

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin, I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Relevanz der konstitutiven Aktivierung des IL-6-Signalwegs für die Proliferation und Transformation humaner Leberzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Johannes Ruben Herden
aus Darmstadt

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.07.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. H. Wege

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. M. Dandri-Petersen

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. J. Petersen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)	5
1.2 Entzündung und HCC	5
1.3 Interleukin 6 (IL-6).....	6
1.4 Der IL-6-Signalweg	7
1.5 IL-6 in der Hepatokarzinogenese	9
1.6 Die Telomerase in der Hepatokarzinogenese.....	10
1.7 Telomerase-immortalisierte humane Hepatozyten.....	11
2. Fragestellung	13
3. Material und Methoden	14
3.1 Das Expressionsplasmid L-gp130	14
3.2 Propagierung der Vektoren in <i>E. coli</i> und Isolierung der Plasmid-DNA.....	15
3.3 Kontrolle der Plasmide mittels Gelelektrophorese.....	17
3.4 Zelllinien	18
3.5 Zellkultur	18
3.6 Transfektion durch Nukleofektion	19
3.7 Selektion und Isolation von Einzelzellklonen	20
3.8 DNA-Extraktion und Zeocin-PCR zum Nachweis von L-gp130.....	20
3.9 Proteinextraktion und Proteinbestimmung.....	21
3.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	22
3.11 Western Blot.....	24
3.12 Immundetektion	24
3.13 RNA-Extraktion und reverse Transkription	26
3.14 qRT-PCR für CyclinD1	26
3.15 Analyse der Zellproliferation und Serumabhängigkeit	27
3.16 Induktion von oxidativem Stress.....	28
3.17 Detektion von oxidativem Stress.....	28
3.18 Kontaktinhibition bzw. Zellzyklusanalyse	29
3.19 Softagarassay.....	30
3.20 qRT-PCR: für p21	30

3.21	PCR-Array.....	31
3.22	Statistik.....	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Sequenzierung des Inserts L-gp130	32
4.2	Zeocin-PCR zum Nachweis der Plasmid-DNA	32
4.3	Immunoblot von P-STAT3 und P-ERK	33
4.4	qRT-PCR für CyclinD1	35
4.5	Proliferation und Serumabhängigkeit.....	36
4.6	Zellzyklusanalyse zur Bestimmung der Kontaktinhibition.....	38
4.7	<i>Colony Assay</i>	39
4.8	Detektion von oxidativem Stress.....	41
4.9	qRT-PCR für p21	42
4.10	PCR-Array.....	43
5.	Diskussion	49
5.1	Die Aktivierung des IL-6-Signalwegs.....	49
5.2	Charakterisierung der Klone	50
5.3	Oxidativer Stress	53
5.4	Ausblick	55
6.	Zusammenfassung.....	57
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	58
8.	Anhang: Sequenz L-gp130.....	64
9.	Literaturverzeichnis.....	66
10.	Danksagung.....	79
11.	Lebenslauf.....	80
12.	Eidesstattliche Versicherung.....	81

1. Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Das hepatozelluläre Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) ist weltweit der fünfthäufigste maligne Tumor bei Männern und der siebthäufigste bei Frauen. Dabei sind Männer etwa zwei- bis viermal so häufig betroffen wie Frauen. Die Inzidenz in Europa und den USA ist zunehmend und liegt zurzeit bei ca. 5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner jährlich. In Entwicklungsländern liegt die Inzidenz des HCC weit höher, wobei es in den tropischen Gebieten eines der häufigsten Malignome ist. Nach Lungen- und Brustkrebs ist das Leberzellkarzinom die dritthäufigste malignombedingte Todesursache weltweit (F. Xavier Bosch *et al.* 2004, www.globocan.iarc.fr).

Eine der wichtigsten Risikofaktoren für das HCC ist eine chronische Virushepatitis, d.h. eine chronische Hepatitis B oder C (Kew 2010). Die Infektionen mit Hepatitis B und C sind weltweit für etwa 80% der HCC-Fälle verantwortlich (Perz *et al.* 2006). Daneben spielen auch eine ganze Reihe weiterer Primärkrankheiten als Risikofaktor eine Rolle. Das Spektrum reicht dabei von Autoimmunerkrankungen, wie der primär biliären Zirrhose und der primär sklerosierenden Cholangitis, über metabolische Erkrankungen wie Morbus Wilson oder Hämochromatose bis hin zu toxischen Leberschäden, wie der alkoholischen Steatohepatitis. Eine Leberzirrhose jeglicher Genese ist dabei ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines HCC (Sherman 2005). In der westlichen Welt erlangen zudem auch die Risikofaktoren Adipositas und Diabetes mellitus zunehmende Bedeutung. Sie bedingen die Entwicklung einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis, die wiederum für die Entstehung einer Leberzirrhose grundlegend sein kann (Siddique und Kowdley 2011 und Hessheimer *et al.* 2010).

1.2 Entzündung und HCC

Die Entzündung ist ein komplexer und vielfältig regulierter Prozess. Dieser soll dem Körper helfen, Infektionen und Gewebeverletzungen zu bekämpfen und geschädigtes Gewebe zu restaurieren. Gerät dieser natürliche Prozess außer Kontrolle oder wird falsch reguliert, trägt das zum Fortschreiten von chronischen Krankheiten bei (Jones 2005). Es gibt zahlreiche Gewebe, bei denen eine chronische Entzündung ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung eines Tumors sein kann. So führen zum Beispiel einige chronische Infektionen zu

einer chronischen Entzündung und konsekutiv zu einer Entartung. Dies ist bekannt beim Magen-Karzinom und MALT (*mucosa associated lymphatic tissue*)-Lymphom durch die Besiedlung mit *Helicobacter pylori* (Conteduca *et al.* 2013), beim Zervix-Karzinom durch den Befall mit den humanen Papillomaviren 16 und 18 und beim Burkitt-Lymphom durch eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus. Schon Rudolf Virchow postulierte 1863 diesen kausalen Zusammenhang zwischen Infektion und Krebs (Virchow 1881), ging aber noch von einem „Krebsbacillus“ als Ursache für die Entzündungen aus, die zu einer malignen Transformation führen sollten. Auch nicht-infektiöse chronisch entzündliche Erkrankungen können ein erhöhtes Risiko einer malignen Entartung bergen. So zum Beispiel die chronisch entzündliche Darmerkrankung Colitis ulcerosa (Ezequiel Fuentes-Pananá *et al.* 2009).

Das HCC ist weltweit das häufigste Malignom, das direkt mit einer chronischen Infektion (vor allem Hepatitis B und C) assoziiert ist. Verschiedene Arbeiten weisen auf eine kritische Rolle von Interleukin-6 (IL-6) und STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) hin, das neben NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'* von aktivierten B-Zellen) als wichtiger Transkriptionsfaktor für bestimmte Gene angesehen wird. Es ist ein Transkriptionsfaktor der Gene reguliert, die für die Differenzierung der Zelle, Apoptose und das Zellwachstum bedeutsam sind. Mittlerweile finden die ersten Medikamente Anwendung, die an diesen Punkten ansetzen. So gibt es erste Hinweise, dass die Verwendung von Celecoxib, einem antiinflammatorischen Medikament, die Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 vermindert und so für HCC-Patienten einen Benefit haben könnte (Liu *et al.* 2011b).

1.3 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 ist ein Zytokin. Zytokine sind Glykoproteine, die der Zellkommunikation dienen. Sie regulieren hauptsächlich Proliferation und Differenzierung von Zellen des Immunsystems. Innerhalb der Zytokine unterscheidet man Interleukine, Chemokine, Interferone, Kolonie stimulierende Faktoren und Tumornekrosefaktoren (TNF). IL-6 ist der Hauptvertreter und Namensgeber der so genannten IL-6-artigen Interleukine. Zu dieser Gruppe zählen auch Interleukin-11, der *leukaemia inhibitory factor*, *oncostatin M*, *ciliary neurotropic factor*, *cardiotropin-1* und *cardiotropin*-ähnliche Zytokine. Diese Zytokine haben eine ähnliche Struktur und die Gemeinsamkeit, dass sie für die Signaltransduktion in der Zelle auf eine Rezeptoruntereinheit, das Glykoprotein 130 (gp130), angewiesen sind (Heinrich PC *et al.*

1998). IL-6 gehört zu einer Gruppe von Substanzen, die neben der Beeinflussung von Wachstum und Differenzierung von Zellen als Immunmodulatoren eine wichtige Stellung innerhalb des Immunsystems und der Koordination der Immunabwehr einnehmen (Kamimura *et al.* 2003). Dabei kann die Wirkung dieser Interleukine auf die engste Umgebung beschränkt bleiben, also auto- oder parakrin sein, aber auch endokrin systemische Prozesse in Gang setzen, wie zum Beispiel die akute Phase im Rahmen einer Immunantwort bei Infektionen oder Gewebsverletzungen. Des Weiteren haben die IL-6-artigen Interleukine auch eine Funktion in der Hämatopoese und der embryonalen Entwicklung und spielen bei der neuronalen und Leberregeneration eine Rolle (Heinrich *et al.* 2003). Die Hauptbedeutung von IL-6 erstreckt sich auf Entzündungsprozesse. IL-6 spielt für den Übergang von der angeborenen hin zur erworbenen Immunreaktion eine bedeutende Rolle, indem IL-6 die Rekrutierung von Leukozyten, ihre Aktivierung und Apoptose kontrolliert (Jones 2005). Diese Rolle von IL-6 bei Entzündungsreaktionen wird auch deutlich, wenn man die pharmakologischen Möglichkeiten betrachtet. So wird z. B. seit einiger Zeit Tocilizumab, ein humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor mit Erfolg bei Morbus Crohn und Rheumatoider Arthritis eingesetzt (Genovese *et al.* 2008), beides chronische entzündliche Erkrankungen.

1.4 Der IL-6-Signalweg

IL-6 kann entweder an einen membrangebundenen Rezeptor (IL-6R), der auf Leberzellen und Leukozyten vorkommt, oder an einen löslichen Rezeptor (sIL-6R) binden. Der lösliche Rezeptor entsteht durch limitierte Proteolyse des membrangebundenen Rezeptors (Scheller und Rose-John 2006) oder durch Translation einer alternativ gespleißten DNA (Heinrich *et al.* 1998). Dem löslichen Rezeptor fehlen die Transmembrandomäne sowie die intrazelluläre Domäne, allerdings ist diese nicht für die Signaltransduktion notwendig (Taga *et al.* 1989).

Der Komplex aus IL-6 und seinem Rezeptor interagiert dann mit dem membrangebundenen gp130 und führt zu dessen Dimerisierung (Abbildung 1). Im Anschluss an diese ligandeninduzierte Dimerisierung kommt es zu verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden. Neben der Aktivierung von Ras (*rat sarcoma*), einem Protoonkogen, und dem Signalweg über MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen, kommt es außerdem zu einer Aktivierung der Januskinasen, die mit gp130 assoziiert sind. Die einzelnen Januskinasen (Jak 1, Jak 2, Tyk 2) werden je nach Zytokin und je nach Zelltyp (Stahl *et al.* 1993) aktiviert und phosphorylieren

gp130 an den Tyrosinresten. So bilden sich Stellen für die Bindung von Molekülen, die SH2 (*src-homology 2*)-Domänen enthalten, wie die STAT-Proteine 1 und 3. Die rekrutierten STAT-Proteine werden wiederum phosphoryliert, bilden daraufhin Homo- oder Heterodimere und translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkription bestimmter Zielgene regulieren (Wollert und Chien 1997).

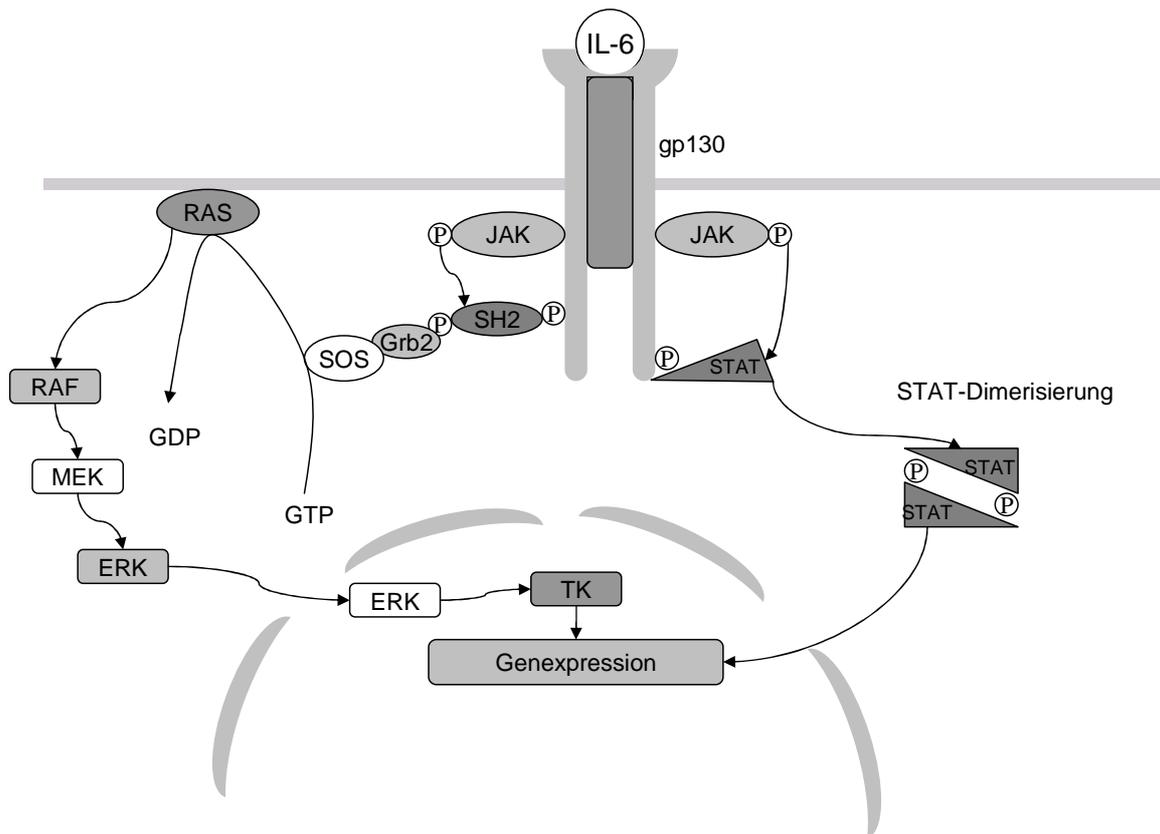


Abbildung. 1: Der IL-6-Signalweg. IL-6 bindet an seinen Rezeptor, wodurch es zur Dimerisierung von gp130 kommt. Dies führt über Januskinasen einerseits zur Aktivierung von STAT3 (rechts im Bild), andererseits zur Aktivierung des Signalwegs über RAS und MAP-Kinasen (links im Bild)

Die Bedeutung der Dimerisierung des gp130 für die weitere Signaltransduktion nutzen Stuhlmann-Laeisz *et al.* für eine konstitutive Aktivierung des gp130/STAT3-Signalwegs. Es konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von gp130 ausreicht, um die Signalkaskade zu aktivieren und die Phosphorylierung von STAT3 auszulösen. Dazu wurden die beiden gp130-Moleküle über einen sogenannten „Leucin-Zipper“, eine Proteindomäne, die der Dimerisierung von Proteinen dient, miteinander verbunden und die genetische Information für dieses Konstrukt in ein Plasmid kloniert (Stuhlmann-Laeisz *et al.* 2006). Dieses Plasmid findet in der vorliegenden Arbeit Verwendung.

1.5 IL-6 in der Hepatokarzinogenese

Die Aktivierung des IL-6-Signalwegs wurde in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben. So wurden erhöhte IL-6-Spiegel z. B. beim multiplen Myelom, bei Prostata-, Ovar- und Magen-Karzinom und beim kolorektalen Karzinom detektiert (Wierzbowska *et al.* 1999, Berek *et al.* 1991, Nakashima *et al.* 2000, Wu *et al.* 1996, Kinoshita *et al.* 1999). Gering erhöhte IL-6-Spiegel wurden ebenfalls bei Patienten mit Leberzirrhose gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe gemessen. Noch deutlicher erhöht war IL-6 bei Patienten mit HCC. Hier korrelierte der IL-6-Spiegel mit dem Stadium der Krankheit: Je invasiver und größer der Tumor, desto höher der gemessene IL-6-Spiegel (Soresi *et al.* 2006). Aus diesem Grund wird IL-6 neben AFP (Alpha-1-Fetoprotein) auch als Tumormarker des HCC sowie als Parameter zur Früherkennung des HCC diskutiert (Wong *et al.* 2009, Giannitrapani *et al.* 2002). Außerdem konnte vor kurzem in einer genomweiten Expressionsstudie gezeigt werden, dass die Aktivierung der Targetgene von IL-6 nach einer potentiell kurativen Resektion mit einer schlechten Prognose einhergeht. So kam der Verdacht auf, dass bei einem früh erkannten und operierten Tumor, ein Spätrezidiv nach zwei bis drei Jahren eher als erneuter Tumor gewertet werden muss, der dann vermutlich erneut durch die chronische Entzündung hervorgerufen wird (Hoshida *et al.* 2010). So ist auch zu verstehen, dass ein wichtiger Grund für die schlechte Prognose nach Resektion eines HCC die hohe Inzidenz von Rezidiven ist, d.h. von erneuten Primärtumoren und wachsenden Metastasen (die zur Zeit der Erstdiagnose noch nicht zu erkennen waren), da die chronische Entzündung bestehen bleibt (Llovet *et al.* 2008). In 80% der Fälle entwickelt sich das HCC aus einer Leberzirrhose. Eine chronische Hepatitis B oder C sind dabei die häufigsten Ursachen für ein HCC bei Zirrhose. Auch bei den chronischen infektiösen Hepatitiden wurde bereits eine erhöhte Konzentration von IL-6 (neben anderen Zytokinen) gemessen (Eriksson *et al.* 2004 und Malaguarnera *et al.* 1997). Es ist nicht geklärt, ob die erhöhte IL-6-Produktion eine Folge der Entzündungsreaktion ist und als Reaktion auf die Entartung steigt oder ob ein erhöhter IL-6-Spiegel bei der malignen Entartung eine treibende Rolle spielt. In einer Fall-Kontroll-Studie konnte gezeigt werden, dass Hepatitis B-Patienten, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes ein HCC entwickelten, bereits zwei bis drei Jahre vor Diagnosestellung einen erhöhten IL-6-Wert im Serum aufwiesen (Wong *et al.* 2009). Ein erhöhter IL-6-Spiegel beschränkt sich nicht nur auf die viralen Hepatitiden. Auch für genetische und diätetische Adipositas wurde kürzlich im Mausmodell nachgewiesen, dass diese zu einer chronischen Entzündung in der Leber der

Versuchstiere führt. Damit gehen eine Erhöhung von IL-6 und die Aktivierung von STAT3 und TNF einher. Dies begünstigt wiederum die Karzinogenese in der Leber (Park *et al.* 2010). Den Zusammenhang von IL-6 und der Hepatokarzinogenese zeigt auch die Arbeit von Naugler *et al.* Hier konnte gezeigt werden, dass bei chemisch induziertem HCC im Mausmodell die Inhibition des IL-6-Signalweges vor der Karzinomentwicklung schützen kann. Wie bereits erwähnt, entwickeln Männer wesentlich häufiger ein HCC als Frauen. Eine ähnliche Verteilung findet sich bei Mäusen. In den DEN (Diethylnitrosamin)-induzierten Tumorzellen produzieren weibliche Mäuse weniger IL-6 und entwickeln seltener ein HCC. Dieser Geschlechtsunterschied konnte bei Inhibition des IL-6-Signalweges im Mausmodell aufgehoben werden. Die Daten deuten daraufhin, dass IL-6 eine ursächliche Rolle für die Verteilungsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen spielt (Naugler *et al.* 2007).

Auch eine konstitutive Aktivierung von STAT3, als nachgeschaltetes Molekül im IL-6-Signalweg, scheint eine Rolle bei der malignen Entartungen zu spielen (Sartor *et al.* 1997, Catlett-Falcone *et al.* 1999, Huang *et al.* 2000, Lin *et al.* 2005). STAT3, das neben den IL-6-artigen Interleukinen auch durch andere Faktoren wie z.B. EGF (*epidermal growth factor*) (Zhong *et al.* 1994) oder TNF- α (*tumor necrosis factor α*) (Miscia *et al.* 2002) aktiviert werden kann, hat unterschiedliche Effekte, die auf eine tumorprogressive Funktion hinweisen. So treibt STAT3 die Proliferation (Kiuchi *et al.* 1999) und Angiogenese (Niu *et al.* 2002) in Tumorzellen voran. Es verhindert die Apoptose (Zushi *et al.* 1998) und hilft den Zellen, die Ausschaltung durch das Immunsystem zu umgehen. Eine konstitutive Aktivierung von STAT3 in der Leber als Reaktion auf den durch eine Infektion hervorgerufenen oxidativen Stress konnte bereits für Hepatitis C gezeigt werden (Waris *et al.* 2005).

1.6 Die Telomerase in der Hepatokarzinogenese

Eine Aktivierung der Telomerase wird für viele Tumorentitäten als obligatorischer Schritt der mehrstufigen Karzinogenese angesehen. So wurde in etwa 90% aller Malignome eine Aktivitätserhöhung der Telomerase als frühe Veränderung detektiert (Shay und Bacchetti 1997). Die alleinige Aktivierung der Telomerase ist jedoch nicht ausreichend, um eine maligne Transformation auszulösen (Harley 2002). Jedoch ist die Aktivierung der Telomerase ein notwendiger früher Schritt (Wege und Brümmendorf 2007). Weitere Alterationen in Signalwegen und genetische Veränderungen sind jedoch nötig. Die Telomerase ist ein Protein,

das im Zellkern die Stabilität der Enden von Chromosomen aufrechterhält. Die Enden der eukaryotischen Chromosomen, die Telomere, bestehen aus repetitiven 5'-TTAGGG-3' Nukleotiden. Bei jeder Zellteilung kommt es durch die unvollständige semikonservative DNA-Replikation zu einer Verkürzung der Telomere bis schließlich eine kritische Telomerlänge erreicht ist. Die Zellen treten in die Seneszenz ein, ein irreversibler postmitotischer Zustand mit Erhalt der Stoffwechselaktivität. Die Telomerase kann diese teilungsbedingte Telomerverkürzung ausgleichen, indem sie die Telomere wieder verlängert. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten. Die RNA-Komponente TERC (*telomerase RNA component*) ist essentiell für die Bindung an das Telomerende und dient gleichermaßen als Matrize für die Neusynthese. TERT (*telomerase reverse transcriptase*), die aktivitätsbestimmende katalytische Untereinheit, verlängert schließlich die Telomere. Während der Embryonalentwicklung ist das Enzym in allen somatischen Zellen aktiv. Zum Zeitpunkt der Geburt wird die Expression von TERT runterreguliert und die Telomerase damit inaktiviert. Im Gegensatz dazu ist das Enzym in Keimbahnzellen und in den meisten Tumorzellen aktiviert (Shay und Bacchetti 1997). Auch in humanen Hepatozyten ist die Expression der Telomerase runterreguliert (Wege *et al.* 2003a).

