektor in weiteren Studien führen kann.

4.3 Weiterführende Studien

Anhand dieses Vektors kann in weiterführenden Studien die Rolle von SOCS-3 in lebereigenen Tumoren detaillierter untersucht werden. Metastasen kolorektaler Karzinome in der Leber können hierbei als Kontrolle genutzt werden, da diese im Gegensatz zu hepatozellulären Neoplasien den Albumin Promoter, der auf dem hergestellten Vektor vorhanden ist, nicht ansprechen. Zur Induktion eines HCC im Tiermodell steht eine gut untersuchte Methode mittels N-nitrosodiethylamine (DEN) und Phenobarbital zur Verfügung [132]. Kolorektale Lebermetastasen können durch eine intraportale oder intrasplenische Gabe von Tumorzellen wie CT26 erzeugt werden.

Zur weiteren Aufklärung der Rolle von SOCS-3 bei lebereigenen Tumoren kann nun das in dieser Arbeit erstellte Plasmid über virale Vektoren in Zellen eingebracht werden. Da das SOCS-3 Gen darauf abhängig von einem Albumin Promoter ist, wird das Gen nur von Leberzellen abgelesen und nur dort das dazu gehörende Protein exprimiert. Wie in 1.2 dargestellt wird eine verringerte STAT-3 Aktivität erwartet und damit die Entstehung hepatozellulärer Karzinome verhindert oder reduziert, wohingegen die Ausbildung kolorektaler Lebermetastasen davon unverändert sein sollte.

Dieser Ansatz kann zeigen, ob eine erniedrigte Aktivität von SOCS-3 im HCC eine notwendige Voraussetzung zur Entstehung der Tumore ist.

5 Zusammenfassung

Entzündungsvorgänge spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Entstehung und der Aufrechterhaltung malignen Wachstums. Besonders IL-6 und seine Signalübertragung mittels der JAK-STAT-3 Kaskade sind in vielen Tumorentitäten dysreguliert. Der hierbei vermehrt aktivierte Transkriptionsfaktor STAT-3 nimmt eine Schlüsselrolle ein bei der Vermittlung maligner Eigenschaften wie Apoptoseresistenz und gesteigerte Proliferation. SOCS-3 ist ein natürlicher Inhibitor dieses Signalwegs. Eine Methylierung seiner Genregion und damit eine verringerte Aktivität dieses Proteins konnte unter anderem im hepatozellulären Karzinom nachgewiesen werden. Erhöhte SOCS-3 Konzentrationen führen zu reduziertem Wachstum und verstärkter Apoptose von Tumorzellen.

Die vorliegende Promotion hat das Ziel, ein Plasmid mit leberzellspezifischer SOCS-3 Expression herzustellen und dessen Funktionalität *in vitro* nachzuweisen. Dies kann in Folge dazu dienen, die Funktion von SOCS-3 bei der Entstehung des HCC zu entschlüsseln und mögliche therapeutische Ansätze aufzuzeigen.

Das SOCS-3 Gen wurde mittels einer PCR vervielfältigt und dieser DNA Abschnitt in einen CMV Promoter tragenden Vektor überführt. Die Vollständigkeit und Expression von der Genregion und damit die Funktionalität des Plasmids konnte durch Gensequenzanalyse und Westernblot verifiziert werden. Der anschließende Austausch der Promoterregion führt zur Spezifität des Vektorproteins bezüglich Leberzellen, da nur in diesen der Albumin Promoter aktiviert wird. Damit transfizierte HepG2 und Hepa 1-6 Zellen zeigen im Westernblot im Gegensatz zu nativen Zellen deutlich erhöhte SOCS-3 Proteinmengen.

Als Funktionsanalyse des modifizierten Vektors fungierten nach Stimulation mit IL-6 ein pSTAT-3 Westernblot und eine pSTAT-3 Bindungskapazitätsmessung. Eine nach Stimulation gemessene erniedrigte pSTAT-3 Proteinmenge und eine verringerte pSTAT-3 Bindungskapazität in mit dem hergestellten Plasmid transfizierten Zellen entsprechen der erwarteten Wirkung vermehrt vorliegenden SOCS-3, das als natürlicher Inhibitor des JAK-STAT-3 Signalweges wirkt.

