

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Einfluss von Interleukin-6 und Interleukin-11 auf
Magenkarzinom- und Immunzellen durch den klassischen und
den trans-Signalweg

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von: Laura Josephine Runge

aus: Dresden

Magdeburg 2023

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Runge, Laura Josephine:

Einfluss von Interleukin-6 und Interleukin-11 auf Magenkarzinom- und Immunzellen durch den klassischen und den trans-Signalweg.

Dissertation, 61 Bl.; 16 Abb.; 13 Tab.; 1 Anl.; 119 Literaturquellen

Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 2023

Kurzreferat

Das Magenkarzinom ist die vierthäufigste Todesursache unter allen Krebserkrankungen weltweit (Sung et al., 2021). Chronische Entzündungen im Magen-Darm-Trakt unterstützen die Entstehung von malignem Gewebe. In dem hier gewählten experimentellen Ansatz wird der Einfluss von Interleukin (IL)-6 und IL-11 auf Magenkarzinom- und Immunzellen durch den klassischen oder trans-Signalweg untersucht. Dazu wurden kultivierte Magenkarzinomzelllinien, Monozytenzelllinien und eine Makrophagenzelllinie mit den Zytokinen sowie deren löslichen Rezeptoren stimuliert, um anschließend die Signalintensität des aktivierten *signal transducer and activator of transcription* (STAT)3 zu messen. Gleichzeitig wurden die kultivierten Magenkarzinom-, Monozyten- und Makrophagenzelllinien auf die Sekretion von IL-6 und IL-11 nach *Transforming growth factor* (TGF)- β Stimulation und ohne Stimulation in den Zellkulturüberständen analysiert. Zusätzlich wurden sowohl die kultivierten Zelllinien, als auch humane mononukleäre Zellen aus peripheren Blutproben (PBMC) und primäre Mausmakrophagen auf die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) Expression der Zytokine, der spezifischen Rezeptoren und der gemeinsamen β -Untereinheit des Rezeptorkomplexes Glykoprotein 130kDa (gp130) untersucht. Der klassische und der trans-Signalweg von IL-6 konnte im Gegensatz zu der IL-11 Stimulation bei allen Zelllinien eine erhöhte Aktivierung von STAT3 auslösen. Die kultivierten Zelllinien zeigten keine Sekretion von IL-6 oder IL-11 in den untersuchten Überständen. Die kultivierten Monozyten und die humanen PBMC wiesen eine, vergleichsweise zu den anderen untersuchten Genen, höhere IL-6 Rezeptor (IL-6R α) mRNA Expression auf. Sowohl die IL-11 als auch die IL-11R α mRNA Expression war bei allen Zelllinien und Primärzellen nur gering nachweisbar.

Schlüsselwörter

Magenkarzinom, Interleukin-6, Interleukin-11, Glykoprotein 130

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	III
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	V
1	Einführung.....	- 1 -
1.1	Das Magenkarzinom	- 1 -
1.1.1	Epidemiologie.....	- 1 -
1.1.2	Pathologie.....	- 1 -
1.1.3	Therapie.....	- 3 -
1.2	Zytokine.....	- 4 -
1.2.1	IL-6-Zytokinfamilie und ihre Rezeptoren	- 4 -
1.2.2	Klassischer Signalweg von IL-6 und IL-11	- 4 -
1.2.3	Trans-Signalweg von IL-6 und IL-11	- 6 -
1.2.4	Einfluss von STAT3 auf den Zellzyklus.....	- 7 -
1.2.5	Biologische Funktionen von IL-6	- 8 -
1.2.6	Biologische Funktionen von IL-11.....	- 8 -
1.2.7	Bedeutung von IL-6 und IL-11 im Magen-Darm-Trakt	- 9 -
1.3	Zielsetzung	- 11 -
2	Material & Methoden.....	- 12 -
2.1	Material.....	- 12 -
2.2	Methoden.....	- 12 -
2.2.1	Zellbiologische Methoden	- 12 -
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	- 15 -
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	- 18 -
2.2.4	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)</i>	- 20 -
3	Ergebnisse.....	- 22 -
3.1	Stimulation des Signalweges.....	- 22 -
3.2	Sekretion von IL-6 und IL-11	- 28 -
3.3	mRNA Expression der primären Zellen und Zelllinien.....	- 30 -

4	Diskussion.....	- 36 -
4.1	Zytokin-induzierte Aktivierung von STAT3	- 36 -
4.2	Sekretion von IL-6 und IL-11	- 38 -
4.3	mRNA Expression der Zytokine und deren Rezeptoren	- 39 -
4.4	Klinische Bedeutung und Ausblick.....	- 42 -
5	Zusammenfassung.....	- 43 -
6	Literaturverzeichnis	- 44 -
7	Danksagung	- 53 -
8	Ehrenerklärung.....	- 54 -
9	Darstellung des Bildungsweges.....	- 55 -
10	Anhang.....	- 56 -
10.1	Material.....	- 56 -
10.1.1	Antikörper	- 56 -
10.1.2	Chemikalien	- 56 -
10.1.3	Geräte.....	- 57 -
10.1.4	Kits	- 58 -
10.1.5	Oligonukleotide	- 58 -
10.1.6	Puffer und Lösungen	- 59 -
10.1.7	Rekombinante Zytokine und Rezeptoren	- 60 -
10.1.8	Verbrauchsmaterialien	- 60 -
10.1.9	Zellkulturmedien und -reagenzien	- 61 -
10.1.10	Zelllinien und Primärzellen.....	- 61 -

II. Abkürzungsverzeichnis

Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CagA	Zytotoxin-assoziierte-Gen-A-Protein
CDK1	Cyclin-abhängige Kinase 1
cDNA	komplementären Desoxyribonukleinsäure
CLC	<i>Cardiotrophin-like-cytokine</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gp130	Glykoprotein 130
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HIF-1 α	Hypoxie-induzierten Faktor-1 α
HRP	Meerrettichperoxidase
Hy-IL-6	Hyper-IL-6
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Jak	Januskinase
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase
Mcl-1	<i>Myeloid leukemia</i>
NP-1	Neuropoeitin 1
OSM	Onkostatin M
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>

qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sIL-6R α	löslicher IL-6R α
sIL-11R α	löslicher IL-11R α
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20
TGF- β	<i>Transforming growth factor</i>
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

1 Einführung

1.1 Das Magenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Magenkarzinom ist der fünfhäufigste diagnostizierte maligne Tumor weltweit und zudem die vierthäufigste Todesursache unter allen Krebserkrankungen (Sung et al., 2021). In Deutschland erkrankten 2018 jeweils 5560 Frauen und 9200 Männer an einem Magenkarzinom. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 34 - 37%. In Deutschland und anderen Industrienationen ist die Erkrankungs- und Sterberate kontinuierlich über die Jahre gesunken, wobei dies am häufigsten die Tumore des Magenausgangs betrifft (Robert Koch Institut, 2021). Die stetige Abnahme der Inzidenz des Magenkarzinoms ist durch multifaktorielle Ursachen, wie die verbesserten Hygienebedingungen, Nahrungsmittelhaltbarkeit, Verfügbarkeit von frischem Gemüse und Obst, Zugang zu sauberem Wasser und dem Rückgang der *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) Infektionen, begründet (Balakrishnan et al., 2017). Bei der Verbreitung des Magenkarzinoms existieren geographische Unterschiede. In Japan und Südkorea ist die Inzidenz stark erhöht. Im Gegensatz dazu ist die Anzahl an Neuerkrankungen pro Jahr in Afrika und Nordeuropa deutlich niedriger (Bray et al., 2018). Regionen mit hohen Inzidenzraten an Magenkarzinomen haben oft auch eine hohe Rate an *H. pylori* Infektionen. Allerdings gibt es auch Regionen mit hoher Seroprävalenz von *H. pylori*, wie Indien, in der die Rate an Magenkarzinomen niedrig ist. Dies ist am ehesten durch ein komplexes Zusammenspiel der bakteriellen und umweltbedingten Einflüsse zu erklären (Fock und Ang, 2010). Hierbei kann auch das Fehlen der Risikofaktoren wie Alkoholkonsum über 45 g pro Tag, der Verzehr von verarbeiteten Fleisch und ein erhöhter *Body-Mass-Index* eine Rolle spielen (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2020).

1.1.2 Pathologie

Die Weltgesundheitsorganisation unterteilt das Magenkarzinom nach dem histologischen Erscheinen in tubuläre, papilläre oder muzinöse Adenokarzinome oder Siegelringzellkarzinome (Hamilton und Aaltonen, 2000). In der Lauren Klassifikation wird das Magenkarzinom in den intestinalen Typ und den diffusen Typ unterschieden (Lauren, 1965). Der intestinale Typ ist charakterisiert durch eine Abfolge von histologischen Veränderungen, genannt Correa-Kaskade (Abb. 1). Zu Beginn ist die Magenschleimhaut durch die nicht-atrophische Gastritis mit der vermehrten Einwanderung von mononukleären Leukozyten oder neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet. Die häufigste Ursache für die Entstehung dieser Entzündung ist eine *H. pylori* Infektion. Die Infiltration von den Immunzellen in das Epithelgewebe kann zu Mikroabszessen führen. Charakteristisch für die fortschreitende chronische Gastritis ist eine lymphozytäre

Ansammlung von Zellen mit Keimzentren (Correa und Piauzelo, 2012). Nach der chronischen Gastritis atrophieren die Drüsen multifokal (Correa et al., 1970). Die Lamina propria, welche sich direkt unter dem Epithelgewebe befindet, kann im Rahmen der chronischen Entzündung fibrosieren. Auf die Atrophie folgt die Metaplasie, welche in zwei Typen unterteilt wird. Bei der intestinalen Metaplasie vom Dünndarmtyp wird das Gewebe durch Becherzellen, Enterozyten mit Mikrovilli und Paneth-Zellen ersetzt. Die intestinale Metaplasie vom Dickdarmentyp zeigt keinen Bürstensaum und besteht vorwiegend aus Becherzellen. In Biopsien können beide Formen der Metaplasie gefunden werden. Die darauffolgende Dysplasie zeigt vergrößerte, hyperchromatische und gedrängte Zellkerne. Allerdings verbleiben die Zellen oberhalb der Basalmembran. Die Drüsen sind irregulär. Das invasive Adenokarzinom entsteht durch die Penetration von neoplastischen Zellen in das angrenzende Stroma (Correa und Piauzelo, 2012).

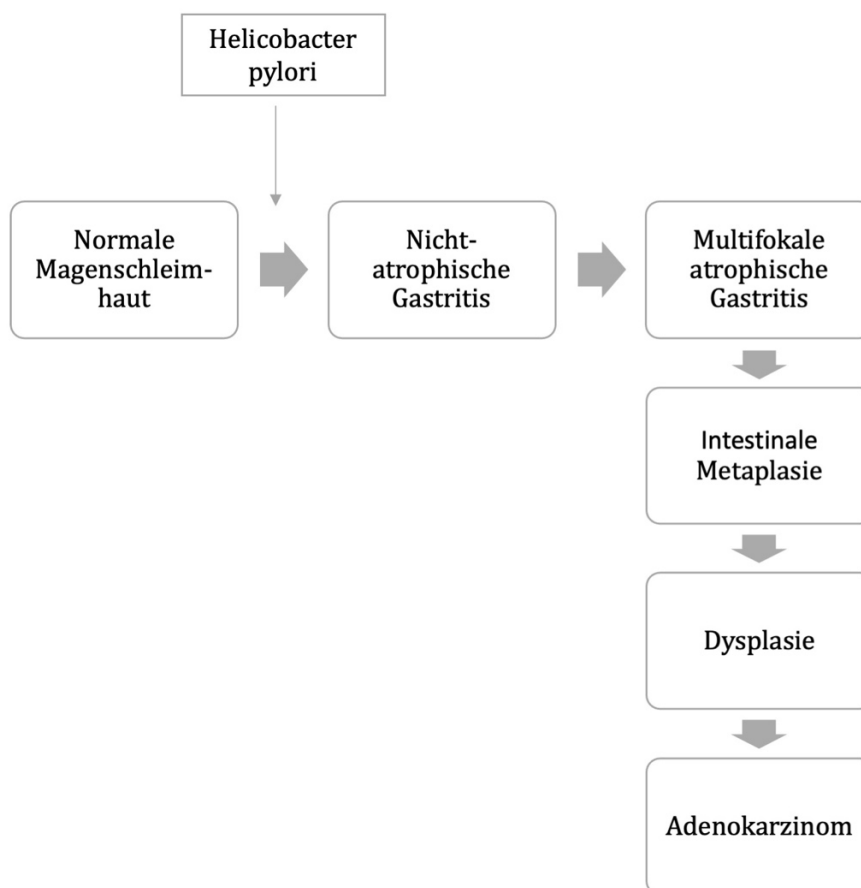


Abb. 1: Schematische Darstellung der Correa-Kaskade. Die histologischen Veränderungen folgen zeitlich aufeinander. *H. pylori* beeinflusst die Entstehung der nicht-atrophischen Gastritis. Aus dieser entwickelt sich die multifokale atrophische Gastritis. Bei der Metaplasie wird das ursprüngliche Epithelgewebe durch Zellen ersetzt, welche physiologisch für den Darm charakteristisch sind. Die Dysplasie zeigt vergrößerte, hyperchromatische und gedrängte Zellkerne. Aus der Dysplasie entwickelt sich letztendlich das Adenokarzinom.

1.1.3 Therapie

Grundpfeiler der Therapie des Magenkarzinoms sind laut den Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft die Resektion und die Chemotherapie. Die Resektion ist die einzige kurative Behandlung. Sie kann endoskopisch oder chirurgisch erfolgen. Für die endoskopische Therapie eignen sich nur intraepitheliale Neoplasien oder Magenfrühkarzinome (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Der Vergleich zwischen der endoskopischen Abtragung und der Gastrektomie zeigte in einer retrospektiven Kohortenstudie, dass die Komplikationsrate und Krankenhausverweildauer bei der chirurgischen Therapie anteilig höher war (Chiu et al., 2012). Das Ziel der Resektion ist eine vollständige Entfernung des Tumors und der regionären Lymphknoten, wobei die proximalen, distalen und zirkumferentiellen tumorfreien Resektionsränder histologisch bestätigt werden müssen. Das Ausmaß der Resektion wird durch die Tumorlokalisation, die Tumor-Nodus-Metastasen (TNM)-Klassifikation und den histologischen Typ bestimmt. Wenn eine alleinige Resektion nicht ausreicht, kann zusätzlich eine perioperative Chemotherapie durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Die perioperative Chemotherapie mit der Kombination aus Fluorouracil, Leukovorin, Oxaliplatin und Doxataxel zeigte in einer Phase II/III Studie nicht nur ein verbessertes Gesamtüberleben, sondern auch eine verbesserte Resektabilität und krankheitsfreies Überleben im Vergleich zu der Kombination aus Epirubicin, Cisplatin und Fluorouracil (Al-Batran et al., 2019). Zur palliativen Therapie wird Patienten in gutem Allgemeinzustand ebenfalls eine systemische Chemotherapie empfohlen. Bei HER2-überexprimierenden Tumoren kann die Chemotherapie um den monoklonalen Antikörper Trastuzumab erweitert werden (Bang et al., 2010; Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Ramucirumab inhibiert die Angiogenese des Tumors und konnte anschließend an eine Erstlinien-Chemotherapie einen Überlebensvorteil bei Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom zeigen (Fuchs et al., 2014). Die Dauer der medikamentösen Tumorthherapie wird in Abhängigkeit vom Ansprechen des Tumors, der therapieassoziierten Toxizität und der Patientenvorstellungen entschieden. Zur Symptomlinderung kommen ebenfalls Stentimplantationen, jejunale Ernährungsfisteln oder auch eine Radiotherapie in Betracht (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019).

1.2 Zytokine

Zytokine sind endogene Proteine, welche von verschiedenen Zelltypen in fast allen Geweben produziert werden können. Ihre Wirkung ist meist autokrin oder parakrin vermittelt und hängt von der Oberflächenexpression der spezifischen Rezeptoren ab. Die Zytokine werden eingeteilt in Chemokine, Interferone und Interleukine. Interleukine haben vielfältige Funktionen und sind unter anderem für die Proliferation und Differenzierung von Zellen des angeborenen oder erworbenen Immunsystems verantwortlich. Aufgrund ihrer Struktur und ihrer Rezeptoren kann man sie in unterschiedliche Familien einteilen.

1.2.1 IL-6-Zytokinfamilie und ihre Rezeptoren

Zur IL-6-Familie zählen neben IL-6 ebenfalls IL-11, ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-like cytokine (CLC), Leukämie-inhibierender Faktor (LIF), Cardiotrophin-1 (CT-1), Onkostatin M (OSM), IL-27, IL-31 und Neuropeitin (NP-1) (Derouet et al., 2004; Dillon et al., 2004; Grötzinger, 2002; Pflanz et al., 2004). Ihr gemeinsames Strukturelement ist ein Bündel aus vier α -Helices, die in einer *up-up-down-down* Topologie angeordnet sind. Allerdings weisen diese nur eine geringe Sequenzhomologie auf (Bazan, 1990; Spangler et al., 2015). Außer IL-31 nutzen alle Zytokine der IL-6-Familie das Transmembranprotein gp130 zur Signaltransduktion (Diveu et al., 2003). Gp130 ist die β -Untereinheit des Rezeptorkomplexes und wird im Gegensatz zu den α -Untereinheiten ubiquitär auf allen Zellen exprimiert (Hibi et al., 1990). Die Zytokine IL-6 und IL-11 sind die einzigen der IL-6-Zytokinfamilie, deren Signalweg durch eine Homodimerisierung von gp130 aktiviert wird (Heinrich et al., 2003). Der IL-6R α wird nur auf Hepatozyten und einigen lymphozytären Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, B-Zellen und Untergruppen der T-Zellen exprimiert (Chalaris et al., 2011). Der IL-11R α existiert in 2 Isoformen. IL-11R α_1 wird in geringen Mengen in vielen Organen, wie beispielsweise dem Dünndarm exprimiert (Davidson et al., 1997; Romas et al., 1996). Dem IL-11R α_2 fehlt der zytoplasmatische Anteil und wird nur im Thymus, den Lymphknoten und den Hoden exprimiert (Robb et al., 1997).

1.2.2 Klassischer Signalweg von IL-6 und IL-11

Für den klassischen Signalweg von IL-6 bindet das Zytokin zunächst an den membranständigen IL-6R α . Nachdem IL-6 gebunden an den spezifischen Rezeptor ebenfalls an gp130 bindet, dimerisiert dieses und aktiviert die intrazelluläre Signalkaskade (Hibi et al., 1990; Taga et al., 1989). Jeweils zwei Moleküle Zytokin, Zytokinrezeptor und gp130 bilden somit einen hexameren Komplex (Boulanger et al., 2003). IL-6 und IL-11 sind die einzigen Zytokine der IL-6-Zytokinfamilie, welche durch die Homodimerisierung von gp130 die Signalkaskade aktivieren (Heinrich et al., 2003). Die Hauptakteure der Signalweiterleitung von gp130 ist die Januskinase (Jak)1, welche konstitutiv an gp130 gebunden ist, und STAT3 (Garbers et al., 2018; Schaper und Rose-John, 2015). Intrazellulär aktiviert gp130 die Januskinase, welche STAT3 durch

Phosphorylierung am Tyrosin 705 aktiviert. IL-11 bindet an den IL-11R α und vermittelt seine Wirkung ebenfalls über die Homodimerisierung von gp130 und die anschließende Aktivierung von der an gp130 gebundenen Kinase Jak1. Somit führt der klassische Signalweg von IL-11 ebenfalls zur Phosphorylierung am Tyrosin 705 von STAT3 (Abb. 2) (Pflanz et al., 1999).

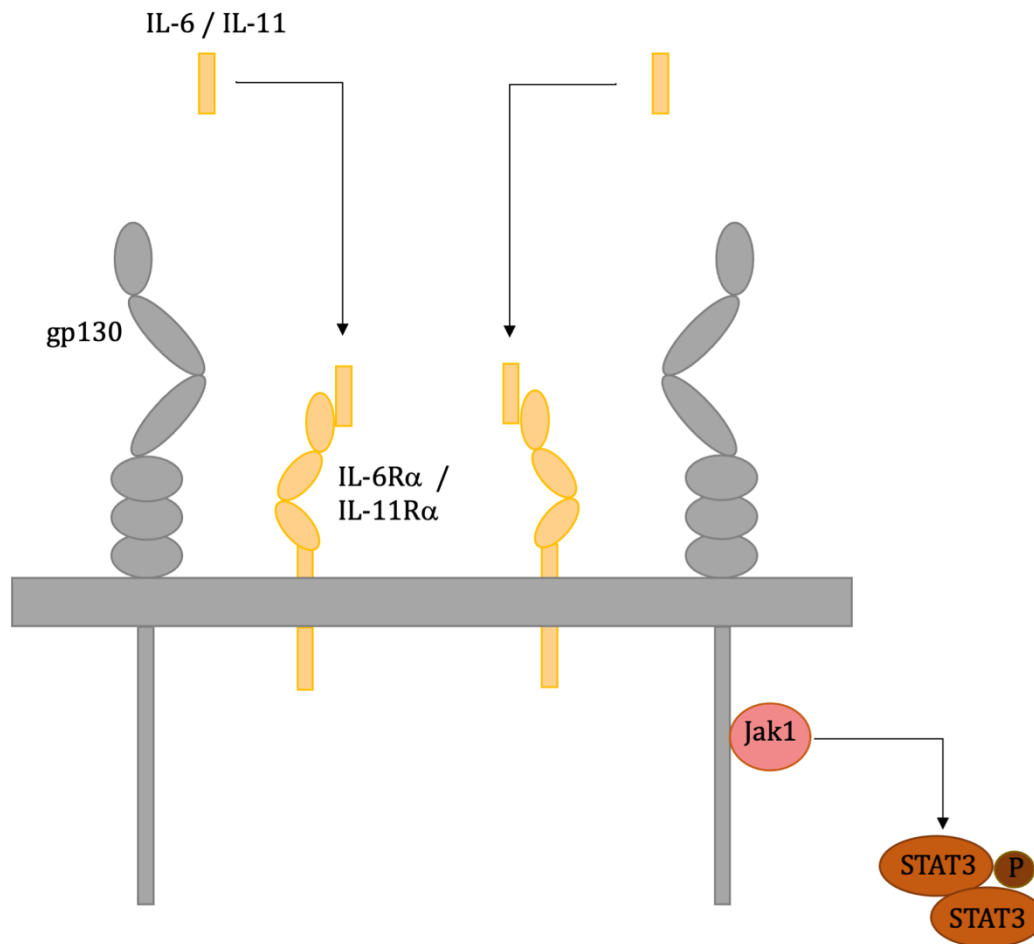


Abb. 2: Schematische Darstellung des klassischen Signalweges von IL-6 und IL-11 durch den spezifischen Rezeptor und gp130. Intrazellulär aktiviert gp130 die Jak1. STAT3 dimerisiert nach Phosphorylierung durch Jak1 und kann anschließend in den Zellkern translozieren.