Basierend auf den bisherigen Untersuchungen, wurde für dieses Projekt die Hypothese aufgestellt, dass es während eines chronischen Leberschadens zur permanenten Aktivierung der Telomerase kommt, die den Hepatozyten ein unbegrenztes Wachstum (Immortalität) ermöglicht. Im entzündlichen Milieu der Leber kommt es dann durch oxidativen Stress im Rahmen von inflammatorischen Signalwegen zu weiteren genetischen Veränderungen und schließlich zu einer malignen Transformation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Relevanz einer konstitutiven IL-6-Aktivierung auf die Proliferation und das Wachstumsverhalten der Zellen sowie der antioxidativen Abwehr von immortalisierten humanen Hepatozyten untersucht.

1.7 Telomerase-immortalisierte humane Hepatozyten

Zur Untersuchung von IL-6 und dessen Bedeutung in der Hepatokarzinogenese eignen sich primäre humane Hepatozyten als Zellkulturmodell nicht. Diese sind nur für eine begrenzte Zeit kultivierbar und teilen sich in Zellkultur nicht mehr. Hepatomazelllinien hingegen, wie etwa HepG2 (Zelllinie eines humanen HCC), lassen sich expandieren, eignen sich aber ebenso wenig für Untersuchungen zu den entscheidenden Schritten in der

Hepatokarzinogenese, da sie bereits entartet zu sind und komplexe Veränderungen des Karyotyps aufweisen.

Um fetale humane Hepatozyten als Zellkulturmodell einzusetzen, wurden von *Wege et al.* aus 22-24 Wochen alten humanen Feten Hepatozyten isoliert. Durch ektope Expression von TERT, dessen Expression limitierend für die Aktivität der Telomerase ist, konnte die Telomerase in diesen Zellen (FH-hTERT) wieder aktiviert und die Telomere so stabilisiert werden (Immortalisierung) (*Wege et al.* 2003a). Durch die Wiederherstellung der Telomerasefunktion konnte die so generierte humane Leberzelllinie bereits bis zu über 800 Populationsverdopplungen expandiert werden, ohne in die Seneszenz einzutreten. Dabei wurde gezeigt, dass die Zellen ihr Potential zur Differenzierung beibehalten, dabei aber keine Anzeichen einer malignen Transformation vorweisen (*Wege et al.* 2003b und *Haker et al.* 2007).

2. Fragestellung

Die Mehrzahl der HCC entsteht auf dem Boden einer entzündlichen Erkrankung und der Zusammenhang zwischen Entzündung und Karzinom ist unbestritten (Coussens und Werb 2002). Der IL-6-Signalweg, ein proinflammatorischer Signalweg, scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Johnson *et al.* 2012). Ebenso scheint das Risiko, bei erhöhten IL-6-Werten im Serum (insbesondere bei Adipositas) ein HCC zu entwickeln, mit dem IL-6-Signalweg in Zusammenhang zu stehen (Ohishi *et al.* 2013 und Beyazit *et al.* 2011). In dieser Arbeit sollte überprüft werden, wie sich eine konstitutive Aktivierung des IL-6-Signalwegs auf die Proliferation und Transformation von Telomerase-immortalisierten Hepatozyten auswirkt. Laut unserer Hypothese könnte eine konstitutive Aktivierung des IL-6-Signalwegs in FH-hTERT-Zellen die Entartung begünstigen. Überwacht wurden dementsprechend die Proliferation, Zellzyklusverteilung und Kontaktinhibition der Zellen mit und ohne IL-6-Aktivierung. Als *in vitro* Marker für eine maligne Transformation wurde zusätzlich das verankerungsunabhängige Wachstum im Colony Assay überwacht. Unter der Annahme, dass IL-6 die Schadensantwort in FH-hTERT auf oxidativen Stress verändert, wurde auch der Einfluss von ROS und dessen Abwehr untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Das Expressionsplasmid L-gp130

Das Protein gp130 ist das signaltransduzierende Protein des IL-6-Rezeptors nach Bindung von IL-6. Die Transmembrandomäne sowie der intrazelluläre Teil und das Signalpeptid des Wildtyp gp130 wurden in dem konstitutiv aktiven Rezeptor-Konstrukt L-gp130 beibehalten (Abbildung 2). Der extrazelluläre Teil wurde durch die *Leucin-Zipper*-Region des humanen *c-jun* Gens mit 39 Aminosäuren ersetzt (Aminosäuresequenz: RIARLEEKVKTLKAQNSELA STANMLREQVAQLKQKVMN). Zusätzlich wurde ein Linker mit der Aminosäuresequenz ELCGG eingefügt. Außerdem enthält der konstitutiv aktive IL-6-Rezeptor L-gp130 eine FLAG-Sequenz für die immunhistochemische Detektion. (Lang 2004 und Stuhlmann-Laeisz *et al.* 2003)

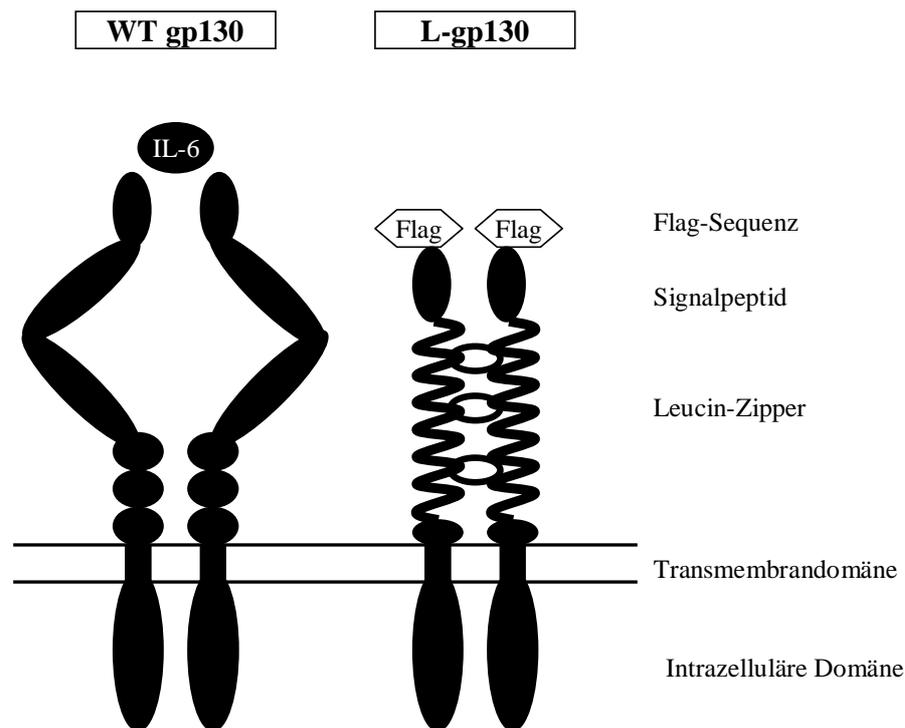


Abbildung 2: Wildtyp WT-gp130 und der konstitutiv aktive IL-6-Rezeptor L-gp130.

Das Basisplasmid pcDNA3.1 enthält zwei Antibiotikaresistenzen. Zum einen eine Ampicillinresistenz, die zur selektiven Vermehrung des Plasmids in Bakterien dient, und zum anderen eine Zeocinresistenz (*bleo*), die zur Selektion erfolgreich transfizierter eukaryotischer

Zellen genutzt wird. Das Konstrukt L-gp130 wurde in der *Multiple cloning site* von pcDNA3.1 eingefügt. Die Transkription von L-gp130 wird über einen konstitutiven CMV-Promotor gesteuert (Abbildung 3). Das Plasmid pcDNA3.1-L-gp130 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Rose-John (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Biochemie) zur Verfügung gestellt. Als Kontrollplasmid wurde das Plasmid pcDNA3.1 mit Geneticinresistenz verwendet.

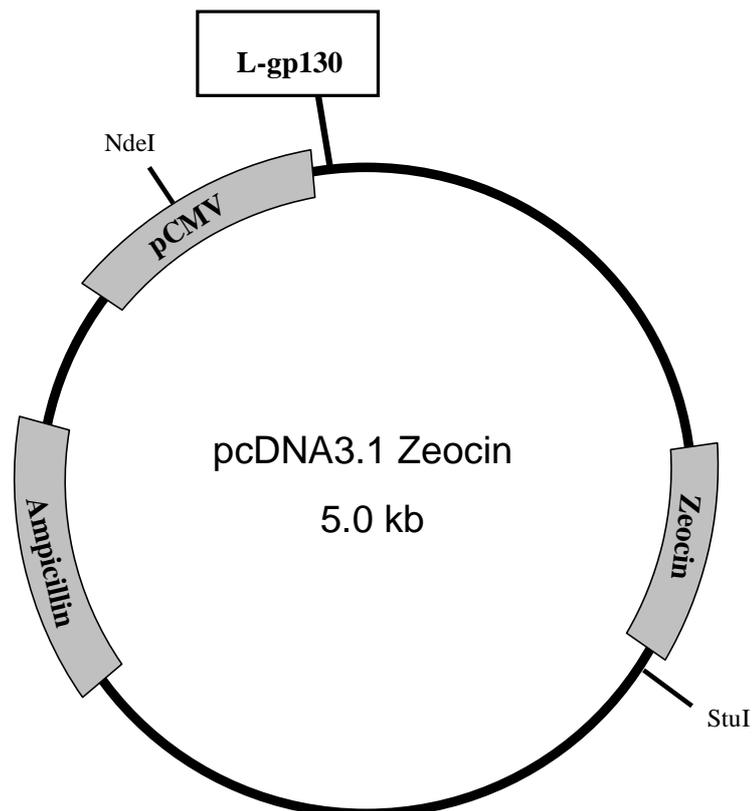


Abbildung 3: Das Plasmid pcDNA3.1. Eingezeichnet sind die Resistenzgene und die Restriktionsenzyme *NdeI* und *StuI*, mit denen das Plasmid zur Kontrolle geschnitten wurde. pCMV bezeichnet den Promotor, der die Expression des Inserts L-gp130 steuert.

3.2 Propagierung der Vektoren in *E. coli* und Isolierung der Plasmid-DNA

Material:

- LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.5; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Ampicillin (50 mg/ml; Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)
- *E. coli* XL 10 Gold
- pcDNA3.1 und pcDNA3.1-L-gp130

- LB-Agarplatten (LB-Medium mit 12 g/l Agar; Invitrogen) mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich)
- *EndoFree Maxi Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Photometer (BioPhotometer 6131; Eppendorf AG)
- Schüttler (Schüttelmaschine RO 10; Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland)
- Primer T7, Sequenz: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (MWG Eurofins, Ebersberg, Deutschland)
- Primer pCR3.1-BGHrev, Sequenz: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' (MWG Eurofins)

Die Vektoren ohne bzw. mit Insert wurden zur Sequenzierung bzw. zur Transfektion in *E. coli* in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin propagiert und anschließend isoliert. Dazu erfolgte zunächst die Transformation der Vektoren in *E. coli* XL 10 Gold. Je Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Zellen aufgetaut, mit je 5 µl Plasmid (3 ng/ml) gemischt und kurz zentrifugiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis, erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 30 Sekunden. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis und Zugabe von 800 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C unter aeroben Bedingungen auf dem Schüttler bei 300 rpm (*rounds per minute*) inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C für 10 Minuten, sodass der Überstand bis auf ca. 100 µl abpipettiert werden konnte. Das Zellpellet wurde mit dem restlichen Überstand resuspendiert und Aliquots dieser Ansätze zur Selektion auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in jeweils 500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Unter aeroben Bedingungen wurden die Ansätze bei 37°C schüttelnd (300 rpm) über Nacht inkubiert. Abschließend wurden die Ansätze 1:500 verdünnt und ein weiteres Mal über Nacht inkubiert. Im Folgenden wurden die Plasmide mit dem *EndoFree Maxi Kit* nach Herstellerangaben isoliert. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm im Photometer. Die Reinheit der gewonnenen Plasmide wurde mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten 260/280 nm bestimmt. Außerdem wurde das Plasmid pcDNA3.1-L-gp130 zur Kontrolle der Insertsequenz ansequenziert. Dazu wurden die Primer T7 und pCR3.1-BGHrev verwendet.

3.3 Kontrolle der Plasmide mittels Gelelektrophorese

Material:

- Agarose (Invitrogen)
- GelRed (Stammlösung 1:10000 verdünnt; Biotium, Hayward, CA, USA)
- TAE-Puffer (40 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 20 mM Eisessig)
- *GeneRuler 1 kb DNA Ladder-Mix* (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
- Restriktionsenzym *NdeI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Restriktionsenzym *StuI* (New England Biolabs)
- *Bovine serum albumin* (BSA; 10 mg/ml)
- *NEBuffer 2* Puffer (New England Biolabs)
- Thermocycler (T3; Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Gelschlitten (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- 6 x Aktionspuffer Loading Dye (Fermentas)
- UV-Schirm (*ChemiDocTM XRS+ Imaging Systems*; Bio-Rad Laboratories GmbH)

Zur Kontrolle der propagierten Plasmide erfolgte ein Restriktionsverdau mit 2 Restriktionsenzymen. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass die Plasmide an zwei verschiedenen Stellen geschnitten werden und so zwei DNA-Fragmente mit bestimmter Länge entstehen, die im Gel identifiziert werden können. Es wurde zu 1 µg des jeweiligen Plasmids (gelöst in 14 µl Wasser) je 1 µl der Restriktionsenzyme, 2 µl BSA sowie 2 µl *NEBuffer 2* Puffer pipettiert. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte anschließend für 20 Minuten bei 65°C ebenfalls im Thermocycler. Für die Gelelektrophorese wurde ein 1%-iges Agarosegel gegossen, indem 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer vorsichtig unter Aufkochen in der Mikrowelle erhitzt und so gelöst wurde. Nach Zugabe von 5 µl GelRed wurde die Agaroselösung auf einen Gelschlitten gegossen, um dort zu polymerisieren. Die Restriktionsansätze wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Zum Vergleich der Bandengröße wurde zusätzlich ein DNA-Marker mit definierten Größen verwendet (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder-Mix*). Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 140 Volt in 1 x TAE-Puffer. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Schirm analysiert.

3.4 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden die in der Einleitung beschriebenen immortalisierten humanen fetalen Hepatozyten (FH-hTERT) verwendet. Für die Positivkontrolle der Western Blots wurde die humane Hepatomzelllinie HepG2 verwendet.

3.5 Zellkultur

Material:

- Medium (FHM): 500 ml *Dulbeccos Modified Eagle Medium* mit 4,5 g/L (DMEM; Invitrogen)
50 ml hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (FBS - *Fetal bovine serum*; Invitrogen)
1 ml Gentamycin/Amphotericin B (Endkonzentration 10 µg/ml Gentamycin 0,25 µg/ml Amphotericin B; Invitrogen)
250 µl Insulin (Endkonzentration 5 µg/ml; Sigma-Aldrich)
50 µl Hydrocortison (Endkonzentration 2,4µg/ml; Sigma-Aldrich)
- Selektionsmedium: FHM mit 200 µg/ml Zeocin (Invitrogen)
- 0,25% Trypsin-EDTA (Invitrogen)
- *Phosphate buffered saline* (PBS; Invitrogen)
- Einfriermedium: 80% DMEM
10% FBS
10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich)
- Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Mikroskop (DM IL; Leica, Wetzlar, Deutschland)
- Zählkammer nach Neubauer (Brand, Wertheim, Deutschland)
- sterile Arbeitsbank (Heraeus HS 12; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) und Brutschrank (Heraeus BB 16; Thermo Scientific)
- *Freezing container* (Nalgene, Rochester, NY, USA)
- Wasserbad (GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)
- Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R; Eppendorf AG)

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in 25 cm²- bzw. 75 cm²-Zellkulturflaschen (T25 bzw. T 75) in FHM kultiviert und bei einer Konfluenz von 80 bis 100% passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die adhärenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA für 3 bis 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Trypsin-EDTA wurde schließlich durch die Zugabe von serumhaltigem Medium inaktiviert und die Zellen in der gewünschten Dichte erneut ausgesät. Das Auftauen von Zellen erfolgte durch Aufwärmen im Wasserbad auf 37°C. Durch Zugabe von FHM wurden die Zellen anschließend resuspendiert und ausgesät. 24 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel. Um einen Vorrat an Zellen zu haben, wurden regelmäßig 1 bis 3 x 10⁶ Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Nach Aufnahme der Zellen in 1 ml Gefriermedium folgte eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur in einem *Freezing container*. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 24 Stunden bei -80°C gelagert, bevor sie für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.6 Transfektion durch Nukleofektion

Material:

- *Amaxa Nucleofector*TM (Lonza Group AG, Basel, Schweiz)
- *Nucleofector*[®] *Solution V* (Lonza Group AG)
- 6-*well*-Platten
- Plasmide (pcDNA3.1-L-gp130 und pcDNA3.1; Invitrogen)

Mit Hilfe der Nukleofektion wird die DNA in den Zellkern der Zielzellen geschleust. Dabei zerstört ein elektrischer Puls kurzfristig das Membranpotential der Zelle. Es entstehen Membranporen, durch die das genetische Material ins Zytoplasma gelangt. Durch Zugabe einer speziellen Nukleofektionslösung kann die DNA dann in den Zellkern gelangen.

Die Nukleofektion wurde entsprechend dem Protokoll von Lonza für adhärenente Zelllinien durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz 1 x 10⁶ Zellen unter der Verwendung von 100 µl der *Solution V* und des Programms T030 mit den Plasmiden transfiziert. Es wurden 0,5 µg Plasmid verwendet. Nach Transfektion wurden die Zellen auf 6-*well*-Platten ausgesät. 24 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel.

3.7 Selektion und Isolation von Einzelzellklonen

Material:

- Selektionsmedium
- Klonierungsringe (Sigma-Aldrich)
- 60 mm-Zellkulturplatten (Sarstedt)

Das Basisplasmid pcDNA3.1 enthält ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Zeocin, so dass erfolgreich transfizierte Zellen selektiert werden können. 48 Stunden nach Transfektion wurde mit der Selektion der Zellen begonnen. Dazu wurde FHM durch Selektionsmedium ersetzt. Die Selektion dauerte 6 Wochen. Zur Isolierung von Einzelzellklonen wurden je 100, 200 und 400 selektierte Zellen auf 60 mm-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 2 bis 3 Wochen wurden aus einzelnen Zellen entstandene Kolonien mit Klonierungsringen aufgenommen und expandiert. Die Expansion und die anschließende Kultivierung der Einzelzellklone erfolgte stets in Selektionsmedium.

3.8 DNA-Extraktion und Zeocin-PCR zum Nachweis von L-gp130

Material:

- *Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen)
- Photometer: BioPhotometer 6131 (Eppendorf AG)
- Mastermix: *Platinum PCR Super Mix* (Invitrogen)
- Primer (Eurofins MWG Operon)

für Zeocin:	pcDNA ZeoF:	5' - GGA CTT CGT GGA GGA CGA C – 3'
	pcDNA ZeoR:	5' - CAC GAC CTC CGA CCA CTC – 3'
für β -Actin:	Actin F:	5' - GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA – 3'
	Actin R:	5' - GTC AGG CAG CTC GTA GCT CT – 3'

- Agarose (Invitrogen)
- Ethidiumbromid (10 mg/ml; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- TAE Puffer (40 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 20 mM Eisessig)
- *Gene Ruler Low Range DNA Ladder* (Fermentas)
- *6x Orange Loading Dye* (Fermentas)

Für die DNA-Extraktion wurden die Zellen trypsiniert, bei 4°C und 300 x g für 3 Minuten zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die DNA wurde dann nach dem Protokoll des Herstellers mit dem *Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit* extrahiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte im Photometer. Für die PCR wurden 22,5 µl des *Platinum PCR Super Mix*, je 1 µl der Primer in einer Konzentration von 50 pmol/µl und 1 µl DNA in einer Konzentration von etwa 25 ng/µl verwendet. Die PCR lief für 35 Zyklen bei folgendem Programm:

- Initiale Denaturierung	94°C	2 Minuten
- Denaturierung	94°C	30 Sekunden
- Annealing	58°C	30 Sekunden
- Extension	72°C	1 Minute

Für die Gelelektrophorese der DNA wurde ein 2%-iges Agarosegel gegossen, indem 2 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer vorsichtig unter Aufkochen in der Mikrowelle erhitzt und so gelöst wurde. Nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid wurde die Agaroselösung auf einen Gelschlitten gegossen, um dort zu polymerisieren. 20 µl der Proben wurden dann mit 4 µl *Loading Dye* angesetzt und in dem Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der *GeneRuler Low Range* verwendet.

3.9 Proteinextraktion und Proteinbestimmung

Material:

- BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Woburn, MA, USA)
- Ultra Microplate Reader EL 808 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)
- Ultraschall-Homogenisator Sonoplus (Bandelin, Berlin, Deutschland)
- 21 G Kanülen (BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Die Proteinextraktion wurde mit RIPA-Puffer durchgeführt.

RIPA-Puffer enthält:

1x PBS	49,5 ml
Igepal CA-630 (1%)	0,5 ml

Sodium deoxycholate (0,5% w/v)	250 mg
SDS (0,1% w/v)	50 mg
Proteaseinhibitor (<i>Complete mini protease inhibitor cocktail tablets</i> ; Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)	

Etwa 5×10^6 Zellen wurden mit 0,3 ml RIPA-Puffer (4°C) mit frisch hinzugefügtem Proteaseinhibitor (1 Tablette auf 10 ml) resuspendiert, durch eine Spritze auf- und abgezogen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 Sekunden 4 mal bei 10% *Power* sonifiziert und bei 10.000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände, die die Proteine enthalten, wurden weiterverwendet bzw. bei -80°C eingefroren. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine der 1:5 und 1:10 verdünnten Proben erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce Biotechnology nach Herstellerangaben bei 540 nm auf dem Microplate Reader.