Die Wirkung von SOCS-3 über die molekulare Ebene hinaus konnte im Vergleich der DNA Synthese und damit der Proliferation der Zellen gezeigt werden. Das Wachstum mit dem SOCS-3 tragenden Vektor transfizierter Zellen nach IL-6 Stimulation ist im Vergleich zu nativen Zellen deutlich verringert. Der proliferative Effekt von IL-6 und

dessen nachfolgendem Signalweg über STAT-3 kann durch vermehrte SOCS-3 Expression effektiv gehemmt werden.

Mit Vorliegen dieses Vektors können weiterführende in vivo Experimente durchgeführt werden, die die Rolle und den Einfluss von SOCS-3 auf Lebertumormodelle in Mäusen untersuchen. Dies trägt nicht nur zum Verständnis der Vorgänge auf molekularer Ebene jener malignen Erkrankung bei, sondern kann mögliche therapeutische Ansätze aufzeigen.

6 Summary

Inflammation is one of the main factors for developing and maintaining malignant growth. Especially IL-6 and its signalling pathway including the JAK-STAT-3 cascade are dysregulated in many tumor entities. Hereby the transcription factor STAT-3 plays a key role communicating malignant features like resistance to apoptosis and enhanced proliferation. SOCS-3 is a natural inhibitor of this signalling pathway. Reduced activity of this protein by DNA methylation was found among others in hepatocellular carcinoma. In contrast increased SOCS-3 concentrations reduce growth and promote apoptosis in cancer cells.

The goal of this study was to create a plasmid expressing SOCS-3 exclusively in liver cells and to prove its functionality *in vitro*. Subsequently this can help to clarify the significance of SOCS-3 in the formation of the HCC and to identify possible therapies. Using PCR the SOCS-3 gene was cloned and transferred to a CMV promoter carrying vector. The integrity and expression of the obtained DNA was verified by gene sequence analysis and westernblot. The following change of the promoter region lead to an exclusive expression in liver cells, because solely those activate the albumin promoter. HepG2 and Hepa 1-6 cells transfected with this vector showed a significant elevation of the SOCS-3 protein compared to native cells.

After cell stimulation with IL-6 a pSTAT-3 westernblot and a pSTAT-3 binding capacity analysis proved the functionality of the modified vector. Reduced amount of pSTAT-3 protein and binding capacity after stimulation in transfected cells containing the created plasmid correspond to the expected effect of increased SOCS-3 levels, which is a natural inhibitor of the JAK-STAT-3 signalling pathway.

The effect of SOCS-3 above the molecular level could be shown in the comparison of DNA synthesis and thus proliferation of cells. After stimulation with IL-6 growth of cells carrying the SOCS-3 vector was significantly reduced compared to native cells. The proliferative effect of IL-6 and its subsequent signalling pathway via STAT-3 could effectively be inhibited by an increased SOCS-3 expression.

With this vector further studies can be performed in order to examine the influence of SOCS-3 in liver tumor models in mice. This not only leads to a more detailed understanding of the molecular interactions of this malignancy but furthermore can identify possible therapies.

7 Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl	B-cell-lymphoma
BSA	Bovines Serumalbumin
CIS	Cytokine-inducible SH2-domain
CMV	Zytomegalievirus
CRC	Kolorektales Karzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli Bakterium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAS	Fibroblast-associated
gp	Glykoprotein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HRP	Horse raddish peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
JAK	Januskinase
KIR	Kinase inhibitory region
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NF	Nuclear factor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
SH2	Src Homologie 2
sIL-6R	Löslicher Interleukin-6 Rezeptor
SOCS	Suppressor of cytokine signalling
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TGF	Transforming growth factor
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

