

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
(Prof. Dr. med. M. Ghadimi)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Der Einfluss einer Aktivierung des STAT3-
Signalweges auf das Ansprechen kolorektaler
Karzinomzellen auf eine Radiochemotherapie**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Carolin Herzberg
aus
Duderstadt

Göttingen 2019

| | |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer |
| Referent: | PD. Dr. med. M. Grade |
| Ko-Referent: | Prof. Dr. Dieter Kube |
| Drittreferent: | Prof. Dr. Martin Oppermann |
| Datum der mündlichen Prüfung: | Dienstag, der 12.11.2019 |

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss einer Aktivierung des STAT3-Signalweges auf das Ansprechen kolorektaler Karzinomzellen auf eine Radiochemotherapie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Kolorektales Karzinom | 1 |
| 1.1.1 | Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2 | Molekulare Pathogenese | 2 |
| 1.1.3 | Diagnose und Staging | 3 |
| 1.1.4 | Therapie | 6 |
| 1.2 | Allgemeines Prinzip einer Kombination von RT und Chemotherapie | 7 |
| 1.2.1 | Strahlentherapie-Resistenz | 8 |
| 1.2.2 | 5-Fluorouracil als Radiosensibilisator | 9 |
| 1.3 | Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) | 9 |
| 1.3.1 | Der JAK-STAT-Signalweg | 9 |
| 1.3.2 | STAT3 | 10 |
| 1.3.3 | IL-6 | 11 |
| 1.3.4 | SOCS3 | 12 |
| 1.4 | Bedeutung von STAT3 in der Tumorentstehung | 13 |
| 1.5 | Klinische Problematik: STAT3 und die Therapieresistenz des Rektumkarzinoms | 14 |
| 1.5.1 | STAT3-Expression in humanen kolorektalen Karzinomzelllinien | 14 |
| 1.5.2 | Der Einfluss von STAT3 auf eine RCT-Sensibilisierung | 14 |
| 1.6 | Zielsetzung | 15 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 16 |
| 2.1 | Material | 16 |
| 2.1.1 | Chemikalien | 16 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterialien | 17 |
| 2.1.3 | Puffer und Lösungen | 18 |
| 2.1.4 | Antikörper | 20 |
| 2.1.5 | Zellen und Zellkulturreagenzien | 20 |
| 2.1.6 | Antibiotika, Enzyme und rekombinante Proteine | 21 |
| 2.1.7 | Vektoren | 21 |
| 2.1.8 | Kits | 22 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.1.9 | Primer | 22 |
| 2.1.10 | Computerprogramme | 23 |
| 2.1.11 | Geräte | 23 |
| 2.2 | Methoden | 25 |
| 2.2.1 | Allgemeine Zellkulturmethoden | 25 |
| 2.2.2 | Transfektion durch Elektroporation | 27 |
| 2.2.3 | Lipidtransfektion | 28 |
| 2.2.4 | RNA-Interferenz | 28 |
| 2.2.5 | Proteinisolation | 29 |
| 2.2.6 | Proteinbestimmung nach Bradford | 30 |
| 2.2.7 | Proteindetektion mittels SDS-PAGE und Western Blot | 30 |
| 2.2.8 | Koloniebildungstest | 32 |
| 2.2.9 | RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung | 33 |
| 2.2.10 | cDNA-Synthese | 34 |
| 2.2.11 | Semi-quantitative Real-Time PCR | 34 |
| 2.2.12 | Stimulation des STAT3-Signalweges durch IL-6 | 36 |
| 2.2.13 | Überexpression von STAT3 in sensiblen Zelllinien | 38 |
| 2.2.14 | Dual-Luciferase-Reporter-Assay | 40 |
| 3 | ERGEBNISSE | 44 |
| 3.1 | Ausschalten des endogenen STAT3-Inhibitors SOCS3 durch siRNA | 44 |
| 3.1.1 | SOCS3-Expression in 12 kolorektalen Zelllinien | 45 |
| 3.1.2 | Ausschalten von SOCS3 mittels RNAi | 45 |
| 3.1.3 | RNA-Isolation und semiquantitative Real-Time PCR nach Transfektion mit siSOCS3 | 48 |
| 3.2 | Stimulation des STAT3-Signalweges durch IL-6 | 50 |
| 3.2.1 | IL-6-Stimulation mit Serumentzug | 50 |
| 3.2.2 | IL-6-Stimulation ohne Serumentzug | 53 |
| 3.3 | Überexpression von STAT3 in sensiblen kolorektalen Karzinomzelllinien | 55 |
| 3.3.1 | STAT3-Expression in 12 kolorektalen Karzinomzelllinien | 56 |
| 3.3.2 | Überexpression von STAT3 in LS411N | 56 |
| 3.3.3 | Überexpression von STAT3 in HCT116 | 57 |
| 3.3.4 | Überexpression von STAT3 in SW480 | 58 |
| 3.4 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 60 |

| | |
|---|-----------|
| 4 DISKUSSION | 62 |
| 4.1 Humane kolorektale Karzinomzelllinien als <i>In-vitro</i> -Modell | 62 |
| 4.2 Ausschalten des endogenen STAT3-Inhibitors SOCS3 durch siRNA | 63 |
| 4.2.1 SOCS3-Expression in 12 kolorektalen Karzinomzelllinien | 63 |
| 4.2.2 SOCS3 und RCT-Resistenz | 64 |
| 4.3 Stimulation des STAT3-Signalweges durch IL-6 | 66 |
| 4.3.1 Ansprechen auf RCT nach IL-6-Stimulation | 66 |
| 4.3.2 IL-6 und RCT-Resistenz | 68 |
| 4.4 Überexpression von STAT3 | 69 |
| 4.4.1 Ansprechen auf RCT nach Überexpression von STAT3 | 69 |
| 4.4.2 STAT3 und RCT-Resistenz | 71 |
| 4.5 Ausblick | 72 |
| 5 ZUSAMMENFASSUNG | 74 |
| 6 LITERATURVERZEICHNIS | 75 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|---|
| APC | <i>adenomatous polyposis coli</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| APRF | <i>acute phase response factor</i> |
| Bcl-2, Bcl-xL | <i>B-cell lymphoma 2, B-cell lymphoma-extra large</i> |
| BRAF | Gen des B-raf(<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>)-Proteins |
| BSA | bovines Serum-Albumin |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CFA | <i>colony formation assay</i> (Koloniebildungstest) |
| CIS | <i>cytokine-inducible SH2-protein</i> |
| CpG | Cytosin-phosphatidyl-Guanin |
| Ct | <i>cycle threshold</i> |
| ddH ₂ O | Doppelt destilliertes Wasser |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | 1,4-Dithio-DL-threit(ol) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| FAP | Familiäre Adenomatöse Polyposis |
| FBS | fetales Kälberserum |
| FOLFOX | Folinsäure (Leucovorin) - FOL 5-Fluorouracil - F Oxaliplatin - OX |
| GP80, GP130 | Glykoprotein 80, Glykoprotein 130 |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| G ₀ /1/2-Phase | <i>gap-0/1/2-Phase</i> |
| HCl | Salzsäure |

| | |
|---------|---|
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> |
| HPRT1 | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| JAK | Tyrosinkinase der Janus-Familie |
| KRAS | <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i> |
| KRK | Kolorektales Karzinom |
| LAR II | <i>luciferase assay reagent II</i> |
| LV | Leervektor |
| MAP | <i>mitogen-activated protein</i> |
| MLH1 | <i>MutL homolog 1</i> |
| mRNA | <i>messenger ribonuclein acid</i> |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NIH | National Institutes of Health |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| PBS | Phosphat Buffered Saline |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pH | Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration |
| PIAS3 | <i>protein inhibitor of activated STAT3</i> |
| pSTAT3 | <i>phospho signal transducer and activator of transcription</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| P53 | Protein 53 |
| qRT-PCR | Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction |
| Ras | <i>rat sarcoma</i> (ein G-Protein) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| RNAse | Ribonuklease |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RCT | Radiochemotherapie |
| RT | Raumtemperatur, Radiotherapie, Reverse-Transkriptase |
| S | Serin |

| | |
|----------|---|
| SH2 | <i>scr-homology-2</i> |
| shRNA | <i>small hairpin RNA</i> |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SOCS | <i>suppressor of cytokine signalling</i> |
| S-Phase | Synthese-Phase |
| scc | <i>single cell clone</i> (Einzelzellklon) |
| STAT3 | <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| TBST | <i>Tris-buffered saline tween</i> |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TNM | Tumor, Nodes (Lymphknoten), Metastase |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| ü.N. | über Nacht |
| ÜE | Überexpression |
| UICC | Union Internationale Contre le Cancer |
| UVB | Ultraviolett-Strahlung der Wellenlänge 315–280 nm |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| WT | Wildtyp |
| Y | Tyrosin |
| Z | Zellen |
| ZL | Zelllinie |
| 5-FU | 5-Fluorouracil |
| 80S | 80 Svedberg (entspricht 10-13 s) |
| bp | Basenpaare |
| rpm | <i>rounds per minute</i> (Runden pro Minute) |

1 Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Jährlich erkranken weltweit mehr als 1,3 Millionen Menschen am kolorektalen Karzinom (KRK), und fast 700.000 der Erkrankten versterben daran jedes Jahr. Damit ist das KRK die dritthäufigste Krebserkrankung weltweit und die vierthäufigste krebsassoziierte Todesursache (Ferlay et al. 2015; RL Siegel et al. 2015).

Die Inzidenz variiert global sehr stark. Die höchsten Neuerkrankungsraten sind in westlichen Ländern zu verzeichnen mit stabilen bis leicht abfallenden Mortalitätsraten in den USA und vielen Ländern Westeuropas seit den 1980er Jahren. Zumindes zum Teil ursächlich ist hier vermutlich die präventive Endoskopie mit Polypenentfernung (Brenner et al. 2016). In den Ländern, welche in den letzten Jahren ein starkes Wirtschaftswachstum verzeichneten, wie zum Beispiel China oder viele Staaten Osteuropas, ist die Mortalitätsrate in der Tendenz steigend (Center et al. 2009). Die weltweite Häufigkeitsverteilung lässt sich durch die Assoziation der Erkrankung mit dem westlichen Lebensstil erklären. Als Risikofaktoren belegt sind eine positive Familienanamnese für das KRK (Taylor et al. 2010), die Colitis ulcerosa als chronisch-entzündliche Darmerkrankung (Jess et al. 2012), Rauchen (Liang et al. 2009), ausgeprägter Alkoholkonsum (Fedirko et al. 2011), hoher Verzehr von rotem Fleisch (Chan et al. 2011), Übergewicht (Ma et al. 2013) und Diabetes mellitus (Jiang et al. 2011). Die Prävalenz steigt mit dem Alter, wobei das mittlere Erkrankungsalter laut deutschem Krebsregister 2013 bei Männern bei 70,3 Jahren und für Frauen bei 72,9 Jahren (<https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE> Zugriff am 08.02.2018) liegt. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Ferlay et al. 2015). Abbildung 1-1 zeigt die Entwicklung der Mortalität des KRKs in verschiedenen Staaten.

Die Prognose des KRKs hat sich in den vergangenen Dekaden in vielen westlichen Ländern stetig verbessert. Zum Beispiel stieg in Deutschland das 5-Jahres-Überleben von 49,8% in den Jahren 1988 bis 1990 auf 61,4% im Zeitraum von 2000 bis 2002 (Brenner et al. 2012). Die verbesserte Prognose ist vermutlich neben der präventiven Endoskopie größtenteils auf eine verbesserte operative und systemische Therapie zurückzuführen (Mitry et al. 2002; RL Siegel et al. 2017; Wolpin et al. 2007). Der

wichtigste die Prognose bestimmende Faktor ist das Stadium bei Diagnosestellung (R Siegel et al. 2012).

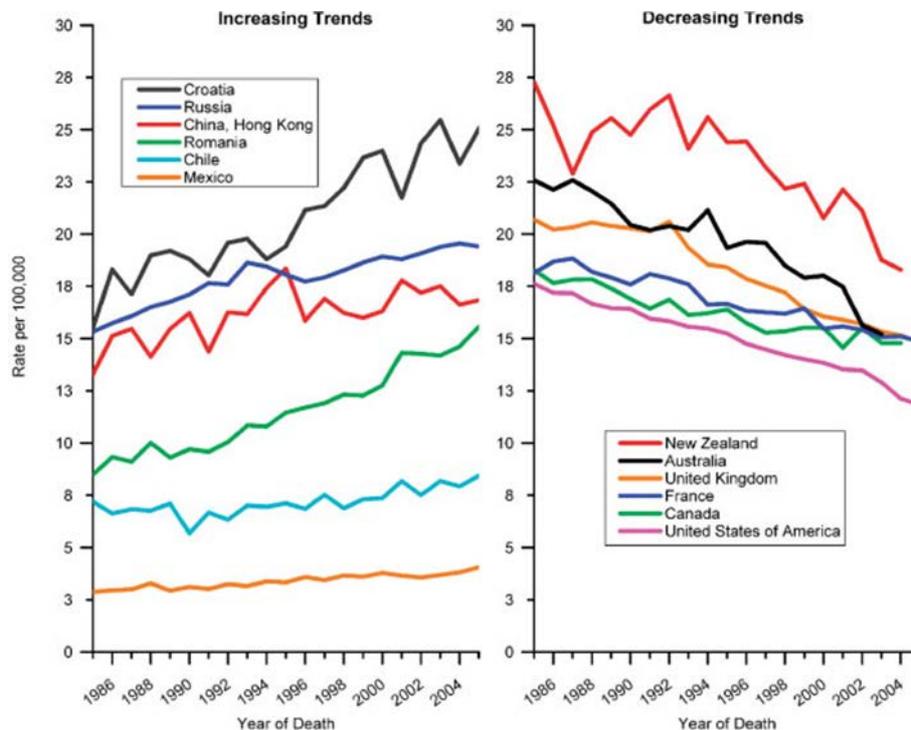


Abbildung 1-1: Trends für die Mortalität des KRKs bei Männern in ausgewählten Staaten von 1985 bis 2005; Quelle: Mortalitätsdatenbank der Weltgesundheitsorganisation unter: www-dep.iarc.fr (Stand November 2015)

1.1.2 Molekulare Pathogenese

Das KRK entsteht, ausgehend vom normalen Mukosaepithel im Kolon oder Rektum, durch eine heterogene Ansammlung von genetischen und epigenetischen Veränderungen. Für das sporadisch auftretende KRK, welches über 95% aller KRK ausmacht, sind mehrere Sequenzen genetischer Aberrationen bekannt (Brenner et al. 2014; Grady und Pritchard 2014).

Die Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein erklärt die Entstehung der meisten kolorektalen Adenokarzinome (Vogelstein et al. 1988). Sie beschreibt den Prozess der Entwicklung des KRKs über Adenome (tubulär, tubulovillös oder villös) durch eine Sequenz verschiedener somatischer Veränderungen, an deren Anfang häufig die APC-Mutation steht. Diese führt zu einer übermäßigen Aktivität des Wnt-Signalweges (Emons et al. 2015; Markowitz und Bertagnolli 2009). Weiterhin folgen häufig eine aktivierende Mutation des KRAS-Onkogens und eine inaktivierende Mutation des Tumorsuppressorgens p53. Neben diesen Genmutationen sind

chromosomale Instabilitäten (CIN), das heißt numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen, typisch für diesen Typ der Karzinomentstehung (Brenner et al. 2014).

Ein ebenfalls gut beschriebener, aber seltenerer Entwicklungspfad des sporadischen KRKs ist die Entstehung von Adenokarzinomen aus sogenannten serratierten Läsionen. Hierzu gehören hyperplastische Polypen, sessile serratierte Adenome (SSA) und traditionelle serratierte Adenome (TSA). Der sogenannte *serrated neoplasia pathway* ist nicht durch eine Schlüsselmutation gekennzeichnet, sondern in frühen Stufen durch die Inaktivierung verschiedener Gene mittels Hypermethylierung von Genomregionen mit erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte (sogenannte CpG-Inseln) und häufig durch aktivierende BRAF-Mutationen (Andrew et al. 2017; Herreros de Tejada et al. 2017). Von der Hypermethylierung ist unter anderem das DNA-Reparaturgen MLH1 betroffen, welches im Zusammenhang mit einer Mikrosatelliteninstabilität gesehen wird (Goldstein 2006).

Etwa 2 bis 5% der Fälle KRK treten hereditär auf (Jasperson et al. 2010). Die beiden häufigsten Formen sind hier das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom) und das Karzinom im Rahmen der familiären adenomatösen Polyposis Coli (FAP) (Brenner et al. 2014). Das Lynch-Syndrom ist Folge verschiedener Keimbahnmutationen in DNA-Reparaturgenen (Jasperson et al. 2010) und ähnelt in der Pathogenese dem *serrated neoplasia pathway*, wobei jedoch fast nie eine BRAF-Mutation zu finden ist (Parsons et al. 2012). Die FAP ist durch eine Keimbahnmutation des APC-Gens gekennzeichnet, welche wie bereits erwähnt auch in der Adenom-Karzinom-Sequenz eine entscheidende Rolle spielt (Jasperson et al. 2010).

1.1.3 Diagnose und Staging

Das KRK wird klassifiziert anhand der lokalen Tiefeninfiltration des Primärtumors (T), des Ausmaßes der Lymphknotenmetastasierung (N) sowie des Vorhandenseins und der Anzahl von Fernmetastasen (M). Tabelle 1-1 zeigt die 8. Edition der TNM-Klassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC) von 2017.

Tabelle 1-1: TNM-Klassifikation des KRKs (8. Edition des American Joint Committee on Cancer): T – Tiefeninvasion des Primärtumors, N – Lymphknoteninfiltration, M – Vorhandensein von Fernmetastasen

| | |
|-----|---|
| Tx | Lokale Tumorerinfiltration unbekannt |
| T0 | Kein Primärtumor nachweisbar |
| Tis | Infiltration der Mucosa ohne Infiltration der Lamina muscularis mucosae (Carcinoma in situ) |
| T1 | Infiltration der Tela submucosa |
| T2 | Infiltration der Tunica muscularis propria |
| T3 | Infiltration der Subserosa/Adventitia |
| T4a | Perforation des viszerale Peritoneums |
| T4b | Infiltration von Nachbarorganen oder –geweben |
| Nx | Regionaler Lymphknotenbefall unbekannt |
| N0 | Keine Metastasen in den regionalen Lymphknoten |
| N1a | Metastasen in einem regionalen Lymphknoten |
| N1b | Metastasen in 2 bis 3 regionalen Lymphknoten |
| N1c | Satellitenmetastasen in Subserosa oder perikolisch/perirektalem Fettgewebe ohne regionale Lymphknotenbeteiligung |
| N2a | Metastasen in 4 bis 6 regionalen Lymphknoten |
| N2b | Metastasen in 7 oder mehr regionalen Lymphknoten |
| Mx | Fernmetastasierung unbekannt |
| M0 | Keine Fernmetastasen |
| M1a | Fernmetastasen in einer nicht regionalen Lymphknotenstation oder einem nicht angrenzenden Organ (z. B. Leber, Lunge, Ovar) |
| M1b | Fernmetastasen in mehreren nicht regionalen Lymphknotenstationen oder mehr als einem nicht angrenzenden Organ ohne peritoneale Metastasen |
| M1c | Peritoneale Metastasen mit oder ohne Fernmetastasen |

Zur Diagnosesicherung des KRKs dient in der Regel eine Biopsie im Rahmen einer Endoskopie. Zum Ausschluss von Zweitumoren, welche in 2 – 4% der Fälle zeitgleich auftreten, sollte präoperativ oder, falls dies nicht möglich ist, innerhalb der ersten 6 Monate postoperativ eine komplette Koloskopie durchgeführt werden (Adloff et al. 1989; Pox et al. 2013).

Der Diagnosestellung folgen Untersuchungen zur Ermittlung der Tumorausbreitung und Feststellung des TNM-Stadiums. Die Ausbreitung des Primärtumors und Ermittlung des T-Stadiums erfolgt für frühe Stadien des Rektumkarzinoms durch eine Endosonographie (Pox et al. 2013; Puli et al. 2010) und die Magnetresonanztomographie für eine genauere Einschätzung des T-Stadiums und

eine präoperative Beurteilbarkeit des Lymphknotenstatus (Al-Sukhni et al. 2012; Pox et al. 2013).

Bei Diagnosestellung sind bei 25% der Patienten mit einem Kolonkarzinom und 18% der Patienten mit einem Rektumkarzinom bereits Fernmetastasen nachweisbar (Kekelidze et al. 2013). Französische Register zeigten eine Häufigkeit von 14,5% für synchrone Leber- und 2,1% für synchrone Lungenmetastasen (Manfredi et al. 2006; Mitry et al. 2010). Ein präoperativer Ausschluss sollte mittels Sonographie des Abdomens und Röntgen des Thorax in 2 Ebenen erfolgen und bei unklarem Befund sollte das Staging ggf. um eine Computertomographie von Thorax und/oder Abdomen ergänzt werden (Pox et al. 2013).

Aus der TNM-Klassifikation leiten sich die Stadien der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) ab. Sie fassen Tumorausbreitungen mit ähnlicher Prognose zusammen und sind maßgebliche Grundlage für die Therapieentscheidung (siehe Abschnitt 1.1.4). Tabelle 1-2 zeigt die 8. Edition der UICC-Klassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC) von 2017.

Tabelle 1-2: UICC-Klassifikation des KRKs (8. Edition des American Joint Committee on Cancer)

| | T | N | M |
|--------------|-------------|------------|----------|
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium I | T1 oder T2 | N0 | M0 |
| Stadium IIA | T3 | N0 | M0 |
| Stadium IIB | T4a | N0 | M0 |
| Stadium IIC | T4b | N0 | M0 |
| Stadium IIIA | T1 oder T2 | N1/N1c | M0 |
| | T1 | N2a | M0 |
| Stadium IIIB | T3 oder T4a | N1/N1c | M0 |
| | T2 oder T3 | N2a | M0 |
| | T1 oder T2 | N2b | M0 |
| Stadium IIIC | T4a | N2a | M0 |
| | T3 oder T4a | N2b | M0 |
| | T4b | N1 oder N2 | M0 |
| Stadium IVA | Jedes T | Jedes N | M1a |
| Stadium IVB | Jedes T | Jedes N | M1b |
| Stadium IVC | Jedes T | Jedes N | M1c |

1.1.4 Therapie

Die Standardtherapie des KRKs ist die chirurgische Resektion des Tumors und des korrespondierenden Lymphabflussgebietes. Für das Rektumkarzinom entspricht dies in der Regel einer totalen mesorektalen Exzision (TME), das heißt die Entfernung des gesamten Rektums und des Mesorektums inklusive mesorektaler Faszie (Heald und Ryall 1986; Pox et al. 2013). Für Karzinome des oberen Rektumdrittels (12 - 16 cm ab Anokutanlinie) ist auch eine Teilentfernung des Rektums mit partieller mesorektaler Exzision (PME) mit 5 cm Sicherheitsabstand zum Tumor möglich.

Bei Patienten mit Kolonkarzinom ist nach kompletter operativer Tumorentfernung (R0-Resektion) im UICC-Stadium I eine zusätzliche Therapie nicht empfohlen. Ab Stadium II kann eine adjuvante Chemotherapie mit Folinsäure und 5-Fluorouracil und ab Stadium III sollte eine adjuvante Chemotherapie mit Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin (FOLFOX) zur Senkung der Rezidivrate und Erhöhung des Gesamtüberlebens erfolgen (Pox et al. 2013).

Die Therapie des Rektumkarzinoms besteht im UICC-Stadium I ebenfalls nur aus der R0-Resektion, eine zusätzliche Therapie zeigt nur sehr geringen Benefit (van Gijn et al. 2011). Zur Steigerung des Gesamtüberlebens kann ab UICC-Stadium II und sollte ab UICC-Stadium III vor einer R0-Resektion eine neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie sowie eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden (Pox et al. 2013). Die Radiotherapie (RT) dient präoperativ der Reduktion der Tumormasse zur besseren Operabilität und verbessert die Lokalrezidivrate (Sauer et al. 2012). Die präoperative RT entspricht einer Kurzzeitbestrahlung mit 25 Gy in Einzeldosen von 5 Gy an 5 aufeinander folgenden Tagen, die Operation erfolgt unmittelbar im Anschluss. Bei der präoperativen Radiochemotherapie (RCT) erfolgt eine fraktionierte Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 50,4 Gy in 28 Fraktionen, begleitet von einer Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, ggf. kombiniert mit Folinsäure. Die Operation erfolgt hier erst nach vier bis sechs Wochen (Pox et al. 2013).

Die Therapie bei Fernmetastasierung oder Peritonealkarzinose (Stadium IV) ist sehr komplex, sodass eine detaillierte Zusammenfassung hier nicht sinnvoll ist und stattdessen auf die entsprechende Literatur verwiesen wird (Pox et al. 2013).

Die adjuvante Therapie wird in Deutschland vier bis sechs Wochen nach der Resektion durchgeführt (Pox et al. 2013). Abbildung 1-2 zeigt die zunehmende Bedeutung von RT und Chemotherapie in fortgeschrittenen Stadien.

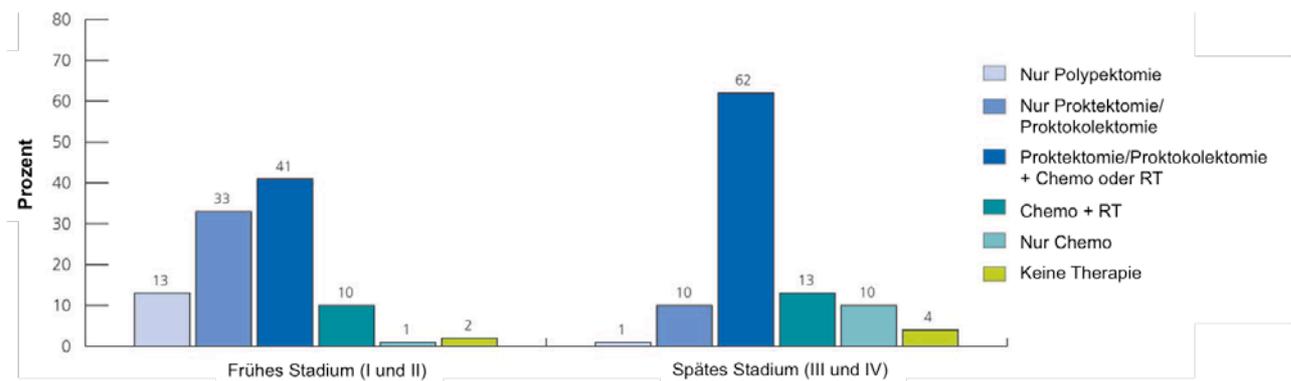


Abbildung 1-2: Stadienabhängige Therapie des Rektumkarzinoms 2008 in den USA (Grafikquelle: modifiziert nach Siegel et al. 2012, S. 226)

1.2 Allgemeines Prinzip einer Kombination von RT und Chemotherapie

Steel beschrieb 1979 zwei theoretische idealisierte Mechanismen für die Interaktion von RT und Chemotherapie, welche klinisch in der Regel synergistisch für die Tumorkontrolle verantwortlich sind (Steel und Peckham 1979). Zum einen gibt es die räumliche Kooperation zwischen den Therapieformen: die Bestrahlung wirkt lokal am Primärtumor und das Chemotherapeutikum im gesamten Körper gegen Mikrometastasen (Steel et al. 1978), sofern die Dosis hoch genug ist. Zum anderen gibt es eine interagierende Wirkung der beiden Methoden am Primärtumor. Diese Wirkung kann additiv sein, das heißt eine reine Summe der Effekte für die alleinige Anwendung der einzelnen Methoden oder supraadditiv. Hierbei verstärken sich die Effekte gegenseitig, so dass sie zusammen größer als die Einzeleffekte sind. Beide Effekte werden durch eine radiosensitivierende Wirkung des Chemotherapeutikums hervorgerufen. Idealerweise sollte sich der wirkverstärkende Effekt stärker am Tumor als am Normalgewebe bemerkbar machen (vgl. Abbildung 1-3) (Phillips und Fu 1976). Eine weitere lokoregionäre Interaktionsmöglichkeit ist die infraadditive Wirkung. Hierbei mindert das Chemotherapeutikum den toxischen Effekt der Bestrahlung am Gewebe. Dieses führt dann zu einer besseren lokalen Tumorkontrolle, wenn es vornehmlich Normalgewebe schützt und somit eine höhere Bestrahlungsdosis erlaubt (Millar et al. 1978).