3.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Material:

- Gelkammer (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland)
- *Prestained Protein Ladder* 6-181 kDa (Invitrogen)
- *Cruz Marker MW Standards* (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)

- Trenngel (10%):

40% Acrylamid	4,7 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8; 0,4% SDS)	3,75 ml
Aqua dest.	6,25 ml
10% SDS	150 µl
10% Ammoniumpersulfat (APS)	150 µl
TEMED	7,5 µl

- Sammelgel: (4%):

40% Arylamid	500 µl
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8; 0,4% SDS)	1,25 ml
Aqua dest.	3,2 ml

10% SDS	50 μ l
10% APS	50 μ l
TEMED	10 μ l

- Elektrophoresepuffer (10 x):

TRIS base	15 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
ad 500 ml Aqua dest.	

- Auftragspuffer (5 x):

TRIS base	150 mg
SDS	500 mg
Bromphenolblau	25 mg
Glycerol	2,5 ml
DTT	386 mg

Die Elektrophorese erfolgte in einem 10%-igen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel in einer *Mini Protean* Elektrophorese Zelle. Zur Polymerisierung der Gele wurden kurz vor dem Gießen TEMED und APS hinzugegeben, die die Radikalbildung initiieren bzw. die Startradikale für die Polymerisation liefern. Durch das enthaltene SDS werden die Ladung der denaturierten Proteine maskiert und durch das SDS negativ geladen, so dass eine elektrische Auftrennung anhand der Proteingröße erfolgen kann, da die Mobilität von Proteinen im SDS-Gel linear mit dem Logarithmus ihrer molaren Masse korreliert. Es wurden jeweils 40 μ g Protein eingesetzt und mit Aqua dest. und 5 x Auftragspuffer (4 μ l) auf 20 μ l aufgefüllt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 3 Minuten bei 90°C denaturiert und wieder auf Eis abgekühlt. Die Proteine wurden zunächst in dem 4%-igen Sammelgel gesammelt. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 70 V für 10 Minuten. Die Trennung der Proteine über das Trenngel erfolgte schließlich bei 210 V für 60 Minuten. Als Molekulargewichtsmarker dienten der *Prestained Protein Ladder* und der *Cruz Marker*.

3.11 Western Blot

Material:

- Blotkammer (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
- Filterpapier
- 0,45 µm Nitrozellulosemembran (Bio-Rad Laboratories)

- Transferpuffer:

TRIS base	5,82 g
Glycin	2,94 g
SDS	0.38 g
Methanol	200 ml
Ad 1 l Aqua dest.	

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine für Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Proteine auf eine Membran übertragen. Dazu wurde eine Membran aus Nitrozellulose mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Zwischen einem äußeren dicken und inneren dünnen Filterpapier lag die Membran unter dem Gel. Die Kathode der Blotkammer war dementsprechend oben, die Anode unten. Die Filterpapiere, das Gel und die Membran wurden vor dem Transfer 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurde eine Stromstärke von 85 mA für 2 Stunden angelegt.

3.12 Immundetektion

Material:

- Waschpuffer (10 x):

NaCl	45 g
1 M TRIS-HCL, pH 8,0	50 ml
ad 500 ml Aqua dest.	

Für 1 x Waschpuffer wurden 100 ml des 10 x Waschpuffers mit 900 ml Aqua dest. verdünnt und 500 µl Tween-20 dazugegeben.

- Blockpuffer:

1 x Waschpuffer 50 ml

Milchpulver 2,5 g

- ECL-Reagenz: Super Signal West Dura (Pierce Biotechnology)

- Antikörper (Santa Cruz Biotechnology):

Primärantikörper:

Phospho-Stat3 (Tyr705) (sc-9131)

Phospho-p44/42 MAPK (sc-9101)

Aktin (C2) (sc-8432)

Sekundärantikörper:

goat-anti-rabbit (sc-2030/)

goat-anti-rabbit (sc-7074)

goat-anti-mouse (sc-2031)

- Stripping Puffer:

10 M NaOH 2,0 ml

Aqua dest. 98 ml

- Schüttler (GFL – Gesellschaft für Labortechnik)

- 50 ml Röhren (Sarstedt)

- Röhren-Roller (Stuart Roller Mixer SRT6; Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK)

Die Membranen wurden für 1 Stunde bei leichtem Schütteln in Blockpuffer bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurden die Membranen in einem 50 ml Röhren mit dem Primärantikörper (1:200 bis 1:1000 in 5 ml Blockpuffer bzw. 1 x Waschpuffer mit 5% BSA je nach Herstellerangaben) über Nacht bei 4°C auf einem Röhren-Roller inkubiert. Nach 3-maligen Waschen mit 1 x Waschpuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler, wurden die Membranen drehend für 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur in einem 50 ml Röhren inkubiert. Es erfolgte erneut ein 3-maliges Waschen. Für die Detektion wurden jeweils 1,5 ml des ECL-Reagenz I und II gemischt und die Membran für 5 Minuten in einem 50 ml Röhren drehend inkubiert. Anschließend fand die Detektion der Banden auf einem Röntgenfilm statt. Für die Immundetektion derselben Membran mit weiteren Antikörpern wurde die Membran gestrippt. Dazu wurde nach 10 Minuten Inkubation bei 70°C in Stripping Puffer die Membran mehrmals gründlich mit 1 x Waschpuffer gewaschen bevor sie wieder verwendet werden konnte.

3.13 RNA-Extraktion und reverse Transkription

Material:

- β -Mercaptoethanol (Bio-Rad Laboratories)
- 96 – 100% Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 21 G Kanüle (BD Microlance)
- *NucleoSpin RNA II Kit* (Machery-Nagel)
- *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche)

Zur Homogenisierung des Zellpellets, aus dem die RNA gewonnen werden sollte, wurde eine 21 G Kanüle verwendet. Die RNA-Extraktion erfolgte dann nach dem *NucleoSpin RNA II Kit* Protokoll, das auch einen DNA-Verdau beinhaltet. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe des Photometers bestimmt, so dass für die Generierung von cDNA die gleichen RNA-Konzentrationen (1 μ g) verwendet werden konnten. Die folgende reverse Transkription wurde mittels des *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* Protokolls durchgeführt.

3.14 qRT-PCR für Cyclin D1

CyclinD1 ist ein Zielgen des IL-6-Signalwegs. So bindet STAT3 u. a. an den CyclinD1-Promotor und reguliert die Expression. CyclinD1 spielt in der Zelle eine wichtige Rolle, indem es den Zellzyklus fördert. Aufgrund einer erhöhten Expression in zahlreichen Tumoren wurde CyclinD1 auch als Onkogen beschrieben. (Tashiro *et al.* 2007) Wird der IL-6-Signalweg gestört, z. B. indem die STAT3-Aktivierung blockiert wird, so kann eine verminderte Expression von Cyclin D1 detektiert werden. (Won *et al.* 2010)

Material:

- *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* (Qiagen)
- *QuantiTect Primerassay Cyclin D1* (Qiagen)
- 384-Well-Platten (Sarstedt)
- Thermocycler (ABI Prism 7900H Thermocycler; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)
- PCR-reines Wasser (Sigma-Aldrich)

Nach Extraktion der Gesamt-RNA und reverser Transkription wurde die cDNA in die quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR) eingesetzt, um die Expression von Cyclin D1 zu detektieren. Dazu wurden pro Ansatz 5 µl 2 x *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*, 1 µl 10 x *QuantiTect Primerset*, 3 µl Aqua bidest. und 1 µl cDNA in einer Konzentration von 10 ng/µl verwendet. Die PCR lief nach der Polymeraseaktivierung für 15 Minuten bei 94°C für 40 Zyklen:

- Denaturierung	94°C	15 Sekunden
- Annealing	55°C	30 Sekunden
- Extension	72°C	30 Sekunden

Als Referenz wurden vier Referenzgene verwendet und zum sogenannten *Basket housekeeper* zusammengefasst: TATA-Bindungsprotein (TBP), ribosomales Protein L13a (RPL), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und β-2-Microglobulin (B2M). Die relative Expression von Cyclin D1 wurde dann mit einem effizienzkorrigiertem Modell relativ quantifiziert ($E^{\Delta Ct [\text{CyclinD1}]} / E^{\Delta Ct [\text{basket housekeeper}]}$). Dazu war in früheren Experimenten der Arbeitsgruppe die PCR-Effizienz (E) für jedes Primerpaar ermittelt worden.

3.15 Analyse der Zellproliferation und Serumabhängigkeit

Die Analyse der Zellproliferation erfolgt mittels einer kolorimetrischen Bestimmung vitaler Zellen, die in der Lage sind, MTS-Tetrazolium intrazellulär in Formazan zu reduzieren. Das ins Medium abgegebene und lösliche Formazan kann bei einer Absorption von 490 nm detektiert werden. Die Farbintensität des Formazans ist dann direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen.

Material:

- *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, WI, USA)
- 96 *Well*-Mikrotiterplatte (Thermo Scientific)
- *Ultra Microplate Reader EL 808* (BioTek Instruments)

Auf 96-*Well*-Platten wurden 5000 bzw. 10.000 Zellen in 100 µl FHM je *Well* ausgesät. 24 Stunden später wurde das Medium gewechselt und durch Medium mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen oder Medium mit IL-6 ersetzt. Über einen Zeitraum von 6 Tagen

wurden jeden Tag 20 µl der *CellTiter* 96 Lösung auf je 8 *Wells* gegeben, 1 Stunde bei 37°C dunkel inkubiert und dann die Absorption bei 490 nm im *Microplate reader* gemessen.

3.16 Induktion von oxidativem Stress

Material:

- 500 µM Wasserstoffperoxid (H₂O₂; Sigma-Aldrich, Stammlösung 10 mM)
- 5 µM *Buthionine Sulfoximine* (BSO; Sigma-Aldrich, Stammlösung 300 µM)

Um in den Zellen oxidativen Stress auszulösen, wurden sie für 90 Minuten mit 5 µM BSO und 400 µM H₂O₂ behandelt. Dabei verhindert BSO den Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), indem es zur Depletion von Glutathion führt.

3.17 Detektion von oxidativem Stress

Zur Detektion von ROS wurde 5-(und 6)-*carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate* (Carboxy-H₂DCFDA) verwendet. Diese nicht-fluoreszierende Substanz wird von den Zellen aufgenommen und in den Zellen von unspezifischen Esterasen deacetyliert (zu Carboxy-DCFH) und anschließend durch ROS oxidiert. Das entstandene Carboxy-DCF fluoresziert und kann mittels Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence activated cell sorting*) detektiert werden.

Material:

- Carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen, Stammlösung 10 mM in DMSO)
- *Hanks balanced salt solution* (HBSS; Invitrogen)
- Zellsieb (70 µm; BD Biosciences)
- FACS-Gerät (LSR II; BD Biosciences)

Es wurden 0,25 x 10⁶ Zellen in T25 ausgesät. Bei einer Konfluenz von 50 – 80% wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln mit 25

μM Carboxy- H_2DCFDA (in HBSS) inkubiert. Danach wurde die Inkubation durch 2-maliges Waschen mit HBSS beendet und die Zellen anschließend für 90 Minuten bei 37°C im Dunkeln mit $400 \mu\text{M}$ H_2O_2 und $5 \mu\text{M}$ BSO behandelt, um oxidativen Stress zu induzieren. Schließlich wurden die Zellen geerntet, durch ein Zellsieb ($70 \mu\text{m}$) gegeben, einmal mit PBS gewaschen und für die FACS-Analyse in $200 \mu\text{l}$ PBS resuspendiert.

3.18 Kontaktinhibition bzw. Zellzyklusanalyse

Propidiumiodid interkaliert in die DNA, sodass durch die Farbintensität des Propidiumiodids der DNA-Gehalt der Zelle ermittelt und zwischen den unterschiedlichen Zellzyklusphasen unterschieden werden kann.

Material:

- Zellsieb ($70 \mu\text{m}$; BD Biosciences)
- 70% Ethanol (-20°C ; Merck)
- Färbelösung ($50 \mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid (Sigma-Aldrich) und 500 U/ml RNaseA in PBS (Sigma-Aldrich))
- FACS-Gerät (LSR II; BD Biosciences)

1×10^6 Zellen wurden bei etwa 40 – 60%igen Konfluenz und 1 Tag nachdem sie 100%-ige Konfluenz erreicht hatten geerntet. Anschließend wurden sie durch ein Zellsieb gegeben, bei $500 \times g$ für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $0,5 \text{ ml}$ PBS resuspendiert. Unter Schwenken wurden 5 ml Ethanol tröpfchenweise zugefügt und die Zellen für 2 Stunden auf Eis stehen gelassen. Für die Färbung der DNA und anschließende Zellzyklusanalyse wurden die Zellen in 5 ml PBS rehydriert, abzentrifugiert und erneut mit PBS gewaschen und wieder zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in $0,5 \text{ ml}$ Färbelösung resuspendiert und 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach erfolgter FACS-Analyse konnten mit der Analysesoftware Flow-Jo (Tree Star, Inc. 1997 - 2012) schließlich die DNA-Histogramme ausgewertet und der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bestimmt werden.

3.19 Softagarassay

Der Softagarassay, ein etablierter *in vitro* Marker für Malignität, dient der Untersuchung auf verankerungsunabhängiges Wachstum der Zellen in Softagar.

Material:

- Agarose (Invitrogen)
- 60 mm-Zellkulturschalen (Sarstedt)

Für diesen Test wurden je 15000 Zellen in 0,33%-igem Agar verdünnt und auf eine 0,5%-ige Agarschicht in Zellkulturschalen (60 mm Durchmesser) ausgesät. Das Koloniewachstum wurde nach 3 Wochen mikroskopisch durch Auszählen der Kolonien quantifiziert.

3.20 qRT-PCR für p21

Der CDK-Inhibitor 1, auch p21 genannt, inhibiert Cyklin-abhängige Kinasen und ist damit wesentlich an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Eine gesteigerte Expression von p21 führt zu einem Zellzyklusarrest. Aufgrund der Fähigkeit die Proliferation von Zellen zu inhibieren, hat p21 tumorsuppressive Funktionen. Einige Onkogene supprimieren p21 und treiben so Zellwachstum und Tumorgenese (Gartel *et al.* 2005).

Material:

- *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* (Qiagen)
- *QuantiTect Primerassay für p21* (Qiagen)
- 384-Well-Platten (Sarstedt)
- Thermocycler (ABI Prism 7900H Thermocycler; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)
- PCR-reines Wasser (Sigma-Aldrich)

Die Zellen wurden zuvor mit 400 μM H_2O_2 und 5 μM BSO für 90 Minuten bei 37°C behandelt, um oxidativen Stress auszulösen. Die negativen Kontrollen blieben unbehandelt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach weiteren 7 Stunden. Nach Extraktion der Gesamt-RNA und reverser Transkription wurde die cDNA in die quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR)

eingesetzt, um Veränderungen in der Expression von p21 zu detektieren. Die Durchführung und Auswertung erfolgte wie in 2.14 beschrieben.

3.21 PCR-Array

Der *Human Oxidative Stress and Antioxidant Defense RT² Profiler*TM PCR Array erstellt im Rahmen einer quantitativen *real time*-PCR ein Genexpressionprofil von 84 definierten Genen, die in Abwehr von oxidativen Stress und Reparatur von DNA-Schäden involviert sind. Zusätzlich sind Primersets für Referenzgene sowie RNA- und qPCR-Kontrollen enthalten. Der Array bietet Platz für vier Proben.

Material:

- *RT² Profiler*TM PCR Array (PAHS-065; Qiagen)
- Thermocycler (ABI Prism 7900H Thermocycler; Applied Biosystems)

Die RNA-Extraktion und das Umschreiben in cDNA erfolgte wie oben beschrieben. Die gewonnene cDNA wurde dann nach Angaben des Protokolls *RT² Profiler*TM PCR Array in die quantitative *real time*-PCR eingesetzt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben.

3.22 Statistik

Die Experimente wurden in der Regel mit mindestens drei separaten Ansätzen durchgeführt und wiederholt. Die ermittelten Werte sind in dieser Arbeit als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Um die Signifikanz der Werte zu testen, wurde der Zweistichproben *t*-Test unter der Annahme gleicher Varianzen verwendet. Ein Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn der errechnete *p*-Wert unter 0,05 lag.

4. Ergebnisse

4.1 Sequenzierung des Inserts L-gp130

Um das Expressionsplasmid L-gp130 zu überprüfen, wurde das Insert des Plasmids von der Firma MWG Eurofins ansequenziert. Die Sequenz für L-gp130 konnte so bestätigt werden (Sequenz siehe Anhang).

4.2 Zeocin-PCR zum Nachweis der Plasmid-DNA

Nach Transfektion von FH-hTERT mit pcDNA3.1 als Kontrolle und pcDNA3.1 L-gp130 wurden die Zellen zunächst mit Geneticin bzw. Zeocin selektiert. Nach Selektion wurden insgesamt sieben L-gp130-Einzelzellklone aufgenommen und expandiert. Die Einzelzellklone FH-hTERT-L-gp130 werden im Folgenden als Klon 1, 2 usw. bezeichnet. Die negative Kontrolle ist, soweit nicht anders deklariert, FH-hTERT-pcDNA3.1, ebenfalls ein Einzelzellklon. Um zu überprüfen, ob die Transfektion mit L-gp130 erfolgreich verlaufen ist, wurde eine PCR zum Nachweis des Resistenzgens für Zeocin durchgeführt (Abbildung 4). Die zu amplifizierende Gensequenz für Zeocin ist 156 Basenpaare lang. Zur Kontrolle der Amplifikation und der eingesetzten DNA-Menge, wurde in einer zweiten PCR β -Aktin, ein Strukturprotein der Zelle, nachgewiesen. Die zu amplifizierende Gensequenz für β -Aktin hat 540 Basenpaare.

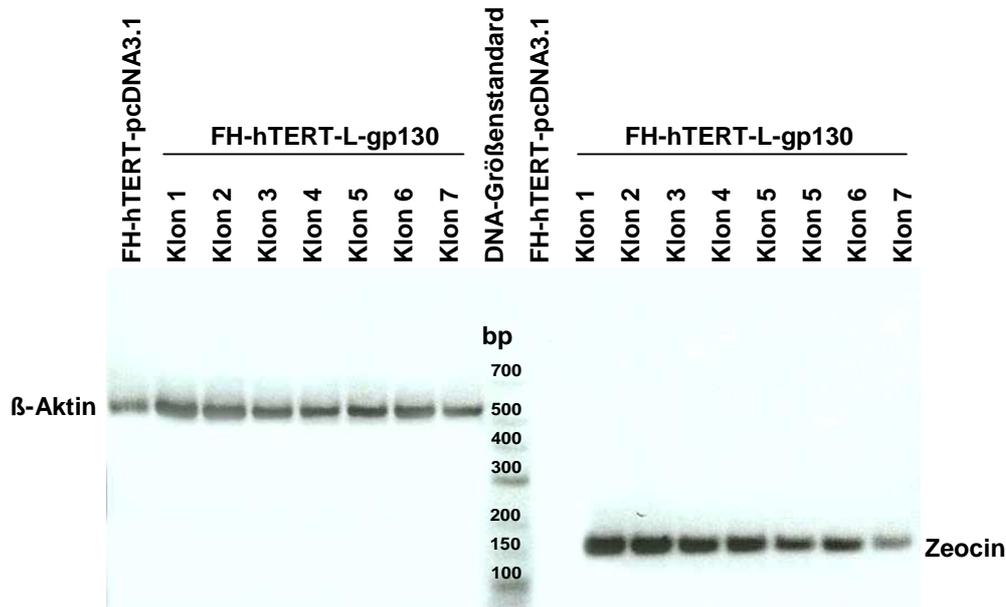


Abbildung 4: Zeocin-Nachweis in einem 2%-igem Agarosegel. Gezeigt sind links neben dem DNA-Größenstandard die spezifischen Banden für β -Aktin und rechts die spezifischen Banden für Zeocin.

Wie in Abbildung 4 zu sehen, zeigen alle Zellklone (Klone 1 – 7) im Gegensatz zu FH-hTERT-pcDNA3.1 eine deutliche Bande bei 156 Basenpaaren. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Klone das Expressionsplasmid L-gp130 enthalten. FH-hTERT pcDNA3.1 enthält ein Resistenzgen für Geneticin und ist demnach in der Zeocin-PCR negativ.

4.3 Immunoblot von P-STAT3 und P-ERK

Im Rahmen der Aktivierung des IL-6-Signalwegs kommt es durch die Phosphorylierung von STAT3 zu dessen Aktivierung und Translokation in den Zellkern. Um zu überprüfen, ob das Konstrukt L-gp130 konstitutiv aktiv ist, wurde ein Immunoblot durchgeführt und die Aktivierung von STAT3 überprüft. Dabei kann das phosphorylierte STAT3 in zwei Formen vorliegen. Die eine Form ist etwa 86 kDa schwer, die andere 79 kDa. Um die Intensität der Banden vergleichen zu können, wurden die Membranen gestrippt und alle gebundenen Antikörper entfernt und schließlich mit einem β -Aktin-Antikörper erneut inkubiert. β -Aktin ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts, das in allen Zellen etwa zu gleichen Mengen

exprimiert wird. So kann überprüft werden, ob gleiche Mengen Protein geladen wurden. Als positive Kontrolle für P-STAT3 wurde HepG2 für 10 Minuten mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert (Abbildung 5).

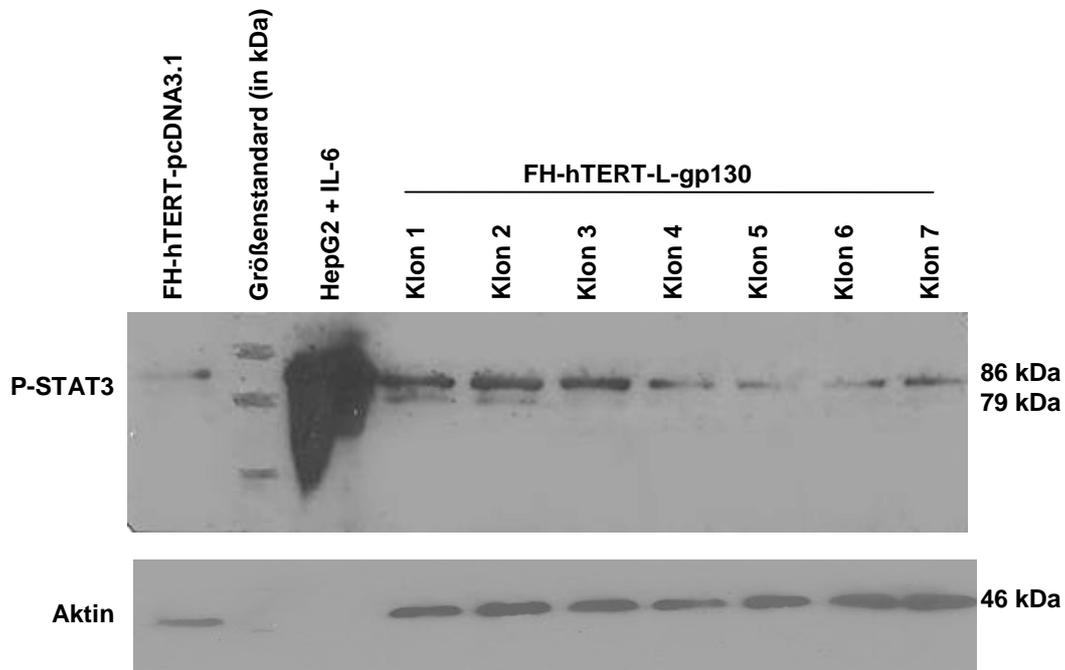


Abbildung 5: Aktivierung von STAT3 in den Einzelzellklonen. Western Blot mit HepG2 (für 10 Minuten mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert) als positive Kontrolle.