Die klassischen Signalwege von IL-6 und IL-11 unterscheiden sich demnach durch die Expression ihrer spezifischen Rezeptoren auf unterschiedlichen Zelltypen (Garbers et al., 2012). Nach der Aktivierung von STAT3 bildet dieses Homodimere und kann anschließend in den Zellkern gelangen. Im Zellkern fungiert STAT3 als Transkriptionsfaktor (Aggarwal et al., 2006; Levy und Darnell, 2002). Ein Zielgen von STAT3 ist der negative Regulator *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)3 (Crocker et al., 2003). Es bindet an das phosphorylierte Tyrosin 759 im Menschen und in Mäusen an das phosphorylierte Tyrosin 757 von gp130. SOCS3 verhindert die weitere Signaltransduktion durch erhöhten Rezeptorabbau und Hemmung der Funktion der Januskinasen (Babon et al., 2012; Nicholson et al., 2000; Sasaki et al., 1999; Schmitz et al., 2000).

1.2.3 Trans-Signalweg von IL-6 und IL-11

Neben dem klassischen Signalweg über den membrangebundenen IL-6R α gibt es eine alternative Möglichkeit der zellulären Aktivierung durch IL-6. Eine lösliche Form des IL-6R α (sIL-6R α) konnte in humanen Blutproben und Urin identifiziert werden (Honda et al., 1992; Novick et al., 1989). Erhöhte Spiegel von sIL-6R α fanden sich bei HIV-Patienten, Patienten mit monoklonaler Gammopathie, Non-Hodgkin-Lymphomen, chronisch lymphatischer Leukämie, endokriner Orbitopathie und multipler Sklerose (Honda et al., 1992; Lavabre-Bertrand et al., 1995; Padberg et al., 1999; Slowik et al., 2012). Es wird angenommen, dass die pro-inflammatorischen Funktionen von IL-6 durch den trans-Signalweg vermittelt werden (Rose-John, 2012). Der trans-Signalweg ist beispielsweise verantwortlich für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (Bergmann et al., 2017). Der lösliche Rezeptor entsteht vor allem durch Proteolyse des membrangebundenen Rezeptors durch die Metalloproteasen ADAM10 oder ADAM17 (Riethmueller et al., 2017). Er kann aber auch durch alternatives Spleissen der mRNA gebildet werden (Lust et al., 1992).

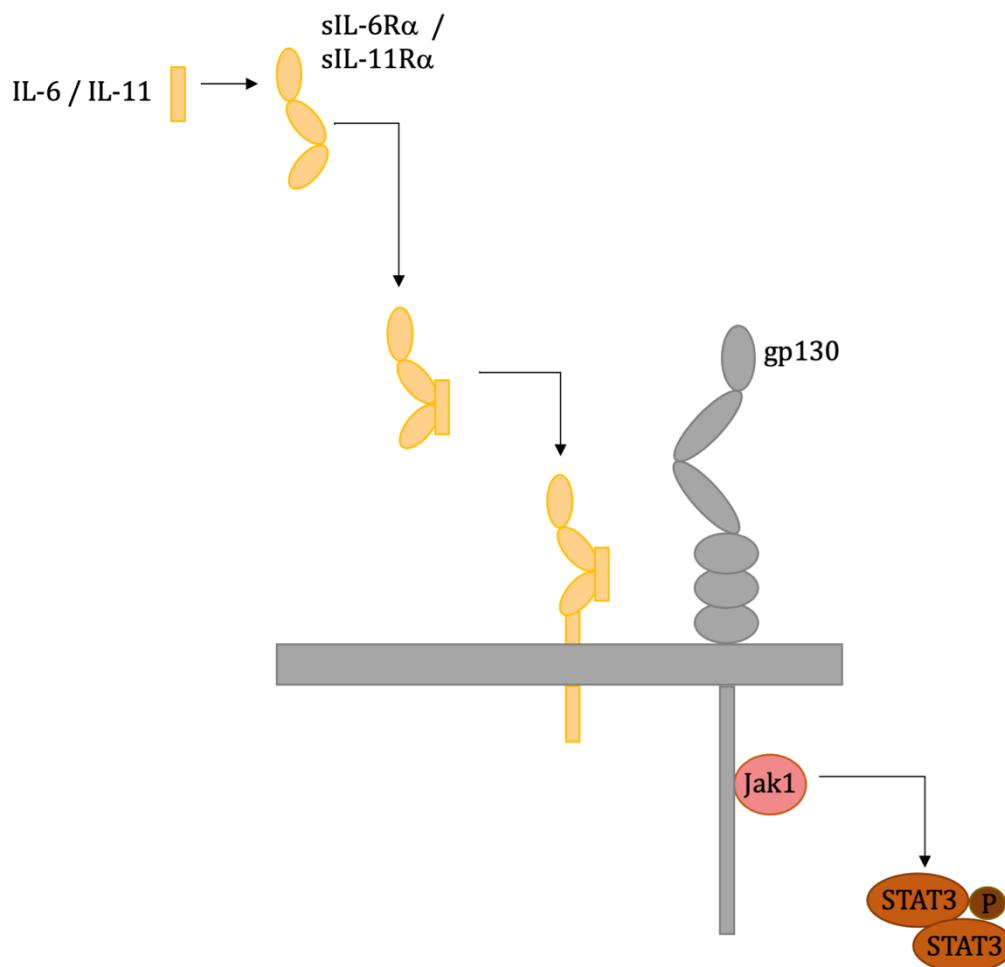


Abb. 3: Schematische Darstellung des trans-Signalweges. Der lösliche Rezeptor sIL-6R α oder sIL-11R α bindet IL-6 bzw. IL-11. Die Signalweiterleitung erfolgt dann über das membranständige gp130, welches auf allen Zellen exprimiert wird. Die Jak1 aktiviert darauffolgend STAT3 und dieses kann in den Zellkern translozieren.

Der lösliche Rezeptor ist in der Lage IL-6 zu binden und kann als IL-6/sIL-6R Komplex membranständiges gp130 auf Zellen aktivieren, welche keinen membranständigen IL-6R α besitzen, wie in Abb. 3 dargestellt (Rose-John und Heinrich, 1994). Die lösliche Form von gp130 (sgp130) konnte ebenfalls in humanen Blut nachgewiesen werden (Narazaki et al., 1993). Jostock et al. zeigten, dass rekombinantes sgp130 den trans-Signalweg von IL-6 spezifisch blocken kann, ohne dabei den membranständigen IL-6R α zu beeinflussen (Jostock et al., 2001). Es wurden mittlerweile verschiedene Isoformen des löslichen gp130 nachgewiesen, welche von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden. Abhängig von der spezifischen Isoform des sgp130 ist auch die Effizienz der Blockierung des trans-Signalweges (Wolf et al., 2016). IL-11 und sIL-11R α können ebenfalls STAT3 aktivieren (Pflanz et al., 1999). Der sIL-11R α wurde bisher nur in einigen Serumproben von gesunden Menschen nachgewiesen. Der lösliche Rezeptor konnte *in vitro* durch ADAM10 und nicht durch ADAM17 freigesetzt werden. Zusätzliche Sheddasen für den IL-11R α sind neutrophile Elastase, Proteinase 3 und rhomboide intramembranöse Protease RHBDL2 (Koch et al., 2021; Lokau et al., 2016).

1.2.4 Einfluss von STAT3 auf den Zellzyklus

Die vermehrte Proliferation von Zellen ist charakteristisch für die Tumorentstehung durch den Verlust der Zellzykluskontrolle. STAT3 kann die Apoptose durch die Hochregulierung von überlebensfördernden Proteinen wie z.B. *B-cell lymphoma* (Bcl)-2, Bcl-X_L, *myeloid leukemia* (Mcl)-1 und Survivin hemmen (Bromberg et al., 1999; Kanda et al., 2004; Rahaman et al., 2002). Gemeinsam mit c-jun hemmt STAT3 die extrinsische Apoptose durch Herunterregulierung der Fas-Rezeptor Expression auf der Zelloberfläche. Der Zelltod durch die Bindung des Fas-Liganden kann somit nicht stattfinden (Ivanov et al., 2001). STAT3 greift ebenfalls in den Zellzyklus ein, indem es die Expression von c-myc und Cyclin D1 fördert (Bromberg et al., 1999). Außerdem scheint STAT3 bei der Hochregulierung von Cyclin B1 und der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (CDK1) beteiligt zu sein (Wang et al., 2014). Der Transkriptionsfaktor führt ebenfalls zu einer Herunterregulierung des natürlichen Inhibitors p21, welcher die Cyclin-abhängigen Kinasen hemmt (Bollrath et al., 2009). Angiogenese ist ein weiterer wichtiger Faktor für die Tumorgenese. STAT3 erhöht die *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Expression und fördert damit Wachstum, Gefäßneubildung und Metastasierung (Wei et al., 2003). STAT3 induziert bei Sauerstoffmangel im Gewebe den Hypoxie-induzierten-Faktor (HIF)-1 α und formt Komplexe mit diesem. Somit ist die Expression von Zielgenen wie VEGF möglich (Lang et al., 2007). STAT3 kann zudem durch eine Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase (MMP)-2 die Metastasierung von Tumoren fördern (Xie et al., 2004).

1.2.5 Biologische Funktionen von IL-6

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit vielen pro- und anti-inflammatorischen Funktionen. IL-6 aktiviert mehrere Akute-Phase-Proteine, wie das C-reaktive Protein, Serum-Amyloid-A, Fibrinogen, Haptoglobin und α_1 -Antichymotrypsin. Zusätzlich reduziert IL-6 die Anti-Akute-Phase-Proteine Albumin und Transferrin (Castell et al., 1989). Bei einer Sepsis kann IL-6 als prognostischer Laborparameter für den Erfolg der antibiotischen Therapie dienen. Eine der ersten entdeckten Wirkungen von IL-6 ist die Stimulation der Differenzierung von aktivierten B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen (Yoshizaki et al., 1984). Daher kann es auch als autokriner Wachstumsfaktor für reife B-Zell-Neoplasien wirken, beispielsweise beim Multiplen Myelom (Kawano et al., 1988). Im Knochenmark fördert IL-6 die Megakaryozytenreifung und somit den Anstieg der Thrombozyten im Blut (Ishibashi et al., 1989). IL-6 stimuliert gemeinsam mit TGF- β die spezifische Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen zu T_H17-Zellen (Korn et al., 2009). Zudem hemmt IL-6 die TGF- β -induzierte Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Bettelli et al., 2006). Eine gestörte Balance der T_H-Subpopulationen zugunsten von T_H17-Zellen kann zu Autoimmunerkrankungen führen. Bei der dermalen Erkrankung Psoriasis steigert IL-6 die Keratozytenproliferation (Grossman et al., 1989). In Fibroblasten-ähnlichen Synovialzellen stimuliert IL-6 den RANK-Liganden über den trans-Signalweg, welcher Osteoklasten aktiviert und somit zur Knochenresorption führt (Hashizume und Hayakawa, 2008). IL-6 konnte in der Synovialflüssigkeit der Gelenke von Patienten mit aktiver rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden (Hirano et al., 1988). In synovialen Fibroblasten, welche von rheumatoider Arthritis betroffenen sind, fördert IL-6 außerdem die Produktion von VEGF (Nakahara et al., 2003). Zusätzlich konnte bei Patienten mit Covid-19-Infektion ein Zusammenhang zwischen IL-6 Serumspiegeln und der Prognose der Erkrankung gezeigt werden (Wu et al., 2021). Tocilizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den IL-6R α , ist in der Europäischen Union bereits zur Behandlung von rheumatoider Arthritis, aktiver systemischer juveniler idiopathischer Arthritis, polyartikulärer juveniler idiopathischer Arthritis, Riesenzellerarthritis, schwerer Covid-19-Infektion und dem Zytokin-Freisetzungssyndrom zugelassen (European Medicines Agency, 2021). Die Bedeutung von IL-6 bei der Tumorgenese wird in Kapitel 1.2.7 beschrieben.

1.2.6 Biologische Funktionen von IL-11

IL-11 wurde zuerst im Überstand von kultivierten Fibroblasten entdeckt, welche die Proliferation von IL-6-abhängigen Plasmazytomzellen und deren Immunglobulin (Ig)G-Produktion stimuliert (Paul et al., 1990). IL-11 steigert die Thrombopoese und ist in den USA in rekombinanter Form als Therapeutikum nach Chemotherapie zugelassen (Cantor et al., 2003). Das Zytokin stimuliert außerdem die Erythropoese und die Aktivierung von Megakaryozyten und unterstützt zusätzlich die Makrophagenproliferation (Du und Williams, 1994; Musashi et al., 1991; Weich et al., 1997).

Den Behandlungserfolg von Knochenmarkstransfers in Mäusen kann man zudem durch IL-11 verbessern (Holyoake et al., 1996). Erhöhte IL-11 Werte sind mit kardialen Komplikationen bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz assoziiert (Ye et al., 2019). Durch TGF- β wird die IL-11 Expression induziert und somit die Entstehung von kardiovaskulärer Fibrose gefördert (Schafer et al., 2017). IL-11 wird ebenfalls vermehrt in dem Lungengewebe von Patienten exprimiert, welche an idiopatischer pulmonaler Fibrose erkrankt sind (Strikoudis et al., 2019). Bei den Lebern von Mäusen, welche IL-11 Injektionen erhalten hatten, wurden erhöhte Fibrosemarker, Entzündungsreaktionen und Zelltod der Hepatozyten nachgewiesen. Neutralisierende Antikörper gegen IL-11 bewirkten eine Reduktion der Fibrose, Steatose, Zelltod der Hepatozyten, Entzündung und Hyperglykämie in Mäusen mit einer Diät-induzierten Steatohepatitis (Widjaja et al., 2019). In der Tumorgenese spielt IL-11 ebenfalls eine Rolle. Yamazumi et al. konnten sowohl eine Überexpression von IL-11 als auch IL-11R α im kolorektalem Adenokarzinom nachweisen (Yamazumi et al., 2006). Die erhöhte Expression des IL-11R α konnte in Proben von Prostatakarzinomen nachgewiesen werden. IL-11 im Serum könnte sogar ein möglicher Tumormarker beim Prostatakarzinom darstellen (Zurita et al., 2004).

1.2.7 Bedeutung von IL-6 und IL-11 im Magen-Darm-Trakt

Karzinome entstehen durch das unkontrollierte Wachstum eines bestimmten Zelltyps und gehen mit der Invasion des umliegenden Gewebes einher sowie der Ausbreitung von malignen Zellen über die Blut- oder Lymphbahnen. Chronische Entzündungsreaktionen unterstützen dabei die Entstehung des malignen Gewebes vor allem im Magen-Darm-Trakt (Karin und Greten, 2005). Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa, einer inflammatorischen Darmerkrankung, zeigten eine höhere IL-6 Expression und STAT3-Phosphorylierung in den epithelialen Kolonzellen. Beides ist ebenfalls bei dem Fortschreiten in dysplastische Zellen und Tumorzellen erhöht. Die Expression des negativen Regulators SOCS3 reduziert sich während der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms (Li et al., 2010). In einem STAT3 ^{Δ IEC} Mausmodell von Bollrath et al. zeigten Mäuse mit fehlender STAT3 Expression in den Epithelzellen des Darms keine tubulären Adenome im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nach Gabe von Azoxymethan. Im Gegensatz dazu ist in dem gp130^{Y757F} Mausmodell gp130 mutiert, so dass SOCS3 nicht an Tyrosin 757 binden kann. Dies führt zu einer Hyperaktivierung von STAT3, da der negative Regulator des Signalweges durch das mutierte gp130 seine Funktion verliert. Diese Mäuse zeigten eine erhöhte Anzahl und Größe der induzierten Tumore im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Die Funktionsgewinnmutation gp130^{Y757F} hatte zusätzlich einen erhöhten Bromdesoxyuridin-Proliferationsindex verglichen mit den STAT3 ^{Δ IEC} Mäusen, welche kein STAT3 in den Epithelzellen des Darms exprimieren. Diese Mäuse wiesen sogar eine erhöhte Apoptoserate auf. Das STAT3-kompetente Vergleichsmausmodell STAT3^{fllox} zeigte außerdem eine Induktion der antiapoptotischen Zielproteine Bcl-X_L und Survivin. In den STAT3 ^{Δ IEC} Mäusen fiel allerdings im Vergleich zu den STAT3^{fllox} Mäusen eine erhöhte

Zerstörung der Kolonmukosa auf. Gp130^{Y757F}/Il6^{-/-} und gp130^{Y757F}/Il11ra^{-/-} Mäuse entwickelten beide den hyperproliferativen Phänotyp. Das gp130^{Y757F}/Il11ra^{-/-}/Il6^{-/-} Mausmodell, bei welchem beide Zytokinwirkungen fehlen, zeigte eine Reduktion in der Proliferationsrate. Dies legt die redundante Funktion von IL-6 und IL-11 im Darm bei den gp130^{Y757F} Mäusen nahe (Bollrath et al., 2009). Putoczki et al. zeigten ebenfalls eine IL-11 abhängige Tumorgenese in Kolontumoren und Magentumoren unabhängig von hämatopoetischen Zellen. Das Einsetzen von mIL-11 Mutein, einem Antagonisten des IL-11 Signalweges, führte zu einer verminderten Tumorlast und epithelialer Hyperplasie in Mäusen (Putoczki et al., 2013).

In humanen Adenokarzinomen des Magens konnte eine erhöhte IL-11 Expression nachgewiesen werden (Ellmark et al., 2006). Nakayama et al. untersuchten 73 Fälle von chirurgisch resezierten humanen Magenkarzinomen. In der immunhistochemischen Färbungen für IL-11 und IL-11R α konnten beide Proteine nachgewiesen werden. Die IL-11R α Expression wurde besonders in den invasiven Anteilen des Primärtumors gefärbt. Die Expression von IL-11 war deutlich höher im intestinalen Typ als im diffusen Typ (Nakayama et al., 2007). Zwischen erhöhten IL-6 Serumwerten und der Größe des Tumors sowie venöse und lymphatische Metastasierung bei Patienten mit Magenkarzinom konnte ebenso ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden (Ashizawa et al., 2005). In humanen Magengewebe von Patienten mit *H. pylori* Infektion, welches den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Magenkarzinoms darstellt, wurde eine erhöhte STAT3 Aktivierung nachgewiesen (Jackson et al., 2007). *H. pylori* induziert die Aktivierung von STAT3 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Diese *H. pylori* medierte STAT3 Aktivierung benötigt den IL-6R α , ist allerdings unabhängig von IL-6 oder IL-11. Das Zytotoxin-assoziierte-Gen-A-Protein (CagA) von *H. pylori*, welches in die Epithelzellen der Magenschleimhaut gelangt, ist notwendig für die Phosphorylierung von STAT3 und scheint die Dimerisierung von gp130 indirekt zu fördern (Bronte-Tinkew et al., 2009). Ernst et al. zeigten im gp130^{Y757F} Mausmodell, dass IL-11 mRNA und Proteinspiegel in den Tumoren des Magens erhöht waren. In diesen Läsionen war die Genexpression von IL-6 zwar auch erhöht, jedoch deutlich weniger als IL-11. Die Rezeptorexpression beider Zytokine blieb unverändert im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. Außerdem zeigten gp130^{Y757F}/Il11ra^{-/-} Mäuse keine Tumore und unterschieden sich nicht in der Morphologie zu den Mägen in den Wildtyp Mäusen. Dem gegenüber konnte eine genetische Deletion von IL-6 in den gp130^{Y757F}/Il6^{-/-} Mäusen die Tumorgenese nicht unterdrücken. Ebenfalls blieben die inflammatorischen Zellinfiltrate erhalten. In den gp130^{Y757F}/Il11ra^{-/-} Mäusen konnte eine deutliche Reduktion der STAT3 Aktivierung und SOCS3 Expression nachgewiesen werden. Zudem zeigten gp130^{Y757F} Mäuse eine erhöhte Expression der STAT3 Zielgene Cyclin D1, c-myc, Survivin, Bcl-X_L und Matrix Metalloproteinase 13 (Ernst et al., 2008). Dies legt eine vermehrte Bedeutung von IL-11 in der Tumorgenese des Magenkarzinoms nahe. IL-6 scheint hier dagegen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

1.3 Zielsetzung

Das Magenkarzinom ist der fünfthäufigste diagnostizierte maligne Tumor weltweit und zudem die vierthäufigste Todesursache unter allen Krebserkrankungen (Sung et al., 2021). Karzinome entstehen durch das unkontrollierte Wachstum eines bestimmten Zelltyps und führen zu einer Invasion des umliegenden Gewebes sowie der Ausbreitung von malignen Zellen über die Blut- oder Lymphbahnen. Chronische Entzündungsreaktionen unterstützen diesen Prozess vor allem im Magen-Darm-Trakt (Karin und Greten, 2005).