8 Abbildungsverzeichnis

1	IL-6/IL6-R Komplex und Transsignalling	4
2	Schema der JAK/STAT Signalkaskade	5
3	Zusammenspiel von Tumorzellen und immunologischen Zellen im umgebenden Gewebe	13
4	Positive Rückkopplung STAT-3	17
5	Kontrolle PCR	40
	(a) Enzymverdau pORF9 Vektor	40
	(b) Gel-Elektrophorese PCR	40
6	Kontrolle Topo Vektor	41
	(a) Enzymverdau Topo Vektor	41
	(b) SOCS-3 aus Topo Vektor	41
7	pCI-neo Vektor mit SOCS-3 Insert	42
8	PSA Vektor	43
9	SOCS-3 Westernblot COS 7	43
10	pCI-neo mit Albumin Promoter	44
11	Fertiges Plasmid	45
12	SOCS-3 Westernblot HepG2, Hepa 1-6	45
13	pSTAT-3 Westernblot Hepa1-6	46
14	pSTAT-3 Bindungskapazität	47
15	Zellproliferation unter IL-6 Stimulation	48

9 Literaturverzeichnis

- [1] Coussens, L. M. and Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860–867.
- [2] Balkwill, F., Charles, K. A., and Mantovani, A. (2005) Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7, 211–217.
- [3] Brenner, H., Rothenbacher, D., and Arndt, V. (2009) Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol*, 472, 467–477.
- [4] Koike, K. (2007) Hepatitis c virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol*, 22 Suppl 1, S108–S111.
- [5] Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., and Schaper, F. (2003) Principles of interleukin (il)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374, 1–20.
- [6] Kishimoto, T. (1989) The biology of interleukin-6. *Blood*, 74, 1–10.
- [7] Aggarwal (1995) *Human cytokines: their role in disease and therapy*. Blackwell Science.
- [8] Snick, J. V. (1990) Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol*, 8, 253–278.
- [9] Scheller, J., Ohnesorge, N., and Rose-John, S. (2006) Interleukin-6 transsignalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol*, 63, 321–329.
- [10] Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/jak/stat pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2), 297–314.
- [11] Haga, S., et al. (2003) Stat3 protects against fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest*, 112, 989–998.
- [12] Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R. (2009) Stats in cancer inflammation and immunity: a leading role for stat3. *Nat Rev Cancer*, 9, 798–809.
- [13] Brigati, C., Noonan, D. M., Albini, A., and Benelli, R. (2002) Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis*, 19, 247–258.
- [14] Briscoe, J., Guschin, D., and Müller, M. (1994) Signal transduction. just another signalling pathway. *Curr Biol*, 4, 1033–1035.

- [15] Kovalovich, K., DeAngelis, R. A., Li, W., Furth, E. E., Ciliberto, G., and Taub, R. (2000) Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology*, 31, 149–159.
- [16] Kovalovich, K., Li, W., DeAngelis, R., Greenbaum, L. E., Ciliberto, G., and Taub, R. (2001) Interleukin-6 protects against fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins flip, bcl-2, and bcl-xl. *J Biol Chem*, 276, 26605–26613.
- [17] Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., DeAngelis, R. A., Ciliberto, G., Furth, E. E., Poli, V., and Taub, R. (1996) Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*, 274, 1379–1383.
- [18] Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E. (1994) Stat3: a stat family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264, 95–98.
- [19] Park, O. K., Schaefer, T. S., and Nathans, D. (1996) In vitro activation of stat3 by epidermal growth factor receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13704–13708.
- [20] Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.-N., Hong, F., and Gao, B. (2004) Interleukin 22 (il-22) plays a protective role in t cell-mediated murine hepatitis: Il-22 is a survival factor for hepatocytes via stat3 activation. *Hepatology*, 39, 1332–1342.
- [21] Waris, G., Huh, K. W., and Siddiqui, A. (2001) Mitochondrially associated hepatitis b virus x protein constitutively activates transcription factors stat-3 and nf-kappa b via oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 21, 7721–7730.
- [22] Fukada, T., Ohtani, T., Yoshida, Y., Shirogane, T., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998) Stat3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced g1 to s cell-cycle transition. *EMBO J*, 17, 6670–6677.
- [23] Sehgal, P. B., Wang, L., Rayanade, R., Pan, H., and Margulies, L. (1995) Interleukin-6-type cytokines. *Ann N Y Acad Sci*, 762, 1–14.
- [24] Hong, D. S., Angelo, L. S., and Kurzrock, R. (2007) Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer*, 110, 1911–1928.
- [25] Jones, S. A. (2005) Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for il-6. *J Immunol*, 175, 3463–3468.
- [26] Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., and Iwamatsu, A. (1986) Complementary dna for a novel human interleukin (bsf-2) that induces b lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324, 73–76.
- [27] Okada, M., Sakaguchi, N., Yoshimura, N., Hara, H., Shimizu, K., Yoshida, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, S., Yamamura, Y., and Kishimoto, T. (1983) B cell growth factors and b cell differentiation factor from human t hybridomas. two distinct kinds of b cell growth factor and their synergism in b cell proliferation. *J Exp Med*, 157, 583–590.