Wie in Abbildung 5 zu sehen, zeigt HepG2 als positive Kontrolle nach Stimulierung mit IL-6 ein deutliches Signal. Bei allen sieben Einzelzellklone ist ebenfalls die aktive Form von STAT3 zu erkennen. Im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 haben die Klone 1, 2 und 3 die stärkste Bande für P-STAT3. So kann angenommen werden, dass diese Klone das Konstrukt L-gp130 am stärksten exprimieren. Die Klone 1 bis 3 wurden daher für alle weiteren Experimente ausgewählt.

Um die erfolgreiche Aktivierung des IL-6-Signalwegs in den Zellklonen zu bestätigen, wurde mit den drei Klonen ein weiterer Western Blot durchgeführt. Es wurde die Aktivierung von ERK nachgewiesen. Ebenso wie STAT3 wird ERK im Rahmen der Aktivierung des IL-6-Signalweges phosphoryliert. P-ERK kann in zwei Formen vorliegen. Die eine Form ist 44, die andere 42 kDa schwer. Abbildung 6 zeigt die Doppelbanden für P-ERK, sowie die Banden für Aktin.

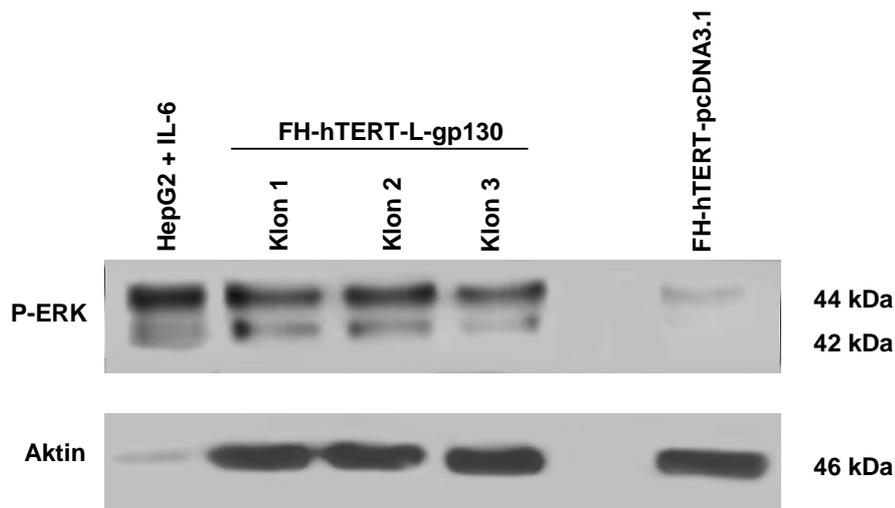


Abbildung 6: Aktivierung von ERK in den Einzelzellklonen. Western Blot mit HepG2 (für 10 Minuten mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert) als positive Kontrolle. Bei den Klonen wurde 20 µg Protein eingesetzt bei den stimulierten HepG2 5 µg.

Die Klone 1 bis 3 sowie die positive Kontrolle HepG2 nach Stimulierung mit IL-6 zeigen wie in Abbildung 6 zu sehen eine deutliche Doppelbande für das Protein P-ERK. Bei FH-hTERT-pcDNA3.1 ist die Bande trotz ähnlicher Proteinnmenge (siehe Aktin-Banden) nur schwach zu erkennen. In den Klonen ist der Signalweg über P-ERK im Vergleich zur Kontrolle also deutlich aktiver.

4.4 qRT-PCR für CyclinD1

Aufgrund der Aktivierung des IL-6-Signalwegs und der nachgeschalteten Signalwege kommt es in der Zelle zur Regulierung zahlreicher Zielgene durch Transkriptionsfaktoren. Zu den Zielgenen gehört u.a. CyclinD1, das bei Aktivierung des Signalwegs hochreguliert wird. Um auf der Ebene der Genexpression die funktionelle konstitutive Aktivierung des Signalweges und somit die Funktionsfähigkeit des überexprimierten aktiven L-gp-130 zu prüfen, wurde die Expression von CyclinD1 gemessen. Dies geschah mittels einer quantitativen *real time*-PCR. Abbildung 7 zeigt die relative Expression des Gens der Klone und der Kontrolle HepG2 als Positivkontrolle in Bezug auf FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1). Es handelt sich hierbei um eine orientierende Einzelbestimmung.

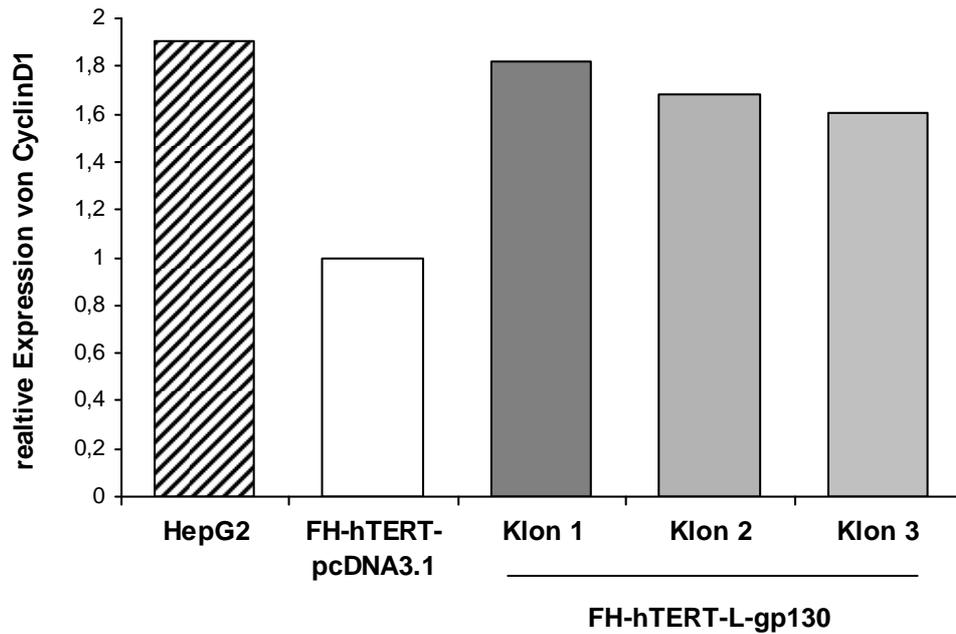


Abbildung 7: Relative Genexpression von CyclinD1 in den Klonen und HepG2 im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

Im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 kommt es bei den Klonen zu einer 1,61-fach (Klon 3) bis 1,82-fach (Klon 1) höheren Expression von CyclinD1.

4.5 Proliferation und Serumabhängigkeit

Mittels einer täglichen kolorimetrischen Bestimmung lebender Zellen wurde die Proliferation der Zellen untersucht (Abbildung 8). Ebenso wurde das Wachstum in Abhängigkeit von Serum überprüft.

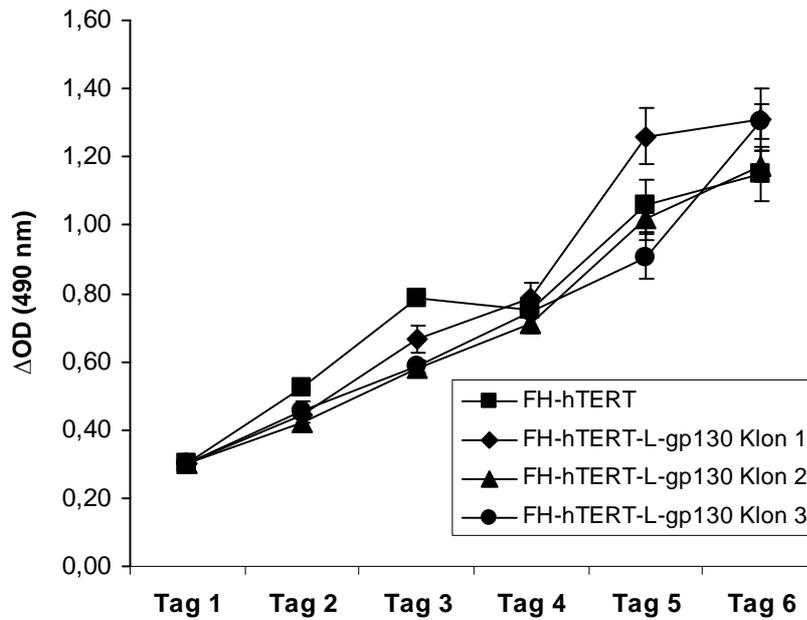


Abbildung 8: Proliferation der Klone und der Kontrolle in normalem Medium. Als Kontrolle diente hier FH-hTERT.

Abbildung 8 zeigt die Proliferation der Klone im Vergleich zur Kontrolle FH-hTERT. An Tag 4 scheint zwischen den Klonen und der Kontrolle kein relevanter Unterschied der Proliferation zu bestehen. Es ist kein signifikanter Unterschied zu berechnen. An Tag 5 zeigt sich lediglich für Klon 1 ein im Vergleich zur Kontrolle und den anderen Klonen erhöhtes Wachstum.

Abbildung 9 zeigt die Serumabhängigkeit der Klone und der Kontrolle. Dazu wurde 24 Stunden nach Aussaat das Medium gewechselt und mit 2% bzw. 0% serumhaltigem Medium ersetzt und das Zellwachstum ebenfalls kolorimetrisch bestimmt. Dargestellt ist die Serumabhängigkeit an Tag 4.

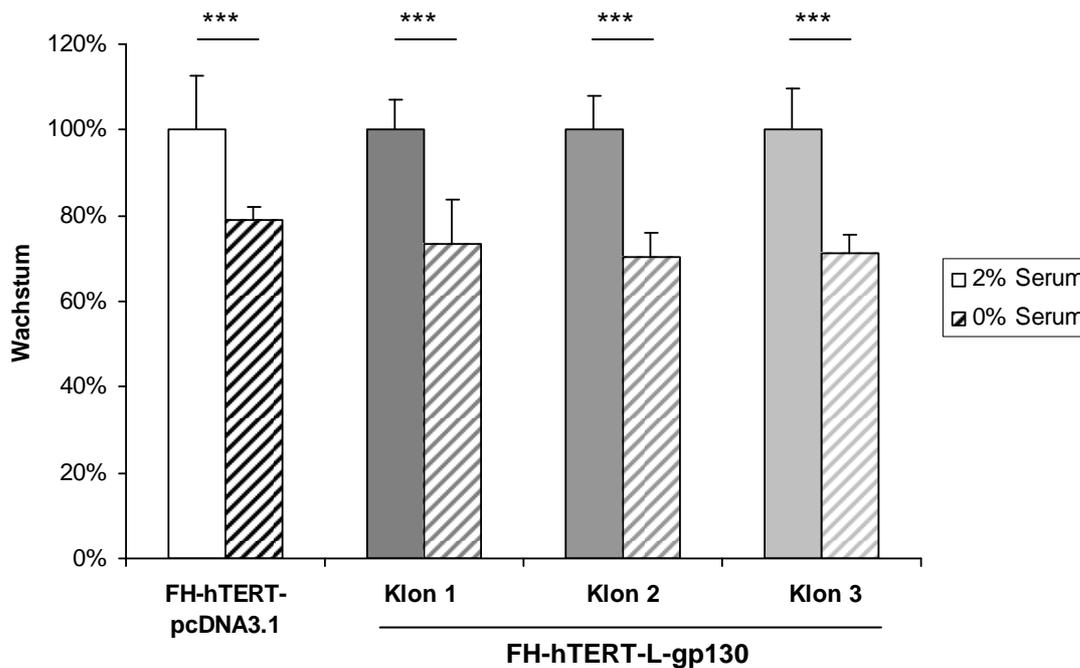


Abbildung 9: Serumabhängigkeit der Klone und der Kontrolle FH-hTERT-pcDNA3.1. Wachstum in % bei 0% Serum im Vergleich zum Wachstum bei 2% Serum an Tag 4 nach Aussaat (Wachstum bei 2% Serum = 100%). $p < 0,001$ (***)

Es zeigt sich bei allen Zellklonen eine signifikante Verminderung des Wachstums ($p < 0,001$), wenn dem Medium kein Serum zugesetzt wurde. Alle Zellklone sind demnach weiterhin abhängig von der Zugabe von Serum zum Zellkulturmedium.

4.6 Zellzyklusanalyse zur Bestimmung der Kontaktinhibition

Bei FH-hTERT kommt es bei 100%-iger Konfluenz vermittelt durch Zell-Zell-Kontakte zu einem Wachstumsstopp. (Wege *et al.* 2003b) Anders ist es bei entarteten Zellen. Die sogenannte Kontaktinhibition kann bei diesen vermindert oder ganz aufgehoben sein. Um die Klone auf Kontaktinhibition zu untersuchen, wurde die DNA der Zellen in der Wachstumsphase bei 40 – 60%-iger Konfluenz und ein bis zwei Tage nach 100%-iger Konfluenz mit Propidiumjodid angefärbt. So konnte anschließend der Anteil der Zellen, die sich in der replikativen S-Phase befinden, verglichen werden (siehe Abbildung 10).

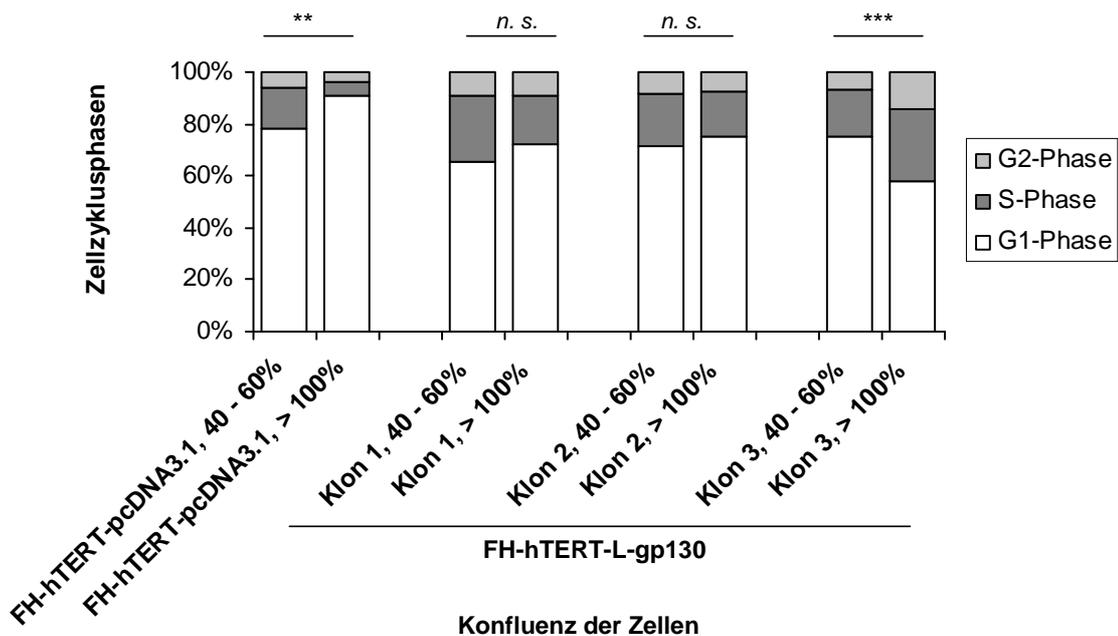


Abbildung 10: Kontaktinhibition der einzelnen Klone. Zellzyklusphasen (in %) der einzelnen Klone und FH-hTERT-pcDNA3.1 bei einer Konfluenz von 40 – 60% bzw. über 100%. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Zu- bzw. Abnahme der S-Phase-Zellfraktion der superkonfluenten Zellen im Vergleich zu den Zellen in der log-Phase (dunkelgrau). $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) und nicht signifikant (n.s.).

Bei den Kontrollen kommt es bei über 100% Konfluenz zu einer Reduktion der Zellzahl, die in S-Phase vorliegen. So ging die Zellzahl der sich in der S-Phase befindenden Zellen bei über 100% Konfluenz im Vergleich zur S-Phase-Zellfraktion in der log-Phase auf 33% zurück. Bei den Klonen 1 und 2 war nur eine Reduktion auf 72% und 81% zu beobachten. Bei Klon 3 hingegen befanden sich bei 100% Konfluenz mehr Zellen in der S-Phase als bei 40 – 60% Konfluenz (Anstieg auf 150%). Dabei war die Abnahme der Zellfraktion, die sich in der S-Phase befindet, nur bei den Kontroll-Zellen signifikant. Die Abnahme der S-Phase-Zellfraktion bei Klon 1 und 2 war statistisch nicht signifikant. Klon 3 zeigte schließlich eine statistisch signifikante Zunahme der S-Phase-Zellfraktion. Die Kontaktinhibition war somit in diesem Klon vollständig aufgehoben.

4.7 Colony Assay

Die Fähigkeit von Zellen auf Softagar verankerungsunabhängig zu wachsen und Kolonien zu bilden ist ein etablierter *in vitro* Marker für Malignität. Der *Colony Assay* wurde direkt nach

Selektion der transfizierten Zellen durchgeführt. Die Einzelzellklone, einschließlich der Kontrolle, wurden dann nach 6 (Passage 8), nach 10 (Passage 21) und nach 32 Wochen (Passage 65) auf verankerungsunabhängiges Wachstum überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Kolonienanzahl mit Standardabweichung bei 5000, 10.000 und 20.000 ausgesäten Zellen auf 60 mm-Zellkulturschalen nach 4 Wochen. Dargestellt ist die Auswertung des *Colony Assays* der Klone nach 6- 10- und 32-wöchiger Kultivierung.

		Anzahl der Kolonien		
		Ausgesäte Zellen	5000	10000
Zell-Passage 8 (6 Wochen)	FH-hTERT-pcDNA3.1	0	0	0
	FH-hTERT-L-gp130 <i>Klon 1</i>	0	0	0
	FH-hTERT-L-gp130 <i>Klon 2</i>	0	0	0
Zell-Passage 21 (10 Wochen)	FH-hTERT-L-gp130 <i>Klon 3</i>	0	0	0
	FH-hTERT-pcDNA3.1	0	0	0
	FH-hTERT-L-gp130 <i>Klon 1</i>	0	0	0
Zell-Passage 65 (32 Wochen)	FH-hTERT-L-gp130 <i>Klon 2</i>	0	0	0
	FH-hTERT-L-gp130 <i>Klon 3</i>	0	0	0
	FH-hTERT-pcDNA3.1	0	2 ± 1,1	0
	FH-hTERT-L-gp130 <i>Klon 1</i>	16 ± 4,2	45 ± 6,5	118 ± 18
Zell-Passage 65 (32 Wochen)	FH-hTERT-L-gp130 <i>Klon 2</i>	28 ± 8,7	67 ± 8	143 ± 9,2
	FH-hTERT-L-gp130 <i>Klon 3</i>	27 ± 6	63 ± 6,6	137 ± 10,5

Direkt nach Selektion konnten keine Kolonien im Softagar beobachtet werden. Auch nach 6- und 10-wöchiger Kultivierung waren die Einzelzellklone nicht in der Lage verankerungsunabhängig zu wachsen. Nach 32 Wochen jedoch, entsprechend 65 Passagen nach Transduktion, hatten alle Klone ein verankerungsunabhängiges Wachstum entwickelt. Bei allen Klonen kam es dabei proportional zur ausgesäten Zellzahl zur Bildung von zahlreichen Kolonien im Softagar. Bei der Kontrolle FH-hTERT-pcDNA3.1 konnten zwei Kolonien nur bei 10.000 ausgesäten Zellen beobachtet werden.

4.8 Detektion von oxidativem Stress

Im Rahmen einer chronischen Leberentzündung entstehen ROS. Diese können schließlich genetische Veränderungen auslösen und eine Transformation begünstigen. Um zu untersuchen wie die Klone auf oxidativen Stress reagieren, wurden zunächst die ROS-Spiegel nach 90-minütiger Behandlung mit H₂O₂ und BSO bzw. ohne Behandlung quantitativ in der Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 11).