Ein Zusammenhang zwischen erhöhten IL-6 Serumwerten und der Größe des Tumors sowie venöser und lymphatischer Metastasierung bei Patienten mit Magenkarzinom konnte bereits gezeigt werden (Ashizawa et al., 2005). In humanen Adenokarzinomen des Magens konnte ebenfalls eine erhöhte IL-11 Expression nachgewiesen werden (Ellmark et al., 2006). Ernst et al. zeigten in einem Magentumormodell von Mäusen, dass die IL-11 mRNA und Proteinspiegel in den Tumoren des Magens erhöht waren. Die Genexpression von IL-6 war ebenfalls erhöht, jedoch deutlich weniger als die Expression von IL-11. Die Mäuse mit deletiertem IL-11R α in dem Magentumormodell entwickelten außerdem keine Tumore und unterschieden sich nicht von Wildtyp Mäusen (Ernst et al., 2008). Diese Ergebnisse legen einen kausalen Einfluss von IL-6 und vor allem IL-11 auf die Entstehung und das Wachstum des Magenkarzinoms nahe.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von IL-6 und IL-11 auf Magenkarzinomzellen und Immunzellen über den klassischen sowie den trans-Signalweg analysiert. Beide Signalwege führen zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (Levy und Darnell, 2002). Für die Untersuchungen wurden kultivierte Zelllinien von Magenkarzinomzellen, Monozyten und Makrophagen mit beiden Zytokinen sowie deren löslichen Rezeptoren stimuliert, um anschließend die Signalintensität des aktivierten STAT3 zu messen. Pelaia et al. zeigten, dass eine Stimulation von humanen Lungenfibroblasten mit TGF- β zu einer erhöhten Sekretion von IL-6 und IL-11 führen kann (Pelaia et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Magenkarzinom-, Monozyten- und Makrophagenzelllinien kultiviert und die Sekretion von IL-6 und IL-11 in den Zellkulturüberständen von Zellen mit und ohne TGF- β Stimulation analysiert. Zusätzlich wurden sowohl die kultivierten Zelllinien als auch humane PBMC und primäre Mausmakrophagen auf ihre mRNA Expression der Zytokine, ihrer spezifischen Rezeptoren und dem gemeinsamen Rezeptor gp130 untersucht.

2 Material & Methoden

2.1 Material

Eine Auflistung der verwendeten Antikörper, Chemikalien, Geräte, Kits, Oligonukleotide, Verbrauchsmaterialien, Zellen, Zytokine und Rezeptoren befindet sich in Kapitel 10.1.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Auftauen der Zelllinien

Es wurden die folgenden vier humanen und zwei murinen Zelllinien epitheliale oder hämatopoetischem Ursprungs verwendet:

Tabelle 1: Ursprungsgewebe der Zelllinien

Zelllinie	Art der Zelllinie
AGS	humane epitheliale Magenkarzinomzellen
CLS-103	murine epitheliale Magenkarzinomzellen
J774A.1	murine Makrophagen
N87	humane epitheliale Magenkarzinomzellen
THP-1	humane Monozyten
U-937	humane Monozyten

Die Kryoröhrchen mit Zellen wurden in der Hand aufgewärmt und in 10 ml Nährmedium überführt. Für die Entfernung des enthaltenen Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden die Zellen bei 700 g für 5 min zentrifugiert. DMSO verhindert beim Einfrieren der Zellen die Bildung von schädigenden Eiskristallen. Nach dem Auftauen wirkt es sich allerdings toxisch auf die Zellen aus und muss dementsprechend vor der Kultivierung entfernt werden. Das Zellpellet wurde anschließend mit 1 ml Nährmedium resuspendiert und wie in 2.2.1.2 beschrieben kultiviert.

2.2.1.2 Kultivierung

Die jeweiligen Zelllinien wurden in folgenden Medien mit *fetal bovine serum* (FBS), Penicillin, Streptomycin und L-Glutamine in entsprechender Konzentration kultiviert:

Tabelle: 2: Verwendete Kulturmedien der Zelllinien

Zelllinie	Nährmedium	FBS	Penicillin	Streptomycin	L-Glutamine
AGS	Ham's Medium	10%	100 U/ml	100 µg/ml	200 mM
CLS-103	RPMI 1640 (PAN-Biotech)	10%	100 U/ml	100 µg/ml	
J774A.1	DMEM	10%	100 U/ml	100 µg/ml	
N87	RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific)	10%	100 U/ml	100 µg/ml	
THP-1	RPMI 1640 (PAN-Biotech)	10%	100 U/ml	100 µg/ml	
U-937	RPMI 1640 (PAN-Biotech)	10%	100 U/ml	100 µg/ml	

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Epithelzellen wurden in CELLSTAR® Zellkultur Flaschen (75 cm²) mit 25 ml Nährmedium kultiviert und die Monozyten in Petrischalen mit 10 ml Nährmedium. Für die Makrophagen wurden Corning® Zellkulturschalen mit 10 ml Nährmedium verwendet. Zur Subkultivierung wurden die Epithelzellen einmal mit 5 ml *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und mit 5 ml Trypsin 0,25% für 10-15 min bei 37°C abgelöst. Trypsin ist eine Endopeptidase, welche die Zell-Matrix-Verbindungen abbaut und somit die Zellen von der Oberfläche ablöst. Die Zellsuspensionen wurden anschließend mit ihrem Nährmedium in ein Röhrchen überführt und bei 700 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut resuspendiert und 1:3 (N87) oder 1:10 (AGS, CLS-103) verdünnt. Die Monozyten wurden 1:10 für die Subkultivierung verdünnt. Die Makrophagenzelllinie wurde bei der Subkultivierung mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Medium mit dem Zellen-Schaber von der Platte gelöst. Die Verdünnung erfolgte 1:3. Die N87 Zelllinie wurde einmal pro Woche passagiert. Alle anderen Zelllinien wurden dreimal die Woche passagiert.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung für die verschiedenen Versuche wurden die Zellen im jeweiligen Nährmedium verdünnt und ein Aliquot von 10 μ l mit 10 μ l Trypan Blue Stain in einem 500 μ l Reagiergefäß transferiert. Die angefärbte Zellsuspension wurde in Countess™ Cell Counting Chamber Slides pipettiert und mit Hilfe des Zellzählers gezählt. Für die Versuche wurde die gewünschte Zellzahl mit entsprechendem Nährmedium in ein 50 ml Röhrchen suspendiert und anschließend ausplattiert.

2.2.1.4 Isolation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Für die Isolierung von PBMC wurden zunächst 27 ml Blut mittels Li-Heparin Monovetten abgenommen. Die Blutproben stammten von freiwilligen gesunden Spendern. Für die Blutabnahme lag ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg vor (129/19). Die Proben wurden 2:1 mit PBS verdünnt und anschließend 30 ml dieser Suspension in ein 50 ml Röhrchen auf 7,5 ml Histopaque®-1077 geschichtet. Das Röhrchen wurde ohne Bremse für 24 min bei 700 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnten die PBMC zwischen Plasma und TrennungsmEDIUM isoliert werden (Abb. 4).

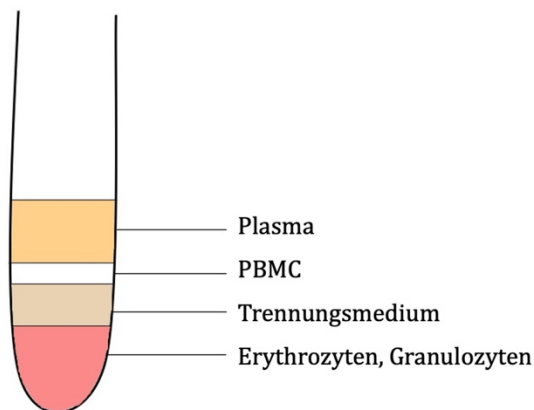


Abb. 4: Schematische Darstellung der Trennung der Blutbestandteile nach Dichtegradientenzentrifugation. Die Blutproben wurden verdünnt mit PBS auf Histopaque®-1077 geschichtet. Nach der 24-minütigen Zentrifugation sind Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Röhrchens. Über dem TrennungsmEDIUM befinden sich die PBMC. Die oberste Schicht ist das Blutplasma.

Die Zellen wurden mit einer 1 ml Pipette in ein neues Röhrchen überführt und bei 700 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet der PBMC wurde zweimal mit 1 ml PBS resuspendiert und erneut bei 700 g für 5 min zentrifugiert. Die Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus den Zellen erfolgte, wie in 2.2.3.1 beschrieben ohne zwischenzeitliches Einfrieren.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herunterregulierung der Signalwege in den Zellen

Zur Stimulation des STAT3-Signalweges wurden die Epithelzellen und Makrophagen auf 6-Loch-Platten transferiert. Für die AGS und CLS-103 Zelllinien wurden 5×10^5 Zellen pro Feld genutzt und für die Makrophagen etwa 3×10^6 Zellen pro Feld. Die N87 Zelllinie benötigte $7,5 \times 10^5 - 4,5 \times 10^6$ Zellen pro Feld, um die gewünschte Gesamtproteinmenge zu erreichen. Durch die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes (beschrieben in Kapitel 2.2.2.3) konnte die maximal erreichbare Zahl an Zellen für die Stimulation genutzt werden. Die adhärennten Epithelzellen wurden über Nacht im Inkubator belassen und am nächsten Tag dreimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in dem jeweiligen Medium ohne Zusätze inkubiert. Das Fehlen der Nährstoffe aus dem FBS führt zu einer Herunterregulierung der ablaufenden Signalwege in den Zellen, beispielsweise der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3. Dadurch ist es besser möglich, den Effekt der Stimulation mit einer unstimulierten Kontrolle zu vergleichen. Die Epithelzellen wurden für 24 h in nährstofffreiem Medium inkubiert, während dies bei den Makrophagen nur für 5 h der Fall war. Zum Herunterregulieren der intrazellulären Signalwege der Monozyten wurden etwa 30 ml Zellsuspension bei 700 g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde dreimal in 10 ml PBS resuspendiert und erneut wie im vorherigen Schritt zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend mit 7 ml nährstofffreien Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Es wurden etwa $1,5 \times 10^6$ Monozyten pro Feld auf eine 12-Loch-Platte aufgetragen. Die Inkubation mit nährstofffreiem Medium dauerte bei den Monozyten 6 h. Zusammenfassend folgt eine Tabelle der Versuchsschritte:

Tabelle 3: Verwendete Zellzahlen und Dauer der Hungerperiode

Zelllinie	Zellzahl	Zeit in nährstofffreiem Medium
AGS	5×10^5	24 h
CLS-103	5×10^5	24 h
J774.A1	3×10^6	5 h
N87	$7,5 \times 10^5 - 4,5 \times 10^6$	24 h
THP-1	$1,5 \times 10^6$	6 h
U-937	$1,5 \times 10^6$	6 h

2.2.2.2 Stimulation und Lyse der Zellen

Für die Stimulation der Zellen wurden 10 ng/ml IL-6, IL-11 oder Hyper-IL-6 (Hy-IL-6) in jeweils ein Feld der 6 oder 12-Loch-Platte pipettiert. Für den trans-Signalweg wurden zuvor 200 ng/ml sIL-6R α oder sIL-11R α mit 10 ng/ml IL-6 oder IL-11 in ein 500 μ l Reagiergefäß transferiert und danach in je ein Feld überführt. Als Negativkontrolle blieb ein Feld unbehandelt. Die Monozytenzelllinien THP-1 und U-937 wurden mit 50 ng/ml Hy-IL-6 stimuliert, da bei 10 ng/ml kein P-STAT3 Signal nachgewiesen werden konnte. Die Stimulation bei 37°C im Inkubator wurde nach 15 min beendet. Die Platte wurde mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und je nach Konfluenz 60 – 200 μ l Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Mit dem Zellschaber wurden die Zelltrümmer mit dem Lysepuffer in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Reagiergefäße bei 1200 g zentrifugiert, um die verbliebenen Zellreste von dem Lysat zu trennen. Das Lysat wurde bei -20°C eingefroren.

2.2.2.3 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Lysate wurde das DC Protein Assay Kit von Bio-RAD verwendet. In eine 96-Loch-Platte wurden je 5 μ l Lysat oder Standard in Duplikaten pipettiert. Anschließend wurden 25 μ l Reagenz A und Reagenz S im Verhältnis 20:1 und 200 μ l Reagenz B hinzugegeben. Die Platte wurde vor der Messung für 15 min auf dem Schüttler belassen. Mit Hilfe des Plattenreaders Glomax-Multi Detection System von Promega wurde die Absorption bei 650 nm gemessen und die Konzentration der Proteine mittels einer bovines Serumalbumin (BSA)-Standardgerade berechnet.

2.2.2.4 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach Molekülgröße wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli genutzt (Laemmli, 1970). Für die Elektrophorese wurde das PowerPac Basis mit einer Spannung von 130 V verwendet. Das Gel wurde mit 10 Probenaschen und in einer Breite von 12 mm pro Tasche hergestellt. Die Acrylamidkonzentration betrug 10% beim Trenngel und 5% beim Sammelgel. Für die Beladung der einzelnen Taschen wurden zunächst jeweils 40 μ g Gesamtprotein aus dem Lysat mit 5x oder 2x Laemmlipuffer für 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Laemmlipufferkonzentration wurde an die Gesamtproteinkonzentration angepasst, so dass ein Volumen von 40 μ l nicht überschritten wurde. Das Volumen an genutztem Laemmli blieb pro Gel identisch. Als Größenmarker wurde der Precision Plus WesternC Standards verwendet.

2.2.2.5 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Transfermembran mit Hilfe der semi-dry Western Blot Methode übertragen. Die Membran, sechs Filterpapiere und das Acrylamidgel wurden zuvor in Transferpuffer inkubiert. Das Gel mit den zu übertragenden

Proteinen wurde auf die befeuchteten Filterpapiere und die Membran gelegt. Auf das Gel wurden erneut drei Filterpapiere platziert und auftretende Luftblasen nach außen gestrichen. Der Transfer fand bei einer konstanten Spannung von 25 V mit einer maximalen Stromstärke von 1 A für 40 min statt. Nach dem Transfer wurden die Banden des Größenmarkers mit dem WesternSure® Pen markiert. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocking Puffer auf dem Plattformschüttler blockiert. Der Primärantikörper wurde 1:1000 in 5%igen Lösung von BSA in *Tris buffered Saline* und Tween 20 (TBS-T) verdünnt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Plattformschüttler. Der Sekundärantikörper, 1:3000 verdünnt in 5% Milchpulver in TBS-T, wurde nach dreimaligem, dreiminütigem Waschen mit TBS-T für eine Stunde auf der Membran belassen. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal in TBS-T gewaschen und für 2 min in Immobilon Western Meerrettichperoxidase (HRP) Substrat inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit dem Western Blot Entwickler Imager Fluor Chem E von Protein Simple. Nach der Detektion wurde die Membran erneut dreimal in TBS-T gewaschen und für 20 min mit Stripping Puffer inkubiert. Um die Membran erneut mit Blocking Puffer zu behandeln, wurde diese ebenfalls zuvor dreimal mit TBS-T gewaschen. Eine erneute Behandlung mit Antikörpern war wie oben beschrieben möglich.

2.2.2.6 Statistische Auswertung

Die Signalstärke der einzelnen Banden wurde mit dem Programm ImageStudioLite ausgewertet. Es wurde das Verhältnis der P-STAT3 zu STAT3 Signalintensität gebildet und wiederum in das Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle gesetzt. Unterschiede zu der unstimulierten Kontrolle wurden mit einem one-way ANOVA mit Dunn's Post-hoc Test auf Signifikanz geprüft. Die Ergebnisse wurden bei einem p-Wert < 0,05 als signifikant angegeben.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Extraktion und Konzentrationsmessung

Für die Isolation und Aufreinigung der RNA aus den Zellen wurde das NucleoSpin RNA-Kit von Machery-Nagel nach den Angaben des Herstellers genutzt. Die kultivierten Zellen wurden mit einer Zellzahl von 5×10^6 Zellen eingesetzt. Bei den PBMC erfolgte keine Zellzählung, da die gesamte Menge an Zellpellet genutzt wurde. Um eine höhere Konzentration an RNA zu erhalten, wurde bei den Primärzellen abweichend vom Protokoll mit 40 μl Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des ScanDrop² gemessen. Zum Überprüfen der Reinheit der Proben diente der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm. Dieser lag bei allen kultivierten Zellen im optimalen Bereich zwischen 2,0 und 2,3. Bei zwei Proben der PBMC war der Wert zwischen 1,95 und 1,99.

2.2.3.2 Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure

Für die Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurde von den kultivierten Zellen und den primären murinen Makrophagen 2 μg RNA verwendet. Aufgrund der geringeren RNA-Konzentration der PBMC wurden für die Synthese nur 1 μg RNA genutzt. Folgender Ansatz wurde 5 min bei 65°C inkubiert:

RNA	1 bzw. 2 μg
oligo-dT-Primer	100 μM
ddH ₂ O	ad 13 μl

Nach dem Abkühlen auf 4°C wurde der folgende Mastermix hinzugegeben:

5X Reaction Buffer for RT	4 μl
dNTP-Mix (10 mM)	2 μl
Revert Aid Reverse Transcriptase	1 μl

Der Ansatz wurde 60 min bei 42°C und 10 min bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

2.2.3.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Nach der RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des FAST SYBR® Green Master Mix die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) durchgeführt, um eine relative Quantifizierung von mRNA vorzunehmen.

Für die qPCR wurde folgender Ansatz verwendet:

SYBR Green Master Mix	5 µl
Forward Primer (10 µM)	0,4 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,4 µl
Wasser	3,7 µl
cDNA	0,5 µl (25 bzw. 50 ng Ausgangs-RNA)

Für die Auswertung der qPCR wurde das QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systems genutzt mit den folgenden Temperaturzyklen:

95°C	10 min	} 40 Zyklen
95°C	15 s	
60°C	1 min	

Zur Auswertung der Daten wurde die komparative CT-Methode ($2^{-\Delta CT}$) angewandt. Die Ergebnisse der humanen Zellkulturproben wurden auf die endogenen Kontrollen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Aktin bezogen. Für die murinen Zellkulturproben und die Primärzellproben wurde lediglich das endogene GAPDH als Vergleich genutzt. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.2.4 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

2.2.4.1 Probengewinnung

Für die Analyse der Zytokinsekretion wurden die AGS, CLS-103, J774.A1, THP-1 und U-937 Zelllinien in 12-Loch-Platten ausgesät. Die N87 Zelllinie konnte nicht konfluent auf die Platte ausgesät werden und wurde daher bei der Analyse der Zytokinsekretion vernachlässigt. Bei den Suspensionszellen und Makrophagen wurden $7,5 \times 10^5$ Zellen in ein Feld mit 1 ml Medium gegeben. Bei den adhärennten Zellen wurden 3×10^5 Zellen in ein Feld mit 1 ml Medium pipettiert. Alle Zelllinien außer CLS-103 wurden zusätzlich mit 100 ng/ml TGF- β stimuliert, da eine Stimulation mit TGF- β zu einer erhöhten Sekretion von IL-6 und IL-11 in den Zellüberstand führen kann (Pelaia et al., 2007). Der Überstand wurde nach 24 h, 48 h und 72 h abgenommen und bei 18.000 g für 15 min zentrifugiert, um die Zellen aus dem Medium zu entfernen. Danach wurden die Überstände in neue Reagiergefäße überführt und bei -20°C eingefroren.

2.2.4.2 Durchführung

Der *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) ist eine immunologische Methode zum Nachweis von Proteinen, Viren oder niedermolekularen Verbindungen. Bei dem Sandwich-ELISA wird eine Mikrotiterplatte mit einem primären Antikörper (Fängerantikörper) beschichtet (Abb. 5A). Um unspezifische Bindungen zu verhindern wird die Platte gewaschen und blockiert. Anschließend kann das gesuchte Antigen in den Proben an den Fängerantikörper binden (Abb. 5B).

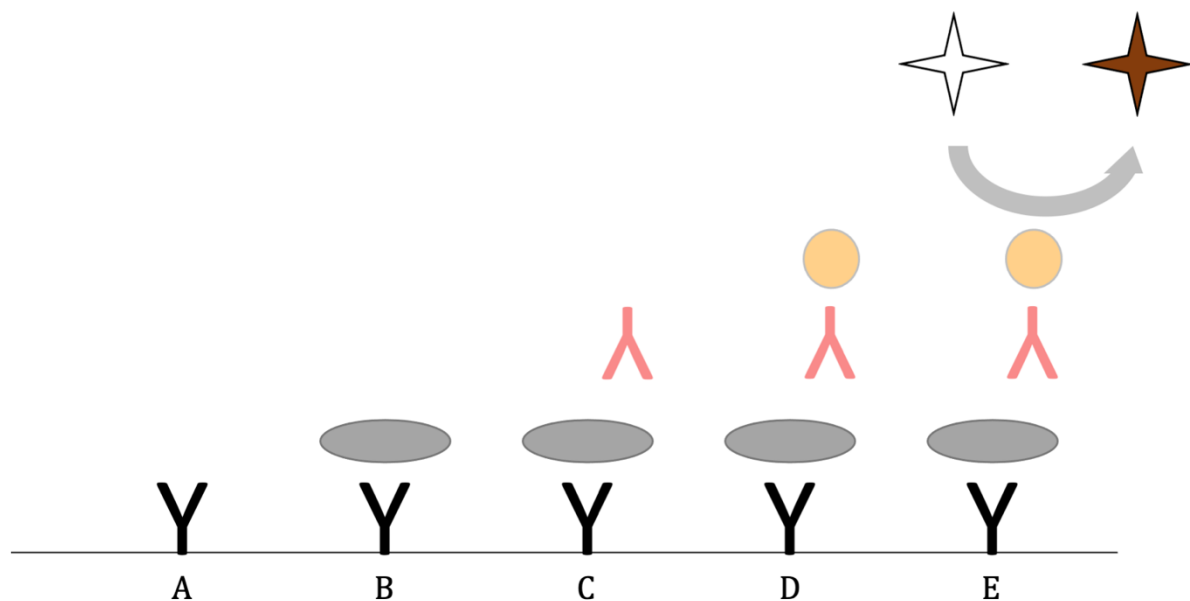


Abb. 5: Sandwich-Elisa. A: Fängerantikörper gebunden an Mikrotiterplatte; B: Antigenbindung; C: Detektorantikörper und Fängerantikörper gebunden an Antigen; D: Bindung des Enzyms; E: Umsetzung des Substrats.