- [28] Butler, J. L., Falkoff, R. J., and Fauci, A. S. (1984) Development of a human t-cell hybridoma secreting separate b-cell growth and differentiation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 2475–2478.
- [29] Lotz, M., Jirik, F., Kabouridis, P., Tsoukas, C., Hirano, T., Kishimoto, T., and Carson, D. A. (1988) B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and t lymphocytes. *J Exp Med*, 167, 1253–1258.
- [30] Takai, Y., Wong, G. G., Clark, S. C., Burakoff, S. J., and Herrmann, S. H. (1988) B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic t lymphocytes. *J Immunol*, 140, 508–512.
- [31] Decker, K. (1995) *Cytokines and the Liver*. Kluwer Academic Publishers.
- [32] Helle, M., Brakenhoff, J. P., Groot, E. R. D., and Aarden, L. A. (1988) Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur J Immunol*, 18, 957–959.
- [33] Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T., and Kaziro, Y. (1988) Induction of neuronal differentiation in pc12 cells by b-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol*, 8, 3546–3549.
- [34] Spittler, A., Razenberger, M., Kupper, H., Kaul, M., Hackl, W., Boltz-Nitulescu, G., Függer, R., and Roth, E. (2000) Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin Infect Dis*, 31, 1338–1342.
- [35] Lam, H. S. and Ng, P. C. (2008) Biochemical markers of neonatal sepsis. *Pathology*, 40, 141–148.
- [36] Zimmers, T. A., McKillop, I. H., Pierce, R. H., Yoo, J.-Y., and Koniaris, L. G. (2003) Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology*, 38, 326–334.
- [37] Taub, R. (2003) Hepatoprotection via the il-6/stat3 pathway. *J Clin Invest*, 112, 978–980.
- [38] Jin, X., Zimmers, T. A., Zhang, Z., Peirce, R. H., and Koniaris, L. G. (2009) Interleukin-6 is an important in vivo inhibitor of intestinal epithelial cell death in mice. *Gut*, 2, 186–96.
- [39] Bollrath, J., et al. (2009) gp130-mediated stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*, 15, 91–102.
- [40] Grivennikov, S., et al. (2009) Il-6 and stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 15, 103–113.
- [41] Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007) Socs proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 7, 454–465.

- [42] Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J. A., and Yoshimura, A. (1999) 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*, 4, 339–351.
- [43] Yasukawa, H., et al. (2003) Il-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of socs3 in macrophages. *Nat Immunol*, 4, 551–556.
- [44] Kasmi, K. C. E., et al. (2006) General nature of the stat3-activated anti-inflammatory response. *J Immunol*, 177, 7880–7888.
- [45] Bode, J. G., Nimmesgern, A., Schmitz, J., Schaper, F., Schmitt, M., Frisch, W., Häussinger, D., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1999) Lps and tnfalpa induce socs3 mrna and inhibit il-6-induced activation of stat3 in macrophages. *FEBS Lett*, 463, 365–370.
- [46] Riehle, K. J., Campbell, J. S., McMahan, R. S., Johnson, M. M., Beyer, R. P., Bammler, T. K., and Fausto, N. (2008) Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3. *J Exp Med*, 205, 91–103.
- [47] Croker, B. A., et al. (2003) Socs3 negatively regulates il-6 signaling in vivo. *Nat Immunol*, 4, 540–545.
- [48] Murray, P. J. (2007) The jak-stat signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*, 178, 2623–2629.
- [49] Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G., Furlanetto, R. W., and Mooney, R. A. (2003) Suppressor of cytokine signaling-3 (socs-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*, 278, 13740–13746.
- [50] Sopasakis, V. R., Larsson, B.-M., Johansson, A., Holmäng, A., and Smith, U. (2004) Short-term infusion of interleukin-6 does not induce insulin resistance in vivo or impair insulin signalling in rats. *Diabetologia*, 47, 1879–1887.
- [51] Ueki, K., Kadowaki, T., and Kahn, C. R. (2005) Role of suppressors of cytokine signaling socs-1 and socs-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hepatol Res*, 33, 185–192.
- [52] Kanzler, S. and Galle, P. R. (2000) Apoptosis and the liver. *Semin Cancer Biol*, 10, 173–184.
- [53] Fausto, N., Campbell, J. S., and Riehle, K. J. (2006) Liver regeneration. *Hepatology*, 43, S45–S53.
- [54] Wuestefeld, T., Klein, C., Streetz, K. L., Betz, U., Lauber, J., Buer, J., Manns, M. P., Müller, W., and Trautwein, C. (2003) Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem*, 278, 11281–11288.