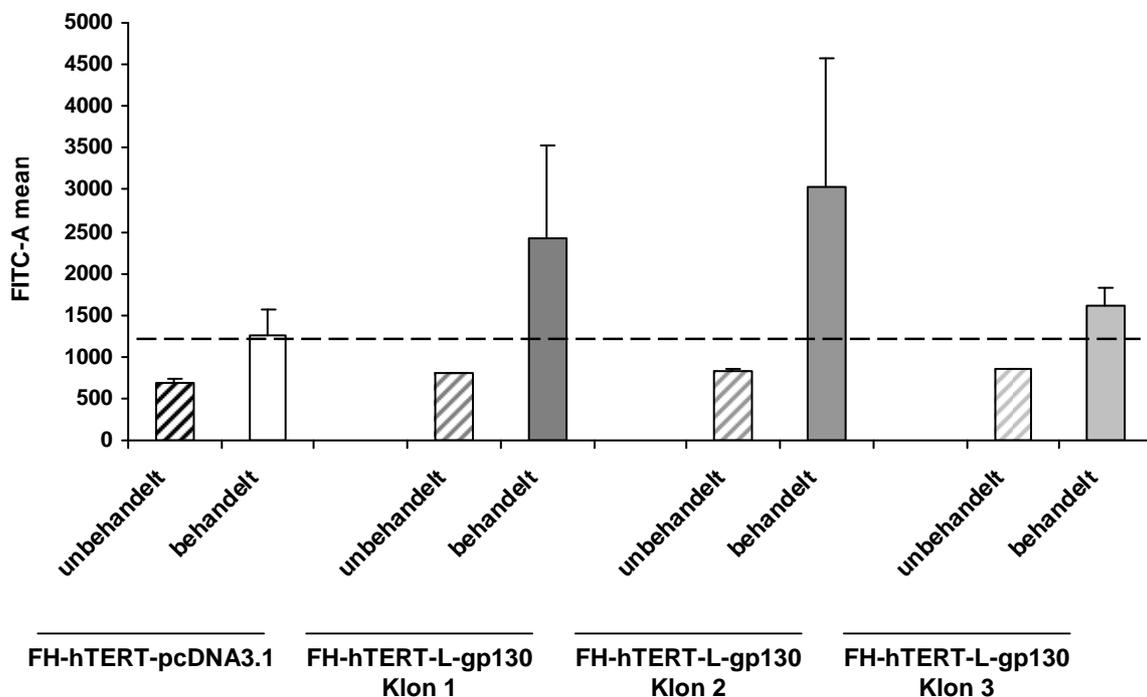


Abbildung 11: Detektion der ROS-Spiegel bei den Klonen und FH-hTERT-pcDNA3.1, ohne bzw. nach Induktion von oxidativem Stress. Für die unbehandelten Klone und unbehandelte Kontrolle (gestrichelte Balken) sowie für die behandelten Klone und die unbehandelte Kontrolle sind die Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

Für die unbehandelten Zellen wurden etwa gleiche Spiegel an oxidativen Stress gemessen. Nach der Behandlung zeigten alle Zellklone eine deutliche Zunahme an detektierbaren ROS. Bei der Kontrolle stieg die Zahl der detektierbaren ROS nach Behandlung im Mittel auf das 1,81-fache (gestrichelte Linie), bei Klon 1 und 2 auf das 3,04- bzw. 3,67-fache, bei Klon 3 auf das 1,91-fache. Dementsprechend fanden sich bei Klon 1 und 2 im Vergleich mit der Kontrolle bei gleicher Behandlung signifikant ($p < 0,01$) mehr ROS. Bei Klon 3 waren im Vergleich zu der Kontrolle nicht signifikant mehr ROS nach Behandlung detektierbar.

4.9 qRT-PCR für p21

p21 ist ein Molekül, das im Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt, indem es Cyclin-abhängige Kinasen hemmt und dadurch einen Zellzyklusarrest induzieren kann. In einer quantitativen *real time*-PCR wurde die Expression von p21 bei den Klonen mit und ohne Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (=1) gemessen (Abbildung 12).

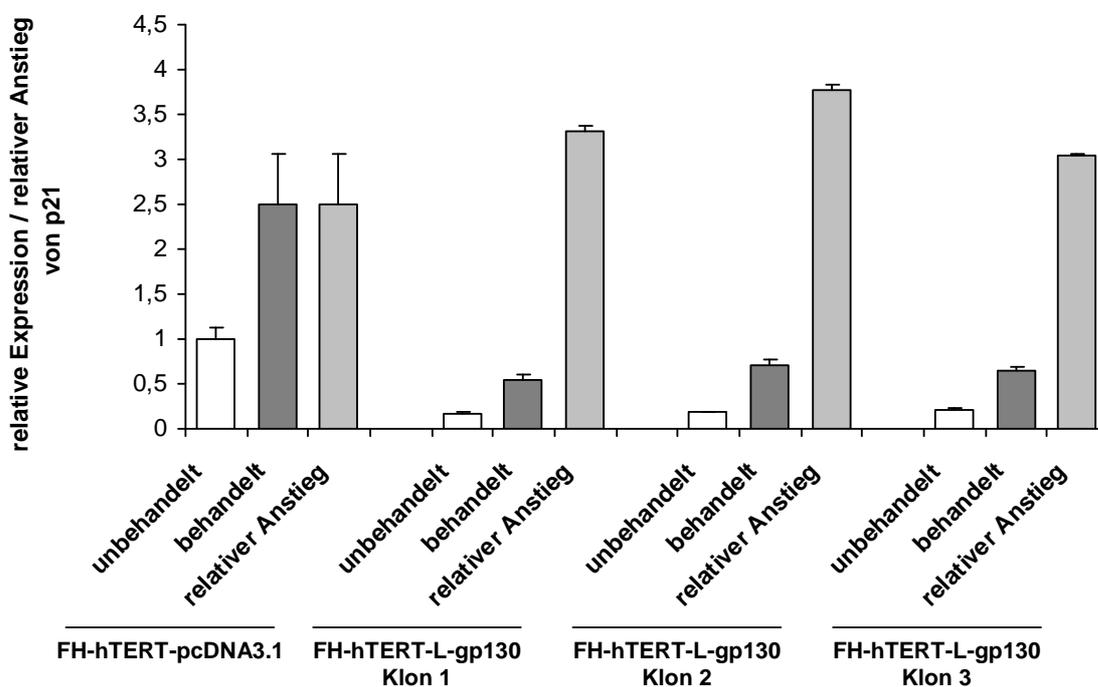


Abbildung 12: Expression von p21 der Klone und von FH-hTERT-pcDNA3.1. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung der unbehandelten Kontrolle und der Klone (weißer Balken), der Kontrolle und der Klone nach Induktion von oxidativem Stress (dunkelgrauer Balken) im Vergleich zu unbehandelten FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1) und die relative Zunahme der Expression von p21 nach Induktion von oxidativem Stress (hellgrauer Balken).

Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle wird p21 in den unbehandelten Klonen nur zu 16 – 21% exprimiert. Damit zeigen die Klone unbehandelt eine signifikant geringere Expression von p21 ($p < 0,01$). Nach Induktion von oxidativem Stress kommt es bei den Klonen zu einer deutlich geringeren Expression als bei der behandelten Kontrolle. Der relative Anstieg der Expression nach Behandlung ist jedoch bei den Klonen und FH-hTERT pcDNA3.1 ähnlich (kein signifikanter Unterschied, $p > 0,05$).

4.10 PCR-Array

Der *Human oxidative stress and antioxidant defense RT² Profiler™* PCR Array wurde durchgeführt um Unterschiede in der Expression von Genen, die an der Abwehr von oxidativem Stress beteiligt sind, zwischen den Klonen und der Kontrolle zu ermitteln. Zu sehen sind in den Abbildungen 13 A-K die Gene, deren Expression mit dem verwendeten PCR Array untersucht wurden. Dargestellt ist die relative Expression in den Klonen im Vergleich zur Kontrolle FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1) (waagrechte schwarze Linie). Die Abbildungen 13 A-D sind Untergruppen der Antioxidantien, die Abbildungen E-K sind Untergruppen von Genen, die in den ROS-Stoffwechsel involviert sind. Eine Liste der Gene befindet sich im Anhang.

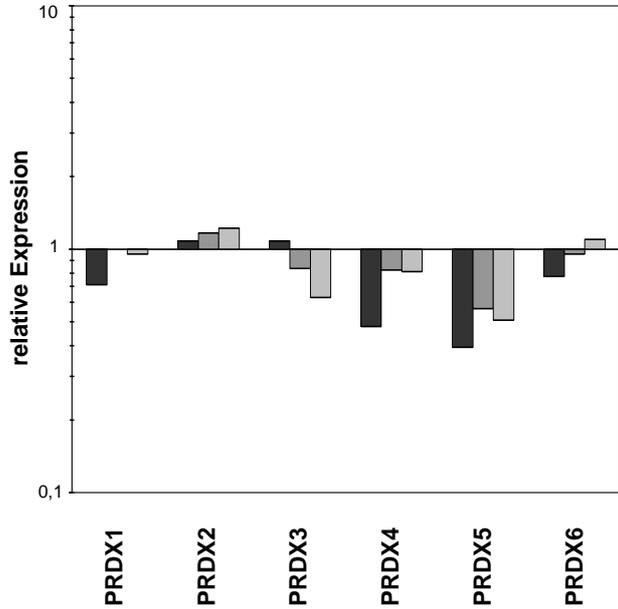
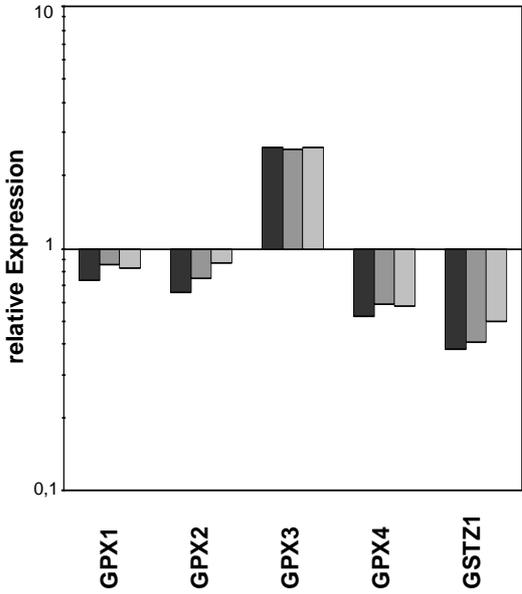


Abbildung 13 A: PCR-Array, Glutathion-Peroxidasen. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

Abbildung 13 B: PCR-Array, Peroxiredoxine. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

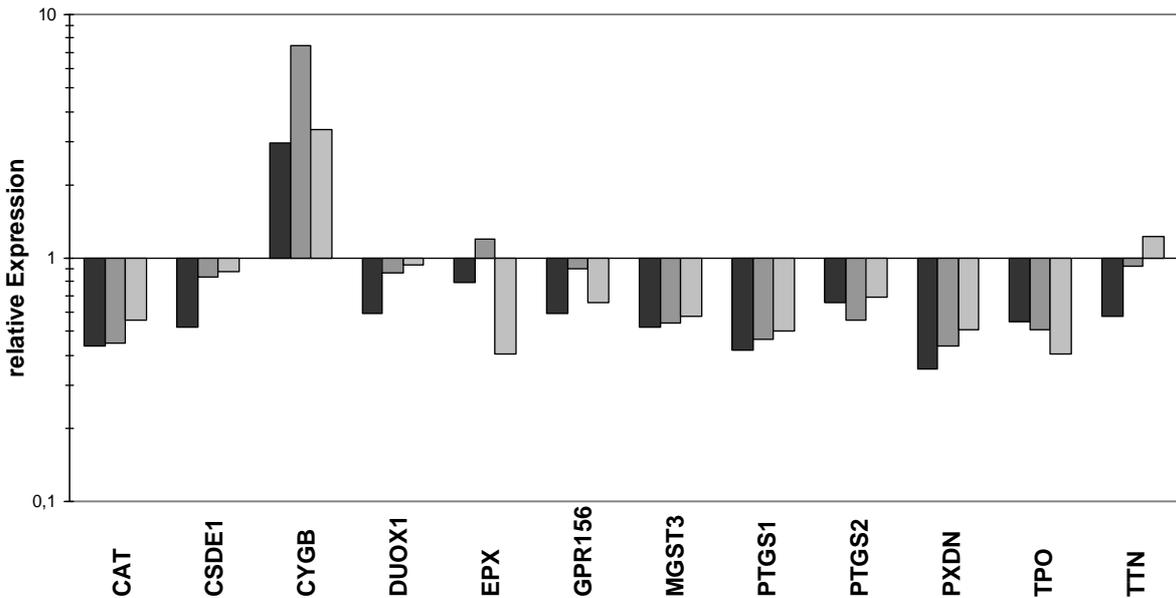


Abbildung 13 C: PCR-Array, andere Peroxidasen. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

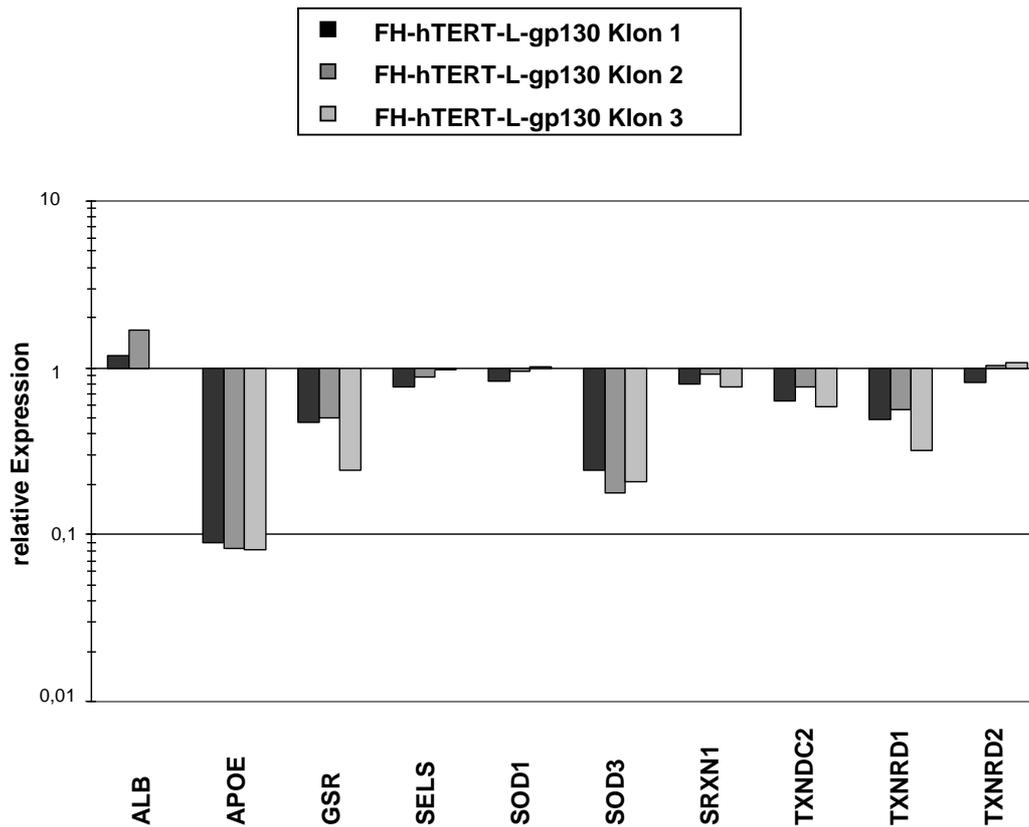


Abbildung 13 D: PCR-Array, andere Antioxidantien. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

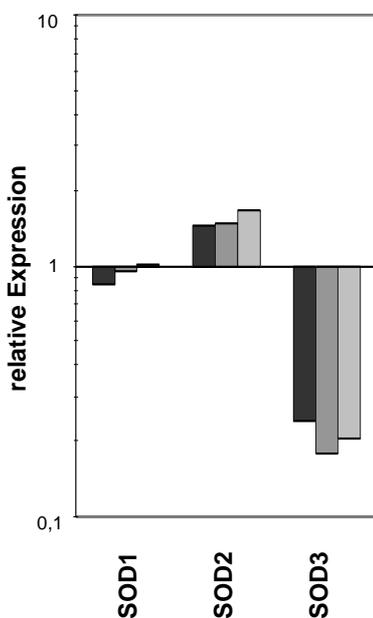


Abbildung 13 E: PCR-Array, Superoxid-Dismutasen. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

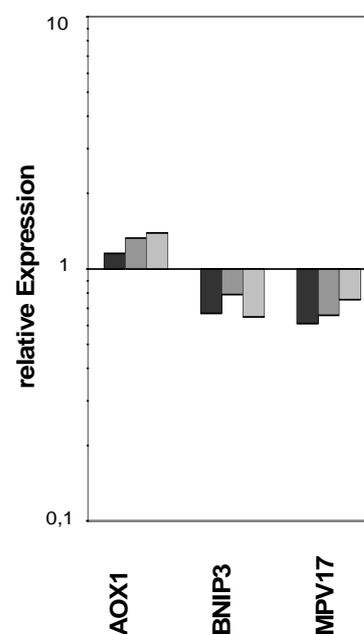


Abbildung 13 F: PCR-Array, andere Gene involviert in ROS. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

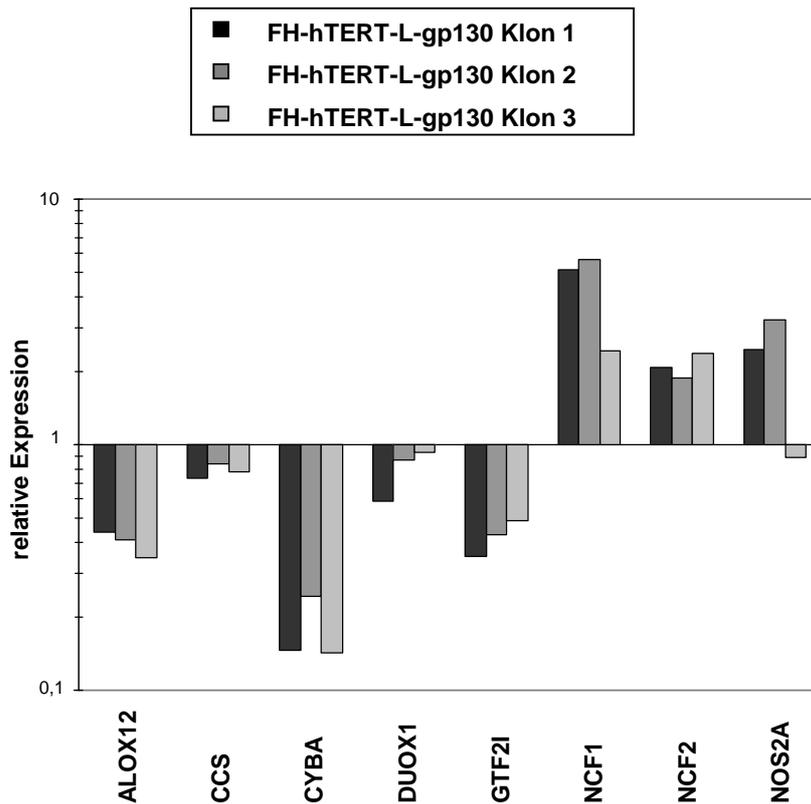


Abbildung 13 G: PCR-Array, in den Superoxid-Stoffwechsel involvierte Gene. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

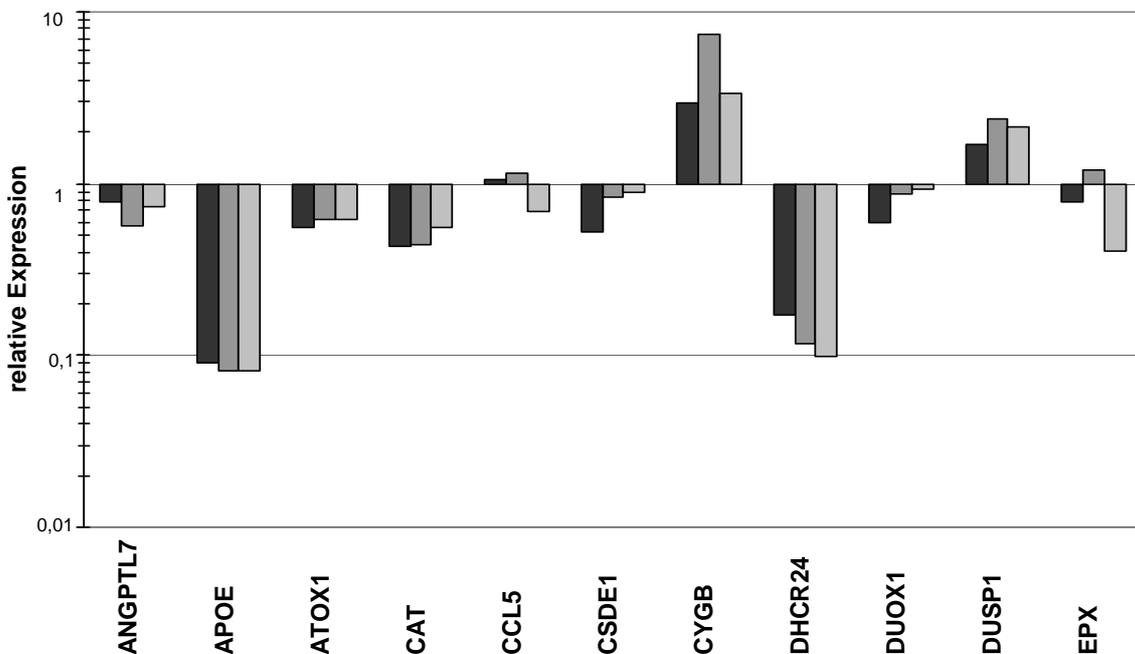


Abbildung 13 H: PCR-Array, auf oxidativen Stress responsive Gene, Teil 1. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

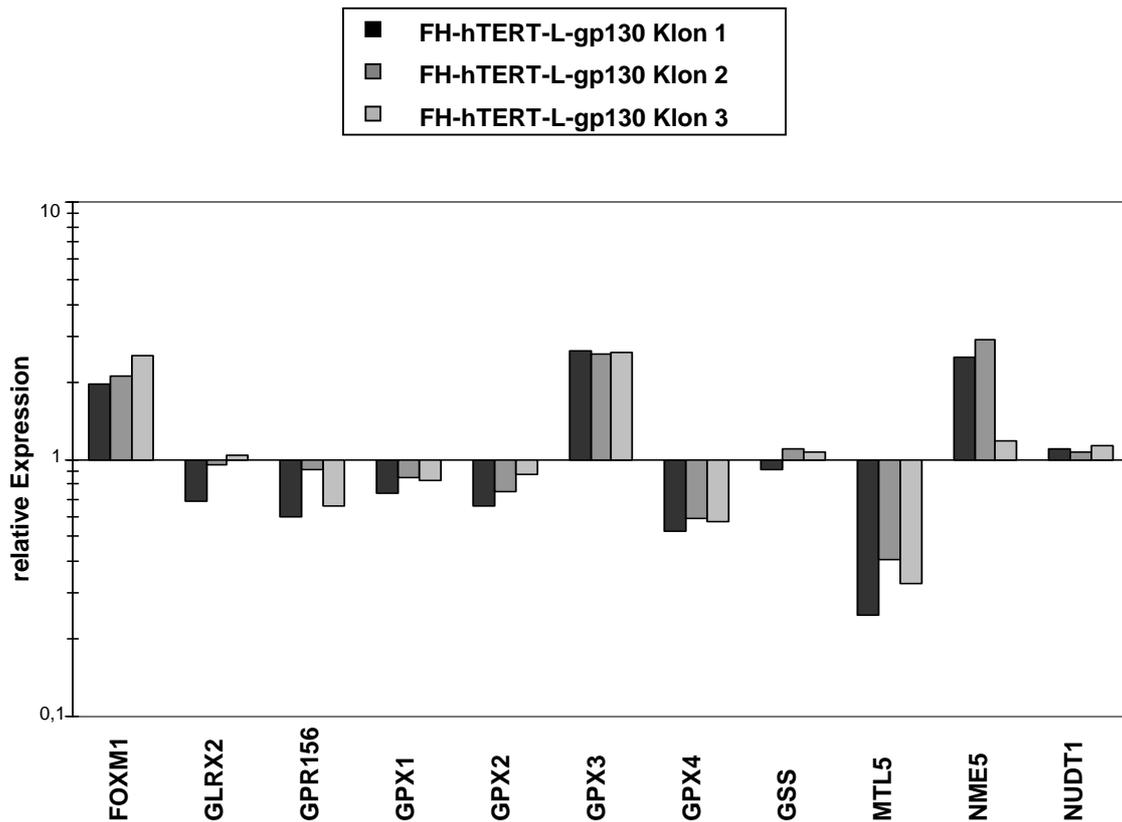


Abbildung 13 I: PCR-Array, auf oxidativen Stress responsive Gene, Teil 2. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