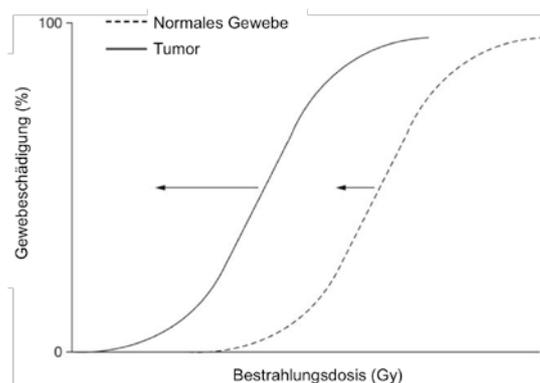


Abbildung 1-3: Schematische Dosis-Wirkungs-Kurve von Tumor und Normalgewebe nach Bestrahlung. Der Abstand zwischen den beiden Kurven ist ein Maß für den therapeutischen Bereich. Die Pfeile symbolisieren die Linksverschiebung (hin zu größerer Gewebeschädigung) durch den additiven Effekt von gleichzeitiger Chemotherapie. Dieser ist idealerweise größer beim Tumor als beim Normalgewebe (Nishimura 2004).

1.2.1 Strahlentherapie-Resistenz

Die klinische Erfahrung zeigt, dass eine Reihe von Tumoren, entweder als Merkmal einer Entität oder wie beim Rektumkarzinom eine Subgruppe von Patienten betreffend, nicht oder nur schlecht auf eine Strahlentherapie ansprechen. In vielen Fällen ist der Mechanismus der Strahlentherapieresistenz unzureichend verstanden. Ionisierende Strahlung verursacht DNA-Schäden, auch über Bildung von Sauerstoffradikalen. Deshalb ist eine große Tumormasse und der damit einhergehende niedrige Sauerstoffpartialdruck im Tumorzentrum ein Faktor, welcher mit schlechtem Therapieerfolg bei der Strahlentherapie einhergeht (Vaupel 2004). Eine scheinbare Strahlentherapieresistenz wird vermittelt durch die Repopulation nach Bestrahlung. Durch Selektion können sich hieraus resistente Populationen entwickeln. Verhindern kann man dies z. B. durch akzelerierte Bestrahlung, d. h. kürzere Intervalle bei fraktionierter Bestrahlung (Suwinski und Withers 2003).

Das Ausmaß des DNA-Schadens und die Signalverarbeitung der Zelle entscheiden darüber, ob diese den DNA-Schaden repariert und überlebt oder Apoptose induziert wird. Erworbene Mutationen von Protoonkogenen wie *mitogen activated kinase* (MAPK) können durch Förderung von der Expression proapoptotischer und DNA-Reparaturgene Strahlentherapieresistenz einer Tumorentität oder eines Patientenkollektivs vermitteln. Eine Beeinflussung anti-apoptischer Signalwege ist somit ein wichtiger Ansatzpunkt für RT-Sensibilisierung (Hein et al. 2014). Darüberhinaus gibt es viele weitere Faktoren, die die Strahlentherapieempfindlichkeit beeinflussen können, auf die hier aber nicht im Detail eingegangen werden kann.

Daher sei hier auf entsprechende Übersichtsarbeiten verwiesen (Barker et al. 2015; Chang et al. 2016; Grade et al. 2012).

1.2.2 5-Fluorouracil als Radiosensibilisator

5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Chemotherapeutikum, welches in der Therapie des Rektumkarzinoms als Radiosensibilisator eingesetzt wird. Es handelt sich hierbei um ein Nukleosidanalogen, welches nach intrazellulärer Aktivierung zum Nukleotid umgebaut und als Antimetabolit seine Wirkung entfaltet (Pox et al. 2013).

Das Nukleosidanalogen Fluoro-desoxy-Uracilmonophosphat (F-dUMP) hemmt mit Folat als Kofaktor die Thymidylat-Synthetase. Dies führt zu einem Mangel an Nukleotiden als DNA-Bausteine und schließlich über fehlerhafte DNA zum Zelltod (Hartmann und Heidelberger 1961; Pinedo und Peters 1988). Das Nukleosidanalogen Fluoro-Uracilmonophosphat (F-UMP) wird in die RNA inkorporiert und inhibiert so die Transkription und dadurch die Proteinsynthese (Valeriotte und Santelli 1984). Der strahlensensibilisierende Effekt des 5-FU wird vor allem durch seine Wirkung an der DNA hervorgerufen. Er besteht zum einen darin, die Zellen durch zusätzliche DNA-Defekte zu schädigen, des Weiteren ist 5-FU in höherer Dosierung in der Lage, die sehr radioresistenten Zellen in der S-Phase zu töten. In geringeren Dosen wirkt es wahrscheinlich über Zellzyklusprogression, vor allem durch Förderung des Übergangs von der G1- in die S-Phase, radiosensibilisierend (Lawrence et al. 1997).

1.3 Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)

1.3.1 Der JAK-STAT-Signalweg

Darnell entdeckte in den 1990er Jahren eine Proteinfamilie, die nach Stimulation durch verschiedene Interferone die Transkription einer Reihe von Genen aktiviert, die *signal transducer and activator of Transcription* (STAT)-Familie (Darnell et al. 1994). Zu der STAT-Familie gehören neben STAT3 noch sechs weitere Proteine. Den STAT-Proteinen ist gemeinsam, dass sie durch eine Tyrosinkinase der Janus-Familie (JAK), welche als intrazelluläre Komponente an einen transmembranösen Zytokinrezeptor gebunden ist, phosphoryliert werden, über eine *src-homology-2*-(SH2)-Domäne dimerisieren und so die Transkription verschiedener Zielgene aktivieren. Diese Gene

regulieren unter anderem die Entwicklung, Proliferation und Differenzierung von Zellen (Copeland et al. 1995; Harrison 2012; WX Li 2008; Shuai et al. 1994).

1.3.2 STAT3

1994 beschrieb Zhong erstmals ein 92 kD großes DNA-bindendes Protein der STAT-Familie, welches unter dem Einfluss von Interleukin-6 (IL-6) oder dem *epidermal growth factor* (EGF) seine aktivierende Tyrosinphosphorylierung (Y705) erhält (Zhong et al. 1994). Zeitgleich wurde in Hepatozyten ein Protein entdeckt, welches als Antwort auf eine IL-6-Stimulierung Gene der akuten Phase-Reaktion aktiviert. Es wurde *acute phase response factor* (APRF) genannt und konnte in sehr vielen humanen Geweben nachgewiesen werden (Akira et al. 1994). Später stellte sich heraus, dass es sich um das gleiche Protein handelte, welche fortan als Mitglied der STAT-Familie STAT3 hieß. STAT3 wird durch eine ganze Reihe verschiedener Zytokine aktiviert, unter anderem die Zytokine der IL-6-Familie (IL-6, Interleukin-11, *leukemia inhibitory factor*, Oncostatin M, *ciliary neurotropic factor* und Cardiotropin-1), Wachstumsfaktoren wie z. B. *epidermal growth factor* (EGF), *colony stimulating factor 1* (CSF-1) und *platelet-derived growth factor* (PDGF), Interferon- γ , Interleukin-10 und Interleukin-2 (Takeda und Akira 2000). Abbildung 1-4 zeigt schematisch den IL-6-STAT3-Signalweg mit dem endogenen Inhibitor SOCS3 (siehe Abschnitt 1.3.4).

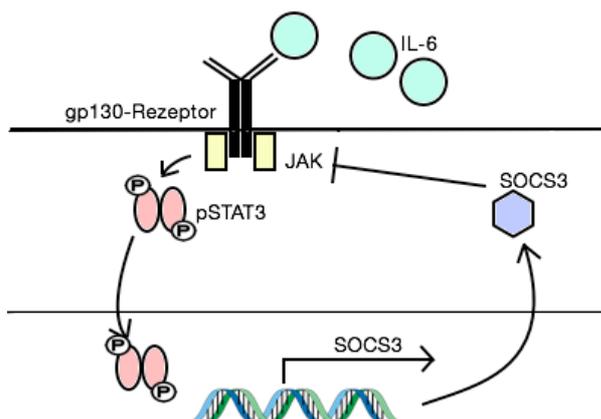


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des IL-6-STAT3-SOCS3-Signalwegs

STAT3 wird durch Phosphorylierung am Tyrosin Y705 aktiviert (Kaptein et al. 1996) und ist dann in der Lage, über die SH2-Domäne Homodimere aber auch Heterodimere mit STAT1 zu bilden (Haan et al. 1999; Zhong et al. 1994). Nach der Bildung von Dimeren findet eine Translokation vom Zytosol in den Zellkern statt (Akira et al. 1994).

Zur maximalen Transkriptionsaktivierung durch STAT3 ist neben der Tyrosinphosphorylierung noch eine Serinphosphorylierung an S727 notwendig (Boulton et al. 1995; Wen et al. 1995; Zhang et al. 1995). Abbildung 1-5 zeigt schematisch die Struktur des STAT3-Protein mit beiden Phosphorylierungsstellen.

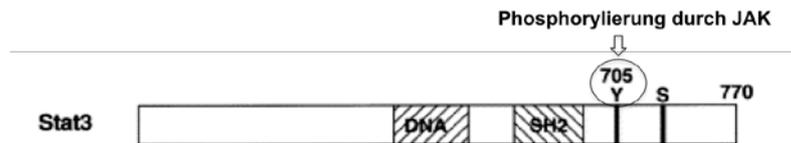


Abbildung 1-5: Struktur des STAT3-Proteins: Aminosäurelänge (rechts): 770; DNA-Bindestelle in der Mitte; SH2-Domäne: vermittelt Bindung am Rezeptor und Dimerisierung über Tyrosin(Y)705; S: Phosphorylierungsstelle für Serinproteasen (modifiziert nach Takeda und Akira 2000, S. 200)

Neben dem oben beschriebenen STAT3 α existiert weiterhin eine Spleißvariante, STAT3 β , welche sich von STAT3 α in ihren Eigenschaften unterscheidet. STAT3 β fehlen am carboxyterminalen Ende 55 Aminosäuren, die durch 7 andere Aminosäuren ersetzt sind. Die Funktion von STAT3 β als Transkriptionsfaktor ist in der Literatur umstritten: Es ist zum einen beschrieben, dass in einigen Zelltypen STAT3 β zur Aktivierung STAT3-abhängiger Gene in der Lage ist und in anderen Zelltypen wiederum nicht (Sasse et al. 1997). Außerdem wurden dominant-negative Funktionen (d. h. Inhibition von STAT3 α) und Transkriptionsaktivierung von Genen, auf die STAT3 α kein Effekt hat, beschrieben (Caldenhoven et al. 1996; Schaefer et al. 1995).

1.3.3 IL-6

IL-6 aktiviert verschiedene Signalwege, von denen viele Zellproliferation und -differenzierung steuern. Einer dieser Signalwege ist der JAK-STAT3-Signalweg (Zhong et al. 1994). Wie in Abbildung 1-6 veranschaulicht bindet IL-6 zunächst an den IL-6-Rezeptor (GP80) (Yamasaki et al. 1988), in löslicher oder membrangebundener Form, und dieser induziert dann eine Homodimerisierung des Glykoproteins GP130 (Murakami et al. 1993; Taga et al. 1989). GP130 ist mit einer Januskinase (JAK) assoziiert, die nach Dimerisierung von GP130 durch Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert wird, was anschließend zur Phosphorylierung von STAT3 führt (Guschin et al. 1995; Stahl et al. 1994).

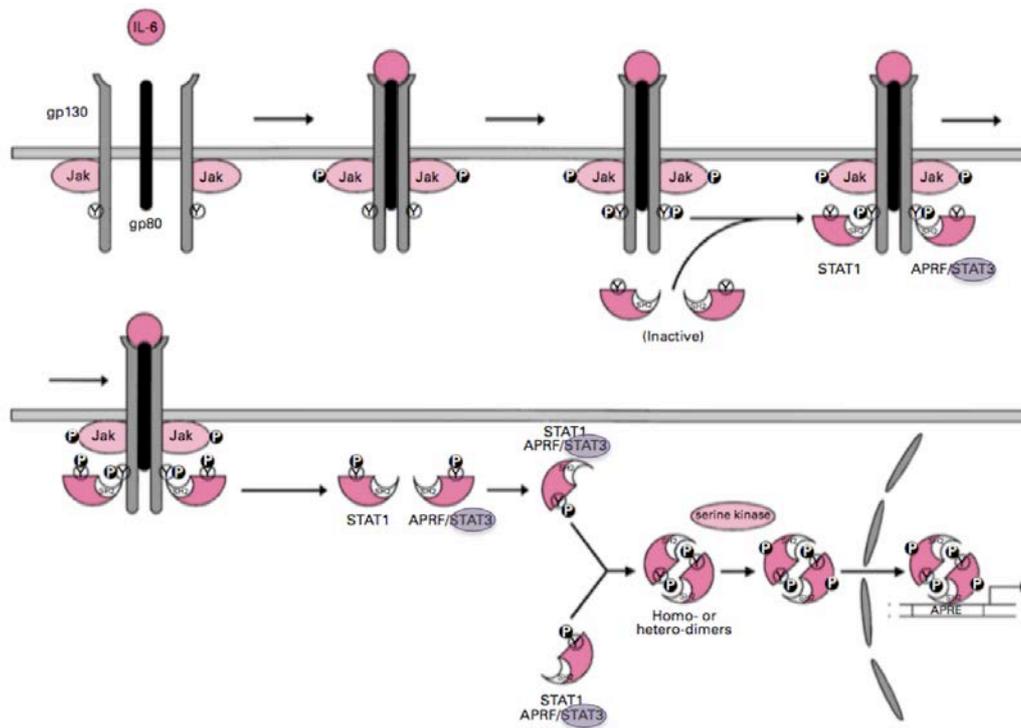


Abbildung 1-6: IL-6-Rezeptor-Signalverarbeitung (modifiziert nach Heinrich et. al. 1998, S. 302)

1.3.4 SOCS3

1997 entdeckten drei Arbeitsgruppen parallel eine Gruppe von Proteinen, deren Expression durch Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs gesteigert wird und welche durch Inhibition der STAT-Phosphorylierung am Tyrosin als ein negativer Feedback-Mechanismus wirken (Endo et al. 1997; Naka et al. 1997; Starr et al. 1997). Starr nannte diese Proteinfamilie *suppressor of cytokine signalling* (SOCS). Sie besteht aus acht Proteinen (SOCS1-7 und CIS), welche alle eine SH2-Domäne enthalten, mit der sie kompetitiv mit anderen Proteinen, wie z. B. STAT3, an Phosphotyrosine binden (Kile und Alexander 2001; Masuhara et al. 1997). Außerdem besitzen alle SOCS-Proteine eine C-terminale SOCS-Box, welche die Degradation von Tyrosinphosphorylierten Proteinen, wie der aktivierten JAK, vermittelt (Babon et al. 2009; Kamizono et al. 2001). SOCS1 und SOCS3 enthalten zusätzlich eine N-terminale *kinase inhibitory region* (KIR), welche die Kinase-Region von JAK bindet und hemmt, wenn die SH2-Domäne von SOCS gleichzeitig den phosphorylierten Tyrosin-Rest der aktivierten JAK bindet (Sasaki et al. 1999; Yasukawa et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass SOCS3 eine entscheidende Rolle in der Regulation der

Signalübermittlung von IL-6, dem Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor, *leukemia-inhibitory factor* und Leptin zukommt. Gesteigerte Expression von SOCS3 verhindert die IL-6-abhängige STAT3-Aktivierung und den daraus resultierenden Effekt auf die Zelldifferenzierung und –proliferation (Suzuki et al. 1998).

1.4 Bedeutung von STAT3 in der Tumorentstehung

STAT3 ist ein proliferationsfördernder Transkriptionsfaktor. Es ist daher nicht verwunderlich, dass eine Funktionssteigerung von STAT3 in der Tumorentstehung eine Rolle spielt. 1999 konnte erstmals gezeigt werden, dass die Einführung von konstitutiv aktivem STAT3 in Mäusefibroblasten zur Zelltransformation und Tumorentstehung führt (Bromberg et al. 1999). Seither wurde in verschiedenen Tumorentitäten das Vorkommen von konstitutiv aktivem STAT3 beschrieben. Zum Beispiel ist es beim Glioblastom mit höherer Mortalität (Birner et al. 2010) und beim Ösophaguskarzinom mit besonders aggressivem Wachstum (MF Chen et al. 2012) assoziiert. Außerdem ist konstitutiv aktives STAT3 nur in Mammarkarzinomzellen, nicht aber in normalen Brustdrüsenzellen nachzuweisen (Garcia et al. 1997). Es konnte zudem, auch für die ausgewählten Beispiele von Tumorentitäten, gezeigt werden, dass das Ausschalten des konstitutiv aktiven STAT3s zu einer Reduktion des Tumorwachstums führt (Burke et al. 2001; MF Chen et al. 2013).

Für das Tumorwachstum wichtige Zielgene von STAT3, welche bei konstitutiver Aktivität überexprimiert werden, kodieren u. a. für die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 (Bhattacharya et al. 2005), Bcl-xL (Bromberg et al. 1999) und Mcl-1 (Epling-Burnette et al. 2001). Umgekehrt kann durch die Inhibition von konstitutiv aktivem STAT3 in Tumoren Apoptose induziert werden (LF Gao et al. 2006; Iwamaru et al. 2007; Kunigal et al. 2009). Zielgen *cyclin D1* als Progressor des Zellzyklus am G1-/S-Phase-Übergang (Bromberg et al. 1999) trägt über Verhinderung von Zellzyklusarrest zur Proliferationssteigerung bei. Ebenfalls Zielgen von STAT3 ist das für einen Transkriptionsfaktor kodierende Protoonkogen *c-myc* (Kiuchi et al. 1999). Der Angiogeneesefaktor *vascular endothelial growth factor* (VEGF) trägt zur Angiogenese im Tumorgewebe und damit zum Tumorwachstum bei (Niu et al. 2002). Die Expression einer Untereinheit der *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT), welche die Lebenszeit von Zellen erhöht, wird ebenfalls durch STAT3 gesteigert (Konnikova et al. 2005).

STAT3 spielt nicht nur eine Rolle in der Tumorentstehung, sondern auch in der Tumorinvasion und Metastasierung, indem es die epithelial-mesenchymale Transition fördert (z. B. über den Transkriptionsfaktor Twist) (Yuan et al. 2015).

1.5 Klinische Problematik: STAT3 und die Therapieresistenz des Rektumkarzinoms

Die radikale Resektion des Primärtumors kombiniert mit einer präoperativen RCT mit 5-FU als Radiosensibilisator ist die Standardtherapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms (Pox et al. 2013). Das Ansprechen auf diese neoadjuvante RCT ist jedoch sehr heterogen und es reicht von vollständigem Ansprechen bis hin zur vollständigen Resistenz. Patienten mit resistenten Tumoren unterziehen sich somit einer toxischen Therapie, ohne von ihr zu profitieren. Hieraus ergibt sich die dringende Notwendigkeit molekulare Biomarker zu finden, welche das Ansprechen auf die RCT bereits im Voraus vorhersagen können. Diese molekularen Marker für RCT-Resistenz können gleichzeitig Zielstrukturen liefern für eine gezielte individualisierte Therapie, welche resistente Tumoren gegenüber der neoadjuvanten Therapie sensibilisieren und damit das Ansprechen und die klinischen Prognose des lokal fortgeschrittenen Karzinoms verbessern (Cunningham et al. 2010; Grade et al. 2012).

1.5.1 STAT3-Expression in humanen kolorektalen Karzinomzelllinien

In meiner Arbeitsgruppe wurde 2010 ein *In-vitro*-Modell für die Testung von Zelllinien auf deren Sensibilität gegenüber einer RCT etabliert. 12 humane kolorektale Karzinomzelllinien wurden mit 3 μ M 5-FU vorbehandelt und mit 2 Gy bestrahlt. Parallel wurden prätherapeutische Genexpressionsprofile erstellt und mit den entsprechenden Überlebensfraktionen (*surviving fraction*) korreliert. Die Analysen der Genexpressionsprofile zeigten unter anderem eine signifikant erhöhte STAT3-Expression in Zelllinien mit vergleichsweise hoher RCT-Resistenz (Spitzner et al. 2010; Spitzner und Roesler und et al. 2014).

1.5.2 Der Einfluss von STAT3 auf eine RCT-Sensibilisierung

Die Korrelation von erhöhter STAT3-Expression und RCT-Resistenz legte nahe, dass Zellen, welche hohe STAT3-Level exprimieren, gegenüber einer RCT sensibilisiert

werden könnten, indem STAT3 herunterreguliert wird. In einem Nachfolgeprojekt konnte meine Arbeitsgruppe in den Karzinomzelllinien SW480 und SW837 einen Sensibilisierungseffekt nach Inhibition des STAT3-Signalweges mittels siRNA, shRNA und dem STAT3-Inhibitor STATTIC zeigen (Spitzner et al. 2014).

1.6 Zielsetzung

Nachdem in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, dass eine STAT3-Inhibierung zu einer RCT-Sensibilisierung führt, soll in dieser Doktorarbeit die Rolle von STAT3 bei der Resistenzvermittlung weiter untersucht werden. Ziel dieser Arbeit war die Frage, ob die Stimulation des STAT3-Signalwegs zu einer gesteigerten Resistenz von sensiblen kolorektalen Karzinomzellen auf die RCT führt, welches sich durch eine erhöhte Überlebensfraktion in den Koloniebildungstests äußern würde. Es wird hierbei auf drei unterschiedlichen Ebenen eingegriffen, um die Aktivität des Signalwegs zu verstärken.

Frage 1: Führt das Ausschalten des endogenen Inhibitors von STAT3, SOCS3, in kolorektalen Karzinomzellen mittels RNA-Interferenz durch das Aufheben der endogenen Hemmung der Rezeptor-assoziierten JAK zu einer gesteigerten STAT3-Aktivität und dadurch zu einer Resistenzsteigerung?

Frage 2: Kann durch eine externe Stimulation des STAT3-Signalwegs mit seinem Rezeptorliganden IL-6 die STAT3-Aktivität gesteigert und hierdurch die Sensibilität kolorektaler Karzinomzellen gegenüber einer RCT beeinflusst werden?

Frage 3: Sind kolorektale Karzinomzellen, die stabil STAT3 überexprimieren, resistenter gegenüber einer RCT?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| | |
|--|--|
| Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent | GE Healthcare UK Limited, Chalfont St. Giles, United Kingdom |
| Ammoniumpersulfat (APS) zur Analyse | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Bovines Serum-Albumin (BSA) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Brilliantblau R250 Tabletten | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Bromphenolblau-Lösung | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| 1,4-Dithio-DL-threit(ol) (DTT) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Essigsäure 100% Ph. Eur.,reinst | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol, ROTIPURAN® ≥99,8% | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | QualityBiological, Gaithersburg, MD, USA |
| Glycin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| 2-Propanol (Isopropanol) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Kristallviolett | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland |
| Luminata™ Forte Western HRP Substrate | Millipore Corporation, Billerica, MA,USA |
| MagicMark™ XP Western Protein Standard | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Methanol, ROTIPURAN®, ≥99,9% | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natrium Deoxycholat ≥97% (titration) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Natriumazid (NaN ₃), reinst | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl), ≥99,5% | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

| | |
|--|--|
| Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10% für die Molekularbiologie | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland |
| Nonidet® P40 (NP40) (Ersatzprodukt) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Phosphatase-Inhibitor Cocktail Tabletten; PhosSTOP | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| Protease-Inhibitor Cocktail; Protease Block™ | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland |
| Rotiphorese® Gel30 Lösung | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Roti®-Quant 5x Konzentrat | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Salzsäure (HCl) 5 M | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland |
| Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland |
| SsoFast™ EvaGreen® Supermix | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Tris ultrapure | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Tween® 20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|--|
| 6-Well-Plates Cyto One®, steril | STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland |
| 12-Well-Plates Cellstar®, steril | Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland |
| 96-Well-Plates Cyto One®, steril | STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland |
| 96-Well-Plates, steril | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| 96-Well-Plates, weiß (für Luciferase- Reporter Assay) | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Bad Stabil Konzentrat | neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Filterpapier, Chromatography Paper 3MM Chr, (für Western Blot) | Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, United Kingdom |
| Einmal-Reagenzreservoirs | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

| | |
|--|---|
| Flüssigkeitsreservoirs Rotilabo® PVC | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Kryo-Röhrchen | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Neubauer Zählkammer improved 0,0025 mm ² | Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland |
| Pasteurpipetten Glas (150 und 230 mm) | Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland |
| Pipettenspitzen (10 ml), für Multipette® Stream | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen Safe Seal-Tips® professional | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Pipettenspitzen Tip One® (10, 200, 300 und 1000 µl) | STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen Tip One® (10, 100, 200 und 1000 µl), steril | STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland |
| QIAshredder | Qiagen Sciences, Maryland, USA |
| Reagiergefäß Biosphere® Safe Seal (1,5 ml) | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (2 ml) | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Röhrchen (15 und 50 ml) | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Serologische Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25 und 50 ml) | STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Spritzen, Original-Perfusor® (50 ml) | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Transfermembran, Immobilon®-P Membran, PVDF, Filterporengröße 0,45 µm (für Western Blot) | EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA |
| Transferpipette (3,5 ml) | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Zellkulturflaschen Cyto One® (25, 75 und 225 cm ²) | STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Zellschaber | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellspachtel | TPP, Trasadingen, Schweiz |

2.1.3 Puffer und Lösungen

| | Trenngel, 10%, für 2 Minigele | Sammelgel, für 2 Minigele |
|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| ddH ₂ O | 7,9 ml | 3,4 ml |
| Rotiphorese® Gel30 Lösung | 6,7 ml | 0,83 ml |
| Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH=8,8) | 5 ml | - |

| | | |
|--------------------------------------|--|---------|
| Sammelgelpuffer (1,0 M Tris, pH=6,8) | - | 0,63 ml |
| SDS-Lösung, 10% | 200 µl | 50 µl |
| APS, 10% | 200 µl | 50 µl |
| TEMED | 20 µl | 5 µl |
| Blockierpuffer | 5 g Trockenmilch 100 ml TBS- 0,1% Tween20 | |
| CoomassieBlue-Färbelösung | 50 Vol.-% Methanol 0,05 m-% Brilliantblau 10 Vol.-% Essigsäure 40 Vol.-% ddH ₂ O | |
| CoomassieBlue-Fixierlösung | 50 Vol.-% Methanol 10 Vol.-% Essigsäure 40 Vol.-% ddH ₂ O | |
| CoomassieBlue-Entfärbelösung | 5 Vol.-% Methanol 7 Vol.-% Essigsäure 88 Vol.-% ddH ₂ O | |
| SDS-PAGE-Laufpuffer | 25 mM Tris pH=8,3 192 mM Glycin 0,1 m-% SDS in ddH ₂ O lösen | |
| SDS-PAGE- Probenpuffer (6x) | 3 ml 20% SDS-Lösung 3 ml β-Mercaptoethanol 4 ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau | |
| SDS-PAGE-Sammelgelpuffer | 1 M Tris pH=6,8 in ddH ₂ O lösen | |
| SDS-PAGE-Trenngelpuffer | 1,5 M Tris pH=8,8 in ddH ₂ O lösen | |
| Transferpuffer (Western Blot) | 48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037% SDS 20% Methanol in ddH ₂ O lösen | |
| Tris buffered saline (TBS) Puffer | 150 mM NaCl 50 mM Tris pH=7,5 in ddH ₂ O lösen | |
| TBS-Tween (TBST) | TBS Puffer + 0,1% Tween [®] 20 | |
| Zelllysepuffer | 50 mM Tris-HCl pH=7,8 150 mM NaCl 1% NP-40 in ddH ₂ O lösen | |