- [55] Cabibbo, G. and Craxì, A. (2010) Epidemiology, risk factors and surveillance of hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 14, 352–355.
- [56] Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010) Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138, 2101–2114.e5.
- [57] Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3, 991–998.
- [58] Ostrand-Rosenberg, S. and Sinha, P. (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*, 182, 4499–4506.
- [59] Hagemann, T. and Lawrence, T. (2009) Investigating macrophage and malignant cell interactions in vitro. *Methods Mol Biol*, 512, 325–332.
- [60] Zou, W. (2005) Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5, 263–274.
- [61] Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., and Ruco, L. (1992) The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*, 13, 265–270.
- [62] Colombo, M. P. and Trinchieri, G. (2002) Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 155–168.
- [63] Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. (2009) Tumor-associated macrophages (tam) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*, 86, 1065–1073.
- [64] Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*, 454, 436–444.
- [65] Zou, W. (2006) Regulatory t cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 6, 295–307.
- [66] Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B.-M., Tato, C., Yoshimura, A., Hennighausen, L., and O’Shea, J. J. (2006) Selective regulatory function of socs3 in the formation of il-17-secreting t cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 8137–8142.
- [67] Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y., Harris, T., Drake, C., Pardoll, D., and Yu, H. (2009) Regulation of the il-23 and il-12 balance by stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 15, 114–123.
- [68] Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I., and Akira, S. (1999) Enhanced th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10, 39–49.
- [69] Ho, H. H. and Ivashkiv, L. B. (2006) Role of stat3 in type i interferon responses. negative regulation of stat1-dependent inflammatory gene activation. *J Biol Chem*, 281, 14111–14118.

- [70] Schiechl, G., et al. (2011) Tumor development in murine ulcerative colitis depends on myd88 signaling of colonic f4/80+cd11b(high)gr1(low) macrophages. *J Clin Invest*, 121, 1692–1708.
- [71] Groblewska, M., Mroczko, B., Wereszczynska-Siemiakowska, U., Kedra, B., Lukaszewicz, M., Baniukiewicz, A., and Szmitkowski, M. (2008) Serum interleukin 6 (il-6) and c-reactive protein (crp) levels in colorectal adenoma and cancer patients. *Clin Chem Lab Med*, 46, 1423–1428.
- [72] Olcaydu, D., Harutyunyan, A., Jäger, R., Berg, T., Gisslinger, B., Pabinger, I., Gisslinger, H., and Kralovics, R. (2009) A common jak2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*, 41, 450–454.
- [73] Ernst, M., et al. (2008) Stat3 and stat1 mediate il-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *J Clin Invest*, 118, 1727–1738.
- [74] Yu, H. and Jove, R. (2004) The stats of cancer—new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*, 4, 97–105.
- [75] Grandis, J. R., Drenning, S. D., Chakraborty, A., Zhou, M. Y., Zeng, Q., Pitt, A. S., and Tweardy, D. J. (1998) Requirement of stat3 but not stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest*, 102, 1385–1392.
- [76] Yu, H., Kortylewski, M., and Pardoll, D. (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of stat3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*, 7, 41–51.
- [77] Catlett-Falcone, R., et al. (1999) Constitutive activation of stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human u266 myeloma cells. *Immunity*, 10, 105–115.
- [78] Isomoto, H., Mott, J. L., Kobayashi, S., Werneburg, N. W., Bronk, S. F., Haan, S., and Gores, G. J. (2007) Sustained il-6/stat-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to socs-3 epigenetic silencing. *Gastroenterology*, 132, 384–396.
- [79] Baud, V. and Karin, M. (2009) Is nf-kappab a good target for cancer therapy? hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*, 8, 33–40.
- [80] Lee, H., Herrmann, A., Deng, J.-H., Kujawski, M., Niu, G., Li, Z., Forman, S., Jove, R., Pardoll, D. M., and Yu, H. (2009) Persistently activated stat3 maintains constitutive nf-kappab activity in tumors. *Cancer Cell*, 15, 283–293.
- [81] Yoshimura, A. (2006) Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci*, 97, 439–447.
- [82] Wang, J., Wang, X., Hussain, S., Zheng, Y., Sanjabi, S., Ouaaz, F., and Beg, A. A. (2007) Distinct roles of different nf-kappa b subunits in regulating inflammatory and t cell stimulatory gene expression in dendritic cells. *J Immunol*, 178, 6777–6788.