Ein zweiter Antikörper (Detektorantikörper) bindet an eine andere Stelle des Antigens (Abb. 5C). An den Detektorantikörper ist Biotin fixiert. Biotin bindet an das Enzymkonjugat bestehend aus Streptavidin und Peroxidase (Abb. 5D). Nach Zugabe des Substrats kann das Enzymkonjugat eine Farbreaktion auslösen (Abb. 5E). Die Farbreaktion wird durch die Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Das Signal kann mit Hilfe eines Plattenlesers nachgewiesen werden (Engvall und Perlmann, 1971). Zur Analyse der IL-6 oder IL-11 Konzentration im Überstand der kultivierten Zellen wurden DuoSet ELISA Kits für humanes IL-6, humanes IL-11, murines IL-6 und murines IL-11 laut Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden unverdünnt in Triplikaten aufgetragen. Der Standard wurde ebenfalls in Triplikaten aufgetragen. Für die Messung wurde der ELISA Plattenleser CLARIOstar® Plus von BMG Labtech verwendet und die Messung bei 450 nm durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Stimulation des Signalweges

Zur Detektion der Induktion des STAT3-Signalweges nach Zytokinstimulation wurden alle Zelllinien, wie in den Kapiteln 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschrieben, mit IL-6, IL-11, Hy-IL-6 stimuliert. Der IL-6 trans-Signalweg konnte durch die Stimulation mit dem IL-6R α und IL-6 nachgewiesen werden. Stellvertretend für jede Zellart wurde der Versuch nur mit N87, U-937 und J774.A1 durchgeführt. Zusätzlich wurde der IL-11 trans-Signalweg ebenfalls bei den genannten Zelllinien analysiert. Zum Nachweis der Phosphorylierung von STAT3 wurde ein Western Blot durchgeführt. Hy-IL-6 diente dabei als Positivkontrolle. Das synthetisch hergestellte Zytokin besteht aus IL-6 kovalent gebunden an sIL-6R α und hat deshalb eine höhere Aktivität als IL-6 + sIL-6R α (Fischer et al., 1997). Die Signalstärke der einzelnen Banden wurde mit dem Programm ImageStudioLite ausgewertet. Es wurde das Verhältnis der P-STAT3 zu STAT3 Signalintensität gebildet und wiederum in das Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle gesetzt. Die Zelllinie CLS-103 zeigte eine 3,4-fache Erhöhung der STAT3 Aktivierung nach IL-6 Stimulation im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Es konnte allerdings keine erhöhte Phosphorylierung von STAT3 nach der IL-11 Stimulation nachgewiesen werden. Hy-IL-6 führte zu einer signifikanten Steigerung der P-STAT3-Signalintensität (29-fache) (Abb. 6A). Bei der humanen AGS Zelllinie konnte ebenfalls eine leichte Stimulation des Signalweges durch IL-6 gezeigt werden (2,4-fache). Hier war auch eine 1,6-fache Steigerung der STAT3 Aktivierung nach IL-11 Stimulation nachweisbar. Nach Stimulation mit der Positivkontrolle Hy-IL-6 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von STAT3 (6,5-fache) (Abb. 6B). Bei der N87 Zelllinie konnte eine 20-fache Steigerung des Signalweges nach IL-6 Stimulation nachgewiesen werden. Bei der humanen Magenkarzinomzelllinie wurde die STAT3 Phosphorylierung nach IL-11 Stimulation um das 7,7-fache erhöht. Es zeigte sich außerdem eine 48-fache höhere Signalintensität von aktiviertem STAT3 durch den IL-6 trans-Signalweg und eine 22-fache Steigerung der STAT3-Signalintensität nach der Stimulation mit sIL-11-R α und IL-11. Eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von STAT3 war nach der Stimulation mit Hy-IL-6 nachweisbar (120-fache) (Abb. 6C).

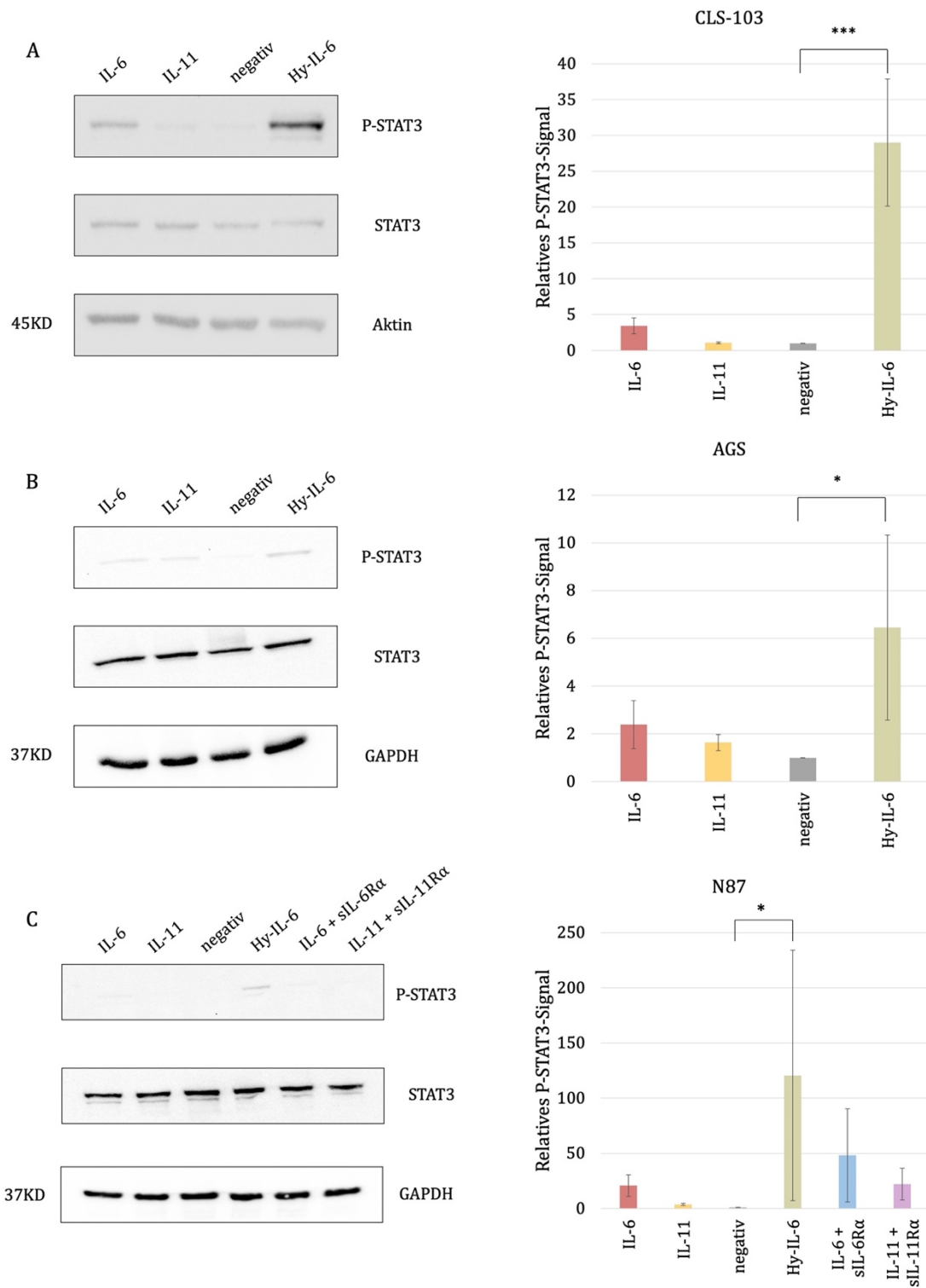


Abb. 6: Western Blot Analyse der STAT3-Phosphorylierung nach der 15-minütigen Stimulation mit 10 ng/ml IL-6, IL-11, Hy-IL-6 und einer unstimulierten Kontrolle (neg) bei A: CLS-103; B: AGS. Western Blot Analyse der STAT3-Phosphorylierung nach der 15-minütigen Stimulation mit 10 ng/ml IL-6, IL-11, Hy-IL-6 und 10 ng/ml IL-6 + 200 ng/ml sIL-6R α ; 10 ng/ml IL-11 + 200 ng/ml sIL-11R α und einer unstimulierten Kontrolle (neg) bei C: N87. Alle Versuche wurden mit drei unabhängigen Proben im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei Experimenten und ein repräsentatives Beispiel. Die statistische Signifikanz wurde bestimmt durch den Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mittels one-way ANOVA mit Dunn's Post-hoc Test. *, P 0.05; ***, P 0.001.

Eine signifikante Aktivierung von STAT3 ist bei der Monozytenzelllinie THP-1 sichtbar, wenn sie mit IL-6 stimuliert wird. Es zeigte sich eine 144-fache höhere STAT3 Phosphorylierung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Stimulation mit IL-11 hatte keinen Effekt auf die Zelllinie. Die Konzentration von Hy-IL-6 musste bei den THP-1 auf 50 ng/ml erhöht werden, um eine Steigerung der Signalintensität von P-STAT3 zu erkennen (50-fache) (Abb. 7A). Die ebenfalls humane Monozytenzelllinie U-937 zeigte ähnliche Ergebnisse wie die THP-1. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der STAT3 Aktivierung (77-fache) nach IL-6 Stimulation. Nach IL-11 Stimulation ließ sich keine gesteigerte Phosphorylierung von STAT3 nachweisen. Die Konzentration Positivkontrolle Hy-IL-6 wurde ebenfalls auf 50 ng/ml erhöht um eine Zunahme der Signalintensität nachzuweisen (30-fache). Eine signifikante Erhöhung der STAT3 Aktivierung durch den IL-6 trans-Signalweg war bei der Monozytenzelllinie U-937 mit einer 62-fachen Steigerung sichtbar. Es zeigte sich allerdings keine erhöhte Phosphorylierung von STAT3 bei einer Stimulation mit sIL-11-R α und IL-11 (Abb. 7B). Die Makrophagenzelllinie J774.A1 zeigte eine ähnliche Steigerung der Phosphorylierung von STAT3 (19-fache) nach IL-6 Stimulation wie die N87-Zelllinie. Die Stimulation mit IL-11 hatte keinen Effekt auf die Makrophagenzelllinie. Nach der Stimulation des IL-6 trans-Signalweges zeigte sich eine signifikante 28-fache erhöhte Signalintensität von P-STAT3. Bei der Zelllinie konnte eine 7,4-fache Erhöhung der Phosphorylierung von STAT3 nach Stimulation des IL-11 trans-Signalweges nachgewiesen werden. Hy-IL-6 in der Konzentration von 10 ng/ml zeigte eine signifikante 53-fache erhöhte Aktivierung von STAT3 (Abb. 7C).

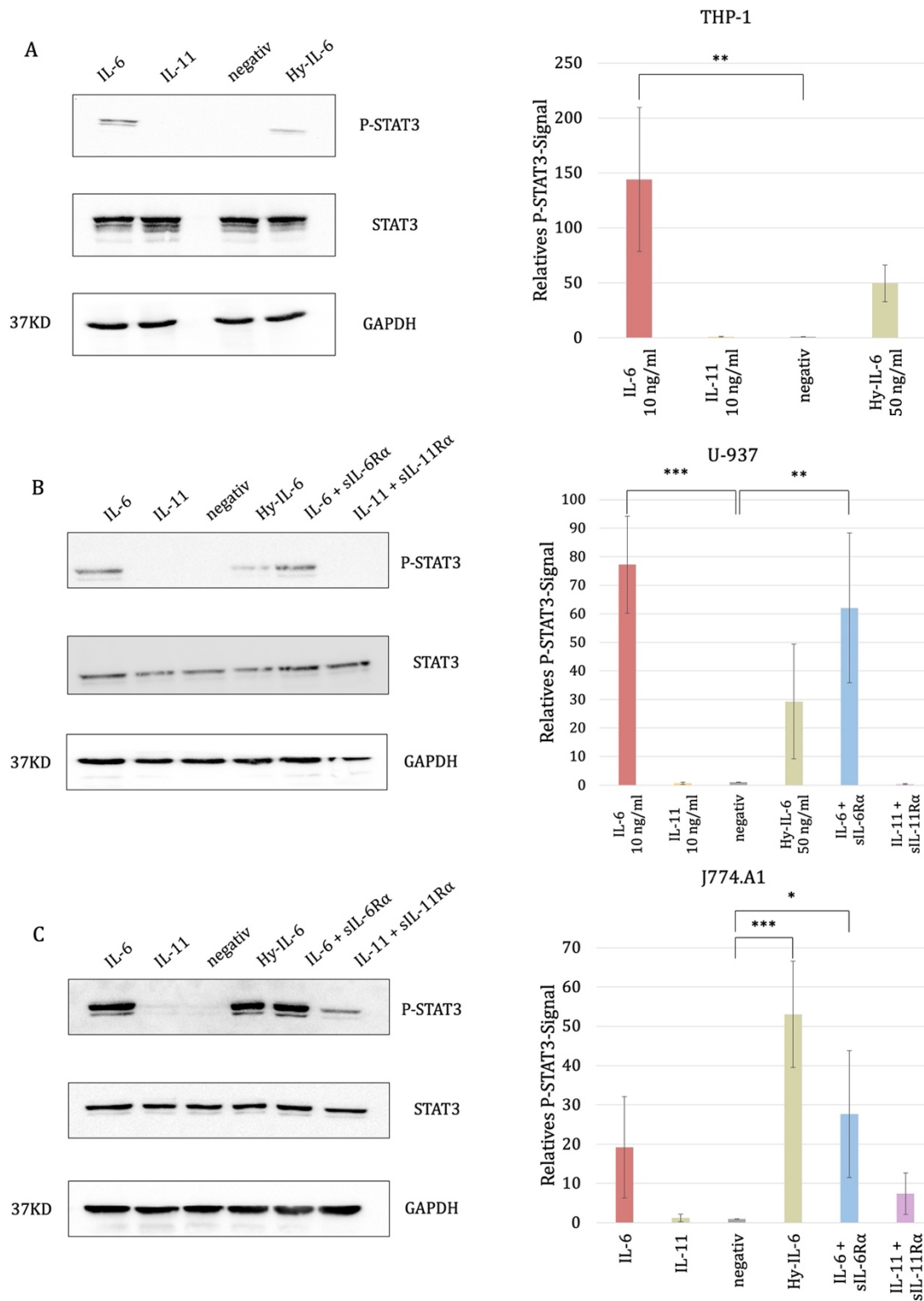


Abb. 7: Western Blot Analyse der STAT3-Phosphorylierung nach der 15-minütigen Stimulation mit 10 ng/ml IL-6, IL-11 und 50 ng/ml Hy-IL-6 und einer unstimulierten Kontrolle (neg) bei A: THP-1. Western Blot Analyse der STAT3-Phosphorylierung nach der 15-minütigen Stimulation mit 10 ng/ml IL-6, IL-11, 50 ng/ml Hy-IL-6, 10 ng/ml IL-6 + 200 ng/ml sIL-6R α ; 10 ng/ml IL-11 + 200 ng/ml sIL-11R α und einer unstimulierten Kontrolle (neg) bei B: U-937. Western Blot Analyse der STAT3-Phosphorylierung nach der 15-minütigen Stimulation mit 10 ng/ml IL-6, IL-11, Hy-IL-6, 10 ng/ml IL-6 + 200 ng/ml sIL-6R α ; 10 ng/ml IL-11 + 200 ng/ml sIL-11R α und einer unstimulierten Kontrolle (neg) bei C: J774.A1. Alle Versuche wurden mit drei unabhängigen Proben im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei Experimenten und ein repräsentatives Beispiel. Die statistische Signifikanz wurde bestimmt durch den Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mittels one-way ANOVA mit Dunn's Post-hoc Test. *, P 0.05; **, P 0.01; ***, P 0.001.

Zusammenfassend kann man erkennen, dass die Monozyten ein deutlich höheres Signal an aktiviertem STAT3 nach IL-6 Stimulation aufweisen als die Epithelzellen und die Makrophagen. Für eine gesteigerte Signalintensität von P-STAT3 nach Hy-IL-6 Stimulation bei den Monozyten musste die Konzentration allerdings auf 50 ng/ml erhöht werden. Die anderen Zelllinien zeigten nach 10 ng/ml Hy-IL-6 Stimulation dagegen eine deutliche Aktivierung von STAT3. Eine gesteigerte Phosphorylierung von STAT3 nach IL-11 Stimulation konnte nur bei der AGS und N87 Zelllinie gezeigt werden. Auf die anderen Zelllinien hatte die IL-11 Stimulation keinen Effekt. Der IL-6 trans-Signalweg konnte bei allen drei Zelllinien nachgewiesen werden. Der IL-11 trans-Signalweg zeigte eine STAT3 Aktivierung lediglich bei den Makrophagen und Epithelzellen (Abb. 8).

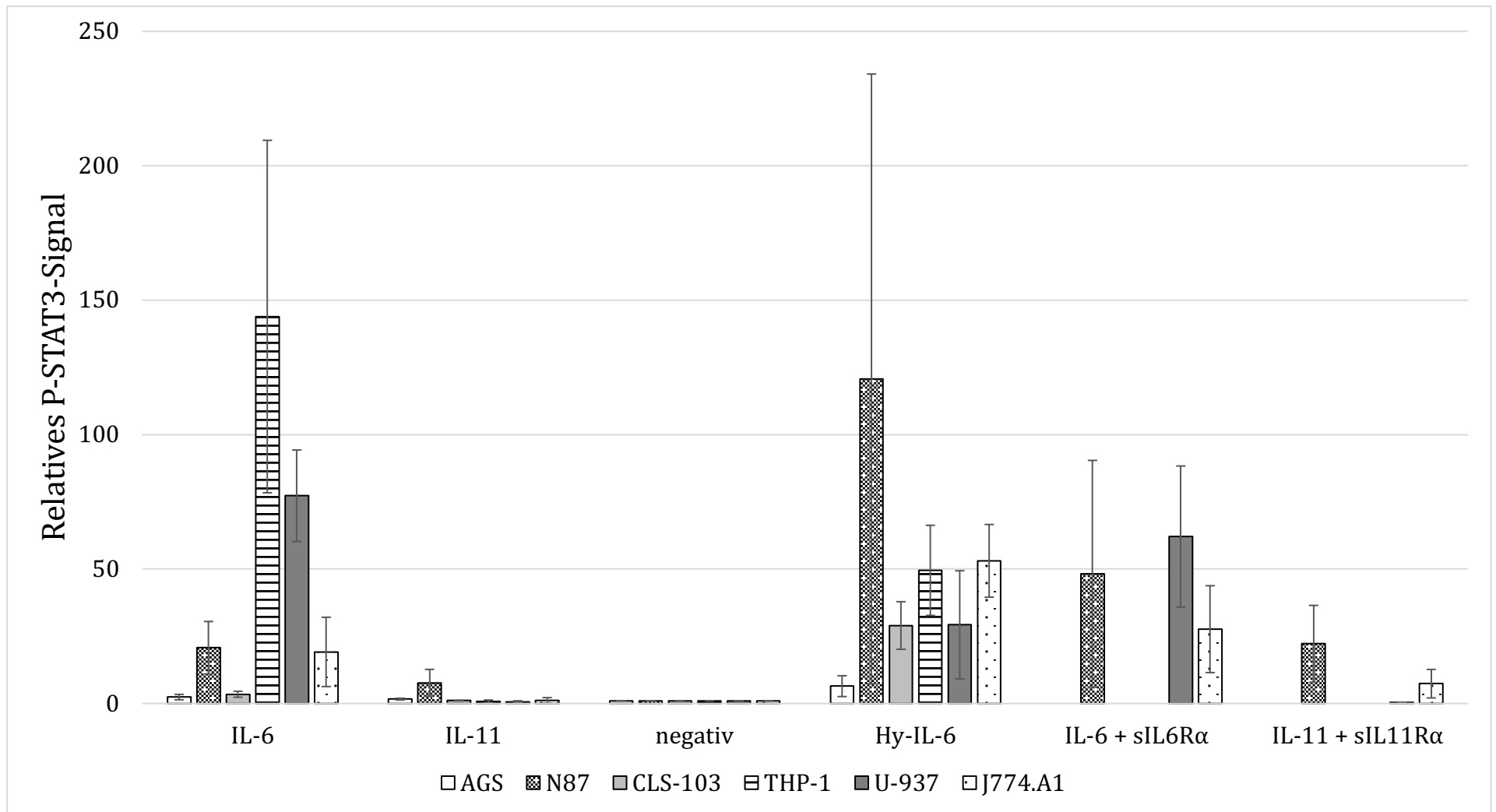


Abb. 8: Vergleich der Signalintensität von P-STAT3 nach der 15-minütigen Stimulation mit den verwendeten Zytokinen und Auswertung mittels Western Blot. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen P-STAT3-Signale \pm SD von drei Experimenten. Es zeigt sich vor allem eine stärkere STAT3 Aktivierung nach IL-6 Stimulation bei den Monozyten. Eine Phosphorylierung von STAT3 nach IL-11 Stimulation konnte nur bei den humanen Magenkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Der IL-6 trans-Signalweg konnte bei allen drei untersuchten Zelllinien eine STAT3 Aktivierung nachweisen. Der IL-11 trans-Signalweg dagegen zeigte eine STAT3 Phosphorylierung lediglich bei den Makrophagen und Epithelzellen.