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

| Antikörper | Herkunft | Hersteller | Verdünnung | Inkubation |
|---|-----------|---------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Anti-Stat3, polyklonal | Kaninchen | Cell Signaling Danvers MA USA | 1 : 10.000 in 5%-BSA-TBST | üN bei 4 °C |
| Anti-Phospho-Stat3 (Tyr705), monoklonal | Kaninchen | Cell Signaling Danvers MA USA | 1 : 1.500 in 5%-BSA-TBST | üN bei 4 °C |
| Anti-SOCS3, polyklonal | Kaninchen | Cell Signaling Danvers MA USA | 1 : 1.000 in 5%-BSA-TBST | üN bei 4 °C |
| Anti-Aktin Kaninchen, polyklonal | Kaninchen | Sigma Steinheim Deutschland USA | 1 : 2.000 in 5%-Milch-TBST | 2 h bei Raumtemperatur |

Sekundärantikörper

| Antikörper | Herkunft | Hersteller | Verdünnung | Inkubation |
|----------------------------|----------|---------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Anti-Kaninchen, polyklonal | Ziege | Acris Herford Deutschland | 1 : 30.000 in 5%-Milch-TBST | 2 h bei Raumtemperatur |

2.1.5 Zellen und Zellkulturreagenzien

2.1.5.1 Zelllinien

| Zelllinie | ATCC-Nr. | Wachstumsmedium | Wachstumsbedingungen |
|-----------|----------|-----------------------------------|--|
| HCT116 | CCL-247 | McCoy's + 1% L-Glutamin + 10% FBS | 37 °C Raumluft + 5% CO ₂ |
| LS411N | CRL-2159 | RPMI + 1% L-Glutamin + 10% FBS | 37 °C Raumluft + 5% CO ₂ |
| SW480 | CCL-228 | L-15 + 1% L-Glutamin + 10% FBS | 37 °C Raumluft |

2.1.5.2 Zellkulturreagenzien

| | |
|--------------------------------|---|
| 0,25% Trypsin -EDTA (1x) | Gibco® by life technologies™, Paisley, United Kingdom |
| DMSO | Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland |
| Fetal Bovine Serum (FBS) | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| 5-Fluorouracil (5-FU) | Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland |
| HiPerFect Transfection Reagent | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland |

| | |
|--|---|
| Leibovitz's L-15 Medium (1x) [+] L-Glutamine; [+] L-Amino Acids | Gibco® by life technologies™, Paisley, United Kingdom |
| L-Glutamine 200 mM in 0,85% NaCl Solution | Boehringer/Ingelheim Bioproducts Partnership, Veviers, Belgien |
| McCoy's 5A Medium (1x) (Modified) [+] L-Glutamine; [-] Serum | Gibco® by life technologies™, Paisley, United Kingdom |
| Molecular Grade Water | ATCC, Manassas, VA, USA |
| PBS pH 7,2 (1x) Phosphate Buffered Saline [-] CaCl ₂ ; [-] MgCl ₂ | Gibco® by life technologies™, Paisley, United Kingdom |
| RPMI Medium 1640 (1x) [+] L-Glutamine | Gibco® by life technologies™, Paisley, United Kingdom |
| Trypan Blue solution 0,4% | Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland |
| X-treme Gene HP DNA Transfection Reagent | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |

2.1.6 Antibiotika, Enzyme und rekombinante Proteine

| | |
|--|--|
| G 418-BC, flüssig (gebrauchsfertig), steril | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Restriktionsendonuklease Sca I | New England BioLabs, Ipswich, MA, USA |
| Humanes Interleukin-6 | Cell Signaling, Danvers, MA, USA |

2.1.7 Vektoren

| | |
|---|------------------------------------|
| AllStars Negative Control siRNA | Qiagen Sciences, Maryland, USA |
| Signal STAT3 Reporter (luc) Kit: CCS- 9028L Enthält: <ul style="list-style-type: none"> ▪ STAT3 Reporter ▪ Negative control ▪ Positive control | Qiagen Sciences, Maryland, USA |
| FlexiTube GeneSolution GS9021 for SOCS3 Enthält: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hs_SOCS3_1 siRNA ▪ Hs_SOCS3_4 siRNA ▪ Hs_SOCS3_6 siRNA ▪ Hs_SOCS3_7 siRNA | Qiagen Sciences, Maryland, USA |
| pcDNA3.1 pDEST313 | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |

2.1.8 Kits

| | |
|---|--|
| <p>Amaya™ Cell Line Nucleofactor™ Kit V (25 RCT)</p> <p>Enthält:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Nucleofactor-Solution ▪ Küvetten ▪ Transferpipetten | <p>Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland</p> |
| <p>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</p> <p>Enthält:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Luciferase Assay Substrate ▪ Passive Lysis Buffer, 5X ▪ Luciferase Assay Buffer II ▪ Stop & Glo® Substrate ▪ Stop & Glo® Buffer | <p>Promega Corporation, Madison, WI, USA</p> |
| <p>QIAEX II Gel Extraction Kit</p> | <p>Qiagen Sciences, Maryland, USA</p> |
| <p>RNeasy Mini Kit (250)</p> <p>Enthält:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mini-Zentrifugationssäulen • 1 und 2 ml Sammelröhrchen • RNAase-freier RLT-Puffer • RNAase-freier RPE-Puffer ▪ RNAase-freier RW1-Puffer | <p>Qiagen Sciences, Maryland, USA</p> |
| <p>RNase-Free DNase Set</p> <p>Enthält:</p> <ul style="list-style-type: none"> • RNase-freie DNase • RNase-freier RDD-Puffer <p>RNase-freies Wasser</p> | <p>Qiagen Sciences, Maryland, USA</p> |
| <p>SuperScript® III First-Strand Synthesis System</p> <p>Enthält:</p> <ul style="list-style-type: none"> • SuperScript III RT (200 U/μl) • 10 mM dNTP mix • 0.1 M DTT • RNaseOUT (40 U/μl) <p>5X First-Strand Buffer</p> | <p>Invitrogen, Darmstadt, Deutschland</p> |

2.1.9 Primer

| | |
|--|--|
| <p>Random Primer für cDNA-Synthese</p> | <p>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland</p> |
| <p>STAT3 Primer (MWG eurofins, Ebersberg, Deutschland)</p> | <p>For: CTTGACACACGGTACCTGGA Rev: CTTGCAGGAAGCGGCTATAC</p> |

| | |
|---|---|
| SOCS3 Primer (MWG eurofins, Ebersberg, Deutschland) | For: CAAGGACGGAGACTTCGATT Rev: AACTTGCTGTGGGTGACCAT |
| HPRT1 Primer (MWG eurofins, Ebersberg, Deutschland) | For: TGACACTGGCAAACAATGCA Rev: GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT |

2.1.10 Computerprogramme

| | |
|-----------------------------------|--|
| Grapher™ 8 | Golden Software, Inc., Golden, CO, USA |
| ImageQuant™ LAS 4000 mini 1.2 | GE Healthcare UK Limited, Chalfont St. Giles, United Kingdom |
| ImageQuant™ TL 7.0 | GE Healthcare UK Limited, Chalfont St. Giles, United Kingdom |
| KaleidaGraph 4.1.0 | Synergy Software Systems, Dubai, Vereinte Arabische Emirate |
| Microsoft Office 2007 | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |
| MikroWin 2000 | Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland |
| ND-1000 | PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland |
| Wallac 1420 Workstation 3.00.0.53 | PerkinElmer, Waltham, MA, USA |

2.1.11 Geräte

| | |
|---|--|
| Bestrahlungsgerät Xstrahl RS225 X-Ray irradiator | Gulmay Medical Ltd, Camberley (Surrey), United Kingdom |
| CCD Kamera ImageQuant LAS 4000 mini | GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden |
| Elektroblotter, semi-dry | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Gelelektrophorese-Kammer Minigel-Twin | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Glasplatte, ausgeschnitten, mit geradem Schliff, für Minigele | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Glasplatte, fixe Spacer, 1,0 mm, für Minigele | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Inkubator CO ₂ Incubator C200 | Labotect GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Inkubator Heraeus Function line | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Inkubator Water-Jacketed Incubator 3250 | Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA |

| | |
|---|---|
| Kämme (10- und 16-zählig), für Minigele | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Magnetrührer | IKA®-Werke GmbH & COKG, Staufen, Deutschland |
| Mikroskop, invers, Leica DM IL | Leica, Wetzlar, Deutschland |
| Mikroskopkamera, High-speed Leica EC3 | Leica, Wetzlar, Deutschland |
| Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser | Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland |
| Netzgerät PowerPac 3000 | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Netzgerät PowerPac™ HC | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Netzgerät Standard Power Pack P25 | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| pH-Meter PB-11 | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| PerfectBlue Semi-Dry Electro Blotter SEDEC M | PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland |
| Pipette, elektrisch, 8-Kanal Research pro 50-1200 µl | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Pipette, Multipipette® Stream | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Pipetten „Eppendorf Reference“ (variabel) (0,1-2,5; 0,5-10; 2-20; 10-100; 50-200 und 100-1000 µl) | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Pipettierhelfer accu-jet® | Brand GMBH + COKG, Wertheim, Deutschland |
| Plattformschüttler Polymax 1040, Heidolph | OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland |
| Präzisionswaage BP 610 | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| Präzisionswaage ED224S | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| Schüttler MS 3 digital | IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland |
| Silikonabdichtung, 1,0 mm, für Minigel | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Spectrophotometer NanoDrop® ND-1000 | PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland |
| Stereomikroskop Leica S6 E | Leica, Wetzlar, Deutschland |
| Sterilbank Typ HS 18/2 | Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland |
| Sterilbank SterilGARD Hood Class II Typ A/B3 | The Baker Company, Sanford, ME, USA |
| Thermomixer comfort | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Transfektionsgerät Nucleofactor™ 2b Device | Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland |
| Victor™ X4 Multilabel Plate Reader | PerkinElmer, Waltham, MA, USA |

| | |
|--|---|
| Vortexer IKA® MS1 Shaker | IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland |
| Vortexer Lab dancer | IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland |
| Vortexer Vortex Genie 2 G-560 E | Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA |
| Wasserbad GFL 1003 | Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland |
| Zählkammer, Neubauer improved | Brand GMBH + COKG, Wertheim, Deutschland |
| Zentrifuge 5415 D | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Zentrifuge Heraeus Fresco 17 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Zentrifuge Heraeus Labofuge 400 R | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Zentrifuge, Mini, Rotilabo® | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Fluoreszenzlampe, Vorschaltgerät Hg 50 W | Leica, Wetzlar, Deutschland |
| Tiefkühlschrank (-80 °C) VIP Series MDF U74V | Sanyo, Moriguchi, Japan |
| Membranpumpe Miniport | KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland |
| Kühlschrank (4 °C; -20 °C) Premium | Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland |
| eCount™ Colony Counter | Heathrow Scientific® LLC, Nottingham, United Kingdom |
| Wippschüttler WS42 | A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg / Versbach, Deutschland |
| Tiefkühlschrank (-20 °C) Biomedical Freezer MDF U537 | Sanyo, Moriguchi, Japan |

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Es wurden die humanen Karzinomzelllinien SW480, HCT116 und LS411N verwendet. Alle verwendeten Zellen wurden steril bei 37 °C in Inkubatoren unter den von der ATCC (American Type Culture Collection) für die jeweiligen Zelllinien empfohlenen

Bedingungen kultiviert. Alle Experimente wurden in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von ca. 60 – 70% durchgeführt.

2.2.1.1 Zellsplit und Mediumwechsel

Alle zwei bis drei Tage wurde bei geringer Zelldichte das Medium erneuert, um den Zellen neue Nährstoffe zukommen zu lassen. Bei höherer Zelldichte (ca. 80 – 90% Konfluenz) wurden die Zellen passagiert und ein Teil der Zellen zurück in die Flasche gegeben (Splitten). Das Splitverhältnis war neben der Zelldichte auch abhängig von der Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,25% Trypsin-EDTA 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Zellkulturmedium resuspendiert, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und je nach benötigtem Splitverhältnis anteilig zurück in die Zellkulturflasche gegeben.

2.2.1.2 Zellen einfrieren und auftauen

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Wildtypzelllinien, stabil transfizierte Zelllinien und Einzelzellklone bei -150 °C eingefroren. Dieses diente der Vermeidung von Kontamination und Veränderung des Genoms. Zum Einfrieren wurden die Zellen in ihrem jeweiligem Wachstumsmedium, welches zusätzlich 10% DMSO und 20% FBS enthielt, suspendiert und in Kryoröhrchen überführt. In den ersten 24 h wurden die Zellen in einem Isopropanol-haltigen Gefäß langsam auf -80 °C heruntergekühlt und erst anschließend bei -150 °C aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen kurz im 37 °C-Wasserbad erwärmt, in ein 15 ml-Röhrchen mit Medium überführt und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert, resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche (25 cm² Bodenfläche) gegeben. Nach 24 h wurde das Medium erneuert, um tote Zellen zu entfernen.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zellsuspension wurde hierfür 1:10 in Trypanblau-Lösung verdünnt, welche abgestorbene Zellen blau färbt. Mit je 10 µl dieser Suspension wurden die beiden Zählkammerseiten befüllt und alle vitalen und demnach nicht gebläuten Zellen in den insgesamt acht 0,1 mm³ großen Volumen über den Eckquadraten gezählt. Zur Berechnung der Zellzahl wurde der Mittelwert der acht Quadrate gebildet und

anschließend unter Berücksichtigung der Trypanblau-Verdünnung die Zellzahl pro Milliliter durch Multiplikation mit dem Faktor 100.000 ermittelt.

2.2.2 Transfektion durch Elektroporation

Bei der Elektroporation werden Zellen durch ein elektrisches Feld temporär permeabilisiert, sodass u. a. Nukleinsäuren in die Zelle aufgenommen werden können (Neumann et al. 1982). Die Elektroporationen wurden mit dem Transfektionsgerät Nucleofactor™ 2b Device durchgeführt. Die verwendeten Küvetten und die Nucleofector-Lösung stammen aus dem Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit V. Die Transfektionen wurden entsprechend dem empfohlenen Protokoll der Firma Amaxa durchgeführt. Die Zellen wurden wie beim Zellsplit aus der Zellkulturflasche gelöst, eingezählt und jeweils 1 Million Zellen pro Transfektionsansatz in 100 µl Nucleofector-Lösung resuspendiert. Die zu transfizierende Nukleinsäure (Plasmid oder siRNA) lag in einem 1,5 ml-RNase-DNase-freien Reaktionsgefäß vor, wurde mit 100 µl der resuspendierten Zellen vermischt und anschließend in eine Küvette pipettiert. Sobald das Transfektionsgerät mit der Küvette beladen war, erfolgte die Transfektion mit dem Programm T-30. Nach der Transfektion wurde die Zellsuspension mithilfe einer Transferpipette in ein 1,5 ml-RNase-DNase-freies-Reaktionsgefäß mit 1 ml RPMI-Medium überführt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 700 rpm für 5 min zentrifugiert, die Zellen in ihr jeweiliges Wachstumsmedium resuspendiert, in eine 6-Well-Platte überführt und 24 h nach der Transfektion einem Mediumwechsel unterzogen. Bei der Elektroporation mit siSOCS3 wurden 2 Millionen Zellen und 2,5 µl siRNA eingesetzt. Um später größere Proteinmengen für mehrere Western Blots gewinnen zu können, wurden bei SW480 für die siNEG 10 Millionen Zellen und 10 µl siRNA für die Transfektion verwendet. Bei SW480 wurden die Zellen gleichmäßig auf fünf Wells einer 6-Well-Platte bzw. auf 5 T-25-Zellkulturflaschen im Falle der siNEG-transfizierten Zellen aufgeteilt, um eine Proteinisolation an fünf verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion (24, 48, 72, 96 und 120 h) durchführen zu können. Bei HCT116 wurden nur Proteinisolierungen nach 24 und 48 h durchgeführt und deshalb entsprechend weniger Wells benötigt. Näheres zu den verwendeten siSOCS3 siehe Abschnitt 2.2.3.

2.2.3 Lipidtransfektion

Bei der Lipidtransfektion werden die negativ geladenen Nukleinsäuren an positiv geladene Liposomen gebunden. Diese können, wenn sie zu adhären wachsenden Zellen gegeben werden, durch die Phospholipidmembran und somit in die Zellen wandern und dort ihre Funktion entfalten (Felgner et al. 1987).

Dieser Mechanismus wurde genutzt, um die beiden Zelllinien SW480 und HCT116 mit vier verschiedenen *small interfering RNAs* (siRNA), siSOCS3 1, 4, 6 und 7, zu transfizieren. Diese siRNAs sind Bestandteil des FlexiTube GeneSolution GS9021 für SOCS3. Alle siRNAs wurden als Lyophilisat geliefert, nach Lieferung in 50 µl RNase-DNase-freiem Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Die Transfektion mit der AllStars Negative Control siRNA (im Folgenden siNEG genannt) wurde in allen Fällen als Negativkontrolle durchgeführt. Für die Transfektion wurden zunächst 300.000 SW480-Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesetzt, welche über Nacht adhärirten. Der Transfektionsansatz bestand aus 100 µl serumfreiem Medium pro Well, in welchem zunächst 0,5 µl siRNA (entspricht 10 ng) verdünnt und dann 6 µl Lipid (HiPerFect Transfection Reagent) pipettiert wurde. Dieser Ansatz musste 10 min bei Raumtemperatur inkubieren, um die Bindung von Lipid und siRNA zu ermöglichen. Zwischenzeitlich wurde bei den zu transfizierenden Zellen das verbrauchte Medium gegen 2,3 ml frisches Medium ausgetauscht und anschließend der Transfektionsansatz tröpfchenweise zu den Zellen pipettiert. Zur Erhöhung der Proteinausbeute wurden in einer weiteren Transfektionsvariante 600.000 SW480-Zellen pro Well gesetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit 0,75 µl siRNA (entspricht 15 ng) und 9 µl Lipid.

Die Effektivität der Transfektion wurde durch Western Blot- und PCR-Analysen beurteilt. Hierzu erfolgte eine Proteinisolation an vier Zeitpunkten nach der Transfektion (24, 48, 72 und 96 h) und für die RNA-Isolation wurden die Zeitpunkte 24 und 48 h gewählt.

2.2.4 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) mit siRNA nutzt einen endogen vorkommenden posttranskriptionellen Regulationsmechanismus der Zelle. Endogene siRNAs sind Fragmente von einer Länge von ca. 21 Nukleotiden welche durch die RNase Dicer

aus doppelsträngiger RNA durch Spaltung hergestellt werden. Bei dieser Spaltung entsteht ein 2-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende sowie eine 5'-Phosphatgruppe. siRNAs können an komplementäre Sequenzen von *messenger RNA* (mRNA) binden. Mithilfe mit des sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) kann die mRNA etwa in der Mitte der gebundenen Sequenz gespalten werden und anschließend dem Abbau zugeführt werden. Hierdurch kommt es durch Verhinderung der Translation zu einer reduzierten Genexpression (Caplen und Mousses 2003).

Die in dieser Arbeit kommerziell erworbenen siRNAs gegen SOCS3 wurden wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben mittels Lipidtransfektion in die verwendeten kolorektalen Karzinomzellen eingebracht. Durch gezielte Bindung an SOCS3-mRNA und mithilfe des RISC wird auch hier deren Abbau bewirkt und dadurch die SOCS3-Expression inhibiert (Caplen und Mousses 2003).

2.2.5 Proteinisolation

Zur Proteingewinnung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann aus dem jeweiligen Zellkulturgefäß herausgelöst. Bei einer Proteinisolation aus einer Zellkulturflasche glichen die folgenden Schritte dem Splitvorgang (siehe Abschnitt 2.2.1.1), wobei das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen, danach in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert wurde. Das so gewonnene Zellpellet wurde je nach Größe mit 50 – 300 µl Zellysepuffer resuspendiert und anschließend 45 min auf Eis bei 4 °C inkubiert. Die Entfernung von Membran- und Zellkernresten der lysierten Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend direkt weiterverwendet oder zur längerfristigen Aufbewahrung bei -80 °C tiefgefroren. Die Proteingewinnung von Zellen aus 6-Well-Platten unterschied sich in den ersten Schritten: Hierbei wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS im Well mit 100 µl Zellysepuffer 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Vorgehensweise glich der oben beschriebenen Proteingewinnung aus einer Zellkulturflasche.

2.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Bradford-Test durchgeführt, bei dem man sich zunutze macht, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 Proteine bindet und dabei sein Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595 nm Wellenlänge verschiebt, da er durch die Bindung in seiner anionischen Form stabilisiert wird (Bradford 1976). Die Absorption von Licht der Wellenlänge 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration.

Zunächst erfolgte die Herstellung einer BSA-Standardreihe mit Konzentrationen von 0 – 100 µg/ml und die Verdünnung der zu messenden Proteinproben im Verhältnis 1:200 und 1:400. Jeweils 50 µl des Standards und der Verdünnungslösungen wurden in technischen Replikaten in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Inkubation mit 200 µl Roti[®]-Quant (2:5,5) mit darauffolgender Messung im Victor[™] X4 Multilabel Plate Reader bei einer Extinktion von 595 nm. Die Proteinkonzentrationen der unbekanntenen Proben berechneten sich anhand der Steigung der Regressionsgeraden.

2.2.7 Proteindetektion mittels SDS-PAGE und Western Blot

Um bestimmte Proteine in den isolierten Proteinproben nachzuweisen und sie in ihrer Quantität mit anderen Proben zu vergleichen, wurde eine Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht durchgeführt. Anschließend wurden sie mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und durch Immunodetektion sichtbar gemacht.

2.2.7.1 Probenaufbereitung

Zur Vorbereitung für die SDS-PAGE wurden die Proben mit 5fach-SDS-PAGE-Ladepuffer (siehe Abschnitt 2.1.3) versetzt. Das enthaltene SDS versieht die Proteine mit negativer Ladung, sodass sie bei der Elektrophorese zur Anode laufen. Das Bromphenolblau markiert die Lauffront. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung 5 min bei 95 °C aufgekocht. Die denaturierten Proben wurden direkt in die Geltaschen geladen oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurden selbstgegossene Minigele (siehe Abschnitt 2.1.3) verwendet, welche in einer mit SDS-PAGE-Laufpuffer befüllten Gelelektrophoresekammer befestigt und pro Tasche mit 20 µg Protein beladen wurden. Die Verwendung von zwei Proteinstandards, Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (5 µl; auf Polyacrylamidgel und PVDF-Membran sichtbar) und Magic Mark™ Standard (1 µl; bei Immunodetektion sichtbar), diente dem Abschätzen der richtigen Proteinbandengröße. Die Gelelektrophorese lief ca. für 60 – 90 min bei 20 – 30 mA.

2.2.7.3 Western Blot

Beim anschließend durchgeführten Western Blot wurden die aufgetrennten Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen, um sie der Detektion durch Antikörper zugänglich zu machen. Es erfolgte zunächst eine Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol (10 s), Waschen mit destilliertem Wasser (3 min) und Inkubation in Transferpuffer (15 min). Das Polyacrylamidgel wurde nach der Gelelektrophorese für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Western Blot wurde als *semidry blot* durchgeführt, bei dem Membran und Gel zwischen mit Transferpuffer befeuchteten Filterpapieren in die Blot-Apparatur gelegt werden. Durch das angelegte elektrische Feld zwischen den Kontaktplatten der Blot-Apparatur wurden die Proteine von dem Gel auf die Membran übertragen. Der Blot-Vorgang lief eine Stunde bei 100 mA pro Membran.

2.2.7.4 Immunodetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran mussten zuerst die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert werden, um zu verhindern, dass hier später Antikörper unspezifisch binden. Dieses geschah durch Inkubation in 5%-Milch-TBST für eine Stunde. Nun erfolgte die Markierung der gewünschten Proteine mit Antikörpern. Nähere Informationen zu den verwendeten Antikörpern und ihren Inkubationsbedingungen sind im Abschnitt 2.1.4 beschrieben. Ungebundene Antikörper wurden nach der Inkubation entfernt, indem die Membran dreimal 5 min mit TBST gewaschen wurde. Anschließend inkubierte die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper, der spezifisch an den Primärantikörper bindet und eine Peroxidase enthält, die später der Detektion dient. Die ungebundenen Antikörper wurden durch Waschen entfernt und die Antikörper-

markierten Proteinbanden konnten durch Zugabe von Luminata™ Forte Western HRP Substrate, welches durch die *horseradish peroxidase* (HRP) auf dem Sekundärantikörper proportional zur gebundenen Antikörpermenge umgesetzt wird, detektiert werden. Die Detektion erfolgte durch die CCD Kamera ImageQuant LAS 4000 mini. Bei Bedarf konnte die Bandenstärke neben der visuellen Beurteilung auch mithilfe von ImageQuant™ TL 7.0 berechnet werden.

2.2.7.5 Polyacrylamidgel-Färbung

Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung der Geltaschen und des gleichmäßigen und vollständigen Transfers der Proteine auf die PVDF-Membran konnte nach dem Western Blot eine Proteinfärbung des Gels mit CoomassieBlue durchgeführt werden. Dafür wurde das Gel zunächst 30 min in CoomassieBlue-Fixierlösung und anschließend über Nacht in der CoomassieBlue-Färbelösung inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Gel nochmals 30 min fixiert und danach so lange in CoomassieBlue-Entfärbelösung geschwenkt bis der Hintergrund entfärbt war.

2.2.8 Koloniebildungstest

Um zu messen, wie sich eine Behandlung (z.B. RT oder RCT) auf die Fähigkeit von Zellen, aus Einzelzellen wieder Kolonien bilden zu können, auswirkt, wurden Koloniebildungstests durchgeführt (Franken et al. 2006). Hierzu wurde eine Einzelzellsuspension mit definierter Zellzahl in 6-Well-Platten ausgesetzt und dann einige Tage (je nach Verdopplungszeit der Zelllinie) zum Wachsen im Inkubator sitzen gelassen. Zum Abstoppen des Versuches erfolgte eine Fixierung der Zellen mit 1 ml 70%igem-Ethanol und anschließender Färbung mit Hämalaunblau (HCT116, LS411N) oder Kristalviolett (SW480). Unter einem Stereomikroskop erfolgte die Auswertung, bei der bestimmt wurde, wie viele Zellen es geschafft hatten eine Kolonie zu bilden, wobei eine Kolonie so definiert ist, dass sie mehr als 50 Zellen enthalten muss. Bei allen durchgeführten Koloniebildungstests wurden die Zellen nach dem Setzen einer RT oder einer RCT unterzogen. Die RT geschah durch Bestrahlung der Zellen 24 h nach dem Setzen mit Dosen von 0 bis 8 Gy. Zu diesem Zeitpunkt waren die ausplattierten Zellen am Wellboden adhäriert, jedoch hatten sie noch keine Zellteilung durchlaufen. Für die Chemotherapie wurde 8 h nach dem Setzen 3 µM 5-FU, welches der mittleren

Konzentration im Patientenplasma bei einer Chemotherapie des KRKs entspricht, zugegeben. 24 h später wurde das Medium der Zellen gewechselt und somit das 5-FU entfernt.

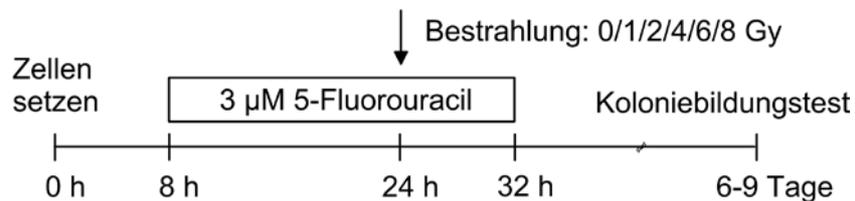


Abbildung 2-1: Zeitlicher Ablauf des Koloniebildungstests

Aus gesetzter Zellzahl und gewachsener Koloniezahl in der unbehandelten Kontrolle wurde dann die Plattierungseffizienz (*plating efficiency* = PE) errechnet, mittels der man dann in den bestrahlten Platten die Überlebensfraktion (*surviving fraction* = SF) bestimmen konnte.

$$PE = \frac{\text{Anzahl von Kolonien}}{\text{Anzahl von gesetzten Zellen}} \times 100\%$$

$$SF = \frac{\text{Anzahl von Kolonien nach RT/RCT}}{\text{Anzahl von gesetzten Zellen}} \times PE$$

Für jede Bedingung wurden drei Wells gesetzt und dann der Mittelwert aus den Triplikaten gewertet, um Schwankungen zu eliminieren.