- [83] Maini, R. N., et al. (2006) Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in european patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum*, 54, 2817–2829.
- [84] Gustot, T., Lemmers, A., Louis, E., Nicaise, C., Quertinmont, E., Belaiche, J., Roland, S., Gossum, A. V., Devière, J., and Franchimont, D. (2005) Profile of soluble cytokine receptors in crohn’s disease. *Gut*, 54, 488–495.
- [85] Ferrari, S. L. and Rizzoli, R. (2005) Gene variants for osteoporosis and their pleiotropic effects in aging. *Mol Aspects Med*, 26, 145–167.
- [86] Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., and Tanaka, H. (1988) Autocrine generation and requirement of bsf-2/il-6 for human multiple myelomas. *Nature*, 332, 83–85.
- [87] Hata, H., Xiao, H., Petrucci, M. T., Woodliff, J., Chang, R., and Epstein, J. (1993) Interleukin-6 gene expression in multiple myeloma: a characteristic of immature tumor cells. *Blood*, 81, 3357–3364.
- [88] Gaillard, J. P., Liautard, J., Klein, B., and Brochier, J. (1997) Major role of the soluble interleukin-6/interleukin-6 receptor complex for the proliferation of interleukin-6-dependent human myeloma cell lines. *Eur J Immunol*, 27, 3332–3340.
- [89] Gaillard, J. P., Bataille, R., Brailly, H., Zuber, C., Yasukawa, K., Attal, M., Maruo, N., Taga, T., Kishimoto, T., and Klein, B. (1993) Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur J Immunol*, 23, 820–824.
- [90] Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M.-J., Harousseau, J.-L., Bataille, R., and Amiot, M. (2002) Antisense strategy shows that mcl-1 rather than bcl-2 or bcl-x(1) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*, 100, 194–199.
- [91] Tu, Y., et al. (1998) Bcl-x expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res*, 58, 256–262.
- [92] Isaacs, K. L., Sartor, R. B., and Haskill, S. (1992) Cytokine messenger rna profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology*, 103, 1587–1595.
- [93] Reinecker, H. C., Steffen, M., Witthoeft, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R. P., and Raedler, A. (1993) Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, il-6, and il-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and crohn’s disease. *Clin Exp Immunol*, 94, 174–181.
- [94] Atreya, R., et al. (2000) Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses t-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*, 6, 583–588.