3.2 Sekretion von IL-6 und IL-11

Um zu analysieren, ob die hier untersuchten Zelllinien IL-6 und IL-11 sekretieren, wurden die Zellen zunächst ohne Stimulus für 24, 48, 72 Stunden kultiviert und anschließend mittels ELISA die Menge an Zytokin in den Überständen der Zellen quantifiziert. Hierbei wurden nur die AGS, CLS-103, J774.A1, THP-1 und U-937 Zellreihen untersucht. Die N87 Zelllinie konnte nicht konfluent auf die 6-Loch-Platte ausgesät werden. Bei allen analysierten Zelllinien konnte nach 24, 48, 72 Stunden keine Sekretion von IL-6 nachgewiesen werden (Abb. 9A). Alle genannten Zelllinien außer CLS-103 wurden daher zusätzlich für die genannten Zeiträume mit 100 ng/ml TGF- β stimuliert. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Stimulation mit TGF- β zu einer erhöhten Sekretion von IL-6 und IL-11 in Zellüberständen führen kann (Pelaia et al., 2007). Nach der Stimulation mit 100 ng/ml TGF- β konnte ebenfalls keine IL-6 Produktion in allen gemessenen Zeitpunkten gezeigt werden (Abb. 9B).

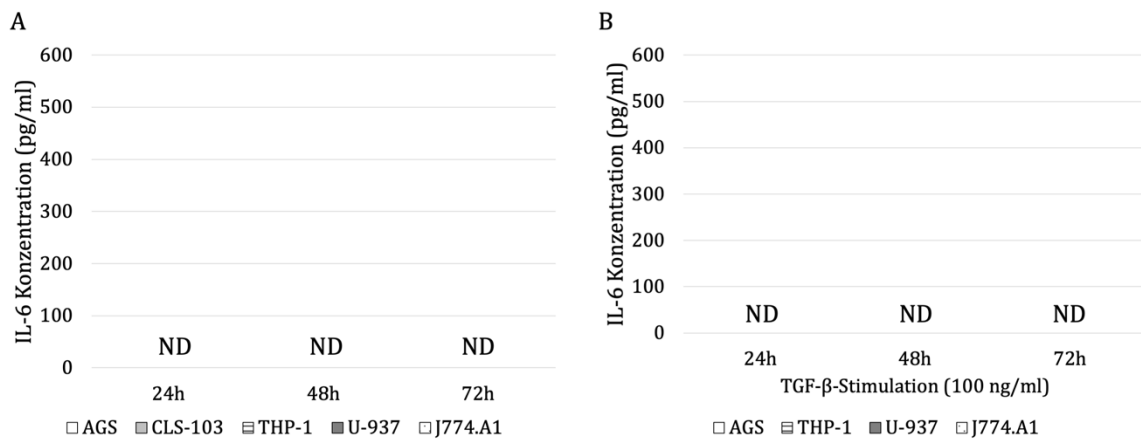


Abb. 9: Analyse der IL-6 Sekretion in den Zellüberständen. A: Der Überstand der Zellreihen AGS, CLS-103, THP-1, U-937, J774.A1 wurden nach 24, 48, 72 Stunden untersucht. B: Eine zusätzliche Stimulation mit 100 ng/ml TGF- β erfolgte für die Zellreihen AGS, THP-1, U-937 und J774.A1. Alle Versuche wurden mit drei unabhängigen Proben durchgeführt.

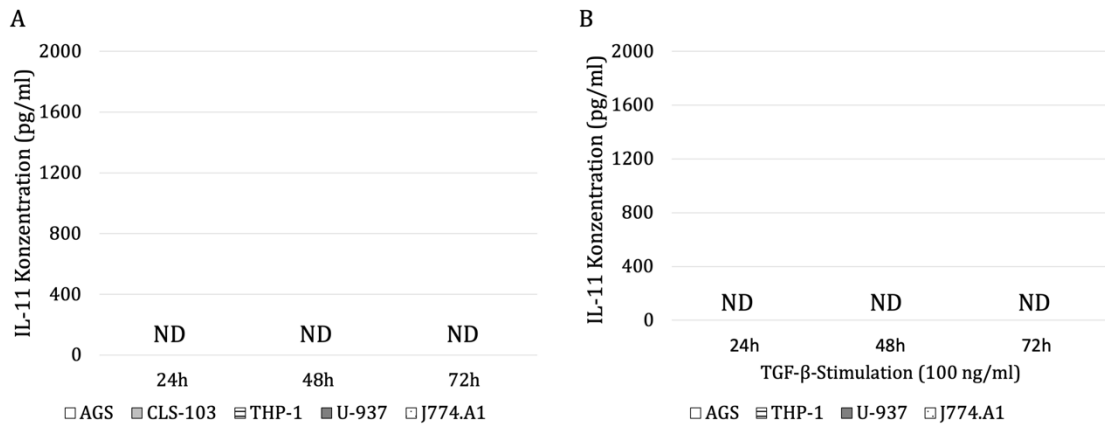


Abb. 10: Analyse der IL-11 Sekretion in den Zellüberständen. A: Der Überstand der Zellreihen AGS, CLS-103, THP-1, U-937, J774.A1 wurden nach 24, 48, 72 Stunden untersucht. B: Eine zusätzliche Stimulation mit 100 ng/ml TGF- β erfolgte für die Zellreihen AGS, THP-1, U-937 und J774.A1. Alle Versuche wurden mit drei unabhängigen Proben durchgeführt.

Die gleichen Ergebnisse zeigten die Analysen der IL-11 Sekretion. Nach keinem der angegebenen Zeitpunkte wurde ein IL-11 Signal in den Überständen gemessen (Abb. 10A). Nach der Stimulation mit TGF- β konnte ebenso keine IL-11 Sekretion nachgewiesen werden (Abb. 10B).

3.3 mRNA Expression der primären Zellen und Zelllinien

Um das Expressionsmuster der Zytokin- und Zytokinrezeptor-mRNA zu analysieren wurde eine qPCR der kultivierten Zellen und PBMC sowie primären murinen Makrophagen durchgeführt. Die Expression von IL-6, IL-11, IL-6R α , IL-11R α und gp130 kodierender mRNA zur relativen Quantifizierung wurde, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, untersucht. Es wurden die sechs Zellkulturlinien (AGS, CLS-103, J774.A1, N87, THP-1, U-937), humane PBMC und primäre murine Makrophagen analysiert. Zur Auswertung der Daten wurde die komparative CT-Methode ($2^{-\Delta CT}$) angewandt. Bei den humanen epithelialen Zellen AGS und N87 wurde die Expression relativ zu GAPDH und Aktin gemessen. Beide Zelllinien zeigten eine stärkere mRNA Expression von IL-6 und IL-6R α im Vergleich zu IL-11 und IL-11R α . Das Gen *Interleukin 6 Signal Transducer (IL6ST)* kodiert die β -Untereinheit des Rezeptorkomplexes gp130 und wies eine deutlich höhere mRNA Expression auf (Abb. 11A;B).

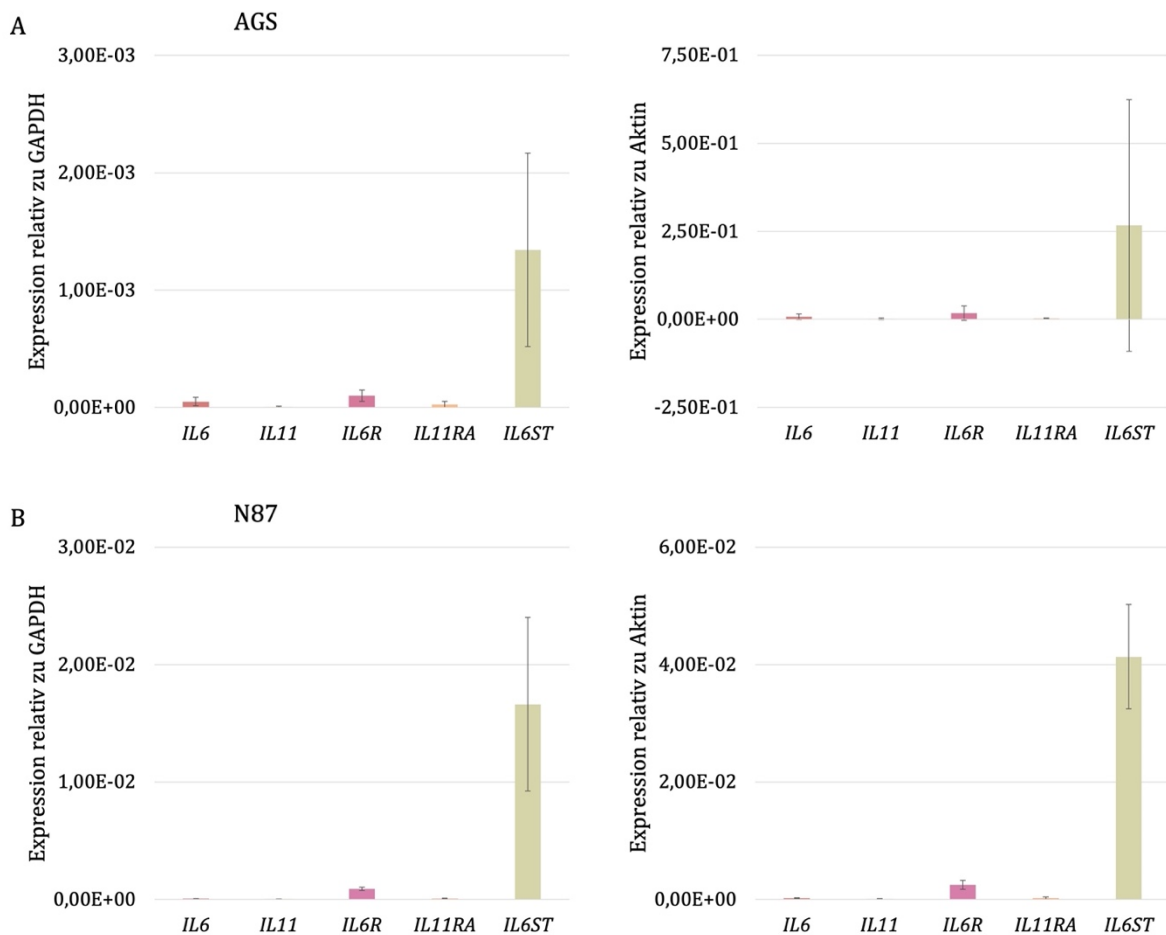


Abb. 11: Auswertung der mRNA Expression der humanen Magenkarzinomzelllinien. Die RNA wurde wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben isoliert und gereinigt. Die reverse Transkription und die qPCR wurden wie in Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. A: Expression der mRNA relativ zu GAPDH und Aktin für die AGS Zelllinie. Dargestellt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta CT} \pm SD$ von vier unabhängigen Experimenten. B: Expression der mRNA relativ zu GAPDH und Aktin für die N87 Zelllinie. Dargestellt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta CT} \pm SD$ von drei unabhängigen Experimenten.

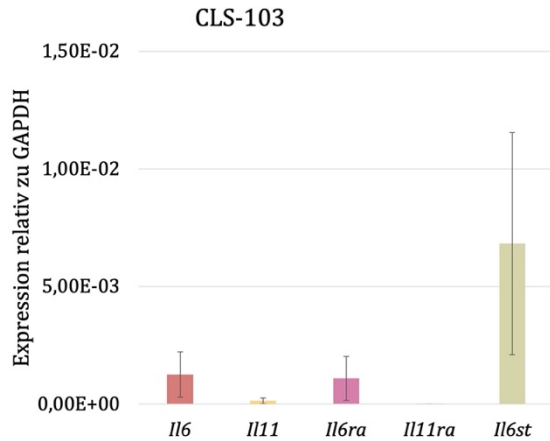


Abb. 12: Auswertung der mRNA Expression der murinen Magenkarzinomzelllinie CLS-103. Die RNA wurde wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben isoliert und gereinigt. Die reverse Transkription und die qPCR wurden wie in Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Die Expression der mRNA wurde relativ zu GAPDH ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta CT} \pm SD$ von drei unabhängigen Experimenten.

Die murine kultivierte Zelllinie CLS-103 zeigte ähnliche Ergebnisse. Bei der murinen Zelllinie wurde die Expression nur relativ zu GAPDH analysiert. IL-6 und IL-6R α wurden ebenfalls stärker exprimiert als IL-11 und dessen spezifischer Rezeptor. Die IL-11 und IL-11R α Expression war nur schwach nachweisbar. Zudem konnte auch hier eine höhere gp130 mRNA Expression nachgewiesen werden (Abb. 12). Die kultivierten Monozyten THP-1 und U-937 zeigten dagegen ein anderes Expressionsmuster. Die Expression der Zielgene von den humanen Monozytenzelllinien wurde ebenfalls relativ zu GAPDH und Aktin ausgewertet. Bei beiden Zelllinien fiel eine hohe IL-6R α mRNA Expression auf im Gegensatz zu allen anderen gemessenen Zytokinen oder Zytokinrezeptoren. Die gp130 mRNA Expression war bei den Monozyten höher als die Zytokine und der IL-11R α . Diese wurden nur schwach exprimiert (Abb. 13A;B).

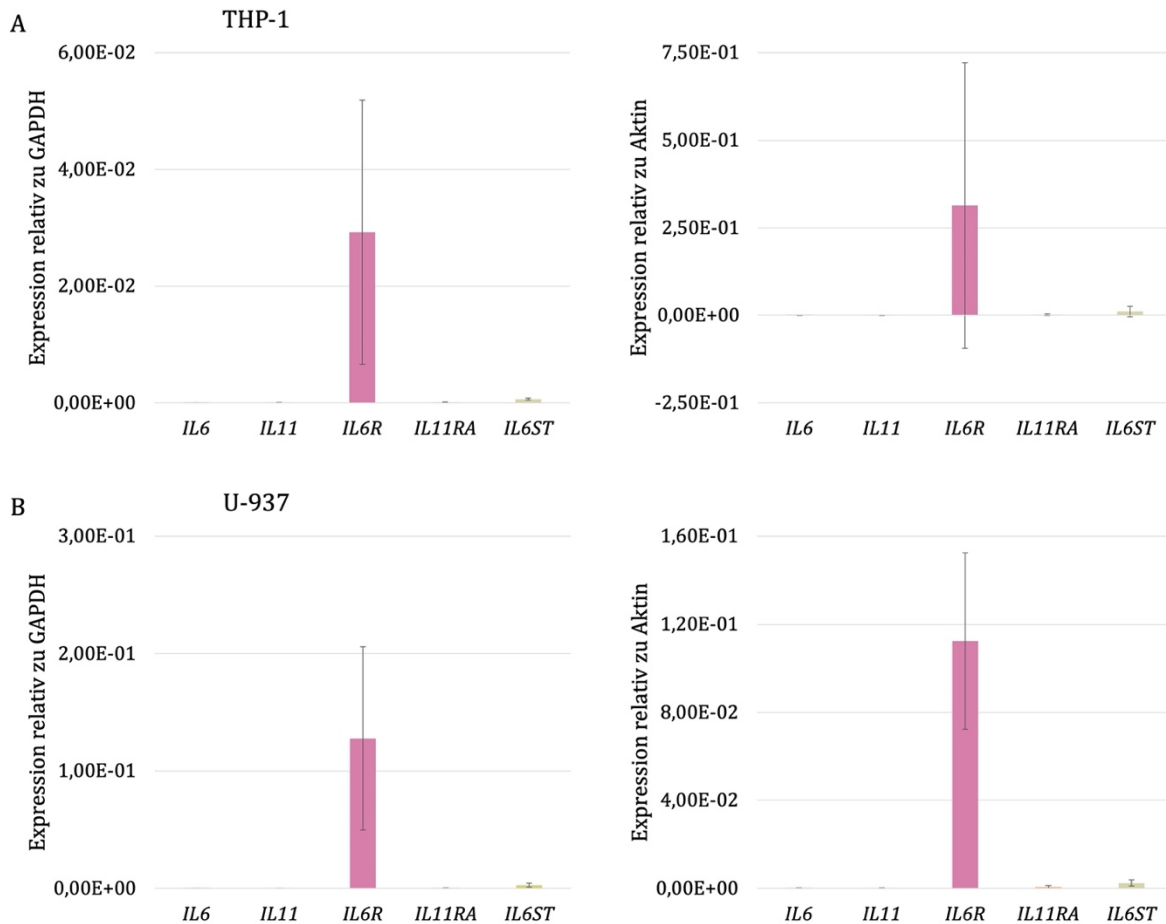


Abb. 13: Auswertung der mRNA Expression der humanen Monozytenzelllinien. Die RNA wurde wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben isoliert und gereinigt. Die reverse Transkription und die qPCR wurden wie in Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. A: Expression der mRNA relativ zu GAPDH und Aktin für die THP-1 Zelllinie. Dargestellt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta CT} \pm SD$ von drei unabhängigen Experimenten. B: Expression der mRNA relativ zu GAPDH und Aktin für die U-937 Zelllinie. Dargestellt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta CT} \pm SD$ von fünf unabhängigen Experimenten.

Bei der murinen Makrophagenzelllinie J774.A1 war die IL-6, IL-6R α und gp130 mRNA Expression höher als die von IL-11 und IL-11R α . Bei der Makrophagenzelllinie war die gp130 Expression ebenfalls am stärksten, gefolgt von dem IL-6R α und anschließend IL-6 (Abb. 14).

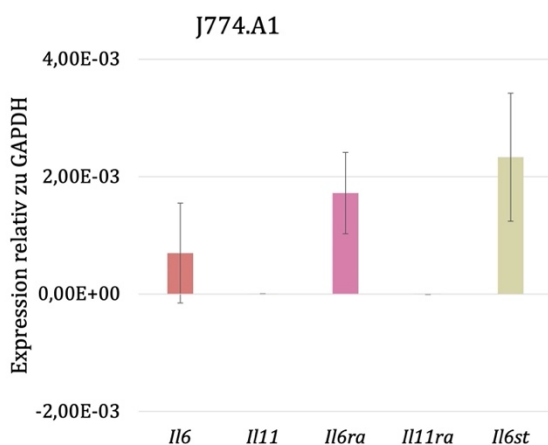


Abb. 14: Auswertung der mRNA Expression der murinen Makrophagenzelllinie J774.A1. Die RNA wurde wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben isoliert und gereinigt. Die reverse Transkription und die qPCR wurden wie in Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Die Expression der mRNA wurde relativ zu GAPDH ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta CT} \pm SD$ von drei unabhängigen Experimenten.

Bei den PBMC fiel eine starke IL-6R α und gp130 mRNA Expression im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen auf. Die IL-11 und die IL-11R α mRNA Expression war auch bei den PBMC nur schwach nachweisbar (Abb. 15A). Bei den primären Mausemakrophagen war IL-6, IL-6R α und gp130 ebenfalls stärker exprimiert als IL-11 und IL-11R α . Allerdings war hier IL-6 am stärksten exprimiert, gefolgt von dem IL-6R α und anschließend gp130 (Abb. 15B).

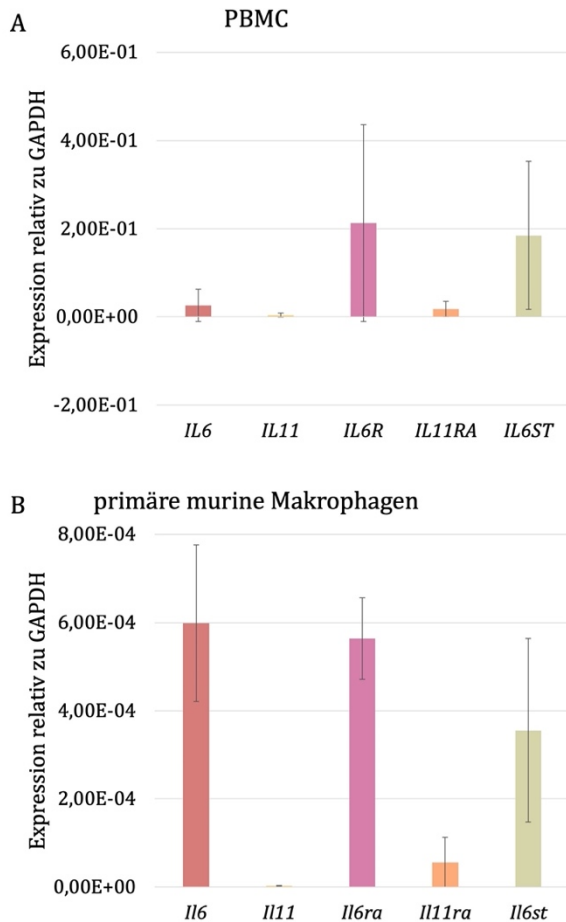


Abb. 15: Auswertung der mRNA Expression der Primärzellen. Die RNA wurde wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben isoliert und gereinigt. Die reverse Transkription und die qPCR wurden wie in Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. A: Expression der mRNA relativ zu GAPDH für die PBMC. Dargestellt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta CT} \pm SD$ von drei unabhängigen Experimenten. B: Expression der mRNA relativ zu GAPDH für die primären murinen Makrophagen. Dargestellt sind die Mittelwerte $2^{-\Delta CT} \pm SD$ von drei unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich der verschiedenen Zelllinien fällt auf, dass bei den epithelialen Zellen die gp130 mRNA Expression am stärksten war. Die Monozyten zeigten dagegen eine deutlich höhere IL-6R α Expression und eine weniger starke gp130 mRNA Expression als die anderen Zelllinien. Die PBMC hatten ähnlich wie die Monozyten Zelllinien eine starke IL-6R α mRNA Expression. Allerdings zeigten sie ebenfalls eine ähnlich starke gp130 mRNA Expression. Die primären Mausmakrophagen hatten eine höhere IL-6, IL-6R α und gp130 mRNA Expression als IL-11 und dessen spezifischer Rezeptor. Die IL-11 und IL-11R α mRNA Expression war bei allen Zelllinien und Primärzellen nur gering nachweisbar (Abb. 16). Die Ergebnisse der mRNA Expressionsmuster passen zu den Ergebnissen der Stimulationsexperimente. Der geringe Nachweis IL-11R α mRNA lässt sich mit der kaum nachweisbaren STAT3 Aktivierung nach IL-11 Stimulation bestätigen. Die hohe IL-6R α mRNA Expression der Monozytenzelllinien und der PBMC ist ebenfalls vereinbar mit der hohen P-STAT3 Signalintensität nach der Stimulation mit IL-6 bei den THP-1 und U-937.