2.2.9 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Isolation wurde mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen), wie in der Gebrauchsanweisung beschrieben, durchführt. Vor der Isolation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers in 350 µl RLT-Puffer pro Well lysiert. Die RNA wurde am Ende in 30 µl RNase-DNase-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration mithilfe des Spectrophotometers NanoDrop® ND-1000 bestimmt.

2.2.10 cDNA-Synthese

Aus der gesamten isolierten RNA ist allein die mRNA, welche die Genexpression der Zellen widerspiegelt, wichtig für die Beurteilung des Knockdowns. Um sie der semiquantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) zugänglich zu machen, muss sie in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurde zunächst 1 µg RNA und 1 µl Random Primer in einem Gesamtvolumen von 19 µl mit RNAase-freiem Wasser verdünnt. Zur Primeranlagerung folgte eine Inkubation für 10 min bei 72 °C und anschließend für 5 min bei 4 °C. Zwischenzeitlich wurde der *master mix* aus 5x-First-Strand-Buffer (6 µl / Probe), 0,1 M DTT (2,5 µl / Probe), 10 mM dNTPs (1 µl / Probe), der Reversen Transkriptase Superscript III (0,25 µl / Probe) und RNaseOUT (0,5 µl / Probe) hergestellt, nach Ende der Primeranlagerung zu den Proben gegeben und durch auf- und abpipettieren vermischt. Darauf folgten drei Inkubationsschritte: 5 min bei 25 °C, 60 min bei 50 °C und abschließend 15 min bei 70 °C. Abschließend wurden die 30 µl Reaktionsvolumen mit 220 µl RNAase-freiem Wasser verdünnt. Die cDNA konnte nun entweder direkt weiter verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.2.11 Semi-quantitative Real-Time PCR

Mithilfe der qRT-PCR kann mRNA und somit Gen-Expression semi-quantifiziert werden (Rappolee et al. 1988). Dies geschieht durch Amplifikation der synthetisierten cDNA mittels Genprodukt spezifischer Primer unter Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes in die neu gebildete DNA. Aus der Messung des emittierten Fluoreszenzlichts lässt sich auf die vor der Amplifikation vorhandene cDNA-Menge schließen.

Die qRT-PCR wurde mithilfe des SsoFast™ EvaGreen® Supermix durchgeführt. Der einfache Reaktionsansatz ist in Tabelle 2-1 dargestellt. Primer wurden für die zu untersuchenden Gene STAT3 und SOCS3 abgeleitet (Primersequenz: Abschnitt 2.1.9). Die Normalisierung der untersuchten Gene erfolgte über Messung der Expression von Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1), einem sogenannten Haushaltsgen, dessen Expression sich weder in unterschiedlichen Zelltypen unterscheidet, noch durch äußere Einflüsse regulierbar ist (Steen et al. 1990).

Tabelle 2-1: Reaktionsansatz pro Well für die RT-PCR

| | |
|---------------------------|---------|
| RNAse/DNAse freies Wasser | 3,5 µl |
| 5x EvaGreen Taq | 2,0 µl |
| cDNA (10 ng) | 2,5 µl |
| 1 µM Primer | 2,0 µl |
| Volumen gesamt: | 10,0 µl |

Das qRT-PCR-Programm begann mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C, die der Aktivierung der Taq-Polymerase diente. Die Amplifikation geschah in 40 PCR-Zyklen, welche aus drei Phasen bestanden:

1. Die Denaturierungsphase: Bei 95 °C (15 s) wurde die doppelsträngige Ausgangs-DNA (*template*) in Einzelstränge aufgeschmolzen.
2. Die *annealing*-Phase: Bei 60 °C (30 s) lagerten sich die Primer so an die cDNA an, dass sie jene cDNA-Sequenz einrahmen, die aus der mRNA synthetisiert werden soll.
3. Die Elongationsphase: Bei 72 °C (1 min) arbeitet die EvaTaq-Polymerase, welche an die Primer DNA-Bausteine (dNTPs) anbaut und so die Kopien der *template*-DNA herstellt.

Den Amplifikationszyklen folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit einer Temperaturrampe von 60 bis 95 °C bei einer Heizrate von 3 °C pro Minute. Bei der Schmelzkurvenanalyse kann mithilfe der Produkt-spezifischen Schmelztemperatur die Reinheit und Menge des gewünschten PCR-Produkts bzw. die etwaige Bildung von Nebenprodukten beurteilt werden. Zur Auswertung der qRT-PCR dient der Ct-Wert (*cycle threshold* bzw. Schwellenwert-Zyklus), welcher die Zykluszahl repräsentiert, ab dem die Amplifikation exponentiell wird. Dieser ist umso kleiner, je mehr cDNA-*template* ursprünglich vorlag, d. h. je höher die mRNA-Kopienzahl und somit die Transkription des untersuchten Gens war. Die Normalisierung und Berechnung der relativen Expression geschah nach der Delta-Delta-Ct-Methode (Livak und Schmittgen 2001). Für jede Bedingung wurden Triplikate bestimmt, die Ct-Werte wurden gemittelt.

2.2.12 Stimulation des STAT3-Signalweges durch IL-6

Um die Koloniebildungsfähigkeit von Zellen zu beurteilen, die vor der RCT auch eine Stimulation mit IL-6 erhalten hatten, wurde ein Koloniebildungstest in einem von 2.2.8 abweichenden Versuchsschema durchgeführt. Es wurde sowohl eine RT als auch eine RCT jeweils mit und ohne IL-6-Stimulation durchgeführt.

2.2.12.1 IL-6-Stimulation mit Serumentzug

Das FBS in Kompletmedium enthält sehr viele miteinander interagierende Wachstumsfaktoren. Um den Effekt von spezifisch zugesetztem IL-6 isoliert darstellen zu können, wurde ein Serumentzug vor der Bestrahlung durchgeführt. Hierfür wurde 24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen das Kompletmedium gegen serumfreies Medium (ohne FBS) ausgetauscht. Dieses wurde, um gleiche Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, auch in den Kontrollgruppen durchgeführt. Gleichzeitig wurde den mit RCT behandelten Zellen auch das 5-FU (3 μ M) zugeführt und die Bestrahlung 16 h später durchgeführt. 30 min vor Bestrahlung erfolgte die Zugabe von IL-6 (100 ng / ml pro Well) in der IL-6-Gruppe, sodass zum Bestrahlungszeitpunkt das maximale Level an aktiviertem phosphoryliertem STAT3 erreicht war. Die optimale Stimulierungskonzentration und -dauer wurde in Vorexperimenten ermittelt, die nicht Teil dieser Arbeit sind. 24 h nach Zugabe vom 5-FU wurde ein Mediumwechsel zu Kompletmedium durchgeführt (Abb. 2-2).

Das Abstoppen und Färben geschah analog den in 2.2.8 beschriebenen Koloniebildungstests.

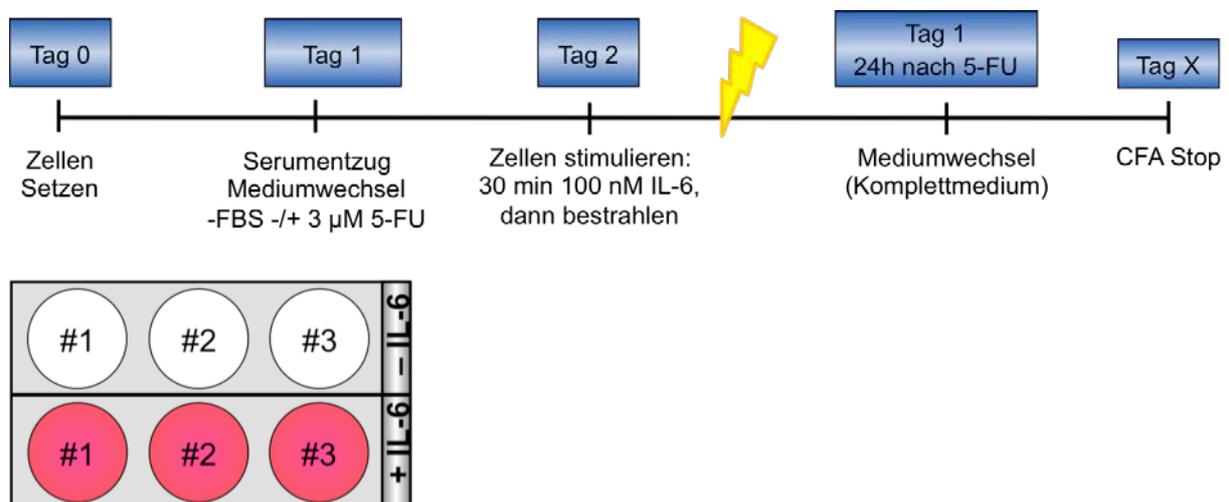


Abbildung 2-2: Stimulation des STAT3-Signalweges mit IL-6 nach Serumentzug - experimenteller Ablauf

Folgende Zelllinien wurden verwendet: LS411N, HCT116 und SW480. Es wurden an Tag 0 die in Tabelle 2-2 dargestellten Zellzahlen für den CFA gesetzt.

Tabelle 2-2: Zellzahlen für den Koloniebildungstest nach IL-6-Stimulation

| Dosis | LS411N | HCT116 | SW480 |
|---------------------------|---------------|---------------|--------------|
| 0 Gy | 2250 | 500 | 500 |
| 1 Gy | 2250 | 500 | 500 |
| 2 Gy | 2250 | 1000 | 500 |
| 4 Gy | 4500 | 1500 | 1000 |
| 6 Gy | 6750 | 2000 | 1500 |
| 8 Gy | 9000 | 3000 | 2000 |
| CFA-Wachstumsdauer | 8 Tage | 6 Tage | 9 Tage |

2.2.12.2 IL-6-Stimulation ohne Serumentzug

Die Koloniebildungstests nach IL-6-Stimulation wurden ebenfalls ohne Serumentzug, d. h. mit Kompletmedium, durchgeführt. Da eine optimale Inkubationszeit für IL-6-Stimulation ohne Serumentzug in unserer Arbeitsgruppe nicht getestet wurde, wurde für die Versuchsanordnung mit Kompletmedium zwei verschiedene Inkubationszeiten gewählt, eine Stimulation über 30 min und eine Stimulation über Nacht. Der experimentelle Ablauf unterschied sich vom Versuchsablauf mit Serumentzug durch den fehlenden Wechsel auf serumfreies Wachstumsmedium und die Über-Nacht-Stimulation erfolgte die Zugabe von IL-6 (100 ng / ml pro Well) schon am Nachmittag vor der Bestrahlung (Abb. 2-3).

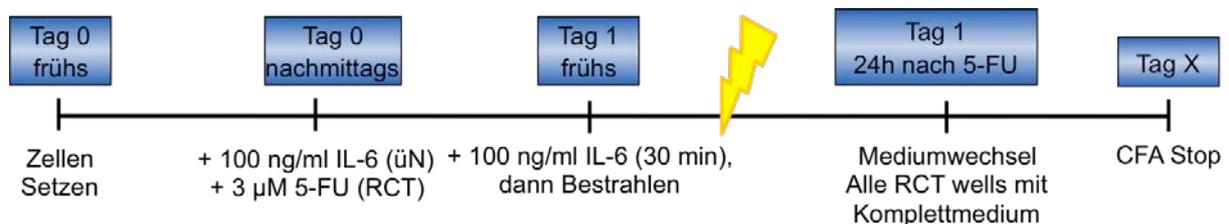


Abbildung 2-3: Stimulation des STAT3-Signalweges mit IL-6 ohne Serumentzug

Das Experiment wurde mit den beiden kolorektalen Karzinomzelllinien HCT116 und SW480 durchgeführt. Auf die Verwendung von LS411N wurde aufgrund des nicht zu erwartenden Effekts bei fehlender STAT3-Expression in dieser Versuchsanordnung verzichtet. Es wurden an Tag 0 die in Tabelle 2-3 beschriebenen Zellzahlen gesetzt.

Tabelle 2-3: gesetzte Zellzahlen für Koloniebildungstest nach IL-6-Stimulation ohne Serumentzug

| <i>Dosis</i> | <i>HCT116</i> | <i>SW480</i> |
|---------------------------|---------------|--------------|
| 0 Gy | 250 | 250 |
| 1 Gy | 250 | 250 |
| 2 Gy | 500 | 250 |
| 4 Gy | 750 | 500 |
| 6 Gy | 1000 | 750 |
| 8 Gy | 1250 | 1000 |
| <i>CFA-Wachstumsdauer</i> | 6 Tage | 9 Tage |

2.2.13 Überexpression von STAT3 in sensiblen Zelllinien

2.2.13.1 *Linearisieren und Aufreinigen der Vektoren*

Für die Überexpression von STAT3 wurde ein Vektorsystem von Invitrogen (pcDNA3.1 / pDEST313) verwendet. Als Kontrolle für die Versuche diente der Leervektor (LV), dem die Sequenz für das STAT3-Gen fehlt. Beide Vektoren enthielten ein GFP-Gen, welches als visuelle Kontrolle der Transfektionseffizienz diente, und ein Gen, welches eine Resistenz gegenüber Genetizin vermittelt und dadurch eine Selektion transfizierter Zielzellen mit diesem Antibiotikum erlaubt. Es wurden zunächst 10 µg des zirkulären Vektors unter Zugabe der folgenden Reagenzien linearisiert:

Tabelle 2-4: Reaktionsansatz für die Vektorlinearisierung

| | |
|-----------------------------|---------|
| RNAase DNAase freies Wasser | 11,2 µl |
| 10x Reaktionspuffer | 5 µl |
| DNA (10 µg) | 23,8 µl |
| Sca I (Restriktionsenzym) | 10 µl |
| Gesamtvolumen | 50 µl |

Der Ansatz wurde 10 min bei 37 °C und danach 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde zur Überprüfung des Erfolgs der Linearisierung eine Gelelektrophorese (0,8% Agarose) durchgeführt. Zur Entfernung des Restriktionsenzym und der Salze im Puffer wurde der linearisierte Vektor mittels QIAEX II Gel Extraction Kit aufgereinigt.

2.2.13.2 *Transfektion und Selektion der Überexpressionsvektoren*

Die Transfektion mit dem STAT3-Vektor wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Für Details zur Durchführung der Elektroporation siehe Abschnitt 2.2.2. Es wurden gemäß Hersteller-Empfehlung für jede Zelllinie je 2 Millionen Zellen mit 2,5 µg STAT3-

Vektor bzw. LV transfiziert und am nächsten Tag mit dem Antibiotikum Genetizin selektiert. Das Aminoglykosid Genetizin hemmt die 80S-Untereinheit der Ribosomen eukaryontischer Zellen. Die vom Vektor exprimierte Genetizin-Resistenz ist eine Aminoglykosid-Phosphotransferase, welche zu einem Wirkverlust von Genetizin in der transfizierten Zelle führt (Southern und Berg 1982). Mithilfe der Resistenz kann man durch Zugabe von Genetizin die transfizierten von den nicht transfizierten Zellen, welche durch das Antibiotikum absterben, selektieren. Es wurde die niedrigste Antibiotikumkonzentration verwendet, unter welcher Wildtyp-Zellen absterben. Diese Konzentration war in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits ermittelt worden: 300 µg / ml für SW480 und 150 µg / ml für HCT116 bzw. LS411N.

2.2.13.3 Einzelzellklonierung

Im Anschluss an die Selektion wurden Populationen von Einzelzellklonen etabliert, um Zellen zu generieren, welche durch eine identische Integration des Vektors ein identisches Expressionslevel der Vektorgene gewährleisten.

Um die Zellen zu vereinzeln, wurde eine Zellsuspension von 32 Zellen/10 ml in einer 96-Well-Platte ausplattiert. 24 Stunden nach dem Aussetzen wurden diejenigen Wells markiert, in denen sich eine Zelle befand. Alle Einzelzellen, die im Verlauf eine Kolonie gebildet hatten, wurden in eine 24-Well-Platte überführt und dann weiterkultiviert bis zu einer T-75-Flasche. Nun wurden Proteine isoliert und mittels Western Blot überprüft, ob die Klone STAT3 überexprimieren. Überexprimierende Klone wurden sowohl für Folgeexperimente weiterkultiviert als auch zur Aufbewahrung eingefroren.

2.2.13.4 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest wurde wie unter Abschnitt 2.2.8 beschrieben mit den Zelllinien SW480 Wildtyp (SW480 WT), SW480 LV und den Einzelzellklonen SW480 STAT3 scc 2 (scc = *single cell clone*) und scc 7 mit den in Tabelle 2-5 genannten Zellzahlen durchgeführt.

Tabelle 2-5: Zellzahlen für den Koloniebildungstest der SW480 STAT3-Überexpressionsklone

| Dosis | SW480 WT | SW480 LV, STAT3 scc 2 und scc 7 |
|---------------------------|-----------------|--|
| 0 Gy | 250 | 500 |
| 1 Gy | 250 | 500 |
| 2 Gy | 250 | 500 |
| 4 Gy | 250 | 500 |
| 6 Gy | 500 | 1000 |
| 8 Gy | 750 | 1500 |
| CFA-Wachstumsdauer | 9 Tage | 9 Tage |

Der Koloniebildungstest mit den Zelllinien HCT116 WT, HCT116 LV, sowie HCT116 STAT3 scc 2, scc 4 und scc 7 wurde ebenfalls unter den in Abschnitt 2.2.8 beschriebenen Bedingungen durchgeführt und mit den in Tabelle 2-6 genannten Zellzahlen gesetzt.

Tabelle 2-6: gesetzte Zellzahlen für den Koloniebildungstest der HCT116 STAT3-Überexpressionsklone

| Dosis | HCT116 WT | HCT116 LV, STAT3 scc 2, scc 4 | HCT116 STAT3 scc 7 |
|---------------------------|------------------|--|-------------------------------|
| 0 Gy | 250 | 250 | 750 |
| 1 Gy | 250 | 250 | 750 |
| 2 Gy | 500 | 250 | 750 |
| 4 Gy | 750 | 500 | 1500 |
| 6 Gy | 1000 | 750 | 2250 |
| 8 Gy | 1500 | 1000 | 3000 |
| CFA-Wachstumsdauer | 6 Tage | 6 Tage | 6 Tage |

2.2.14 Dual-Luciferase-Reporter-Assay

Der Dual-Luciferase-Reporter-Assay bietet die Möglichkeit, die Funktion von Transkriptionsfaktoren bzw. des vorgeschalteten Signalwegs zu ermitteln.

Dies ermöglicht ein Vektorsystem, welches aus zwei verschiedenen Vektoren besteht, welche jeweils für eine Luciferase kodieren. Einer der Vektoren kodiert für die Renilla-Luciferase, welche in jeder Zelle unreguliert exprimiert wird und als Transfektionskontrolle und der Normalisierung dient. Der zweite Vektor kodiert für die Firefly-Luciferase, welche nur nach Bindung von dem Transkriptionsfaktor exprimiert wird, dessen Funktion überprüft werden soll, also in diesem Experiment STAT3 (schematische Darstellung siehe Abbildung 2-4). Das Ausmaß der Transkription der Luciferase kann nach Zellyse durch Zugabe des Luciferasesubstrats und einer Lumineszenz-Messung des Reaktionsprodukts ermittelt werden. Die Normalisierung der Lumineszenz-Messung nach Transfektion mit der Renilla-Luciferase dient der Minimierung von Schwankungen in der Transfektionseffizienz (Farr und Roman 1992).

Als Negativkontrolle diente ein Firefly-Vektor-System ohne STAT3-Bindungsstelle. Auf diese Weise lässt sich indirekt der Effekt des aktiven STAT3 auf die Expression der Firefly-Luciferase messen.

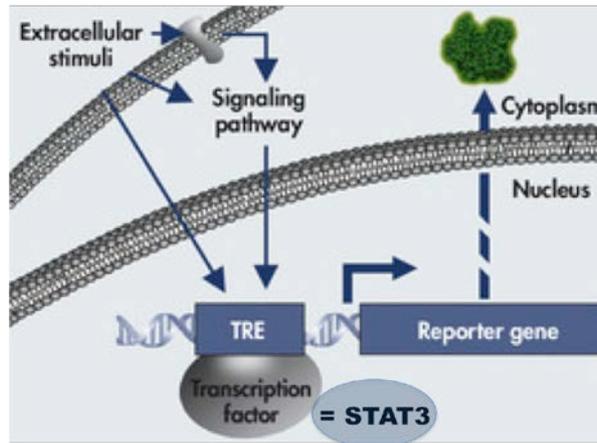


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Transkriptionsfaktoren (modifiziert nach: Signal ERSE Reporter (luc) Kit: CCS-2032L Signal Technology Overview auf der Qiagen Website)

2.2.14.1 Zellen setzen und Serumentzug

Für das Experiment wurden Zellen der STAT3-überexprimierenden Einzelzellklone (SW480 STAT3 scc 2 und scc 7) und der Kontrollzelllinien (SW480 WT und LV) in 12-Well-Platten ausgesetzt. Für jede Zelllinie wurden in vier Wells jeweils 200.000 Zellen ausgesetzt. Die Belegung der Platte ist in Abbildung 2-5 dargestellt. 24 Stunden nach dem Ausplattieren wurde ein Serumentzug durchgeführt, die für eine effiziente Lipidtransfektion nötig war.

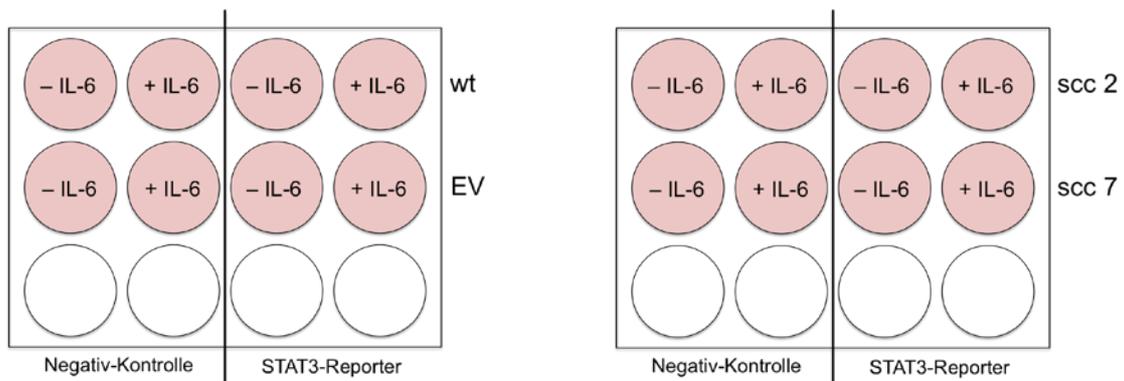


Abbildung 2-5: Belegung der 12-Well-Platten für den Dual-Luciferase-Reporter-Assay

2.2.14.2 Plasmidtransfektion

Die Transfektion mit den Luciferase-Vektoren erfolgt nach dem Prinzip der Lipidtransfektion. Als Lipid wurde das X-treme Gene HP DNA Transfection Reagent verwendet. Zunächst wurde der Transfektionsansatz hergestellt, bestehend aus 100 µl serumfreiem Medium, 1 µg (entspricht 10 µl) Vektor-DNA (STAT3-Reporter- bzw. Negative-Control-Vektor) und 3 µl Lipid (alle Mengenangaben gelten pro zu transfizierendem Well). Dieser Ansatz inkubierte 15 min bei Raumtemperatur. Vor der Transfektion wurden die in 12-Well-Platten gesetzten, zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen und 1 ml frisches serumfreies Medium zugefügt. Anschließend wurden 100 µl des Transfektionsansatzes tropfenweise auf die Zellen gegeben.

2.2.14.3 Stimulation mit IL-6 und Zellyse

STAT3 ist unter normalen Bedingungen nur aktiv, wenn es durch Stimulierung phosphoryliert wird. Deshalb müssen die Zellen vor der Zellyse mit rekombinantem IL-6 stimuliert werden. Zur Messung von konstitutiv aktivem STAT3 (ohne externe Stimulation) werden nicht-stimulierte Zellen verwendet. Die Messung der Stimulierbarkeit des STAT3-Signalweges erfolgte durch Normalisierung von IL-6 behandelten Zellen mit unstimulierten Zellen. Daher wurde 24 Stunden nach der Transfektion die Hälfte der Platte mit 100 ng / ml IL-6 stimuliert (Abb. 2-5). Die Zellen wurden zuvor mit PBS gewaschen, und es wurde erneut ein Mediumwechsel mit serumfreiem Medium durchgeführt mit anschließender Inkubation der Zellen für 90 min bei 37 °C. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl Passive Lysis Buffer (5x), der zuvor 1:5 in „Molecular Grade Water“ verdünnt wurde, lysiert. Das Lysat wurde entweder direkt für die Messung verwendet oder bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.14.4 Messung der Luciferase-Aktivität

Zur Messung der Luciferase-Aktivität müssen die frisch gewonnenen oder wiederaufgetauten Proben zunächst durch zweimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen komplett lysiert werden. Das Substrat für die Firefly-Luciferase („Luciferase Assay Substrate II“) wurde als Lyophilisat geliefert und musste zunächst in 10 ml „Assay Buffer II“ resuspendiert werden. Das Substrat für die Renilla-Luciferase („Stop&Glo Substrate“) wurde direkt vor jeder Messung 1:50 in „Stop&Glo Buffer“ verdünnt. Die Messung wurde mithilfe des Mithras LB 940 Multitechnologie

Mikrotiterplattenlesers durchgeführt. Dieses Gerät ist mit einer Einspritzanlage ausgestattet, mit dessen Hilfe das Substrat für die zweite Lumineszenz-Messung als „Stop&Glo Reagent“ zu den Proben gegeben wird.

Die Messungen wurden wie im Manual des Dual-Luciferase-Reporter-Assays von Promega beschrieben durchgeführt. Vor Einlegen der Mikrotiterplatte in den Mikrotiterplattenleser wurde in jedes Well 100 µl LAR II vorgelegt und mit 20 µl des Zelllysats gemischt. Zusätzlich wurden Leerwerte bestimmt, bei denen Wells ohne Inhalt und Wells nur mit LAR-II gemessen werden. Nach der ersten Messung wurde durch die Einspritzanlage in jedes Well 100 µl des Stop&Glo Substrats für die Lumineszenz-Messung der Renilla-Luciferase hinzugegeben. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.14.5 Auswertung

Bei der Auswertung der gewonnenen Lumineszenz-Daten wurden zunächst die Mittelwerte aller technischen Triplikate bestimmt und anschließend von diesen Werten der Leerwert subtrahiert. Die Transfektionsnormalisierung berechnete sich aus der Firefly-Renilla-Ratio, mit dem anschließend das STAT3-Neg-Ratio (STAT3-Aktivität) gebildet wurde. Schlussendlich konnte noch die Aktivierbarkeit des Signalweges durch Berechnung des Verhältnisses aus den Werten mit und ohne IL-6-Stimulation bestimmt werden.

3 Ergebnisse

Die Resistenz des Rektumkarzinoms gegenüber einer RCT stellt auch weiterhin ein signifikantes klinisches Problem dar. 2014 konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass sich kolorektale Karzinomzelllinien durch Ausschalten des Transkriptionsfaktors STAT3 gegenüber einer RCT sensibilisieren lassen. Ziel der hier durchgeführten Experimente war es zu überprüfen, ob sensible kolorektale Karzinomzelllinien durch Aktivierung von STAT3 resistenter gegenüber einer RT und einer RCT werden.