- [95] Ishiguro, Y. (1999) Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol*, 34, 66–74.
- [96] Atreya, R. and Neurath, M. F. (2005) Involvement of il-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol*, 28, 187–196.
- [97] Chung, Y.-C. and Chang, Y.-F. (2003) Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J Surg Oncol*, 83, 222–226.
- [98] Schneider, M. R., Hoefflich, A., Fischer, J. R., Wolf, E., Sordat, B., and Lahm, H. (2000) Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Lett*, 151, 31–38.
- [99] Becker, C., et al. (2004) Tgf-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of il-6 trans-signaling. *Immunity*, 21, 491–501.
- [100] Becker, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Lehr, H. A., Galle, P. R., Rose-John, S., and Neurath, M. F. (2005) Il-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle*, 4, 217–220.
- [101] He, B., You, L., Uematsu, K., Zang, K., Xu, Z., Lee, A. Y., Costello, J. F., McCormick, F., and Jablons, D. M. (2003) Socs-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14133–14138.
- [102] Nagai, H., Kim, Y. S., Lee, K. T., Chu, M. Y., Konishi, N., Fujimoto, J., Baba, M., Matsubara, K., and Emi, M. (2001) Inactivation of ssi-1, a jak/stat inhibitor, in human hepatocellular carcinomas, as revealed by two-dimensional electrophoresis. *J Hepatol*, 34, 416–421.
- [103] Niwa, Y., Kanda, H., Shikauchi, Y., Saiura, A., Matsubara, K., Kitagawa, T., Yamamoto, J., Kubo, T., and Yoshikawa, H. (2005) Methylation silencing of socs-3 promotes cell growth and migration by enhancing jak/stat and fak signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 24, 6406–6417.
- [104] Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G. S., Jackson, P., Groopman, J. D., Manning, J. E., Harris, C. C., and Herman, J. G. (2001) Socs-1, a negative regulator of the jak/stat pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet*, 28, 29–35.
- [105] Calvisi, D. F., Ladu, S., Gorden, A., Farina, M., Conner, E. A., Lee, J.-S., Factor, V. M., and Thorgeirsson, S. S. (2006) Ubiquitous activation of ras and jak/stat pathways in human hcc. *Gastroenterology*, 130, 1117–1128.
- [106] Ogata, H., Chinen, T., Yoshida, T., Kinjyo, I., Takaesu, G., Shiraishi, H., Iida, M., Kobayashi, T., and Yoshimura, A. (2006) Loss of socs3 in the liver promotes fibrosis by enhancing stat3-mediated tgf-beta1 production. *Oncogene*, 25, 2520–2530.

- [107] Ogata, H., et al. (2006) Deletion of the *socs3* gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 131, 179–193.
- [108] Isomoto, H., Kobayashi, S., Werneburg, N. W., Bronk, S. F., Guicciardi, M. E., Frank, D. A., and Gores, G. J. (2005) Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a *stat3* pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology*, 42, 1329–1338.
- [109] Liu, X. H., Xu, S. B., Yuan, J., Li, B. H., Zhang, Y., Yuan, Q., Li, P. D., Li, F., and Zhang, W. J. (2009) Defective interleukin-4/*stat6* activity correlates with increased constitutive expression of negative regulators *socs-3*, *socs-7*, and *cish* in colon cancer cells. *J Interferon Cytokine Res*, 29, 809–816.
- [110] Puhr, M., Santer, F. R., Neuwirt, H., Marcias, G., Hobisch, A., and Culig, Z. (2010) *Socs-3* antagonises the proliferative and migratory effects of fibroblast growth factor-2 in prostate cancer by inhibition of p44/p42 *mapk* signalling. *Endocr Relat Cancer*, 17, 525–538.
- [111] Martini, M., Pallini, R., Luongo, G., Cenci, T., Lucantoni, C., and Larocca, L. M. (2008) Prognostic relevance of *socs3* hypermethylation in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Cancer*, 123, 2955–2960.
- [112] Sasi, W., Jiang, W. G., Sharma, A., and Mokbel, K. (2010) Higher expression levels of *socs 1,3,4,7* are associated with earlier tumour stage and better clinical outcome in human breast cancer. *BMC Cancer*, 10, 178.
- [113] Wang, W. H., Huang, J. Q., Zheng, G. F., Lam, S. K., Karlberg, J., and Wong, B. C.-Y. (2003) Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1784–1791.
- [114] Chang, E. T., Zheng, T., Weir, E. G., Borowitz, M., Mann, R. B., Spiegelman, D., and Mueller, N. E. (2004) Aspirin and the risk of hodgkin’s lymphoma in a population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 96, 305–315.
- [115] Hur, C., Nishioka, N. S., and Gazelle, G. S. (2004) Cost-effectiveness of aspirin chemoprevention for barrett’s esophagus. *J Natl Cancer Inst*, 96, 316–325.
- [116] Chan, A. T., Giovannucci, E. L., Schernhammer, E. S., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Willett, W. C., and Fuchs, C. S. (2004) A prospective study of aspirin use and the risk for colorectal adenoma. *Ann Intern Med*, 140, 157–166.
- [117] Karin, M. and Greten, F. R. (2005) *Nf-kappab*: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 5, 749–759.
- [118] Darnell, J. E. (2002) Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2, 740–749.
- [119] Kortylewski, M., et al. (2005) Inhibiting *stat3* signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, 11, 1314–1321.