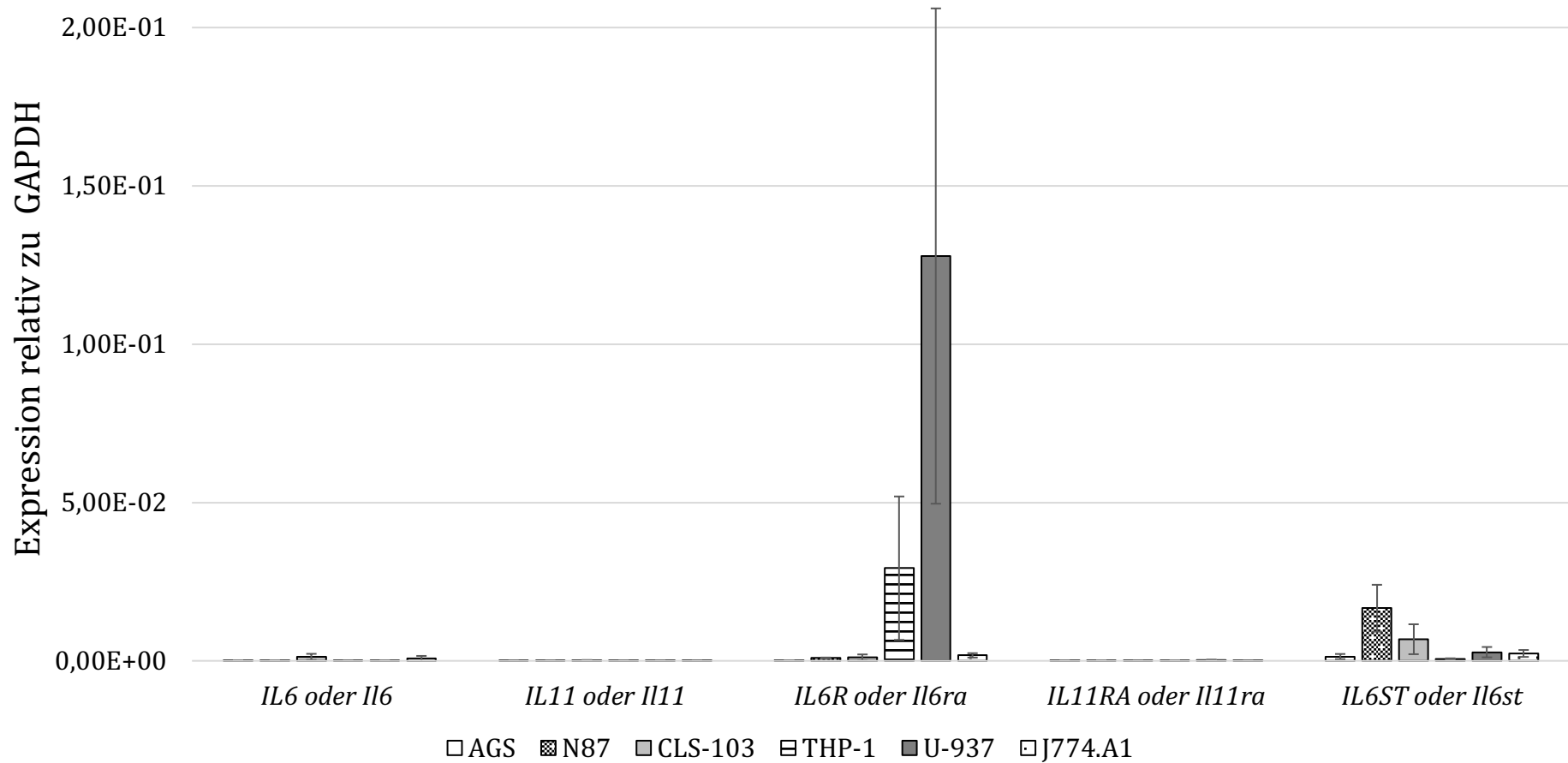


Abb. 16: Vergleich der mRNA Expression der unterschiedlichen kultivierten Zelllinien relativ zu GAPDH. Dargestellt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta CT} \pm SD$. Auffällig ist die starke IL-6 α mRNA Expression bei den monozytären Zelllinien THP-1 und U-937 im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen. Zellen des gleichen Ursprungs zeigten ein ähnliches Expressionsmuster der mRNA.

4 Diskussion

Trotz sinkender Inzidenzen in Deutschland ist das Magenkarzinom weiterhin als der fünfthäufigste diagnostizierte maligne Tumor weltweit eines der bedeutendsten Karzinome. Außerdem zählt es durch seine hohe Mortalität zu der vierthäufigsten Todesursache unter allen Krebserkrankungen (Sung et al., 2021). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von IL-6 und IL-11 auf Magenkarzinomzelllinien und Immunzelllinien untersucht. Dazu wurden die kultivierten Zelllinien mit IL-6 und IL-11 sowie mit den Zytokinen und deren löslichen Rezeptoren stimuliert. Die sich daraus ergebende Aktivierung von STAT3 wurde durch einen Western Blot analysiert. Die Zellkulturüberstände der Magenkarzinomzelllinien und der Immunzelllinien wurden zudem auf die Sekretion von IL-6 und IL-11 nach der Stimulation mit TGF- β und ohne Stimulation untersucht. Weiterhin wurden alle Zelllinien, primäre Mausmakrophagen und PBMC auf die mRNA Expression der Zytokine, ihrer spezifischen Rezeptoren und der gemeinsamen β -Untereinheit des Rezeptors gp130 analysiert.

4.1 Zytokin-induzierte Aktivierung von STAT3

Bei der Stimulation von Magenepithel- und Immunzellen mit IL-6 und IL-11 sowie deren löslichen Rezeptoren wiesen Zellen aus dem gleichen Ursprungsgewebe ähnliche Ergebnisse auf. So zeigten die Epithelzellen eine gesteigerte STAT3 Aktivierung nach der 15-minütigen Stimulation mit IL-6 und IL-11. Dabei war die Phosphorylierung von STAT3 nach der IL-11 Stimulation schwächer als nach der Inkubation mit IL-6. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen von Zhu et al. überein. Sie stimulierten AGS Zellen mit 50 ng/ml IL-6 und wiesen ebenfalls eine Steigerung des P-STAT3 Signals im Gegensatz zu der nicht stimulierten Kontrolle nach (Zhu et al., 2011). Die hier durchgeführten Versuche konnten allerdings schon eine Steigerung der STAT3 Aktivierung nach einer Stimulation mit 10 ng/ml IL-6 zeigen. Suman et al. zeigten in einer Chorionkarzinomzelllinie, dass die Stimulation mit IL-11 zu einer dosisabhängigen Phosphorylierung von STAT3 führte, wobei 10 ng/ml die geringste verwendete Konzentration war. Zusätzlich konnten die Autoren eine von IL-11 dosisabhängige Steigerung der Invasion der Zellen in einem *in vitro* Matrigel Invasions Assay nachweisen (Suman et al., 2009). In den hier durchgeführten Versuchen wiesen die Epithelzellen nach 10 ng/ml IL-11 Inkubation nur eine schwache Aktivierung von STAT3 auf. Es ist zu erwarten, dass eine Dosissteigerung der Zytokinstimulation bei den hier verwendeten Epithelzellen auch eine dosisabhängige Steigerung des P-STAT3 Signals ergeben würde. Die stärkere Aktivierung von STAT3 nach IL-6 Stimulation als nach IL-11 Stimulation liegt vermutlich an der Verfügbarkeit des spezifischen Rezeptors. Die Epithelzellen exprimieren vermehrt IL-6R α , wie in der Analyse der mRNA Expression in Kapitel 3.3 gezeigt wurde.

Die Epithelzelllinie N87 wurde zusätzlich mit 10 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R α bzw. 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R α stimuliert. Die Stimulation des trans-Signalweges konnte eine stärkere Aktivierung von STAT3 auslösen als die Induktion des klassischen Signalweges. In Kapitel 3.3 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die ubiquitär vorkommende β -Untereinheit gp130 eine höhere mRNA Expression als der IL-6R α in den Magenkarzinomzelllinien hat. Durch die Stimulation des trans-Signalweges kann somit die Aktivierung von STAT3 vereinfacht induziert werden, da kein spezifischer membranständiger Rezeptor notwendig ist. Die Epithelzellen des Magenkarzinoms könnten demnach ebenfalls durch die löslichen Varianten der IL-6 oder IL-11 Rezeptoren ihre Stimuli erhalten. Die Monozytenzelllinien THP-1 und U-937 zeigten nach der Inkubation mit den Zytokinen ebenfalls eine ähnliche Aktivierung von STAT3. Sowohl IL-6 als auch der trans-Signalweg von IL-6 können eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung von STAT3 auslösen. Aus den Versuchen von Basu et al. geht hervor, dass eine Stimulation von THP-1 mit 50 ng/ml IL-6 für zwei Stunden zu einem gesteigerten P-STAT3 Level führt (Basu et al., 2017). Yeh et al. zeigten ebenfalls, dass THP-1 nach der Stimulation mit 100 ng/ml IL-6 oder Zellkulturüberständen von kolorektalen Krebszelllinien eine erhöhte Phagozytosekapazität und Migrationsfähigkeit resultierte. Außerdem wurde bei der THP-1 Zelllinie auch eine vermehrte Aktivierung von STAT3 nach IL-6 Stimulation oder Inkubation mit den Zellkulturüberständen nachgewiesen (Yeh et al., 2016). Die hier durchgeführten Versuche zeigen demnach, dass ebenfalls eine deutlich geringere Konzentration mit 10 ng/ml IL-6 zu einer Aktivierung des klassischen und trans-Signalweges führen kann.

Es ist davon auszugehen, dass die Aktivierung von STAT3 durch IL-11 in Epithelzellen und Monozyten eher eine untergeordnete Rolle spielt. In einem Kolonkarzinom Mausmodell zeigten Nishina et al., dass vor allem Fibroblasten IL-11 produzierten. Die Deletion des IL-11R α oder IL-11 schwächte die Entwicklung von Kolontumoren ab. Die IL-11 produzierenden Fibroblasten aktivierten ebenfalls die Karzinomepithelzellen. Allerdings zeigten die Epithelzellen eine schwächere Aktivierung von STAT3 durch IL-11 als die Fibroblasten (Nishina et al., 2021). Eine IL-11 Sekretion und Stimulation der Tumor-assoziierten Fibroblasten im Magenkarzinom ist demnach denkbar.

Die Versuche mit der Makrophagenzelllinie J774.A1 zeigen eine Aktivierung von STAT3 nach alleiniger IL-6 sowie nach IL-6 und IL-11 trans-Signalweg Stimulation. Dabei hat die Stimulation über den IL-6 trans-Signalweg den stärksten Effekt und über den IL-11 trans-Signalweg den schwächsten. Niemand et al. konnten ebenfalls zeigen, dass die Stimulation mit IL-6 eine dosisabhängige Aktivierung von STAT3 in primären humanen Makrophagen bewirkt. Diese wurde durch eine Vorbehandlung mit pro-inflammatorischen Faktoren wie LPS und TNF- α gehemmt (Niemand et al., 2003).

Die STAT3 Aktivierung kann somit sowohl mit IL-6 als auch IL-11 oder dem trans-Signalweg induziert werden. Allerdings ist bei allen Zelllinien die Induktion nach IL-11 Stimulation schwächer als nach IL-6 Stimulation. Dies steht im Kontrast zu der Annahme, das Magenkarzinom entstehe vor allem durch eine vermehrte IL-11 Stimulation. Dass eine genetische Deletion von IL-6 trotzdem zur Tumorgenese führte, zeigten Ernst et al. in dem Funktionsgewinnmausmodell gp130^{Y757F}, in dem gp130 hyperaktiviert ist. Mäuse mit der genetischen Deletion des IL-11R α zeigten dagegen keine Tumore und glichen in der Magenmorphologie den Wildtyp Mäusen (Ernst et al., 2008). Die Stimulation mit IL-6 oder über den IL-6 trans-Signalweg der Epithelzellen und der Immunzellen zeigte eine höhere STAT3 Aktivierung als mit IL-11 oder dem IL-11 trans-Signalweg. Eine auto- oder parakrine Stimulation von IL-11 in Magenkarzinomen würde demnach nur eine geringe Phosphorylierung von STAT3 auslösen. Eine durch IL-6 ausgelöste STAT3 Phosphorylierung in Magenkarzinomepithelzellen wäre eher denkbar. Möglicherweise sind bei der Tumorgenese und -progression im Magenkarzinom ebenfalls Karzinom-assoziierte Fibroblasten involviert, welche durch autokrine IL-11 Produktion STAT3 aktivieren.

4.2 Sekretion von IL-6 und IL-11

Zwei der epithelialen Zellreihen (AGS, CLS-103), die Monozyten- (THP-1, U-937) und die Makrophagenzelllinie (J774.A1) wurden auf die Sekretion von IL-6 untersucht. Der Überstand der Zellen wurde nach 24, 48 und 72 Stunden im ELISA analysiert. Bei keiner Zelllinie konnte eine Sekretion von IL-6 nachgewiesen werden. Die Sekretion von IL-6 durch Tumor- oder Tumor-assoziierte Zellen wurde schon in einer Vielzahl von Tumoren untersucht. In der Kolitis-assoziierten Tumorgenese wird IL-6 vor allem von dendritischen Zellen und Makrophagen produziert. T-Zellen sekretieren ebenfalls nachweislich IL-6 (Grivennikov et al., 2009). Dagegen zeigten Becker et al. in einem Kolonkarzinom Mausmodell, dass IL-6 vor allem durch CD4⁺-T-Zellen aus Tumorgewebe exprimiert wurde. IL-6 wurde zusätzlich in Tumorepithelzellen und dendritischen Zellen exprimiert. In Makrophagen und CD8⁺-T-Zellen war die Menge an IL-6 dagegen gering (Becker et al., 2004). Hou et al. zeigten eine geringe Sekretion von maximal 23,8 pg/ml IL-6 nach 48 Stunden in U-937 oder THP-1 Monokulturen (Hou et al., 2020). Die fehlende IL-6 Sekretion von allen hier untersuchten Zelllinien unterscheidet sich somit von den oben genannten Ergebnissen. Die von Hou et al. nachgewiesene IL-6 Sekretion bei den monozytären Zelllinien THP-1 und U-937 war sehr gering, so dass die Sekretion bei den hier vorliegenden Ergebnissen eventuell durch einen unterschiedlichen Versuchsablauf unter der Detektionsgrenze lag. Die entweder sehr geringe nachgewiesene IL-6 Sekretion von Hou et al. oder sogar fehlende IL-6 Sekretion in den hier untersuchten Zelllinien könnte ebenfalls durch das fehlende Tumorumgebungsgewebe begründet sein. Erez et al. zeigten, dass die Tumor-assoziierten Fibroblasten im Brustkrebsgewebe und Ovarialkrebsgewebe IL-6 exprimieren

(Erez et al., 2013). Zudem könnten CD4⁺-T-Zellen oder dendritische Zellen die Quelle der IL-6 Sekretion im Magenkarzinom sein.

In den hier untersuchten Zellreihen konnte keine IL-11 Produktion in den Zellüberständen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Sekretion von IL-6 und IL-11 nach einer Stimulation mit 10 ng/ml TGF- β untersucht. Bei allen Zelllinien konnte erneut keine Sekretion der Zytokine in den Zellüberständen nachgewiesen werden. Pelaia et al. stimulierten primäre humane Lungenfibroblasten ebenfalls mit 10 ng/ml TGF- β . Nach 24, 48 und 72 Stunden konnte eine deutlich erhöhte Sekretion von IL-6 und IL-11 nachgewiesen werden (Pelaia et al., 2007). Die TGF- β Produktion in Tumor infiltrierenden T-Lymphozyten unterdrückten allerdings das Tumorwachstum in einem Kolonkarzinom Mausmodell durch die Hemmung der IL-6 Produktion in den T-Zellen (Becker et al., 2004). Eventuell wurde die Sekretion von IL-6 durch die Stimulation mit TGF- β weiterhin unterdrückt, wie Becker et al. in ihrem Kolonkarzinom Mausmodell zeigten. Eine erhöhte Sekretion von IL-6 und IL-11 nach der TGF- β Behandlung, wie bei den primären Lungenfibroblasten, konnte zumindest nicht nachgewiesen werden. Eine durch TGF- β stimulierte IL-11 Produktion konnte schon mehrfach nachgewiesen werden. Morinaga et al. zeigten, dass humane Melanomzellen durch TGF- β Produktion, die durch IL-11 induzierte Osteolyse stimulierten (Morinaga et al., 1997). Humane Alveolarzellen konnten ebenfalls eine gesteigerte IL-11 Gen Transkription nach TGF- β Stimulation nachweisen (Tang et al., 1998). TGF- β sekretierende Kolontumorzellen führten zu einer IL-11 Sekretion der Tumor-assoziierten Fibroblasten (Calon et al., 2012). Wang et al. zeigten, dass eine IL-11 Sekretion mittels ELISA detektiert wurde, wenn Magenkarzinomzelllinien MGC-803 und SGC-7901 mit Tumor-assoziierten Fibroblasten kokultiviert wurden (Wang et al., 2018). Möglicherweise sekretieren die Tumor-assoziierten Fibroblasten IL-11 bzw. auch IL-6 in Magenkarzinomen und können somit die Tumorepithelzellen stimulieren. Zudem könnten andere Immunzellen, wie CD4⁺-T-Zellen oder dendritische Zellen, als Quelle für die Sekretion der Zytokine dienen. Das fehlende Ansprechen der kultivierten Magenkarzinomzelllinien und Immunzellen auf die TGF- β Stimulation könnte in einem Mangel an TGF- β Rezeptoren begründet sein.

4.3 mRNA Expression der Zytokine und deren Rezeptoren

In der qPCR wurden von allen sechs kultivierten Zelllinien und PBMC sowie murinen primären Makrophagen die IL-6, IL-11, ihre spezifischen Rezeptoren IL-6R α und IL-11R α und die gp130 mRNA Expression relativ zu GAPDH oder Aktin gemessen. Die humanen Epithelzellen zeigten eine höhere IL-6R α und IL-6 mRNA Expression als die IL-11R α und IL-11 mRNA Expression. Der gemeinsame Rezeptor gp130 wurde bei beiden Zelllinien am stärksten exprimiert. Die murine Epithelzelllinie CLS-103 zeigte das gleiche Expressionsmuster wie die humanen Zelllinien. Dies passt zu den in Kapitel 3.1 beschriebenen Ergebnissen der Aktivierung von STAT3 nach

Stimulation. Eine stärkere Aktivierung des klassischen Signalwegs nach IL-6 Stimulation zeigte sich in den kultivierten Magenkarzinomzelllinien im Vergleich zu der IL-11 Stimulation, was mit der höheren mRNA Expression des IL-6R α einhergeht. Die Stimulation über den trans-Signalweg in der N87 Zelllinie führte abgesehen von der Positivkontrolle zur stärksten Signalintensität von P-STAT3. Dies ist ebenfalls mit der hohen gp130 mRNA Expression zu vereinbaren. Jackson et al. untersuchten in einer qPCR Analyse humane Magenbiopsien von Patienten mit *H. pylori* Infektion. Die Autoren zeigten eine zweifach erhöhte IL-6 mRNA Expression des untersuchten Gewebes im Gegensatz zu nicht-infizierten Kontrollen. Die IL-6 mRNA Expression blieb weiterhin in der intestinalen Metaplasie und dem Magenkarzinom erhöht. Die IL-11 mRNA Expression war dagegen während der Gastritis und intestinaler Metaplasie normal wie in dem nicht-infizierten Magengewebe. Die mRNA Expression von IL-11 erhöhte sich erst in den Magenkarzinomproben (Jackson et al., 2007). Yin et al. zeigten ebenfalls erhöhte IL-6 mRNA Expressionslevel in humanen Magenkarzinomproben im Vergleich zu gesundem Magengewebe (Yin et al., 2013). Da in den hier durchgeführten Versuchen keine gesunde Magenepithelzelllinie untersucht wurde, kann man die Stärke IL-6 und IL-6R α mRNA Expression schwer einordnen. Die Ergebnisse von Jackson et al. und Yin et al. legen zumindest nahe, dass IL-6 mRNA Expression in gesunden Magenepithelzellen geringer ist als in den hier untersuchten Magenkarzinomzelllinien. Allerdings ist es unklar, ob die erhöhte IL-6 mRNA Expression von den Magenkarzinomzellen oder anderen umgebenden Zellen stammt (Jackson et al., 2007; Yin et al., 2013).

In den hier vorliegenden Ergebnissen konnte keine IL-6 Sekretion von Magenkarzinomzelllinien im ELISA nachgewiesen werden. Die fehlende Produktion der Zytokine kann ebenfalls an der fehlenden Stimulation von umgebenden Zellen liegen. Die kultivierten Monozyten THP-1 und U-937 zeigten eine sehr hohe IL-6R α mRNA Expression im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen. Der gemeinsame Rezeptor gp130 war deutlich weniger exprimiert als der IL-6R α . Allerdings war die gp130 mRNA Expression ebenfalls stärker als IL-6, IL-11 und IL-11R α . Die PBMC zeigten ebenso eine starke IL-6R α mRNA Expression im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen. Bei den PBMC ist die Differenz zwischen IL-6R α und gp130 mRNA Expression jedoch nicht so deutlich. Hou et al. untersuchten ebenfalls die monozytäre Zelllinie U-937 und konnten keine starke IL-6R α mRNA Expression nachweisen. Diese war auch ähnlich wie die gp130 mRNA Expression (Hou et al., 2020). Die fehlend hohe IL-6R α Expression bei Hou et al. unterscheidet sich von den oben beschriebenen Daten der qPCR von THP-1, U-937 und den PBMC. Da alle drei Zelllinien die gleiche hohe Expression des IL-6R α zeigten und es sich bei den PBMC um humane Primärzellen handelt, kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei nicht um Artefakte handelt. In dem Kolonkarzinom Mausmodell von Becker et al. wurde gezeigt, dass der membrangebundene IL-6R α sowohl im Western Blot als auch in der Immunohistochemie in den Tumorepithelzellen wenig oder gar nicht nachweisbar war. In den Tumorepithelzellen wurde dagegen

reichlich mRNA des Rezeptors exprimiert. Dies lässt die Tumorzellen als Herkunft des löslichen sIL-6R α vermuten. Der Western Blot der konzentrierten Überstände bestätigte die Anwesenheit des 50kDa sIL-6R α (Becker et al., 2004). Bei Becker et al. waren zwar Tumorepithelzellen der Ursprung des sIL-6R α , aber die hohe IL-6R α mRNA Expression bei den hier untersuchten monozytären Zelllinien und den PBMC könnten ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass die Zellen eine Quelle für den sIL-6R α sind. In den Stimulationsexperimenten zeigten die Monozytenzelllinien eine stärkere Aktivierung von STAT3 nach der Stimulation mit IL-6 als nach der Hy-IL-6 Stimulation. Ein höheres Angebot an membrangebundenen IL-6R α als gp130 würde dies erklären. Bei der Inkubation mit IL-6 und IL-6R α zeigte sich ebenfalls eine etwas schwächere P-STAT3 Signalintensität als nach der alleinigen IL-6 Gabe. Wenn die Zellen ein hohes Angebot an IL-6R α besitzen ist es unklar, ob die STAT3 Aktivierung nach Inkubation mit IL-6 und IL-6R α durch den klassischen oder trans-Signalweg ausgelöst wurde. Die murine Makrophagen Zelllinie J774.A1 und die primären murinen Makrophagen zeigten wenig IL-11 oder IL-11R α mRNA Expression. Dies könnte an dem fehlenden Tumorumgebungsgewebe liegen oder andere Zellen sind die Quelle der IL-11 Sekretion, wie die vorher genannten Tumor-assoziierten Fibroblasten. Diese Ergebnisse passen ebenfalls zu den Ergebnissen nach IL-11 Stimulation in der murinen Makrophagenzelllinien. Die Aktivierung von STAT3 unterschied sich nicht von der unstimulierten Kontrolle.

Zusammenfassend zeigten die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten murine und beide humanen Magenkarzinomzelllinien ein ähnliches mRNA Expressionsmuster. IL-6 mRNA und IL-6R α mRNA wurde stärker exprimiert als die IL-11R α und IL-11 mRNA. Die hohe IL-6R α mRNA Expression bei den kultivierten Monozyten THP-1 und U-937 ähnelte ebenfalls dem Expressionsmuster der PBMC. Die kultivierte murine Makrophagenzelllinie J774.A1 und die primären Mausmakrophagen zeigten auch eine geringere IL-11 und IL-11R α mRNA Expression im Vergleich zu den anderen Zielgenen.

4.4 Klinische Bedeutung und Ausblick

Studien weisen auf einen möglichen klinischen Einfluss der Zytokine IL-6 und IL-11 auf die Entwicklung des Magenkarzinoms hin. Ernst et al. zeigte in einem Mausmodell mit hyperaktiviertem STAT3, dass vor allem die IL-11 und auch die IL-6 mRNA und Proteinspiegel in den Tumoren des Magens erhöht waren. Mäuse mit deletiertem IL-11R α waren in diesem Modell vor der Tumorbildung geschützt und unterschieden sich somit nicht von Mäusen ohne STAT3 Hyperaktivierung (Ernst et al., 2008). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen eher eine untergeordnete Rolle der IL-11 gesteuerten STAT3 Aktivierung in kultivierten und primären Magenkarzinomzellen oder Immunzellen. Die Karzinomzellen könnten im Umgebungsgewebe durch IL-6 sekretierende Tumor-assoziierte Fibroblasten oder Immunzellen stimuliert werden. Die in den hier vorliegenden Ergebnissen hohe IL-6R α mRNA Expression der Monozyten und den PBMC könnte auf eine mögliche Sekretion des sIL-6R α hinweisen. Dieser könnte wiederum gemeinsam mit IL-6 über den trans-Signalweg die Karzinomzellen aktivieren. Um weitere Aussagen treffen zu können, wäre es sinnvoll immunhistochemische Untersuchungen an Magenkarzinomen von Mäusen durchzuführen. Eine Untersuchung der Proben auf IL-6, IL-11 und deren Rezeptoren wäre interessant. Zusätzlich könnten Magenkarzinome von Mäusen durch eine qPCR auf die mRNA Expression der Zytokine und ihrer Rezeptoren analysiert werden. Zum Nachweis der Sekretion des sIL-6R α von den Monozytenzelllinien wäre eine ELISA-Analyse der Zellkulturüberstände sinnvoll. Um den Einfluss von Tumor-assoziierten Fibroblasten auf die humanen Magenkarzinomzelllinien zu untersuchen, wäre eine Kokultivierung dieser Zellen denkbar. Die Überstände der Zellen könnten dann mit einem ELISA auf die Sekretion von IL-6 und IL-11 geprüft werden.

Weitere Therapiemöglichkeiten für das Magenkarzinom sind aufgrund seiner hohen Mortalität von großem Interesse. Der Einsatz von Antikörpern gegen IL-6 oder IL-6R α , sowie einer spezifischen Blockierung des trans-Signalweges durch sgp130Fc, wäre denkbar. Auch Antikörper gegen IL-11 und den IL-11R befinden sich derzeit in der Entwicklung und könnten möglicherweise eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Analyse eines möglichen Einflusses von IL-6 und IL-11 über den klassischen oder den trans-Signalweg auf Magenkarzinomzellen und Immunzellen. Hierfür wurden murine und humane Magenkarzinom-, humane Monozyten- und eine murine Makrophagenzelllinie untersucht. Die Zelllinien wurden mit IL-6 und IL-11 sowie ihren löslichen Rezeptoren stimuliert und die darauffolgende Phosphorylierung von STAT3 mittels Western Blot nachgewiesen. Zudem wurde die Sekretion von IL-6 und IL-11 ohne Stimulation und nach Stimulation mit TGF- β in den Überständen der Zellkulturlinien mittels ELISA analysiert. Die mRNA Expression von IL-6 und IL-11, deren spezifischen Rezeptoren und der gemeinsamen β -Untereinheit gp130 wurde bei allen Zelllinien, primären Mausmakrophagen und humanen PBMC, durch eine qPCR gemessen. Auf die Stimulation mit IL-6 reagierten alle untersuchten Zelllinien mit einer Aktivierung von STAT3. Nach der Inkubation mit IL-11 ließ sich nur bei den humanen Epithelzellen eine leichte Phosphorylierung von STAT3 nachweisen. Die Stimulation durch den IL-6 trans-Signalweg und IL-11 trans-Signalweg zeigte ebenfalls eine gesteigerte Aktivierung von STAT3. Eine Sekretion von IL-6 oder IL-11 in den untersuchten Überständen konnte nicht nachgewiesen werden. Die Sekretion war nach TGF- β Inkubation ebenfalls nicht nachweisbar. Die Analyse der mRNA Expression wies bei den kultivierten Zelllinien und den Primärzellen bei gleicher Zellart jeweils konsistente Ergebnisse auf. Die IL-11 und IL-11R α mRNA Expression war bei allen untersuchten Zellen niedrig. Bei den Monozytenzelllinien und PBMC war eine hohe IL-6R α mRNA Expression nachweisbar. Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Phosphorylierung von STAT3 durch IL-11 in den Epithelzellen und Monozyten eine untergeordnete Rolle spielt. Die hohe IL-6R α mRNA Expression bei den hier untersuchten Monozyten und den PBMC könnte ein Hinweis sein, dass die Zellen eine Quelle für den sIL-6R α sind. Die Magenkarzinomzellen könnten demnach ebenfalls durch den IL-6 trans-Signalweg aktiviert werden. Die verschiedenen Zelltypen zeigten jeweils ähnliche Expressionsmuster, welche ebenso zu den Ergebnissen der STAT3 Aktivierung nach alleiniger Zytokinstimulation oder Stimulation des trans-Signalweges passten. Dabei war dies unabhängig davon, ob es sich um murine oder humane kultivierte Zellen oder Primärzellen handelte. Aufgrund der weltweit hohen Inzidenzen und Mortalität des Magenkarzinoms sind neue therapeutische Ansätze weiterhin notwendig. Der Einsatz spezifischer Antikörper gegen die involvierten Zytokine oder die Blockierung des trans-Signalweges wären denkbar.

6 Literaturverzeichnis

1. Aggarwal, B.B., Sethi, G., Ahn, K.S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Kunnumakkara, A.B., Sung, B., Ichikawa, H. (2006). Targeting Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription-3 for Prevention and Therapy of Cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1091, 151–169.
2. Al-Batran, S.E., Homann, N., Pauligk, C., Goetze, T.O., Meiler, J., Kasper, S., Kopp, H.G., Mayer, F., Haag, G.M., Luley, K., et al. (2019). Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet* 393, 1948–1957.
3. Ashizawa, T., Okada, R., Suzuki, Y., Takagi, M., Yamazaki, T., Sumi, T., Aoki, T., Ohnuma, S., Aoki, T. (2005). Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: Role of IL-6 as a prognostic factor. *Gastric Cancer* 8, 124–131.
4. Babon, J.J., Kershaw, N.J., Murphy, J.M., Varghese, L.N., Laktyushin, A., Young, S.N., Lucet, I.S., Norton, R.S., Nicola, N.A. (2012). Suppression of Cytokine Signaling by SOCS3: Characterization of the Mode of Inhibition and the Basis of Its Specificity. *Immunity* 36, 239–250.
5. Balakrishnan, M., George, R., Sharma, A., Graham, D.Y. (2017). Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 19, 36.
6. Bang, Y.J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H.C., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T., et al. (2010). Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376, 687–697.
7. Basu, A., Das, A.S., Sharma, M., Pathak, M.P., Chattopadhyay, P., Biswas, K., Mukhopadhyay, R. (2017). STAT3 and NF- κ B are common targets for kaempferol-mediated attenuation of COX-2 expression in IL-6-induced macrophages and carrageenan-induced mouse paw edema. *Biochem. Biophys. Reports* 12, 54–61.
8. Bazan, J.F. (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today* 11, 350–354.
9. Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., et al. (2004). TGF- β suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21, 491–501.
10. Bergmann, J., Müller, M., Baumann, N., Reichert, M., Heneweer, C., Bolik, J., Lücke, K., Gruber, S., Carambia, A., Boretius, S., et al. (2017). IL-6 trans-signaling is essential for the development of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 65, 89–103.
11. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238.
12. Bollrath, J., Phesse, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, Ö., Schwitalla, S., 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.
13. Boulanger, M.J., Chow, D., Brevnova, E.E., Garcia, K.C. (2003). Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300, 2101–2104.

14. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J. Clin.* 68, 394–424.
15. Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., Darnell, J.E. (1999). Stat3 as an Oncogene. *Cell* 98, 295–303.
16. Bronte-Tinkew, D.M., Terebiznik, M., Franco, A., Ang, M., Ahn, D., Mimuro, H., Sasakawa, C., Ropeleski, M.J., Peek, R.M., Jones, N.L. (2009). Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene a activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 69, 632–639.
17. Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V.F., Iglesias, M., Céspedes, M.V., Sevillano, M., Nadal, C., Jung, P., Zhang, X.H.-F., et al. (2012). Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* 22, 571–584.
18. Cantor, S.B., Elting, L.S., Hudson, D. V., Rubenstein, E.B. (2003). Pharmacoeconomic analysis of oprelvekin (recombinant human interleukin-11) for secondary prophylaxis of thrombocytopenia in solid tumor patients receiving chemotherapy. *Cancer* 97, 3099–3106.
19. Castell, J. V., Gómez-Lechón, M.J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., Heinrich, P.C. (1989). Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 242, 237–239.
20. Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S., Scheller, J. (2011). The soluble Interleukin 6 receptor: Generation and role in inflammation and cancer. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 484–494.
21. Chiu, P.W.Y., Teoh, A.Y.B., To, K.F., Wong, S.K.H., Liu, S.Y.W., Lam, C.C.H., Yung, M.Y., Chan, F.K.L., Lau, J.Y.W., Ng, E.K.W. (2012). Endoscopic submucosal dissection (ESD) compared with gastrectomy for treatment of early gastric neoplasia: a retrospective cohort study. *Surg. Endosc.* 26, 3584–3591.
22. Correa, P., Piazzuelo, M.B. (2012). The gastric precancerous cascade. *J. Dig. Dis.* 13, 2–9.
23. Correa, P., Cuello, C., Duque, E. (1970). Carcinoma and Intestinal Metaplasia of the Stomach in Colombian Migrants. *J. Natl. Cancer Inst.* 44, 297–306.
24. Croker, B.A., Krebs, D.L., Zhang, J.G., Wormald, S., Willson, T.A., Stanley, E.G., Robb, L., Greenhalgh, C.J., Förster, I., Clausen, B.E., et al. (2003). SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat. Immunol.* 4, 540–545.
25. Davidson, A.J., Freeman, S.A., Crosier, K.E., Wood, C.R., Crosier, P.S. (1997). Expression of murine interleukin 11 and its receptor α -chain in adult and embryonic tissues. *Stem Cells* 15, 119–124.
26. Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., et al. (2004). Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4827–4832.
27. Deutsches Krebsforschungszentrum (2020). Magenkrebs: Risikofaktoren <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/magenkrebs/risikofaktoren.php> (zugegriffen am: 03/11/2022).
28. Dillon, S.R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S.R., Haugen, H.S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., et al. (2004). Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat. Immunol.* 5, 752–760.

29. Diveu, C., Lelièvre, E., Perret, D., Lak-Hal, A.H.L., Froger, J., Guillet, C., Chevalier, S., Rousseau, F., Wesa, A., Preisser, L., et al. (2003). GPL, a Novel Cytokine Receptor Related to GP130 and Leukemia Inhibitory Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* *278*, 49850–49859.
30. Du, X.X., Williams, D.A. (1994). Interleukin-11: A Multifunctional Growth Factor Derived From the Hematopoietic Microenvironment. *Blood* *83*, 2023–2030.
31. Ellmark, P., Ingvarsson, J., Carlsson, A., Lundin, B.S., Wingren, C., Borrebaeck, C.A.K. (2006). Identification of protein expression signatures associated with *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma using recombinant antibody microarrays. *Mol. Cell. Proteomics* *5*, 1638–1646.
32. Engvall, E., Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* *8*, 871–874.
33. Erez, N., Glanz, S., Raz, Y., Avivi, C., Barshack, I. (2013). Cancer Associated Fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *437*, 397–402.
34. Ernst, M., Najdovska, M., Grail, D., Lundgren-May, T., Buchert, M., Tye, H., Matthews, V.B., Armes, J., Bhathal, P.S., Hughes, N.R., 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.
35. European Medicines Agency (2021). RoActemra <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/roactemra> (zugegriffen am: 03/11/2022).
36. Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J.P.G., Kallen, K.J., Wollmer, A., Grötzinger, J., Rose-John, S. (1997). A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat. Biotechnol.* *15*, 142–145.
37. Fock, K.M., Ang, T.L. (2010). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *25*, 479–486.
38. Fuchs, C.S., Tomasek, J., Yong, C.J., Dumitru, F., Passalacqua, R., Goswami, C., Safran, H., Dos Santos, L.V., Aprile, G., Ferry, D.R., et al. (2014). Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* *383*, 31–39.
39. Garbers, C., Hermanns, H.M., Schaper, F., Müller-Newen, G., Grötzinger, J., Rose-John, S., Scheller, J. (2012). Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* *23*, 85–97.
40. Garbers, C., Heink, S., Korn, T., Rose-John, S. (2018). Interleukin-6: Designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat. Rev. Drug Discov.* *17*, 395–412.
41. Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., 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.
42. Grossman, R.M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D.P., May, L.T., Kupper, T.S., Sehgal, P.B., Gottlieb, A.B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels of psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 6367–6371.

43. Grötzinger, J. (2002). Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 215–223.
44. Hamilton, S.R., Aaltonen, L.A. (2000). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. (IARC Press: Lyon).
45. Hashizume, M., Hayakawa, M.M. (2008). IL-6 Trans-Signalling Directly Induces RANKL on Fibroblast-Like Synovial Cells and Is Involved in RANKL Induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatol.* 47, 1635–1640.
46. Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1–20.
47. Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63, 1149–1157.
48. Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., Sato, K., Shimi, M., Maid, R., Feldmann, M., et al. (1988). Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 18, 1797–1801.
49. Holyoake, T.L., Freshney, M.G., McNair, L., Parker, A.N., McKay, P.J., Steward, W.P., Fitzsimons, E., Graham, G.J., Pragnell, I.B. (1996). Ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin-11 augments both short-term recovery posttransplant and the ability to serially transplant marrow. *Blood* 87, 4589–4595.
50. Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Suzuki, H., Saito, T., Osugi, Y., Tokunaga, T., Kishimoto, T. (1992). Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J. Immunol.* 148, 2175–2180.
51. Hou, D., Wang, B., You, R., Wang, X., Liu, J., Zhan, W., Chen, P., Qin, T., Zhang, X., Huang, H. (2020). Stromal cells promote chemoresistance of acute myeloid leukemia cells via activation of the IL-6/STAT3/OXPHOS axis. *Ann. Transl. Med.* 8, 1346.
52. Ishibashi, T., Kimura, H., Shikama, Y., Uchida, T., Kariyone, S., Hirano, T., Kishimoto, T., Takatsuki, F., Akiyama, Y. (1989). Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 74, 1241–1244.
53. Ivanov, V.N., Bhoumik, A., Krasilnikov, M., Raz, R., Owen-Schaub, L.B., Levy, D., Horvath, C.M., Ronai, Z. (2001). Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol. Cell* 7, 517–528.
54. Jackson, C., Judd, L., Menheniott, T., Kronborg, I., Dow, C., Yeomans, N., Boussioutas, A., Robb, L., Giraud, A. (2007). Augmented gp130-mediated cytokine signalling accompanies human gastric cancer progression. *J. Pathol.* 213, 140–151.
55. Jostock, T., Müllberg, J., Özbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F., Rose-John, S. (2001). Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur. J. Biochem.* 268, 160–167.
56. Kanda, N., Seno, H., Konda, Y., Marusawa, H., Kanai, M., Nakajima, T., Kawashima, T., Nanakin, A., Sawabu, T., Uenoyama, Y., et al. (2004). STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene* 23, 4921–4929.
57. Karin, M., Greten, F.R. (2005). NF-κB: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749–759.

58. Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., et al. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332, 83–85.
59. Koch, L., Kespohl, B., Agthe, M., Schumertl, T., Düsterhöft, S., Lemberg, M.K., Lokau, J., Garbers, C. (2021). Interleukin-11 (IL-11) receptor cleavage by the rhomboid protease RHBDL2 induces IL-11 trans-signaling. *FASEB J.* 35, e21380.
60. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517.
61. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
62. Lang, S.A., Moser, C., Gaumann, A., Klein, D., Glockzin, G., Popp, F.C., Dahlke, M.H., Piso, P., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., et al. (2007). Targeting heat shock protein 90 in pancreatic cancer impairs insulin-like growth factor-I receptor signaling, disrupts an interleukin-6/signal-transducer and activator of transcription 3/hypoxia-inducible factor-1 α autocrine loop, and reduces orthotopic tumor growth. *Clin. Cancer Res.* 13, 6459–6468.
63. Lauren, P. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 64, 31–49.
64. Lavabre-Bertrand, T., Exbrayat, C., Liautard, J., Gaillard, J.-P., Baskevitch, P.-P., Poujol, N., Duperray, C., Bourquard, P., Brochier, J. (1995). Detection of membrane and soluble interleukin-6 receptor in lymphoid malignancies. *Br. J. Haematol.* 91, 871–877.
65. Leitlinienprogramm Onkologie (2019). S3-Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.0 <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/magenkarzinom/> (zugegriffen am: 06/11/2020).
66. Levy, D.E., Darnell, J.E. (2002). STATs: Transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 651–662.
67. Li, Y., De Haar, C., Chen, M., Deuring, J., Gerrits, M.M., Smits, R., Xia, B., Kuipers, E.J., Van Janneke Der Woude, C. (2010). Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut* 59, 227–235.
68. Lokau, J., Nitz, R., Agthe, M., Monhasery, N., Aparicio-Siegmund, S., Schumacher, N., Wolf, J., Möller-Hackbarth, K., Waetzig, G.H., Grötzinger, J., et al. (2016). Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling. *Cell Rep.* 14, 1761–1773.
69. Lokau, J., Göttert, S., Arnold, P., Düsterhöft, S., Massa López, D., Grötzinger, J., Garbers, C. (2018). The SNP rs4252548 (R112H) which is associated with reduced human height compromises the stability of IL-11. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1865, 496–506.
70. Lust, J.A., Donovan, K.A., Kline, M.P., Greipp, P.R., Kyle, R.A., Maihle, N.J. (1992). Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 4, 96–100.
71. Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P.C., Rose-John, S. (1992). Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J. Immunol.* 149, 2021–2027.
72. Morinaga, Y., Fujita, N., Ohishi, K., Tsuruo, T. (1997). Stimulation of interleukin-11 production from osteoblast-like cells by transforming growth factor-beta and tumor cell factors. *Int. J. Cancer* 71, 422–428.