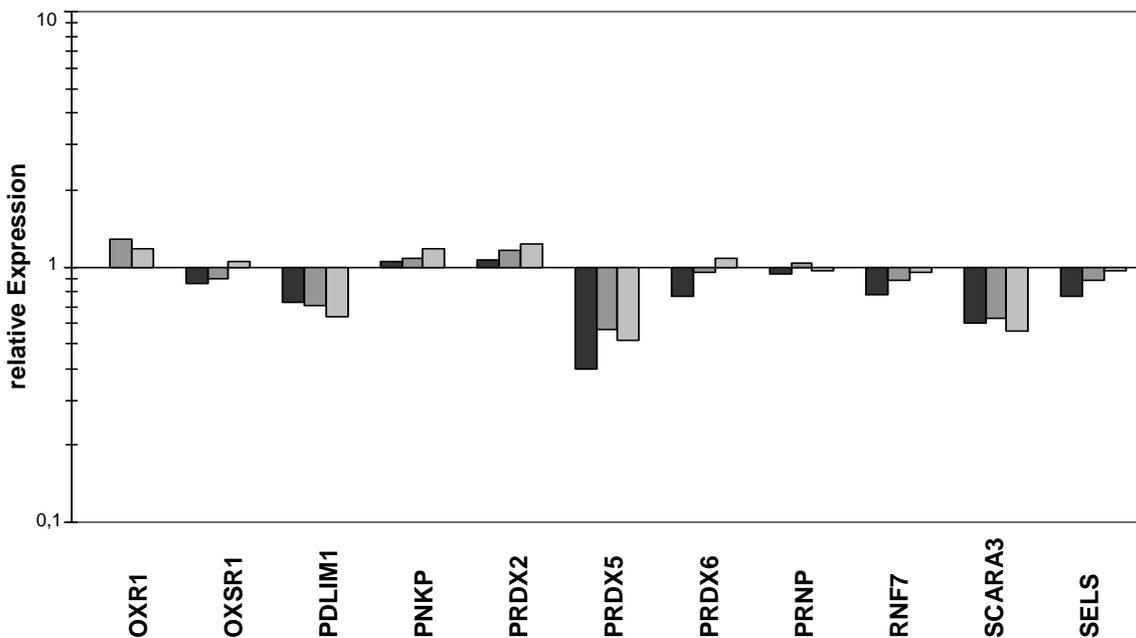


Abbildung 13 J: PCR-Array, auf oxidativen Stress responsive Gene, Teil 3. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

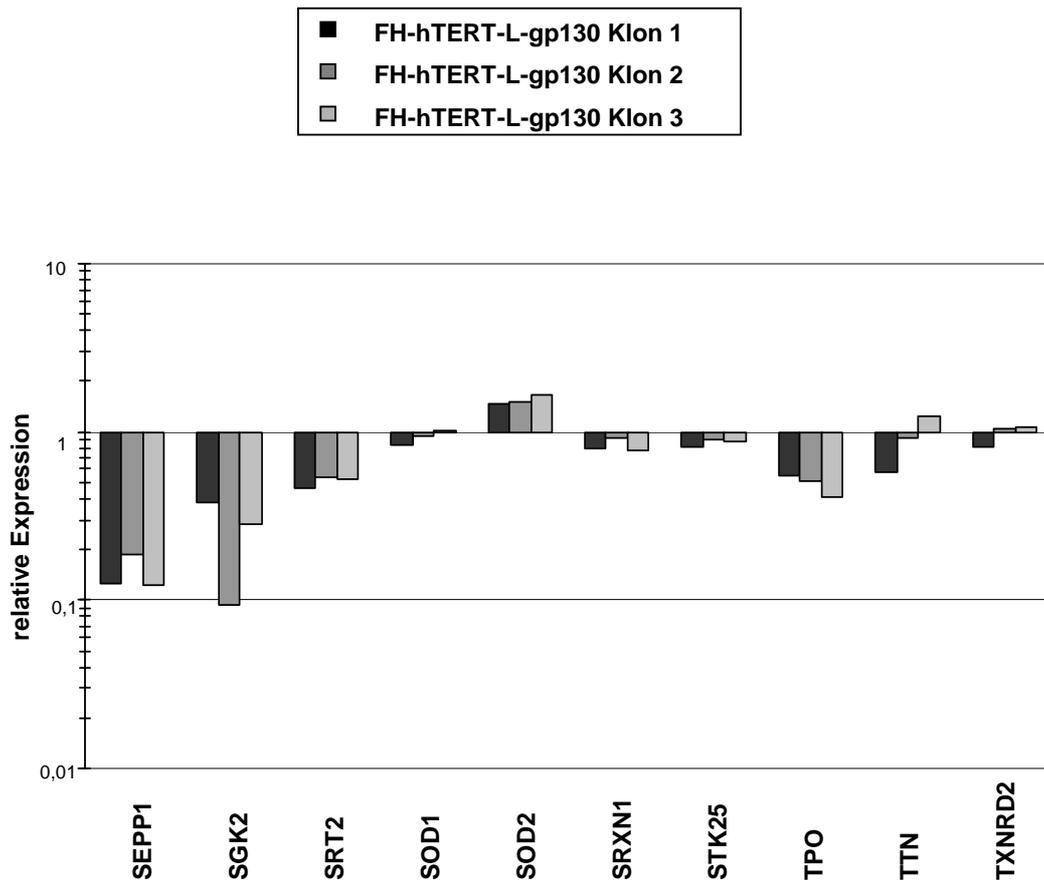


Abbildung 13 K: PCR-Array, auf oxidativen Stress responsive Gene, Teil 4. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression in den Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 (=1).

Für die meisten Gene zeigen sich kohärente Ergebnisse, d.h. die Gene wurden bei allen Klonen im Vergleich zu FH-hTERT-pcDNA3.1 entweder vermehrt oder vermindert exprimiert. Einige Gene wurden erst sehr spät amplifiziert (Ct-Wert über 35), sodass bei diesen Genen von ungenauen Werten ausgegangen werden muss und diese deshalb nicht in die Abbildungen aufgenommen wurden. Dazu gehörten folgende Gene: DGKK, DUOX2, EPHX, GPX 5, GPX5, GPX 7, KRT1, LPO, MBL2, MPO, MSRA, MT3, NOX5, PRG3, PXDNL, SFTPD. Gene mit deutlich veränderter Expression in den Klonen werden in der Diskussion genauer besprochen. Dazu wurde der *cut-off* Ct-Wert auf 32 gelegt und alle Gene ausgewählt, die mindestens eine doppelt bzw. halb so starke Genexpression zeigten wie die Kontrolle. Dazu gehören die folgenden Gene: APOE, CYBA, CYGB, DHCR24, GPX3, MTL5, SEPP1 und SOD3.

5. Diskussion

Die molekulare Karzinogenese des HCC ist noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Häufig kommt es jedoch früh zu einer Aktivierung der Telomerase (Shay und Bacchetti 1997), auch wenn dies allein für die maligne Entartung nicht ausreicht. (Harley 2002) Die unbegrenzte Proliferation ist eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Voraussetzung für die Entwicklung von malignen Leberzellen. Andere Veränderungen müssen hinzukommen. Dies sind u. a. Veränderungen in wichtigen Signalwegen der Zelle oder Mutationen von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen, die auf diese Signalwege zurückwirken. Dazu gehört z.B. der Wnt/ β -Catenin-Signalweg (Whittaker *et al.* 2010), für den kürzlich gezeigt werden konnte, dass eine Aktivierung die Transformation von immortalisierten Hepatozyten begünstigt (Wege *et al.* 2011). Telomerase-immortalisierte Hepatozyten stellen deshalb ein ideales Zellkulturmodell dar, um weitere funktionell relevante Schritte der humanen Hepatokarzinogenese zu untersuchen.

5.1 Die Aktivierung des IL-6-Signalwegs

Es wird angenommen, dass der IL-6-Signalweg in der Hepatokarzinogenese eine wichtige Rolle spielt. So verhindert die Blockierung von IL-6 die Tumorenstehung in einem Modell mit NASH (*non-alcoholic steatohepatitis*)-induzierter Hepatokarzinogenese (Park *et al.* 2010). Die meisten Zielgene von IL-6 sind an der Regulierung des Zellzyklus und der Apoptose und damit in dem Modell auch an der Karzinogenese beteiligt (Haura *et al.* 2005 und Yu *et al.* 2009). IL-6 unterstützt das Wachstum und Überleben der Leberzellen bei der Regeneration, aber auch in der Karzinogenese (Galun und Rose-John 2013).

In dieser Arbeit wurde überprüft, wie sich die konstitutive Aktivierung des IL-6-Signalwegs auf die Proliferation und Transformation von Telomerase-immortalisierten Hepatozyten (den oben beschriebenen FH-hTERT-Zellen) auswirkt. Dazu erfolgte zunächst die Transfektion von FH-hTERT-Zellen mit dem Expressionplasmid L-gp130 bzw. mit dem Kontrollplasmid pcDNA3.1. Der intrazelluläre Signalweg wird im Zellkulturmodell so durch ein konstitutiv aktives gp130-Protein aktiviert. Rebouissou *et al.* detektierten bei Leberzelladenomen in etwa 60% der Fälle so genannte *gain-of-function* Mutationen in gp130. *Gain-of-function* Mutationen sind Mutationen, die zu einer neuen oder verstärkten Aktivierung des Genproduktes führen. Dies ging einher mit einer Aktivierung von STAT3 und einer

verstärkten Entzündung (Rebouissou *et al.* 2009). Auch hier kommt es demnach zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs, der jedoch nicht zu einer malignen Entartung führt, wohl aber zu einem veränderten Zellwachstum im Adenom beiträgt. Ebenso wie für das Leberadenom beschrieben, konnte in der vorliegenden Arbeit durch ein verändertes gp130-Protein eine erhöhte Aktivierung von STAT3 hervorgerufen werden. Würde auch eine verstärkte Entzündung ausgelöst, so könnte dies weiter zu einem (wie im Adenom) veränderten Wachstum der Zellen beitragen.

Um nach erfolgreicher Transduktion und Selektion die Expression des Konstruktes L-gp-130 und seine Funktionsfähigkeit in der Zelle zu überprüfen, wurde mit Hilfe eines Western Blots die Phosphorylierung von STAT3 und ERK 1/2 und damit die Aktivierung des IL-6-Signalwegs nachgewiesen. Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten die Klone eine erhöhte Phosphorylierung von STAT3 und ERK 1/2. Diese Untersuchungen auf Proteinebene bestätigen, dass es durch Expression des konstitutiv aktiven IL-6-Rezeptors L-gp130 zu einer Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege kommt. Um dies weiter zu bestätigen, dass auch die Zielgene vermehrt transkribiert werden, wurde eine orientierende quantitative RT-PCR von CyclinD1 durchgeführt. CyclinD1 verkürzt die G1-Phase und treibt den Zellzyklus voran (Jiang *et al.* 1993). Eine erhöhte Expression von CyclinD1 wurde schon in zahlreichen Tumoren gefunden, so z. B. dem Ovarial-Karzinom (Dai *et al.* 2012). Die Hochregulation von CyclinD1 sowie anderer wesentlicher Gene für malignes Wachstum wie Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) und VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) bei vermehrt aktiviertem STAT3 zeigten Jiang *et al.* 2011 als Folge einer Aktivierung von IL-22 (Interleukin 22) sowie IL-6 (Jiang *et al.* 2011). Auch hier konnte in unserem Modellsystem für die mit L-gp130 transfizierten Zellen eine erhöhte Expression von CyclinD1 gemessen werden. Die FH-hTERT-L-gp130-Klone können dementsprechend genutzt werden, um die Rolle eines aberrant aktivierten IL-6-Signalwegs für das Wachstumsverhalten und die Transformation Telomerase-immortalisierter humaner Leberzellen zu überprüfen.

5.2 Charakterisierung der Klone

IL-6 spielt eine wesentliche Rolle für das Wachstum von Leberzellen. So zeigten IL-6-*knockout*-Mäuse eine geschädigte Leberregeneration. In den Hepatozyten wurden eine geringere Aktivierung von STAT3 und eine verminderte Expression von CyclinD1 detektiert.

Wurden solche Mäuse mit IL-6 behandelt, erhöhte sich die Aktivierung von STAT3 und die Genexpression von CyclinD1. Infolgedessen kam es wieder zu einer annähernd normalen Regeneration durch Proliferation (Cressmann *et al.* 1996). Im folgenden Teil dieser Arbeit wurde nun das Wachstumsverhalten der Klone untersucht. Die Hypothese ist, dass der aktivierte IL-6-Signalweg eine erhöhte Proliferationsrate induziert. Im Mausmodell führt die Koexpression von hohen Spiegeln an IL-6 und seinem löslichen Rezeptor zur Bildung von Adenomen und Hyperplasie. Außerdem ist eine IL-6-Aktivierung für die proliferative Regeneration nach Leberteilektomie unverzichtbar (Maione *et al.* 1998). Eine erhöhte Proliferationsrate war auch für mesenchymale Stammzellen beobachtet worden (Lam *et al.* 2010). Massives Wachstum in der Leber fanden auch Zimmers *et al.* nach Gabe von IL-6 (Zimmers *et al.* 2003). Man nimmt an, dass IL-6 und STAT3 dabei die Funktion haben, die Zellen für Wachstumsfaktoren empfänglicher zu machen (Fukada *et al.* 1996). Unsere FH-hTERT-L-gp130-Klone zeigten entgegen diesen ersten Erwartungen keine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen FH-hTERT-pcDNA3.1. Santer *et al.* zeigten für verschiedene Prostata-Karzinom-Zelllinien unterschiedliche Effekte des IL-6-Signalwegs auf die Proliferation (Santer *et al.* 2010). Es gibt für IL-6 zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege. Zum einen über den löslichen Rezeptor, zum anderen über einen membranständigen Rezeptor. Das Konstrukt L-gp130 ist dem membranständigen Rezeptor nachempfunden. Es könnte in der Leberzelle von Bedeutung sein, ob das IL-6-Signal über den löslichen Rezeptor und das so genannte *Trans-signaling* vermittelt oder durch den membranständigen IL-6-Rezeptor weitergegeben wird (Rose-John 2012). Interessant wäre es, den Effekt von Hyper-IL-6 im Medium auf die Proliferation von FH-hTERT-Zellen zu untersuchen. Möglicherweise kommt es hier zu einer verstärkten Proliferation. Die Proliferationsanalyse wurde mit Zellkulturmedium durchgeführt, das 10% Serum enthält. Der fehlende Unterschied in der Proliferation, könnte auch daran liegen, dass die Kontrollzellen mit ausreichend Wachstumsfaktoren versorgt waren und so der Unterschied nicht deutlich wurde. Möglich wäre auch, dass die konstitutive Aktivierung des IL-6-Signalwegs zwar zu den vermuteten Veränderungen führt, jedoch zu schwach ausgeprägt ist, als dass ein Effekt im Proliferations-Assay messbar wäre, zumal die Zellen in Kultur bereits maximal proliferierten.

Neben Proliferation wurde auch das Wachstum in Abhängigkeit von Serum untersucht. Es zeigte sich, dass die Klone, wie die Kontrollzellen, abhängig von Serum wachsen. Wurde dem Medium das Serum entzogen, so kam es auch bei den Klonen zu einem verminderten Wachstum. Die Klone blieben also abhängig von Wachstumsfaktoren, anders als etwa von

Stuhlmann-Laeisz *et al.* und Suthaus *et al.* in anderen Zellkulturmodellen beobachtet (Stuhlmann-Laeisz *et al.* 2006, Suthaus *et al.* 2010).

Die Kontaktinhibition der Klone war im Vergleich zur Kontrolle verändert. Die Klone zeigten bei Konfluenz keine signifikant verminderte S-Phase und damit keine Verringerung der DNA-Replikation. So kam es bei den Klonen zu einer verminderten (Klon 1 und Klon 2) bzw. aufgehobenen (Klon 3) Inhibition des Wachstums durch Zell-Zellkontakte. Normalerweise führt die Konfluenz von nicht-malignen Zellen zu einer verminderten Zellteilung; die Zell-Zellkontakte vermitteln einen Wachstumsstopp. Diese Kontaktinhibition ist ein wichtiges Kriterium gesunder Zellen in funktionstüchtigen Zellverbänden. Die Aufhebung der Kontaktinhibition hingegen ist ein Hinweis für malignes Wachstum (Pollack 1968, Fisher und Yeh 1967). Für IL-6 waren bisher keine Daten hinsichtlich einer möglichen Kontaktinhibition in der Literaturrecherche ausfindig zu machen.

Der *Colony Assay* ist ein *in vitro* Marker für malignes Wachstum (Clark *et al.* 1995). Gutartige Zellen, wie FH-hTERT-Zellen, haben nicht die Fähigkeit verankerungsunabhängig zu wachsen (Haker *et al.* 2007). Maligne Zellen hingegen zeichnen sich durch verankerungsunabhängiges Zellwachstum aus und bilden Kolonien im Softagar. Mit dem verankerungsunabhängigen Wachstum ist eine wichtige Voraussetzung für die Invasion der Zellen in gesundes Gewebe und zur Metastasierung geschaffen, ein wichtiges Kriterium maligner Zellen (Hanahan und Weinberg 2000) Es konnte bereits beispielhaft für das Ovarial-Karzinom (Wang *et al.* 2012) sowie für das kolorektale Karzinom gezeigt werden (Foran *et al.* 2010), dass verankerungsunabhängiges Wachstum durch IL-6 stimuliert werden kann. Da FH-hTERT-L-gp130-Zellen im Gegensatz zu FH-hTERT-pcDNA3.1-Zellen Kolonien entwickeln, kann auch bei immortalisierten Hepatozyten davon ausgegangen werden, dass eine konstitutive Aktivierung von IL-6 die Entartung begünstigt. Allerdings entwickeln die Klone erst nach einer Passagezahl von 65 im Softagar Kolonien. Es liegt damit die Vermutung nahe, dass die Telomerase- und IL-6-Aktivierung nicht alleine ausreichen, um die Zellen maligne entarten zu lassen, sondern die Zelle über die Zeit weitere Schäden akquirieren muss. Vermutlich führt die IL-6-Aktivierung jedoch dazu, dass die Apoptose in geschädigten Zellen bei Auftreten genetischer Schäden vermieden wird und sich so genetische Alterationen anhäufen können. Die Aktivierung des IL-6-Signalwegs allein führt demnach nicht zur Ausbildung eines malignen Phänotyps.

3. Oxidativer Stress

In FH-hTERT-L-gp130-Klonen ist also etwas passiert, dass ihre Kontaktinhibition aufhebt und dazu führt, dass sie im Softagar nach zusätzlichen Passagen in Zellkultur Kolonien bilden. Im Rahmen einer chronischen Entzündung der Leber kommt es zu einer Aktivierung von Signalwegen, wie dem STAT3- und NF- κ B-Signalweg. Signalwegen also, die mit der Entstehung von malignen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden (Fan *et al.* 2013). Die Aktivierung dieser Signalwege führt zu einem genotoxischen Milieu, in dem ROS auftreten und in dem DNA-Schäden akkumulieren können. Diese können dann zu einer malignen Entartung führen. Den im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen zufolge, führt die Aktivierung des IL-6-Signalwegs möglicherweise dazu, dass bei oxidativem Stress, FH-hTERT-L-gp130 weiter proliferieren (die Kontaktinhibition ist aufgehoben) und das Zellüberleben an erster Stelle steht, während die Integrität der Zellen zweitrangig wird (nach 65 Passagen bilden die Zellen im Softagar Kolonien).

Mit Hilfe von Carboxy-H₂DCFDA wurde die Menge an ROS in den Klonen und der Kontrolle detektiert. Dabei zeigte sich ohne Behandlung ein ähnlicher ROS-Spiegel. Wurde in den Zellen jedoch oxidativer Stress induziert, fand sich bei den Klonen (Klone 1 und 2) ein im Vergleich zur Kontrolle etwa dreifach erhöhter ROS-Spiegel. Die Klone scheinen also im Rahmen der konstitutiven Aktivierung des IL-6-Signalwegs eine verminderte Abwehr von oxidativem Stress zu haben. Somit scheint es wahrscheinlich, dass IL-6 dazu führt, dass oxidativer Stress schlechter abgebaut wird. Dass es in der Zelle infolgedessen vermehrt zu DNA-Schäden kommt, die nicht mehr ausreichend repariert werden. Und, dass die Aktivierung des IL-6-Signalwegs das entscheidende Signal für die Zelle weiter zu proliferieren und zu überleben ist, statt zunächst entstandene DNA-Schäden zu reparieren oder in die Apoptose zu gehen.

Lokale Faktoren spielen in der Hepatokarzinogenese eine wichtige Rolle (Yang *et al.* 2011). So trägt auch oxidativer Stress durch kontinuierliche Produktion von ROS, die durch Umgebungsfaktoren oder mitochondriale Schädigung entstehen, zur Karzinogenese bei. Dies geschieht zum einen durch die Aktivierung und Transkription von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Marra *et al.* 2011) und zum anderen (und vor allem) durch die Induktion von DNA-Schäden (Calvisi *et al.* 2005 und Tanaka *et al.* 2008). Die Zelle hat Mechanismen zur Abwehr von oxidativem Stress entwickelt. Dies sind Katalasen, Superoxiddismutasen, Gluthathion-Perioxidasen und andere Enzyme. Können diese Enzyme die anfallenden ROS

nicht abfangen, entsteht oxidativer Stress in der Zelle. Dazu kommt es vor allem unter pathologischen Konditionen, wie z.B. bei chronischen Infektionen und Leberzirrhose. Mit Hilfe eines PCR-Array haben wir verschiedene Gene, die an der oxidativen Abwehr beteiligt sind, überprüft. Obwohl ohne Behandlung kein Unterschied in den ROS-Spiegeln festzustellen war, war die Expression verschiedener Gene in den Klonen im Vergleich zur Kontrolle verändert. Eine deutlich geringere Expression wurde für SOD3, DHCR24 und SEPP1 beobachtet. Superoxiddismutasen schützen vor den toxischen Effekten von ROS, indem diese abgebaut werden. DHCR24 schützt die Zellen, indem die Caspase 3-Aktivität während der Apoptose reduziert wird. SEPP1 werden ebenfalls Funktionen zugeschrieben, die vor oxidativem Stress schützen. Somit sind in allen untersuchten Klonen drei ausgewählte Gene deutlich herabreguliert, die an der Abwehr von oxidativem Stress beteiligt sind. Dies ist ein Hinweis, dass durch die Aktivierung des IL-6-Signalwegs die Abwehr von oxidativem Stress in den Klonen beeinträchtigt wird und es so zu erhöhten ROS-Spiegel nach Induktion von oxidativem Stress kommt.