- [120] Chiarle, R., Simmons, W. J., Cai, H., Dhall, G., Zamo, A., Raz, R., Karras, J. G., Levy, D. E., and Inghirami, G. (2005) Stat3 is required for alk-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med*, 11, 623–629.
- [121] Turkson, J., Ryan, D., Kim, J. S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sebti, S., Hamilton, A. D., and Jove, R. (2001) Phosphotyrosyl peptides block stat3-mediated dna binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem*, 276, 45443–45455.
- [122] Turkson, J., Kim, J. S., Zhang, S., Yuan, J., Huang, M., Glenn, M., Haura, E., Sebti, S., Hamilton, A. D., and Jove, R. (2004) Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity. *Mol Cancer Ther*, 3, 261–269.
- [123] Siddiquee, K., et al. (2007) Selective chemical probe inhibitor of stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7391–7396.
- [124] Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T. U., and Berg, T. (2006) Stattic: a small-molecule inhibitor of stat3 activation and dimerization. *Chem Biol*, 13, 1235–1242.
- [125] Turkson, J., Zhang, S., Palmer, J., Kay, H., Stanko, J., Mora, L. B., Sebti, S., Yu, H., and Jove, R. (2004) Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther*, 3, 1533–1542.
- [126] Barton, B. E., Karras, J. G., Murphy, T. F., Barton, A., and Huang, H. F.-S. (2004) Signal transducer and activator of transcription 3 (stat3) activation in prostate cancer: Direct stat3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther*, 3, 11–20.
- [127] Kortylewski, M., et al. (2009) In vivo delivery of sirna to immune cells by conjugation to a tlr9 agonist enhances antitumor immune responses. *Nat Biotechnol*, 27, 925–932.
- [128] Rigby, R. J., Simmons, J. G., Greenhalgh, C. J., Alexander, W. S., and Lund, P. K. (2007) Suppressor of cytokine signaling 3 (socs3) limits damage-induced crypt hyper-proliferation and inflammation-associated tumorigenesis in the colon. *Oncogene*, 26, 4833–4841.
- [129] Francipane, M. G., et al. (2009) Suppressor of cytokine signaling 3 sensitizes anaplastic thyroid cancer to standard chemotherapy. *Cancer Res*, 69, 6141–6148.
- [130] Kuo, P.-L., Ni, W.-C., Tsai, E.-M., and Hsu, Y.-L. (2009) Dehydrocostuslactone disrupts signal transducers and activators of transcription 3 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 5, 1328–39.

-
- [131] Lee, J. S., Paek, N. S., Kwon, O. S., and Hahm, K. B. (2010) Anti-inflammatory actions of probiotics through activating suppressor of cytokine signaling (socs) expression and signaling in helicobacter pylori infection: a novel mechanism. *J Gastroenterol Hepatol*, 25, 194–202.
- [132] Tamano, S., Merlino, G. T., and Ward, J. M. (1994) Rapid development of hepatic tumors in transforming growth factor alpha transgenic mice associated with increased cell proliferation in precancerous hepatocellular lesions initiated by n-nitrosodiethylamine and promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis*, 15, 1791–1798.

Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Stefan Fichtner-Feigl für die Überlassung dieses Themas und die durchweg ausgezeichnete Betreuung während des experimentellen Teils und beim Erstellen der Promotionsarbeit.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter im experimentellen chirurgischen Labor für die Unterstützung und Geduld bei allen Fragen und Problemen. Frau Manuela Kovács im Besonderen für die geduldige Einarbeitung und die vielfache Hilfe. Vielen Dank auch Gabriela Schiechl und Maria Martin.

Vielen Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Axel Doenecke für die Überlassung des psa Vektors.

Ich danke auch für die bedingungslose Unterstützung durch meine Familie und meiner langjährigen Freundin Caroline.