3.1 Ausschalten des endogenen STAT3-Inhibitors SOCS3 durch siRNA

Eine (indirekte) Möglichkeit, die STAT3-Aktivität in Zellen zu verstärken, ist es, einen endogenen Inhibitor zu inhibieren (Stimulation durch Inhibierung des Inhibitors). Solch ein Inhibitor ist *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), welcher konstitutiv die JAK2-Kinase hemmt und dadurch die Phosphorylierung von STAT3 am Tyrosin 705 zu aktiven pSTAT3 (pSTAT3^{Y705}) unterbindet (Crocker et al. 2003; Suzuki et al. 1998). Das Prinzip ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

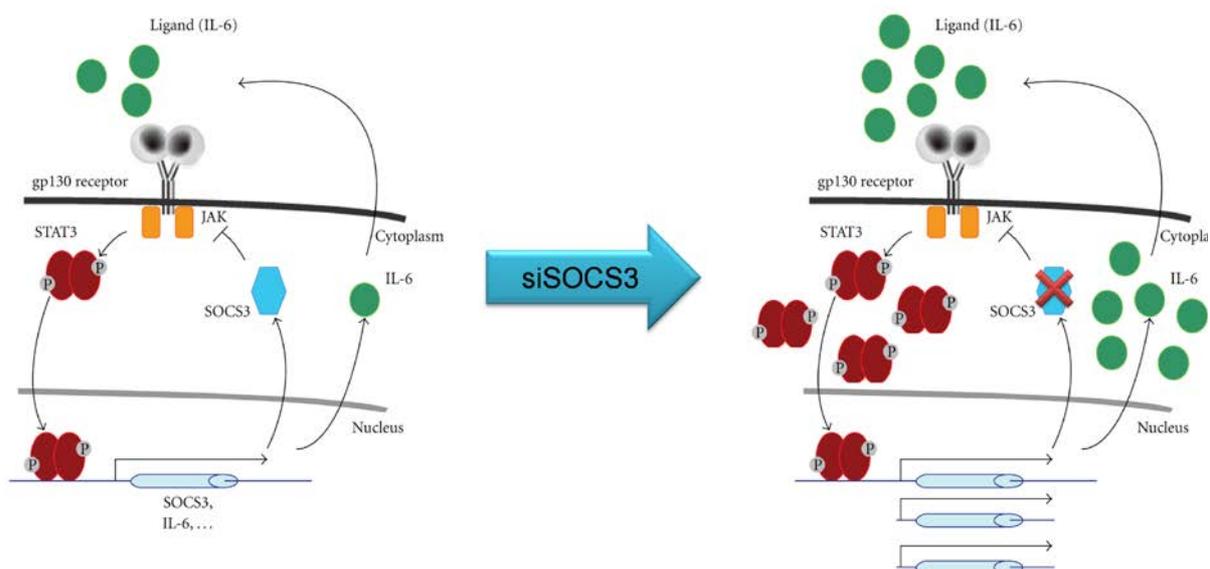


Abbildung 3-1: Theoretischer Effekt der Hemmung von SOCS3 durch siRNA (modifiziert nach Ozawa et al. 2011, S. 2)

3.1.1 SOCS3-Expression in 12 kolorektalen Zelllinien

Um Zelllinien für die geplanten Experimente auszuwählen, wurde zuerst die Expression von SOCS3 bestimmt.

Es konnte mittels Western Blot gezeigt werden, dass in allen 12 Zelllinien SOCS3 auf einem ähnlich hohen Level exprimiert wird (Abbildung 3-2).

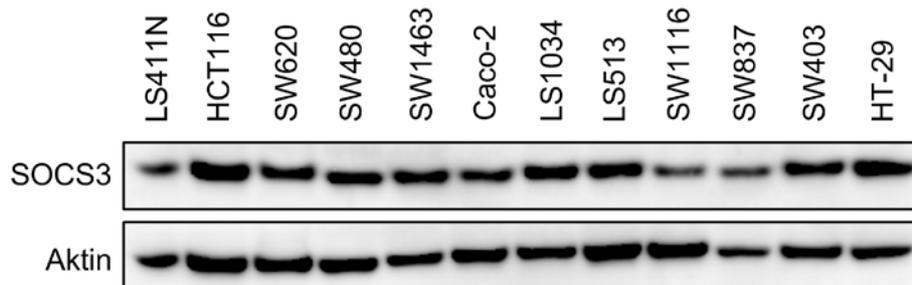


Abbildung 3-2: Western Blot von 12 KRK-Zelllinien mit SOCS3-Banden bei 26 kDa und Aktinbanden bei 42 kDa. Die Zelllinien sind nach ihrer Sensibilität gegenüber einer RCT aufgetragen (links = sensibel, rechts = resistent).

Von der Arbeitsgruppe konnte in einer vorangegangenen Arbeit ein sensibilisierender Effekt nach Ausschalten von STAT3 in der Zelllinie SW480 gezeigt werden (Spitzner und Roesler und et al. 2014). Aus diesem Grund wurde SW480 für die geplanten Versuche ausgewählt. Weiterhin ist SW480 eine Zelllinie, mit der unsere Arbeitsgruppe methodisch bereits viel Erfahrung gesammelt hat und die die typischen genetischen Veränderungen kolorektaler Karzinome aufweist. Zur Untermauerung eines möglichen Effektes ist es von Vorteil, die Versuche in einer zweiten sensiblen Zelllinie zu validieren. Dafür wurde HCT116 ausgewählt.

3.1.2 Ausschalten von SOCS3 mittels RNAi

Die RNAi-Experimente wurden mit vier verschiedenen siRNAs gegen SOCS3 (nachfolgend mit si #1, #4, #6, #7 bezeichnet) durchgeführt. Die Beurteilung, ob die Transfektion und der SOCS3-Knockdown erfolgreich war, erfolgte mittels Western Blot durch Vergleich der Expressionslevel von SOCS3 in den siRNA-behandelten Zellen mit einer Negativkontrolle (siNEG). Bevor der Effekt der siRNA-Transfektion auf die RCT-Empfindlichkeit getestet werden konnte, musste zuerst der optimale Zeitpunkt für

die Experimente bestimmt werden. Dafür wurde eine Zeitreihe im Bereich von 24 - 96 Stunden durchgeführt.

3.1.2.1 Lipidtransfektion mit SW480

Wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, wurde die Lipidtransfektion zu Optimierungszwecken in zwei Varianten bezüglich der Zellzahl (300.000 Zellen/Well und 600.000 Zellen/Well) durchgeführt. Die Proteinisolation erfolgte jeweils 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion. In den isolierten Proben wurde mittels Western Blot semiquantitativ die SOCS3-Menge ermittelt.

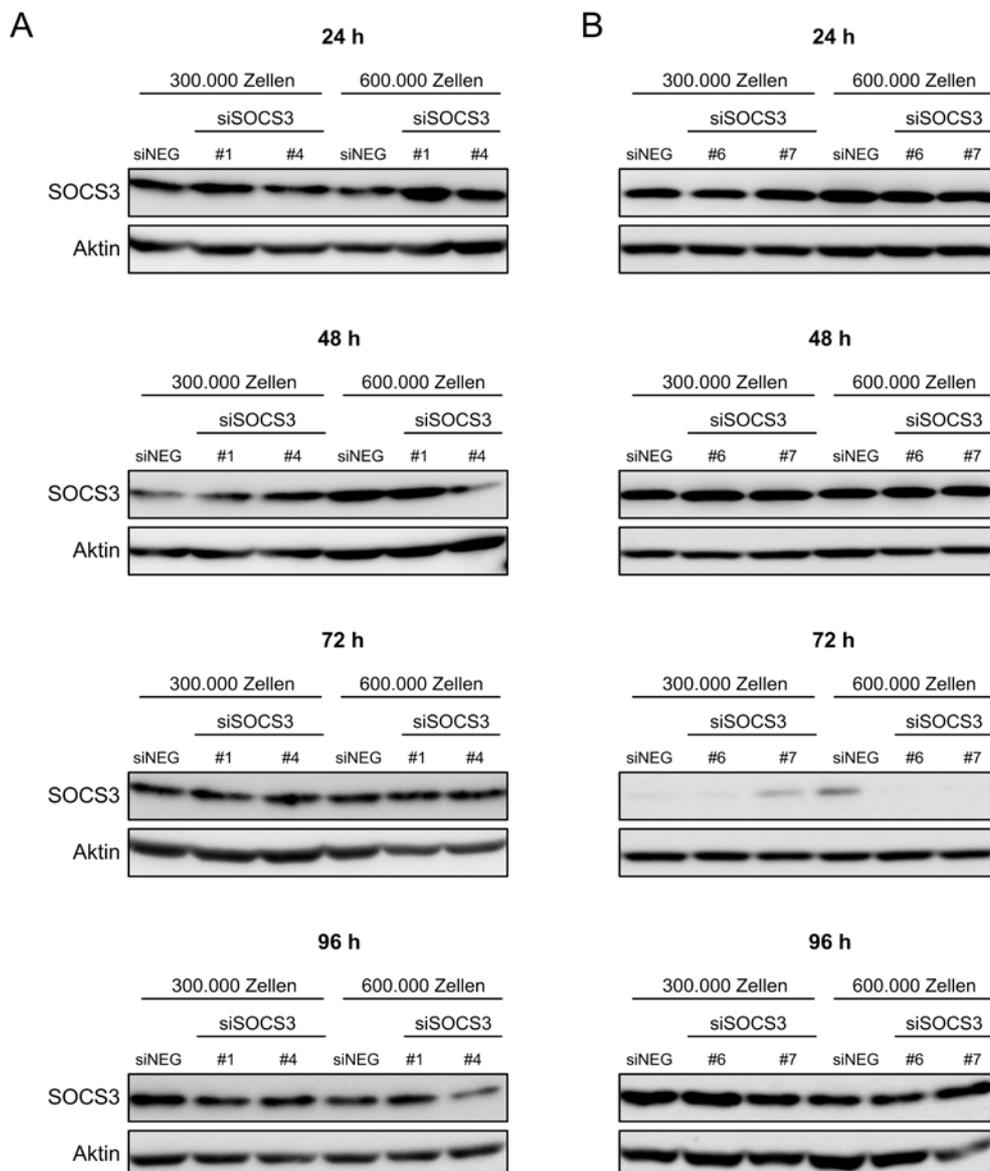


Abbildung 3-3: Western Blots von SW480 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Lipidtransfektion mit siSOCS3. (A) siRNA #1 und #4, (B) siRNA #6 und #7, SOCS3-Banden bei 26 kDa, Aktinbanden bei 42 kDa.

Abbildung 3-3A zeigt die Proben si #1 und si #4 neben der Kontrolle siNEG im zeitlich aufsteigenden Verlauf. Zu keinem Zeitpunkt konnte mit diesen beiden siRNAs ein Knockdown von SOCS3 nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden noch zwei weitere siRNAs (si #6 und si #7) der Firma Qiagen getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3-3B dargestellt. Obwohl die Proben des 72 h-Zeitpunktes aufgrund technischer Probleme unvollständige SOCS3-Bandenfärbung aufweisen und deswegen nicht zu beurteilen sind, zeigt sich auch hier zu keinem Zeitpunkt bei keiner siRNA eine detektierbare Reduktion der Proteinmenge von SOCS3. Da sich für SW480 mit keiner siRNA ein Knockdown von SOCS3, wurde die Lipidtransfektion nicht mehr in HCT116 durchgeführt.

3.1.2.2 Elektroporation mit SW480 und HCT116

Da mittels Lipidtransfektion kein adäquater Knockdown erzielt wurde, wurde eine zweite, im Labor fest etablierte Transfektionsmethode angewendet, die Elektroporation. Diese wurde wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Um die Probenmenge für diesen Versuch überschaubar zu halten, wurden die Zeitpunkte der Proteinisolation auf 24 und 48 h nach Transfektion beschränkt.

Wie in Abbildung 3-4 dargestellt, zeigte sich auch hier in SW480 zu keinem der betrachteten Zeitpunkte ein relevanter Knockdown mit den vier eingesetzten siRNAs gegen SOCS3. Der scheinbare Knockdown der si #1 bei 48h (Abbildung 3-4B) ist auf die geringere Proteinbeladung zurückzuführen, was an der dünneren Aktinbande im Vergleich zu siNEG sichtbar wird.

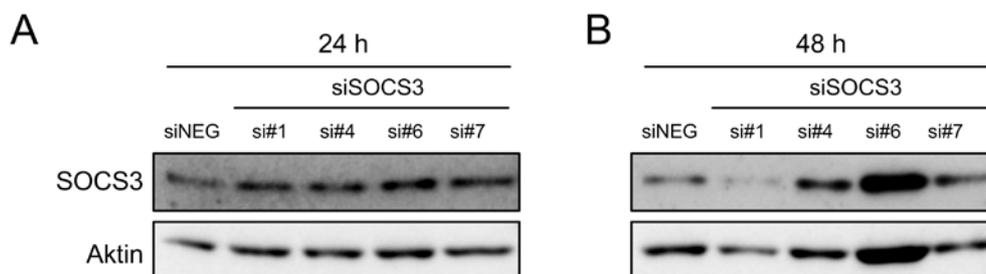


Abbildung 3-4: Western Blots von SW480 nach Elektroporation mit siSOCS3. (A) 24 h, (B) 48 h nach Transfektion, SOCS3-Banden bei 26 kDa, Aktinbanden bei 42 kDa.

Diese Experimente wurden ebenfalls in HCT116 durchgeführt. Der experimentelle Ablauf entsprach dem von SW480. Abbildung 3-5 zeigt, dass auch hier mit den vier verwendeten siSOCS3 keinen Effekt auf das Proteinlevel von SOCS3 nach 24 (A) oder 48 Stunden (B) nachweisbar war.

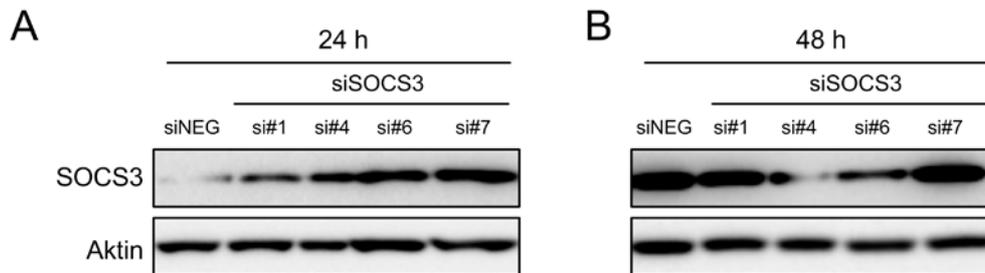


Abbildung 3-5: Western Blots von HCT116 nach Elektroporation mit siSOCS3 (A) 24 h, (B) 48 h nach Transfektion, SOCS3-Banden bei 26 kDa, Aktinbanden bei 42 kDa.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass mit den hier verwendeten siRNAs gegen SOCS3 weder in der Zelllinie SW480 noch in der Zelllinie HCT116 mit zwei verschiedenen Transfektionsmethoden ein Knockdown von SOCS3 auf Proteinlevel nachweisbar war.

3.1.3 RNA-Isolation und semiquantitative Real-Time PCR nach Transfektion mit siSOCS3

Da die Transfektion mit den vier siRNAs in keiner der beiden angewandten Transfektionsmethoden zu einer nachweisbaren Reduktion der Proteinmenge von SOCS3 führte, wurde als weitere Methode zum Nachweis der Wirksamkeit der siRNA eine semiquantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt.

Der qRT-PCR ging die Bestimmung der Primer-Effizienz aus der linearen Regression der Ct-Werte voraus, welche für die SOCS3-Primer bei 96,11% lag. Der Test der Wirksamkeit der siRNA auf qRT-PCR-Ebene wurde in der Zelllinie SW480 durchgeführt. Nach einer Lipidtransfektion aller vier siRNAs und anschließender RNA-Isolation zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden wurde nun mithilfe der entsprechenden Primer die qRT-PCR durchgeführt. Die Belegung der PCR-Platte ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Normalisiert wurde die Expression von SOCS3 anhand der Expression der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1), einem sogenannten *housekeeping*-Gen, dessen Expression sich in unterschiedlichen Zelltypen nur unwesentlich unterscheidet und durch äußere Einflüsse nur wenig reguliert wird.

Tabelle 3-1: Belegung der 384-Well-Platte für die qRT-PCR

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
|----------|----------------------|---|---|----------------------|---|---|----------------|
| A | SW480 WT 24h | | | SW480 WT 24h | | | Primer: |
| B | SW480 siNEG 24h | | | SW480 siNEG 24h | | | SOCS3 |
| C | SW480 siSOCS3 #1 24h | | | SW480 siSOCS3 #1 24h | | | HPRT1 |
| D | SW480 siSOCS3 #4 24h | | | SW480 siSOCS3 #4 24h | | | |
| E | SW480 siSOCS3 #6 24h | | | SW480 siSOCS3 #6 24h | | | |
| F | SW480 siSOCS3 #7 24h | | | SW480 siSOCS3 #7 24h | | | |
| G | SW480 WT 48h | | | SW480 WT 48h | | | |
| H | SW480 siNEG 48h | | | SW480 siNEG 48h | | | |
| I | SW480 siSOCS3 #1 48h | | | SW480 siSOCS3 #1 48h | | | |
| J | SW480 siSOCS3 #4 48h | | | SW480 siSOCS3 #4 48h | | | |
| K | SW480 siSOCS3 #6 48h | | | SW480 siSOCS3 #6 48h | | | |
| L | SW480 siSOCS3 #7 48h | | | SW480 siSOCS3 #7 48h | | | |

Als Ergebnis der qRT-PCR ergab sich nach Berechnung mittels der Delta-Delta-Ct-Methode wie unter Abschnitt 2.2.11 beschrieben folgender Knockdown:

Tabelle 3-2: SOCS3-Knockdown nach qRT-PCR

| siRNA | Knockdown nach 24 h | Knockdown nach 48 h |
|-------------------|---------------------|---------------------|
| siSOCS3 #1 | 46,7 % | 53,6 % |
| siSOCS3 #4 | 59,6 % | 28,2 % |
| siSOCS3 #6 | 56,7 % | 54,6 % |
| siSOCS3 #7 | 12,4 % | 27,4 % |

Da also weder per Western Blot noch per PCR ein Knockdown nachweisbar war, wurden diese siRNA als nicht funktionierend bei der Firma Qiagen reklamiert. Weitere

siRNAs gegen *SOCS3* wurden aufgrund der begrenzten Zeit für die Erstellung dieser experimentellen Doktorarbeit nicht getestet.

3.2 Stimulation des STAT3-Signalweges durch IL-6

Eine weitere Möglichkeit die STAT3-Aktivität zu erhöhen ist es, den JAK-STAT-Signalweg mit seinem natürlichen Liganden zu stimulieren, IL-6. Die Stimulation des Signalweges durch rekombinantes IL-6 sollte zu einer verstärkten Aktivität der JAK2-Kinase, und damit zu einer erhöhten Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 führen.

Für diese Versuche waren drei RCT-sensible KRK-Zelllinien ausgewählt worden: LS411N, HCT116 und SW480. Der Einfluss von IL-6 auf die Sensibilität gegenüber einer RCT wurde mithilfe des Koloniebildungstests überprüft. Zu erwarten wäre nach einer Stimulation mit IL-6 und der daraus resultierenden Erhöhung der STAT3-Aktivität eine konsekutive Resistenzzunahme gegenüber einer RT bzw. RCT. LS411N wurde explizit als Negativkontrolle ausgewählt, da diese Zelllinie kein endogenes STAT3 exprimiert und IL-6 kein Einfluss auf diese Zelllinie haben sollte.

3.2.1 IL-6-Stimulation mit Serumentzug

Der Koloniebildungstest dient zum Nachweis, ob eine Einzelzelle die Fähigkeit hat, sich zu teilen und eine Kolonie zu bilden. Er ist der Standardtest in der experimentellen Strahlenbiologie, um Substanzen (hier: IL-6) und deren Wirkung auf eine kombinierte RCT bzw. eine alleinige RT zu untersuchen (Franken et al. 2006).

Alle Koloniebildungstests wurden dreimal für alle Bedingungen durchgeführt (jeweils drei technische und drei biologische Replikate). Die folgenden Versuche entsprechen dem experimentellen Ablauf, der unter Abschnitt 2.2.12.1 erläutert ist. Die Zellen wurden zunächst einem Serumentzug ausgesetzt, und die IL-6-Stimulation erfolgte am nächsten Tag 30 min vor der Bestrahlung. Parallel zu den Koloniebildungstests wurden 500.000 Zellen / Well in 6-Well-Platten ausgesetzt, welche die gleiche Behandlung erfuhren wie die zu bestrahlenden Zellen. Sie dienten der Proteingewinnung zum Nachweis von pSTAT3^{Tyr705} und STAT3 mittels Western Blot Analyse, welche

zeitgleich mit der Bestrahlung stattfand. Abbildung 3-6 zeigt das Proteinlevel von STAT3 und pSTAT3^{Tyr705} in den mit IL-6 stimulierten Proben im Vergleich zu unstimulierten Proben.

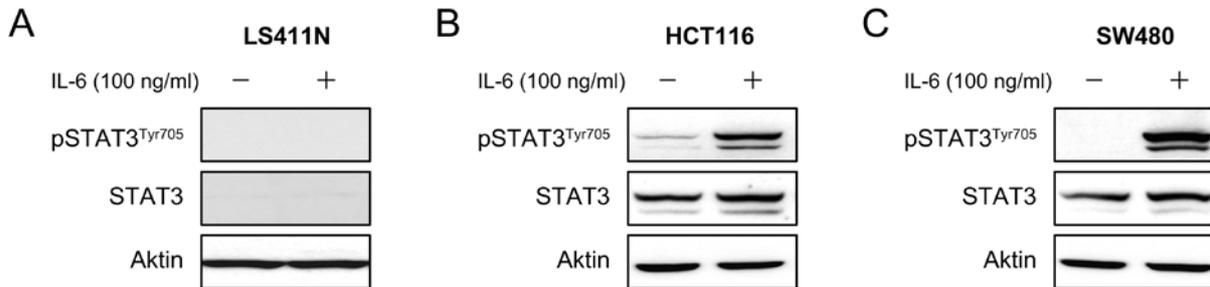


Abbildung 3-6: Western Blots nach Stimulation mit IL-6 zum Zeitpunkt der Bestrahlung. (A) LS411N, (B) HCT116, (C) SW480, pSTAT3/STAT3-Banden bei 79/86 kDa, Aktinbanden bei 42 kDa.

Die jeweils bei den anderen Koloniebildungstests durchgeführten Western Blots ergaben ähnliche Proteinbandenmuster. Wie zu erwarten, lässt sich für LS411N weder im unstimulierten noch im stimulierten Zustand STAT3 bzw. pSTAT3^{Tyr705} nachweisen. HCT116 weist schon im unstimulierten Zustand eine geringe Menge pSTAT3^{Tyr705} auf, welches sich jedoch durch Zugabe von IL-6 noch deutlich steigern lässt. SW480 zeigt erst nach Stimulation eine sehr deutliche pSTAT3^{Tyr705}-Bande.

Zur Auswertung der Koloniebildungstests wurden, wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben, die Überlebensfraktionen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis bestimmt. Aus den drei Koloniebildungstests, die pro Bedingung durchgeführt wurden, wurden die Mittelwerte der Überlebensfraktionen gebildet. Der Koloniebildungstest von LS411N nach IL-6-Stimulation mit Serumentzug ergab jeweils nach RT und RCT die in Abbildung 3-7A gezeigten Überlebenskurven, welche wie erwartet nach Zugabe von IL-6 keine Unterschiede aufwiesen (RT: $p = 0,5127$; RCT: $p = 0,7397$). Abbildung 3-7B zeigt die entsprechenden Überlebenskurven für die Versuche mit der Zelllinie HCT116. Auch hier liegen die Überlebenskurven nach Stimulation mit IL-6 annähernd auf den Kontrollen, sowohl nach RT als auch nach RCT (RT: $p = 0,5956$; RCT: $p = 0,2945$). Mit der Zelllinie SW480 ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Überlebenskurven mit und ohne IL-6-Stimulation (RT: $p = 0,6466$; RCT: $p = 0,6102$), wie in Abbildung 3-7C zu sehen.

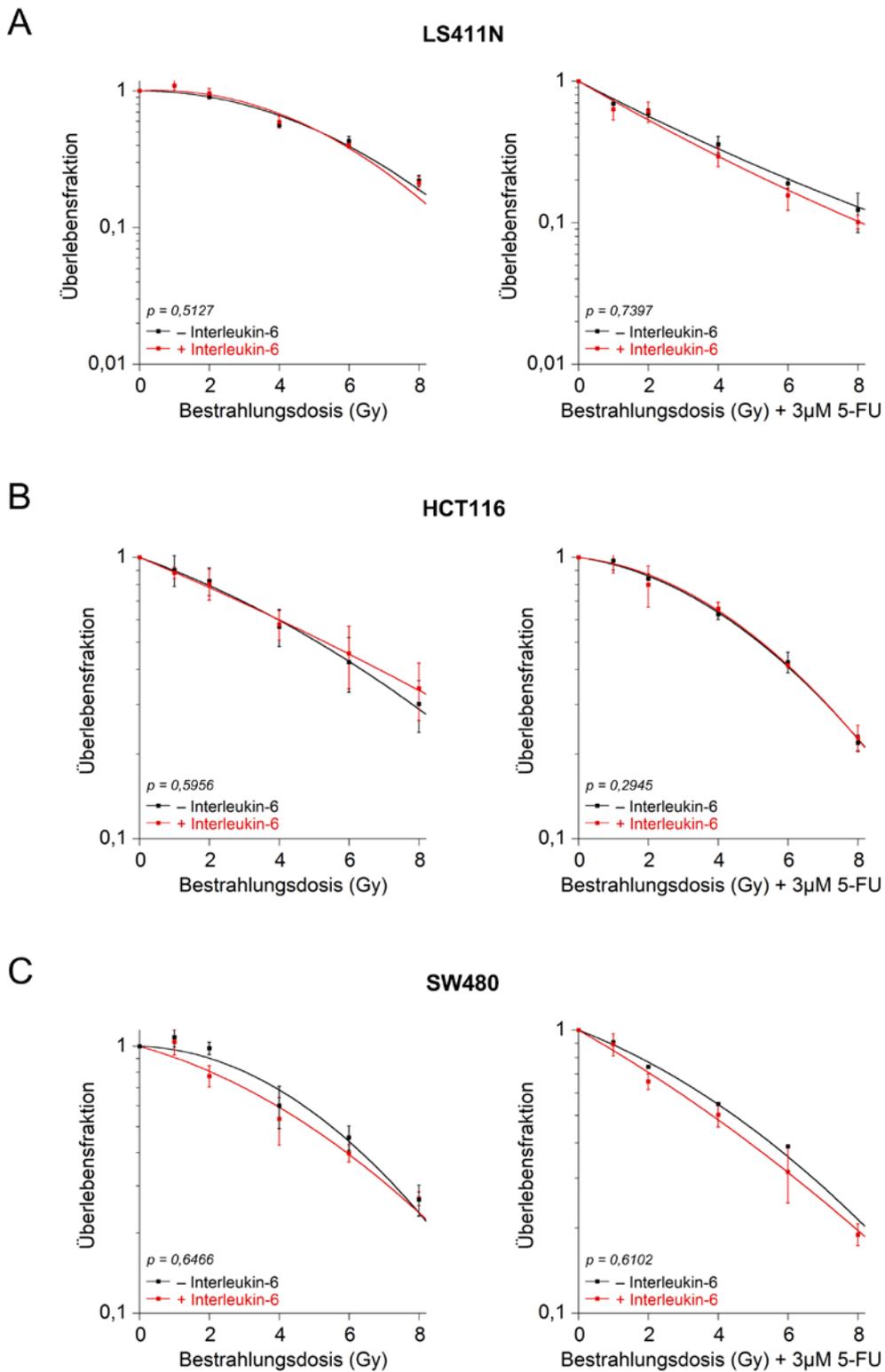


Abbildung 3-7: Koloniebildungstest nach Serumentzug und anschließender 30-minütiger IL-6-Stimulation. (A) LS411N, (B) HCT116, (C) SW480.

3.2.2 IL-6-Stimulation ohne Serumentzug

Da entgegen unseren Erwartungen die Stimulation des JAK-STAT-Signalweges mit IL-6 nach vorherigem Serumentzug keinen Effekt auf die Therapiesensibilität zeigte, wurde der experimentelle Ablauf verändert. Die Entfernung von Serum und damit von Wachstumsfaktoren aus dem Zellkulturmedium über Nacht bewirkt einen Zellzyklusarrest in der G₀-Phase (Zetterberg und Skold 1969). Dies betrifft alle Zellen, unabhängig von der Zyklusphase, in der sie sich zuvor befanden. Um der Beeinflussung des Zellüberlebens durch den Zellzyklus-synchronisierenden Effekt des Serumentzugs zu entgehen, wurden nun die Koloniebildungstests ohne den Wechsel auf serumfreies Medium durchgeführt. Da der optimale Zeitraum ohne Serumentzug nicht getestet war, wurden zwei IL-6-Stimulationszeiträume (30 min und über Nacht) miteinander verglichen. Da aufgrund der fehlenden STAT3-Expression in der Zelllinie LS411N auch bei diesem Versuchsaufbau kein Effekt der IL-6-Stimulation und damit auch keine Änderung der RT/RCT-Sensibilität zu erwarten war, wurden hier nur die beiden Zelllinien HCT116 und SW480 verwendet.

Um das Proteinlevel von STAT3 und pSTAT3^{Tyr705} zum Zeitpunkt der Bestrahlung zu bestimmen, wurden zeitgleich zu den Koloniebildungstests Zellen in 6-Well-Platten ausgesetzt (500.000 Zellen / Well), welche die gleiche Behandlung erfuhren wie die zu bestrahlenden Zellen. In Abbildung 3-8 sind die Western Blots von HCT116 und SW480 nach IL-6-Behandlung dargestellt. Wie bereits in den vorherigen Versuchen ist bei HCT116 im Gegensatz zu SW480 auch im unstimulierten Zustand eine schwache pSTAT3^{Tyr705}-Bande zu erkennen. In beiden Zelllinien wird durch Stimulation mit IL-6 die Expression von pSTAT3^{Tyr705} nach 30 min und auch nach einer Einwirkzeit über Nacht initiiert. In SW480 ist das Phosphorylierungssignal nach 30 min stärker ausgeprägt als nach einer über Nacht-Inkubation. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die STAT3-Aktivierung in dem Zeitraum über Nacht wieder abnimmt. Das Proteinlevel von Gesamt-STAT3 bleibt durch die IL-6-Behandlung unbeeinflusst.

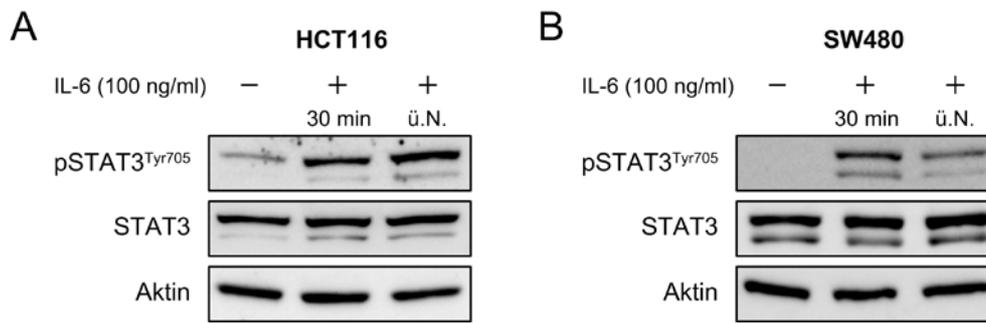


Abbildung 3-8: Western Blots nach Stimulation mit IL-6. STAT3-Banden und pSTAT3-Banden bei 79/86 kDa, Aktinbanden bei 42 kDa. ü.N. = über Nacht

Die Auswertung der Koloniebildungstests erfolgte wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben. Aus den drei Koloniebildungstests, die pro Bedingung durchgeführt worden sind, wurden die Mittelwerte der Überlebensfraktionen gebildet. Abbildung 3-9 zeigt die Überlebensfraktionen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von IL-6 in den Zelllinien HCT116 (Abbildung 3-9A) und SW480 (Abbildung 3-9B). Es zeigt sich bei HCT116 nach einer RT eine signifikante Resistenzsteigerung sowohl nach IL-6-Inkubation für 30 min ($p = 0,0431$) als auch über Nacht ($p = 0,0205$). Behandelt man HCT116 mit einer RCT, führt nur die Über-Nacht-Inkubation mit IL-6 zu einer erhöhten Therapieresistenz ($p = 0,0338$).

In SW480 ist eine Abhängigkeit von der IL-6-Inkubationszeit zu beobachten. Wird IL-6 30 min vor Bestrahlung zu den Zellen gegeben, sind die Zellen signifikant resistenter gegenüber einer RT ($p = 0,0156$) bzw. einer RCT ($p = 0,003$). Dieser Effekt verliert sich bei der Über-Nacht-Inkubation wieder (RT: $p = 0,7037$; RCT: $p = 0,9432$). Betrachtet man dieses Ergebnis zusammen mit den Western Blots, lässt sich vermuten, dass die gesteigerte Resistenz bei SW480 mit der Stärke der STAT3-Aktivität (Menge an pSTAT3^{Tyr705}) korreliert, welche nach 30 min IL-6-Gabe größer ist als nach über Nacht-Inkubation.

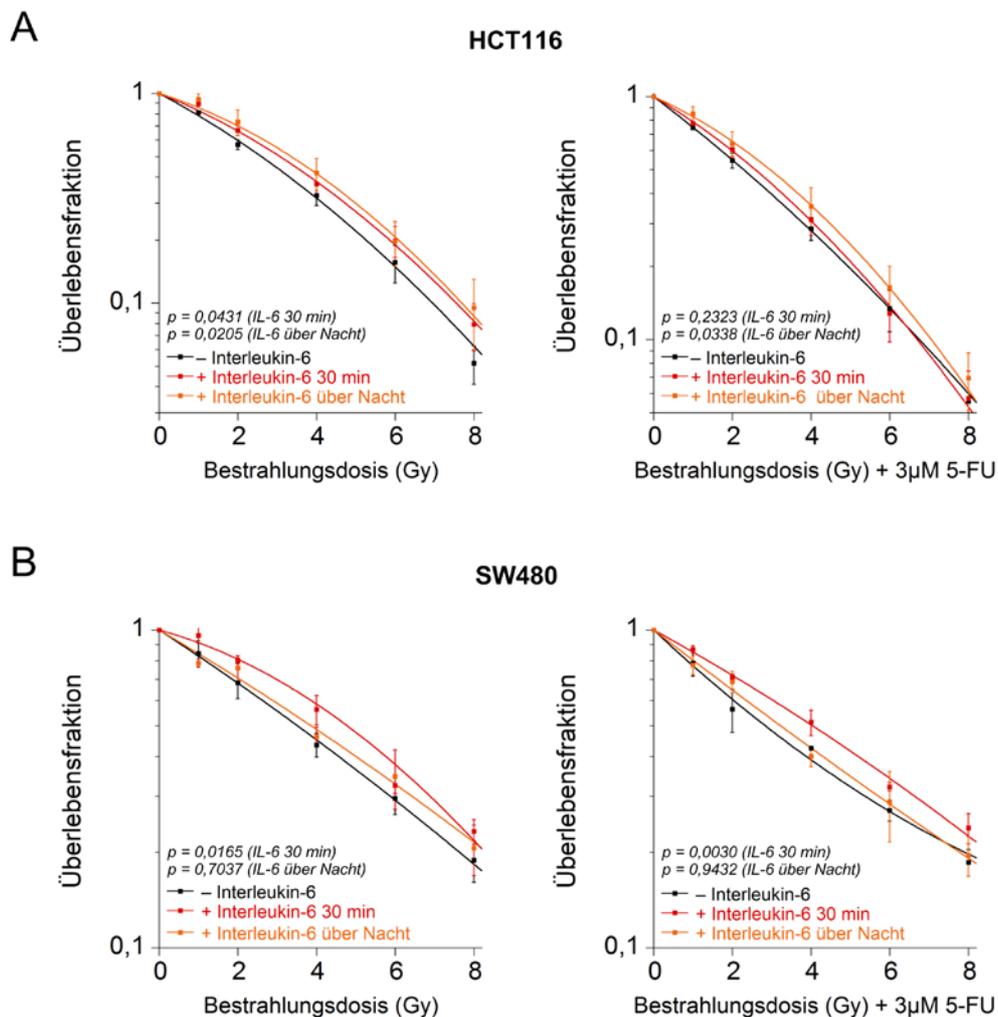


Abbildung 3-9: Koloniebildungstest nach IL-6-Stimulation (30 min und über Nacht) ohne Serumentzug. (A) HCT116, (B) SW480.

3.3 Überexpression von STAT3 in sensiblen kolorektalen Karzinomzelllinien

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob mittels eines Überexpressionsvektors die STAT3-Expression in sensiblen Zelllinien erhöht und dadurch eine Resistenz gegenüber einer RCT erzeugt werden kann. Der hierfür eingesetzte Überexpressionsvektor (Vektor-Backbone: pcDNA3.1/pDEST313) enthielt neben der STAT3-Sequenz noch ein HA-tag und eine GFP-Sequenz unter eigenem Promoter, welches eine visuelle Transfektionskontrolle ermöglichte. Der Vektor wird nachfolgend mit „hSTAT3-HA-GFP“ bezeichnet. Der Kontrollvektor enthält die GFP-Sequenz, aber keine STAT3-Sequenz, und wird nachfolgend mit „Leervektor“ (LV) bezeichnet. Beide

Vektoren enthalten eine Genetizin-Resistenz, welche eine Selektion transfizierter Zellen und so die Herstellung stabiler Einzelzellklonpopulationen ermöglicht. Transfektion und Selektion sind in Abschnitt 2.2.13.2 beschrieben.

3.3.1 STAT3-Expression in 12 kolorektalen Karzinomzelllinien

Abbildung 3-10 zeigt die STAT3-Expression von 12 humanen kolorektalen Karzinomzelllinien, welche nach deren ansteigender RCT-Resistenz angeordnet sind. Die sensiblen Zelllinien LS411N, HCT116 und SW480 auf der linken Seite exprimieren im Verhältnis zu resistenten Zelllinien wie HT-29 oder SW837 auf der rechten Seite weniger bis kein detektierbares STAT3. Aus diesem Grund wurden diese drei Zelllinien für die folgenden Überexpressionsversuche ausgewählt.

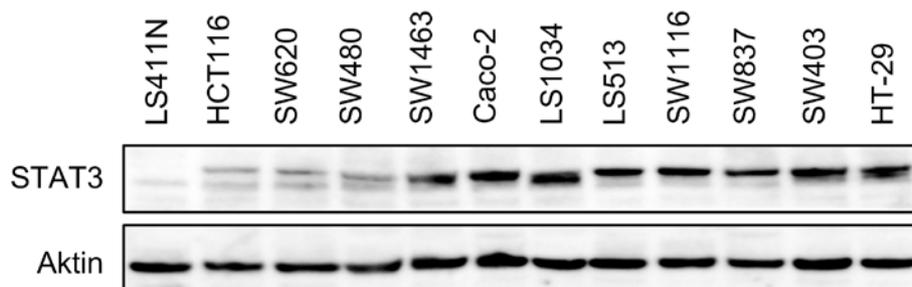


Abbildung 3-10: STAT3-Expression in 12 kolorektalen Karzinomzelllinien. Western Blot mit STAT3-Banden bei 79/86 kDa und Aktinbanden bei 42 kDa (Spitzner und Roesler und et al. 2014).

3.3.2 Überexpression von STAT3 in LS411N

Nach Transfektion von LS411N mit hSTAT3-HA-GFP und der Selektion der transfizierten Zellen durch Genetizin wurden, wie unter Abschnitt 2.2.13.3 beschrieben, Einzelzellklonpopulationen etabliert. Abbildung 3-11 zeigt im Western Blot alle Einzelzellklonpopulationen, die von LS411N etabliert werden konnten. In keiner Klonpopulation konnte eine STAT3-Expression nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde mit dieser Zelllinie an dieser Stelle nicht weiter gearbeitet.

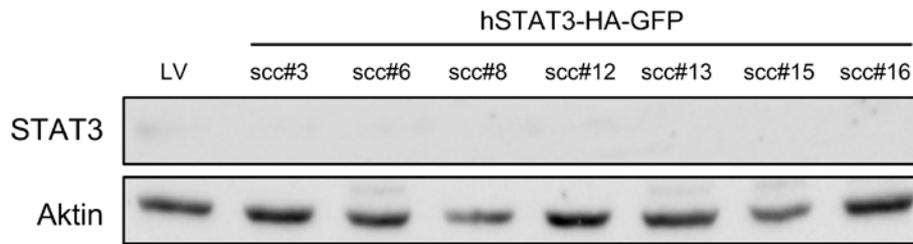


Abbildung 3-11: STAT3-Expression in LS411N in den Einzelzellklonen mit den Nummern 3, 6, 8, 12, 13, 15 und 16. Western Blot ohne STAT3-Banden bei 79/86 kDa und mit Aktinbanden bei 42 kDa.

3.3.3 Überexpression von STAT3 in HCT116

Nach Selektion der transfizierten Zellen, wie unter Abschnitt 2.2.13.3 beschrieben, und der Etablierung von Einzelzellklonpopulationen erfolgte der Expressions-nachweis von STAT3 mittels Western Blot (Abbildung 3-12). Die höchste Expression zeigte sich in den Einzelzellklonen scc #2, #4 und #7.

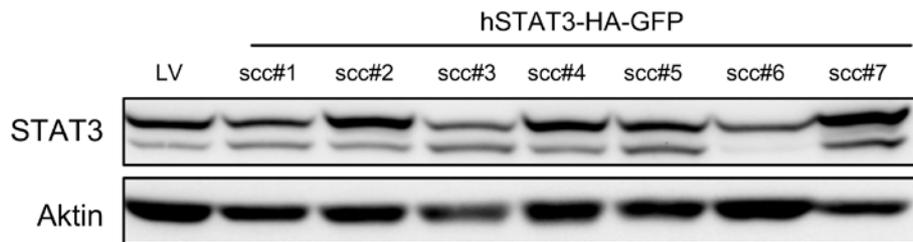


Abbildung 3-12: STAT3-Überexpression in HCT116 in den scc mit den Nummern 1 bis 7. Western Blot mit STAT3-Banden bei 79/86 kDa und Aktinbanden bei 42 kDa.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich allerdings ein rascher Verlust der STAT3-Überexpression in den ausgewählten Einzelzellklonen. Der Western Blot, welcher die STAT3-Expression im September 2012 (Abbildung 3-13A) kurz nach abgeschlossener Einzelzellklon-Etablierung zeigt, wies noch eine deutliche Überexpression der Klone auf, die sich im Laufe des nächsten Monats weiter reduzierte (Abbildung 3-13B) bis im November 2012 (Abbildung 3-13C) gar keine Überexpression mehr nachweisbar war.

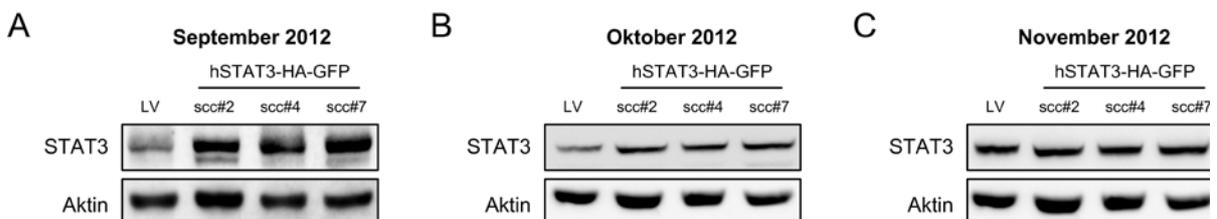


Abbildung 3-13: STAT3-Überexpression in HCT116 in den Einzelzellklonen mit den Nummern 2, 4 und 7 im zeitlichen Verlauf. (A) September 2012, (B) Oktober 2012, (C) November 2012. Western Blot mit STAT3-Banden bei 79/86 kDa und Aktinbanden bei 42 kDa.

Ein Teil der neu etablierten Einzelzellklone wurde zu Asservierungszwecken nach nur wenigen Passagen wie in Abschnitt 2.2.1.2 erläutert bei -150°C eingefroren. Doch weder in den wieder aufgetauten Zellpopulationen noch in einer zweiten Wiederholung der Transfektion mit anschließenden Einzelzellklonierung konnte eine STAT3-Überexpression wie im September 2012 gezeigt werden. Die Bestrahlungsversuche wurden daher nicht mehr durchgeführt.

3.3.4 Überexpression von STAT3 in SW480

Nach Transfektion mit dem hSTAT3-HA-GFP-Vektor, Selektion mit Geneticin und Einzelzellklonierung konnten Einzelzellpopulationen für SW480 etabliert werden (experimenteller Ablauf siehe Abschnitt 2.2.13). Abbildung 3-14 zeigt die STAT3-Expression der Einzelzellklone im Vergleich zur SW480-Population, welche mit dem LV transfiziert wurde. Die Klone scc#2 und scc#7 wiesen eine starke STAT3-Expression auf, so dass diese für weiterführende Versuche ausgewählt wurden.

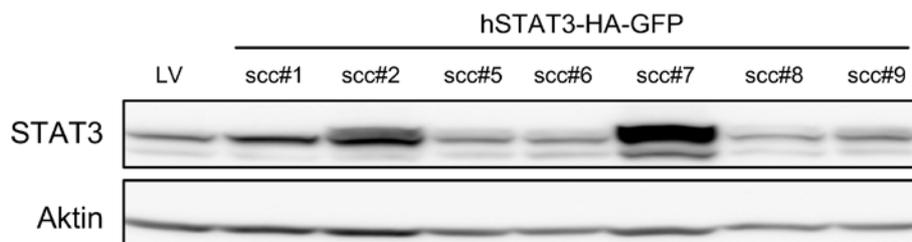


Abbildung 3-14: STAT3-Überexpression in SW480 in den Einzelzellklonen mit den Nummern 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9. Western Blot mit STAT3-Banden bei 79/86 kDa und Aktinbanden bei 42 kDa.

Mithilfe des Dual-Luciferase-Reporter-Systems (DLR) wurde die Aktivität von STAT3 als Transkriptionsfaktor in den Einzelzellklonen #2 und #7 im Vergleich zu SW480-WT und SW480-LV quantifiziert. Es enthält drei Vektoren:

- STAT3-Luc: STAT3-abhängige Firefly-Luciferase
- NEG-Luc: wie STAT3-Luc, aber ohne das STAT3-Binderesponselement (Negativkontrolle)

- Renilla-Luciferase (wird nicht reguliert wird; Normalisierungskontrolle)

Der Versuchsablauf ist in Abschnitt 2.2.14 detailliert beschrieben. Die STAT3-Aktivität wurde sowohl mit externer IL-6-Stimulation zur Generierung des aktiven phosphorylierten STAT3, als auch ohne externe Stimulierung gemessen, wodurch die Grundaktivität des Signalweges ermittelt wird. Zur Auswertung der Versuche wird zunächst eine Normalisierung der Messwerte mit denen des Renilla-Vektors durchgeführt, um Schwankungen in der Transkriptionseffizienz auszugleichen. Danach wird ein Verhältnis aus den normalisierten Lumineszenzwerten (STAT3-Luc / NEG-Luc) gebildet. Dies wird auch als Aktivitätsfaktor bezeichnet, welcher ein Maß für die STAT3-Aktivität ist. Abbildung 3-15A zeigt den Aktivitätsfaktor von SW480-WT, SW480-LV, SW480-hSTAT3-HA-GFP scc#2 und scc#7 mit und ohne externe Stimulation durch IL-6. Alle untersuchten Zelllinien zeigten ohne IL-6-Stimulation eine ähnliche, relativ niedrige STAT3-Grundaktivität. Diese konnte jedoch durch Gabe von IL-6 um den Faktor 14 bis 24 signifikant gesteigert werden (WT: $p = 0,0094$; LV: $p = 0,001$; scc#2: $p = 0,003$; scc#7: $p = 0,0011$). Werden die STAT3-Aktivitätsfaktoren der korrespondierenden stimulierten und unstimulierten Versuchspaare ins Verhältnis und die Werte der scc in Relation zum LV gesetzt, lässt sich die relative STAT3-Aktivität der scc errechnen (Abbildung 3-15B). Es lässt sich erkennen, dass scc#2 eine ähnlich hohe STAT3-Aktivität wie der LV ($p = 0,1061$) hat, wohingegen die relative STAT3-Aktivität des scc#7 gegenüber dem LV signifikant erhöht ist ($p = 0,0414$).

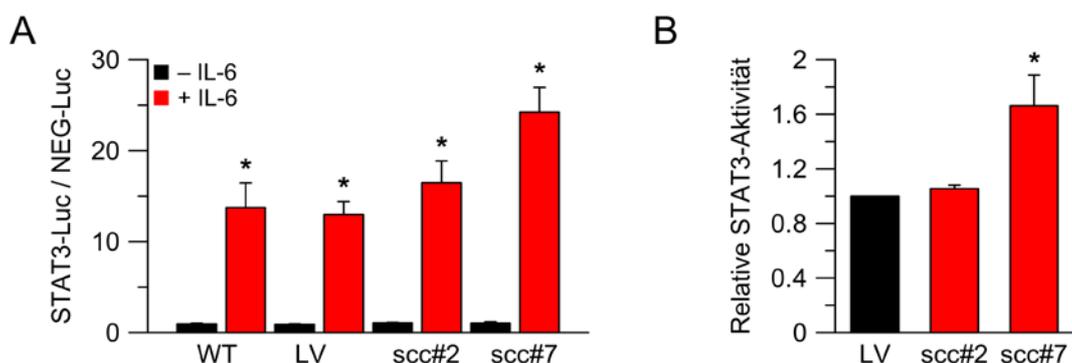


Abbildung 3-15: Dual-Luciferase-Reporter-Assay. (A) STAT3-Aktivitätsfaktoren der SW480-Überexpressionseinzellklone scc#2 und scc#7 im Vergleich zu SW480-WT und SW480-LV mit und ohne IL-6-Stimulation, (B) Relative STAT3-Aktivität von scc#2 und scc#7 im Vergleich zu SW480-LV.

Zum Vergleich des Überlebens unter einer RT bzw. einer RCT der STAT3-überexprimierenden Einzelzellklone gegenüber der Kontrollzelllinie SW480-LV wurden

wie in Abschnitt 2.2.13.4 Koloniebildungstests durchgeführt. Die sich hieraus ergebenden Überlebenskurven sind in Abbildung 3-16 zu sehen. Für den Klon SW480-hSTAT3-HA-GFP scc#7 (signifikant gesteigerte STAT3-Aktivität) zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Resistenz gegenüber der LV-Kontrolle unter RT ($p = 0,0035$) und RCT ($p = 0,0261$). Für den scc#2 (STAT3-Aktivität unwesentlich gesteigert) konnte kein Effekt in Bezug auf Therapieresistenz beobachtet werden (RT: $p = 0,7625$; RCT: $p = 0,5943$).

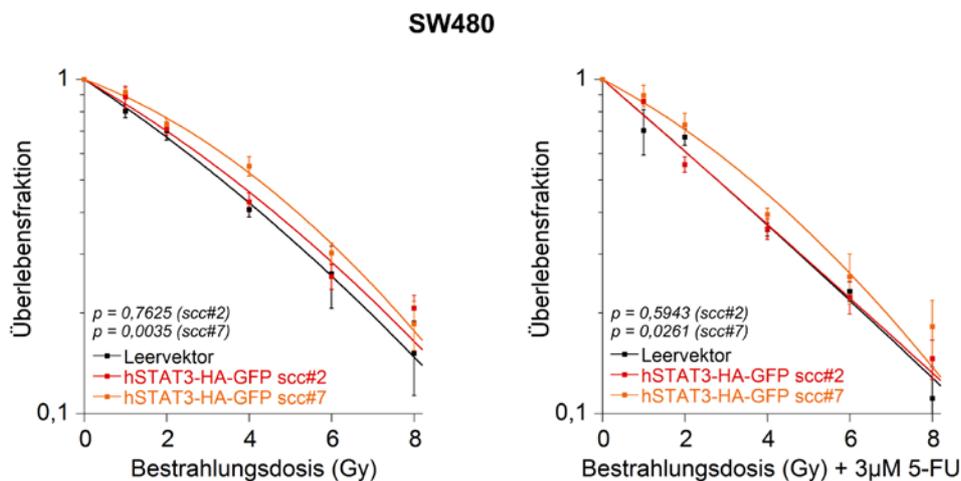


Abbildung 3-16: Koloniebildungstest von SW480-STAT3-Überexpressionseinzelzellklonen. (A) RT: Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis, (B) RCT: Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

- 1) Trotz Verwendung vier verschiedener siRNAs gegen SOCS3 und zwei unterschiedlicher Transfektionsmethoden ließ sich kein adäquater Knockdown von SOCS3 nachweisen, weder auf Protein- noch auf RNA-Niveau. Daher konnte nicht überprüft werden, ob ein Ausschalten von SOCS3 zu einer gesteigerten Therapie-Resistenz führt.
- 2) Die Stimulation sensibler Zelllinien mit IL-6 zeigte, im Setting ohne Serumentzug, eine signifikante Steigerung der Therapieresistenz, die jedoch von der Inkubationsdauer abhängig war: Signifikante Effekte zeigten sich für HCT116 nach Stimulation über Nacht, für SW480 nach Stimulation für 30 min.

- 3) Die ektope Überexpression von STAT3 in SW480 führte zu einer signifikant gesteigerten RT- und RCT-Resistenz, sofern die Überexpression mit einer gesteigerten STAT3-Aktivität assoziiert war.

4 Diskussion

Das KRK ist mit mehr als 1,3 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr eine häufige Erkrankung (Ferlay et al. 2015). Die Standardtherapie beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom ist die präoperative RCT, kombiniert mit standardisierter chirurgischer Resektion (Pox et al. 2013). Allerdings ist das Ansprechen auf die RCT heterogen und reicht von totaler Resistenz bis zur Komplettremission. Gezielte Behandlungsstrategien verlangen daher molekulare Marker, die den Therapieerfolg vorhersagen können, um somit potentiellen Therapieversagern die Toxizität der Therapie zu ersparen. Weiterhin können molekulare Marker Ansatzpunkte für eine ergänzende Therapie liefern, welche die ursprünglich resistenten Tumoren gegenüber der perioperativen RCT sensibilisieren.

In unserer Arbeitsgruppe konnte das Protein STAT3 identifiziert werden, dessen Expression positiv mit der *In-vitro*-RCT-Resistenz kolorektaler Karzinomzelllinien korreliert (Spitzner et al. 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein Ausschalten von STAT3 in kolorektalen Karzinomzellen diese gegenüber der RCT sensibilisiert (Spitzner und Roesler und et al. 2014).

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die Stimulation des STAT3-Signalwegs zu einer gesteigerten Resistenz von sensiblen kolorektalen Karzinomzellen auf die RCT führt. Ansatzpunkte sind dabei:

- Ausschalten des endogenen STAT3-Inhibitors SOCS3
- externe Stimulation des Signalwegs mittels IL-6
- ektope Überexpression von STAT3.

4.1 Humane kolorektale Karzinomzelllinien als *In-vitro*-Modell

Als Modell für das Rektumkarzinom mit seiner heterogenen Therapieantwort dienen in dieser Arbeit 12 verschiedene aus humanem Gewebe entnommene und immortalisierte kolorektale Karzinomzelllinien, welche über die ATCC-Zellbank käuflich erworben wurden. Da nur zwei adhärent wachsende immortalisierte Zelllinien des Rektumkarzinoms verfügbar sind (SW837 und SW1463), wurden auch Kolonkarzinomzelllinien in das Modell miteinbezogen, da sie analoge genetische Veränderungen aufweisen (Grade et al. 2006; Grade et al. 2007).

Eine wesentliche Voraussetzung für die Repräsentativität des *In-vitro*-Modells gegenüber der Situation im Patienten ist die genetische Stabilität der Tumorzellen, das heißt, die Tumor-spezifischen genetischen Aberrationen der immortalisierten Tumorzelllinien sollten sich kaum von denen des primären Tumors unterscheiden. Jones und Kollegen konnten zeigen, dass diese Bedingung für kolorektale Karzinomzelllinien erfüllt ist (Jones et al. 2008). Zudem gelten Zelllinien weiterhin als eines der am besten etablierten und geeignetsten Modell-Systeme.

Ein Modell für die Testung der Zelllinien auf deren Verhalten gegenüber einer RCT wurde im Labor zuvor etabliert (Spitzner et al. 2010). Hierbei entspricht die 5-FU-Konzentration mit 3 μ M jener Konzentration, welche bei der RCT des Rektumkarzinoms im Patientenplasma erreicht wird. Die 12 kolorektalen Karzinomzelllinien zeigen genau wie das Patientenkollektiv ein heterogenes Ansprechen auf die RCT (Spitzner et al. 2010).

4.2 Ausschalten des endogenen STAT3-Inhibitors SOCS3 durch siRNA

Ziel des ersten Teils der Arbeit war das Ausschalten der negativen Feedback-Schleife mittels RNAi gegen SOCS3, um somit die endogene Regulation von STAT3 zu hemmen.

4.2.1 SOCS3-Expression in 12 kolorektalen Karzinomzelllinien

Die im Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Versuche zeigen, dass SOCS3 in allen 12 verwendeten kolorektalen Karzinomzelllinien exprimiert wird. SOCS3 stellt somit ein potentiell Ziel für RNAi-Versuche in den Zelllinien dar.

Sowohl die Entdeckungen von Li und Kollegen von reduzierter SOCS3-Expression beim Kolonkarzinom als auch jene von Weber und Kollegen, die zeigen, dass eine Erhöhung der SOCS3-Expression die Phosphorylierung von STAT3 reduziert und Apoptose induziert, legen nahe, dass eine Inhibierung des SOCS3-Gens in kolorektalen Karzinomzellen zu erhöhter Phosphorylierung von STAT3 und vermehrter Zellproliferation führt (Y Li et al. 2012; Weber et al. 2005).

Die Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe zur Korrelation von STAT3 und RCT-Resistenz lassen deshalb einen inversen Zusammenhang von SOCS3-Expression von RCT-Resistenz in kolorektalen Karzinomzelllinien vermuten.

Wie in den Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben, konnte nach Transfektion der kolorektalen Zelllinien SW480 und HCT116 mit siSOCS3 mittels Elektroporation oder Lipidtransfektion weder eine Reduktion des Proteins im Western Blot noch eine ausreichende Abnahme der mRNA in der RT-PCR erreicht werden. Die theoretischen Überlegungen zur Auswirkung des SOCS3-Knockdowns auf die RCT-Resistenz konnten deshalb *in vitro* nicht überprüft werden.

4.2.2 SOCS3 und RCT-Resistenz

In anderen Tumorentitäten mit erfolgreichem Knockdown von SOCS3 konnten die folgenden Beobachtungen gemacht werden:

In SOCS3-defizienten Makrophagen war die STAT3-Aktivierung durch IL-6 verstärkt und prolongiert, nicht jedoch die GP130-unabhängige Aktivierung von STAT3 durch IL-10 obwohl beide Zytokine über eine gesteigerte STAT3-Expression die Expression von SOCS3 steigern (Niemand et al. 2003). Jedoch änderte sich das Wirkprofil von IL-6 durch SOCS3-Knockdown: Es erhielt neben den eigentlichen pro-inflammatorischen zusätzliche anti-inflammatorische Eigenschaften in Makrophagen (Croker et al. 2003; Lang et al. 2003; Yasukawa et al. 2003). Damit kommt SOCS3 neben der reinen Regulierung der Signalstärke auch eine Bedeutung in der Modulierung der Interaktion von Signalen zu.

Neben der STAT3-Inhibition haben Cacalano und Kollegen eine weitere Funktion von SOCS3 entdeckt: die Aktivierung von Zellproliferation über den Ras/MAP-Kinase-Weg durch phosphoryliertes SOCS3 (Cacalano et al. 2001). Die unterschiedliche Wirkweise von SOCS3 in verschiedenen Signalwegen mit proliferativen und anti-proliferativen Effekten könnte eine Ursache dafür sein, dass Tumorwachstum sowohl mit einem stillgelegten SOCS3-Gen als auch mit SOCS3-Überexpression einhergehen kann. In chronisch-myeloischen Leukämiezellen wurde beispielsweise eine konstitutive SOCS3-Expression bei geringer STAT3-Expression nachgewiesen und mit einer Resistenz gegenüber der üblicherweise angewandten Interferon- α -Therapie in Verbindung gebracht (Sakai et al. 2002). Bei kutanen T-Zell-Lymphom-Zellen konnte eine STAT3-abhängige konstitutive SOCS3-Expression nachgewiesen werden, die ebenfalls mit einer Interferon- α -Resistenz assoziiert ist. Durch dominant-negatives STAT3 β konnte hier die Therapieresistenz reduziert werden (Brender et al. 2001). Eine RT-Resistenz vermittelnde, konstitutive SOCS3-Expression, welche auch von aktivem

STAT3 abhängig ist, wurde in Zellen vom Glioblastoma multiforme gefunden (Zhou et al. 2007).

Beim hepatozellulären Karzinom (Niwa et al. 2005) und beim Kolitis-assoziierten Kolonkarzinom (Y Li et al. 2012) hingegen wurden durch Hypermethylierung stillgelegte SOCS3-Gene entdeckt, die mit vermehrtem Zellwachstum in Verbindung gebracht werden. Bei Kopf- und Halstumoren konnte auch durch Expression von WT-SOCS3 die STAT3-Aktivität herunterreguliert sowie der Effekt aufs Wachstum umgekehrt und Apoptose induziert werden (Weber et al. 2005).

Auch bei einem erfolgreichen SOCS3-Knockdown und einer möglichen gesteigerten Therapieresistenz ließe sich die Auswirkung auf die RCT-Antwort nur indirekt auf die Rolle von STAT3 zurückführen. Zunächst müsste die von SOCS3 vermittelte inhibitorische Funktion auf STAT3 in den untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Dies wäre durch Bestimmung der aktiven phosphorylierten Form pSTAT3^{Tyr705}, im Western Blot und durch den Nachweis der Transkriptionsfaktoraktivität mittels eines Dual-Luciferase-Reporter-Assays erfolgt. Weiterhin ist bekannt, dass STAT3 durch SOCS3 nur indirekt beeinflusst wird, da SOCS3 primär die JAK-Tyrosinkinaseaktivität hemmt (Yoshimura et al. 2007). Es ließe sich folglich nicht eindeutig beweisen, dass eine gemessene Veränderung der RT-Resistenz Folge der STAT3-Überaktivität wäre, sondern möglicherweise Folge der Hemmung anderer JAK-abhängige Signalwege. Klarheit könnte hier allerdings die gemeinsame Interpretation mit den Ergebnissen der weiteren Experimente dieser Arbeit zur Steigerung der STAT3-Aktivität (Stimulation mit IL-6, STAT3-Überexpression) bringen.

Der Mechanismus, über den STAT3 eine RCT-Resistenz vermittelt, ist noch nicht geklärt. Da es sich bei STAT3 um einen Transkriptionsfaktor handelt, ist der Effekt vermutlich durch eines oder mehrere seiner Zielgene vermittelt. Da auch SOCS3 zu diesen zählt, ist nicht auszuschließen, dass SOCS3 neben der negativen Feedbackschleife von STAT3 auch an dessen RCT-Resistenzvermittlung beteiligt ist. Es existieren allerdings noch weitere endogene Inhibitoren von STAT3. Einen der Inhibitoren stellt das *protein inhibitor of activated STAT3* (PIAS3) dar. PIAS3 bindet direkt Dimere von aktiviertem STAT3 und verhindert deren DNA-Bindung und Wirkung als Transkriptionsfaktor (Chung et al. 1997). Neben SOCS3 würde sich daher auch PIAS3 als ein weiterer Angriffspunkt zur indirekten Überaktivierung von STAT3

anbieten. Diese Versuche konnten aber aufgrund der zeitlichen Limitation einer medizinischen Doktorarbeit im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

4.3 Stimulation des STAT3-Signalweges durch IL-6

IL-6 ist eines der Zytokine, welches über die Aktivierung einer Rezeptor-gebundenen Janus-Kinase den Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert. Neben dem STAT3-Signalweg stimuliert IL-6 unter anderem die Proliferation über den *mitogen-activated-protein-kinase*-(MAPK)-Signalweg (Schiemann et al. 1997) und inhibiert die Apoptose über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)/Akt-Signalweg (Jee et al. 2002). Trotz der Beeinflussung multipler Signalwege ist IL-6, unter anderem wegen seiner extrazellulären Verfügbarkeit, ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine gegen STAT3 gerichtete Tumorthherapie.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Ansprechen auf die RT/RCT nach IL-6-Stimulation untersucht. Zur Evaluation des Einflusses von IL-6 auf das Therapieansprechen wurden Koloniebildungstest nach IL-6-Simulation (mit und ohne Serumentzug) und anschließender RT oder RCT durchgeführt. Ziel der IL-6-Stimulationsversuche in dieser Arbeit war zum einen die Bestätigung der Resistenzfördernden Wirkung von erhöhter STAT3-Aktivität und zum anderen der Nachweis der Generierbarkeit dieses Effekts über externe Stimulation des Signalwegs, welches einen guten therapeutischen Angriffspunkt am Patienten bieten würde.

4.3.1 Ansprechen auf RCT nach IL-6-Stimulation

Die IL-6-Stimulation wurde zunächst unter Serumentzug-Bedingungen durchgeführt. Ziel des Serumentzugs war die Entfernung anderer Wachstumsfaktoren, welche bei der Kultivierung durch fetales Kälberserum normalerweise in hoher Konzentration dem Zellmedium zugefügt werden, um so den Effekt des zugefügten IL-6 herauszufiltern. Der Versuchsablauf ist in Abschnitt 2.2.12.1 beschrieben. Die Zelllinie LS411N wurde als Negativkontrolle mitgeführt. LS411N ist die RCT-sensibelste aller in unserer Arbeitsgruppe verwendeten kolorektalen Zelllinien, in der sich kein STAT3 nachweisen lässt, weder in inaktiver noch in aktiver Form und auch nicht nach IL-6-Stimulation. Ein möglicher Effekt der IL-6-Stimulation auf das RCT-Ansprechen in STAT3-exprimierenden Zelllinien sollte demnach in LS411N nicht nachweisbar sein. Wie in

Abschnitt 3.2.1 bereits erläutert, konnte in diesem Versuchsabschnitt in den drei RCT-sensiblen Zelllinien LS411N, HCT116 und SW480 keine Veränderung des Ansprechens auf die RT/RCT nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis hängt möglicherweise mit dem gewählten Versuchsaufbau zusammen. Ein Serumentzug führt zu einer starken Hemmung der Proliferationsrate einer Zellpopulation und zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase, also einem Übertritt in die G0-Phase (Yen und Pardee 1978; Zetterberg und Skold 1969). Durch den Entzug aller Wachstumsfaktoren erhöht sich demnach der Anteil der Zellen, welche sich in der strahlenresistenten G0-Phase befinden. Je länger der Serumentzug anhält, desto mehr Zellen befinden sich im Zellzyklus-Arrest. Nach langem „Aushungern“ der Zellen und erneuter Zugabe von serumhaltigem Medium ist der Anteil an Zellen, welche gleichzeitig wieder in die G1-Phase eintreten, sehr hoch, ihre Zellzyklen verlaufen ab diesem Zeitpunkt synchron. Der Serumentzug und der mit ihm einhergehende Zellzyklus-Arrest wirkt in den Koloniebildungstest nicht nur gleichzeitig mit dem IL-6, sondern auch mit dem 5-FU und der Bestrahlung auf die Zellen und beeinflusst deren Wirkung, da sowohl Bestrahlung und 5-FU zellzyklus-abhängig wirken und IL-6 als Wachstumsfaktor seine Wirkung über Zellzyklusveränderungen entfaltet. Dadurch und durch die Zellzyklussynchronisation in der anschließenden Repopulationsphase hat der Serumentzug selbst Einfluss auf das Ansprechen der Therapie und die Überlebensfraktion der Zellen im Koloniebildungstest. Besonders die Zellzyklusveränderung durch IL-6 könnte durch die Zellzyklus-Effekte des Serumentzugs überlagert worden sein und dadurch möglicherweise nicht zum Tragen kommen.

Um die Wirkung des Serumentzugs als Variable zu eliminieren, wurden die Koloniebildungstests noch einmal ohne Serumentzug durchgeführt. Wie in Abschnitt 3.2.2 zu sehen ist, konnte hierbei durch IL-6-Stimulation eine im Western Blot sichtbare Aktivierung von STAT3 in HCT116 und SW480 nachgewiesen werden. Unter diesen Versuchsbedingungen zeigten beide Zelllinien eine signifikante Resistenzsteigerung sowohl gegenüber der RT als auch der RCT. Die optimale Inkubationsdauer des IL-6 unterschied sich dabei in den Zelllinien. Es wurden zwei Inkubationszeiten, 30 Minuten und über Nacht, getestet. Bei SW480 zeigte die 30-minütige Inkubation eine signifikante Steigerung der Therapieresistenz, parallel zeigten Proteinanalysen zu diesem Zeitpunkt auch größere Mengen an aktivem STAT3. In den Versuchen mit

HCT116 konnte gegenüber der RCT nach Inkubation über Nacht eine signifikante Erhöhung der Resistenz erreicht werden. Auch hier stimmte der optimale Inkubationszeitraum von IL-6 zur Resistenzsteigerung mit dem für größte nachweisbare Menge an aktiven STAT3 überein. Diese Ergebnisse zeigen also, dass der Einsatz von IL-6 zur Stimulation des JAK-STAT-Signalweges und folglich zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber einer RT/RCT in kolorektalen Karzinomzelllinien führt.

4.3.2 IL-6 und RCT-Resistenz

2001 fanden Tchirkov und Kollegen bei der Untersuchung von Glioblastomgewebe eine Amplifikation des IL-6-Gens und konnten diese erstmals mit der Aggressivität des Tumorwachstums in Verbindung bringen (Tchirkov et al. 2001). Seit dieser Entdeckung konnte in verschiedenen Tumorentitäten ein Zusammenhang zwischen Therapieresistenz und IL-6-Angebot hergestellt werden. Chen und Kollegen fanden nicht nur ein erhöhtes IL-6-Level in Geweben aus humanen radioresistenten Ösophaguskarzinomen, sondern auch *in vitro* und *in vivo* eine verringerte RT-Resistenz nach Inhibition von IL-6 (MF Chen et al. 2013). Eine RT-Sensibilisierung nach IL-6-Inhibition konnte auch gegenüber Hormon- und RT-resistenten Prostatakarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* erreicht werden (Wu et al. 2013). Chen und Kollegen untersuchten die Bedeutung von IL-6 beim Hypopharynxkarzinom. Sie stellten eine gesteigerte Resistenz gegenüber den Therapiekomponenten Bestrahlung und einem EGF-Rezeptor-Antagonisten nach IL-6-Stimulation fest, welche unter anderem mit einer Erhöhung von pSTAT3 einherging, und fanden eine Sensibilisierung gegenüber dieser Therapie nach IL-6-Inhibition (CC Chen et al. 2010). Es gibt außerdem deutliche Hinweise, dass IL-6 in der Entwicklung von Pankreaskarzinomen eine wichtige Rolle spielt, und dass dieser Effekt zumindest teilweise durch erhöhte STAT3-Aktivität vermittelt wird (Lesina et al. 2011).

Um das hier erhaltene Resultat noch weiter zu untermauern, könnte nachfolgend als Umkehrexperiment der sensibilisierende Effekt einer IL-6-Inhibition gegenüber der RT/RCT untersucht werden. Aus dessen Nachweis würde sich dann eine vielversprechende Therapieoption des Rektumkarzinoms ergeben. Es existieren bereits sehr verträgliche monoklonale Antikörper gegen IL-6 und den IL-6-Rezeptor in klinischer Testung. Der Anti-IL-6-Antikörper CNTO328 (Siltuximab) wird in der

Therapie des Kastrations-resistenten Prostatakarzinoms getestet (Dorff et al. 2010). Der IL-6-Rezeptor-Antikörper Tocolizumab wird bereits zur antiinflammatorischen Therapie der Rheumatoiden Arthritis eingesetzt (Nakashima et al. 2010).

4.4 Überexpression von STAT3

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die Zelllinien LS411N, HCT116 und SW480 stabil mit einem STAT3-exprimierenden Vektor transfiziert.

4.4.1 Ansprechen auf RCT nach Überexpression von STAT3

4.4.1.1 Etablierung von stabil STAT3-überexprimierenden Zelllinien

Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, wurden drei sensible kolorektale Karzinomzelllinien mit einem Vektor transfiziert, der sich stabil in deren Genom integriert und STAT3 und GFP exprimiert. Die transfizierten Zellen wurden mithilfe einer Genetizin-Resistenz selektiert, und es wurden Einzelzellklone GFP-positiver Zellen hergestellt.

LS411N, die RCT-sensibelste Zelllinie, exprimiert kein endogenes STAT3-Protein (Spitzner und Roesler und et al. 2014). Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass diese Zelllinie eine Deletionsmutation (p.T178fs) auf dem STAT3-Gen aufweist (<http://www.portals.broadinstitute.org/ccle/home> Zugriff am 3. Juli 2017). Auch unter Einsatz eines Überexpressionsvektors konnte in dieser Zelllinie keine STAT3-Expression erreicht werden. In der Zelllinie HCT116, konnten nach erfolgreicher Transfektion, Selektion und Einzelzellklonierung drei STAT3-überexprimierende Einzelzellklone hergestellt werden. Jedoch ging die Überexpression sowohl in Kultur als auch in Kryokonservierung bei allen drei Einzelzellklonen rasch verloren. Ein zweiter Versuch der Transfektion dieser Zelllinie mit dem STAT3-Vektor und anschließender Einzelzellklonierung blieb ohne erfolgreiche STAT3-Überexpression. In der Zelllinie SW480 resultierte die Transfektion, Selektion und anschließende Einzelzellklonierung in zwei STAT3-überexprimierenden Einzelzellklonen. Bei diesem Versuch wurde das STAT3-Gen demnach erfolgreich in das Genom der Zelle integriert und dessen Expression auch später nicht durch Gegenregulations-mechanismen unterdrückt.

Grund für eine fehlende Expression von STAT3 direkt nach der Transfektion in LS411N kann eine Eliminierung des Vektors vor der Integration in das Zielgenom sein

(Lechardeur et al. 1999). In diesem Fall wäre jedoch auch das zweite Gen des Vektors, das *GFP*-Gen, welches als visuelle Kontrolle für eine erfolgreiche Genomintegration dient, nicht exprimiert worden. Eine weitere Erklärung für eine zwar erfolgreiche Genomintegration aber nicht messbare Expression, ist der Ort der Integration. Steht ein Gen zufällig unter dem Einfluss eines starken Silencers (Patel und Bastia 1986) oder wird kurz nach dessen Integration hypermethyliert (Dobrovic et al. 1988; Pikaart et al. 1998), kann es auch nicht abgelesen werden. Der hSTAT3-HA-GFP-Vektor konnte in Einzelzellklonen dieser Zelllinie zwar seine Genetizin-Resistenz vermitteln, jedoch keine STAT3-Expression generieren. Ein weiteres Problem des hSTAT3-HA-GFP-Vektors ist seine geringe Transfektionsrate. Diese kann durch seine Größe bedingt sein, welche z. B. durch einen Verzicht auf das *GFP*-Gen reduziert werden könnte. Ein Grund dafür, dass die Expression eines Gens im Zeitverlauf, so wie bei HCT116 geschehen, herunterreguliert wird, kann eine Art Feedback-Mechanismus sein (Haghikia et al. 2012): Überschreitet ein Protein eine bestimmte Konzentration, werden Gegenmechanismen aktiviert, welche dessen Expression hemmen, entweder die des endogenen STAT3s, des artifiziellen STAT3s oder beide zusammen.

4.4.1.2 Funktionsanalyse im Dual-Luciferase-Reporter-Assay

Auch wenn die Western Blots eine stabil hohe STAT3-Expression in zwei SW480-Einzelzellklonen zeigten, sagt dies jedoch wenig über die Funktionalität des gebildeten STAT3 aus. Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, ist STAT3 ein Transkriptionsfaktor. Um als dieser aktiv sein zu können, sind mehrere Schritte notwendig: die Tyrosin-705-Phosphorylierung, die Dimerisierung, die Translokation in den Zellkern, die Serin-727-Phosphorylierung und letztlich die DNA-Bindung mit Transkriptionsaktivierung. Der Dual-Luciferase-Reporter-Assay testet die Aktivität von STAT3 als Transkriptionsfaktor. Wie in Abbildung 3-14 zu sehen, zeigen zwei SW480-STAT3 Einzelzellklone eine deutlich stärkere STAT3-Proteinbande im Western Blot als die Kontrollen, jedoch nur einer der beiden Klone, SW480 STAT3 scc#7, zeigt auch eine signifikant höhere Transkriptionsfaktoraktivität (Abbildung 3-15). Beim STAT3-Überexpressionsklon SW480 scc#2 ist nach Transfektion zwar eine erhöhte STAT3-Proteinmenge, jedoch keine erhöhte STAT3-Aktivität nachzuweisen. Die Transfektion mit dem gleichen Vektor führt im SW480 STAT3 scc#7 neben einer gesteigerten STAT3-Proteinmenge auch zu einer erhöhten STAT3-Aktivität. Eine mögliche Erklärung für die Inaktivität des exprimierten Gens in anderen Zellpopulationen ist,

dass das überschüssige STAT3 akkumuliert und evtl. fehlgefaltet ist. Fehlgefaltete Proteine sind in der Regel nicht funktionell und werden dem Abbau zugeführt oder entfalten eine dominant negative Wirkung (Diaz-Villanueva et al. 2015). Im Western Blot sind die Proteine denaturiert und so können funktionelle von fehlgefalteten Proteinen nicht unterschieden werden.

4.4.1.3 Koloniebildungstests STAT3-überexprimierender Zelllinien

Wie im Abschnitt 3.3.4 beschrieben, wurden mit den SW480 Überexpressionseinzellklonen Koloniebildungstests nach RT und RCT durchgeführt. Der SW480 Überexpressionsklon scc#7, welcher eine deutlich erhöhte STAT3-Aktivität besitzt, weist auch eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber RT und RCT auf. Es konnte somit gezeigt werden, dass nach der Sensibilisierung von SW480 gegenüber RT/RCT durch Knockdown von STAT3 (Spitzner und Roesler und et al. 2014) auch eine Umkehrung des biologischen Prinzips realisierbar ist: eine Überexpression von STAT3 in SW480 bewirkt eine Resistenzsteigerung gegenüber RT und RCT. Dies stärkt die Bedeutung von STAT3 in der Therapieresistenzvermittlung und seine Rolle als molekulare Zielstruktur neuer therapeutischer Optionen.

Untermuert werden könnte dieses biologische Prinzip durch Nachweis des resistenzsteigernden Effekts in weiteren sensiblen kolorektalen Karzinomzelllinien, insbesondere in der STAT3-negative Zelllinie LS411N. Hierfür wären Versuche mit einem effizienteren Vektorsystem notwendig oder eine „Entfernung“ der Deletion des STAT3-Gens, z. B. mit CRISP/CAS (Cong et al. 2013).

4.4.2 STAT3 und RCT-Resistenz

Eine Überexpression von STAT3 wurde in der Literatur bereits mit einer Therapie- oder Bestrahlungsresistenz in Zusammenhang gebracht (Spitzner und Ebner und et al. 2014). Sano und Kollegen zeigten, dass STAT3-überexprimierende Maus-Keratinocyten eine reduzierte Anzahl an apoptotischen Zellen nach UVB-Bestrahlung aufwiesen, genauso wie transgene Mäuse, welche eine konstitutiv aktive STAT3-Form exprimierten. Im Gegensatz dazu zeigten STAT3-defiziente Keratinocyten eine gesteigerte Apoptose nach UVB-Bestrahlung und dieser Effekt konnte durch Einbringen eines STAT3-Plasmids aufgehoben werden (Sano et al. 2005).

Huang und Kollegen untersuchten den Mechanismus des RT-sensibilisierenden Effekts von Sorafenib beim hepatozellulärem Karzinom und fanden, dass die Inaktivierung von STAT3 als Vermittler fungiert: durch RNAi-vermittelte Inhibierung von STAT3 konnte der sensibilisierende Effekt von Sorafenib auf die Bestrahlung reproduziert und durch Einbringen eines ekto STAT3-exprimierenden Vektors wieder aufgehoben werden (Huang et al. 2013).

Beim Glioblastom konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass eine Inhibition von STAT3 mittels RNAi zu einer RT-Sensibilisierung führt, und diese korrelierte mit einer Kaspasen-induzierten Apoptosesteigerung (L Gao et al. 2010).

Für das Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich konnte *in vivo* und *in vitro* eine RT-Sensibilisierung durch Inhibition mit dem STAT3-Inhibitor STATTIC und durch shRNA gezeigt werden (Adachi et al. 2012; X Li et al. 2010).

Eine Sensibilisierung gegenüber Bestrahlung durch reduzierte Proliferations- und gesteigerte Apoptoserate konnte auch für nicht-kleinzellige Lungenkarzinom mittels RNAi mit shRNA gegen STAT3 *in vitro* und im Mausmodell erreicht werden (Yin et al. 2011).

In Mammakarzinomzellen wurde konstitutiv aktives STAT3 nachgewiesen (Garcia et al. 1997; Page et al. 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl durch Einführen von stabil exprimiertem dominant-negativem STAT3 als auch durch den JAK2-Inhibitor AG490 Tumorzellwachstum reduziert werden (Burke et al. 2001). Außerdem zeichneten sich Mammakarzinomzellen, welche dominant-negatives STAT3 überexprimieren, durch eine Sensibilisierung gegenüber einer RT aus (Kim et al. 2006).

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern weitere Hinweise, dass in kolorektalen Karzinomzelllinien eine gesteigerte STAT3-Aktivität – durch externe Stimulation des JAK-STAT-Signalwegs und auch durch Überexpression von STAT3 – eine erhöhte Resistenz gegenüber einer RCT vermittelt. Folgeexperimente sollten sich zum einen auf den therapeutischen Nutzen konzentrieren, der sich aus der Rolle von STAT3 in der Resistenzvermittlung ergibt und zum anderen den Mechanismus der STAT3-Wirkung weiter aufklären, hierbei vor allem über die Identifizierung der für die Resistenzvermittlung verantwortlichen STAT3-Zielgene. Erst kürzlich konnte in

kolorektalen Karzinomzellen nicht nur eine Sensibilisierung gegenüber einer Chemotherapie mit 5-FU durch STAT3-Knockdown gezeigt werden, sondern auch das STAT3-Zielgen *CyclinD1* als ein Mediator des Effektes identifiziert werden (Qin et al. 2015). Im subkutanen Mausmodell konnte die RCT-Sensibilisierung durch STAT3-Knockdown in unserer Arbeitsgruppe bereits nachvollzogen werden (Spitzner und Roesler und et al. 2014). Der nächste Schritt ist die Übertragung auf den Menschen mit dem Fernziel der STAT3-Inhibition in der präoperativen Therapie des Rektumkarzinoms. Der im Mausmodell verwendete STAT3-Inhibitor STATTIC, welcher über die Bindung der SH2-Domäne von STAT3 wirkt, ist aufgrund seiner Toxizität für die Anwendung am Menschen jedoch ungeeignet (Schust et al. 2006). Auch hier könnte die Aufdeckung der für die Resistenzvermittlung verantwortlichen Zielgene hilfreich sein, um bei einer dadurch möglichen spezifischeren Therapie toxische Nebenwirkungen zu reduzieren.

Eine Alternative zu direkten STAT-Inhibitoren ist die Reduktion der STAT3-Aktivierung mittels JAK-Hemmung. Für myeloproliferative Erkrankungen wie die Osteomyelofibrose und die Polycythämia vera sind mehrere JAK-Inhibitoren, wie z. B. INCB018424, auch bekannt als Ruxolitinib (Vannucchi et al. 2017; Verstovsek et al. 2017), bereits in klinischem Einsatz. Der JAK-Inhibitor AZD1480 zeigte in präklinischen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* gute Ergebnisse in der Wachstumshemmung solider Tumoren (Hedvat et al. 2009), jedoch musste eine klinische Phase-1-Studie von AZD1480 (im Rahmen der Anwendung zur Therapie myeloproliferativer Erkrankungen) bei guter allgemeiner Verträglichkeit wegen erhöhter Neurotoxizität abgebrochen werden (Verstovsek et al. 2015). Daher ist die Testung weiterer JAK-Inhibitoren oder Inhibitoren, welche an anderen Punkten der Signaltransduktion ansetzen, in präklinischen Experimenten und klinischer Übertragung notwendig.

Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Steigerung der RCT-Resistenz kolorektaler Zelllinien mittels IL-6-Stimulation, sind *In-vitro*-Experimente mit Anti-IL-6-Antikörper dringend zu empfehlen. Für eine klinische Relevanz einer Therapie mit Anti-IL-6-Antikörpern wären auch immunhistochemische Färbungen von Rektumkarzinomgewebe für IL-6 hilfreich. Insgesamt stellt die weitere Untersuchung des JAK-STAT3-Signalwegs im Rektumkarzinom einen lohnenswerten Ansatzpunkt zur Verbesserung der präoperativen Therapie dar.

5 Zusammenfassung

Das KRK ist die dritthäufigste Krebserkrankung weltweit. Beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom ist die Standardtherapie die präoperative RCT kombiniert mit einer standardisierten chirurgischen Resektion. Allerdings erfordert das heterogene Ansprechen auf die RCT die Aufklärung der resistenzvermittelnden Faktoren, die Etablierung molekularer Marker und darauf aufbauend die Ergänzung der RCT um zielgerichtete Wirkstoffe zur Vermeidung eines Therapieversagens.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten eine positive Korrelation zwischen der Expression von STAT3 und einer RCT-Resistenz in kolorektalen Karzinomzelllinien aufzeigen. In Folgeexperimenten konnte durch Ausschalten von STAT3 ein verbessertes RCT-Ansprechen erreicht werden. Diese Arbeit beschäftigt sich nun mit der Frage, ob durch eine Stimulation des STAT3-Signalweges die RCT-Resistenz gesteigert werden kann.

Im ersten Teil der Arbeit wurden zu diesem Zweck die RCT-sensiblen Zelllinien SW480 und HCT116 mit siSOCS3 transfiziert, um dadurch den endogenen Inhibitor der STAT3-Aktivierung SOCS3 auszuschalten und den JAK-STAT3-Signalweg zu enthemmen. Trotz Verwendung von vier verschiedenen siRNAs gegen SOCS3 und zwei unterschiedlichen Transfektionsmethoden ließ sich in SW480 und HCT116 kein adäquater Knockdown nachweisen, weder auf Protein- noch auf RNA-Niveau. Dieser Teilaspekt wurde daher nicht weiter verfolgt.

Im zweiten Teil der Arbeit zeigte die Stimulation sensibler Zelllinien mit IL-6 – im Setting ohne Serumentzug – eine signifikante Steigerung der Therapieresistenz, die jedoch von der Inkubationszeit abhängig war: Effekte zeigten sich für HCT116 nach Stimulation über Nacht, für SW480 nach Stimulation für 30 min.

Im dritten Abschnitt der Arbeit führte die ektope Überexpression von STAT3 in SW480 zu einer signifikant gesteigerten RT- und RCT-Resistenz, sofern die Überexpression mit einer erhöhten STAT3-Aktivität assoziiert war.

Diese Ergebnisse bestätigen also die bisherigen Untersuchungen, dass der JAK-STAT-Signalweg eine wichtige Rolle bei der RCT-Resistenz spielt. Nachfolgend sollte die Wirksamkeit von Anti-IL-6-Antikörpern getestet werden. Langfristig wäre eine

therapeutische Inhibierung des JAK-STAT-Signalwegs in Kombination zur RCT denkbar.

6 Literaturverzeichnis

Adachi M, Cui C, Dodge CT, Bhayani MK, Lai SY (2012): Targeting STAT3 inhibits growth and enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma *Oral Oncol* 48, 1220-1226

Adloff M, Arnaud JP, Bergamaschi R, Schloegel M (1989): Synchronous carcinoma of the colon and rectum: prognostic and therapeutic implications *Am J Surg* 157, 299-302

Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T (1994): Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway *Cell* 77, 63-71

Al-Sukhni E, Milot L, Fruitman M, Beyene J, Victor JC, Schmocker S, Brown G, McLeod R, Kennedy E (2012): Diagnostic accuracy of MRI for assessment of T category, lymph node metastases, and circumferential resection margin involvement in patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis *Ann Surg Oncol* 19, 2212-2223

Andrew AS, Baron JA, Butterly LF, Suriawinata AA, Tsongalis GJ, Robinson CM, Amos CI (2017): Hyper-Methylated Loci Persisting from Sessile Serrated Polyps to Serrated Cancers *Int J Mol Sci* 18

Babon JJ, Sabo JK, Zhang JG, Nicola NA, Norton RS (2009): The SOCS box encodes a hierarchy of affinities for Cullin5: implications for ubiquitin ligase formation and cytokine signalling suppression *J Mol Biol* 387, 162-174

Barker HE, Paget JT, Khan AA, Harrington KJ (2015): The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence *Nat Rev Cancer* 15, 409-425

Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR (2005): STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells *Biochem J* 392, 335-344

Birner P, Toumangelova-Uzeir K, Natchev S, Guentchev M (2010): STAT3 tyrosine phosphorylation influences survival in glioblastoma *J Neurooncol* 100, 339-343

Boulton TG, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr., Stahl N, Yancopoulos GD (1995): STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6915-6919

- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* 72, 248-254
- Brender C, Nielsen M, Kalsoft K, Mikkelsen G, Zhang Q, Wasik M, Billestrup N, Odum N (2001): STAT3-mediated constitutive expression of SOCS-3 in cutaneous T-cell lymphoma *Blood* 97, 1056-1062
- Brenner H, Bouvier AM, Foschi R, Hackl M, Larsen IK, Lemmens V, Mangone L, Francisci S, Group EW (2012): Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: the EURO CARE study *Int J Cancer* 131, 1649-1658
- Brenner H, Kloor M, Pox CP (2014): Colorectal cancer *Lancet* 383, 1490-1502
- Brenner H, Schrotz-King P, Holleczeck B, Katalinic A, Hoffmeister M (2016): Declining Bowel Cancer Incidence and Mortality in Germany *Dtsch Arztebl Int* 113, 101-106
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. (1999): Stat3 as an oncogene *Cell* 98, 295-303
- Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, Lin J (2001): Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells *Oncogene* 20, 7925-7934
- Cacalano NA, Sanden D, Johnston JA (2001): Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras *Nat Cell Biol* 3, 460-465
- Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP (1996): STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription *J Biol Chem* 271, 13221-13227
- Caplen NJ, Mousses S (2003): Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells *Ann N Y Acad Sci* 1002, 56-62
- Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E (2009): Worldwide variations in colorectal cancer *CA Cancer J Clin* 59, 366-378
- Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T (2011): Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies *PLoS One* 6, e20456
- Chang L, Graham P, Hao J, Ni J, Deng J, Bucci J, Malouf D, Gillatt D, Li Y (2016): Cancer stem cells and signaling pathways in radioresistance *Oncotarget* 7, 11002-11017
- Chen CC, Chen WC, Lu CH, Wang WH, Lin PY, Lee KD, Chen MF (2010): Significance of interleukin-6 signaling in the resistance of pharyngeal cancer to

irradiation and the epidermal growth factor receptor inhibitor *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 76, 1214-1224

Chen MF, Chen PT, Lu MS, Lin PY, Chen WC, Lee KD (2013): IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus *Mol Cancer* 12, 26

Chen MF, Lu MS, Lin PY, Chen PT, Chen WC, Lee KD (2012): The role of DNA methyltransferase 3b in esophageal squamous cell carcinoma *Cancer* 118, 4074-4089

Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K (1997): Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3 *Science* 278, 1803-1805

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, et al. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems *Science* 339, 819-823

Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr., Mui AL, Miyajima A, Quelle FW, Ihle JN, et al. (1995): Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes *Genomics* 29, 225-228

Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, Robb L, Greenhalgh CJ, Forster I, Clausen BE, et al. (2003): SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo *Nat Immunol* 4, 540-545

Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N (2010): Colorectal cancer *Lancet* 375, 1030-1047

Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins *Science* 264, 1415-1421

Diaz-Villanueva JF, Diaz-Molina R, Garcia-Gonzalez V (2015): Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis *Int J Mol Sci* 16, 17193-17230

Dobrovic A, Gareau JL, Ouellette G, Bradley WE (1988): DNA methylation and genetic inactivation at thymidine kinase locus: two different mechanisms for silencing autosomal genes *Somat Cell Mol Genet* 14, 55-68

Dorff TB, Goldman B, Pinski JK, Mack PC, Lara PN, Jr., Van Veldhuizen PJ, Jr., Quinn DI, Vogelzang NJ, Thompson IM, Jr., Hussain MH (2010): Clinical and correlative results of SWOG S0354: a phase II trial of CNTO328 (siltuximab), a monoclonal antibody against interleukin-6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer *Clin Cancer Res* 16, 3028-3034

Emons G, Ghadimi M, Grade M (2015): [General principles of tumour biology in visceral surgery] *Zentralbl Chir* 140, 74-82

- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, et al. (1997): A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases *Nature* 387, 921-924
- Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, et al. (2001): Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression *J Clin Invest* 107, 351-362
- Farr A, Roman A (1992): A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency *Nucleic Acids Res* 20, 920
- Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, Negri E, Straif K, Romieu I, La Vecchia C, et al. (2011): Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies *Ann Oncol* 22, 1958-1972
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 *Int J Cancer* 136, E359-386
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006): Clonogenic assay of cells in vitro *Nat Protoc* 1, 2315-2319
- Gao L, Li F, Dong B, Zhang J, Rao Y, Cong Y, Mao B, Chen X (2010): Inhibition of STAT3 and ErbB2 suppresses tumor growth, enhances radiosensitivity, and induces mitochondria-dependent apoptosis in glioma cells *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 77, 1223-1231
- Gao LF, Wen LJ, Yu H, Zhang L, Meng Y, Shao YT, Xu DQ, Zhao XJ (2006): Knockdown of Stat3 expression using RNAi inhibits growth of laryngeal tumors in vivo *Acta Pharmacol Sin* 27, 347-352
- Garcia R, Yu CL, Hudnall A, Catlett R, Nelson KL, Smithgall T, Fujita DJ, Ethier SP, Jove R (1997): Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells *Cell Growth Differ* 8, 1267-1276
- Goldstein NS (2006): Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular-morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification *Am J Clin Pathol* 125, 146-153
- Grade M, Becker H, Liersch T, Ried T, Ghadimi BM (2006): Molecular cytogenetics: genomic imbalances in colorectal cancer and their clinical impact *Cell Oncol* 28, 71-84

Grade M, Hormann P, Becker S, Hummon AB, Wangsa D, Varma S, Simon R, Liersch T, Becker H, Difilippantonio MJ, et al. (2007): Gene expression profiling reveals a massive, aneuploidy-dependent transcriptional deregulation and distinct differences between lymph node-negative and lymph node-positive colon carcinomas *Cancer Res* 67, 41-56

Grade M, Wolff HA, Gaedcke J, Ghadimi BM (2012): The molecular basis of chemoradiosensitivity in rectal cancer: implications for personalized therapies *Langenbecks Arch Surg* 397, 543-555

Grady WM, Pritchard CC (2014): Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer *Toxicol Pathol* 42, 124-139

Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR, et al. (1995): A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6 *EMBO J* 14, 1421-1429

Haan S, Hemmann U, Hassiepen U, Schaper F, Schneider-Mergener J, Wollmer A, Heinrich PC, Grotzinger J (1999): Characterization and binding specificity of the monomeric STAT3-SH2 domain *J Biol Chem* 274, 1342-1348

Haghikia A, Hoch M, Stapel B, Hilfiker-Kleiner D (2012): STAT3 regulation of and by microRNAs in development and disease *JAKSTAT* 1, 143-150

Harrison DA (2012): The Jak/STAT pathway *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4

Hartmann KU, Heidelberger C (1961): Studies on fluorinated pyrimidines. XIII. Inhibition of thymidylate synthetase *J Biol Chem* 236, 3006-3013

Heald RJ, Ryall RD (1986): Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer *Lancet* 1, 1479-1482

Hedvat M, Huszar D, Herrmann A, Gozgit JM, Schroeder A, Sheehy A, Buettner R, Proia D, Kowolik CM, Xin H, et al. (2009): The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors *Cancer Cell* 16, 487-497

Hein AL, Ouellette MM, Yan Y (2014): Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (review) *Int J Oncol* 45, 1813-1819

Herreros de Tejada A, Gonzalez-Lois C, Santiago J (2017): Serrated lesions and serrated polyposis syndrome *Rev Esp Enferm Dig* 109, 516-526

Huang CY, Lin CS, Tai WT, Hsieh CY, Shiau CW, Cheng AL, Chen KF (2013): Sorafenib enhances radiation-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by inhibiting STAT3 *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 86, 456-462

Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, Aoki H, Yokoyama T, Fokt I, Hess K, Conrad C, Madden T, Sawaya R, et al. (2007): A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo *Oncogene* 26, 2435-2444

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW (2010): Hereditary and familial colon cancer *Gastroenterology* 138, 2044-2058

Jee SH, Chiu HC, Tsai TF, Tsai WL, Liao YH, Chu CY, Kuo ML (2002): The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathway is involved in interleukin-6-mediated Mcl-1 upregulation and anti-apoptosis activity in basal cell carcinoma cells *J Invest Dermatol* 119, 1121-1127

Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L (2012): Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies *Clin Gastroenterol Hepatol* 10, 639-645

Jiang Y, Ben Q, Shen H, Lu W, Zhang Y, Zhu J (2011): Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies *Eur J Epidemiol* 26, 863-876

Jones S, Chen WD, Parmigiani G, Diehl F, Beerewinkel N, Antal T, Traulsen A, Nowak MA, Siegel C, Velculescu VE, et al. (2008): Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4283-4288

Kamizono S, Hanada T, Yasukawa H, Minoguchi S, Kato R, Minoguchi M, Hattori K, Hatakeyama S, Yada M, Morita S, et al. (2001): The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2 *J Biol Chem* 276, 12530-12538

Kapteijn A, Paillard V, Saunders M (1996): Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction *J Biol Chem* 271, 5961-5964

Kekelidze M, D'Errico L, Pansini M, Tyndall A, Hohmann J (2013): Colorectal cancer: current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation *World J Gastroenterol* 19, 8502-8514

Kile BT, Alexander WS (2001): The suppressors of cytokine signalling (SOCS) *Cell Mol Life Sci* 58, 1627-1635

Kim KW, Mutter RW, Cao C, Albert JM, Shinohara ET, Sekhar KR, Lu B (2006): Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 activity results in down-regulation of Survivin following irradiation *Mol Cancer Ther* 5, 2659-2665

Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimatsu M, Mizuno K, Hibi M, Hirano T (1999): STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene *J Exp Med* 189, 63-73

Konnikova L, Simeone MC, Kruger MM, Kotecki M, Cochran BH (2005): Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells *Cancer Res* 65, 6516-6520

- Kunigal S, Lakka SS, Sodadasu PK, Estes N, Rao JS (2009): Stat3-siRNA induces Fas-mediated apoptosis in vitro and in vivo in breast cancer *Int J Oncol* 34, 1209-1220
- Lang R, Pauleau AL, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, Rutschman R, Murray PJ (2003): SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling *Nat Immunol* 4, 546-550
- Lawrence TS, Tepper JE, Blackstock AW (1997): Fluoropyrimidine-Radiation Interactions in Cells and Tumors *Semin Radiat Oncol* 7, 260-266
- Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, Beatty B, Squire J, O'Brodovich H, Lukacs GL (1999): Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer *Gene Ther* 6, 482-497
- Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Kloppel G, Yoshimura A, Reindl W, Sipos B, Akira S, et al. (2011): Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer *Cancer Cell* 19, 456-469
- Li WX (2008): Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling *Trends Cell Biol* 18, 545-551
- Li X, Wang H, Lu X, Di B (2010): STAT3 blockade with shRNA enhances radiosensitivity in Hep-2 human laryngeal squamous carcinoma cells *Oncol Rep* 23, 345-353
- Li Y, Deuring J, Peppelenbosch MP, Kuipers EJ, de Haar C, van der Woude CJ (2012): IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer *Carcinogenesis* 33, 1889-1896
- Liang PS, Chen TY, Giovannucci E (2009): Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis *Int J Cancer* 124, 2406-2415
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method *Methods* 25, 402-408
- Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, Qin H (2013): Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies *PLoS One* 8, e53916
- Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM (2006): Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer *Ann Surg* 244, 254-259
- Markowitz SD, Bertagnolli MM (2009): Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer *N Engl J Med* 361, 2449-2460

Masuhara M, Sakamoto H, Matsumoto A, Suzuki R, Yasukawa H, Mitsui K, Wakioka T, Tanimura S, Sasaki A, Misawa H, et al. (1997): Cloning and characterization of novel CIS family genes *Biochem Biophys Res Commun* 239, 439-446

Millar JL, Blackett NM, Hudspith BN (1978): Enhanced post-irradiation recovery of the haemopoietic system in animals pretreated with a variety of cytotoxic agents *Cell Tissue Kinet* 11, 543-553

Mitry E, Bouvier AM, Esteve J, Faivre J (2002): Benefit of operative mortality reduction on colorectal cancer survival *Br J Surg* 89, 1557-1562

Mitry E, Guiu B, Coscinea S, Jooste V, Faivre J, Bouvier AM (2010): Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study *Gut* 59, 1383-1388

Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T (1993): IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase *Science* 260, 1808-1810

Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, et al. (1997): Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor *Nature* 387, 924-929

Nakashima Y, Kondo M, Harada H, Horiuchi T, Ishinishi T, Jojima H, Kuroda K, Miyahara H, Nagamine R, Nakashima H, et al. (2010): Clinical evaluation of tocilizumab for patients with active rheumatoid arthritis refractory to anti-TNF biologics: tocilizumab in combination with methotrexate *Mod Rheumatol* 20, 343-352

Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982): Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields *EMBO J* 1, 841-845

Niemand C, Nimmesgern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, Heinrich PC, Muller-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

Nishimura Y (2004): Rationale for chemoradiotherapy *Int J Clin Oncol* 9, 414-420

Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, et al. (2002): Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis *Oncogene* 21, 2000-2008

Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, Saiura A, Matsubara K, Kitagawa T, Yamamoto J, Kubo T, Yoshikawa H (2005): Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma *Oncogene* 24, 6406-6417

Page C, Huang M, Jin X, Cho K, Lilja J, Reynolds RK, Lin J (2000): Elevated phosphorylation of AKT and Stat3 in prostate, breast, and cervical cancer cells *Int J Oncol* 17, 23-28

Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB (2012): Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification *J Med Genet* 49, 151-157

Patel I, Bastia D (1986): A replication origin is turned off by an origin-"silencer" sequence *Cell* 47, 785-792

Phillips TL, Fu KK (1976): Quantification of combined radiation therapy and chemotherapy effects on critical normal tissues *Cancer* 37, 1186-1200

Pikaart MJ, Recillas-Targa F, Felsenfeld G (1998): Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators *Genes Dev* 12, 2852-2862

Pinedo HM, Peters GF (1988): Fluorouracil: biochemistry and pharmacology *J Clin Oncol* 6, 1653-1664

Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heussner P, Hohenberger W, Holstege A, Hubner J, Kolligs F, et al. (2013): [S3-guideline colorectal cancer version 1.0] *Z Gastroenterol* 51, 753-854

Puli SR, Bechtold ML, Reddy JB, Choudhary A, Antillon MR (2010): Can endoscopic ultrasound predict early rectal cancers that can be resected endoscopically? A meta-analysis and systematic review *Dig Dis Sci* 55, 1221-1229

Qin A, Yu Q, Gao Y, Tan J, Huang H, Qiao Z, Qian W (2015): Inhibition of STAT3/cyclinD1 pathway promotes chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer *Biochem Biophys Res Commun* 457, 681-687

Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z (1988): Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping *Science* 241, 708-712

Sakai I, Takeuchi K, Yamauchi H, Narumi H, Fujita S (2002): Constitutive expression of SOCS3 confers resistance to IFN-alpha in chronic myelogenous leukemia cells *Blood* 100, 2926-2931

Sano S, Chan KS, Kira M, Kataoka K, Takagi S, Tarutani M, Itami S, Kiguchi K, Yokoi M, Sugawara K, et al. (2005): Signal transducer and activator of transcription 3 is a key regulator of keratinocyte survival and proliferation following UV irradiation *Cancer Res* 65, 5720-5729

Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, Sasaki M, Johnston JA, 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

Sasse J, Hemmann U, Schwartz C, Schniertshauer U, Heesel B, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Heinrich PC, Horn F (1997): Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization *Mol Cell Biol* 17, 4677-4686

Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab HR, Villanueva MT, Witzigmann H, et al. (2012): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years *J Clin Oncol* 30, 1926-1933

Schaefer TS, Sanders LK, Nathans D (1995): Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3 *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9097-9101

Schiemann WP, Bartoe JL, Nathanson NM (1997): Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras *J Biol Chem* 272, 16631-16636

Schust J, Sperl B, Hollis A, Mayer TU, Berg T (2006): Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization *Chem Biol* 13, 1235-1242

Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE, Jr. (1994): Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions *Cell* 76, 821-828

Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, et al. (2012): Cancer treatment and survivorship statistics, 2012 *CA Cancer J Clin* 62, 220-241

Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, Jemal A (2017): Colorectal cancer statistics, 2017 *CA Cancer J Clin* 67, 177-193

Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015): Cancer statistics, 2015 *CA Cancer J Clin* 65, 5-29

Southern PJ, Berg P (1982): Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter *J Mol Appl Genet* 1, 327-341

Spitzner M, Ebner R, Wolff HA, Ghadimi BM, Wienands J, Grade M (2014): STAT3: A Novel Molecular Mediator of Resistance to Chemoradiotherapy Cancers (Basel) 6, 1986-2011

Spitzner M, Emons G, Kramer F, Gaedcke J, Rave-Frank M, Scharf JG, Burfeind P, Becker H, Beissbarth T, Ghadimi BM, et al. (2010): A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 78, 1184-1192

Spitzner M, Roesler B, Bielfeld C, Emons G, Gaedcke J, Wolff HA, Rave-Frank M, Kramer F, Beissbarth T, Kitz J, et al. (2014): STAT3 inhibition sensitizes colorectal cancer to chemoradiotherapy in vitro and in vivo *Int J Cancer* 134, 997-1007

Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, et al. (1994): Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components *Science* 263, 92-95

Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, et al. (1997): A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling *Nature* 387, 917-921

Steel GG, Hill RP, Peckham MJ (1978): Combined radiotherapy--chemotherapy of Lewis lung carcinoma *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 4, 49-52

Steel GG, Peckham MJ (1979): Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5, 85-91

Steen AM, Luthman H, Hellgren D, Lambert B (1990): Levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase RNA in human cells *Exp Cell Res* 186, 236-244

Suwinski R, Withers HR (2003): Time factor and treatment strategies in subclinical disease *Int J Radiat Biol* 79, 495-502

Suzuki R, Sakamoto H, Yasukawa H, Masuhara M, Wakioka T, Sasaki A, Yuge K, Komiya S, Inoue A, Yoshimura A (1998): CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells *Oncogene* 17, 2271-2278

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

Takeda K, Akira S (2000): STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 199-207

Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA (2010): Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach *Gastroenterology* 138, 877-885

Tchirkov A, Rolhion C, Bertrand S, Dore JF, Dubost JJ, Verrelle P (2001): IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas *Br J Cancer* 85, 518-522

Valeriote F, Santelli G (1984): 5-Fluorouracil (FUra) *Pharmacol Ther* 24, 107-132

van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EM, Putter H, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van de Velde CJ, et al. (2011): Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer:

12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial *Lancet Oncol* 12, 575-582

Vannucchi AM, Verstovsek S, Guglielmelli P, Griesshammer M, Burn TC, Naim A, Paranagama D, Marker M, Gadbow B, Kiladjian JJ (2017): Ruxolitinib reduces JAK2 p.V617F allele burden in patients with polycythemia vera enrolled in the RESPONSE study *Ann Hematol* 96, 1113-1120

Vaupel P (2004): Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology *Semin Radiat Oncol* 14, 198-206

Verstovsek S, Hoffman R, Mascarenhas J, Soria JC, Bahleda R, McCoon P, Tang W, Cortes J, Kantarjian H, Ribrag V (2015): A phase I, open-label, multi-center study of the JAK2 inhibitor AZD1480 in patients with myelofibrosis *Leuk Res* 39, 157-163

Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, DiPersio JF, Catalano JV, Deininger MW, Miller CB, Silver RT, Talpaz M, et al. (2017): Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial *J Hematol Oncol* 10, 55

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development *N Engl J Med* 319, 525-532

Weber A, Hengge UR, Bardenheuer W, Tischoff I, Sommerer F, Markwarth A, Dietz A, Wittekind C, Tannapfel A (2005): SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition *Oncogene* 24, 6699-6708

Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. (1995): Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation *Cell* 82, 241-250

Wolpin BM, Meyerhardt JA, Mamon HJ, Mayer RJ (2007): Adjuvant treatment of colorectal cancer *CA Cancer J Clin* 57, 168-185

Wu CT, Chen MF, Chen WC, Hsieh CC (2013): The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer *Radiat Oncol* 8, 159

Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T (1988): Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor *Science* 241, 825-828

Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, et al. (1999): The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop *EMBO J* 18, 1309-1320

Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, et al. (2003): IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages *Nat Immunol* 4, 551-556

Yen A, Pardee AB (1978): Exponential 3T3 cells escape in mid-G1 from their high serum requirement *Exp Cell Res* 116, 103-113

Yin ZJ, Jin FG, Liu TG, Fu EQ, Xie YH, Sun RL (2011): Overexpression of STAT3 potentiates growth, survival, and radioresistance of non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells *J Surg Res* 171, 675-683

Yoshimura A, Naka T, Kubo M (2007): SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation *Nat Rev Immunol* 7, 454-465

Yuan J, Zhang F, Niu R (2015): Multiple regulation pathways and pivotal biological functions of STAT3 in cancer *Sci Rep* 5, 17663

Zetterberg A, Skold O (1969): The effect of serum starvation on DNA, RNA and protein synthesis during interphase in L-cells *Exp Cell Res* 57, 114-118

Zhang X, Blenis J, Li HC, Schindler C, Chen-Kiang S (1995): Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes *Science* 267, 1990-1994

Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. (1994): Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6 *Science* 264, 95-98

Zhou H, Miki R, Eeva M, Fike FM, Seligson D, Yang L, Yoshimura A, Teitell MA, Jamieson CA, Cacalano NA (2007): Reciprocal regulation of SOCS 1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme *Clin Cancer Res* 13, 2344-2353

DANKSAGUNG

Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Klinik zur Promotion.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. M. Grade für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und für seine umfassende und kompetente Betreuung mit produktiven Gesprächen und Diskussionen.

Gleichsam möchte ich mich herzlich bei meiner Betreuerin Dr. M. Spitzner für die ständige Erreichbarkeit und die positiven und motivierenden Worte bei Problemen bedanken. Die produktiven Diskussionen mit ihr und ihre fortwährende Unterstützung sind Grundlage für die Ergebnisse dieser Arbeit.

Ausdrücklich geht mein Dank an die gesamte Arbeitsgruppe, insbesondere an die MTAs Stefanie Müller, Jessica Eggert und Chan-Rong Lai, Sarah Wachenhausen, die verschiedenen MTA-Schüler und Dr. Sebastian Reineke, mit denen ich viele Stunden im Labor verbrachte und mit denen ich gern und häufig diskutierte, an die ich mich bei Fragen und Problemen jederzeit wenden konnte.

Für Unterstützung bei jeglichen statistischen und mathematischen Fragen danke ich Dr. F. Kramer aus der Medizinischen Statistik.

Weiterhin gilt mein Dank auch Frau Dipl.-Biol. M. Rave-Fränk und Herrn Dr. S. Dango für hilfreiche fachliche Hinweise und Diskussionen.

Für die finanzielle Förderung im Rahmen des „Gö4med“-Stipendienprogramms bedanke ich mich bei den Vertretern der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank all denen, die mich in den letzten Jahren motiviert haben und damit den kontinuierlichen Fortschritt sowie den Abschluss dieser Arbeit erst ermöglichten.