Zellzyklus, Reparaturvorgänge und Apoptose sind mannigfaltig und komplex durch Wachstumsfaktoren, Protoonkogene und Tumorsuppressorgene gesteuert. Zu diesen gehört p53, das u. a. als Transkriptionsfaktor die Expression von p21 induzieren kann. p21 inhibiert Cyclin-abhängige Kinasen und kann so einen Zellzyklusarrest bewirken, um der Zelle z. B. Zeit für DNA-Reparatur zu geben (Gartel und Radhakrishnan 2005). Dieser Signalweg wird vor allem durch ROS und DNA-Schäden aktiviert (Ozturk 2009). Wir fanden nach IL-6-Aktivierung in FH-hTERT eine deutlich verminderte Expression von p21 auf mRNA-Ebene im Vergleich zur Kontrolle. Zwar kommt es nach Induktion von oxidativem Stress in den Klonen zu einer erhöhten Menge an ROS, jedoch im Vergleich zur Kontrolle nicht zu einer relativ erhöhten Expression von p21, wie das die Arbeit von Ozturk *et al.* nahe legen würde. Die Zellen gehen, trotz höherer ROS-Spiegel, nicht verstärkt in den Zellzyklusarrest. Schäden, die durch ROS ausgelöst werden, könnten so akkumulieren und dazu beitragen, dass FH-hTERT-L-gp130-Klone im Softagar Kolonien bilden. Die Aktivierung des IL-6-Signalwegs könnte demnach dazu führen, dass die Schwelle zur Aktivierung von p21 (und zur Reparatur) in der Zelle erhöht wird. In malignen Zellen kommt es zu einer autonomen Zellteilung bei veränderter Dauer des Zellzyklus und die Apoptose wird umgangen. Kürzlich wurde die Rolle von p21 für die Hepatokarzinogenese und Leberregeneration untersucht. Dabei schien die Funktion von p21 abhängig vom Schweregrad der Leberschädigung zu sein: Bei schwerer Leberschädigung führte die Inhibierung von p21 im Mausmodell zu einer gesteigerten

Proliferation der Hepatozyten, die Mäuse überlebten, allerdings unter erhöhtem Tumorrisiko. Eine verminderte Expression von p21 steht häufig im Zusammenhang mit Mutationen im Gen von p53 und könnte so zur Hepatokarzinogenese beitragen (Hui *et al.* 1998). Der Spiegel von p21 wurde auch im humanen Leberzellkarzinom überprüft (Qin *et al.* 2001). Moran *et al.* zeigten in Abhängigkeit von IL-6 und der Aktivierung von STAT3 eine vermehrte Expression von p21, einen Zellzyklusarrest und eine vermindert Proliferation in HCC-Zellen (Moran *et al.* 2005, Moran *et al.* 2008). Wie dargestellt, finden sich für die Expression von p21 in Leberzellen bzw. Leberkarzinomzellen vielschichtige Angaben in der Literatur. Dies liegt zum einen daran, dass der Zellzyklus überaus komplex reguliert wird. Zum anderen lassen sich FH-hTERT-L-gp130-Klone auch nicht mit Tumorzellen vergleichen. Und nicht zuletzt kann das p21-Protein, das in einer Karzinom-Zelle erhöht exprimiert wird (siehe Moran *et al.*), das Produkt eines mutierten Gens und funktionsuntüchtig sein.

Die aberrante Aktivierung des IL-6-Signalwegs in FH-hTERT begünstigt das Überleben, was jedoch auf Kosten der Integrität der Zellen geschieht. So wie die Telomerase im Rahmen der Leberschädigung und -regeneration aktiviert wird (Kotoula *et al.* 2002, Michalopoulos und DeFrances 1997, Michalopoulos 2007), ist sie andererseits auch eine notwendige Voraussetzung für die Hepatokarzinogenese (Wege und Brümmendorf 2007). Analog könnte die IL-6-Signalweg-Aktivierung in unserem Zellkulturmodell ein wichtiges Signal sein, bei oxidativem Stress alles dem Zellüberleben unterzuordnen und so zur Transformation beitragen.

5.4 Ausblick

Die Bedeutung von IL-6 im Rahmen der Hepatokarzinogenese gewinnt in den letzten Jahren in der Forschung immer mehr an Bedeutung. Es gibt Studien, die dem IL-6-Spiegel einen prognostischen Wert zuschreiben (Boige *et al.* 2012), die IL-6 als Tumormarker (Porta *et al.* 2008) und als therapeutisches Ziel sehen (Jang *et al.* 2012). Mithilfe des verwendeten Zellkulturmodells gelang es, die funktionelle Bedeutung von IL-6 für die Hepatokarzinogenese genauer zu untersuchen und zu bestätigen. Es zeigte sich, dass die Aktivierung des IL-6-Signalwegs allein nicht eine Transformation der immortalisierten Zellen hervorruft, diese jedoch vermutlich über die veränderte Abwehr von oxidativem Stress begünstigt. Weitere Untersuchungen im Zellkulturmodell wären interessant: Zum einen die

Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen unter der Hypothese, dass mehr ROS auch zu mehr Doppelstrangbrüchen führt. Zum anderen, inwieweit die Apoptose in FH-hTERT-L-gp130-Klonen verändert ist. Anschließend könnte die Begünstigung der Transformation auch im Mausmodell überprüft werden. So könnten weitere Eigenschaften der Zellen im Organismus untersucht werden, wie Neoangiogenese und Invasion in Gewebe. Für die Zukunft ist das Ziel, über ein genaueres Verständnis der Hepatokarzinogenese und der funktionellen Rolle von IL-6 in der Leberkrebsentstehung, Medikamente für die Therapie oder auch Prävention des HCC zu entwickeln. Erste Schritte in diese Richtung gibt es bereits. So wird die Blockierung des IL-6-Signalwegs als potentielle Therapie des HCC gesehen (Liu und Lin 2011a). Liu *et al.* fanden, dass HCC-Zelllinien mit höheren IL-6-Spiegeln resistenter gegenüber Doxorubicin waren. Und, dass die Inhibierung des IL-6-Signalwegs über siRNA (*small interfering RNA*) gegen STAT3 zu einem besseren Ansprechen der Zellen in Zellkultur gegenüber Doxorubicin, einem Chemotherapeutikum führte. Außerdem war der antiapoptotische Effekt von STAT3 gemindert (Liu *et al.* 2010).

6. Zusammenfassung

Das HCC, weltweit das fünfthäufigste Malignom, ist das am häufigsten mit einer chronischen Entzündung assoziierte Malignom. Die Hepatokarzinogenese verläuft als mehrstufiger Prozess, wobei die Stabilisierung der Telomere als ein notwendiger und früher Schritt angesehen wird. Die Aktivierung der Telomerase in humanen fetalen Hepatozyten (FH-hTERT) führt jedoch *per se* zu keinem malignen Phänotyp. Im entzündlichen Milieu der Leber spielt IL-6 eine wichtige Rolle, weshalb dem IL-6-Signalweg in der Hepatokarzinogenese ebenfalls eine große Bedeutung beigemessen wird. Um diese Bedeutung genauer zu untersuchen, wurden FH-hTERT-Zellen mit dem Expressionsplasmid L-gp130 transfiziert, das für eine konstitutiv aktive Form von gp130 kodiert, und der IL-6-Signalweg so aktiviert. Als Kontrolle diente das Plasmid pcDNA3.1. Die Aktivierung des Signalwegs wurde durch die vermehrte Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 bestätigt. In der anschließenden Untersuchung der Proliferion und Serumabhängigkeit fanden sich entgegen der Erwartung keine Unterschiede zur Kontrolle. Hingegen war die Kontaktinhibition bei den Zellen mit konstitutiv aktivem IL-6-Signalweg aufgehoben und die Zellen bildeten Kolonien im Softagar, allerdings erst nach zahlreichen zusätzlichen Passagen in Langzeitkultur. Die Aktivierung des IL-6-Signalwegs scheint demnach für die Transformation nicht hinreichend zu sein, diese jedoch zu begünstigen.

In der entzündlichen Leber kommt es durch hohe Spiegel an ROS zu genetischen Alterationen. Daher haben wir im nächsten Schritt die antioxidative Abwehr der Klone untersucht. Es konnte eine geringere Expression verschiedener Gene, die an der oxidativen Abwehr beteiligt sind, gemessen werden (SOD3, DHCR24 und SEPP1). Die Aktivierung des IL-6-Signalwegs in FH-hTERT führt folglich zu einer verminderten Abwehr von oxidativem Stress. Nach Induktion von oxidativen Stress wurden in den Zellen mit IL-6-Aktivierung in Bestätigung der Ergebnisse der PCR auch höhere ROS-Spiegel detektiert. Die Expression von p21 hingegen war im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Trotz höherer ROS-Spiegel treten die Zellen demnach nicht verstärkt in den Zellzyklusarrest.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die IL-6-Aktivierung der Zelle signalisiert, unter allen Umständen und auf Kosten der zellulären Integrität zu überleben und weiter zu proliferieren. Infolgedessen könnten durch oxidativen Stress ausgelöste DNA-Doppelstrangbrüche akkumulieren, die unter diesem sog. „*pro-survival*“ Signal nicht mehr repariert werden und schließlich eine maligne Transformation auslösen.

7. Abkürzungen

7.1 PCR Array, Gen-Liste

Gluthathion-Peroxidasen:

GPX (*Glutathione peroxidase*)1-7

GSTZ1 (*Glutathione transferase zeta 1*)

Peroxiredoxine:

PRDX (*Peroxiredoxin*) 1-6

Andere Peroxidasen:

CAT (*Catalase*)

CSDE (*Cold shock domain containing E1, RNA-binding*)

CYGB (*Cytoglobin*)

DUOX (*Dual oxidase*) 1-2

EPX (*Eosinophil peroxidase*)

GPR156 (*G protein-coupled receptor 156*)

LPO (*Lactoperoxidase*)

MGST3 (*Microsomal glutathione S-transferase 3*)

MPO (*Myeloperoxidase*)

PTGS (*Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)*) 1-2

PXDN (*Peroxidasin homolog (Drosophila)*)

PXDNL (*Peroxidasin homolog (Drosophila)-like*)

TPO (*Thyroid peroxidase*)

TTN (*Titin*)

Andere Anioxidantien:

ALB (*Albumin*)

APOE (*Apolipoprotein E*)

GSR (*Glutathione reductase*)

MT3 (*Metallothionein 3*)

SELS (*Selenoprotein S*)

SOD1 (*Superoxide dismutase 1, soluble*)
SOD3 (*Superoxide dismutase 3, extracellular*)
SRXN1 (*Sulfiredoxin 1*)
TXNDC2 (*Thioredoxin domain containing 2 (spermatozoa)*)
TXNRD (*Thioredoxin reductase*) 1-2

Superoxid-Dismutasen:

SOD1 (*Superoxide dismutase 1, soluble*)
SOD2 (*Superoxide dismutase 2, mitochondrial*)
SOD3 (*Superoxide dismutase 3, extracellular*)

In den Superoxid-Stoffwechsel involvierte Gene:

ALOX12 (*Arachidonate 12-lipoxygenase*)
CCS (*Copper chaperone for superoxide dismutase*)
CYBA (*Cytochrome b-245, alpha polypeptide*)
DUOX (*Dual oxidase*) 1-2
GTF2I (*General transcription factor Iii*)
MT3 (*Metallothionein 3*)
NCF (*Neutrophil cytosolic factor*) 1-2
NOS2A (*Nitric oxide synthase 2, inducible*)
NOX5 (*NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5*)
PREX1 (*Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1*)
PRG3 (*Proteoglycan 3*)

Andere in ROS involvierte Gene:

AOX1 (*Aldehyde oxidase 1*)
BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*)
EPHX2 (*Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic*)
MPV17 (*MpV17 mitochondrial inner membrane protein*)

Auf oxidativen Stress responsive Gene:

ANGPTL7 (*Angiopoietin-like 7*)
APOE (*Apolipoprotein E*)
ATOX1 (*ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)*)

CAT (*Catalase*)
CCL5 (*Chemokine (C-C motif) ligand 5*)
CSDE1 (*Cold shock domain containing E1, RNA-binding*)
CYGB (*Cytoglobin*)
DGKK (*Diacylglycerol kinase, kappa*)
DUOX (*Dual oxidase*) 1-2
DUSP1 (*Dual specificity phosphatase 1*)
EPX (*Eosinophil peroxidase*)
FOXM1 (*Forkhead box M1*)
GLRX2 (*Glutaredoxin 2*)
GPR156 (*G protein-coupled receptor 156*)
GPX (*Glutathione peroxidase*) 1-7
GSS (*Glutathione synthetase*)
KRT1 (*Keratin 1*)
LPO (*Lactoperoxidase*)
MBL2 (*Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble*)
MPO (*Myeloperoxidase*)
MSRA (*Methionine sulfoxide reductase A*)
NUDT1 (*Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1*)
OXR1 (*Oxidation resistance 1*)
OXSR1 (*Oxidative-stress responsive 1*)
PDLIM1 (*PDZ and LIM domain 1*)
PNKP (*Polynucleotide kinase 3'-phosphatase*)
PRDX (*Peroxiredoxin*) 2, 5-6
PRNP (*Prion protein*)
RNF7 (*Ring finger protein 7*)
SCARA3 (*Scavenger receptor class A, member 3*)
SELS (*Selenoprotein S*)
SEPP1 (*Selenoprotein P, plasma, 1*)
SGK2 (*Serum/glucocorticoid regulated kinase 2*)
SIRT2 (*Sirtuin 2*)
SOD1 (*Superoxide dismutase 1, soluble*)
SOD2 (*Superoxide dismutase 2, mitochondrial*)
SRXN1 (*Sulfiredoxin 1*)

STK25 (*Serine/threonine kinase 25*)

TPO (*Thyroid peroxidase*)

TTN (*Titin*)

TXNRD2 (*Thioredoxin reductase 2*)

7.2 andere Abkürzungen

AFP	Alpha-1-Fetoprotein
APS	Ammonuimpersulfat
B2M	β -2-Microglobulin
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
BSO	<i>Buthionine sulfoximine</i>
cDNA	komplementäre DNA
DEN	Diethylnitrosamin
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Serum</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gp130	Glykoprotein 130
Grb2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HepG2	Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms
IL-6	Interleukin 6
IL-22	Interleukin 22
JAK	Januskinase

kDA	Kilodalton
LB	<i>Luria Broth</i>
MALT	<i>Mucosa associated lymphatic tissue</i>
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
NaCl	Natrium Chlorid
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
NdeI	<i>Neisseria dentrificans</i> (Restriktionsenzym)
NF-kB	<i>Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“</i>
p21	Protein 21
p53	Protein 53
PBS	<i>Fetale bovine serum</i>
pCMV	Cytomegalie Virus Promoter
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -PCR
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RIPA	<i>Radio immunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPL	ribosomales Protein L13a
rpm	<i>Rounds per minute</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SH2	Src Homologie Domäne 2
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
StuI	<i>Streptomyces tubercidicus</i> (Restriktionsenzym)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	TATA-Bindungsprotein
TERC	<i>Telomerase RNA component</i>
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TF	Transkriptionfaktoren

TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Wnt	zusammengesetzt aus <i>Wg</i> für <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
WT	Wildtyp

8. Anhang: Sequenz L-gp130

(Dargestellt ist in der jeweils oberen Reihe die Basen-Sequenz, in der unteren Reihe die korrespondierende Aminosäuren-Sequenz. Es handelt sich um eine Ansequenzierung, nicht um das vollständige L-gp130. Fett und unterstrichen dargestellt ist die FLAG-Sequenz, kursiv und fett dargestellt ist der Linker und kursiv und unterstrichen ist der *Leucin-Zipper* dargestellt. Vor der FLAG-Sequenz befindet sich das Signalpeptid, im Anschluss an den *Leucin-Zipper* die Transmembrandomäne und der intrazelluläre Teil (nicht vollständig).)

TTACGGGCCTCTAGACTCGAGTCTAGACCCCGCAAGATGTTGACGTTGCAGACTTGGCTA
M L T L Q T W L

GTGCAAGCCTTGTTTATTTTCCTCACCCTGAATCTACAGGTGACTACAAAGATGACGAT
V Q A L F I F L T T E S T G D Y K D D D

GATAAAGAATTGTGCGGCGGCAGAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAAGTGAAAACCTTGAAA
D K E L C G G R I A R L E E K V K T L K

GCTCAGAACTCGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAACAGGTGGCACAGCTT
A Q N S E L A S T A N M L R E Q V A Q L

AAACAGAAAGTCATGAACGAATTCACTTTTACTACCCCAAAGTTTGCTCAAGGAGAAATT
K Q K V N M E F T F T T P K F A Q G E I

GAAGCCATAGTCGTGCCTGTTTGCTTAGCATTTCCTATTGACAACTCTTCTGGGAGTGCTG
E A I V V P C C L A F L L T T L L G V L

TTCTGCTTTAATAAGCGAGACCTAATTA AAAA ACACATCTGGCCTAATGTTCCAGATCCT
F C F N K R D L I K K H I W P N V P D P

TCAAAGAGTCATATTGCCAGTGGTCACCTCACACTCCTCCAAGGCACAATTTTAATTCA
S K S H I A Q W S P H T P P R H N F N S

AAAGATCAAATGTATTTCAGATGGCAATTTCACTGATGTAAGTGTTGTGGAAATAGAAGCA
K D Q M Y S D G N F T D V S V V E I E A

AATGACAAAAAGCCTTTTCCAGAAGATCTGAAATTATTGGACCTGTTCAAAAAGGAAAA
N D K K P F P E D L K L L D L F K K E K

ATTAATACTGAAGGACACAGCAGTGGTATTGGGGGGTCTTCATGCATGTCATCTTCTAGG
I N T E G H S S G I G G S S C M S S S R

CCAAGCATTCTAGCAGTGATGAAAATGAATCTTCACAAAACACTTCGAGCACTGTCCAG
P S I S S S D E N E S S Q N T S S T V Q

TATTCTACCGTGGTACACAGTGGCTACAGACACCAAGTTCCGTCAGTCCAAGTCTTCTCA
Y S T V V H S G Y R H Q V P S V Q V F S

AGATCCGAGTCTACCCAGCCCTTGTTAGATTCAGAGGAGCGGCCAGAAGATCTACAATTA
R S E S T Q P L L D S E E R P E D L Q L

GTAGATCATGTAGATGGCGGTGATGGTATTTTGCCCAGGCAACAGTACTTCAAACAGAAC
V D H V D G G D G I L P R Q Q Y F K Q N

TGCAGTCAGCATGAATCCAGTCCAGATATTTTACATTTTGAAAGGTCAAAGCAAGTTTCA
C S Q H E S S P D I S H F E R S K Q V S

TCAGTCAATGAGGAAGATTTTGTTAGACTTAAACAGCAGATTTTCAGATCATATTTTAC
S V N E E D F V R L K Q Q I S D H I S

9. Literaturverzeichnis

1. Berek, J S, Chung, C, Kaldi, K, Watson, J M, Knox, R M und Martínez-Maza, O. „Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 164, Nr. 4 (1991): 1038–1043.
2. Beyazit, Y, Sayilir, A, Suvak, B und Torun, S. „The missing link between obesity and hepatocellular carcinoma: IL-6-mediated STAT-3 activation as a key player in hepatocarcinogenesis“. *Digestion* 84, Nr. 3 (2011): 185–186.
3. Boige, V, Malka, D, Bourredjem, A, Dromain, C, Baey, C, Jacques, N, Pignon, J-P, Vimond, N, Bouvet-Forteau, N, De Beare, T, Ducreux, M und Farace, F. „Efficacy, safety, and biomarkers of single-agent Bevacizumab therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma“. *The Oncologist* 17, Nr. 8 (2012): 1063–1072.
4. Bosch, F X, Ribes, J, Díaz, M und Cléries, R. „Primary liver cancer: worldwide incidence and trends“. *Gastroenterology* 127, Nr. 5 Suppl 1 (2004): 5–16.
5. Calvisi, D F, Conner, E A, Ladu, S, Lemmer, E R, Factor, V M und Thorgeirsson, S S. „Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway confers growth advantages in c-Myc/E2F1 transgenic mouse model of liver cancer“. *Journal of Hepatology* 42, Nr. 6 (2005): 842–849.
6. Catlett-Falcone, R, Landowski, T H, Oshiro, M M, Turkson, J, Levitzki, A, Savino, R, Ciliberto, G, Moscinski, L, Fernández-Luna, J L, Nuñez, G, Dalton, W S und Jove, R. „Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells“. *Immunity* 10, Nr. 1 (1999): 105–115.
7. Clark, G J, Cox, A D, Graham, S M und Der, C J. „Biological assays for Ras transformation“. *Methods in Enzymology* 255 (1995): 395–412.

8. Conteduca, V, Sansonno, D, Lauletta, G, Russi, S, Ingravallo, G, Dammacco, F. „H. Pylori infection and gastric cancer: state of the art (review)“. *International Journal of Oncology* 42, Nr. 1 (2013): 5-18
9. Coussens, L M, und Werb, Z. „Inflammation and cancer“. *Nature* 420, Nr. 6917 (2002): 860–867.
10. Cressman, D E, Greenbaum, L E, DeAngelis, R A, Ciliberto, G, Furth, E E, Poli, V und Taub R. „Liver failure and defective hepatocyte regeneration in Interleukin-6-deficient mice“. *Science* 274, Nr. 5291 (1996): 1379–1383.
11. Dai, J, Zhang, P-H, Liu, P-S und Qu, H-H. „[Expressions and significance of cyclinD1 in epithelial ovarian cancer cell 3AO]“. *Zhonghua yi xue za zhi* 92, Nr. 5 (2012): 351–353.
12. Eriksson, A S, Gretzer, C und Wallerstedt, S. „Elevation of cytokines in peritoneal fluid and blood in patients with liver cirrhosis“. *Hepato-Gastroenterology* 51, Nr. 56 (2004): 505–509.
13. Fan, Y, Mao, R und Yang, J. „NF-κB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer“, *Protein & Cell* 4, Nr. 3 (2013): 176–185
14. Fisher, H W, und Yeh, J. „Contact inhibition in colony formation“. *Science* 155, Nr. 3762 (1967): 581–582.
15. Foran, E, Garrity-Park, M M, Mureau, C, Newell, J, Smyrk, T C, Limburg, P J und Egan, L J. „Upregulation of DNA Methyltransferase-mediated gene silencing, anchorage-independent growth, and migration of colon cancer cells by Interleukin-6“. *Molecular Cancer Research* 8, Nr. 4 (2010): 471–481.
16. Fuentes-Pananá, E, Camorlinga-Ponce, M und Maldonado-Bernal, C. „[Infection, inflammation and gastric cancer]“. *Salud Pública De México* 51, Nr. 5 (2009): 427–433.