73. Musashi, M., Yang, Y.C., Paul, S.R., Clark, S.C., Sudo, T., Ogawa, M. (1991). Direct and synergistic effects of interleukin 11 on murine hemopoiesis in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 765–769.
74. Nakahara, H., Song, J., Sugimoto, M., Hagihara, K., Kishimoto, T., Yoshizaki, K., Nishimoto, N. (2003). Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *48*, 1521–1529.
75. Nakayama, T., Yoshizaki, A., Izumida, S., Suehiro, T., Miura, S., Uemura, T., Yakata, Y., Shichijo, K., Yamashita, S., Sekin, I. (2007). Expression of interleukin-11 (IL-11) and IL-11 receptor α in human gastric carcinoma and IL-11 upregulates the invasive activity of human gastric carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* *30*, 825–833.
76. Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Yancopoulos, G.D., Taga, T., Kishimoto, T. (1993). Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* *82*, 1120–1126.
77. Nicholson, S.E., Souza, D. De, Fabri, L.J., Corbin, J., Willson, T.A., Zhang, J.-G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A.D., et al. (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 6493–6498.
78. Niemand, C., Nimmegern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., Heinrich, P.C., Müller-Newen, G. (2003). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in Primary Human Macrophages Is Differentially Modulated by Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* *170*, 3263–3272.
79. Nishina, T., Deguchi, Y., Ohshima, D., Takeda, W., Ohtsuka, M., Shichino, S., Ueha, S., Yamazaki, S., Kawauchi, M., Nakamura, E., et al. (2021). Interleukin-11-expressing fibroblasts have a unique gene signature correlated with poor prognosis of colorectal cancer. *Nat. Commun.* *12*, 2281.
80. Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D., Rubinstein, M. (1989). Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.* *170*, 1409–1414.
81. Padberg, F., Feneberg, W., Schmidt, S., Schwarz, M.J., Körschenhausen, D., Greenberg, B.D., Nolde, T., Müller, N., Trapmann, H., König, N., et al. (1999). CSF and serum levels of soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R and sgp130), but not of interleukin-6 are altered in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *99*, 218–223.
82. Paul, S.R., Bennett, F., Calvetti, J.A., Kelleher, K., Wood, C.R., O'Hara, R.M., Leary, A.C., Sibley, B., Clark, S.C., Williams, D.A., et al. (1990). Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 7512–7516.
83. Pelaia, G., Gallelli, L., D'Agostino, B., Vatrella, A., Cuda, G., Fratto, D., Renda, T., Galderisi, U., Piegari, E., Crimi, N., et al. (2007). Effects of TGF- β and glucocorticoids on map kinase phosphorylation, IL-6/IL-11 secretion and cell proliferation in primary cultures of human lung fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* *210*, 489–497.
84. Pflanz, S., Tacke, I., Grötzinger, J., Jacques, Y., Dahmen, H., Heinrich, P.C., Müller-Newen, G. (1999). A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130. *FEBS Lett.* *450*, 117–122.
85. Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J.F., Phillips, J.H., McClanahan, T.K., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A. (2004). WSX-1 and Glycoprotein 130 Constitute a Signal-Transducing Receptor for IL-27. *J. Immunol.* *172*, 2225–2231.

86. Putoczki, T.L., Thiem, S., Loving, A., Busuttill, R.A., Wilson, N.J., Ziegler, P.K., Nguyen, P.M., Preaudet, A., Farid, R., Edwards, K.M., et al. (2013). Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer Cell* 24, 257–271.
87. Rahaman, S.O., Harbor, P.C., Chernova, O., Barnett, G.H., Vogelbaum, M.A., Haque, S.J. (2002). Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 21, 8404–8413.
88. Riethmueller, S., Somasundaram, P., Ehlers, J.C., Hung, C.W., Flynn, C.M., Lokau, J., Agthe, M., Düsterhöft, S., Zhu, Y., Grötzinger, J., et al. (2017). Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation. *PLoS Biol.* 15, e2000080.
89. Robb, L., Hilton, D.J., Brook-Carter, P.T., Begley, C.G. (1997). Identification of a Second Murine Interleukin-11 Receptor α -Chain Gene (IL11Ra2) with a Restricted Pattern of Expression. *Genomics* 40, 387–394.
90. Robert Koch Institut (2021). Magenkrebs (Magenkarzinom) https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Magenkrebs/magenkrebs_node.html (zugegriffen am: 03/11/2022).
91. Romas, E., Udagawa, N., Zhou, H., Tamura, T., Saito, M., Taga, T., Hilton, D.J., Suda, T., Ng, K.W., Martin, T.J. (1996). The role of gp130-mediated signals in osteoclast development: Regulation of interleukin 11 production by osteoblasts and distribution of its receptor in bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* 183, 2581–2591.
92. Rose-John, S. (2012). Il-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 1237–1247.
93. Rose-John, S., Heinrich, P.C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: Generation and biological function. *Biochem. J.* 300, 281–290.
94. Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J.A., 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.
95. Schafer, S., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Lim, W.W., Moreno-Moral, A., DeLaughter, D.M., Ng, B., Patone, G., Chow, K., Khin, E., et al. (2017). IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature* 552, 110–115.
96. Schaper, F., Rose-John, S. (2015). Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 475–487.
97. Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P.C., Schaper, F. (2000). SOCS3 Exerts Its Inhibitory Function on Interleukin-6 Signal Transduction through the SHP2 Recruitment Site of gp130. *J. Biol. Chem.* 275, 12848–12856.
98. Slowik, M., Urbaniak-Kujda, D., Bohdanowicz-Pawlak, A., Kapelko-Slowik, K., Dybko, J., Wolowiec, D., Jazwiec, B., Daroszewski, J. (2012). CD8+CD28-lymphocytes in peripheral blood and serum concentrations of soluble interleukin 6 receptor are increased in patients with graves' orbitopathy and correlate with disease activity. *Endocr. Res.* 37, 89–95.
99. Spangler, J.B., Moraga, I., Mendoza, J.L., Garcia, K.C. (2015). Insights into Cytokine–Receptor Interactions from Cytokine Engineering. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 139–167.

100. Strikoudis, A., Cieślak, A., Loffredo, L., Chen, Y.W., Patel, N., Saqi, A., Lederer, D.J., Snoeck, H.W. (2019). Modeling of Fibrotic Lung Disease Using 3D Organoids Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* *27*, 3709–3723.
101. Suman, P., Poehlmann, T.G., Prakash, G.J., Markert, U.R., Gupta, S.K. (2009). Interleukin-11 increases invasiveness of JEG-3 choriocarcinoma cells by modulating STAT3 expression. *J. Reprod. Immunol.* *82*, 1–11.
102. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* *71*, 209–249.
103. Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* *58*, 573–581.
104. Tang, W., Yang, L., Yang, Y.C., Leng, S.X., Elias, J.A. (1998). Transforming growth factor-beta stimulates interleukin-11 transcription via complex activating protein-1-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* *273*, 5506–5513.
105. Wang, X., Che, X., Liu, C., Fan, Y., Bai, M., Hou, K., Shi, X., Zhang, X., Liu, B., Zheng, C., et al. (2018). Cancer-associated fibroblasts-stimulated interleukin-11 promotes metastasis of gastric cancer cells mediated by upregulation of MUC1. *Exp. Cell Res.* *368*, 184–193.
106. Wang, Y.X., Cai, H., Jiang, G., Zhou, T.B., Wu, H. (2014). Silibinin inhibits proliferation, induces apoptosis and causes cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via STAT3 pathway inhibition. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* *15*, 6791–6798.
107. Wei, D., Le, X., Zheng, L., Wang, L., Frey, J.A., Gao, A.C., Peng, Z., Huang, S., Xiong, H.Q., Abbruzzese, J.L., et al. (2003). Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* *22*, 319–329.
108. Weich, N.S., Wang, A., Fitzgerald, M., Neben, Y., Donaldson, D., Giannotti, J., Yetz-Aldape, J., Leven, R.M., Turner, K.J. (1997). Recombinant Human Interleukin-11 Directly Promotes Megakaryocytopoiesis In Vitro. *Blood* *90*, 3893–3902.
109. Widjaja, A.A., Singh, B.K., Adami, E., Viswanathan, S., Dong, J., D'Agostino, G.A., Ng, B., Lim, W.W., Tan, J., Paleja, B.S., et al. (2019). Inhibiting Interleukin 11 Signaling Reduces Hepatocyte Death and Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis in Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* *157*, 777–792.
110. Wolf, J., Waetzig, G.H., Chalaris, A., Reinheimer, T.M., Wege, H., Rose-John, S., Garbers, C. (2016). Different Soluble Forms of the Interleukin-6 Family Signal Transducer gp130 Fine-tune the Blockade of Interleukin-6 Trans-signaling. *J. Biol. Chem.* *291*, 16186–16196.
111. Wu, J., Shen, J., Han, Y., Qiao, Q., Dai, W., He, B., Pang, R., Zhao, J., Luo, T., Guo, Y., et al. (2021). Upregulated IL-6 Indicates a Poor COVID-19 Prognosis: A Call for Tocilizumab and Convalescent Plasma Treatment. *Front. Immunol.* *12*, 598799.
112. Xie, T.X., Wei, D., Liu, M., Gao, A.C., Ali-Osman, F., Sawaya, R., Huang, S. (2004). Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* *23*, 3550–3560.

113. Yamazumi, K., Nakayama, T., Kusaba, T., Wen, C.Y., Yoshizaki, A., Yakata, Y., Nagayasu, T., Sekine, I. (2006). Expression of interleukin-11 and interleukin-11 receptor α in human colorectal adenocarcinoma; Immunohistochemical analyses and correlation with clinicopathological factors. *World J. Gastroenterol.* *12*, 317–321.
114. Ye, J., Wang, Z., Ye, D., Wang, Y., Wang, M., Ji, Q., Huang, Y., Liu, L., Shi, Y., Shi, L., et al. (2019). Increased interleukin-11 levels are correlated with cardiac events in patients with chronic heart failure. *Mediators Inflamm* *2019*, 1575410.
115. Yeh, K.Y., Wu, T.H., Wu, T.L. (2016). Colorectal cancer cell-derived interleukin-6 enhances the phagocytic capacity and migration of THP-1 cells. *Cytokine* *79*, 82–89.
116. Yin, Y., Si, X., Gao, Y., Gao, L., Wang, J. (2013). The nuclear factor- κ B correlates with increased expression of interleukin-6 and promotes progression of gastric carcinoma. *Oncol. Rep.* *29*, 34–38.
117. Yoshizaki, K., Nakagawa, T., Fukunaga, K., Tseng, L.T., Yamamura, Y., Kishimoto, T. (1984). Isolation and characterization of B cell differentiation factor (BCDF) secreted from a human B lymphoblastoid cell line. *J. Immunol.* *132*, 2948–2954.
118. Zhu, B.H., Chen, H.Y., Zhan, W.H., Wang, C.Y., Cai, S.R., Wang, Z., Zhang, C.H., He, Y.L. (2011). (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits VEGF expression induced by IL-6 via Stat3 in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* *17*, 2315–2325.
119. Zurita, A.J., Troncoso, P., Cardó-Vila, M., Logothetis, C.J., Pasqualini, R., Arap, W. (2004). Combinatorial Screenings in Patients: The Interleukin-11 Receptor α as a Candidate Target in the Progression of Human Prostate Cancer. *Cancer Res.* *64*, 435–439.

7 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Verfassung der Dissertation unterstützt haben.

Mein allererster Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Garbers für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung und dem Erstellen der Arbeit. Ich danke für die vielen und konstruktiven Diskussionen und die durchgehende Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. J. Lokau, die mich stets methodisch und inhaltlich unterstützte. Für das Vertrauen in meine Arbeit und ihr stets offenes Ohr kann ich gar nicht genug danken.

Zudem danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathologie, insbesondere Frau Medau und Frau Herrmanns für die Einweisung und Hilfe bei den durchgeführten Experimenten und die unablässige Unterstützung.

Für die Durchsicht und die schnellen Korrekturen bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Garbers und Dr. J. Lokau danken.

Außerdem bedanke ich mich bei den freiwilligen Spendern und Spenderinnen der PBMC.

Für die Stärkung, Motivation und Geduld bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Freund bedanken.

8 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluss von Interleukin-6 und Interleukin-11 auf Magenkarzinomzellen und Immunzellen durch den klassischen und den trans-Signalweg

im Institut für Pathologie

mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. C. Garbers und Dr. J. Lokau

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 06.01.2023

Laura Josephine Runge

9 Darstellung des Bildungsweges

Allgemeine Hochschulreife

07/2011 Marie-Curie-Gymnasium Dresden

Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin

09/2011 – 09/2014 Carus Akademie, Universitätsklinikum Dresden

Gesundheits- und Krankenpflegerin

10/2014 – 08/2015 chirurgische Intensivstation, Universitätsklinikum Dresden

Studium der Humanmedizin

09/2015 – 06/2017 Universität Pécs, Ungarn

1. Staatsexamen: Juni 2015

10/2017 – 10/2021 Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

2. Staatsexamen: Oktober 2021

11/2021 – 10/2022 Praktisches Jahr an der TU Dresden

3. Staatsexamen: Dezember 2022

Ärztin in Weiterbildung

Ab 02/2023 Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Dresden

10 Anhang

10.1 Material

10.1.1 Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper - Alle primären Antikörper (β -Actin, GAPDH, phospho-STAT3, STAT3) wurden in 5% BSA in TBS-T verdünnt. Alle sekundären Antikörper (anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG) wurden in 5% Milchpulver in TBS-T verdünnt.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
β-Actin Antibody	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
GAPDH (D16H11) XP® Rabbit mAb	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP® Rabbit mAb	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
STAT3 (124H6) Mouse mAb	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	1:3000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:3000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

10.1.2 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
5X Reaction Buffer for RT	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
10x SDS-Page Rotiphorese	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat APS 10%	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth Karlsruhe
Ethanol absolut	Chemsolute by Th. Geyer, Renningen
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Histopaque®-1077	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kodan Tinktur forte farblos	Schülke & Meyr, Norderstedt
Immobilon Western HRP Substrat	Millipore by Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nukleotide dCTP, dATP, dUTP, dGTP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBST	Calbiochem by Merck, Darmstadt

Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Precision Plus WesternC Standards	Bio-RAD, Hercules, CA, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Revert Aid Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RT-PCR grade water	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Stripping Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SYBR® Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TEMED	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tris-hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasser Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandelt	Roth, Karlsruhe

10.1.3 Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Heizblock	Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Zellzähler	Countess™ II FL Automated Cell Counter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Elisa Plattenleser	CLARIOstar® Plus	BMG Labtech, Ortenberg
Waage	Präzisionswaage 440-33N	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Western Blot Entwickler	Imager Fluor Chem E	Protein Simple, San Jose, CA, USA
Inkubator	Binder CB	Binder, Tuttlingen
Kochplattenrührer	Hotplate Stirrer UC152	Stuart Equipment, Staffordshire, UK
Mikroskop	AE21 ZOE Fluorescent Cell Imager	Motic, Barcelona, Spanien Bio-RAD, Hercules, CA, USA
PCR cycler		Bio-RAD, Hercules, CA, USA
Pipettierhilfe	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettenhaltersystem		Eppendorf, Hamburg
Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach
qPCR Gerät	QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Proteinbestimmung Plattenreader	Glomax-Multi Detection System	Promega, Mannheim
Netzgeräte	PowerPac Basic	Bio-RAD, Hercules, CA, USA
Kipp-/Rollmischer	RS TR-05	Phoenix Instrument, Garbsen
Spektrophotometer	ScanDrop ²	Analytik Jena, Jena
Schüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Western Blot Transfer System	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-RAD, Hercules, CA, USA
Venenstauer		Sarstedt, Nümbrecht

Vortex	Vortex-Schüttler MS 3 basic	IKA, Staufen
Wasserbad	W6 W	Labortechnik Medingen, Dresden
Western Blot Kammer System	Mini-Protean® Tetra-Cell	Bio-RAD, Hercules, CA, USA
Zellkulturbank	Herasafe 2030i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5417R Multifuge 3 S-R Heraeus Tisch	Eppendorf, Hamburg Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

10.1.4 Kits

Tabelle 7: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Human IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Human IL-11 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Mouse IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Mouse IL-11 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
NucleoSpin RNA-Kit	Macherey-Nagel
DC Protein Assay Kit	Bio-RAD, Hercules, CA, USA

10.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Hersteller
hActin	Forward: 5' CTCGCCTTTGCCGATCC 3' Reverse: 5' TTCTCCATGTCGTCCCAGTT 3'	Sigma-Aldrich, München
hGAPDH	Forward: 5' AGCCACATCGCTCAGACAC 3' Reverse: 5' GCCCAATACGACCAAATCC 3'	Sigma-Aldrich, München
hgp130	Forward: 5' GGGCAATATGACTCTTTGAAGG 3' Reverse: 5' TTCCTGTTGATGTTTCAGAATGG 3'	Sigma-Aldrich, München
hIL-6	Forward: 5' CACCAGGCAAGTCTCCTCAT 3' Reverse: 5' TCCAAAGATGTAGCCGCC 3'	Sigma-Aldrich, München
hIL6R	Forward: 5' GCTGAACCTTGCTCCCGACAC 3' Reverse: 5' AAGAGCCCCCTCAGCAATGT 3'	Sigma-Aldrich, München
hIL-11	Forward: 5' GGACAGGGAAGGGTTAAAGG 3' Reverse: 5' CTCAGCACGACCAGGACC 3'	Sigma-Aldrich, München
hIL11R	Forward: 5' GGCTATGGACACTCTGCTGC 3' Reverse: 5' GCAGACACCAGGGCTGTAG 3'	Sigma-Aldrich, München
mGAPDH	Forward: 5' AAGGTCATCCCAGAGCTGAA 3' Reverse: 5' CTGCTTCACCACCTTCTTGA 3'	Sigma-Aldrich, München
mgp130	Forward: 5' ACCTGCTCTGGGTGGAATGG 3' Reverse: 5' CGGCTTGTTTGAGGTACGCC 3'	Sigma-Aldrich, München
mIL-6	Forward: 5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3' Reverse: 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'	Sigma-Aldrich, München
mIL6R	Forward: 5' CATCTGTGAGTGGCGTCCGA 3' Reverse: 5' TCGTTGTGGCTGGACTTGCT 3'	Sigma-Aldrich, München
mIL-11	Forward: 5' CTGCACAGATGAGAGACAAATTCC 3'	Sigma-Aldrich, München

	Reverse: 5' GAAGCTGCAAAGATCCCAATG 3'	
mIL11R	Forward: 5'AATACCGACCAGCACAGCAT 3' Reverse: 5' TGA CTCGTACCGCGTGTG 3'	Sigma-Aldrich, München
Oligo dT	5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Sigma-Aldrich, München

10.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
5x Laemmlipuffer	2,5 mM Tris-Hydrochlorid 10% Glycerol 2% SDS 5% 2-Mercaptoethanol pH 6,8 Spatelspitze Bromphenolblau
Blocking Puffer	TBS 1x 333 µmol/l Albumin Fraktion V 0,2% Nonidet P40
Laufpuffer	10% 10xSDS-Page Rotiphorese
Lysepuffer	1 mmol/l Tris-hydrochlorid pH 7,5 150 mmol/l Natriumchlorid 0,5 mol/l EDTA pH 8 1% Triton-X-100
Sammelgel	20% Sammelgelpuffer 5% Acrylamid 0,075% Ammoniumpersulfat 0,08% TEMED
Sammelgelpuffer	1,84 mol/l Tris 0,5% SDS pH 6,8
Sekundärantikörper Verdünnungspuffer	TBS-T 5% Milchpulver
TBS 10x	74,3 mmol/l Tris 0,4 mol/l Tris-hydrochlorid 1,5 mol/l NaCl pH 7,4-7,6
TBS-T	TBS 1x 0,25% Tween 20
Transferpuffer	25 mmol/l Tris 192 mmol/l Glycin 20% Methanol
Trenngel	20% Trenngelpuffer 10% Acrylamid 0,075% Ammoniumpersulfat 0,08% TEMED
Trenngelpuffer	1,84 mol/l Tris 1% SDS pH 8,8

10.1.7 Rekombinante Zytokine und Rezeptoren

Tabelle 10: Verwendete Zytokine und Rezeptoren

Name	Hersteller
Hy-IL-6	Hergestellt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Garbers, wie zuvor beschrieben (Fischer et al., 1997)
IL-6	Hergestellt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Garbers, wie zuvor beschrieben (Mackiewicz et al., 1992)
IL-6R α	Hergestellt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Garbers, wie zuvor beschrieben (Riethmueller et al., 2017)
IL-11	Hergestellt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Garbers, wie zuvor beschrieben (Lokau et al., 2018)
IL-11R α	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

10.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Molecular biology 384-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CELLSTAR® Zellkultur Flaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® Zellkultur Multiwell Platten (6, 12 Well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Countess™ Cell Counting Chamber Slides	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ELISA-Platten 96 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Filterpapiere Western Blot	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikrotest Platten 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht
Müllbeutel Labsolute	Th. Geyer, Renningen
Nitrilhandschuhe Shieldskin orange nitrile 260	Shield Scientific, Bennekom, Niederlande
Nitrilhandschuhe	MaiMed, Neuenkirchen
Nitrocellulose Transfermembran 0,45 μ m	GVS, Sanford, ME, USA
Petrischalen 92x16 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 μ l, 300 μ l, 1000 μ l)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (200 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg
S-Monovette 9 ml Li-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht
Schlinggazetupfer	Fuhrmann, Much

SafeSeal Reagiergefäße (500 µl, 1500 µl, 2000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (10ml, 25ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Serologische Pipetten (5ml)	Corning, Corning, NY, USA
Trypan Blue Stain (0,4%)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
WesternSure® Pen	LI-COR, Lincoln, NB, USA
Zellen-Schaber	Sarstedt, Nümbrecht
Corning® 100 mm TC-treated Culture Dish	Corning, Corning, NY, USA
Zellschalen steril	Corning, Corning, NY, USA

10.1.9 Zellkulturmedien und -reagenzien

Tabelle 12: Verwendete Zellkulturmedien und -reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Trypsin 0,25%	PAN-Biotech, Aidenbach
DMEM	PAN-Biotech, Aidenbach
FBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ham's F12 Medium	PAN-Biotech, Aidenbach
L-Glutamine	PAN-Biotech, Aidenbach
PBS	PAN-Biotech, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAN-Biotech, Aidenbach
RPMI 1640	PAN-Biotech, Aidenbach
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

10.1.10 Zelllinien und Primärzellen

Tabelle 13: Verwendete Zelllinien und Primärzellen

Bezeichnung	Referenz
AGS	89090402 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
CLS-103	CVCL_5725
J774.A1	ATCC TIB-67
N87	ATCC CRL-5822
THP-1	ATCC TIB-202
U-937	ATCC CRL-1593.2
PBMC	Hergestellt, wie in 2.2.1.4 beschrieben
Primäre Mausmakrophagen	Hergestellt aus C57BL/6 Mäusen, von Dr. Lokau aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Garbers