17. Fukada, T, Hibi, M, Yamanaka, Y, Takahashi-Tezuka, M, Fujitani, Y, Yamaguchi, T, Nakajima, K und Hirano, T. „Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis“. *Immunity* 5, Nr. 5 (1996): 449–460.
18. Galun, E, und Rose-John, S. „The regenerative activity of interleukin-6“. *Methods in Molecular Biology* 982 (2013): 59–77.
19. Gartel, A L, und Radhakrishnan, S K. „Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences“. *Cancer Research* 65, Nr. 10 (2005): 3980–3985.
20. Genovese, M C, McKay, J D, Nasonov, E L, Mysler, E F, da Silva, N A, Alecock, E Woodworth, T und Gomez-Reino, J J. „Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study“. *Arthritis and Rheumatism* 58, Nr. 10 (2008): 2968–2980.
21. Giannitrapani, L, Cervello, M, Soresi, M, Notarbartolo, M, La Rosa, M, VIRRUSO, L, D’Alessandro, N und Montalto, G. „Circulating IL-6 and sIL-6R in patients with hepatocellular carcinoma“. *Annals of the New York Academy of Sciences* 963 (2002): 46–52.
22. „GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Liver Cancer“. Zugegriffen 1. August 2011. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/liver.asp>.
23. Grivennikov, S, Karin, E, Terzic, J, Mucida, D, Yu, G-Y, Vallabhapurapu, S, Scheller, J, Rose-John, S, Cheroutre, H, Eckmann, L und Karin, M. „IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer“. *Cancer Cell* 15, Nr. 2 (2009): 103–113.

24. Haker, B, Fuchs, S, Dierlamm, J, Brümmendorf, T H und Wege, H. „Absence of oncogenic transformation despite acquisition of cytogenetic aberrations in long-term cultured telomerase-immortalized human fetal hepatocytes“. *Cancer Letters* 256, Nr. 1 (2007): 120–127.
25. Hanahan, D, und Weinberg, R A. „The hallmarks of cancer“. *Cell* 100, Nr. 1 (2000): 57–70.
26. Harley, C B. „Telomerase is not an oncogene“. *Oncogene* 21, Nr. 4 (2002): 494–502.
27. Haura, E B, Turkson, J und Jove, R. „Mechanisms of disease: insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer“. *Nature Clinical Practice. Oncology* 2, Nr. 6 (2005): 315–324.
28. Heinrich, P C, Behrmann, I, Müller-Newen, G, Schaper, F und Graeve, L. „Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway“. *The Biochemical Journal* 334, Pt. 2 (1998): 297–314.
29. Heinrich, P C, Behrmann, I, Haan, S, Hermanns, H M, Müller-Newen, G und Schaper, F. „Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation“. *The Biochemical Journal* 374, Pt. 1 (2003): 1–20.
30. Hessheimer, A J, Forner, A, Varela, M und Bruix, J. „Metabolic risk factors are a major comorbidity in patients with cirrhosis independent of the presence of hepatocellular carcinoma“. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 22, Nr. 10 (2010): 1239–1244
31. Hoshida, Y, Villanueva, A, Kobayashi, M, Peix, J, Chiang, D Y, Camargo, A, Gupta, S, Moore, J, Wrobel, M, Lerner, J, Reich, M, Chan, J A, Glickman, J, Ikeda, K, Hashimoto, M, Watanabe, G, Daidone, M G, Roayaie, S, Schwartz, M, Thung, S, Salvesen, H, Gabriel, S, Mazzaferro, V, Bruix, J, Friedaman, S, Kumada, H, Llovet, J M, und Golub, T R. „Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma“. *The New England Journal of Medicine* 359, Nr. 19 (2008): 1995–2004.

32. Huang, M, Page, C, Reynolds, R K und Lin, J. „Constitutive activation of STAT3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells“. *Gynecologic Oncology* 79, Nr. 1 (2000): 67–73.
33. Hui, A M, Makuuchi, M und Li, X. „Cell cycle regulators and human hepatocarcinogenesis“. *Hepato-gastroenterology* 45, Nr. 23 (1998): 1635–1642.
34. Jang, J W, Oh, B S, Kwon, J H, You, C R, Chung, K W, Kay, C S und Jung, H S. „Serum Interleukin-6 and c-reactive protein as a prognostic indicator in hepatocellular carcinoma“. *Cytokine* 60, Nr. 3 (2012): 686–693.
35. Jiang, R, Tan, Z, Deng, L, Chen, Y, Xia, Y, Gao, Y, Wang, X und Sun, B. „Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3“. *Hepatology* 54, Nr. 3 (2011): 900–909.
36. Jiang, W, Kahn, S M, Zhou, P, Zhang, Y J, Cacace, A M, Infante, A S, Doi, S, Santella, R M und Weinstein, I B. „Overexpression of Cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression“. *Oncogene* 8, Nr. 12 (1993): 3447–3457.
37. Johnson, C, Han, Y, Hughart, N, McCarra, J, Alpini, G und Meng, F. „Interleukin-6 and its receptor, key players in hepatobiliary inflammation and cancer“. *Translational Gastrointestinal Cancer* 1, Nr. 1 (2012): 58–70.
38. Jones, S A. „Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6“. *Journal of Immunology* 175, Nr. 6 (2005): 3463–3468.
39. Kamimura, D, Ishihara, K und Hirano, T. „IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model“. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 149 (2003): 1–38.
40. Kew, M C. „Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma“. *Pathologie-Biologie* 58, Nr. 4 (2010): 273–277.

41. Kinoshita, T, Ito, H und Miki, C. „Serum interleukin-6 level reflects the tumor proliferative activity in patients with colorectal carcinoma“. *Cancer* 85, Nr. 12 (1999): 2526–2531.
42. Kiuchi, N, Nakajima, K, Ichiba, M, Fukada, T, Narimatsu, M, Mizuno, K, Hibi, M und Hirano, T. „STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene“. *The Journal of Experimental Medicine* 189, Nr. 1 (1999): 63–73.
43. Kotoula, V, Hytioglou, P, Pyrpasopoulou, A, Saxena, R, Thung, S N und Papadimitriou, C S. „Expression of human telomerase reverse transcriptase in regenerative and precancerous lesions of cirrhotic livers“. *Liver* 22, Nr. 1 (2002): 57–69.
44. Lam, S P, Luk, J M, Man, K, Ng, K T P, Cheung, C K, Rose-John, S und Lo, C M. „Activation of Interleukin-6-induced glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3 pathway in mesenchymal stem cells enhances hepatic differentiation, proliferation, and liver regeneration“. *Liver Transplantation* 16, Nr. 10 (2010): 1195–1206.
45. Lang, Sigrid, „Konstruktion und Charakterisierung eines konstitutiv aktiven Zytokinrezeptors: gp130, Biol. Dissertation, Universität Kiel (2004)
46. Lin, Q, Lai, R, Chirieac, L R, Li, C, Thomazy, V A, Grammatikakis, I, Rassidakis, G Z, Zhang, W, Fujio, Y, Kunisada, K, Hamilton, S und Amin, H M. „Constitutive activation of JAK3/STAT3 in colon carcinoma tumors and cell lines: inhibition of JAK3/STAT3 signaling induces apoptosis and cell cycle arrest of colon carcinoma cells“. *The American Journal of Pathology* 167, Nr. 4 (2005): 969–980.
47. Liu, Y, Li, P-K, Li, C und Lin, J. „Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-apoptotic activity of IL-6 in human liver cancer cells“. *The Journal of Biological Chemistry* 285, Nr. 35 (2010): 27429–27439.
48. Liu, Y, und Lin, J. „Blocking the IL-6-STAT3 signaling pathway: potential liver cancer therapy“. *Future Oncology* 7, Nr. 2 (2011a): 161–164.

49. Liu, Y, Liu, A, Li, H, Li, C und Lin, J. „Celecoxib inhibits Interleukin-6/Interleukin-6 receptor-induced JAK2/STAT3 phosphorylation in human hepatocellular carcinoma cells“. *Cancer Prevention Research* 4, Nr. 8 (2011b): 1296–1305.
50. Llovet, J M, Di Bisceglie, A M, Bruix, J, Kramer, B S, Lencioni, R, Zhu, A X, Sherman, M, Schwartz, M, Lotze, M, Talwalkar, J und Gores, G J. „Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma“. *Journal of the National Cancer Institute* 100, Nr. 10 (2008): 698–711.
51. Maione, D, Di Carlo, E, Li, W, Musiani, P, Modesti, A, Peters, M, Rose-John, S, Della Roca, C, Tripodi, M, Lazzaro, D, Taub, R, Savino, R und Ciliberto, G. „Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver“. *The EMBO Journal* 17, Nr. 19 (1998): 5588–5597.
52. Malaguarnera, M, Di Fazio, I, Romeo, M A, Restuccia, S, Laurino, A und Trovato, B A. „Elevation of interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus“. *Journal of Gastroenterology* 32, Nr. 2 (1997): 211–215.
53. Marra, M, Sordelli, I M, Lombardi, A, Lamberti, M, Tarantino, L, Giudice, A, Stiuso, P, Abbruzzese, A, Sperlongano, R, Accardo, M, Agresti, M, Caraglia, M und Sperlongano, P. „Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview“. *Journal of Translational Medicine* 9 (2011): 171.
54. Michalopoulos, G K, und DeFrances, M C. „Liver regeneration“. *Science* 276, Nr. 5309 (1997): 60–66.
55. Michalopoulos, G K. „Liver regeneration“. *Journal of Cellular Physiology* 213, Nr. 2 (2007): 286–300.
56. Miscia, S, Marchisio, M, Grilli, A, Di Valerio, V, Centurione, L, Sabatino, G, Garaci, F, Zauli, G, Bonvini, E und Di Baldassarre, A. „Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells“. *Cell Growth & Differentiation* 13, Nr. 1 (2002): 13–18.

57. Moran, D M, Mattocks, M A, Cahill, P A, Koniaris, L G und McKillop, I H. „Interleukin-6 mediates G(0)/G(1) growth arrest in hepatocellular carcinoma through a STAT 3-dependent pathway“. *The Journal of Surgical Research* 147, Nr. 1 (2008): 23–33.
58. Moran, D M, Mayes, N, Koniaris, L G, Cahill, P A und McKillop, I H. „Interleukin-6 inhibits cell proliferation in a rat model of hepatocellular carcinoma“. *Liver International* 25, Nr. 2 (2005): 445–457.
59. Nakashima, J, Tachibana, M, Horiguchi, Y, Oya, M, Ohigashi, T, Asakura, H und Murai, M. „Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer“. *Clinical Cancer Researc* 6, Nr. 7 (2000): 2702–2706.
60. Naugler, W E, Sakurai, T, Kim, S, Maeda, S, Kim, K, Elsharkawy, A M und Karin, M. „Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production“. *Science* 317, Nr. 5834 (2007): 121–124.
61. Niu, G, Wright, K L, Huang, M, Song, L, Haura, E, Turkson, J, Zhang, S, Wang, T, Sinibaldi, D, Cappola D, Heller, R, Ellis, L M, Karras, J, Bromberg, J, Pardoll, D, Jove, R und Yu, H. „Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis“. *Oncogene* 21, Nr. 13 (2002): 2000–2008.
62. Ohishi, Waka, John B Cologne, Saeko Fujiwara, Gen Suzuki, Tomonori Hayashi, Yasuharu Niwa, Masazumi Akahoshi, Keiko Ueda, Masataka Tsuge, und Kazuaki Chayama. „Serum Interleukin-6 associated with hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study“. *International Journal of Cancer* 134, Nr. 1 (2013): 154–163.
63. Ozturk, M, Arslan-Ergul, A, Bagislar, S, Senturk, S und Yuzugullu, H. „Senescence and immortality in hepatocellular carcinoma“. *Cancer Letters* 286, Nr. 1 (2009): 103–113.

64. Park, E J, Lee, J H, Yu, G-Y, He, G, Raza Ali, S, Holzer, R G, Osterreicher, C H, Takahashi, H und Karin, M. „Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression“. *Cell* 140, Nr. 2 (2010): 197–208.
65. Perz, J F, Armstrong, G L, Farrington, L A, Hutin, Y J F und Bell, B P. „The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide“. *Journal of Hepatology* 45, Nr. 4 (2006): 529–538.
66. Pollack, R E, Green, H und Todaro, G J. „Growth control in cultured cells: selection of sublines with increased sensitivity to contact inhibition and decreased tumor-producing ability“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60, Nr. 1 (1968): 126–133.
67. Porta, C, De Amici, M, Quaglini, S, Paglino, C, Tagliani, F, Boncimino, A, Moratti, R und Corazza, G R. „Circulating Interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma“. *Annals of Oncology* 19, Nr. 2 (2008): 353–358.
68. Qin, L F, und Ng, I O. „Expression of p27(KIP1) and p21(WAF1/CIP1) in primary hepatocellular carcinoma: clinicopathologic correlation and survival analysis“. *Human Pathology* 32, Nr. 8 (2001): 778–784.
69. Rebouissou, S, Amessou, M, Couchy, G, Poussin, K, Imbeaud, S, Pilati, C, Izard, T, Balabaud, C, Bioulac-Sage, P und Zucman-Rossi, J. „Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours“. *Nature* 457, Nr. 7226 (2009): 200–204.
70. Rose-John, S. „IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6“. *International Journal of Biological Sciences* 8, Nr. 9 (2012): 1237–1247.

71. Santer, F R, Malinowska, K, Culig, Z und Cavarretta, I T. „Interleukin-6 transsignalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and Maspin expression in human prostate cancer cells“. *Endocrine-related Cancer* 17, Nr. 1 (2010): 241–253.
72. Sartor, C I, Dziubinski, M L, Yu, C L, Jove, R und Ethier, S P. „Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomous proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells“. *Cancer Research* 57, Nr. 5 (1997): 978–987.
73. Scheller, J, und Rose-John, S. „Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside“. *Medical Microbiology and Immunology* 195, Nr. 4 (2006): 173–183.
74. Shay, J W, und Bacchetti, S. „A survey of telomerase activity in human cancer“. *European Journal of Cancer* 33, Nr. 5 (1997): 787–791.
75. Sherman, M. „Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening“. *Seminars in Liver Disease* 25, Nr. 2 (2005): 143–154.
76. Siddique, A und Kowdley, K V. „Insulin resistance and other metabolic risk factors in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma“, *Clinics in Liver Disease* 15, Nr. 2 (2011): 281–296, vii–x
77. Soresi, M, Giannitrapani, L, D’Antona, F, Florena, A-M, La Spada, E, Terranova, A, Cervello, M, D’Alessandro, N und Montalto, G. „Interleukin-6 and its soluble receptor in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma“. *World Journal of Gastroenterology* 12, Nr. 16 (2006): 2563–2568.
78. Stahl, N, Boulton, T G, Farruggella, T, Ip, N Y, Davis, S, Witthuhn, B A, Quelle, F W, Silvennoinen, O, Barbieri, G und Pellegrini, S. „Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components“. *Science* 263, Nr. 5143 (1994): 92–95.

79. Stuhlmann-Laeisz, C, Lang, S, Chalaris, A, Krzysztof, P, Enge, S, Eichler, J, Klingmüller, U, Samuel, M, Ernst, M, Rose-John, S und Scheller, J. „Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells“. *Molecular Biology of the Cell* 17, Nr. 7 (2006): 2986–2995.
80. Suthaus, J, Tillmann, A, Lorenzen, I, Bulanova, E, Rose-John, S und Scheller, J. „Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth“. *Molecular Biology of the Cell* 21, Nr. 15 (2010): 2797–2807.
81. Taga, T, und Kishimoto, T. „Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines“. *Annual Review of Immunology* 15 (1997): 797–819.
82. Tanaka, H, Fujita, N, Sugimoto, R, Urawa, N, Horiike, S, Kobayashi, Y, Iwasa, M, Ma, N, Kawanishi, S, Watanabe, S, Katio, M, Takei, Y. „Hepatic oxidative DNA damage is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C“. *British Journal of Cancer* 98, Nr. 3 (2008): 580–586.
83. Tashiro, E, Tsuchiya, A und Imoto, M. „Functions of Cyclin D1 as an oncogene and regulation of Cyclin D1 expression“. *Cancer Science* 98, Nr. 5 (2007): 629–635.
84. Virchow, R. „An address on the value of pathological experiments“. *British Medical Journal* 2, Nr. 1075 (1881): 198–203.
85. Wang, Y, Li, L, Guo, X, Jin, X, Sun, W, Zhang, X und Xu, R C. „Interleukin-6 signaling regulates anchorage-independent growth, proliferation, adhesion and invasion in human ovarian cancer cells“. *Cytokine* 59, Nr. 2 (2012): 228–236.
86. Waris, G, Turkson, J, Hassanein, T und Siddiqui, A. „Hepatitis C virus (HCV) constitutively activates STAT-3 via oxidative stress: role of STAT-3 in HCV replication“. *Journal of Virology* 79, Nr. 3 (2005): 1569–1580.

87. Wege, H und Brümmendorf, T H. „Telomerase activation in liver regeneration and hepatocarcinogenesis: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?“ *Current Stem Cell Research & Therapy* 2, Nr. 1 (2007): 31–38.
88. Wege, H, Chui, M S, Le, H T, Strom, S C und Zern, M A. „In vitro expansion of human hepatocytes is restricted by telomere-dependent replicative aging“. *Cell Transplantation* 12, Nr. 8 (2003a): 897–906.
89. Wege, H, Heim, D, Lütgehetmann, M, Dierlamm, J, Lohse, A W und Brümmendorf, T H. „Forced activation of {beta}-catenin signaling supports the transformation of hTERT-immortalized human fetal hepatocytes“. *Molecular Cancer Research* 9, Nr. 9 (2011): 1222-1231.
90. Wege, H, Le, H T, Chui, M S, Liu, L, Wu, J, Giri, R, Malhi, H, Sappal B S, Kumaran, V, Gupta, S und Zern M A. „Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential“. *Gastroenterology* 124, Nr. 2 (2003b): 432–444.
91. Whittaker, S, Marais, R und Zhu, A X. „The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma“. *Oncogene* 29, Nr. 36 (2010): 4989–5005.
92. Wierzbowska, A, Urbańska-Ryś, H und Robak, T. „Circulating IL-6-type cytokines and sIL-6R in patients with multiple myeloma“. *British Journal of Haematology* 105, Nr. 2 (1999): 412–419.
93. Wollert, K C, und Chien, K R. „Cardiotrophin-1 and the role of gp130-dependent signaling pathways in cardiac growth and development“. *Journal of Molecular Medicine* 75, Nr. 7 (1997): 492–501.
94. Won, C, Lee, C S, Lee, J-K, Kim, T-J, Lee, K-H, Yang, Y M, Kim, Y-N, Ye, S-K und Chung, M-H. „CADPE suppresses Cyclin D1 expression in hepatocellular carcinoma by blocking IL-6-induced STAT3 activation“. *Anticancer Research* 30, Nr. 2 (2010): 481–488.

95. Wong, V W-S, Yu, J, Cheng, A S-L, Wong, G L-H, Chan, H-Y, Chu, E S-H, Ng, E K-O, Chan, F K-L, Sung, J J-Y und Chan, H L-J. „High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B“. *International Journal of Cancer* 124, Nr. 12 (2009): 2766–2770.
96. Wu, C W, Wang, S R, Chao, M F, Wu, T C, Lui, W Y, Peng, F K und Chi, C W. „Serum interleukin-6 levels reflect disease status of gastric cancer“. *The American Journal of Gastroenterology* 91, Nr. 7 (1996): 1417–1422.
97. Yang, J D, Nakamura, I und Roberts, L R. „The Tumor Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma: Current status and therapeutic targets“. *Seminars in Cancer Biology* 21, Nr. 1 (2011): 35–43.
98. Yu, H, Pardoll, D und Jove, R. „STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3“. *Nature Reviews. Cancer* 9, Nr. 11 (2009): 798–809.
99. Zhong, Z, Wen, Z und Darnell Jr, J E. „STAT3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6“. *Science* 264, Nr. 5155 (1994): 95–98.
100. Zimmers, T A, McKillop, I H, Pierce, R H, Yoo, J-Y und Koniaris, L G. „Massive liver growth in mice induced by systemic Interleukin-6 administration“. *Hepatology* 38, Nr. 2 (2003): 326–334.
101. Zushi, S, Shinomura, Y, Kiyohara, T, Miyazaki, Y, Kondo, S, Sugimachi, M, Higashimoto, Y, Kanayama, S und Matsuzawa, Y. „STAT3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells“. *International Journal of Cancer* 78, Nr. 3 (1998): 326–330.

9. Danksagung

PD Dr. Henning Wege danke ich besonders für die Betreuung der Dissertation, seine Unterstützung und pragmatischen Ratschläge zur Durchführung und experimentellen Planung der Arbeit, sowie in seiner Funktion als Doktor-Vater.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Lohse, der mir ermöglicht hat in seiner Klinik diese Doktor-Arbeit zu erstellen.

Besonders danke ich auch Petra Trautmann für die Einarbeitung und die vielen praktischen Hilfestellungen während der experimentellen Arbeit. Ebenso Dr. Denise Heim für ihre Hilfestellungen uns insbesondere für ihre hilfreichen Ratschläge rund um das schriftliche Erstellen der Arbeit.

Prof. Rose-John aus Kiel danke ich dafür, dass er das in dieser Arbeit verwendete Plasmid bereitgestellt hat.

Abschließend möchte ich auch meinen Eltern für ihre Verbesserungsvorschläge danken und natürlich meiner Frau für ihre seelische Unterstützung und dass sie mir immer weider den Rücken zum Schreiben der Arbeit freigehalten hat.

10. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird mein Lebenslauf in der elektronischen Version meiner Doktorarbeit nicht veröffentlicht.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: