

Die Rolle von Stat3 in Gliomen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften der
Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von Maike Priester
geboren am 11.05.1984 in Frankfurt

Frankfurt, 2011

Vom Fachbereich der Biowissenschaften der
Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekanin: Prof. A. Starzinski-Powitz

1. Gutachterin: Prof. A. Starzinski-Powitz

2. Gutachter: PD Dr. D. Kögel

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	3
2.1 Gliome: Tumoren des Zentralen Nervensystems	3
2.2 Die physiologische Funktion von Stat3.....	7
2.2.1 Aufbau und Aktivierung	7
2.2.2 Funktion von Stat3 in untransformierten Zellen	10
2.3 Stat3 als onkogener Transkriptionsfaktor	12
2.3.1 Konstitutive Aktivierung von Stat3 in malignen Gliomen	15
2.4 Stat3 als Zielstruktur für die Tumorthherapie.....	17
2.5 Syngenes Maus-Transplantationsmodell für Gliome.....	19
3 Zielsetzung	22
4 Material.....	23
4.1 Zelllinien und Primärkulturen.....	23
4.2 Zellkulturmaterial.....	23
4.3 Primäre und sekundäre Antikörper	24
4.4 Plasmide.....	24
4.5 siRNA Oligonukleotide.....	25
4.6 TaqMan-Sonden.....	25
4.7 Bakterienstämme zur Plasmidvermehrung.....	26
4.8 Verwendeter Mausstamm.....	26
4.9 Kits	26
4.10 Chemikalien, Substanzen und Verbrauchsmaterialien.....	27
4.11 Laborgeräte	28
4.12 Datenanalyse.....	29

5 Methoden.....	30
5.1 Zellbiologische Methoden.....	30
5.1.1 Subkultivierung von adhärenen Zellen (Passagieren).....	30
5.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
5.1.3 Zellzahlbestimmung und Aussaat	31
5.1.4 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen.....	32
5.1.5 Transfektion eukaryontischer Zellen mit siRNA.....	32
5.1.6 Transduktion eukaryontischer Zellen mit lentiviralen Partikeln	33
5.1.7 <i>Scratch</i> -Assay	34
5.1.8 Boyden-Chamber Assay.....	34
5.1.9 Isolierung von primären Rattenastrozyten	35
5.2 DNA- und RNA-Methoden	36
5.2.1 Plasmidvermehrung in Bakterienkultur (Transformation).....	36
5.2.2 Plasmidaufreinigung.....	36
5.2.3 Isolation von RNA aus eukaryontischen Zellen.....	37
5.2.4 cDNA-Synthese.....	38
5.2.5 Quantitative <i>real-time</i> -PCR (<i>TaqMan</i>)	38
5.3 Proteinbiochemische Methoden.....	39
5.3.1 Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen	39
5.3.2 Proteingehaltbestimmung mittels BCA-Kit	40
5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	40
5.3.4 Western Blot.....	41
5.3.5 Proteinbestimmung nach Bradford für Caspase-Assay	42
5.4 Caspase-Assay	43
5.5 Herstellung von lentiviralen Transduktionspartikeln.....	44
5.6 MTT-Assay	45
5.7 Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid.....	45
5.8 ELISA.....	46
5.8.1 ELISA für murines VEGF	46
5.8.2 ELISA zum Nachweis von aktivem Stat3.....	47
5.9 Organotypische Schnittkulturen.....	48
5.10 Transplantationsmodell.....	48
6 Ergebnisse.....	50
6.1 Der Einfluss von Kurkumin auf den Jak/Stat3 Signalweg	
<i>in-vivo</i> und <i>in-vitro</i>	50
6.1.1 Kurkumin inhibiert die Stat3 Aktivität über Januskinase 1/2.....	50
6.1.2 Kurkumin beeinflusst die Zellproliferation	51

6.1.3	Kurkumin moduliert die Expression von Stat3-Zielgenen.....	53
6.1.4	Kurkumin induziert keinen apoptotischen Zelltod.....	55
6.1.5	Die Behandlung mit Kurkumin führt zu einem G2/M Zellzyklusarrest.....	56
6.1.6	Kurkumin reduziert das migratorische und invasive Potential muriner Gliomzellen	57
6.1.7	Überexpression der Stat3-Mutante Stat3C hebt die Kurkumin-vermittelten Effekte auf	61
6.1.8	Das Überleben von tumortragenden immunkompetenten Mäusen wird durch Fütterung von Kurkumin verlängert	64
6.2	Effekte des Stat3- <i>Knockdowns</i> durch RNA-Interferenz auf murine Gliomzellen <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i>	67
6.2.1	Lentiviraler <i>Knockdown</i> in murinen Gliomzelllinien führt zu deutlich reduzierter Stat3-Expression.....	67
6.2.2	Stat3-shRNA in murinen Gliomzellen führt zu verminderter Expression von tumorpromotenden Stat3-Zielgenen auf Protein- und mRNA-Ebene	68
6.2.3	<i>Knockdown</i> von Stat3 führt zu reduzierter Invasion und Migration von murinen Gliomzellen	72
6.2.4	<i>Knockdown</i> von Stat3 beeinflusst den Hypoxie-induzierten Faktor1 (Hif1 α) in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor.....	77
6.2.5	Das Überleben von Mäusen, die einen Stat3-defizienten Tu-2449 Tumor tragen ist signifikant verlängert	80
6.2.6	Verwendung von organotypischen Schnittkulturen verdeutlicht die Invasion der Gliomzellen auf Einzelzellebene.....	82
7	Diskussion	85
7.1	Der Einfluss von Kurkumin auf den Jak/Stat3 Signalweg.... in Glioblastomen.....	85
7.1.1	Effekte von Kurkumin auf die Stat3-Phosphorylierung und Proliferation.....	86
7.1.2	Effekte von Kurkumin auf die Migration und Invasion von murinen Gliomzellen	89
7.1.3	Effekte von Kurkumin in tumortragenden Tieren.....	92
7.1.4	Kurkumin und der Jak/Stat3-Signalweg	95
7.2	Der Einfluss des Stat3- <i>Knockdowns</i> in murinen Gliomen <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i>	98
7.2.1	Effekte des Stat3- <i>Knockdowns</i> auf die Expression pro-tumorigener Stat3-Zielgene.....	98

7.2.2 Einfluss der Stat3-Depletion auf das Migrations- und Invasionspotential muriner Gliomzellen	101
7.2.3 Einfluss von Stat3 auf den Hypoxie-induzierten Faktor 1 (Hif1 α) in murinen Gliomzelllinien	105
7.2.4 Einfluss der Stat3-Depletion <i>ex-vivo</i> und <i>in-vivo</i>	106
 8 Literaturverzeichnis.....	 111
 9 Anhang.....	 127
9.1 Abkürzungsverzeichnis	127
9.2 Publikationen und Kongressbeiträge.....	129
9.3 Danksagung	131
9.4 Lebenslauf	132

1 Zusammenfassung

Das maligne Gliom, auch Glioblastom multiforme (GBM) genannt, ist der häufigste und gleichzeitig auch bösartigste hirneigene Tumor und macht rund 2% aller Krebsneuerkrankungen aus. Die Weltgesundheitsorganisation (*world health organisation*, WHO) stuft das GBM als Grad IV Tumor ein, was es als hochmalignen Tumor auszeichnet der infiltrativ in das umliegende Hirnparenchym einwandert und mit den gegenwärtigen Behandlungsmethoden, bestehend aus Resektion des Tumors, Chemotherapie und Strahlentherapie nicht kuriert werden kann. Das aggressive Wachstum und die ausgeprägte Resistenz dieses astrozytären Tumors gegenüber den verfügbaren Therapien der Bestrahlung und Chemotherapie sind Hauptgründe für die schlechte Prognose für Patienten mit Glioblastomen, deren medianes Überleben immer noch unter der Zwei-Jahres-Grenze liegt. Daher ist es von Nöten neue therapeutische Strategien auf Grundlage der Chemotherapie zu entwickeln, die selektiv wichtige, deregulierte Signalwege der Krebszelle angreifen. Einer dieser Signalwege in Gliomen ist der Stat3-Signalweg (*signal transducer and activator of transcription*). Stat3, ein latenter zytoplasmatischer Transkriptionsfaktor liegt in Gliomen oftmals konstitutiv aktiv vor. Diese Deregulation des Signalweges führt zur dauerhaften Transkription protoonkogener Zielgene die in transformierten Zellen zu Proliferation, Apoptoseresistenz, Neoangiogenese und Immunsupprimierung führen können. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern eine pharmakologische oder gentechnische Inhibierung von Stat3 molekulare und zelluläre Charakteristika von Gliomen beeinflusst. Dazu wurde für die *in-vivo* Versuche ein syngenes, murines Gliom-Transplantationsmodell verwendet dessen Pathologie der eines humanen Glioms gleicht und den Vorteil besitzt keine immunsupprimierten Tiere verwenden zu müssen. Die murinen Gliomzelllinien, gewonnen aus spontanen Gliomen von GFAP-v-*Src* überexprimierenden Mäusen, wurden vorher *in-vitro* und auch *ex-vivo* bezüglich ihres Verhaltens auf die pharmakologische oder gentechnische Inhibierung von Stat3 charakterisiert. Für die pharmakologische Inhibierung wurde Kurkumin gewählt, der biologische aktive Wirkstoff der Pflanze *Curcuma longa*. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Kurkumin konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von Stat3 in drei murinen Gliomzelllinien hemmt. Des Weiteren zeigte sich, dass auch die Proliferation der untersuchten transformierten Zellen sowie ihre Fähigkeit zur Invasion und Migration konzentrationsabhängig durch den Einsatz von Kurkumin inhibiert werden konnte, ohne dabei allerdings die Proliferation von primären Astrozyten im gleichen Maße zu hemmen. Kurkumin induziert zusätzlich in den

überaus apoptoseresistenten Gliomzellen einen G2/M Zellzyklusarrest. Diese beobachteten Effekte stehen im Zusammenhang mit der konzentrationsabhängigen transkriptionellen Beeinflussung Kurkumins der tumorpromotenden Stat3-Zielgene. Durch Einsatz einer Stat3-Mutante, Stat3C, die ohne Phosphorylierung konstitutiv aktiv in der Zelle vorliegt, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Kurkumin seinen Einfluss auf die Invasion und Migration der murinen Gliomzelllinien auch über den Stat3-Signalweg vermittelt, zeigte sich, dass durch Einbringung dieser Mutante trotz Kurkuminbehandlung die Migrations- und Invasionsfähigkeit partiell reetabliert werden konnte. Durch diätetische Gabe von Kurkumin konnte in tumortragenden Mäusen gezeigt werden, dass die *in-vitro* ermittelten Effekte an einem längeren Überleben jener Mäuse beteiligt waren, deren Futter das Kurkumin enthielt. Die Administration des Kurkumins wurde entsprechend einer für die Klinik bevorzugten Darreichungsform gewählt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde Stat3 in den murinen Gliomzelllinien durch Transduktion mit shRNA gerichtet gegen die Stat3-mRNA stabil depletiert um im Folgenden untersuchen zu können, welche zellulären und molekularen Konsequenzen konstitutiv aktives Stat3 für die Gliomzellen hat. Es zeigte sich, dass der Wegfall von Stat3 das Migrations- und Invasionspotential signifikant verringerte und die Expression tumorfördernder Zielgene ebenfalls in den Stat3-defizienten Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene signifikant reduziert war. Der Einfluss von Stat3 auf die Hif1 α -Expression, ein Transkriptionsfaktor der die Anpassung der Gliomzellen an ein hypoxisches Milieu und damit verbunden auch Migration und Invasion induziert kann, macht deutlich, dass konstitutiv aktives Stat3 unter normoxischen sowie auch hypoxischen Bedingungen *upstream* entscheidender Transkriptionsfaktoren liegt und sich somit als Zielmolekül für eine therapeutische Intervention anbietet. Eine *ex-vivo* Applikation auf organotypischen Schnittkulturen zeigte, dass durch den Wegfall von Stat3 in den murinen Gliomzellen die Einzelzellinvasion unterbunden werden konnte was entscheidend für das klinisch hochrelevante Problem der Rezidive sein könnte. Transplantierte man nun Kontroll- und Stat3-defiziente Zellen orthotrop in die immunkompetenten Mäuse zeigte die Kaplan-Meier-Kurve, dass der Krankheitsbeginn so wie das mediane Überleben in den Mäusen mit Stat3-defizientem Tumor zeitlich deutlich nach hinten verschoben war. Neben den *in-vitro* und *ex-vivo* ermittelten Effekte des Stat3-Wegfalls ist anzunehmen, dass das verlängerte Überleben dieser Mäuse auch mit der fehlenden Immunsupprimierung der Stat3-defizienten Tumore zusammenhängt. Es zeigte sich, dass eine Intervention gegen Stat3, ob nun pharmakologisch oder gentechnisch, die malignen Charakteristika des Glioblastoms positiv beeinflussen kann. Stat3, bestätigt als onkogener Transkriptionsfaktor, stellt damit eine lohnenden Zielstruktur in Gliomen dar.

2 Einleitung

2.1 Gliome: Tumoren des Zentralen Nervensystems

Primäre Tumoren des Zentralen Nervensystems machen rund 2% aller Krebsneuerkrankungen aus. Für Deutschland ergibt sich somit jährlich eine Zahl von 8000 neuen Patienten, die an einem Tumor des Gehirns oder des Rückenmarks erkranken (Statistisches Bundesamt). 60% der primären Glioblastome treten bei Erwachsenen auf, die älter als 50 Jahre sind (Wen et al., 2008, Ohgaki und Kleihues, 2005). Die Ursachen und Risikofaktoren für die Entstehung eines Hirntumors sind weiterhin unbekannt. Einzig eine direkte radioaktive Bestrahlung des Kopfes im Kindesalter erhöht das Risiko als Erwachsener an einem Tumor des Gehirns zu erkranken. In einigen wenigen Fällen geht die Erkrankung mit einer erblichen Disposition einher (Ohgaki und Kleihues, 2009).

In der Klassifizierung durch die World Health Organisation (WHO) wird das Glioblastom als ein Astrozytom Grad IV geführt (Kleihues et al., 2002). In dieser WHO-Einstufung werden die Hirntumoren nach ihrer Ursprungszelle und dem histologisch beurteiltem Malignitätsgrad I bis IV klassifiziert. Der WHO-Grad I entspricht einem niedrig-malignen das heißt einem gutartigen, langsam wachsenden Tumor mit einer günstigen Prognose. Im Gegensatz dazu wird der Grad IV bei hochmalignen Tumoren vergeben, die infiltrativ in das umliegende Hirnparenchym einwandern und mit den gegenwärtig verfügbaren Behandlungsmethoden nicht kuriert werden können. Glioblastome (WHO-Grad IV) sind die häufigsten und bösartigsten hirneigenen Tumoren (Collins, 2004, Rainov et al., 2006). Man unterscheidet zwischen zwei verschiedenen Arten des Glioblastoms multiforme (GBM). Das primäre GBM entsteht *de novo*, das bedeutet bereits die Erstdiagnose zeigt einen hochmalignen Tumor Grad IV. Im Gegensatz dazu entsteht das sekundäre Glioblastom durch Progression aus Tumorzellen eines niedrigeren Malignitätsgrades (Smith und Jenkins, 2000).

Der Ursprung eines GBM liegt vermutlich in entdifferenzierten Gliazellen (Holland, 2000). Zu den Gliazellen zählen verschiedene Zelltypen wie Astrozyten, Mikroglia und Oligodendroglia. Oligodendroglia entsprechen den Schwannschen Zellen im peripheren Nervensystem und bilden die Myelinisierung der neuronalen Axone. Die Mikroglia bilden das Immunsystem des ZNS und machen etwa 20% aller Gliazellen

aus. Mikroglia sind außerhalb des ZNS nicht anzutreffen und schützen die in der Regel nicht regenerationsfähigen Neuronen vor irreversiblen Schäden (Ghosh und Chaudhuri, 2010). Die Astroglia oder Astrozyten bilden die Mehrheit der Gliazellen im Zentralen Nervensystem. (ZNS). Ging man früher von der Annahme aus, sie würden lediglich Stützfunktionen im Gehirn übernehmen, ist man heute zu der Erkenntnis gelangt, dass sie ebenfalls an der Informationsverarbeitung im Gehirn teilnehmen, indem sie Glutamat freisetzen, das benachbarte Neuronen aktiviert (McCarty, 2009). Kommt es in Folge einer gestörten Regulierung von Proliferation und Apoptose nun zu einer Entartung von Gliazellen entstehen die Grundlagen für ein Astrozytom, ein Oligodendrogliom oder einen Misch tumor.

Die molekulare und zelluläre Heterogenität eines Glioms lässt sich nur schwer mit der Hypothese erklären, dass der Tumor allein aus einem entdifferenzierten Astrozyten hervorgegangen ist. *In-vitro* und *in-vivo* Studien zeigten, dass mit dem Oberflächenmarker CD133 positiv markierte sogenannte „Gliomstammzellen“ im Vergleich zu CD133-negativen Zellen zur Selbsterneuerung fähig sind und eine erhöhte Proliferationsrate sowie ein verstärktes Wachstum *in-vivo* besitzen (Beier et al., 2007). Jedoch zeigten andere aktuelle Studien, dass der Marker CD133 wohl nicht exklusiv als Stammzellmarker verwendet werden kann, da unter anderem auch zum Beispiel CD133-negative Darmkrebszellen in der Lage sind, einen Tumor zu bilden (Shmelkov et al., 2008).

Die Glioblastome sind zytogenetisch zumeist durch komplexe Veränderungen des Karyotyps mit multiplen, numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen charakterisiert (Muleris et al., 1994, Schröck et al., 1994, Mohapatra et al., 1995, Ohgaki, 2005, Verhaak et al., 2010). An Hand dieser genetischen Abberationen lassen sich das primäre und sekundäre Glioblastom unterscheiden. Genetische Veränderungen in Glioblastomen betreffen nicht nur Genverluste bzw. Mutationen von Tumorsuppressorgenen wie PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) und TP53 (codiert für *tumor protein 53*), sondern auch Amplifikationen von verschiedenen Protoonkogenen. Am häufigsten wird dabei das EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Gen amplifiziert und auf mRNA- und Proteinebene überexprimiert (Collins et al., 1995, Ekstrand et al., 1991). In den meisten Glioblastomen wird zu der erhöhten EGFR-Expression auch eine Überexpression der Liganden TGF α (*transforming growth factor alpha*) und/oder EGF gefunden (Mollenhauer et al., 1997).

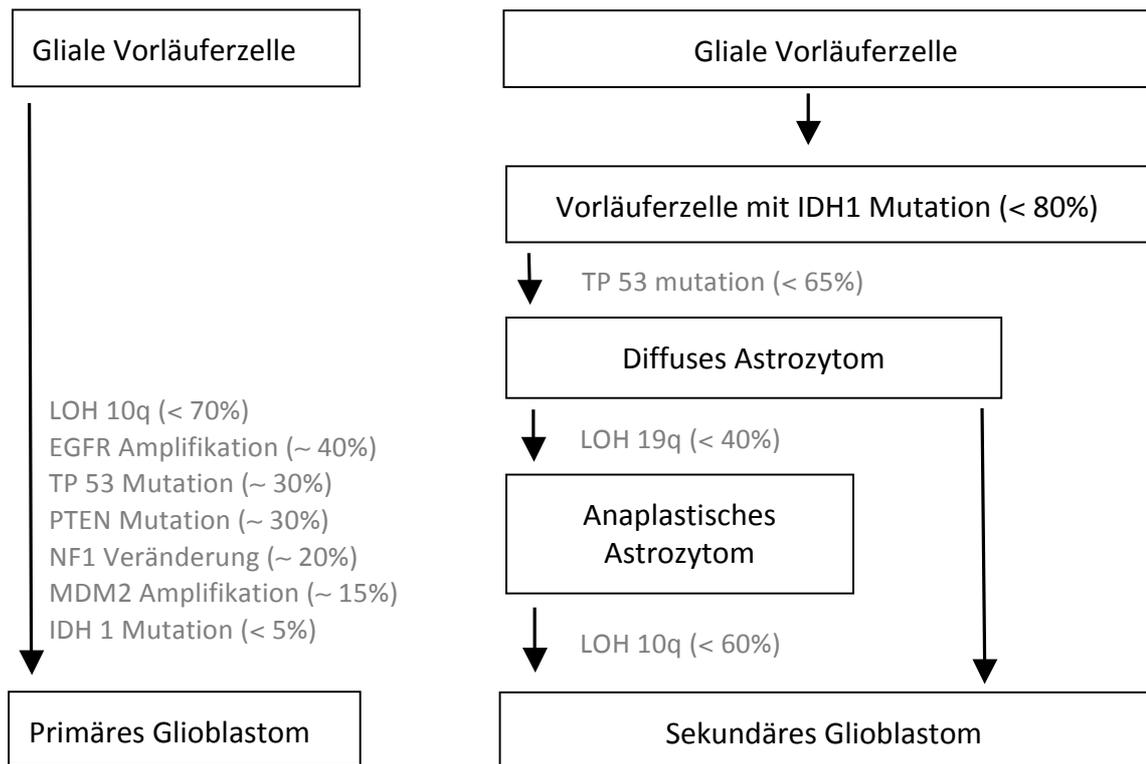


Abb. 2.1_Genetische Progressionswege des primären und sekundären Glioblastoms.

Das primäre Glioblastom entwickelt sich *de novo* in Abhängigkeit eines Chromosom 10 Verlustes, einer PTEN Mutation oder der EGFR Amplifikation, während sich das sekundäre Glioblastom aus niedriggradigen Astrozytomen bzw. Oligodendrogliomen über Mutationen, bzw. Verluste bestimmter Gene und fortschreitende Malignisierung hin entwickelt (nach Ogaki und Kleihues, 2009).

LOH: *loss of heterozygosity*, IDH1: Isozitat-Dehydrogenase 1, EGFR: *epidermal-growth-factor-receptor*, NF1: Neurofibromatose Typ1-Gen, MDM2: *murine-double-minute oncogene*

Beim GBM zeigt sich in der Histopathologie oftmals eine zentrale Nekrose die von thrombosierte Gefäßen umgeben ist. Um diese Nekrose herum und dem damit verbundenen Sauerstoff- und Nährstoffmangel befinden sich sogenannte Pseudopalisaden, ein Saum von vitalen, vermutlich in der Migration befindlichen Tumorzellen. Durch die starke Proliferation des Tumors sind viele Mitosen zu beobachten und es kommt verstärkt zu nukleären Atypien. Die Zelldichte eines GBM ist sehr hoch und durch die starke Infiltration der Tumorzellen in das angrenzende Gewebe besitzt der Tumor keine festen Grenzen sondern wächst diffus. Diese sich von dem Tumor entfernenden Zellen sind ein Hauptgrund für die ungünstige Prognose des Glioblastoms. Diese Eigenschaft führt unter anderem zu multifokalen Tumoren oder sogenannten Schmetterlingstumoren, bei denen der Tumor über den Balken hinweg in die andere Hirnhemisphäre wandert (WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (4th Edition)).

Trotz der hohen Proliferationsrate und des invasiven Phänotyps sind Fernmetastasen bei Gliomen äußerst selten. Es sind Ausnahmefälle bekannt bei denen der Tumor die Dura durchbricht oder in die Venen und damit in den Knochen metastasiert; allerdings geht solchen Fällen meist ein operativer Eingriff und eine damit verbundene Verschleppung der Tumorzellen voraus (Pedersen et al., 1994).

Obwohl das Wissen um die molekularen Eigenschaften des GMB stetig wächst, ist die Krankheit bis heute nicht heilbar. Die durchschnittliche Überlebenszeit für Patienten mit einem WHO-Grad IV Tumor beträgt einschließlich aller zu Verfügung stehenden Mittel nur rund 15 Monate (van den Bent et al., 2006, Ashby und Ryken, 2006). Die Standardbehandlung besteht aus einer möglichst kompletten Resektion des Tumors und einer adjuvanten Chemoradiotherapie mit Temozolomid (TMZ) (Stupp et al., 2007). Problematisch bei der chirurgischen Resektion erweist sich die Eigenschaft eines GBM, infiltrierend in gesundes Hirnparenchym einzuwandern (s.o.). Diese Tatsache macht eine komplette Entfernung des Tumors nahezu unmöglich und erklärt das häufige Auftreten von Rezidiven. Die Bestrahlung des Patienten zielt darauf ab, DNA-Schäden hervorzurufen, die für die Zelle nicht mehr zu reparieren und somit letal sind. Durch Einsatz eines Linearbeschleunigers entsteht hochenergetische Röntgenstrahlung die dazu in der Lage ist, in größere Körpertiefen vorzudringen. Im Gegensatz zur systemischen Gabe der Chemotherapie ist die Strahlentherapie eine rein lokale Maßnahme, die exklusiv im Bereich des Bestrahlungsfeldes wirkt.

Das Chemotherapeutikum Temozolomid verursacht DNA-Schäden durch Alkylierung und penetriert gut die Blut-Hirn-Schranke. TMZ ist ein Imidazotetrazinderivat, das seine zytotoxischen Effekte vermutlich über die Alkylierung der DNA an den O6- und N7-Residuen von Guanin vermittelt. Diese Modifikation der DNA führt bei der nächsten Zellteilung zum Abbruch der DNA-Replikation und somit zum Zelltod. Daher sind stark proliferierende Zellen wie Tumorzellen von solchen Zytostatika besonders betroffen. Die Resistenz gegenüber Alkylanzien wie Temozolomid wird unter anderem durch das DNA-Reparaturenzym O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) vermittelt (Gerson et al., 2004). Dieses Reparaturenzym kann die DNA-Alkylierung entfernen und somit eine Proliferation der Tumorzelle gewährleisten. Oftmals ist der Promotor dieses Enzyms, besonders beim GBM aber methyliert, so dass es nicht zur Expression des Proteins kommen kann, die Reparatur fehlschlägt und die Zelle in den programmierten Zelltod getrieben wird. Der MGMT-Status des Patienten ist ein daher starker Prädiktor der Sensitivität oder Resistenz gegenüber der Chemotherapie mit TMZ und wird in der Klinik routinemäßig überprüft (Etcheverry et al., 2010).

In Ermangelung medikamentöser Alternativen zu TMZ und auf Grund der gleichbleibend schlechten Überlebensprognose für den Patienten ist es für die

Zukunft wichtig, neue molekulare Angriffspunkte auszumachen, deren chemotherapeutische Intervention das Überleben der Patienten verlängert.

2.2 Die physiologische Funktion von Stat3

2.2.1 Aufbau und Aktivierung

Stat3 (*signal transducer and activator of transcription*) ist ein Signalmolekül, das zuerst in IL-6 (Interleukin) stimulierten Hepatozyten als DNA-bindendes Protein entdeckt wurde (Akira et al., 1994). Da es spezifisch an sogenannte APRE (*acute phase response element*) im Promotor des Zielgenes bindet lautete der ursprüngliche Name von Stat3 auch APRF (*acute phase response factor*).

Stat3 gehört zu einer Familie latenter zytoplasmatischer Transkriptionsfaktoren mit insgesamt sieben bekannten Mitgliedern (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b und Stat6), die im menschlichen und murinen Genom identifiziert werden konnten (Levy & Darnell, 2002). Die Funktionen als intrazelluläres Signalmolekül und gleichzeitig als Transkriptionsfaktor spiegeln sich in ihrem Domänenbau wider. Die zwischen 780 und 800 Aminosäure großen Moleküle besitzen am N-terminalen Ende eine *coiled-coil* Domäne, die es Stat-Dimeren ermöglicht ein Tetramer zu bilden. Dieser Vorgang ist zwar nicht essentiell für die Funktion der Stat-Moleküle, kann aber die Bindung an die DNA verbessern. An diesen Bereich schließt sich die DNA-Bindungs-Domäne an, die direkt im Promotor des Zielgenes an das GAS Motiv (*gamma interferon activated sequence*), einer palindromischen Sequenz der Struktur (TT(N₄₋₆)AA) bindet (Seidel et al., 1995). Entscheidend für die Aktivierung der Stat-Moleküle ist die Src-Homologie-Domäne (SH2-Domäne) mit der inaktive Moleküle an den aktivierten Rezeptor binden. Es kommt zur Phosphorylierung des Tyrosin705, die den entscheidenden Schritt in der Signaltransduktion darstellt. Die so aktivierten Stat-Moleküle dimerisieren durch Wechselwirken ihres phosphorylierten Tyrosins mit der SH2-Domäne eines zweiten phosphorylierten Stat-Proteins, wobei es sowohl zu Homo-Dimeren (z.B. Stat3/Stat3, Stat5/Stat5) als auch zur Entstehung von Hetero-Dimeren (z. B. Stat3/Stat1) kommen kann (Shuai 1994).

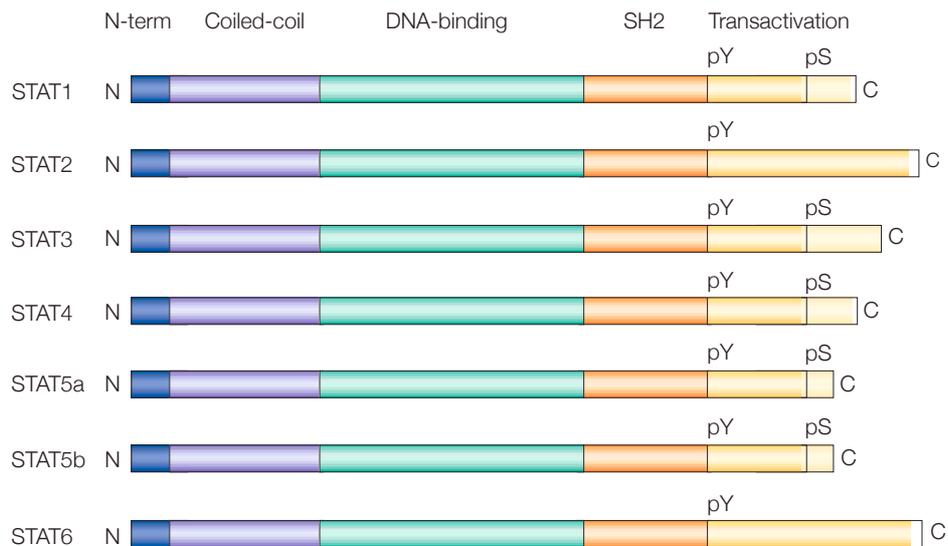


Abb. 2.2_Die Familie der Stat-Proteine. Die Stat-Proteine zeichnen sich durch fünf wichtige Domänen aus: die N-terminale Domäne, die „coiled-coil“- Domäne, die DNA-Bindungsdomäne, die SH2-Domäne und die Transaktivationsdomäne. In allen sieben identifizierten Mitgliedern der Stat-Familie findet man einen konservierten Tyrosinrest, welcher phosphoryliert werden kann und für die Aktivierung der Stats verantwortlich ist (aus Yu & Jove, 2004)

Einige Stat-Moleküle, darunter auch Stat3, können noch zusätzlich an einem Serinrest innerhalb der C-terminalen Transaktivationsdomäne phosphoryliert werden. Diese Aktivierung erhöht die transkriptionale Aktivität und wird meist durch die Kinasen Jun, Erk (extrazellulär Signal-regulierte Kinasen) oder p38 vermittelt (Yu and Jove, 2004).

Die Signalkaskade wird durch Bindung eines Liganden an seinen Zelloberflächenrezeptor gestartet. Dieser Vorgang führt meist zu Rezeptoraggregation um eine starke Signaltransduktion zu gewährleisten. Durch diese Aktivierung des Rezeptors werden seine intrazellulären Tyrosinkinasen oder rekrutierte Tyrosinkinasen wie Janus-Kinasen (JAKs) aktiviert. Es kommt zur Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb des zytoplasmatischen Teil des Rezeptors welche als Bindungsstellen für inaktive Stat-Monomere fungieren. Die Stat-Moleküle binden mit ihrer SH2-Domäne an den aktiven Rezeptor, werden phosphoryliert und können daraufhin Dimere bilden (Bowman et al., 2000).

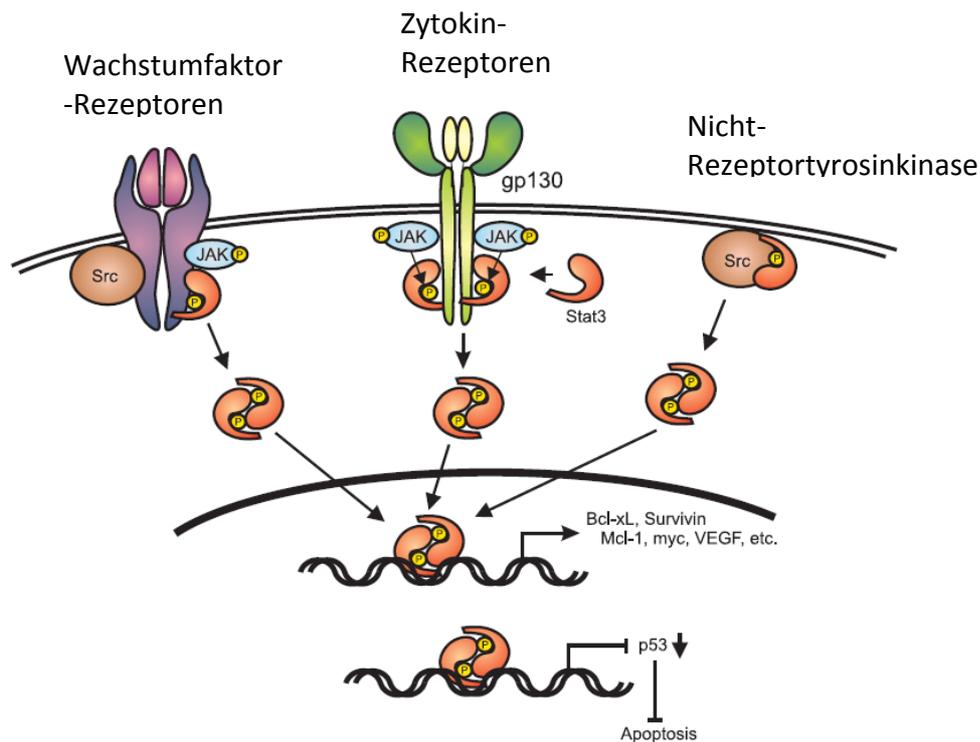


Abb. 2.3_Signalkaskade von Stat-Molekülen. Durch die Bindung eines Liganden wie z.B. Wachstumsfaktor EGF oder Zytokin IL-6 an die extrazelluläre Domäne ihrer spezifischen Rezeptoren wird die Signalübertragung gestartet. Dadurch werden intrazelluläre Tyrosinkinaseendomänen der Rezeptoren (RTK) selbst oder rekrutierte Tyrosinasen (Src, Jak) aktiviert. An diese docken Stat3-Monomere an, die dann ihrerseits phosphoryliert werden. Darüber hinaus können auch Nicht-Rezeptor-Tyrosinasen, wie Abl oder Src, Stat-Moleküle phosphorylieren. Nach ihrer Aktivierung durch Phosphorylierung des Tyrosinrest dimerisieren die Stat-Moleküle und wandern als Dimer in den Nucleus, wo sie an spezifische DNA-Elemente binden und die Transkription der nachgeschalteten Gene regulieren (aus Raptis et al., 2009)

Der Zytokinrezeptor für IL-6 besitzt keine intrinsische Kinaseaktivität sondern rekrutiert nach Aktivierung Janus-Kinasen (Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2) in verschiedenen Kombinationen aus dem Zytoplasma (Verma et al., 2003). Die IL-6-artigen wie IL-11, LIF (*leukemia-inhibitory factor*) und OSM (*oncostatin M*) bilden eine wichtige Familie im Stat-Signalweg und wirken über gp130 (Glycoprotein 130). Nach Aktivierung der Jaks werden Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil des gp130 phosphoryliert die wiederum die angedockten Stat3-Monomere aktivieren (Fu und Zhang, 1993).

Die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel EGF (*epidermal growth factor*) oder PDGF (*platelet-derived growth factor*) gehören zur Familie der Rezeptortyrosinasen und besitzen eine intrinsische Proteintyrosinaseaktivität (van der Geer et al., 1994).

Rezeptorunabhängige Stat-Phosphorylierung ist durch zytoplasmatische Tyrosinasen wie Abl oder Src möglich (Cao et al. 1996). C-Src stellt hierbei das zelluläre Homolog des Onkogens v-Src dar (Steheling et al., 1974). In v-Src

transformierten Zellen konnte gezeigt werden, dass die SH2-Domäne von Stat3 und die SH3-Domäne der Kinase interagieren und unmittelbar die Phosphorylierung am Tyrosin705 bewirken (Schlessinger et al., 2005).

Mittels ihrer SH2-Domäne binden die Stat-Monomere nun an die durch Auto- oder Kinasen phosphorylierte Rezeptoren, werden wiederum selbst aktiviert und leiten die Dimerisierung ein, ein zentrales Element der Kaskade. Durch reziproke Anlagerung zweier Stat-Moleküle bildet sich eine distinkte Struktur, die Voraussetzung für die Translokation in den Nukleus und die transkriptionelle Aktivität des Moleküls ist (Darnell et al., 1997). Die Translokation wird durch ein NLS (*nuclear localization signal*) gewährleistet, worauf ein aktiver Transport mittels Importin durch die Zellkernmembran erfolgt. Das NLS der Stat-Moleküle liegt innerhalb ihrer coiled-coiled Domäne (Ma et al., 2003). Im Zellkern befinden sich sowohl phosphorylierte also auch nicht phosphorylierte Stat-Moleküle. Erst nach erfolgter Tyrosinphosphorylierung reichern sich die Stat-Dimere im Zellkern an und regulieren die Transkription ihrer Zielgene (Marg et al., 2004). Der Export aus dem Nukleus wird durch ein NES (*nuclear export signal*) vermittelt, dessen Sequenz an Exportin bindet und den Transport zurück in das Zytoplasma vornimmt. Speziell von Stat3 ist bekannt, dass es mehrere NES-Signale besitzt, von welchen einige für den Transport des phosphorylierten Stat3 aus dem Kern, andere aber für einen von der Phosphorylierung unabhängigen Transport von Stat3 aus dem Kern zuständig sind (Reich und Liu, 2006).

Stat3 wirkt im Zellkern als promotorspezifischer Transkriptionsfaktor oder Aktivator, der von generellen Transkriptionsfaktoren (GTF) unterstützt wird. An der Transkriptionsinitiation beteiligen sich unter anderem Kofaktoren wie Histon-Acetyl-Transferasen (HATs), Histon-Deacetylasen (HDACs) und Histon-Methyl-Transferasen (HMTs). Die Koordination zwischen den Stat3-Proteinen und der Transkriptionsmaschinerie wird von Koaktivatorproteinen übernommen, einer Vielzahl von Multiproteinkomplexen, von welchen viele in der Lage sind, Chromatin zu modifizieren (Naar et al., 2001).

2.2.2 Funktion von Stat3 in untransformierten Zellen

Um die Funktionen von Proteinen im Organismus genauer erörtern und untersuchen zu können bietet es sich an das betreffende Protein schon im Embryo auszuschalten. Es zeigte sich, dass ein *Knockdown* von Stat3 letal wirkt und den Tod des Embryos zwischen Tag 6.5 und 7.5 verursacht (Takeda et al., 1997). Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, dass Stat3 schon während der Entwicklung eine zentrale Rolle einnimmt, indem es unter anderem die Pluripotenz der embryonalen Stammzellen und Proliferation im Allgemeinen gewährleistet (Matsuda et al., 1999). Konditionelle *Knockouts*, die nur einen bestimmten Zelltyp

betreffen, wurden daraufhin in Immunzellen, der Haut und den Myozyten des Herzmuskels vorgenommen. Es zeigte sich, dass Stat3 die T-Zellpopulation über die Reduzierung der Apoptoserate reguliert, indem es eine vermehrte Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 (*b-cell lymphoma*) in den Zellen verursacht (Takeda et al., 1998; Levy und Lee, 2002). In Keratinozyten führt der Wegfall der Expression von Stat3 zu einer beeinträchtigten Wundheilung, da die Migration der Zellen nicht mehr gewährleistet werden kann (Sano et al., 1999). Ein *Knockout* in Myozyten machte deutlich, dass die Aktivierung von Stat3 die Herzmuskelzellen nach einem akuten Myokardinfarkt vor hypoxie-induzierter Apoptose schützt, indem es die Expression antiapoptotischer Gene einleitet (Hilfiker-Kleiner et al., 2005). Der protektive Effekt von Stat3 wird zudem noch zusätzlich über die verminderte Expression des proapoptotischen Proteins Bax (*Bcl2-associated X protein*) unterstützt (Negoro et al., 2000).

Weiterhin ist bekannt, dass Stat3 auch in der Antwort des angeborenen Immunsystems im Falle einer Infektion eine Rolle spielt. So wird im Laufe einer bakteriellen oder aber viralen Infektion verstärk IL-6 produziert und die Stat3-Signalkaskade somit in den betreffenden Zellen aktiviert (Sehgal et al., 1988). Gesteuert wird diese Antwort durch SOCS1 (*Suppressor of cytokine signaling 1*), einem wichtigen Negativregulator von Stat3, der gewährleistet, dass die Immunantwort zum Beispiel auf Lipopolysaccharide von Bakterienwänden nicht zu einer Stat3-induzierten Überreaktion des Immunsystems führt. (Nakagawa et al., 2002).

Die bis heute bekannten physiologischen Funktionen von Stat3 verdeutlichen, dass es ein Molekül mit vielen, oftmals auch konträren Eigenschaften im Organismus darstellt. So wird neben Zellproliferation auch die Apoptose durch Stat3 positiv oder negativ reguliert. Stat3 ist essentiell für die embryonale Entwicklung und das Immunsystem und wird in allen Geweben exprimiert (Bromberg und Darnell, 2000). Die Vielfalt der zellulären Reaktionen auf eine Stat3-Aktivierung ist neben dem Gewebe und dem aktivierten Signalweg auf die große Anzahl an Zielgenen zurückzuführen. Neben den schon erwähnten antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie (Bcl-2, Bcl-X_L und Mcl-1) wird c-Myc, ein Kontrollgen des Zellzyklus, ebenfalls durch Stat3 reguliert. Ein weiteres Beispiel für die Kontrolle des Zellzyklus durch Stat3-Expression ist Cyclin-D; es ist für den Übergang der G1-Phase in die Synthesephase verantwortlich und steuert somit maßgeblich die Zellproliferation (Oh et al., 2011). Auch VEGF, der vaskuläre Wachstumsfaktor, wird transkriptionell durch Stat3 reguliert (Zhang et al., 2010). Weiterhin konnte durch die Inhibition von Stat3 festgestellt werden, dass auch MMP-9, eine Matrix-Metalloprotease durch Stat3 transkriptionell kontrolliert wird und die Regulatoren der Epithelialen-zu-Mesenchymalen-Transition (EMT), Snail und Twist, ebenfalls Zielgene von Stat3 darstellen (Weissenberger et al., 2010). Die Eigenschaft viele zentrale Zellfunktionen zu steuern legt nahe, dass eine Fehlregulation dieser Signalkaskade, wie zum Beispiel eine konstitutive Aktivierung durch autokrine

Schleifen, zu einer Transformation der Zelle führen, welches letztendlich den Grundstein für eine Krebserkrankung legen kann (Yu und Jove, 2004).

2.3 Stat3 als onkogener Transkriptionsfaktor

Die Tumorbildung und die damit verbundene Krebserkrankung ist im wesentlichen eine genetische Krankheit deren Entstehung auf der Akkumulation von Fehlregulationen beruht, die von mehreren, in der Regel somatischen Mutationen ausgeht. Durch eine abnormale Proliferation und eine gestörte Differenzierung kommt es zur Tumorentwicklung- und Progression, was im Verlauf der Erkrankung zur Überwindung der natürlichen Gewebebarrieren führen kann und, dass der Tumor in ursprungsferne Gewebe metastasiert (Sarasin, 2003). Die Entstehung dieser Mutationen reicht von intrinsischen Ursachen wie zum Beispiel einer Fehlerakkumulation während der DNA-Replikation bis hin zu extern bedingter Erbgutschädigung durch Chemikalien, Viren und UV- oder Röntgenexposition. Durch die Identifizierung der molekularen Mechanismen der Krebsentstehung konnten Signalwege ausgemacht werden, die im Vergleich zu untransformierten Zellen dereguliert sind (Hanahan und Weinberg, 2000). Eine maligne Transformation wird vor allem durch Mutationen in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und Genen ausgelöst, die für die DNA-Reparatur verantwortlich sind (Weinberg 1996). Die meisten von Protoonkogenen kodierten Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, der Wachstumskontrolle und dem Zellzyklus von normalen Zellen. Eine Mutation in diesen Genen führt zur Entstehung von Onkogenen. Onkogene kodieren für Proteine, die für den Verlust der Wachstumskontrolle und die Transformation normaler Zellen in maligne Zellen verantwortlich sind (*gain of function*). Damit einhergehend ist meistens ein Verlust von Tumorsuppressorgenen (*loss of function*), die den Zellzyklus und die Apoptose regulieren (Felsher 2003). Die Deregulation von Stat3 allerdings wird nicht durch Mutationen im Transkriptionsfaktor ausgelöst. Bis heute sind keine natürlich vorkommenden Mutanten von Stat3 bekannt (Turkson und Jove, 2000). Vielmehr kommt es zur konstitutiven Aktivierung durch mutierte oder überaktivierte *upstream*-Kinasen (Yue und Turkson, 2009).

In Krebserkrankungen konnte eine Vielzahl deregulierter Signalwege festgestellt werden. Einige wichtige von ihnen lassen sich auf die Fehlregulation weniger Transkriptionsfaktoren runterbrechen (Yu und Jove, 2004). Stat3 ist einer dieser Faktoren, da er folgende Kriterien erfüllt: Es ist hyperaktiv in vielen unterschiedlichen Tumoren. Er steuert nicht nur die Proliferation und das Überleben sondern zusätzlich andere wichtige Eigenschaften der Tumorprogression wie Neo-Angiogenese und Immunevasion. Zusätzlich sind Krebszellen auf die

Funktion des Transkriptionsfaktors mehr angewiesen als untransformierte Zellen (*oncogene addiction*). Die Stat3 Aktivierung erfolgt nicht in allen Krebsarten über den gleichen Signalweg. Beim Myelom und bei Prostatakrebs führt meist eine autokrine oder parakrine Schleife über IL-6 zur Aktivierung von Stat3 (Lu et al., 2000; Mora et al., 2003) und bei Karzinomen des Kopf- und Halsbereichs führt die Aktivierung häufig über den EGF-Rezeptor (Song et al., 2000). In Melanomen, Brust- und Lungenkrebs konnte gezeigt werden, dass die onkogene Signaltransduktion vermutlich über die deregulierte Src-Kinase läuft (Garcia et al., 2001, Niu et al., 2002; Song et al., 2003). Die Rolle von aktivem Stat3 zeigt sich deutlich in einem Versuch von Bromberg et al., die darlegen konnten, dass die Expression von Stat3C, einer konstitutiv aktiven Mutante von Stat3, in Fibroblasten zur Transformation und zur Bildung von Tumoren in Mäuse führt (Bromberg et al., 1998).

Nach erfolgter Transformation einer normalen Zelle in eine Krebszelle kommt es wie bereits angesprochen zu einer unkontrollierten Proliferation. Aktiviertes Stat3 wirkt hier über seine transkriptionellen Zielgene Bcl-X_L, Mcl-1, Survivin und c-Myc. Die antiapoptotischen Familienmitglieder der Bcl-2 Familie, Bcl-X_L und Mcl-1, sind in bestimmten Tumorarten abhängig von konstitutiv aktivem Stat3 und fördern die Proliferation durch Unterdrückung der Apoptose (Catlett-Falcone et al., 1999). Ein weiteres apoptosehemmendes Protein, welches ebenfalls durch die Aktivierung von Stat3 induziert werden kann, ist Survivin, ein Mitglied der IAP-Familie (*Inhibitor of Apoptosis*). Neben der Kontrolle der Proliferation durch Hemmung des Zelltods verhindert Stat3 zusätzlich den Eintritt der Zelle in ein post-mitotisches, differenziertes Stadium, indem es Einfluss auf die Expression von c-Myc, einem Zellzyklusregulator nimmt (Dang et al., 1999). Zusätzlich konnte von Bowman et al. gezeigt werden, dass die von Stat3 regulierte c-Myc-Expression die notwendige Voraussetzung für eine Src-induzierte Transformation einer normalen Zellen ist (Bowman et al., 2001). Neben c-Myc wird auch Cyclin-D, ebenfalls ein Zellzyklusprotein, durch konstitutiv aktives Stat3 hochreguliert, was eine Beschleunigung des Zellzyklus und damit eine gesteigerte Proliferation zur Folge hat. Weiterhin scheint Stat3 auch Einfluss auf p53 zu nehmen, einen weitverbreiteten Inhibitor der Apoptose in normalen und entarteten Zellen, der wiederum Schnittpunkt vieler Signalwege ist, die wichtig für Wachstumsarrest und Apoptose sind. Stat3 scheint die Expression von p53 herunter zu regulieren, was die Beobachtung erklären könnte, dass auch Zellen ohne vorliegende p53-Mutation (in 50% aller Fälle) einer bösartigen Transformation unterliegen können (Niu et al., 2005).

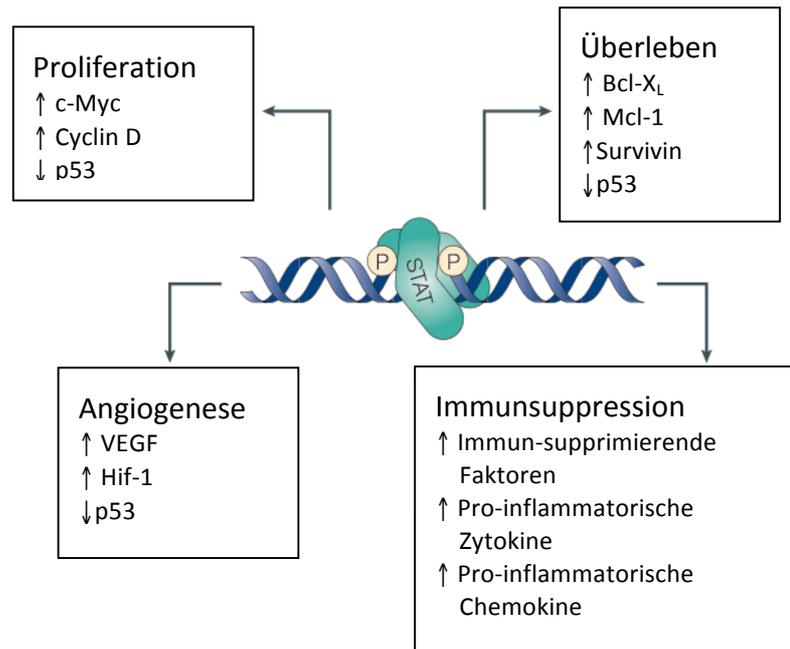


Abb 2.4_Die Rolle von Stat3 in der Tumorgenese. Tumorprogression basiert auf den Fähigkeit von Tumorzellen sich unkontrolliert vermehren zu können, resistent gegen apoptotischen Signale zu sein, verstärkte Angiogenese im Tumorgewebe zu induzieren und das Immunsystem zu umgehen. Stat3, das in zahlreichen Tumoren hyperaktiv ist, ist an der Regulation dieser malignen Prozesse beteiligt. (verändert nach Yu und Jove, 2004).

Wie oben angesprochen kommt es innerhalb des Tumors ab einer kritischen Größe zu einem „angiogenen-switch“ und der damit verbundenen Einsprossung von Blutgefäßen. Der potenteste angiogene Promotor ist VEGF. VEGF rekrutiert die Endothelzellen zur Gefäßbildung in den Tumor um den bestehenden Sauerstoff- und Nährstoffmangel aufzuheben. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF ein direktes transkriptionelles Zielgen von Stat3 ist (Wei et al., 2003). Transfiziert man Zellen mit der konstitutiv aktiven Mutante Stat3C führt die Aktivierung dieses Signalweges zu einer Induktion von Angiogenese *in vivo* (Niu et al, 2003). Stat3 wird bei diesem Vorgang nicht nur in den Tumorzellen aktiv sondern sorgt innerhalb der tumorassoziierten Endothelzellen für die rezeptorvermittelte VEGF-Signaltransduktion. Die Aktivierung von Stat3 führt im Weiteren dazu, dass der Tumor das Immunsystem umgehen kann und die unkontrolliert proliferierenden Zellen nicht durch T-Zell-Aktivierung in die Apoptose getrieben werden können. Stat3 ist an der Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen und Stickstoffmonoxid in den Immunzellen beteiligt, deren Spiegel dramatisch abnimmt wenn Stat3 in den betreffenden Monozyten oder Neutrophilen blockiert wird (Takeda et al., 1999). Zusätzlich wird durch Stat3-Aktivierung in den Tumorzellen die Reifung von dendritischen Zellen inhibiert, da der Stat3-Signalweg hemmende Faktoren wie zum Beispiel VEGF produziert und somit eine T-Zell-Toleranz herbeiführt (Yang et al., 2003). Konstitutive Aktivierung von Stat3 in Tumor- und Immunzellen resultiert daher unmittelbar in einer Hemmung

des Immunsystems und somit einer effektiven Bekämpfung des Tumors. Diese tumorbedingte Entzündung ist eine der Voraussetzungen für die Invasion der Zellen um Mikro- und nachfolgend Makrometastasen in entfernten Geweben bilden zu können (Joye und Pollard, 2009). Die Invasion der Zellen wird gewährleistet durch die Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP), die enzymatisch die extrazelluläre Matrix degradieren und den Tumor die Basallamina durchbrechen lassen. Es konnte gezeigt werden, dass MMP-2 und MMP-9 direkt transkriptionell von Stat3 reguliert werden und die Aktivierung des onkogenen Transkriptionsfaktors somit auch während des Prozesses der Metastasierung eine Rolle spielt (Polyak und Weinberg, 2009). Neben der Invasion führt die Aktivität von Stat3 auch zu einer erhöhten Zellmotilität, indem Teile des EMT-Mechanismus aktiviert werden. Durch transkriptionelle Einflussnahme auf Snail und Twist, Transkriptionsfaktoren und Hauptregulatoren der EMT, kann die Aktivierung des Programmes gewährleistet werden (Kang und Massague, 2004). Nebenbei kommt es durch Stat3-vermittelte Herabregulation von E-Cadherin zu einer Zunahme von Lamellipodien und Stressfasern in den betreffenden Tumorzellen. Das führt zu einer Veränderung des Aktinskeletts und einem Anstieg der Integrin β 6-Expression, einem Adhäsionsprotein dass mit dem Fibronektin der extrazellulären Matrix interagiert (Azare et al., 2007). Aus diesen Veränderungen resultiert eine deutlich erhöhte Zellmotilität gepaart mit invasivem Verhalten. Es wird deutlich, dass Stat3 in seiner Funktion als onkogener Transkriptionsfaktor Einfluss auf verschiedene Signalwege hat, die entscheidend für Proliferation, Neo-Angiogenese, Immunsuppression und Metastasierung sind. Diese Eigenschaften wurden von Hanahan und Weinberg als essentielle Kennzeichen maligner Tumore festgelegt und die betreffenden „*Hallmarks of cancer*“ scheinen von Stat3 und seinen Zielgenen konzertiert zu werden (Hanahan und Weinberg, 2000).

2.3.1 Konstitutive Aktivierung von Stat3 in malignen Gliomen

Dass Stat3 auch in Gliomen seine Funktion als onkogener Promotor ausübt zeigt sich deutlich an konstitutiv phosphoryliertem Stat3, dass in humanem GBM-Gewebe detektiert werden konnte (Rahaman et al., 2002; Schäfer et al., 2002, Weissenberger et al., 2004). Neben der Phosphorylierung am Tyrosinrest705 konnte zusätzlich in vielen Proben auch eine Serin727 Phosphorylierung festgestellt werden welches die Annahme zulässt, dass eine konstitutive Stat3-Aktivierung in den betreffenden Tumoren zusätzlich mit maximaler transkriptionellen Aktivität einhergeht (Wen et al., 1995).

Carro et al. konnten anhand statistischer Auswertungen eines großen Kollektives von hochgradigen Gliomen Stat3 neben C/EBP-beta (*CCAAT/enhancer binding*

protein) als treibenden Transkriptionsfaktor für die mesenchymale Transformation von Gliomzellen identifizieren. Die Aktivität dieses mesenchymalen Netzwerkes korreliert mit der Überlebenszeit des Patienten und führt zu einer schlechteren Prognose (Carro et al., 2010).

Die konstitutive Aktivierung von Stat3 erfolgt auch in Glioblastomen über vorgeschaltete, deregulierte Kinasen im Signalweg. Besonders eine Mutation des EGF-Rezeptors, EGFRvIII, ist in nahezu 50% aller Gliome zu beobachten. Die Mutation führt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors, was im Folgenden zur Daueraktivierung aller beteiligten Signalwege, auch dem Stat3-Signalweg, führt (Maher et al., 2001). Neben Rezeptortyrosinkinasen sind an der anhaltenden Stat3-Aktivierung auch Zytokinrezeptoren. Die IL6-Rezeptoraktivität wird durch Hypoxie, proinflammatorische Mediatoren und Mitgliedern der IL-6 Familie, wie IL-6 selbst und OSM, hochreguliert (van Wagoner, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die IL-6 vermittelte Stat3 Aktivierung zur Gliomgenese *in-vivo* führt (Weissenberger et al., 2004). Neben der Hyperaktivierung der Rezeptoren resultiert auch der Wegfall von Inhibitoren des Stat3-Signalweges, namentlich der SOCS Proteine (*suppressor of cytokine signaling*), in eine konstitutive Aktivierung von Stat3. Martini et al. konnten darlegen, dass die Expression von SOCS-3 mit dem Überleben der GBM-Patienten korreliert. Kommt es im Tumor zu einer Methylierung des SOCS-3 Promotors und der damit verbundenen verminderten Expression des Inhibitors, so ist die Prognose für den Patienten signifikant schlechter, basierend auf den Stat3 vermittelten protumorigenen Effekten (Martini et al., 2008).

Im Falle von Astrozytomen scheint Stat3 neben seinen zielgenvermittelten Folgen für die Tumorprogression auch während der Tumorenstehung eine Rolle zu spielen.

Wie in Kapitel 2.1 angesprochen besteht die Möglichkeit, dass sich der Tumor aus entdifferenzierten Astrozyten, glialen Vorläuferzellen und/oder aber neuralen Stammzellen entwickelt. Der Jak/Stat Signalweg ist hierbei an der Differenzierung von Gliazellen und dem Erhalt der Selbsterneuerungs-Kapazität von neuralen Stammzellen beteiligt (Bonni et al., 1997; Rajan et al., 1998). Über die Expression von BMP4 (*bone morphogenic protein*) steuert der Stat3 Signalweg die Differenzierung von Astrozyten (Rajan et al., 2003). Aktiviert man während der gliogenen Phase der Gehirnentwicklung Stat3 über den EGF-Rezeptor, so konnte gezeigt werden, dass das zu einer frühzeitigen Astrogliogenese führt (Viti et al., 2003).

Neuere Thesen von sogenannten Gliom-Stammzellen lassen vermuten, dass die Tumormasse sich aus wenigen proliferierenden Krebsstammzellen bildet, was die Beobachtung erklärt, dass auch nach einer Resektion des Tumors gerade bei GBM im weiteren Verlauf der Krankheit oftmals Rezidive diagnostiziert werden (Park und Rich, 2009; Rosen und Jordan, 2009). All diese Tatsachen machen Stat3 in vielen Tumoren, besonders aber in Gliomen auf Grund der gleichzeitigen

Beteiligung an der Gliagenese zu einem viel versprechenden Angriffspunkt für eine zielgerichtete molekulare Therapie.

2.4 Stat3 als Zielstruktur für die Tumorthherapie

Der Stat3-Signalweg kann an wichtigen Stellen wie der initialen Phosphorylierung, der Dimerisation oder der Transkription der Zielgene durch Inhibitoren unterbrochen werden, was in jedem der Fälle zum Abbruch der Signaltransduktion führt. Man unterscheidet hierbei zwischen der direkten und der indirekten Hemmung des Stat3-Signalweges.

Eine direkte Hemmung erfolgt über die Bindung eines Inhibitors an das betreffende Zielmolekül selbst. Im Falle von Stat3 wurden mehrere Methoden erfolgreich *in-vitro*, einige auch *in-vivo* getestet.

Hemmung über die SH2-Domäne:

Bei Hemmung über die SH2-Domäne wird die Region, an der das Stat3-Protein phosphoryliert wird und dimerisieren kann durch Peptide oder durch chemische Komponenten besetzt, worauf hin keine Interaktion mit den Tyrosinkinase oder einem bereits aktiven Stat3-Molekül erfolgen kann.

Speziell gefertigte Phosphopeptide besitzen eine hohe Affinität zur SH2-Domäne von Stat3. Die Behandlung von v-Src transformierten NIH-3T3 Fibroblasten mit dem Fusionspeptid der Sequenz PpYLKTK führte zur Induktion von Apoptose (Turkson et al., 2001). Des Weiteren wurden kleinere, sequenzspezifische Peptidaptamere ohne Phosphorylierung mit Hilfe von Peptidbibliotheken synthetisiert, die den Tyrosinrest 705 flankieren und somit eine Phosphorylierung unterbinden. Auch so behandelte Zellen konnten *in-vitro* in die Apoptose getrieben werden (Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, et al., 2004). Dieser Ansatz über Peptide hat allerdings den Nachteil, dass sie die Zellmembran, oder im Falle von Gliomen zusätzlich die Blut-Hirn-Schranke nur schwer passieren können, relativ instabil sind und daher eine niedrige biologische Aktivität zeigen.

Als attraktiver stellten sich chemische Stat3-Inhibitoren heraus, die kleiner, membrangängig und im zellulären Milieu stabil sind. STA-21 und Stattic (*stat three-inhibitory compound*) stören beide die Dimerisierung der Stat3-Monomere, was in Induktion der Apoptose resultierte (Song et al., 2005; Schust et al., 2006). Stattic scheint hierbei direkt den IL6/Stat3-Signalweg in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 zu beeinflussen.

Ein weiterer direkter Stat3-Inhibitor, der über die SH2-Domäne fungiert sind sogenannte „*G-quartet*“ Oligonukleotide, bestehend aus G-reichen Region die intra- und intermolekular viersträngige Strukturen ausbilden. Diese Strukturen interferieren mit den SH2 Domänen und stören die Dimerisierung, was zur Tumorprogression in Brust- und Prostata-Xenograftmodellen führt (Jing et al., 2004).

Hemmung über die DNA-Bindung:

Durch Verhinderung der Protein-DNA Wechselwirkung auf der Stat3

Promotorregion wird die Transkription der potentiell tumorfördernden Zielgene unterbunden.

Beispiele für solche Inhibitoren kommen aus der Familie der Platin IV Komponenten. Es konnte gezeigt werden, dass IS3 295 durch Blockade der Stat3 DNA-Bindungsaktivität in v-*Src* transformierten Mausfibroblasten die Zellproliferation gehemmt und gleichzeitig Apoptose induziert werden konnte (Turkson et al., 2005). Ähnliche Effekte zeigten kleine Peptide, die von der helikalen N-terminalen Region abgeleitet wurden. Sie inhibieren die transkriptionelle Aktivität von Stat3, indem sich der Transkriptionskomplex nicht mehr zusammensetzen kann und als Konsequenz die Aktivierung der Zielgene ausbleibt. Durch den Einsatz von synthetischen Ködernukleotiden (*decoy oligonucleotides*), die cis-Elemente der Konsensussequenz auf dem Promotor imitieren, kommt es zur kompetitiven Hemmung der aktiven Stat3-Dimere. Diese Interaktion führt dazu, dass der Transkriptionsfaktor signifikant seltener an die Promotorregion des Zielgens bindet, was zu einer Reduktion der Transkriptionsaktivität führt (Tomita et al., 2003). Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Stat3 *in-vivo* die Tumorprogression hemmen kann und zum programmierten Zelltod der Tumorzellen führt (Leong et al., 2003).

Hemmung über RNA-Interferenz:

Mit Hilfe der RNA-Interferenz ist es möglich, die Translation des Zielproteins zu inhibieren. Bei Einbringung von synthetisch hergestellten, doppelsträngigen siRNA (*small interfering RNA*) in die Zelle binden diese nach Spaltung durch die RNase Dicer an den Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*). Dieser bindet mit Hilfe der eingebrachten siRNA-Fragmente an die komplementäre mRNA des Zielgens und degradiert diese (Dorsett & Tuschl, 2004). In Glioblastomzelllinien führt diese Inhibitionsstrategie zu erhöhten Level an proapoptotischen Proteinen wie aktivierter Caspase 3 und gleichzeitig zu einer Abnahme an anti-apoptotischen Proteinen wie Survivin (Konnikova et al., 2003).

Indirekte Hemmung bedeutet, dass nicht Stat3 selbst das Zielmolekül darstellt, sondern die *upstream* liegenden Aktivatoren wie Rezeptortyrosinkinasen, Januskinasen und Nicht-Rezeptortyrosinkinasen. Durch den Einsatz von

Inhibitoren wird die Phosphorylierung der Kinasen unterbunden und eine Aktivierung von Stat3 verhindert.

Hemmung von Tyrosinkinasen:

Die Hemmung dieser Kinasen hat sich als die effektivste Methode zur Kontrolle der Stat3-Aktivität herausgestellt (Brantley und Benveniste, 2008). Die Blockierung des EGF-Rezeptors durch Gefitinib führt zu verminderter Stat3-Phosphorylierung wie auch die Inhibition von Januskinasen (Ciardiello et al., 2000). Besonders AG490 und WP1066 zeigen eine dosisabhängige Stat3 Hemmung und damit verbundenen Zielgenexpression anti-apoptotischer Proteine (Rahaman et al., 2003). Im Gegensatz zu AG490 konnten mit WP1066 auch *in-vivo* gute Ergebnisse erzielt werden, da es erfolgreich die Blut-Hirn-Schranke passiert und das Tumorstadium in Gliom-Xenograftmodellen reduzierte. Zudem zeigte sich eine tumorspezifische Wirkung von WP1066, da es nur Tumorzellen nicht aber Astrozyten in der Zellviabilität beeinflusst (Iwamaru et al., 2007). Auch Naturstoffe wie Kurkumin (aus der Gelbwurz) und Cucurbitacin I (aus dem Kürbis) wirken über die Januskinasen und bei Resveratrol aus der Weinpflanze konnte gezeigt werden, dass es den Stat3 Signalweg über die Hemmung der Src-Kinase steuert (Bharti et al., 2003; Blaskovich et al., 2003; Kotha et al., 2006).

2.5 Syngenes Maus-Transplantationsmodell für Gliome

Für die Untersuchung molekularer Grundlagen einer Erkrankung und die damit verbundene Etablierung möglicher Behandlungsstrategien sind Tiermodelle, die die Situation im Menschen möglichst lebensnah widerspiegeln von zentraler Bedeutung.

Beim Transplantationmodell werden die Krebszellen mit Hilfe einer Spritze in das Mäusehirn standardisiert appliziert. Prinzipiell wird bei den in der Gliomforschung eingesetzten Transplantationsmodellen zwischen dem Allograftmodell und dem Xenograftmodell unterschieden (de Vries et al., 2009). Im ersten Fall werden die Tumorzellen in diejenige Spezies transplantiert aus der sie ursprünglich isoliert wurden und im zweiten Fall unterscheiden sich Ursprungs- und Empfängerspezies. Die Transplantation von humanen Zellen bringt den Vorteil, dass die molekularen und histopathologischen Charakteristika eines humanen GBM so genau wie möglich abgebildet werden können (Hambardzumyan und Parada, 2011). In der Durchführung bedeutet das allerdings, dass für die Xenotransplantation immunsupprimierte Mäuse verwendet werden müssen damit es zu keiner Abstoßungsreaktion kommen kann. Die Abwesenheit eines funktionierenden Immunsystems und die damit korrelierte, in immunsupprimierten Mäusen häufig

beobachtete DNA-Reparatur-Störung sind zwei Hauptkritikpunkte des Xenograftmodelles (Biedermann et al., 1991).

Neben dem Transplantationsmodell wird seit Anfang der 1980er Jahre auch an genetisch veränderten Mäusen geforscht, die durch eingebrachte Mutationen Gehirntumore entwickeln. Das erste Modell dieser Art von Brinster et al entstand aus gentechnisch eingebrachten Keimbahnmutationen in Mäusen, die darauf hin virale Onkogene überexprimierten und verschiedene Krebsarten, darunter auch Hirntumore, entwickelten (Brinster et al., 1984). Im Laufe der Zeit entwickelten sich aus diesen Anfängen ausgereifere Systeme wie das Cre-Lox-System, das es erlaubt genetische Veränderungen nur in denjenigen Geweben einzuführen, die Gegenstand der Forschung sind (Macleod und Jacks 1999, Talmadge et al., 2007). Hiermit umgeht man zusätzlich das Problem der Embryoletalität bei Keimbahnmutationen. Die gängigsten gentechnischen Modelle orientieren sich an den Signalwegen, die oftmals in Gliomen verändert sind. Dazu gehört die Deletion des NF1-Gens (Neuro-Fibromatose Typ 1) auf dem Chromosom 17, die Expression eines mutierten EGF-Rezeptors und die Aktivierung des PDGF-Signalweges (Brennan et al., 2009, Phillips et al., 2006, Verhaak et al., 2010). Bislang nutze man in der Gliomforschung vor allem Xenotransplantate in immunsupprimierten Nacktmäusen. Die Verwendung von Zelllinien die sich schon lange in Kultur befinden, zeigen allerdings oftmals nicht die Heterogenität des Tumors und die invasive Neuropathologie, die für Gliome charakteristisch ist (Lee et al., 2006, Voskoglou-Nomikos et al, 2003). Die Rolle des Immunsystems in der Tumorabwehr kann aufgrund des genetischen Hintergrundes der Nacktmaus in diesem Modell überhaupt nicht untersucht werden.

Um neue Therapieansätze finden zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem Modell gearbeitet, das aus einer transgenen Maus generiert wurde, die das Onkogen *v-Src* unter dem GFAP-Promotor, dem astrozytären Marker, überexprimiert (Weissenberger et al., 1997). Von diesen Mäusen entwickeln etwa 20% spontan Gliome, die in ihrer Histopathologie den humanen Gliomen sehr ähneln. Es sind Astrogliosen zu beobachten wie auch diffuse Infiltration in das Hirnparenchym, Pseudopalisaden und zentrale Nekrosen. Zusätzlich lässt sich auch eine Progression des Tumors von niedrig- zu hochgradig feststellen. Aus diesen Tumoren wurde vier Zelllinien abgeleitet (Tu-251, Tu-2449, Tu-9648 und Tu-9668) von denen Tu-2449 und Tu-9648 subkutan und ins Striatum appliziert in syngenen B6C3F1 Mäusen anwachsen. Auch diese Tumoren zeigen wie die parentalen die typischen Eigenschaften humaner Gliome. Einen zusätzlichen Vorteil der Transplantation gegenüber der Verwendung transgener Tiere ist die hohe Anwachsrate der Tumore, die schnelle Tumorbildung, der ähnliche zeitliche Verlauf der Krankheit in den einzelnen Tieren und die Verwendung eines kommerziell erhältlichen, immunkompetenten Mäusestamms (Smilowitz et al., 2007). Da die Zelllinien gut unter Laborbedingungen zu kultivieren sind, kann mit den methodischen Ansätzen für eine Therapie *in-vitro* und *in-vivo* geforscht

werden. Dieses Modell vereint die Vorzüge der genetisch veränderten Mausmodelle (gutes Abbild der histopathologischen und genetischen Charakteristika des Glioms) mit denen des Transplantationsmodell (disinkter Transplantationsort und Zellmenge garantieren Reproduzierbarkeit der Versuches).

Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorentstehung in diesem Modell von IL-6 abhängig ist, und die maligne Progression über die Aktivierung von Stat3 gesteuert wird. Durch die von v-Src vermittelte konstitutive Phosphorylierung von Stat3 kann seine Rolle in Gliomzellen optimal untersucht werden und durch pharmakologische oder durch siRNA-basierte Intervention die Abhängigkeit der Tumorzelle vom Onkogen Stat3 sichtbar gemacht werden (Weissenberger et al., 2010, Priester et al., unpublished).

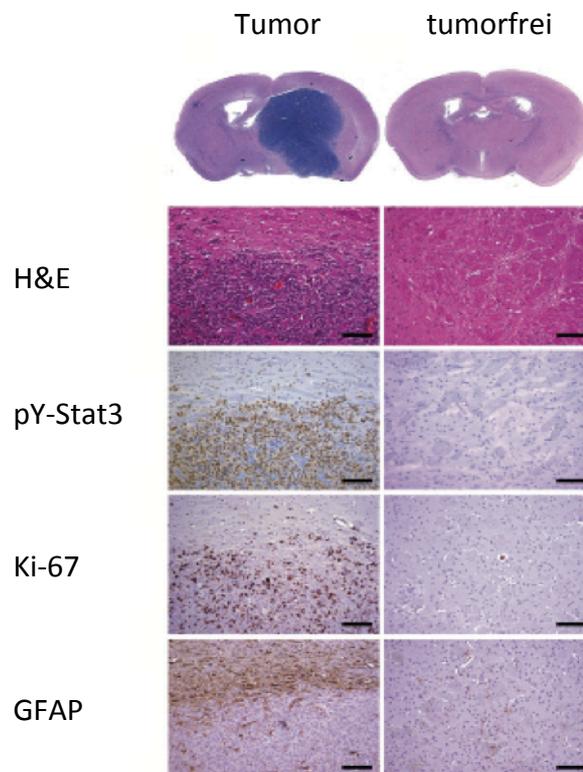


Abb 2.5_Histologie der transplantierten Tumore der Zelllinie Tu-2449 im syngenem Mausmodell. Die H&E-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) zeigt Veränderungen der Gewebestruktur auf und macht die zelluläre Dichte im Tumor deutlich. Innerhalb des Tumor lässt sich eine Aktivierung von Stat3 sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 feststellen. Die Färbung von GFAP (Sauerer Gliafaserprotein, *glial fibrillary acidic protein*) zeigt eine reaktive Astrogliose, die oft bei pathologischen Veränderungen des Hirns, wie Schlaganfällen, epileptischen Anfällen und Hirnverletzungen beobachtet wird. Ebenfalls wird deutlich, dass der Tumor keine feste Abgrenzung hat sondern diffus in das umliegende Hirnparenchym einwandert.

3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll ermittelt werden, welche Rolle der onkogene Transkriptionsfaktor Stat3 (*signal transducer and activator of transcription*) in murinen Gliomzellen spielt und welche Folgen bezüglich der Charakteristika der Gliomekrankung eine pharmakologische und gentechnische Inhibition von Stat3 hat. Da diese Krebserkrankung bis heute nicht kurativ behandelbar ist, ist es wichtig für die Zukunft geeignete Zielstrukturen zu identifizieren, die eine Verwendung in chemotherapeutischen Maßnahmen finden könnten.

Für die nachfolgenden Versuche wurden murinen Gliomzelllinien verwendet, die aus spontanen Tumoren von transgenen GFAP-v-Src überexprimierenden Mäusen stammen. Durch diese Überexpression der Nichtrezeptor-Tyrosinkinase v-Src kommt es in den Zellen zur konstitutiven Aktivierung von Stat3, was die betreffenden Zelllinien zu einem optimalen Testsystem für die vorliegende Fragestellung machen. Es sollte festgestellt werden, wie eine Behandlung mit Kurkumin, dem biologische aktiven Wirkstoff der Pflanze *Curcuma longa*, die Aktivierung von Stat3 beeinflusst und welche zellulären und molekularen Konsequenzen sich für die Gliomzelle daraus ergeben. Dafür wurde die Transkription der Stat3-Zielgene auf mRNA-Ebene untersucht, sowie das Migrations- und Invasionspotential der murinen Gliomzellen mit Hilfe zellbiologischer Assays. Durch Verwendung einer aktiven Stat3-Mutante, Stat3C, sollte im Folgenden gezeigt werden welche Effekte des Kurkumins, einer pleiotropischen Substanz, durch Stat3 vermittelt werden.

Neben der pharmakologischen Inhibition sollte durch Deletion von Stat3 mit Hilfe von RNA-Interferenz die Rolle des Transkriptionsfaktors in den murinen Gliomzellen untersucht werden. Wieder sollte die Expression der tumorpromotenden Zielgene untersucht werden sowie die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Stat3-defizienten Zellen. Neben den *in-vitro* Versuchen sollte das Invasionspotential auch *ex-vivo* mit Hilfe von organotypischen Schnittkulturen untersucht und charakterisiert werden.

Beide Ansätze, pharmakologisch und gentechnisch, sollten im Anschluss auch in einem syngenem Maus-Modell getestet werden um den Einfluss dieser beiden Herangehensweisen auf das Gesamtüberleben der tumortragenden Tiere untersuchen zu können.

4 Material

4.1 Zelllinien und Primärkulturen

Tab. 4.1_Zelllinien und Primärkulturen

Bezeichnung	Ursprung
Tu-2449	abgeleitet aus einem spontanen Gliom einer GFAP- <i>v-src</i> transgenen Maus (Weissenberger et al., 1997)
Tu-9648	abgeleitet aus einem spontanen Gliom einer GFAP- <i>v-src</i> transgenen Maus (Weissenberger et al., 1997)
Tu-251	abgeleitet aus einem spontanen Gliom einer GFAP- <i>v-src</i> transgenen Maus (Weissenberger et al., 1997)
HEK-293T	humane Embryonenkarzinom-Zelllinie aus der Niere
Primäre Rattenastrozyten	Unilever Wistar-Ratten

4.2 Zellkulturmaterial

Tab. 4.2_Zellkulturmaterial

Material	Herstellung/Vertrieb
45% Glukoselösung	Sigma-Aldrich, München
BME Basales Eaglemedium	Invitrogen, Karlsruhe
DharmaFect 1	Dharmacon, Waltham USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DMEM Dulbecco's modified Eaglemedium, Glutamax (4,5g/L Glukose)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
FuGENE Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
MEM Minimum essentiell Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM, reduziertes Medium	Invitrogen, Karlsruhe
PBS Puffer (1x, nach Dulbecco-Pulver)	AppliChem, Darmstadt
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin- und Penicillinlösung	Invitrogen, Karlsruhe

Trypsin/EDTA

Invitrogen, Karlsruhe

4.3 Primäre und sekundäre Antikörper

Tab. 4.3 _Primäre und sekundäre Antikörper

Primärantikörper	Typ	Hersteller/Artikelnummer
Anti-Cyclin-D1	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverly, USA (#2922)
Anti-GAPDH	monoklonal, Maus	Calbiochem, Cambridge, UK (#1001)
Anti-Hif1 α	polyklonal, Kaninchen	Novus Biologicals, Littelton, USA (#NB100-479)
Anti-MMP2	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverly, USA (#4022)
Anti-phospho JAK1 (Tyr 1022/1023)	polyklonal Kaninchen	Calbiochem, Cambridge, UK (#420092)
Anti-phospho JAK2 (Tyr 1007/1008)	polyklonal, Kaninchen	Calbiochem, Cambridge, UK (#PS1014)
Anti-Phospho-Stat3 (Tyr 705)	monoklonal, Maus	Cell Signaling Technology, Beverly, USA (#9131)
Anti-Snail	polyklonal, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK (#17732)
Anti-Stat3 (C-20)	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg (#sc- 482)
Sekundärantikörper	Typ	Hersteller/Artikelnummer
Anti-Kaninchen	IRDye 680	LI-COR, Lincoln, USA (#926- 32221)
Anti-Kaninchen	IRDye 800	LI-COR, Lincoln, USA (#926- 32211)
Anti-Maus	IRDye 680	LI-COR, Lincoln, USA(#926- 32220)
Anti-Maus	IRDye 800	LI-COR, Lincoln, USA (#926- 32210)

4.4 Plasmide

Tab. 4.4 _Plasmide

Bezeichnung	codiert für	Publikation
pCMVR8.91	Plasmid für eukaryontische Expression von Core Protein zur	AG Groner (Zufferey et al., 1997)

Verpackung von Lentiviren		
pMD2.VSVG	Plasmid für eukaryontische Expression von Hüllprotein des Vesicular Stromatitisvirus zur Herstellung von Lentiviren	AG Groner (Follenzi & Naldini, 2002)
pYN3218	Leervektor für Kontrollversuche	Joo-Yeon Yoo, J Biol Chem. 2001
pYN3218-Stat3C	Plasmid für eukaryontische Expression von konstitutiv aktivem Stat3	Joo-Yeon Yoo, J Biol Chem. 2001
SEW Vektor	Leervektor für Kontrollversuche	AG Groner (Demaison et al., 2002)
SEW-shStat3	Plasmid für lentiviralen Gentransfer von small hairpin RNA gegen Stat3	AG Groner (Gao et al., 2005)

4.5 siRNA Oligonukleotide

Tab. 4.5_siRNA Oligonukleotide

Bezeichnung	Hersteller
murines Hif1 α α	Dharmacon, Waltham, USA (#D-040638-01-001 und #040638-03-001)
ungerichtete Kontroll-siRNA	Dharmacon, Waltham, USA (#D-001210-01-20)

4.6 TaqMan-Sonden

Tab. 4.6_TaqMan-Sonden

mRNA-Name	Sondenbezeichnung	Hersteller
Bcl-2	Mm0047763_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bcl-Xl	Mm00437783_M1	Applied Biosystems, Foster City, USA
c-Myc	Mm00487804_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
HPRT	Mm00446966_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ki-67	Mm01278617_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
MMP2	Mm00439506_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA

MMP9	Mm00600163_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Podoplanin	Mm00494716_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Snail	Mm01249564_g1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Stat3	Mm01219775_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Twist	Mm00442036_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
VEGF	Mm1281449_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA

4.7 Bakterienstämme zur Plasmidvermehrung

Tab. 4.7_Bakterienstämme zur Plasmidvermehrung

Bezeichnung	Hersteller
<i>E. coli</i> -DH5- α	Invitrogen, Karlsruhe

4.8 Verwendeter Mausstamm

Tab. 4.8_Verwendeter Mausstamm

Bezeichnung	Hersteller
B6C3F1	Harlan-Winkelmann, Borchen

4.9 Kits

Tab. 4.9_Kits

Bezeichnung	Hersteller
Endo Free Plasmid Kit Maxi	Qiagen
BCA Protein Assay Kit	Uptima, Köln
Qiashredder	Qiagen, Hildesheim
RNeasy Kit	Qiagen, Hildesheim
Quantakine <i>mouse</i> VEGF	R&D Systems, Minneapolis, USA
TransFactor Kit	Clontech, Mountain View, USA

4.10 Chemikalien, Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Tab. 4.10_Chemikalien, Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamide-Bis Lösung (37,5:1) 40 % (PAA)	Serva, Heidelberg
Ampicillin sodium salt	AppliChem, Darmstadt
Aprotinin	Alexis, Grünberg
APS (Ammoniumpersulfat)	AppliChem, Darmstadt
Aqua ad injectabilia Delta-Pharma	Delta Pharma, Boehringer
BD Matrigel Invasion Chambers 24 well	BD Biosciences, Heidelberg
beta-Mercaptoethanol-2	Fulka, Neu-Ulm
BM Cyclin	Roche, Mannheim
BSA (Albumin bovine serum)	Sigma, Deisenhofen
Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-AMC)	Eppendorf, Hamburg
Chloroquine	Sigma, Deisenhofen
Curcumin	LKT Laboratories
dNTP Mix (10mM)	Invitrogen, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific, Bremen
Halt Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific, Bremen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Ketamin 10%	Park-Davis, Ann Arbor, USA
Kristallviolett	Neolab, Heidelberg
Leupeptin Hemisulfat	AppliChem, Darmstadt
Luria Agar (Miller's LB Broth Base)	Invitrogen, Karlsruhe
Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Millicell-CM Transwell Membraneinsatz	Millipore, Eschborn
Mitomycin C	Sigma, Deisenhofen
Nitrozellulose Membran	Schleicher & Schüll, Heidelberg
Oligo (dt) Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Papain	Janssen, Beerse, Belgien
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Pepstatin A	AppliChem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Polybren (Hexadimethrin Bromid)	Sigma, Deisenhofen
Precision Plus Protein, Dual Color Standard	Bio-Rad, Hercules, USA
Propanol (Isopropanol)	Sigma, Deisenhofen
Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe

RNaseZap	Ambion, Darmstadt
Rompun 2%	Bayer, Leverkusen
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe
SDS (Dodecylsulfat-Na)	MP Biomedicals, Aurora, USA
Serologische Pipetten	VWR, Darmstadt
Simply Blue Safe Stain	Invitrogen, Karlsruhe
Staurosporine	Alexis, Grünberg
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
TaqMan Universal Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma, Deisenhofen
Thiazolyl Blau Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma, Deisenhofen
Triton x-100	Sigma, Deisenhofen
Trypan Blau	Bio Whittaker,
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Vetranquil 1%	Ceva, Düsseldorf
Zellkulturflaschen, -schalen, -platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen

4.11 Laborgeräte

Tab. 4.11_Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Autoklav Systec 2540 EL	Systec, Wettenberg
Autoklav Varioklav	Biomedis, Gießen
BD FACS Canto II V96100345	BD Biosciences, Gießen
Bio Rad Mini Protean Tetra cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Bio Rad Power Pac HC	Bio-Rad, Hercules, USA
Bio Rad Transblot SD Semi-dry -Transfer-Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
BL1500S Waage	Sartorius, Göttingen
Cleanbench (Heraeus)	Heraeus, Hanau
Clenbench (TECNOFLOW)	Integra Biosciences, Fernwald
Falkonroller	Karl Hecht KG, Sondheim
Falkonroller Typ RM 5	Karl Hecht KG, Sondheim
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gelstand für SDS-Page	Bio-Rad, Hercules, USA
Hera Cell 150 Zellkulturschrank	Heraeus, Hanau
Inversmikroskop Eclipse TE300	Nikon, Düsseldorf
Konfokales Mikroskop (LSM Pascal)	Zeiss, Jena

Milli-Q Reinstwasseranlage	Millipore, Bedford, USA
Mini Spin Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Nikon C1 i Konfokales Mikroskop	Nikon, Melville, USA
Nikon Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE2000-S	Nikon, Melville, USA
Nikon Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE2000-S	Nikon, Melville, USA
Odyssey Infrared Scanner	LI-COR, Lincoln, USA
pH-Meter	Schott Instruments, Mainz
Sanjo CO2 Inkubator	Thermofisher, Bremen
TaqMan Step-One Plus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Tecan Reader Genios	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge	Hereaus, Hanau
Tischzentrifuge fresco	Hereaus, Hanau
UV Spektrometer	Pharmacia, Freiburg
Vakuumpumpe	Bio-Rad, Hercules, USA
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad	Minitüb, Tiefenbach

4.12 Datenanalyse

Tab. 4.12_Datenanalyse

Bezeichnung	Hersteller
SPSS Statistikprogramm	SPSS, München
Endnote	Thomson ISI ReasearchSoft
GraphPad Prism 4	Graphpad Software. San Diego,USA
Adobe Illustrator CS3	Adobe Systems, Mountain View, USA
Adobe Photoshop	Adobe Systems, Mountain View, USA

5 Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Subkultivierung von adhärennten Zellen (Passagieren)

In Zellkulturen lassen sich immortalisierte Zellen z.B. Tumorzelllinien halten. Die in dieser Arbeit verwendeten Tu-2449, Tu-9648 und Tu-251 Zelllinien wachsen adhärennt. Die Zellen wurden zwei bis dreimal pro Woche passagiert, bevor sie eine 90-100% Konfluenz erreicht hatten.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden steril an einer Zellkulturbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Sterile Medien und Puffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C temperiert. Das Kulturmedium DMEM 4,5g/L Glukose wurde mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Pen/Strep versetzt. Das Serum wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56°C inaktiviert und gefiltert (Filterporengroße 0,22 µm). Die Subkultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre und hoher Luftfeuchtigkeit in einem Zellkulturbrutschrank.

Durchführung

- Das alte Medium wurde mit einer Pasteurpipette aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen
- Die adhärennten Zellen wurden mit 3 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst
- Die abgelösten Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und gut resuspendiert
- Die gewünschte Menge an Zellsuspension wurde (1:10) in der Flasche belassen und auf 25 ml Gesamtvolumen mit Kulturmedium aufgefüllt
- Die passagierten Zellen wurden im Zellkulturbrutschrank bei 37°C kultiviert

5.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Kryokonservieren von Zellen dient vor allem der Sicherung und langfristigen Lagerung der entsprechenden Zelllinie bei -80°C oder im Stickstofftank. Die

Gegenwart von DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen zerstören könnten.

Einfrieren

- In einer 175 cm³ Zellkulturflasche wurde die Zelllinie bis zu einer 70%igen Konfluenz kultiviert und nach dem Abtrypsinieren durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 3 min pelletiert
- Das Zellpellet wurde anschließend in Kulturmedium und Einfriermedium, bestehend aus 80% fötalem Kälberserum und 20% DMSO, im Verhältnis 1:1 resuspendiert
- Je 1,2 ml der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und in eine Einfrierhilfe gestellt. Diese Kryobox wurde mit Isopropanol gefüllt, welches das Abkühlen im -80°C Gefrierschrank auf 1°C/min verlangsamt
- Nach 24 h konnten die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt werden

Auftauen

- Die eingefrorenen Zellen im Kryoröhrchen wurden rasch durch wiederholte Zugabe von warmen Kulturmedium aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen überführt
- Die Zellsuspension wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 10 ml mit Kulturmedium aufgefüllt
- Die Zentrifugation erfolgte mit 1000 rpm für 3 min bei Raumtemperatur
- Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen, in eine Zellkulturflasche überführt und im Zellkulturbrutschrank kultiviert

5.1.3 Zellzahlbestimmung und Aussaat

Um die Zellen mit Substanzen behandeln oder in Tiere transplantieren zu können, ist es wichtig, die im Experiment eingesetzte Zellzahl bestimmen zu können. Dafür ist es notwendig, tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können. Dazu wurde eine Trypanblau-Färbung vorgenommen. Lebende Zellen bleiben farblos, während tote Zellen aufgrund defekter Zellmembranen den Farbstoff aufnehmen und blau erscheinen. Die Zellzahl in der Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauerkammer ermittelt. Die Zellzahl pro ml errechnet sich aus der Anzahl der Zellen eines Großquadrates multipliziert mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor. Für jede Zellzahlbestimmung wurden vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt.

Durchführung

- Die resuspendierte Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,4% Trypanblaulösung versetzt

- Das Deckgläschen wurde auf die Zählkammer gedrückt und ca. 10 µl der Suspension in die Kammer gefüllt
- Mit Hilfe des Mikroskops wurden dann die ungefärbten Zellen ausgezählt, die Zellzahl ermittelt und in der gewünschten Verdünnung ausgesät

5.1.4 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen

Als Transfektion bezeichnet man die Aufnahme einer DNA-Sequenz in eine Säugerzelle. Man unterscheidet zwischen der transienten Transfektion, bei der die DNA-Sequenz nur temporär in die Zelle auf einem Plasmid aufgenommen wird, und der stabilen Transfektion, bei der die DNA-Sequenz ins Genom der Zelle integriert wird. Hierfür wurden die Zellen subkonfluent ausgesät (ca. 70%) und vorübergehend in serumfreiem Opti-MEM Medium kultiviert. Die Angaben beziehen sich auf eine Transfektion im 6-Well Format. In der vorliegenden Arbeit wurde im Folgenden die Überexpression von Stat3C im Western Blot ermittelt.

Durchführung

- Für jede Plasmid-DNA wurden zwei Transfektionsansätze vorbereitet; einer bestehend aus 0,5 µg DNA und 50 µl Opti-MEM und einer bestehend aus 50 µl Opti-MEM und 2,5 µl FuGENE Transfektionsreagenz
- Die Ansätze wurden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und in dieser Zeit das Kulturmedium der Zellen gegen serumfreies Opti-MEM ausgetauscht
- Die beiden Transfektionsansätze wurden vereinigt und auf die Zellen gegeben
- Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium durch Kulturmedium ersetzt

5.1.5 Transfektion eukaryontischer Zellen mit siRNA

Die Expression bestimmter Proteine in eukaryontischen Zellen kann durch kurze doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) gemindert beziehungsweise inhibiert werden. Bei dieser sogenannten RNA-Interferenz werden die dsRNA-Moleküle in der Zelle durch eine Typ III-RNase (*Dicer*) in siRNAs prozessiert, die 21 - 23 Nukleotide enthalten. In diesem Fall wurden die siRNA synthetisch hergestellt und direkt transfiziert. Die siRNA wird im Zytoplasma entwunden und dann als einzelsträngige siRNAs in den hochmolekularen Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) integriert. Dieser bindet nun, in seiner aktiven Form, an eine komplementäre Ziel- mRNA-Sequenz und degradiert diese. Die Transfektion der Zellen erfolgte im 6-Well Format bei 70%iger Konfluenz und die

so herbeigeführte Verringerung der Proteinexpression von z.B. Hif1 α wurde im Western Blot ermittelt.

Durchführung

- Für jede siRNA wurden zwei Transfektionsansätze vorbereitet; einer bestehend aus 50 μ g siRNA und 190 μ l Opti-MEM und einer bestehend aus 5 μ l DharmaFECT und 195 μ l Opti-MEM
- Die Ansätze wurden 5min bei Raumtemperatur inkubiert, vereinigt und nochmals für 20 min inkubiert
- Das Kulturmedium wurde abgenommen und durch 1600 μ l Opti-MEM ersetzt bevor der Transfektionsansatz dazugegeben wurde
- Nach 24 h wurde das Opti-MEM durch Kulturmedium ersetzt

5.1.6 Transduktion eukaryontischer Zellen mit lentiviralen Partikeln

Bei dieser Art von Transfektion wird die Tatsache ausgenutzt, dass Lentiviren ihr Genom stabil in die Wirts-DNA integrieren und somit eine Langzeitexpression der gewünschten shRNA in der Wirtszelle garantieren. Basierend auf dem Prozess der RNA-Interferenz wird die Expression des zu betreffenden Proteins inhibiert. Die Transduktion erfolgte unter S2 Bedingungen. Die Gliomzellen wurden im 6-Well Format ausgesät und bei einer Konfluenz von 70% mit nicht replikationskompetenten Lentiviren transduziert. Der Nachweis der so herbeigeführten Expressionshemmung des betreffenden Proteins erfolgte im Western Blot.

Durchführung

- Das Kulturmedium der Zellen wurde durch neues Kulturmedium mit 8 μ g/ml Polybren ersetzt
- 10 μ l der selbsthergestellten Viruspartikel wurden in das Medium pipettiert und um die Transduktionseffizienz zu erhöhen wurde die Platte bei 2000 rpm für 30 min bei 32°C zentrifugiert
- Das Medium wurde nach 24 h ersetzt und der Überstand als S2 Abfall entsorgt

Die Zellen, die nun das gewünschte Gen stabil in sich tragen, fallen fortan unter S1 Sicherheitsbestimmungen und können vom S2 in den S1-Bereich überführt werden

5.1.7 *Scratch*-Assay

In diesem auch Wundheilungs-Assay genannten Versuch wird das migratorische Potential der Zellen ermittelt. Ein konfluenter Zellrasen wird mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze verwundet und nach 16 h werden die Zellen gezählt, die in die Wunde eingewandert sind. Zuvor werden die Zellen mit einem Spindelgift behandelt damit keine neu entstandenen Zellen das Zählergebnis verfälschen.

Durchführung

- Ein konfluenter Zellrasen wurde 2 h vor dem *Scratch* mit 10 µg/ml Mitomycin C behandelt
- Nach Ablauf der 2 h wurde der Zellrasen mit einer gelben Pipettenspitze in der Mitte des Wells verwundet, das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und neues Medium auf die Zellen gegeben (bei Behandlung der Zellen Kulturmedium mit entsprechender Substanz auf die Zellen geben)
- Der 0 h Zeitpunkt wurde mit der vierfachen Vergrößerung am Mikroskop fotografiert und die Koordinaten dieses Ausschnittes notiert
- Nach 16 h wurde der gleiche Ausschnitt wieder fotografiert
- Für die Auswertung wurden die Zellen gezählt, die zwischen dem 0 h und dem 16 h Zeitpunkt in die Wunde eingewandert waren

5.1.8 Boyden-Chamber Assay

Dieser Versuch ermittelt das transmigratorische Potential einer Zelle, das heißt die Fähigkeit eine extrazelluläre Matrix zu degradieren und eine enge Pore zu durchwandern. Mit Hilfe von Matrix-Metalloproteasen durchdringen die Zellen eine Matrigelbeschichtung, die auf Invasionskammern aufgetragen wurde. Hierbei nutzt man die Chemotaxis aus, indem man die Zellen in 2%igem FCS Kulturmedium in der oberen Kammer aussät und unten in das Well 10%iges Medium hinein pipettiert. Nach Degradierung der Matrix passieren die Zellen die Poren in den Invasionskammern, haften an der Unterseite und können dann fixiert, angefärbt und ausgezählt werden. Das Experiment wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Durchführung

- Die Matrigelkammern wurden 2 h vor Gebrauch mit 500 µl DMEM ohne FCS und Pen/Strep rehydriert und im Brutschrank aufbewahrt
- Die Zellen wurden abtrysiniert, pellettiert und in Kulturmedium mit 2% FCS aufgenommen
- Die erhaltene Zellsuspension wurde auf 50.000 Zellen/ml eingestellt

- Das untere Well wurde mit 10%igem FCS Kulturmedium bestückt, die Invasionskammer eingesetzt und mit 500 µl der Zellsuspension befüllt
- Nach 24 h im Brutschrank wurde die Zellsuspension aus der Kammer abgesaugt und mit einem Wattestäbchen die Matrigelbeschichtung abgetragen
- Die Unterseite der Kammer wurde 2 min in Methanol fixiert und weitere 2 min in einer 0,1%igen wässrigen Kristallviolettlösung angefärbt
- Nach dreimaligem Waschen in Wasser wurden die Kammern für circa 1 h getrocknet
- Die Auswertung erfolgt unter dem Mikroskop durch Auszählung von 10 Sichtfeldern in vierfacher Vergrößerung aus denen ein Mittelwert gebildet wird

5.1.9 Isolierung von primären Rattenastrozyten

Die schwangeren Wistar-Ratten wurden von der Firma Harlan bezogen und nach den geltenden Standards in der Zentralen Forschungseinrichtung des Uniklinikums Frankfurt gehalten. Die neonatalen Ratten wurden dekapiert und die Gehirne entnommen. Primäre Rattenastrozyten wurden bis zur Passage 10 verwendet.

Durchführung

- Die beiden Hemisphären wurden getrennt und in BME Kulturmedium bestehend aus BME Medium, 10% FCS, 1% Glutamin, 0,5% Pen/Strep und 1,11% 45%iger Glukose aufgenommen und auf Eis inkubiert
- Nach Entfernung der Hirnhäute wurden die Hemisphären durch ein Sieb mit der Porengröße von 200 µm gepresst und das entstandene Lysat wiederum durch einen weiteren Filter mit der Porengröße von 150 µm gegeben
- Die Zellen wurden bei 900 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen
- Das Zellpellet wurde in 25 ml Kulturmedium aufgenommen und in ein großes Zellkulturgefäß überführt
- Nachdem sich die Zellen gesetzt hatten wurde ein Mediumwechsel durchgeführt

5.2 DNA- und RNA-Methoden

5.2.1 Plasmidvermehrung in Bakterienkultur (Transformation)

E.coli eignet sich besonders gut zur Vermehrung von Plasmiden, da kompetente Stämme Plasmide sehr leicht aufnehmen und *E.coli* eine kurze Generationszeit aufweist. Über ein plasmidkodiertes Resistenzgen kann man diejenigen Bakterien selektieren, welche das gewünschte Plasmid tragen. In der vorliegenden Arbeit wurde über eine Ampicillin-Resistenz selektiert.

Durchführung

- Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und zusammen mit 10 µg der Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert
- Anschließend erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 45 s
- Die Ansätze wurden 2 min im Eisbad abgekühlt und anschließend auf LB-Ampicillin-Platten (1 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert
- Nach 24 h wurden Klone gepickt und in 5 ml LB-Medium mit 1 µg/ml Ampicillin für 5-8 h im Bakterienschüttler bei 37°C und 300 rpm kultiviert
- Die Vorkultur wurde in eine Übernachtskultur mit einem Gesamtvolumen von 250 ml LB-Selektionsmedium überführt und im Schikanenkolben über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert

5.2.2 Plasmidaufreinigung

Je nach benötigter Plasmid-DNA-Menge und Reinheit wurde entweder das QIAprep Minipräp oder Maxipräp Kit von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Durchführung

- Die Übernachtskultur wurde für 20 min und 3500 rpm bei 4°C abzentrifugiert
- Das Bakterienpellet wurde in 10 ml P1-Puffer resuspendiert und in 50 ml Falcons überführt
- 10 ml P2-Puffer wurden hinzugefügt, 4-6 mal invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert
- Dann wurden 10 ml P3 dazugegeben, 4-6 mal invertiert und für 20-30 min auf Eis inkubiert
- Anschließend wurde für 30 min mit 12000 rpm bei 4°C zentrifugiert
- Der Überstand wurde auf eine mit 10 ml QBT äquilibrierte Qiagen-Tip 500

Säule auftragen

- Die Säule wurde 2 mal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen
- Die Elution erfolgte in ein neues 50 ml Falcon mit 15 ml QF-Puffer
- Die DNA wurde anschließend durch den Zusatz von 10,5 ml Isopropanol gefällt
- Der Ansatz zum Sedimentieren der DNA wurde für 30 min mit 10000 rpm bei 4°C zentrifugiert
- Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Pellet mit 5 ml Ethanol (70%) zur Salzentfernung versetzt und für 20 min mit 3500 rpm bei 4°C zentrifugiert
- Der Überstand wurde wieder abgesaugt und die gefällte DNA bei Raumtemperatur inkubiert um Ethanolreste verdunsten zu lassen
- Abschließend wurde die DNA in 200 µl bidest. Wasser gelöst

5.2.3 Isolation von RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Gesamtzell-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die unerwünschte DNA wurde durch einen Hydrolyseschritt mit DNase I entfernt. Die RNA-Konzentrationen wurden UV-photometrisch bei 260 nm gemessen und die Reinheit der Proben durch das A260/A280-Verhältnis bestimmt, welches zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte.

Durchführung

- Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen und im 6-Well Format mit 350 µl RLT-Puffer mit 3,5 µl beta-Mercaptoethanol lysiert
- Der Zellrasen wurde mit einem Zellschaber abgetragen, das Lysat auf eine MiniSpin QiaShredder-Säule aufgetragen und bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert
- Das Lysat wurde 1:1 mit 70% Ethanol vermischt und auf eine RNeasy Mini-Säule aufgetragen, die dann 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert wurde
- Anschließend wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer zum Waschen 5 min inkubiert und bei 10000 rpm für 15 s abzentrifugiert
- 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer wurden auf die Säule geben und 15 min inkubiert
- Anschließend wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und wiederum bei 10000 rpm für 15 s abzentrifugiert
- Danach wurde die Säule zwei mal mit 500 µl RPE -Puffer gewaschen und anschließend 1 min bei 10000 rpm trocken zentrifugiert
- Die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 10000 rpm mit 30-40 µl RNase freiem Wasser eluiert

- Anschließend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt

5.2.4 cDNA-Synthese

Die isolierte Gesamtzell-RNA dient als Matrize für die *complementary DNA* (cDNA). Mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase und zwei verschiedenen Primern (Hexanukleotide, polydT) wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und kann in der Folge mittels quantitativer *real-time* oder konventioneller PCR vervielfältigt und sichtbar gemacht werden.

Durchführung

- 1 µg der isolierten RNA, 1 µl Oligo(dt)-Primer, 1 µl *Random*-Primer und 1 µl dNTP's wurden mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 13 µl aufgefüllt
- Der Ansatz wurde im Thermocycler für 5 min bei 65°C inkubiert, auf Eis gestellt und mit Ansatz B, bestehend aus 5 µl *First-Strang*-Puffer, 1 µl DTT und 1 µl Wasser vereinigt und bei 40°C für 2 min inkubiert
- Ansatz wurde daraufhin wieder auf Eis gestellt und mit 1µl *SuperScriptIII* (Reverse Transkriptase) versetzt
- Der Ansatz wurde zurück in den Thermocycler gestellt und ein Programm bestehend aus 5 min 25°C, 5 min 30°C, 5 min 35°C, 50 min 40°C und für 15 min bei 70°C inkubiert
- Um die synthetisierte cDNA für die *real-time*-PCR einsetzen zu können wurde der 20 µl Ansatz mit 180 µl Wasser aufgefüllt, die Konzentration der cDNA entsprach nun rechnerisch 5 ng/µl

5.2.5 Quantitative *real-time*-PCR (*TaqMan*)

Die *real-time*-PCR wird hauptsächlich zur absoluten und relativen Quantifizierung von Nukleinsäuren in diesem Fall cDNA, verwendet. Mit ihr lässt sich reproduzierbar die Expression von Genen bestimmen. Während der PCR bindet eine spezifische Sonde an die denaturierte Zielsequenz. Die *Taq*-DNA Polymerase trifft während der Extensionsphase auf die Sonde und beginnt diese zu verdrängen. Durch 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase, die jetzt aktiviert wird, kommt es zur Spaltung der Sonde und damit zur Trennung des Energietransfers zwischen einem Reporter- und einem Quencher-Farbstoff. Es entsteht ein fluoreszierendes Signal im Frequenzbereich des Reporters. Neben dem zu untersuchenden Transkript wird immer auch ein Kontrollgen (*Housekeeping*-

Gen) mitgeführt. In der vorliegenden Arbeit wird als Kontrolle das HPRT-Gen (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) verwendet.

Durchführung

- Alle PCRs wurden in Triplikaten durchgeführt (n=3), das heißt 3 Wells der 96-Well-Platte wurden je mit der gleichen Probe bestückt
- Jedes Well wurde mit 5 µl der verdünnten cDNA versehen und ein Ansatz bestehend aus 1 µl TaqMan-Assay, 10 µl Master-Mix und 4 µl Wasser dazupipettiert
- Die PCR-Konditionen waren 50°C für 2 min und 95°C für 10 min gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 15 s und 60°C für 40 s
- Die Auswertung erfolgte über die $2^{(DDC(t))}$ Methode wobei der HPRT-Wert als endogene Kontrolle verwendet wurde

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen

Da Proteine auf verschiedensten Ebenen reguliert werden können, ist zum Beispiel von der mRNA-Menge nicht automatisch auf die Proteinmenge zu schließen. Daher ist es nötig Zellen zu lysieren, um die tatsächliche Menge eines Proteins im Western Blot nachweisen zu können.

Durchführung:

- Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen und je nach Zelldichte im 6-Well mit 80-120 µl 2 x SDS-Lysepuffer bestehend aus 2% SDS, 68,5 mM Tris-HCl (pH7,5), 10% Glycerin und jeweils 1:100 eingesetztem PMSF, Protease- und Phosphatase-Inhibitor lysiert
- Der Zellrasen wurde abgeschabt und das Lysat in ein Eppendorfgefäß überführt
- Das Lysat wurde sonifiziert und falls keine Phospho-Proteine nachgewiesen werden sollten bei 95°C für 5 min aufgekocht und eingefroren
- Für den Nachweis von Phospho-Proteinen wurden die Lysate noch am selben Tag verwendet

5.3.2 Proteingehaltsbestimmung mittels BCA-Kit

Um gewährleisten zu können, dass zum Beispiel im Western Blot gleiche Mengen an Protein aufgetragen werden, ist es nötig, den Proteingehalt jeder einzelnen Probe zu bestimmen. Die Bestimmung wurde mit dem BCA-Protein Assay Kit von Pierce durchgeführt. Anhand einer BSA-Standardkurve wurde die Proteinkonzentration der individuellen Proben ermittelt.

Durchführung

- In jedes Well wurden 150 µl 0,9%ige NaCl Lösung vorgelegt und mit 2 µl der zu analysierenden Probe versetzt
- Danach wurde 150 µl BCA hinzugefügt und bei 37°C für 30 min inkubiert
- Die Auswertung des Farbumschlages erfolgte photometrisch bei 560 nm im Mikroplattenlesegerät von Tecan
- Alle Proben und der Standard wurden in einer Doppelbestimmung angesetzt

5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterliegt den grundsätzlichen elektrophoretischen Trennprinzipien. Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine beruht auch hier auf der unterschiedlichen Größe, Form sowie der elektrischen Ladung der Aminosäuren. Im Unterschied zu Nukleinsäuren sind Proteine jedoch nicht gleichmäßig geladen, vielmehr hängt ihre Ladung von den Seitenketten und dem Grad der Glykosylierung ab. Durch die Verwendung von SDS im Gel, Protein-Elektrophoresepuffer und Auftragspuffer werden die nichtkovalenten Wechselwirkungen der Proteinstruktur aufgehoben, und das SDS lagert sich proportional zur Länge der Aminosäurekette an diese an (~0,4g SDS/g Protein). Die Zugabe von β -Mercaptoethanol zerstört zusätzlich die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen, welche die Tertiärstruktur bestimmen. Das linearisierte, SDS-umhüllte Protein besitzt nun eine negative Ladung, wodurch dieses im elektrischen Feld zum positiven Pol wandert. Das Trennsystem ist diskontinuierlich, da zwei unterschiedliche Gele mit unterschiedlichem pH-Wert eingesetzt werden: Zum einen ein großporiges Sammelgel, in welchem die Proteine konzentriert und zu einer schmalen Lauffront komprimiert werden, zum anderen ein daran anschließendes kleinporiges Trenngel, in welchem die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Durchführung

- Die Probe wurde mit fünffach Bromphenolblau-Ladepuffer versetzt bestehend aus 1,25 M Tris/HCl (pH6,8), 1 g SDS, 5 g Glycerin in 10 ml Wasser und aufgekocht
- Die Gele enthielten 8%, 10% oder 15% Polyacrylamid, 0,1 %SDS, 350 mM Tris-Puffer (pH8,8) und Wasser (Gesamtvolumen für ein Trenngel ca. 5 ml) zudem dann durch Zugabe von 1/2000 TEMED (Katalysator) und 1/100 APS (Quervernetzer) die Vernetzungsreaktion gestartet wurde
- Nach Erstarren des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen, dessen Stocklösung aus 5% PAA, 0,1% SDS, 120 mM Tris-HCl (pH6,8) besteht und mit einem Probenkamm versehen
- Für die Elektrophorese wurden die Gele in der Kammer eingespannt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Nach dem Auftragen der Proben wurde während des Laufs im Sammelgel eine konstante Spannung von 90 V angelegt und nach mit Eintritt der Lauffront ins Trenngel die Spannung auf 160 V erhöht. Der Lauf-Puffer bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1% SDS das mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt wurde
- Der Gellauf wurde beendet sobald die Lauffront das Gel-Ende erreicht hatte

5.3.4 Western Blot

Western Blot bedeutet, dass die bei der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinproben von einem Gel auf eine Membran transferiert und dort immobilisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Membran aus Nitrozellulose verwendet. Die negativ geladenen Proteine wandern in einem elektrischen Feld aus dem Gel auf die Membran. Hierfür wurde ein *semi-dry* System verwendet. Um die Proteine anschließend detektieren zu können werden die noch freien Bindungsstellen auf der Membran nach dem Transfer mit BSA geblockt. Dies verhindert die unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran, was störenden Hintergrund verursachen würde. Die Detektion der Proteine erfolgt indirekt das heißt man gibt zunächst einen für das Protein spezifischen Antikörper auf die Membran, der nur an das gewünschte immobilisierte Protein bindet. Im zweiten Schritt wird ein Sekundärantikörper verwendet an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dieser Antikörper bindet an den nicht-variablen Teil des Primärantikörpers, abhängig von der Spezies in der der Antikörper gebildet wurde.

Durchführung

- *Whatman*-Papiere sowie Membran wurden in kaltem Transferpuffer, bestehend aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol auf 800 ml mit Wasser aufgefüllt und für 10 min äquilibriert
- Danach wurden auf der Anodenplatte der Blotapparatur zwei *Whatman*-Papiere, dann die Membran anschließend das Gel und wieder zwei *Whatman*-Papiere gelegt
- Der Transfer wurde bei 15 V für 35 min vorgenommen, bei 1,5 mm dicken Gelen wurde die Zeit auf 45 min ausgedehnt
- Nach dem Blotten wurde die Membran zum Blocken für 45 min in 5% BSA in TBS plus 0,05% Tween (TBS-T) inkubiert
- Das verbleibende Gel wurde mit *Simply Blue Safe Stain*, einer wasserlöslichen Coomassie-Lösung, über Nacht angefärbt um den Gellauf und das Blotten zu überprüfen
- Nach 8h Entfärben mit Wasser kann das Gel auf ein *Whatman*-Papier transferiert werden, mit Folie abgedeckt und bei 60°C für 2 h unter Vakuum auf dem Geltrockner getrocknet werden
- Der zu verwendende Antikörper wurde in 3% BSA in TBST aufgenommen, die Membran in ein Falcon überführt beides über Nacht bei 4°C auf den Rollschüttler gelegt (Für das *Hauskeeping*-Gen GAPDH reichte eine Inkubation von 1,5 h bei Raumtemperatur)
- Der Primärantikörper wurde mit TBST 3 mal für 10 min von der Membran gewaschen bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte
- Der Sekundärantikörper wurde 1:20000 in 3% BSA in TBST verdünnt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert
- Die Membran wurde wiederum 3 ml mit TBST für 10 min gewaschen bevor sie am Odyssey Infrarot Scanner ausgewertet wurde

5.3.5 Proteinbestimmung nach Bradford für Caspase-Assay

Die Proteinbestimmung nach Bradford wird vorgängig zum Caspase-Assay durchgeführt. Bei der Verwendung von *Roti-Quant* wird eine Absorptionsverschiebung gemessen, die entsteht, wenn sich die in der Probe enthaltenen Proteine an *Coomassie-Blue* anlagern. Anhand einer BSA-Standardkurve kann die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt werden.

Durchführung

- 25 µl Proteinstandard (BSA-Reihe verdünnt in 0,9% NaCl-Lösung) und 25 µl der Probe wurden vorgelegt und mit 25 µl 0,9% NaCl-Lösung sowie 200 µl *Roti-Quant* versetzt
- Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 37°C bevor die photometrische Auswertung bei 595 nm im Mikroplattenlesegerät von Tecan erfolgte
- Alle Proben und die Standards wurden in einer Doppelbestimmung angesetzt

5.4 Caspase-Assay

Nach Apoptoseinduktion kommt es innerhalb der Zelle zur Aktivierung einer speziellen Proteasekaskade, die eine Schlüsselrolle bei biochemischen Abläufen während des programmierten Zelltods spielt. In dieser Kaskade spielen Caspasen, eine Familie der Cysteinproteasen, eine wichtige Rolle. Eine der beteiligten Caspasen ist die Caspase-3, deren Aktivität in diesem Assay als Maß der Apoptoserate herangezogen wurde. Die Caspase-Aktivität wurde indirekt über die Spaltung von Asp-Glu-Val-Asp (DEVD), ein Substrat, an das ein Fluorophor (AMC) gekoppelt ist, bestimmt. Das durch Caspasespaltung freigesetzte AMC konnte fluorimetrisch bestimmt werden. Die Fluoreszenzintensität von freiem AMC in Relation zum Proteingehalt der Probe entspricht der Caspaseaktivität.

Durchführung

- Die Zellen wurden im 24-Well Format in Vierfachbestimmung ausgesät und die Positivkontrolle für 8 h mit 3 µM Staurosporin behandelt
- Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen und in jedes Well 200 µl Lysepuffer gegeben, bestehend aus 10 mM HEPES (pH 7,4), 42 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,5% Chaps und den frisch hinzugegebenen Inhibitoren 1 mM DTT, 5 µg/ml Aprotinin, 1 µg Leupeptin, 1 µg Pepstatin und 1 mM PMSF
- Die Platte konnte nun bei -21°C eingefroren werden um die Lyse der Zellen zu beschleunigen
- Die Platte wurde zum Auftauen auf einen Schüttler gestellt und das Lysat durch Pipettieren homogenisiert
- Je 25 µl des Lysates wurden für die Proteinbestimmung nach Bradford verwendet und 50 µl mit 150 µl Reaktionspuffer (25 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM EDTA, 10% Sucrose, 0,1% CHAPS, 3 mM DTT mit 10 µM DEVD) für 2 h bei 37 °C im Mikroplattenlesegerät von Tecan inkubiert, wobei in zehnminütigen Abständen die Fluoreszenz vermessen wurde

5.5 Herstellung von lentiviralen Transduktionspartikeln

Lentiviren sind für den Gentransfer besonders geeignet, da auch ruhende Zellen infiziert werden und das Genom des Virus, oder im vorliegenden Fall die Plasmide kodierend für *short interfering* RNA, stabil in die Wirts-DNA integriert werden.

Durch Transfektion dreier Vektoren werden in HEK-293T Zellen Viruspartikel gebildet, die durch Zentrifugation des Zellüberstandes gewonnen werden können. Da die Viruspartikel replikationsinkompetent sind, können sie nach Infektion der Zielzellen sich nicht unkontrolliert vermehren, was einen weiteren Vorteil dieses Systems darstellt.

Durchführung

- Drei Tage vor der Transfektion wurden 1 Millionen HEK-293T in einer großen Zellkulturflasche ausgesät und 2 h vor der Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt; Das Kultumedium bestand aus DMEM mit 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Pen/Strep
- Für jedes Konstrukt wurde ein Transfektionsansatz bestehend aus 3,5 µg VSV-G Hüllplasmid, 6,5 µg p8.91 Verpackungsplasmid und 10 µg des Gentransferplasmides in ein Gesamtvolumen von 450 µl sterilem Wasser aufgenommen
- Zu jedem Ansatz wurden 50 µl von 2,5 M CaCl₂ hinzugefügt und in dieses Gemisch unter Blasenbildung 500 µl 2x HBSS dazugetropft
- Die Blasenbildung wurde noch 1 min weitergeführt und dann der Ansatz bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert
- Zu dem Kulturmedium wurden 3 µl Chloroquine hinzugefügt bevor der Transfektionsansatz langsam auf die Zellen gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert wurde
- Am Tag nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Beide Überstände wurden verworfen
- Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde je ein Mediumwechsel vorgenommen und der Überstand gesammelt
- Der vereinigte Überstand wurde bei 250 g für 5 min abzentrifugiert um die zellulären Bestandteile abzutrennen
- Danach wurde der Überstand in der Ultrazentrifuge bei 50000 g für 140 min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet für 2 h in PBS gelöst
- Das Virus wurde bei -80°C aufbewahrt

5.6 MTT-Assay

Die Viabilität der Zellen wurde mit dem MTT-Assay untersucht. Hierbei wird das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) von mitochondrialen Dehydrogenasen viabler Zellen umgesetzt und in wasserunlösliche, violette Formazan-Kristalle umgewandelt. Die Zellen werden lysiert und die Menge an gebildetem Formazan über die optische Dichte bei 540 nm bestimmt. Sie ist direkt proportional zur Anzahl der viablen Zellen.

Durchführung

- Die Zellen wurden im 96-Well Format (2000 Zellen/Well/100 µl Medium) in 16-facher Bestimmung ausgesät
- Zu dem Kultur- oder Behandlungsmedium wurden 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) hinzugefügt und für 2,5-3,5 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert
- Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 100 µl einer Lösung bestehend aus 1 M HCl und Isopropanol (1:24) lysiert und für 30 min auf dem Schüttler inkubiert
- Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 560nm

5.7 Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid

Der Lebenszyklus einer Zelle lässt sich in fünf Phasen aufteilen. Je nachdem in welcher Zellzyklus-Phase sich die Zelle befindet, ist ihr DNA-Gehalt unterschiedlich. Der für die Zellzyklusanalyse am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist Propidiumjodid (PI) ein interkalierendes Molekül, das stöchiometrisch an doppelsträngige DNA bindet. Die Exzitationswellenlänge liegt bei 488 nm, die Emissionswellenlänge bei 600 nm. Da PI unspezifisch bindet und daher auch doppelsträngige RNA detektiert werden kann, ist es notwendig, die Zellen vor FACS-Analyse mit RNase zu behandeln. Wird eine mit PI inkubierte Zellsuspension im Durchflusszytometer analysiert, ist es aufgrund der stöchiometrischen Bindung von PI an doppelsträngige DNA möglich, die Zellen den Fluoreszenzsignalen entsprechend den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zuzuordnen (G0/1-Phase: diploider Chromosomensatz, G2-Phase: tetraploider Chromosomensatz, S-Phase: zwischen di- und tetraploider Chromosomensatz). Die Aktivierung des apoptotischen Programms durch Caspase 3 führt zur DNA-Fragmentierung, was zu einer Anreicherung der events im sub-G1-Bereich des Histogramms führt und zur Quantifizierung der Apoptose herangezogen werden kann.

Durchführung

- Im 24-Well Format wurde für jede Probe ein Well mit 50000 Zellen ausgesät und nach der Behandlung der Zellüberstand in FACS-Röhrchen überführt
- Die Zellen wurden mit 500 μ l Trypsin gelöst, mit 1 ml PBS abgestoppt und ebenfalls in das FACS-Röhrchen überführt
- Anschließend wurde das Röhrchen für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert
- Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 μ l PBS resuspendiert
- Zu der Zellsuspension wurde tropfenweise 5 ml kaltes 70%iges Ethanol hinzugefügt und für 45 min leicht schüttelnd bei 4°C inkubiert
- Anschließend wurden die Proben bei 1500 rpm für 10 min abzentrifugiert, das Pellet in 100 μ l RNase A resuspendiert (20 μ g/ml in PBS) und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert
- 400 μ l der PI-Lösung (50 μ g/ml in PBS) wurden der Suspension hinzugefügt und für 30 min in Dunkelheit inkubiert
- Vor der FACS-Analyse wurden die Proben zur Vermeidung von Aggregaten durch ein Sieb gegeben

5.8 ELISA

5.8.1 ELISA für murines VEGF

Bei diesem ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wird die Menge an sekretiertem VEGF im Zellkulturüberstand (*vascular endothelial growth factor*) mit Hilfe des *Quantikine*-Kit bestimmt. Der Assay wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Der Boden einer 96-Well Platte ist hierbei mit einem Antikörper beschichtet, der spezifisch gegen murines VEGF gerichtet ist. Befindet sich nun das Zielmolekül in der Probe, bindet es an den immobilisierten Antikörper. Nachdem ungebundenes Substrat in einem Waschschrift entfernt worden ist, gibt man einen zweiten Anti-VEGF Antikörper hinzu, an den ein Enzym gekoppelt ist. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung hinzugefügt, die nach Spaltung durch das angekoppelte Enzym einen Farbumschlag herbeiführt. Die Reaktion wird durch eine Stopplösung beendet und die Farbintensität, die sich proportional zu dem in der Probe enthaltenden VEGF verhält, photometrisch vermessen.

Durchführung

- In der *Calibrator* Lösung wurde eine Standardreihe für murines VEGF angesetzt und die mitgelieferten Reaktions-Wells mit 50 μ l *Assay* Lösung benetzt

- 50 µl der Standards und der Proben wurden in Doppelbestimmung in jedes Well pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert
- Nach dreimaligem Waschen mit der Waschlösung wurden 100 µl *mouse VEGF* Konjugat hinzugefügt und wiederum für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert
- Wieder wurden die Wells dreimal gewaschen bevor sie mit 100 µl der Substratlösung für 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert wurden
- Nachdem 100 µl der Stopplösung hinzukamen wurden die Proben bei 450 nm und 540 nm im Mikroplattenlesegerät von Tecan vermessen, wobei die Werte bei 540 nm von denen bei 450 nm subtrahiert wurden

5.8.2 ELISA zum Nachweis von aktivem Stat3

Das hier verwendete *TransFactor*-Kit erlaubt die Detektion von aktiven Transkriptionsfaktoren, nachdem sie an eine kanonische DNA-Sequenz gebunden haben. Ist aktives Stat3 in der zu untersuchenden Probe vorhanden, bindet das Stat3-Dimer an die spezifische DNA-Sequenz, die am Boden des Reaktions-Wells immobilisiert ist. Nach einem Waschschrift wird der gebundene Transkriptionsfaktor mit Hilfe eines Antikörpers detektiert, an den ein Enzym gekoppelt ist. Durch Zugabe eines Substrates, das durch die enzymatische Spaltung einen Farbumschlag verursacht, lässt sich die Menge an aktivem Stat3 direkt in Relation zur Farbtintensität setzen. Der Assay wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Durchführung

- In die Wells wurde 150 µl *TransFactor Blocking Buffer* gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert
- Danach wurde der Puffer entfernt, 50 µl der Gesamtzellextrakte hinzugefügt und für 60 min inkubiert
- Anschließend wurden die Reaktions-Wells dreimalig mit 150 µl des Waschpuffers gewaschen und für 60 min mit 100 µl der Erstantikörperlösung inkubiert
- Wiederum wurden die Wells viermalig mit 150 µl des Waschpuffers gewaschen bevor 100 µl des Zweit-Antikörpers für 30 min in die Wells gegeben und inkubiert wurden
- Nachdem viermal mit 250 µl Waschpuffer der Zweitantikörper gründlich runtergewaschen wurde, wurden 100 µl der TMB Substratlösung für 10 min in den Wells inkubiert und nach Entwicklung einer bläulichen Färbung bei 550 nm vermessen

5.9 Organotypische Schnittkulturen

Ein gut charakterisiertes *in-vitro* Modell für das Verhalten von Gehirntumorzellen in ihrer natürlichen Umgebung stellt die organotypische Schnittkultur dar. Hierbei werden aus einem postnatalen Mäusehirn 300-400 µm dicke koronare Schnitte mit dem Vibratom gewonnen. Die Hirnschnitte werden auf einer Membran kultiviert, die Grenze zwischen Kulturmedium und Luft ist. Solche Kulturen können für längere Zeiträume am Leben gehalten werden.

Für die Experimente wurden neonatale B6C3F1 Mäuse verwendet.

Durchführung

- Die Mäuse (P6) wurden dekapiert und das Gehirn mit Cyanakrylatkleber auf dem Trägertisch eines Vibratoms fixiert; ein Agarblock verhinderte das Wegrutschen des Hirns
- Im Präparationsmedium (MEM, 1% Glutamax, 1% Glukose, 2,5% HEPES (1 M), 1% Pen/Strep, 0,4% NaOH (1 N)) wurden bei 4°C 300 µl dicke Schnitte hergestellt
- Je zwei der gewonnenen Schnitte wurden auf Millicell-Filter aufgebracht und in ein 6-Well, das mit 1 ml 35°C Inkubationsmedium (42% MEM, 25% BME, 25% Pferdeserum, 1% Glutamax, 1,5% Glukose, 2,5% HEPES, 1% Pen/Strep, 2% Na-Bicarbonatlösung (7,5%)) gefüllt war gelegt
- Die Schnitte wurden bei 35°C im Zellkulturbrutschrank kultiviert
- Zum Mikroskopieren wurden die Schnitte mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop unter zehnfacher Vergrößerung fotografiert

5.10 Transplantationsmodell

Das syngene Mausmodell ist der *gold standard* für die Evaluation neuer gegen Gliome gerichtete Therapieformen *in-vivo*. In diesem Modell können im authentischen Mikromilieu die Effekte auf Proliferation, Invasion und Immunabwehr am ganzen intakten Organismus studiert werden. Für die *in vivo* Experimente wurden zehn Wochen alte B6C3F1 Mäuse mit einem Gewicht von 20-25 g verwendet.

Durchführung

- Die Mäuse wurden intraperitoneal mit 0,15 ml Narkosemischung bestehend aus 0,39 ml Rompun (2%), 0,39 ml Ketamin (10%), 0,12 ml Vetranquil (1%) und 2,1 ml NaCl betäubt und die Narkosetiefe durch Areflexie überprüft

-
- Anschließend wurde die desinfizierte Kopfhaut aufgeschnitten und mit einem Bohrer ein kleines Loch in die Schädeldecke gebohrt, so dass eine 5 μ l Hamilton Spritze ins Gehirn Zugang hatte (Koordinaten: 2,5 mm von der Dura, 1,5 mm posterior, 2 mm lateral zum Bregma)
 - Durch eine Hoch- und Runterbewegung der Spritze von 0,5 mm wurde eine kleine Kavität geschaffen
 - 10000 Zellen in 1 μ l wurden durch die Spritze langsam ins Hirn appliziert und diese für 30 s im Gehirn belassen um einen Reflux zu verhindern
 - Die Kopfhaut wurde wieder zugenäht und die Mäuse unter einer Wärmelampe belassen bis alle Tiere transplantiert worden waren
 - Die Tiere wurden jeden Tag kontrolliert und bei Auftreten tumorbedingter neurologischer Symptome eingeschlafert
 - Die Hirne wurden entnommen und mit 4% PFA fixiert
 - Die Therapiewirkung wurde anhand von Kaplan-Meier Kurven dargestellt und mit dem GraphPad-Programm statistisch ausgewertet

6 Ergebnisse

6.1 Der Einfluss von Kurkumin auf den Jak/Stat3 Signalweg *in-vivo* und *in-vitro*

6.1.1 Kurkumin inhibiert die Stat3 Aktivität über Januskinase 1/2

Wie in Kapitel 2.5 angesprochen liegt infolge des genetischen Hintergrunds der eingesetzten Zelllinien eine konstitutive Aktivierung von Stat3 vor. Um zu untersuchen, ob Kurkumin (*Curcumin*, CCM) einen chemotherapeutischen Effekt auf die murinen Gliomzellen *in-vitro* und *in-vivo* hat, wurden die Zellen mit Kurkumin behandelt (Abbildung 6.1).

Kurkumin wird aus der Pflanze *Curcuma longa* gewonnen und ist ein intensiv gelb-oranger Farbstoff der oftmals in der Gewürzmischung Curry Verwendung findet. Dieses Polyphenol ist untoxisch und besitzt antioxidative, antiinflammatorische und antimikrobielle Eigenschaften (Aggrawal et al., 2006, Jurenka et al., 2009, Masuda et al., 2001). Daneben konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass Kurkumin auf Grund seines Wirkspektrums und seiner guten Verträglichkeit ein attraktives Reagenz auch für die Krebsforschung darstellt. In verschiedenen Studien wurde deutlich, dass Kurkumin transformierte Zellen in der Proliferation und Migration hemmen kann und auch in präklinischen und klinischen Studien sich als effektiv in der Behandlung von Krebserkrankungen erwies (Kunnumakkara et al., 2008, Tharakan et al., 2010). Auch in Astrozytom- und Glioblastomzellen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit Kurkumin antikanzerogen wirkt (Aoki et al., 2007, Kim et al., 2005, Dhandapani et al., 2007).

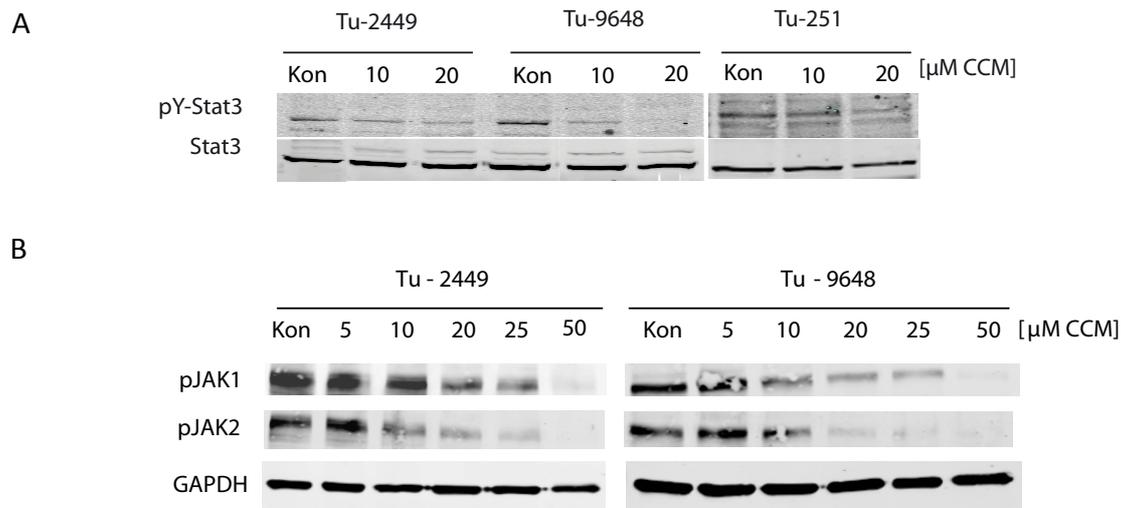


Abb. 6.1_Phosphorylierungslevel von Stat3 und Januskinasen sind nach Behandlung mit Kurkumin dosisabhängig reduziert. Die Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentration CCM, gelöst in DMSO, oder DMSO selbst (Kon) im Vollmedium kultiviert. A) Nach der Zellyse wurde der Phosphorylierungsstatus im Western Blot mittels phosphospezifischen Stat3 Antikörper (pY-Stat3) nachgewiesen und die totale Stat3 Expression mit einem pan-Stat3 Antikörper. B) Zur Detektion von aktivierten Tyrosinkinase 1 und 2 wurden im Western Blot phosphospezifische Antikörper gegen Januskinase 1 und 2 verwendet. Als Kontrolle diente die Expression von GAPDH.

Es zeigte sich, dass in allen drei murinen Gliomzelllinien in Anwesenheit von Kurkumin die Phosphorylierung von Stat3 konzentrationsabhängig abnimmt und bei einer finalen Konzentration im Bereich von 20 μ M nahezu unphosphoryliert vorliegt. Die Behandlung beeinflusst allerdings nur die Aktivierung des Moleküls und nicht die Gesamtexpressionlevel was an der gleichbleibenden Stat3-Proteinbande deutlich wird. Der beobachtete Effekt von Kurkumin auf Stat3 korreliert mit der abnehmenden Phosphorylierung der Januskinasen 1/2, die nach Rezeptoraktivierung den Phosphatrest auf das Stat3-Monomer übertragen. Durch den Einfluss von Kurkumin auf den Phosphorylierungsstatus der Tyrosinkinase wird die Aktivierung von Stat3 moduliert.

6.1.2 Kurkumin beeinflusst die Zellproliferation

Wie in Kapitel 2.2 und 2.3.1 dargelegt beeinflusst Stat3 als Transkriptionsfaktor auch die Proliferation von transformierten und nicht-transformierten Zellen. Um zu untersuchen, ob ein Stat3-vermittelter Effekt von Kurkumin auf die Zellproliferation der Gliomzelllinien vorliegt, wurden die drei Zelllinien Tu-2449, Tu-9648 und Tu-251 für 24, 48 und 72 h in Anwesenheit verschiedener Kurkuminkonzentrationen kultiviert. Durch Zugabe von MTT-Reagenz, das von

viablen Zellen in Formazan umgewandelt wird ließ sich die Proliferationsrate proportional zum gebildeten Formazan bestimmen.

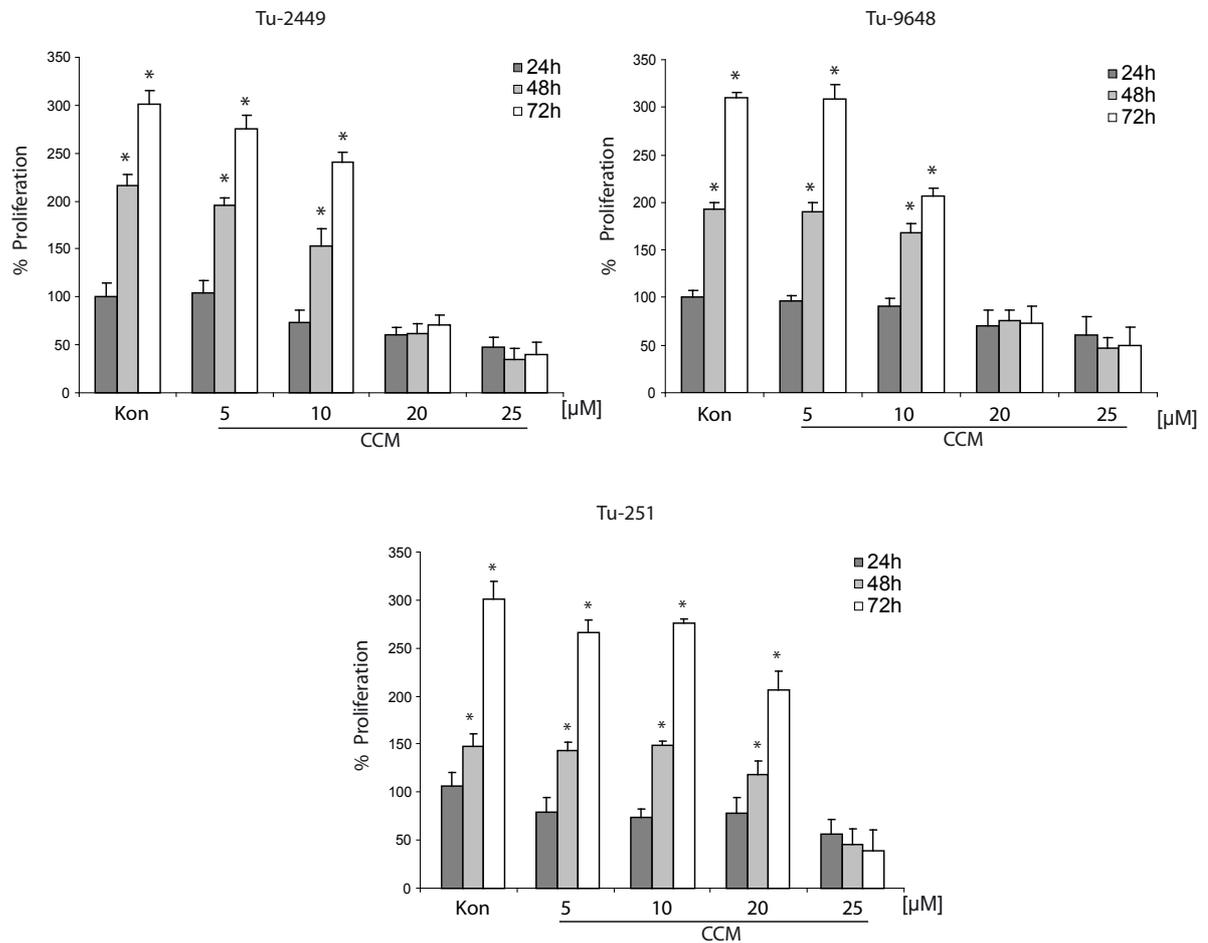


Abb. 6.2_Die exponentielle Proliferation von murinen Gliomzelllinien ist durch Kurkumin inhibiert. Die Zellen wurden für 24, 48 und 72 h in den angegebenen Konzentration CCM, gelöst in DMSO, oder DMSO selbst (Kon) im Vollmedium kultiviert. Das MTT-Reagenz wurde für 3 h mit den Zellen inkubiert und die Absorption des entstandenen Formazans bei 570 nm vermessen. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von $n = 16$ Kulturen. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle bei 24 h.

Die exponentielle Proliferation der Gliomzellen war konzentrationsabhängig über den Zeitraum von 72 h verringert und stagnierte ab 20 µM Kurkumin in den beiden Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648. Bei der dritten Zelllinie Tu-251 trat dieser Effekt erst ab 25 µM ein. Das macht deutlich, dass der durch Kurkumin inhibierte Jak/Stat3 Signalweg in die Proliferation der Gliomzellen involviert ist. In wiefern sich der erzielte Effekt auf malignant transformierte Zellen beschränken sollte, zeigte der nachfolgende Versuche mit primären Rattenastrozyten. Diese Zellen wurden mit höheren Dosen als die malignen Zelllinien behandelt und zeigten eine deutliche Toleranz gegenüber der anti-proliferativen Wirkung von Kurkumin

indem sie auch bei 35 μM Kurkumin noch ein statistisch signifikantes Zellwachstum zeigten.

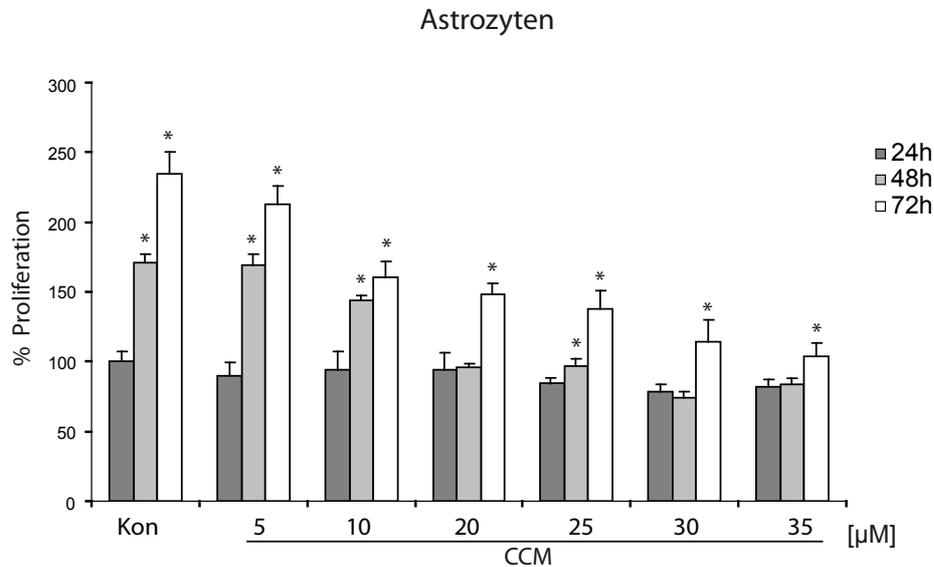


Abb. 6.3_Primäre Astrozyten zeigen unter CCM-Behandlung einen moderaten Rückgang der Proliferation. Die primären Rattenastrozyten vor Passage 8 wurden für 24, 48 und 72 h in den angegebenen Konzentration CCM, gelöst in DMSO, oder DMSO selbst (Kon) im Vollmedium kultiviert. Das MTT-Reagenz wurde für 3 Stunden mit den Zellen inkubiert und die Absorption des entstandenen Formazans bei 570 nm vermessen. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von $n = 16$ Kulturen. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle bei 24 h.

Das macht deutlich, dass Kurkumin besonders auf Gliomzellen mit Stat3-Abhängigkeit wirkt aber gegenüber nicht-transformierte Astrozyten keinen antiproliferativen Effekt hervorruft.

6.1.3 Kurkumin moduliert die Expression von Stat3-Zielgenen

Die oben beschriebenen Experimente verdeutlichen, dass Kurkumin über die Hemmung der Phosphorylierung der beteiligten Januskinasen die Stat3-Aktivität beeinflusst. Ein bisher beschriebener Effekt auf das zelluläre Verhalten war die verminderte Proliferationsrate der Gliomzellen nach erfolgter Kurkuminbehandlung. Daher war es im Folgenden interessant die Expression weiterer Zielgene von Stat3 nach Kurkuminbehandlung mittels quantitativer *real-time*-PCR zu untersuchen um die dort erhaltenen Ergebnisse des Weiteren in funktionellen Assays überprüfen zu können.

Die Zelllinien wurden für 24 h mit 10 oder 20 μM Kurkumin behandelt und nach Isolation der Gesamt-RNA die mRNA der Zelle in cDNA umgeschrieben und mittels *TaqMan real-time-PCR* ausgewertet.

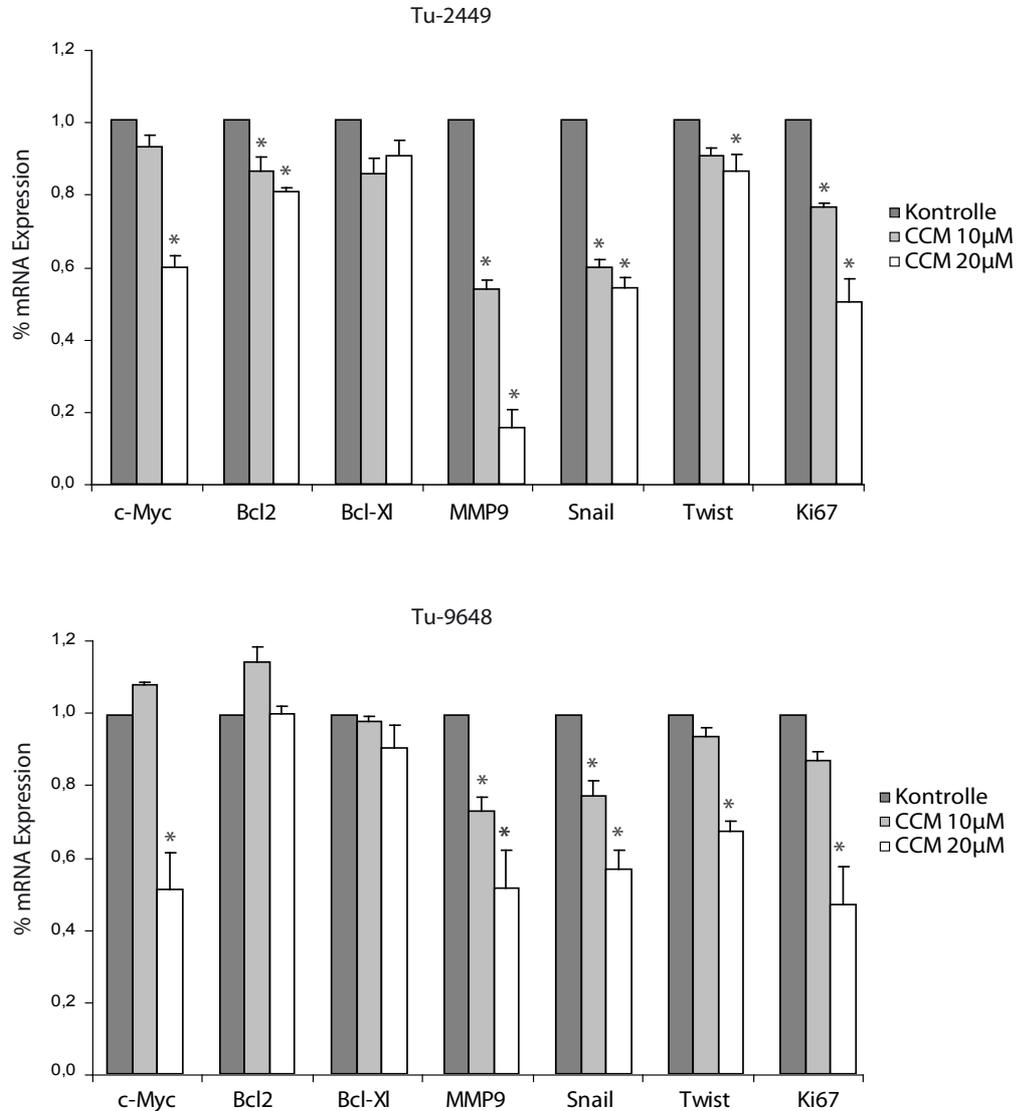


Abb. 6.4_Kurkumin beeinflusst konzentrationsabhängig die Expression der Stat3 Zielgene. Die Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden mit DMSO (Kon), 10 μM oder 20 μM Kurkumin für 24 h im Vollmedium behandelt. Die gewonnene mRNA der Zellen wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese in einer quantitativen *real-time-PCR* eingesetzt. % mRNA-Expression bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von $n = 3$ Kulturen. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die meisten der untersuchten Gene zeigten eine dosisabhängige Verminderung der Expression in beiden Zelllinien mit Ausnahme der anti-apoptotischen Gene Bcl-2 und Bcl-X_L Gene. Nur in der Zelllinie Tu-2449 zeigte sich eine leichte Veränderung der Expression von Bcl-2. In der hohen Dosis kam es deutlich zu einer Kurkumin-induzierten Verminderung der c-Myc Expression, ein Kontrollgen des Zellzyklus

und ebenso bei Ki-67, einem hauptsächlich in der Diagnostik verwendetem Proliferationsmarker in beiden untersuchten Zelllinien. Die Expression der für die Invasion entscheidenden Matrix-Metalloprotease 9 zeigte in beiden Gliomzelllinien eine deutliche Verminderung in der 20 μM Behandlung. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass zwei Mediatoren der epithelialen-zu-mesenchymalen Transition namentlich die Transkriptionsfaktoren Twist und Snail durch Kurkumin in ihrer Genexpression gehemmt werden.

6.1.4 Kurkumin induziert keinen apoptotischen Zelltod

Wie in Kapitel 6.1.3 durch *real-time*-PCR ermittelt wurde, ist die Genexpression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L, beides Zielgene von Stat3, durch die Behandlung der Gliomzelllinien mit Kurkumin nicht stark moduliert. Dieses Ergebnis legt nahe, dass dem im MTT-Assay (Kapitel 6.1.2) beobachteten Effekt von Kurkumin auf die Proliferation zumindest ein nicht-apoptotischer Zelltod zu Grunde liegt.

Die Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Dosen Kurkumin behandelt und anschließend lysiert. Durch Spaltung des fluorigenen Caspase 3-Substrates DEVD-AMC kann die Aktivität des apoptoseinduzierenden Proteins proportional zur entstanden Fluoreszenz bestimmt werden.

Es wurde deutlich, dass die Kurkuminexposition in den Zellen keinen Caspase-abhängigen Zelltod induzierte. Keine der drei Gliomzelllinien zeigte einen signifikanten Anstieg der Caspaseaktivität nach Kurkuminbehandlung im Vergleich zur mit Staurosporin behandelten Positivkontrolle. Der beobachtete Einfluss von Kurkumin auf die Proliferationsrate muss sich somit durch einen anderen, Caspase-unabhängigen Mechanismus erklären lassen.

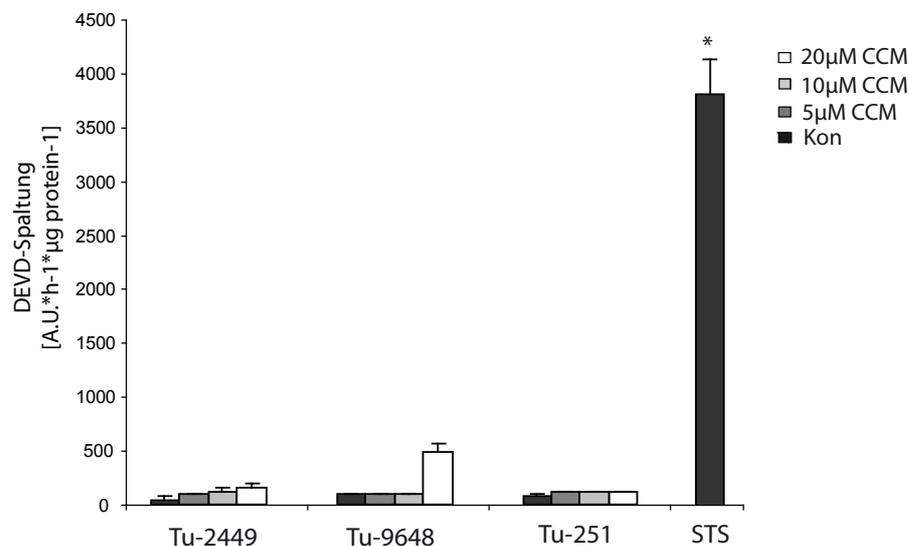
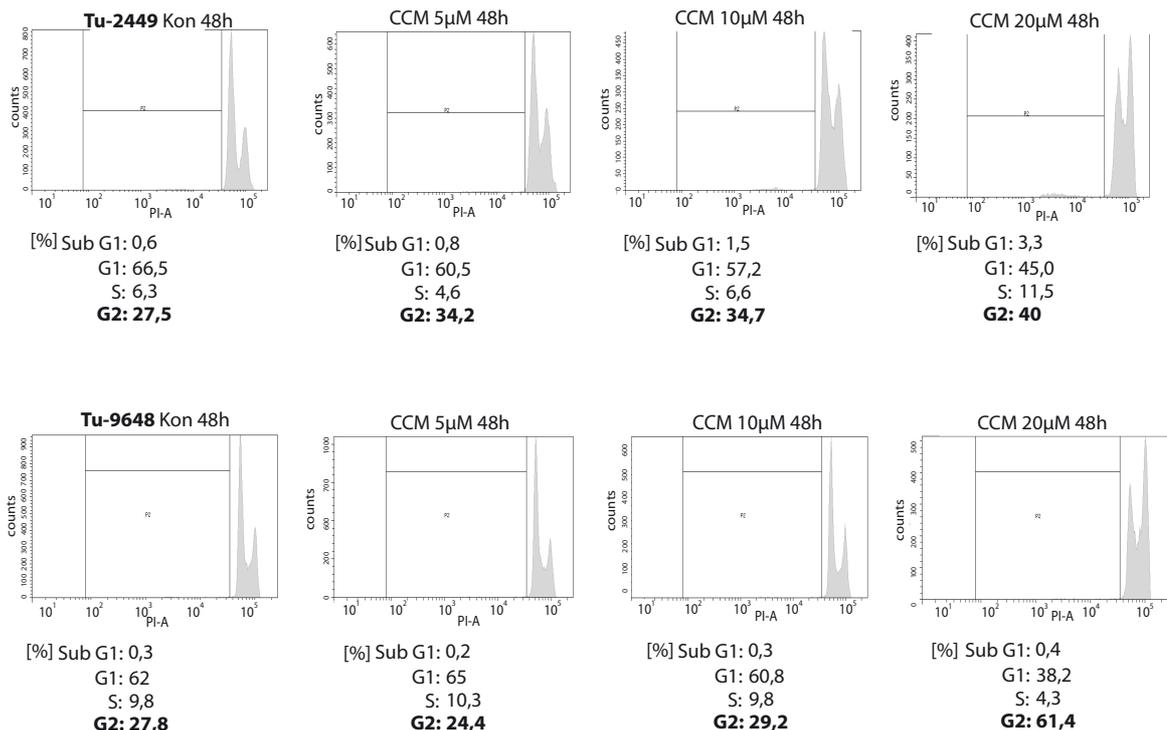


Abb. 6.5_Kurkumin induziert keine Apoptose in Tu-2449, Tu-9648 und Tu-251 Zellen. Die Zellen wurden mit DMSO (Kon) oder den angegebene Dosen Kurkumin für 24 h behandelt. Nach der Zellyse wurde das Caspase-3 Substrat DEVD-AMC (10 μ M) für 2 h mit dem Lysat inkubiert und die entstandene Fluoreszenz bei 380 nm Anregung und 465 nm Emission im Luminometer vermessen. Als Positivkontrolle zur Induktion von Apoptose wurde 3 μ M Staurosporin für 8 h verwendet. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von $n = 3$ Kulturen. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

6.1.5 Die Behandlung mit Kurkumin führt zu einem G2/M Zellzyklusarrest

Eine weitere Möglichkeit um die Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten verifizieren zu können war die Durchführung einer Zellzyklusanalyse. Die Untersuchungen der Zielgeneexpression zeigten bereits eine kurkuminabhängige Expression Zellzyklusregulators c-Myc und der zuvor durchgeführte Caspase-Assay machte deutlich, dass die verminderte Proliferation nicht auf Apoptose zurückzuführen war. Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen 48 h mit verschiedenen Kurkuminkonzentrationen inkubiert und anschließend mit Propidiumjodid (*propidium iodid*, PI) behandelt. PI interkaliert in die DNA und die entstehende Fluoreszenzintensität der Färbung ist ungefähr proportional zum DNA-Gehalt der Zelle. Somit kann mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie bestimmt werden, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle befindet. Auch tote Zellen können hiermit erfasst werden, da ihre Fluoreszenz durch Fragmentierung der DNA deutlich geringer ist.



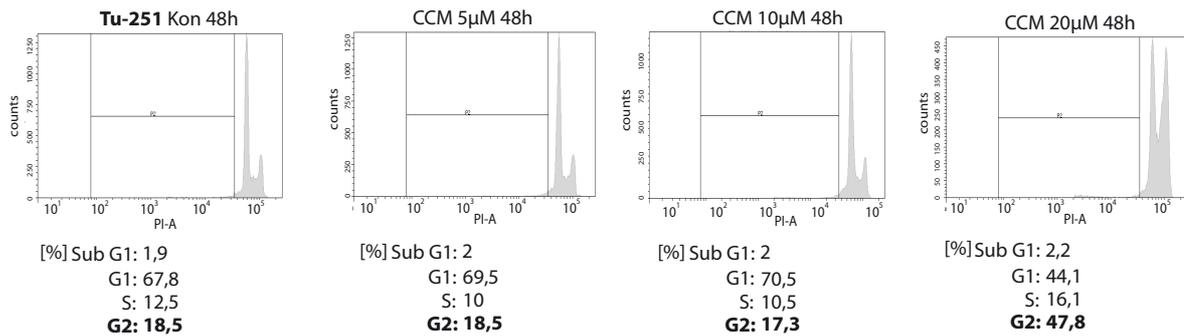


Abb. 6.6_Kurkumin induziert G2/M Zellzyklus-Arrest in murinen Gliomzelllinien. Die Zellen wurden mit DMSO (Kon) oder den angegebene Dosen Kurkumin für 48 h behandelt. Nach dem Abtrypsinieren wurden sie in Ethanol fixiert und für 30 min mit PI inkubiert. Der PI-Gehalt wurde fluorimetrisch mittels Durchflusszytometrie gemessen und als Histogramm dargestellt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

In allen drei Zelllinien zeigte sich, dass 5 und 10 µM Kurkumin zu einem Anstieg der Zellen in der G2-Phase im Vergleich zur Kontrolle führten. Nach 48 h bei 20 µM Kurkuminbehandlung kam es in allen Zelllinien zu einem deutlichen G2-Arrest befanden sich nun in der Tu-2449 40%, in den Tu-9648 61% und in den Tu-251 48% aller Zellen in der G2-Phase. Der niedrige prozentuale Anteil von Zellen in der Sub-G1 Phase untermauert zusätzlich den Befund, dass keine Apoptose durch Kurkumin induziert wird. Vielmehr zeigen diese Ergebnisse, dass die Verminderung der Proliferationsrate durch Kurkumin auf einen G2-Arrest zurückzuführen ist.

6.1.6 Kurkumin reduziert das migratorische und invasive Potential muriner Gliomzellen

Ein weiteres Merkmal von Gliomzellen ist ihre infiltrative Invasion in das umliegende Hirnparenchym sowie ihre hohe Mobilität. Das führt dazu, dass das Krankheitsbild der malignen Gliome geprägt ist von einer Invasionsfront, die oft tief im Gehirn liegt und Rezidiven, die sich ebenfalls weitab vom Ursprungsort manifestieren. Da Kurkumin über die Inhibition des Stat3-Signalweges nachweislich auf den Zellzyklus, die Proliferation und die Genexpression der Gliomzellen wirkt lag es nahe, die verminderte MMP9 Expression mittels einem funktionellen Invasionsassay in Relation zu dem invasiven Potential der Zelle zu setzen.

Zu dem Zweck wurden die Zellen in einer *Boyden*-Kammer ausgesät, die mit extrazellulärer Matrix beschichtet war. Durch die Aussaat in 2 % FCS-Medium wurden die Zellen angeregt durch die Matrix und die Poren der Kammer hin zu dem 10 % FCS-Medium zu wandern, dass sich auf der anderen Seite der Kammer befand. Die Zellen degradieren dabei mit Hilfe ihrer MMP's die extrazelluläre

Matrix und solche Zellen, die die Matrix erfolgreich passierten wurden an der Unterseite der Kammer fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt.

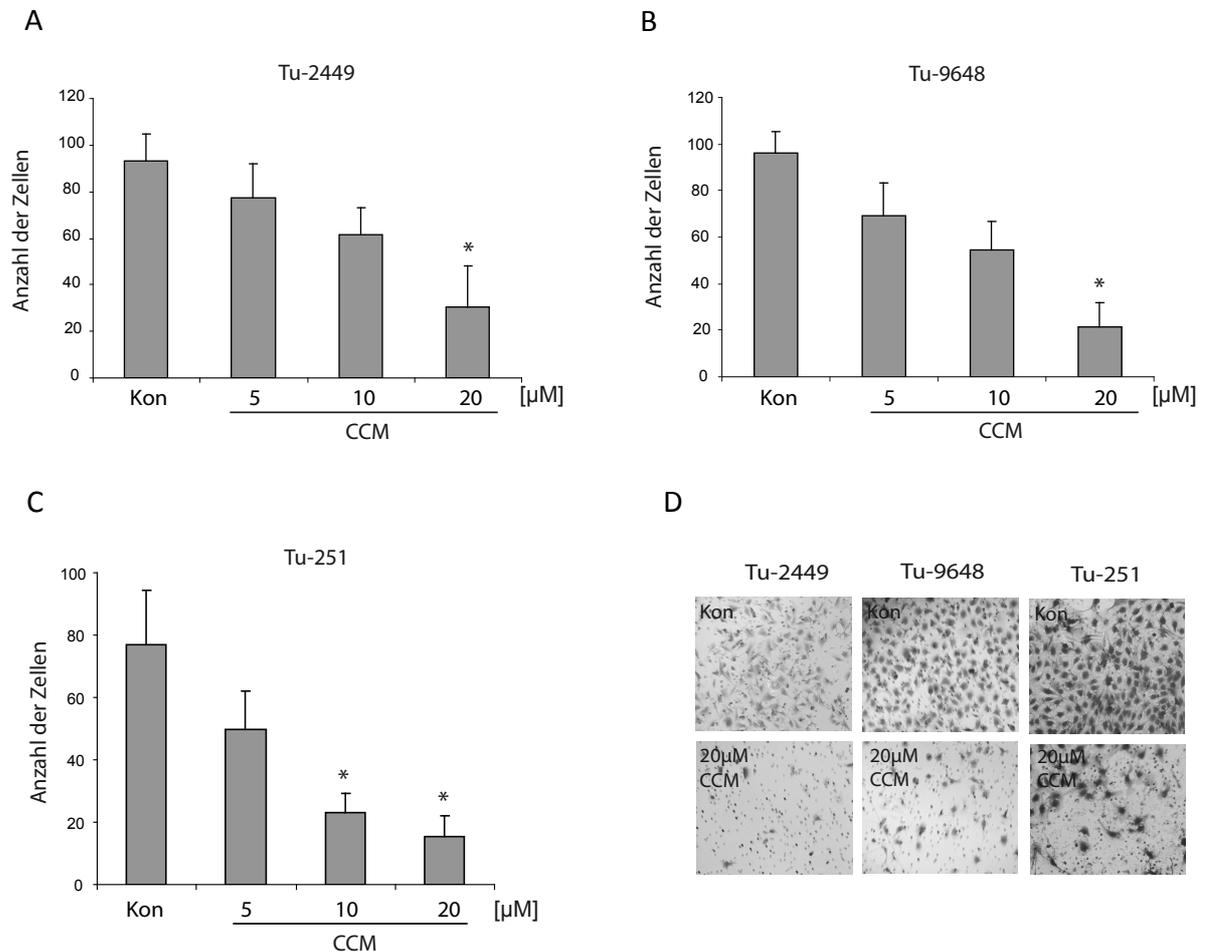


Abb. 6.7_Kurkumin reduziert das invasive Potential muriner Gliomzellen *in-vitro*.

A,B,C) Die drei Gliomzelllinien Tu-2449, Tu-9648 und Tu-251 wurden in 2 % FCS-Medium mit der entsprechenden Kurkuminkonzentration oder DMSO-Kontrolle in die Boyden-Kammer ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die verbliebenen Zellen in der Kammer entfernt und diejenigen auf der Unterseite mit Ethanol fixiert und mittels einer 0,1 % Kristallviolettlösung angefärbt. Mikroskopisch wurden 10 unabhängige Sichtfelder in der Vierfachvergrößerung pro eingesetzte Kammer ausgezählt. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von $n = 10$ Sichtfeldern. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. D) Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen deutlich, dass die ermittelten Effekte der reduzierten Zellinvasion nicht auf verminderte Zellviabilität zurückzuführen sind.

In der Auswertung dieses Versuches zeigte sich, dass in Abhängigkeit der eingesetzten Kurkuminkonzentrationen das invasive Potential der Zellen abnahm. Die Anzahl der Zellen, die die Matrix degradierten und dann angefärbt werden konnten verringerte sich den Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 bei 5 und 10 µm Kurkumindosen und wurde signifikant in der höchsten Dosis von 20 µm Kurkumin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Bei der Tu-251 Zelllinie wird die Reduktion des invasiven Potentials schon bei 10 µm signifikant vermindert.

Abbildung 6.7 D macht deutlich, dass die ermittelten Veränderungen nicht auf eine Induktion des Zelltodes zurückgehen, da die Zellen trotz der erfolgten Behandlung in ihrer Größe und Morphologie vital erscheinen.

Neben der Invasion ist die hohe Mobilität der Zellen eine weitere Ursache für die schlechte Prognose eines Glioblastoms. Die mesenchymale Zellmorphologie bedeutet, dass die Zelle die Voraussetzung zur Invasion und Migration gewonnen hat da sie unpolarisiert ist und keine festen Kontakte zu umliegende Zellen besitzt. Der Einfluss von Kurkumin auf die Invasion wurde bereits dargelegt und kann durch die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse weiter bestätigt werden, da auch die Regulatoren der EMT, Twist und Snail, herunterreguliert sind. Dieser Befund sollte sich auch auf das Migrationspotential der Zellen auswirken. Zusätzlich wurde noch das mRNA-Expressionslevel von Podoplanin untersucht, einem Protein, dass in Podosomen und Invadopodien lokalisiert ist und den Kontakt mit der extrazellulären Matrix vermittelt.

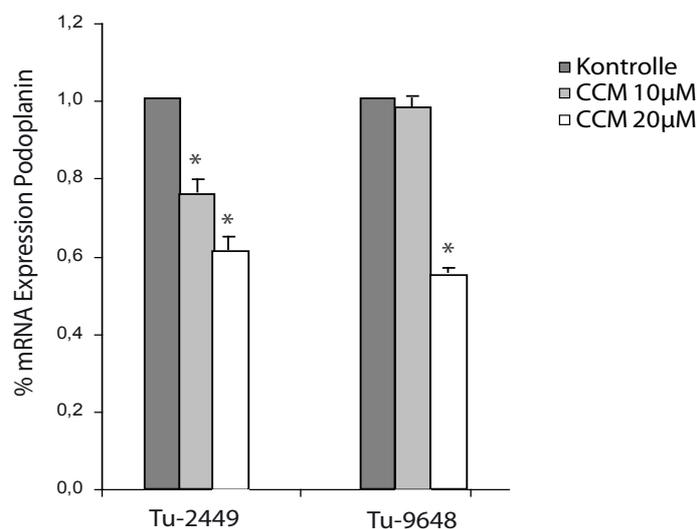


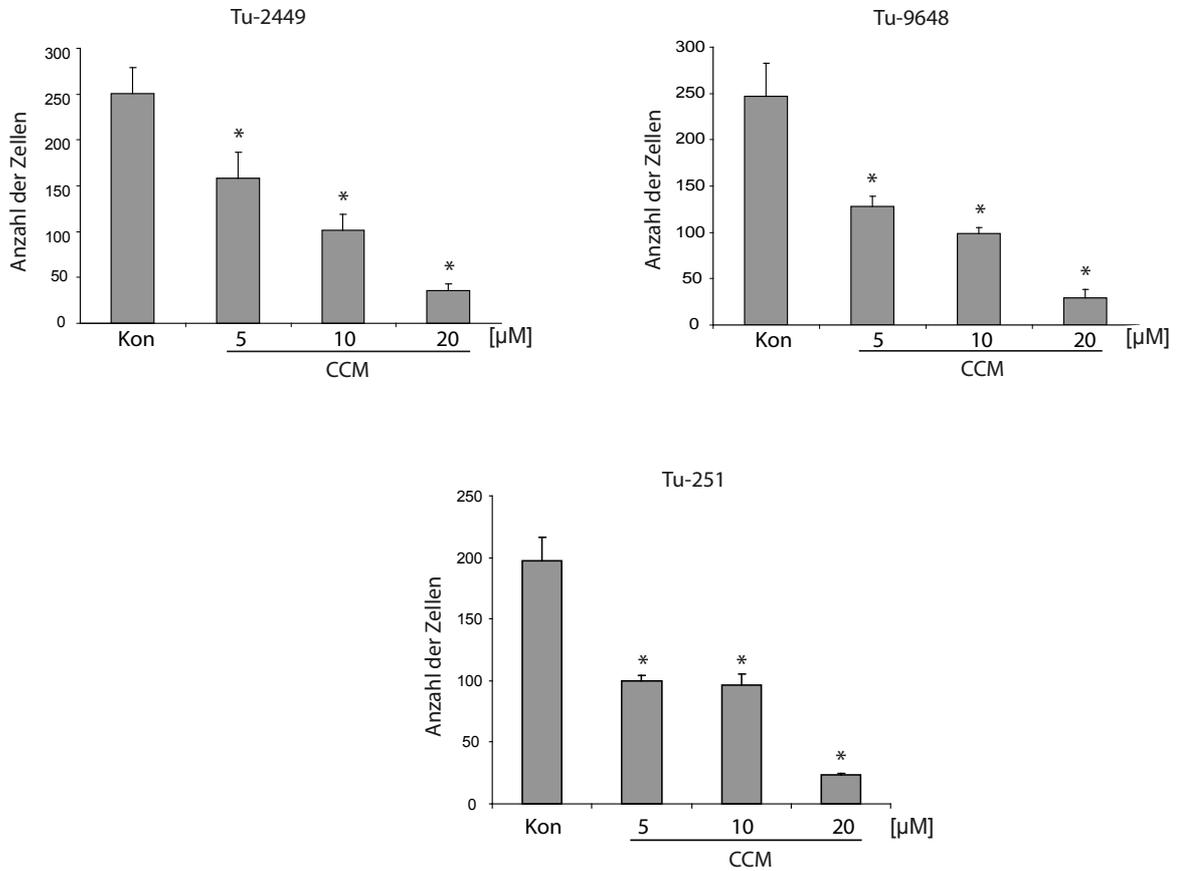
Abb. 6.8_Kurkumin beeinflusst konzentrationsabhängig die mRNA-Experssion von Podoplanin. Die Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden mit DMSO (Kon), 10 µM oder 20 µM Kurkumin für 24 h im Vollmedium behandelt. Die gewonnene mRNA der Zellen wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese in einer quantitativen *realtime*-PCR eingesetzt. % mRNA-Expression bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von $n = 3$ Kulturen. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Tatsächlich zeigte sich eine Reduktion der Podoplaninexpression abhängig von der eingesetzten Dosis Kurkumin. Die Zelllinie Tu-2449 und Tu-9648 zeigten einen signifikanten Rückgang der Expression bei der höchsten Dosis von 20 µM.

Für den funktionellen Ansatz wurde der Wundheilungs- oder auch *Scratch*-Assay gewählt, bei dem ein Zell-Monolayer mit einer Pipettenspitze verwundet wird. Nach 16 Stunden kann die Anzahl der Zellen ermittelt werden die aktiv in die

Wunde zurückgewandert sind. Um zu verhindern, dass die Zellen in die Wunde durch Poriferation gelangen wurde ein Spindelgift hinzugeben.

A



B

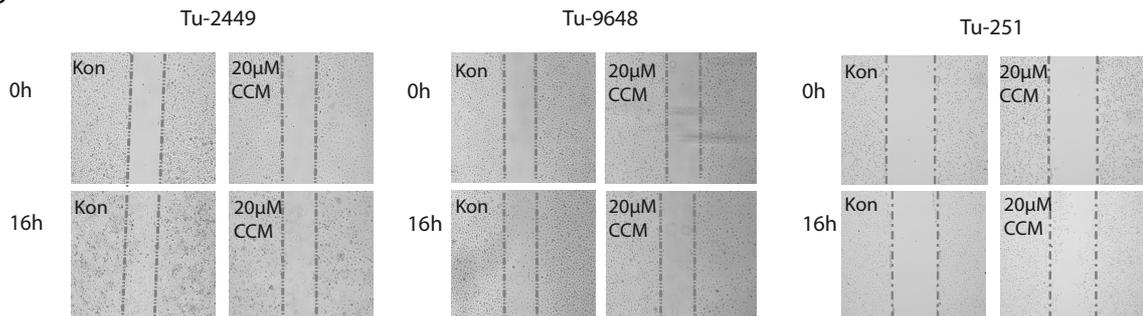


Abb. 6.9_Kurkumin beeinflusst konzentrationsabhängig das migratorische Potential von Tu-2449, Tu-9648 und Tu-251 Zellen. A) Die Zelllinien wurden mit DMSO (Kon), 10 μM oder 20 μM Kurkumin für insgesamt 24 h im Vollmedium behandelt. 6 h nach Behandlungsbeginn wurde Mitomycin C hinzugegeben und für 2 h mit den Zellen inkubiert. Es erfolgte der *Scratch* mit einer Pipettenspitze und ein Mediumwechsel, um die toten Zellen zu entfernen. Eine repräsentative Stelle des Scratch wurde zum 0 h und 16 h Zeitpunkt fotografiert. Anschließend wurde die Anzahl der eingewanderten Zellen bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. B) Repräsentative Abbildungen um zu verdeutlichen, dass die Zellen auch in der hohen Dosis noch vital sind.

Das Ergebnis verdeutlicht, dass zwischen den ermittelten Effekten von Kurkumin auf die Expression für die Migration wichtiger Gene und dem Verhalten der Zellen ein Zusammenhang besteht. Die Behandlung mit Kurkumin zeigte, dass die Anzahl der Zellen, die zurück in die „Wunde“ wandern umgekehrt proportional zur eingesetzten Dosis war. Schon die Behandlung mit 5 μM Kurkumin hatte einen signifikanten Effekt auf das migratorische Potential der Zellen und führt in allen drei Zelllinien zu einer Reduktion der Anzahl an eingewanderten Zellen. In der höchsten Behandlung von 20 μM an eingesetztem Kurkumin im Behandlungsmedium war in allen Zelllinien die Migration der Zellen um das mehr als zehnfache gehemmt.

Abbildung 6.9 B verdeutlicht auch hier, dass die Modulation des migratorischen Potentials nicht über Zelltod oder Zellschädigung ausgelöst wurde, sondern auf die Beeinflussung von Kurkumin auf das Genexpressionsmuster der Zellen zurückzuführen ist.

6.1.7 Überexpression der Stat3-Mutante Stat3C hebt die Kurkumin-vermittelten Effekte auf

Um klar nachweisen zu können, dass die Effekte von Kurkumin auf die Invasion und Migration der Gliomzelllinien über die Hemmung des Stat3-Signalweges vermittelt werden wurde die Zellen mit Stat3C transfiziert. Die Stat3-Mutante benötigt keine Phosphorylierung um dimerisieren zu können und liegt somit konstitutiv aktiv in der Zelle vor. Durch diese Transfektion und gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Kurkumin lässt sich deutlich zeigen, welche Effekte von Kurkumin auf die Gliomzellen durch Hemmung der Stat3-Aktivierung hervorgerufen werden.

Die Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden mit Stat3C oder dem korrespondierenden Leervektor transfiziert und 48 h später die einzelnen Versuche durchgeführt. Zunächst wurde im Western Blot überprüft ob eine Überexpression des betreffenden Proteins vorliegt. Um des Weiteren zu verifizieren ob diese exprimierte Mutante auch funktionsfähig war wurde ein DNA-Bindungs-ELISA eingesetzt. Hierbei bindet transkriptionell aktives Stat3 an seine spezifische DNA-Sequenz, die am Boden eines Reaktionswells aufgebracht ist. Gebundenes Stat3 kann dann mit Hilfe eines Antikörpers detektiert werden, deren Kopplungsgruppe durch Substratzugabe einen Farbumschlag bewirkt. Die gemessene Farbintensität ist proportional zu transkriptionell aktivem Stat3.

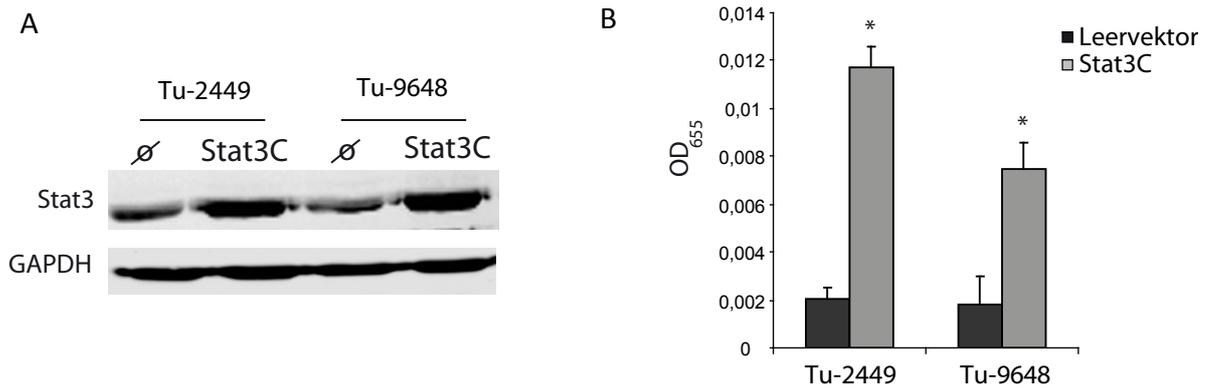


Abb. 6.10_Transfektion mit Stat3C zeigt Überexpression und transkriptionelle Aktivität der konstitutiv-aktiven Mutante in Tu-2449 und Tu-9648 Zellen A) Die Zelllinien wurden mit dem pYN3218-Stat3C und pYN3218 Leervektor transfiziert und 48 h später lysiert. Im Immunoblot wurde ein pan-Stat3 Antikörper zur Detektion des überexprimierten Proteins eingesetzt. Als endogene Kontrolle diente GAPDH. B) Für den ELISA wurden die Zellen identisch zum Western Blot transfiziert und die Lysate wie im Kit vorgegeben verwendet. Transkriptionell aktive Stat3 Dimere bildeten mit der immobilisierten DNA-Sequenz im Reaktionswell einen Komplex, der mit Hilfe eines Stat3-Antikörpers colorimetrisch nachgewiesen werden konnte. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Leervektorkontrolle.

Im Western Blot war zu sehen, dass die Stat3-Mutante im Vergleich zum normalen Stat3 in den Leervektorkontrollen überexprimiert war. Der eingesetzte Stat3-Antikörper war nicht mutationsspezifisch. Zusätzlich machte der nachfolgende ELISA deutlich, dass die Mutante auch ihre physiologischen Funktionen übernahm, indem sie durch Überexpression und Daueraktivierung vermehrt an ihre DNA-Sequenzen bindet und die Transkription der Zielgene somit aktivieren kann. Im ELISA drückt sich das durch eine signifikant höhere Absorption der mit Stat3C-transfizierten Proben im Vergleich zu den Leervektorkontrollen aus.

Um festzustellen welche Rolle Stat3 in der Vermittlung des migratorischen und invasiven Potentials spielt wurden die murinen Gliomzellen mit der Mutante transfiziert und anschließend mit 5, 10 und 20 μM Kurkumin analog zu den vorangegangenen Migrations- und Invasionsversuchen behandelt. Um das migratorische Potential zu untersuchen wurde erneut der *Scratch*-Assay durchgeführt und die Invasionsfähigkeit wurde mit Hilfe der beschichteten *Boyden*-Kammer untersucht.

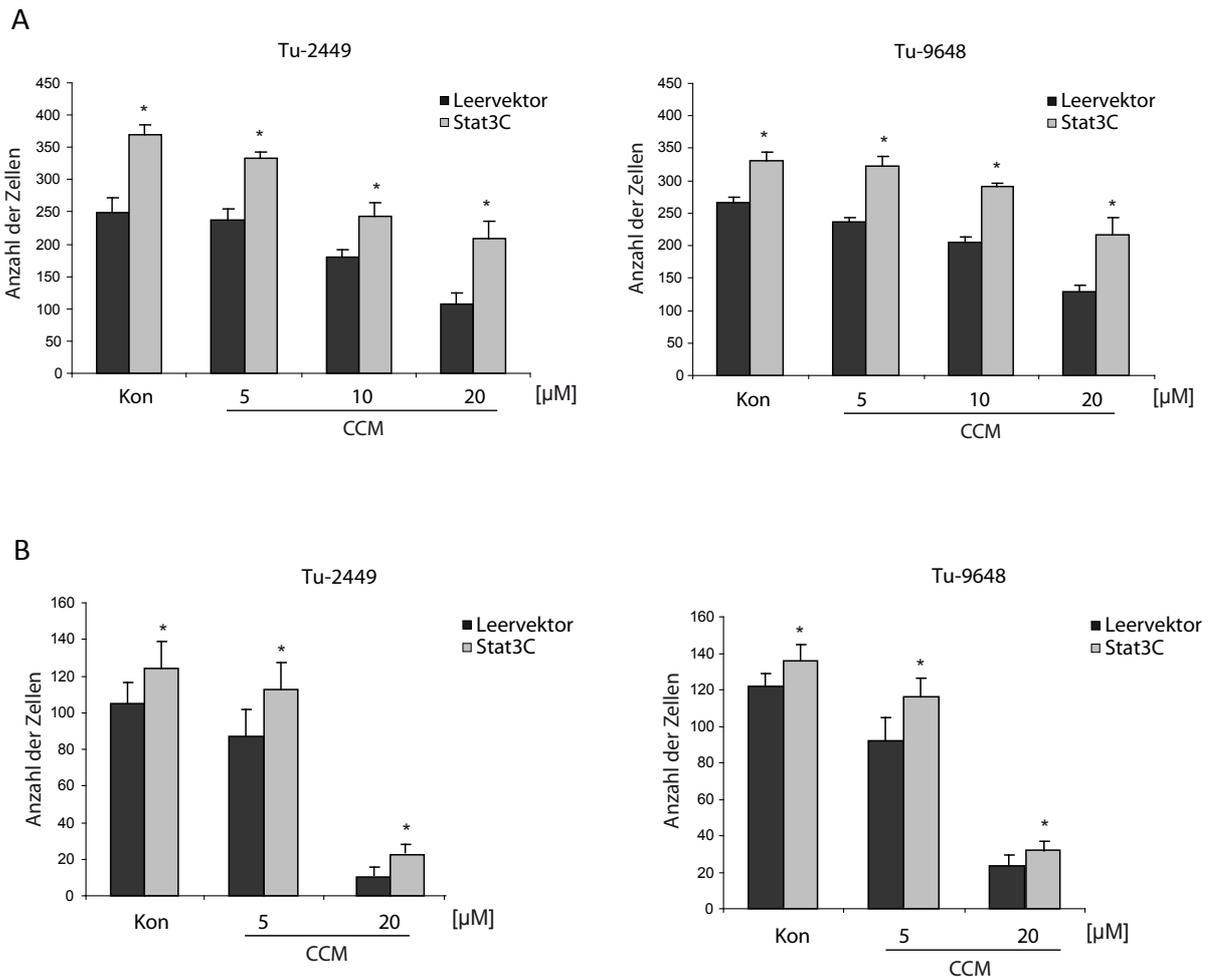


Abb. 6.11_Expression der aktiven Mutante Stat3C antagonisiert die kurkuminvermittelte Reduktion der Migration und Invasion. A) Die Zelllinien wurden mit dem pYN3218-Stat3C oder pYN3218 Leervektor transfiziert und nach 48 h wie in Kapitel 6.1.5 beschrieben im Migrationsassay eingesetzt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Leervektorkontrolle. B) Die eingesetzten murinen Gliomzellen wurde ebenfalls 48 h nach Transfektion mit dem pYN3218-Stat3C oder pYN3218 Leervektor mit 5 oder 20 μM Kurkumin behandelt und wie in Kapitel 6.1.5 beschrieben im Invasionsassay eingesetzt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Leervektorkontrolle.

Im *Scratch*-Assay zeigte sich, dass die Zellen welche die aktive Stat3-Mutante exprimierten in allen Behandlungsdosen vermehrt in die entstandene Wunde einwanderten. Das macht deutlich, dass ohne den Einfluss von Kurkumin auf die Stat3-Aktivierung, die Migrationsfähigkeit der Zellen wiederhergestellt werden kann. Zusätzlich zeigte es auch, dass das migratorische Potential der untersuchten Gliomzellen von der Phosphorylierung und der damit verbundenen transkriptionalen Aktivität von Stat3 abhängig ist.

Ähnlich verhält es sich auch mit der Invasion der Gliomzellen. Die Auswertung des Invasions-Assay zeigte, dass Zellen die mit Stat3C transfiziert waren in beiden Kurkuminbehandlungen signifikant häufiger die extrazelluläre Matrix der *Boyden*-Kammer degradieren und die Membran somit passieren konnten. Es wurde

deutlich, dass auch hier der Rückgang der Invasion bei Kurkuminbehandlung über den Phosphorylierungsstatus von Stat3 reguliert wurde. Die Expression der konstitutiv aktiven, unphosphorylierten Mutante hebt diesen kurkuminvermittelten Effekt auf die Invasion aber auch die Migration auf. Zusätzlich konnten die Kontrollen der beiden Experimente nochmals aufzeigen, dass Stat3 in der Invasion und Migration der murinen Gliomzellen eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

6.1.8 Das Überleben von tumortragenden immunkompetenten Mäusen wird durch Fütterung von Kurkumin verlängert

In den vorangegangenen Versuchen wurde deutlich, dass Kurkumin durch Hemmung des Jak/Stat3-Signalweges *in-vitro* zu Proliferationsverminderung, Zellzyklusarrest und reduzierter Migration und Invasion der Gliomzellen führt ohne dabei nicht-transformierte Astrozyten in ihrer Viabilität einzuschränken (siehe Kapitel 6.1.2). Die dabei untersuchten Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 entstammen spontanen Gliomen aus GFAP-v-*Src* transgenen Mäusen mit dem genetischen Hintergrund des B6C3F1 Hybridstammes (siehe Kapitel 2.5). Daher können die schon *in-vitro* charakterisierten Zellen nun auch *in-vivo* untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern die diätetische Gabe von Kurkumin die Progression der transplantierten Tumore in der Maus beeinflusst. Die Mäuse wurden 7 Tage mit Kontrollfutter oder dem kurkuminversetzten Futter (0,05 %, w/w) angefüttert und bekamen anschließend 10.000 Gliomzellen der Linie Tu-2449 oder Tu-9648 in das Striatum transplantiert. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 65 beziehungsweise 80 Tagen das Kontroll- beziehungsweise das Kurkuminfutter angeboten. Nach Ablauf der Beobachtungszeit oder bei Anzeichen klinischer Symptome wurden die Tiere dekapitiert.

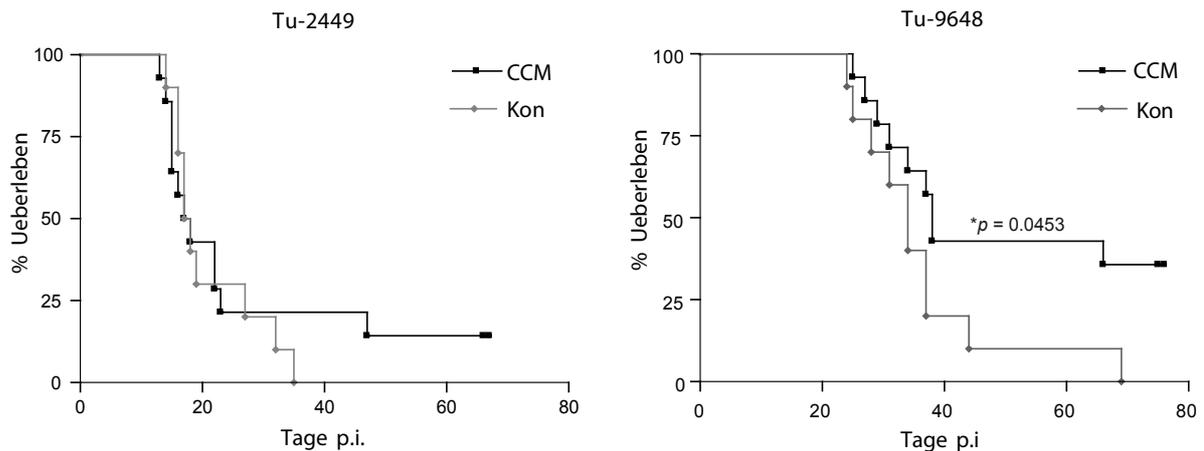


Abb. 6.12_Diätetische Gabe von Kurkumin verlängert das Langzeitüberleben von gliomtragenden Mäusen. 10.000 Zellen der Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden in das Striatum von immunkompetenten B6C3F1 Mäusen transplantiert, die zuvor 7 Tage mit Kontroll- oder Kurkuminkost angefüttert worden waren. Jede Gruppe bestand aus $n=15$ Mäusen. Den Tieren stand das Futter zur freien Verfügung. Mäuse, die einen Tu-2449 Tumor trugen zeigten bei Gabe von Kurkumin ein gesteigertes Langzeitüberleben von 15 %. Bei der Zelllinie Tu-9648 resultierte die Gabe von Kurkumin in 35 % verlängerter Lebensdauer im Vergleich zur Kontrolle. Die Auswertung erfolgte in einer Kaplan-Meier Kurve. *, $p < 0,05$; p.i.= *post implantation*.

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigten, dass die Zelllinie Tu-2449 ein aggressiveres Wachstum mit früherem Einsetzen (14 Tage p.i) im Vergleich zur Tu-9648 Zelllinie besitzt (35 Tage p.i). Dementsprechend liegt das Fenster, indem die Mäuse symptomatisch werden, bei der Tu-2449 Zelllinie zwischen 14 bis 35 Tagen und bei der Tu-9648 zwischen 35 bis 70 Tagen in den Kontrollgruppen. Die Gabe von Kurkumin im Futter konnte die Lebenserwartung in den Mäusen transplantiert mit der Tu-2449 Zelllinie nicht signifikant verlängern. Das mediane Überleben lag in beiden Versuchsgruppen bei 17,5 Tagen. Jedoch kam es in der behandelten Gruppe zu 15 % Langzeitüberlebenden, die über die 65 Tage Beobachtungszeit hinaus symptomfrei blieben. Pathologische Untersuchungen ergaben, dass diese Mäuse keinen Tumor entwickelt hatten. In den Tieren, die einen Tumor der Tu-9648 Linien trugen, kam es über den Beobachtungszeitraum von 80 Tagen zu einem signifikant verlängertem Überleben in der kurkuminbehandelten Gruppe im Vergleich zu den Tieren, die das Kontrollfutter erhalten hatten. Das mediane Überleben betrug in der behandelten Gruppe 38 Tage und in der Kontrollgruppe nur 34 Tage. Hier, 38 % der Mäuse in der kurkuminbehandelten Gruppe zeigten ein verlängertes Gesamtüberleben gemessen an der Kontrollgruppe, in der bis auf eine Maus alle bis Tag 44 p.i. der Erkrankung erlagen. Neben der erhöhten Anzahl an Langzeitüberlebenden ist auch die Strebekurve hin zu späterem Krankheitsbeginn verschoben. Auch bei den

Mäusen, transplantiert mit der Tu-9648 Zelllinie zeigten die Langzeitüberlebenden keinen Tumor.

6.2 Effekte des Stat3-*Knockdowns* durch RNA-Interferenz auf murine Gliomzellen *in-vitro* und *in-vivo*

Die Verwendung des Naturstoffes Kurukumin zeigte in den vorangegangenen Versuchen, dass die Hemmung des Jak/Stat3-Signalweges auf murine Gliomzelllinien *in-vitro* und *in-vivo* Effekte ausübt, die durch ihre antikanzerogene Wirkung für den Gliompatienten von Vorteil sein könnten.

Da bekannt ist, dass Kurkumin aber nicht ausschließlich über Stat3 wirkt sondern auch andere Signalwege beeinflusst, war es im Folgendem interessant nur die Stat3-vermittelte Effekte in den Gliomzellen zu untersuchen (Ryu et al., 2008; Dhandapani et al., 2007). Um sicher zu gehen, dass der Signalweg zuverlässig unterbrochen wird wurde die Translation von Stat3 durch Einbringen einer *shorthairpin*-RNA (shRNA), die spezifisch an die mRNA von Stat3 bindet, gehemmt. Durch diese RNA-Interferenz wird die Stat3-mRNA durch einen Proteinkomplex namens RISC (*RNA-induced silencing complex*) degradiert, so dass es zu stark verringerten Proteinspiegeln in der Zelle kommt und somit davon ausgegangen werden kann, dass der Signalweg durch Wegfall von Stat3 effektiv inhibiert wird (*Knockdown*).

6.2.1 Lentiviraler *Knockdown* in murinen Gliomzelllinien führt zu deutlich reduzierter Stat3-Expression

Die verwendeten lentiviralen Partikel wurden durch dreifache Transfektion von HEK-293T Zellen unter S2-Bedingungen hergestellt. Es wurde je ein Vektor für das Hüllprotein des VS-Virus (*Vesicular stomatitis virus*) VSV-G, ein Verpackungsplasmid und das Gentransferplasmid transfiziert. Das Gentransferplasmid enthält das zu verpackende genetische Material mit dem einzuschleusenden Transgen. Es dient dazu, dass dieses Transgen nach Umwandlung in RNA zusammen mit der lentiviralen RNA in die Viruspartikel verpackt wird und nach Infektion einer Zielzellen stabil im Genom integriert wird. Als Kontrolle wurde ein leeres Gentransferplasmid eingesetzt.

Die murinen Gliomzellen Tu-2449 und Tu-9648 wurden mit den Viruspartikeln infiziert und diese Infektion anhand der Expression des Reportergens *green fluorescent protein* (GFP) nach 24 h fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Mehrere GFP-positive Zellen wurden zu klonalen Zelllinien herangezogen und hinsichtlich der Stärke des Stat3-*Knockdowns* überprüft. Der Klon mit dem besten Stat3-*Knockdown* wurde in den folgenden *in-vitro* Versuchen verwendet.

Um die Stat3-*Knockdown*-Zellen auch im murinen Gliommodell verwenden zu können, wurden die transduzierten, GFP-positiven Zellen mittels *FACS-Sorting* angereichert aber keine Einzelzelllinien herangezogen.



Abb. 6.13_Lentivirale Transduktion mit shStat3-tragenden Vektoren führt zu verminderter Expression von Stat3 in murinen Gliomzellen. Die Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden mit lentiviralen Partikeln transduziert, die entweder einen leeren Gentransfervektor trugen oder einen Gentransfervektor, der für eine shRNA gegen Stat3 codierte. A) 48 h nach Transduktion wurden die Zellen vereinzelt und Einzellzellklone aus GFP-positiven Zellen generiert. Die daraus resultierenden Zelllinien wurden lysiert und im Western Blot auf ihre Stat3-Expression hin untersucht. Gezeigt sind hier die Leervektorkontrollen im Vergleich zu den Klonen die den besten Stat3-*Knockdown* trugen. B) Die transduzierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre GFP-Expression hin sortiert und die GFP-positiven Populationen als Zelllinien für die Transplantation kultiviert. Der Western Blot zeigt den *Knockdown* von Stat3 in Relation zu den Leervektorkontrollen.

Die Überprüfung der Stat3-Expression im Western Blot nach erfolgreicher Transduktion zeigte, dass die Proteinlevels von Stat3 durch die spezifische shRNA erfolgreich reduziert werden konnten. Im Vergleich zu der Leervektorkontrolle kann man bei dem Zellklon der Tu-2449-Linie fast von einem vollständigen *Knockdown* der Stat3-Expression sprechen (Abb. 6.13 A). Im Vergleich zu den durch *FACS-Sorting* angereicherten GFP-positiven Zellen zeigten die hergestellten klonalen Zelllinien eine deutlichere Reduktion der Stat3-Levels in den shStat3-tragenden Zellen. Das ist zurückzuführen auf die Heterogenität der Population, die bei den *FACS*-sortierten Zellen vorliegt. Die Expression des Markers GFP zeigt zwar die erfolgreiche Expression des betreffenden Gentransfersvektors an, kann aber nicht mit der tatsächlichen Stärke des *Knockdowns* korreliert werden. Erst mit der Herstellung klonaler Zelllinien und deren Überprüfung im Western Blot kann sicher davon ausgegangen werden, dass ein guter *Knockdown* auf der Einzellzebene vorlag und diese Population nicht von anderen Zellen überwachsen werden kann, die zum Beispiel durch schlechteren Stat3-*Knockdown* ein Selektionsvorteil haben. In allen folgenden *in-vitro* Versuchen wurden die klonalen Zelllinien von Tu-2449 und Tu-9648 eingesetzt.

6.2.2 Stat3-shRNA in murinen Gliomzellen führt zu verminderter Expression von tumorpromotenden Stat3-Zielgenen auf Protein- und mRNA-Ebene

Stat3 als signaltransduzierendes Protein und Transkriptionsfaktor ist in der Lage, wie in Kapitel 2.3 angesprochen, in transformierten Zellen die Tumorprogression voranzutreiben. Das wird über die Transkription der Stat3-Zielgene gewährleistet,

die zum Beispiel die Angiogenese, den Zellzyklus und das migratorische und invasive Potential des Tumors beziehungsweise der Tumorzellen beeinflussen. Im Folgenden sollte ermittelt werden inwiefern der Wegfall des onkogenen Transkriptionsfaktors Stat3 die Expression der Zielgene auf Protein- und RNA-Level beeinflusst. Im Unterschied zur Behandlung mit dem Naturstoff Kurkumin kann hierbei davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte nun ausschließlich über Stat3 vermittelt werden.

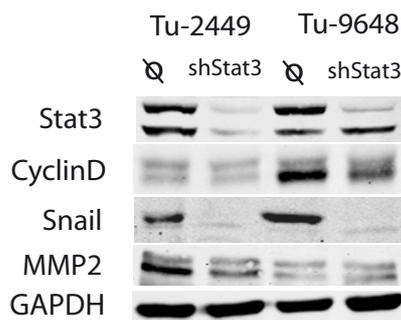


Abb. 6.14_Proteinexpression von Stat3 Zielgenen in shStat3 und Leervektor tragenden murinen Gliomzelllinien. Die Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden mit lentiviralen Partikeln transduziert, die entweder einen leeren Gentransfektor trugen oder einen Gentransfektor, der für eine shRNA gegen Stat3 codierte. Die klonalen Zelllinien wurden lysiert und im Western Blot auf die Expression von Stat3 und den angegebenen Zielgenen untersucht. Als endogene Kontrolle diente GAPDH.

Die Ergebnisse des Western Blots legten dar, dass die Reduktion des Stat3-Niveaus auf Proteinebene auch die Expression der untersuchten Zielgene beeinflusste. Es zeigte sich deutlich, dass es bezüglich des Zellzyklusregulator CyclinD in beiden shStat3-Zelllinien zu einer Reduktion des Proteinlevels in den Zellen kam, wobei hervorgehoben werden kann, dass Tu-9648-Zellen generell eine höhere endogene Expression an CyclinD zeigten als die Tu-2449-Zellen. Eine klare Abnahme der Proteinmenge durch die Einführung eines Stat3-Knockdowns erfuhr auch der Transkriptionsfaktor Snail, der die Zellmorphologie in Richtung eines mesenchymalen Phänotyps steuert (Cano et al., 2000). Diese Annahme kann gestützt werden, indem man die Expression der Matrix-Metalloprotease MMP2 mit einbezieht. Im Western Blot zeigte sich deutlich, dass eine der beiden murinen Gliomzelllinien, Tu-2449, durch den Wegfall von Stat3 eine Erniedrigung in der Expression von MMP2 erfährt. In der zweiten Zelllinie Tu-9648 kann diese Beobachtung nicht bestätigt werden.

Die Befunde aus dem Western Blot wurden mit Hilfe von *real-time-PCR* überprüft und hiermit zusätzlich noch weitere Zielgene von Stat3 untersucht. Hierbei wurde die Menge an mRNA des betreffenden Proteins quantitativ vermessen und in Relation zu einer endogenen Kontrolle (HPRT) gesetzt. Für die Auswertung wurde die Expression in den Kontrollzellen 100 % gesetzt.

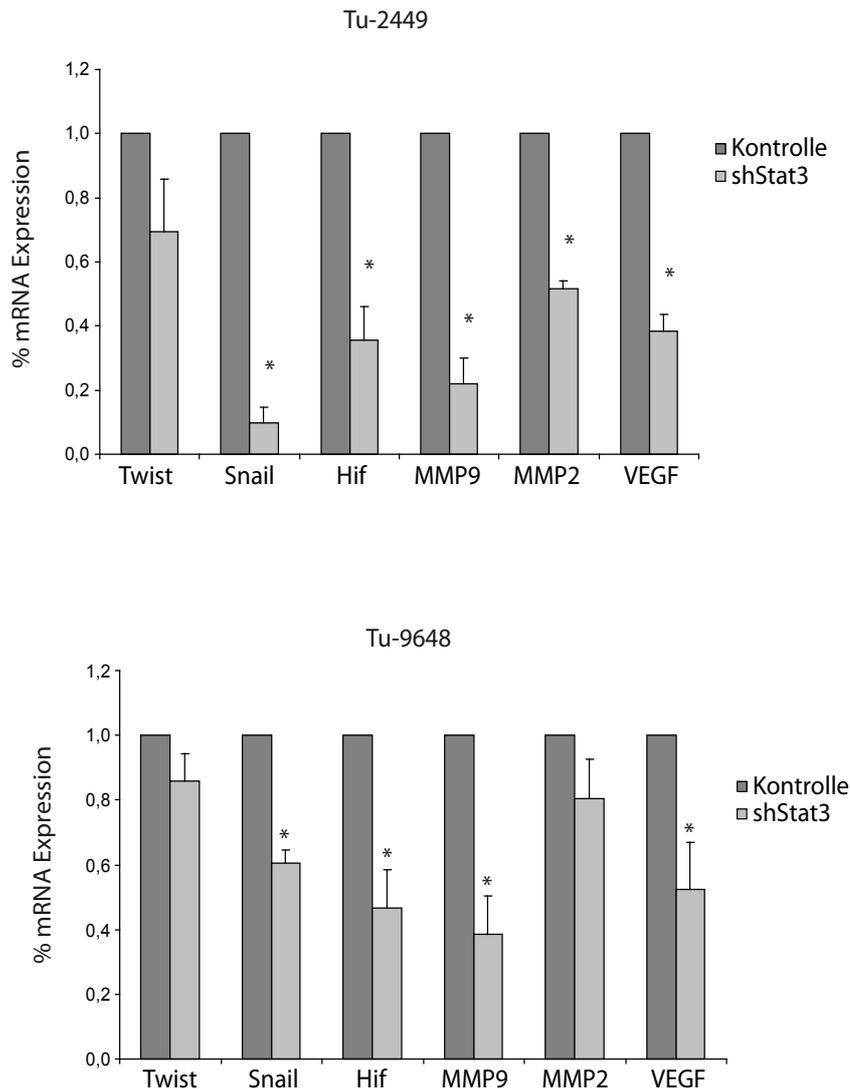


Abb. 6.15_mRNA-Expression von Stat3 Zielgenen in shStat3 und Leervektor tragenden murinen Gliomzelllinien. Die Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden mit lentiviralen Partikeln transduziert, die entweder einen leeren Gentransfektor trugen oder einen Gentransfektor, der für eine shRNA gegen Stat3 codierte. Die klonalen Zelllinien wurden lysiert und die gewonnene mRNA der Zellen wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese in einer quantitativen *realtime*-PCR eingesetzt. % mRNA-Expression bezieht sich auf die Leervektorkontrolle. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von $n = 3$ Kulturen. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Leervektorkontrolle.

Die Genexpressionsanalysen zeigten, dass der Wegfall des Transkriptionsfaktors Stat3 auch auf mRNA-Ebene der Zielgene zu Veränderungen führte. Bestätigt werden konnten die reduzierten Protein- und somit auch mRNA-Level von Snail und MMP2. Daneben wurde in beiden untersuchten Zelllinien auch die Matrix-Metalloprotease 9 als beeinflusstes Zielgen identifiziert was Hinweise bezüglich einer verminderten Invasionsfähigkeit der betroffenen Zellen lieferte. Der neben Snail wichtige Transkriptionsfaktor für die EMT Twist zeigte allerdings weder in

der Tu-2449 noch in der Tu-9648 Zelllinie eine signifikante Beeinflussung der mRNA-Expression durch einen vorhandenen Stat3-*Knockdown*. Unerwarteterweise stellte sich heraus, dass der durch Hypoxie induzierte Transkriptionsfaktor Hif-1 in unseren Versuchen ebenfalls durch Stat3 reguliert zu werden scheint. Auf dieses Ergebnis soll in Kapitel 6.2.4 weiter eingegangen werden. Weiterhin wurde auch das Expressionslevel von VEGF in beiden murinen Gliomzellen auf mRNA-Ebene untersucht und es zeigte sich, dass durch den Wegfall des Transkriptionsfaktors Stat3 eine Verminderung der VEGF-Genexpression von 60 % in der Tu-2449 Zelllinie und von 54 % in der Tu-9648 Zelllinie. Da VEGF ein sekretorisches Protein ist wurde im Folgenden ein ELISA durchgeführt, der die Menge an sekretiertem VEGF im Zellkulturüberstand bestimmte. Das Protein bindet hierbei an einen immobilisierten Antikörper gegen murines VEGF und wird anschließend mittels einem zweitem anti-VEGF Antikörper detektiert.

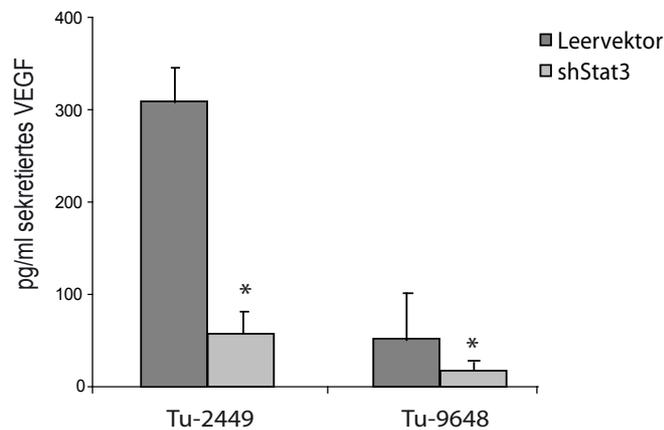


Abb. 6.16_Die Level an sekretiertem VEGF nehmen durch Depletion von Stat3 in murinen Gliomzelllinien ab. Die mit Leervektor- und shStat3-Partikeln transduzierten, klonalen Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden in Vollmedium kultiviert. Der Überstand wurde 1:1 mit Medium verdünnt im murinen VEGF-Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von $n = 3$ Versuchen. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Leervektorkontrolle.

Die Auswertung des murinen VEGF-ELISAs zeigte, dass die Menge an sekretiertem VEGF im Zellkulturüberstand stark abnahm, sobald Stat3 durch die Einführung einer shRNA in die betreffenden Zellen ausgeschaltet war. Zusätzlich zeigte dieser Versuch auch, dass die Tu-2449 und die Tu-9648 Zellen ein unterschiedliches endogenes Level an VEGF exprimierten. Die Menge an sekretiertem VEGF belief sich bei der Tu-2449 Zelllinie auf rund 300 pg VEGF/ml Zellkulturmedium hingegen die Zelllinie Tu-9648 nur rund 40 pg VEGF/ml Zellkulturmedium sekretierte. Trotzdem war die Reduktion des sekretiertem VEGF relativ gesehen in den shStat3-tragenden Zellen signifikant reduziert.

6.2.3 *Knockdown* von Stat3 führt zu reduzierter Invasion und Migration von murinen Gliomzellen

Die bereits durchgeführten Versuche ließen die Schlüsse zu, dass die transkriptionelle Modulation der Matrix-Metalloproteasen 2 und 9, hervorgerufen durch den Wegfall von Stat3, sich in einer verminderten Invasionsfähigkeit der Zellen widerspiegeln könnte. Analog zu den Invasions-Versuchen in Kapitel 6.1.5 wurden auch hier die Zellen in einer *Boyden*-Kammer ausgesät und nach 24 h diejenigen Zellen angefärbt, die durch Degradation der extrazellulären Matrix die Unterseite der *Boyden*-Kammer erreichten. Die betreffenden Zellen wurden fixiert, angefärbt und ausgezählt.

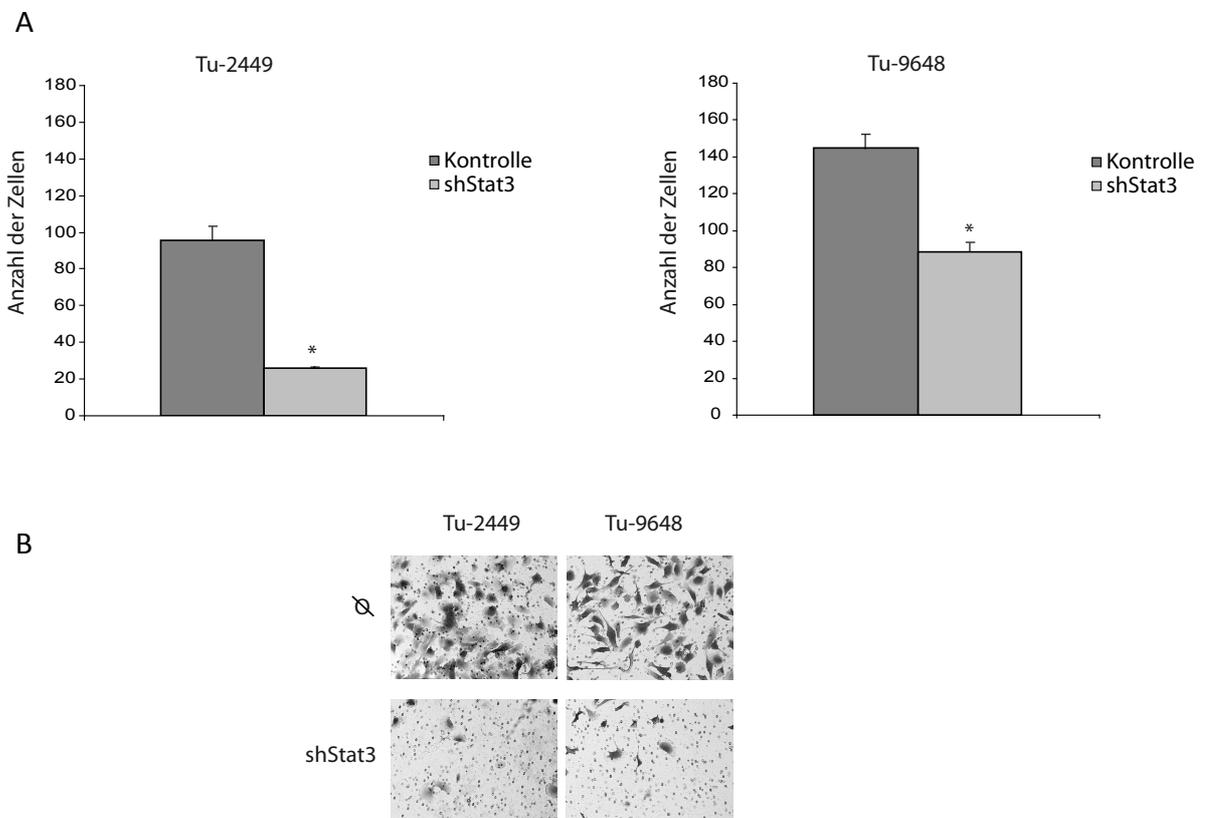


Abb. 6.17_Das invasive Potential von shStat3-tragenden Zellen ist im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert. A) Die mit Leervektor- und shStat3-Partikeln transduzierten, klonalen Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden in Medium mit 2 % FCS in die *Boyden*-Kammern ausgesät. Als Chemoattraktant diente 10 % FCS-Medium im unteren Well. Die Kammern wurden für 24 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die verbliebenen Zellen in der Kammer wurden entfernt und die auf der Unterseite befindlichen fixiert und angefärbt. Mikroskopisch wurden 10 unabhängige Sichtfelder in der Vierfachvergrößerung ausgezählt. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von n = 10 Sichtfeldern. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. *, p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. B) Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen deutlich, dass die ermittelten Effekte der reduzierten Zellinvasion nicht auf verminderte Zellviabilität zurückzuführen sind.

Die Auszählungen des Invasionsversuchs ergaben, dass Zellen die den Stat3-*Knockdown* trugen signifikant seltener die Matrix degradierten konnten als die Leervektorzellen. Das legt nahe, dass das invasive Potential muriner Gliomzellen durch Stat3 maßgeblich beeinflusst wird. Da bei diesem Vorgang Matrix-Metalloproteasen beteiligt sind, wobei MMP2 und MMP9 nachweislich durch den Stat3-*Knockdown* transkriptionell beeinflusst wurden, wurden in einem anschließenden Versuch die betreffenden MMPs und zusätzlich MMP1 durch spezifische Inhibitoren gehemmt. Dieser Versuch sollte Aufschluss darüber geben welche Protease vornehmlich die beobachteten Effekte der Invasionsfähigkeit der Zellen vermittelt. Durch den Einsatz von Stat3-*Knockdown*- Zellen konnte dieser Versuch zusätzlich eine Aussage darüber treffen, wie stark der *Knockdown* die einzelnen MMPs beeinflusst wenn man davon ausgeht, dass die Hemmung durch die spezifischen Inhibitoren nahezu komplett ist.

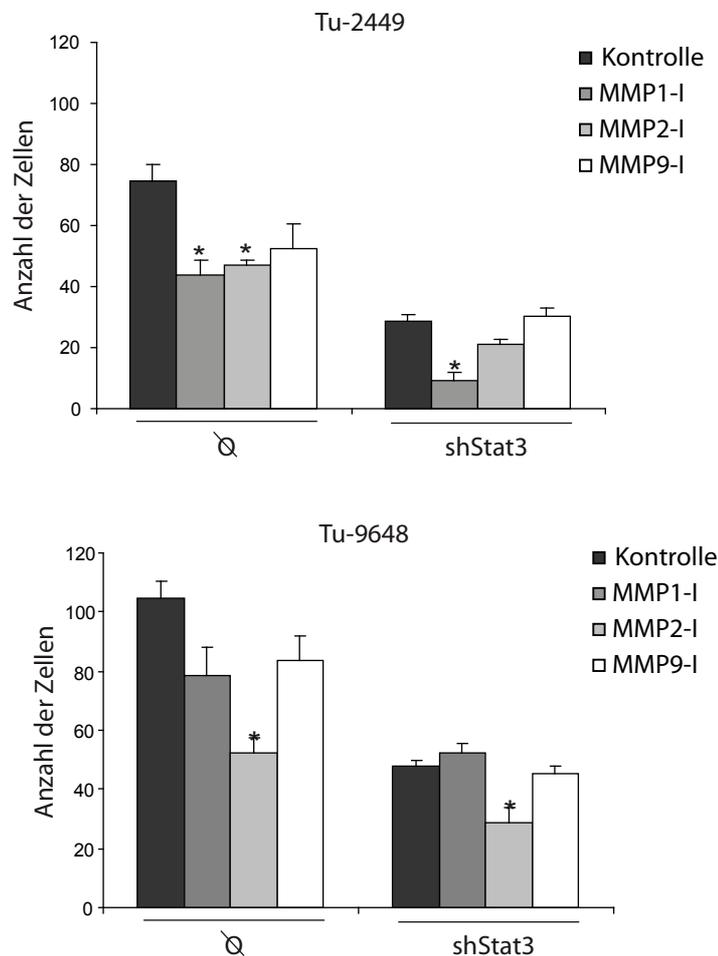


Abb. 6.18_Einsatz verschiedener MMP-Inhibitoren im Invasions-Assay bestätigt welche Protease durch den Stat3-*Knockdown* beeinflusst wird. Die mit Leervektor- und shStat3-Partikeln transduzierten, klonalen Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden in Medium mit 2 % FCS in die *Boyden*-Kammer ausgesät. Als Chemoattraktant diente 10 % FCS-Medium im unteren Well. Die Kammern wurden für 24 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert und mit den entsprechenden Inhibitoren versetzt. Als Konzentration für die Inhibitoren wurde sich am

doppelten IC_{50} -Wert orientiert. Anschließend wurden die verbliebenen Zellen in der Kammer entfernt und diejenigen auf der Unterseite mit Ethanol fixiert und mittels einer 0,1 % Kristallviolettlösung angefärbt. Mikroskopisch wurden 10 unabhängige Sichtfelder in der Vierfachvergrößerung ausgezählt. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von $n = 10$ Sichtfeldern. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

Bei der Tu-2449 Zelllinie zeigte sich, dass die größte Beeinflussung der Invasion in den Leervektorzellen durch die Einsatz des MMP1-Inhibitors erreicht wurde. Allerdings war die Zahl der invadierten Zellen nicht sehr viel geringer als bei den anderen beiden MMP-Inhibitoren. Der Einsatz des MMP1-Inhibitors in den shStat3-tragenden Zellen allerdings zeigte eine Verringerung des Invasionspotential von nahezu 50 %. Das lässt darauf schließen, dass MMP1 durch den Stat3-*Knockdown* nicht so stark beeinflusst wird wie etwa MMP2 und 9. Der Einsatz des MMP2-Inhibitors machte deutlich, dass die Invasion der *Knockdown*-Zellen nicht im gleichen Maße wie in den Kontrollzellen verhindert wird. Der Versuch mit dem MMP9-Inhibitor in der shStat3-Zelllinie bestätigte den Befund aus der Genexpressionsanalyse, die gezeigt hatte, dass die Transkription der MMP9-mRNA durch Wegfall von Stat3 um rund 80% reduziert war. Eine zusätzliche Gabe der beiden für MMP2 und 9 Inhibitoren in den *Knockdown*-Zelllinien führte daher zu keinem additiven Effekt in der Hemmung der Invasion.

In der Zelllinie Tu-9648 bestätigte sich ebenfalls der Befund der Genexpressionsanalyse der gezeigt hatte, dass der Stat3-*Knockdown* die mRNA-Level von MMP2 nicht signifikant reduzierte. Durch die Zugabe eines MMP2-Inhibitors in der shStat3-tragenden Zelllinie ließ sich die Invasion zusätzlich um rund 50 % hemmen. Vielmehr schien hier die Reduktion des invasiven Potentials der *Knockdown*-Zellen auf die verminderte Expression von MMP9 oder MMP1 zurückzuführen sein. Die Behandlung mit beiden Inhibitoren führte in den Stat3-*Knockdown*-Zellen zu keinen additiven Effekten.

Erste Hinweise zur Beeinflussung der Migrationsfähigkeit der murinen Gliomzellen durch den Stat3-*Knockdown* wurden in den Genexpressionsanalysen gewonnen die gezeigt hatten, dass Snail, ein Transkriptionsfaktor verantwortlich für den mesenchymalen Phänotyp, signifikant in beiden Zellen durch die fehlenden Stat3-Expression runterreguliert war. Vor Durchführung eines funktionellen Migrations-*Assays* wurde Podoplanin, ein Protein lokalisierter in den Invadopodien und daher mit dem migratorischen Verhalten der Zelle korrelierbar, untersucht. Die Überprüfung der Expression wurde auf Proteinebene und auf mRNA-Ebene durchgeführt.

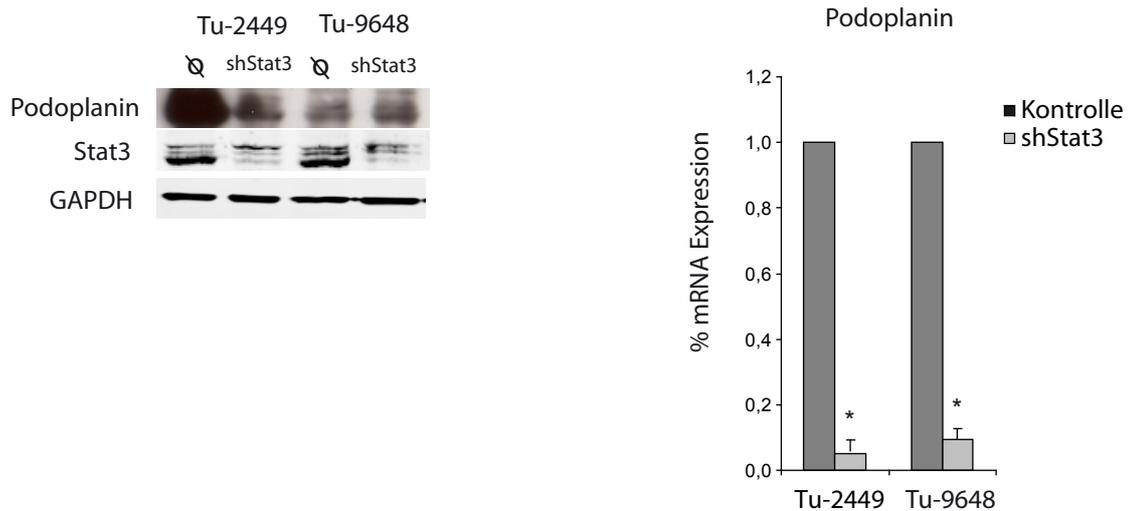


Abb. 6.19_Protein- und mRNA-Level von Podoplanin in shStat3 und Leervektor tragenden murinen Gliomzelllinien. A) Die mit Leervektor- und shStat3-Partikeln transduzierten, klonalen Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden lysiert und im Western Blot auf die Expression von Stat3 und Podoplanin hin untersucht. Als endogene Kontrolle diente GAPDH. B) Die beschriebenen Zellen wurden lysiert und die gewonnene mRNA der Zellen wurde mittels Reverser-Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese in einer quantitativen *realtime*-PCR eingesetzt. % mRNA-Expression bezieht sich auf die Leervektorkontrolle. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von $n = 3$ Kulturen. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Leervektorkontrolle.

Im Western Blot wurde deutlich, dass die Proteinlevel von Podoplanin in der Zelllinie Tu-2449 durch die Stat3-Depletion im Vergleich zur Kontrollzelllinie verändert waren. Es zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Podoplanin-Expression wenn Stat3 in den betreffenden Zellen fehlte. In der zweiten Zelllinie Tu-9648 ist diese klare Expressionsveränderung aber nicht zu beobachten.

Auf mRNA-Ebene zeigte sich allerdings, dass die Menge an Podoplanin-mRNA durch den Wegfall von Stat3 in beiden untersuchten Zelllinien um mehr als 90 % herunterreguliert ist. Ist dieses Ergebnis noch kohärent mit den Untersuchungen im Western Blot für die Tu-2449-Zelllinie so zeigt sich für die Tu-9648-Zelllinie ein unerwartetes Ergebnis. Das ist zurückzuführen auf die Totalexpression der mRNA, die in den Tu-9648 Zellen viel geringer ist als in den Tu-2449-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Stat3-*Knockdown* Gene beeinflusst die wichtig für die Migration der Zellen waren wurde ein *Scratch*-Assay durchgeführt um verifizieren zu können, dass die Veränderungen auf der molekularen Ebene sich auch im zellulären Verhalten widerspiegeln.

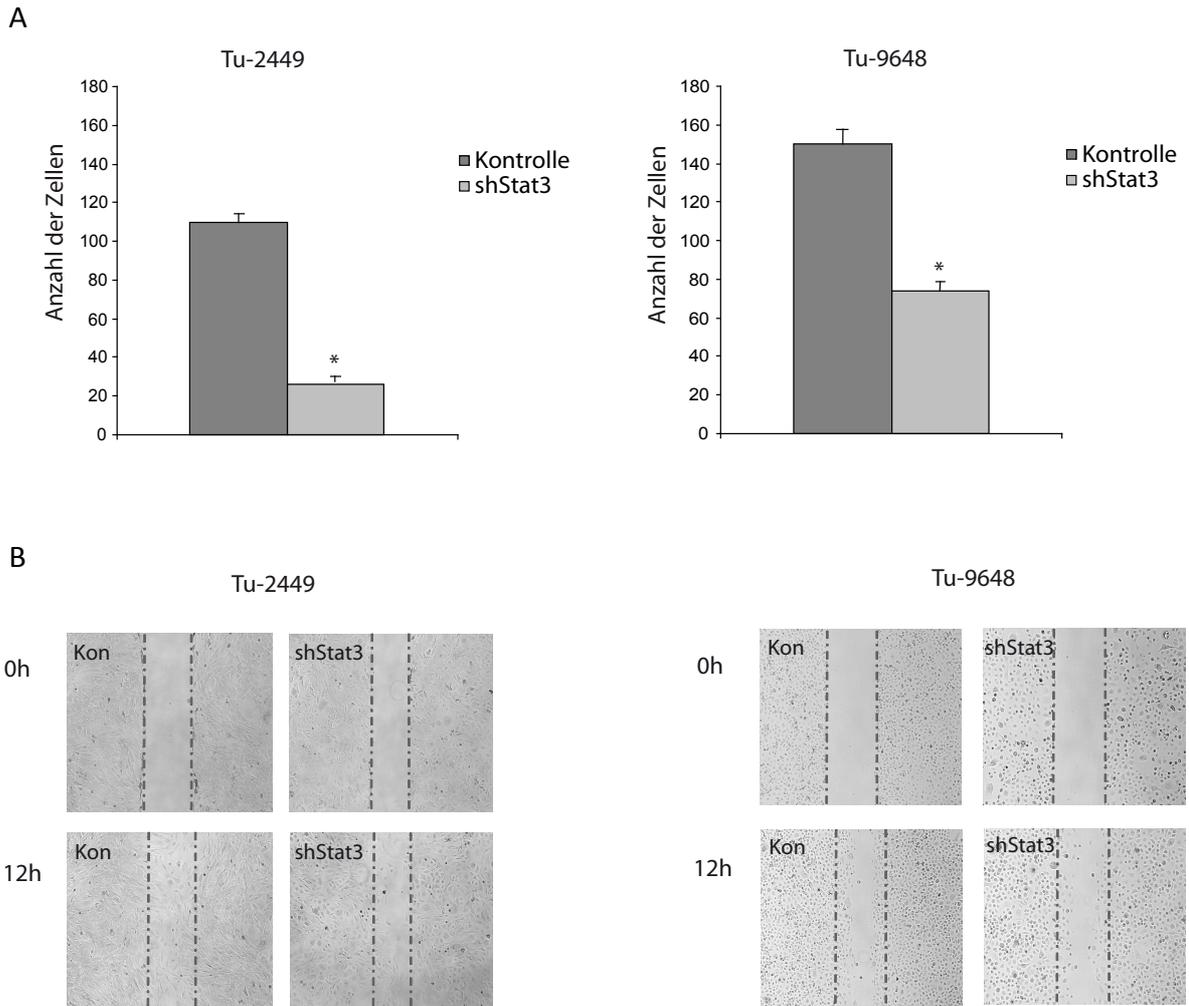


Abb. 6.20_Stat3-Depletion reduziert das migratorische Potential von Tu-2449 und Tu-9648 Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. A) Die Stat3-defizienten Zelllinien und die entsprechenden Kontrollzellen wurden ausgesät und nach dem Adhärenz 2 h vor dem Scratch mit Mitomycin C behandelt und weitere 2 h inkubiert. Es erfolgte der *Scratch* mit einer Pipettenspitze und ein Mediumwechsel, um die toten Zellen zu entfernen. Eine repräsentative Stelle des Scratch wurde zum 0 h und 12 h Zeitpunkt fotografiert. Anschließend wurde die Anzahl der eingewanderten Zellen bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Leerkontrolle. B) Repräsentative Abbildungen um zu verdeutlichen, dass die Zellen vital erscheinen.

Die Ergebnisse des Versuches zeigten auf, dass das migratorische Verhalten der Zellen die den Stat3-*Knockdown* trugen im Vergleich zu den Kontrollzellen verändert war. In beiden Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die schon untersuchten Veränderungen auf Genexpressionsebene in den Zellen, welche die shStat3 trugen, zu einer Reduzierung des migratorischen Potentials führte. Die Anzahl der Zellen, die in die Wunde zurückmigrierten, ist in der Tu-2449 Zelllinie von rund 120 auf 25 gefallen und in der Tu-9648 Zelllinie von rund 150 migrierten Zellen auf rund 70 wenn diese die shStat3 exprimierten. Exemplarisch zeigt die Abbildung 6.17 B die Fotos direkt vor dem *Scratch* und 12 h später die

veranschaulichen, dass die Migration der *Stat3-Knockdown* tragenden Zellen verringert ist aber dieser Effekt nicht durch verminderte Zellviabilität entstanden zu sein scheint.

6.2.4 *Knockdown* von Stat3 beeinflusst den Hypoxie-induzierten Faktor 1 (*Hif1 α*) in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor

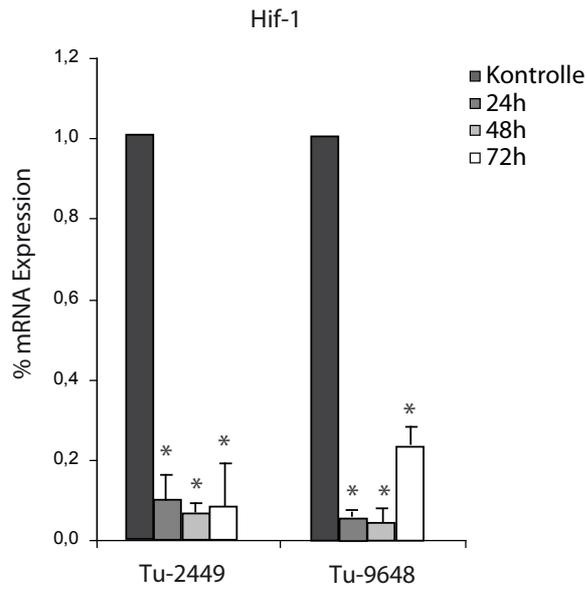
Im Verlauf der Tumorprogression kommt es auf Grund der wachsenden Zellmasse zur Entstehung von Hypoxie im Tumor und Tumormilieu. Um sich an die veränderten Konditionen anzupassen, kommt es zur vermehrten Transkription von *Hif1 α* , einem Transkriptionsfaktor, der es den Zellen erlaubt ihr Genexpressionsprofil zu ändern um unter Hypoxie viabel zu bleiben (Semeza et al., 2010, Majmundar et al., 2010). Dazu gehören die Induktion von VEGF, die metabolische Anpassung durch die Beeinflussung des Glukosetransporters 1 (*Glut-1*) und Vereinfachung der Metastasierung durch transkriptionelle Steuerung der *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (*PDK-1*) (Papadakis et al., 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass *Stat3* aber auch unter Hypoxie die Angiogenese und Migration der Glioblastomen steuern kann (Kang et al., 2010).

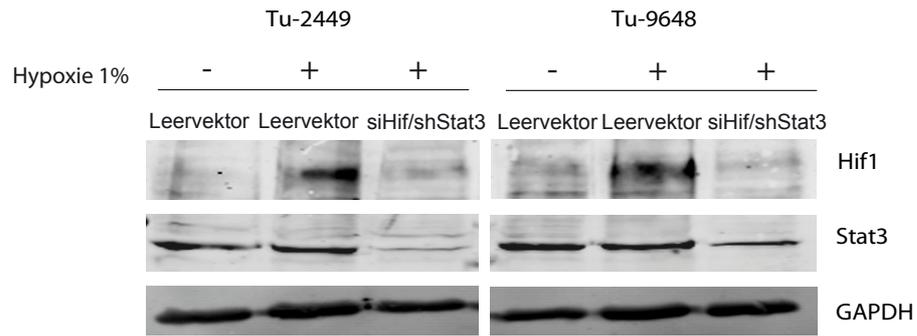
In Kapitel 6.1.2 hatten die Ergebnisse der *realtime*-PCR gezeigt, dass in beiden murinen Gliomzelllinien die mRNA-Level von *Hif1 α* reduziert waren, wenn *Stat3* in den Zellen fehlte. Das legt die Annahme nahe, dass auch in den untersuchten murinen Glioblastomzellen mit der konstitutiven *Stat3*-Aktivierung die *Hif1 α* -vermittelten Effekte durch *Stat3* gesteuert werden. Demnach würde *Stat3* unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen auf die Transkription der *Hif1 α* -Zielgene Einfluss nehmen können und als *upstream* liegender Transkriptionsfaktor noch mehr tumorpromotende Kaskaden steuern kann als bisher angenommen. Um diese Annahme stützen zu können wurde in die *Stat3-Knockdown*-Zellen zusätzlich ein transienter *Knockdown* von *Hif1 α* mittels *small interfering* RNA

(*siRNA*) eingebracht und im Folgenden dann der Effekt auf die Transkription tumorpromotender Gene hin untersucht. Da das Protein *Hif1 α* erst im hypoxischen Milieu stabilisiert im Zytoplasma vorliegen kann um dann in den Kern zu translozieren wurde der Effekt des *Hif1 α -Knockdown* auf die Zielgene unter Hypoxie gemessen. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Western Blot unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Nur so lässt sich eine Abnahme von *Hif1 α* auch auf Proteinlevel und damit in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor zuverlässig feststellen. Die so getesteten Zellen wurden anschließend in einer *realtime*-PCR auf mRNA- Expressionslevel der Zielgene untersucht.

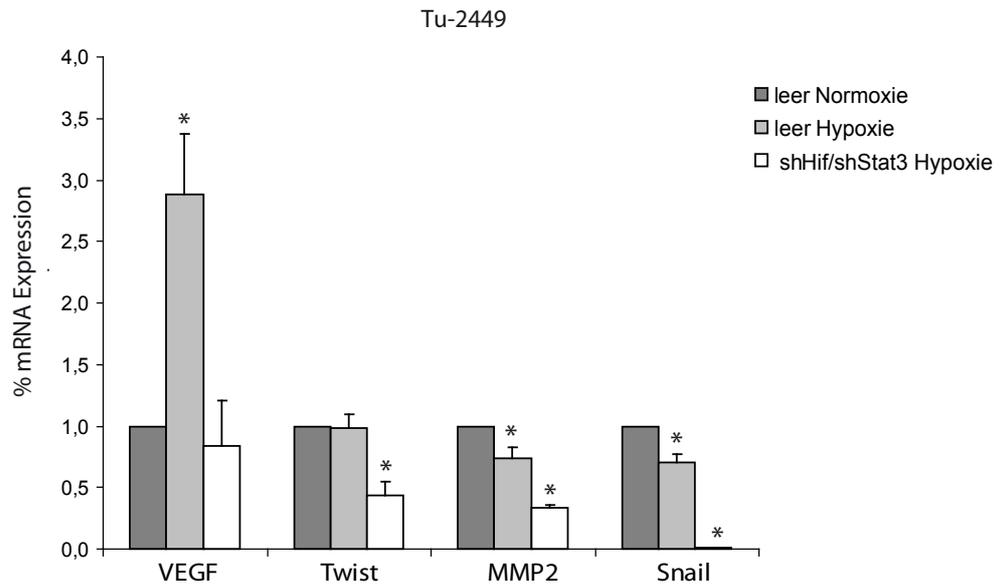
A



B



C



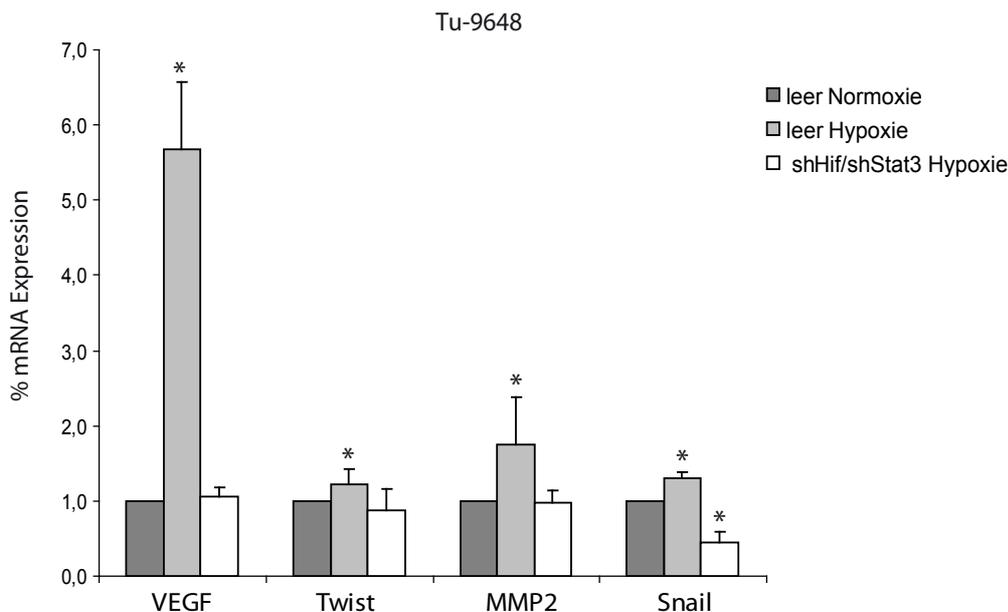


Abb. 6.21_mRNA-Expressionslevel von tumorpromotenden Gene wird durch zusätzlichen transienten Hif1 α -Knockdown nur gering beeinflusst. A) Die Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 wurden mit siRNA gegen Hif1 α und Kontroll-siRNA transfiziert. Jeweils nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die gewonnene mRNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese in einer quantitativen *realtime*-PCR eingesetzt. B) Für die Kontrolle des Hif1 α - und Stat3-Knockdowns auf Proteinebene wurden die Kontroll- und Doppelknockdown-Zellen unter 1% O₂ 24 h nach der Transfektion mit der siRNA gegen Hif1 α für weiter 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im Western Blot auf Stat3 und Hif1 α hin untersucht. C) Um die Effekte des Hif1 α -Stat3-Knockdowns unter Hypoxie messen zu können wurden die Zellen 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen Hif1 α oder Kontroll-siRNA für weitere 24 h in einem Hypoxiebrutschrank bei 1% O₂ kultiviert. Nach anschließender Lyse wurde die isolierte mRNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese in einer quantitativen *realtime*-PCR eingesetzt. % mRNA-Expression bezieht sich auf die Leervektorkontrolle unter Normoxie. Ein Experiment entspricht den Mittelwerten (SEM) von n = 3 Kulturen. *, p < 0,05 im Vergleich zur Leervektorkontrolle unter Normoxie.

In Abbildung 6.21 A ist zu sehen, dass der transiente *Knockdown* in den Zellen durch siRNA gegen Hif1 α nach 24 h eintrat und bis zu 72 h in der Zelle stabil blieb. Die weiteren Versuche wurden somit alle innerhalb dieses Zeitrahmens unternommen.

Der Western Blot in Abbildung 6.21 zeigte auf, dass sowohl der Stat3-Knockdown in den murinen Gliomzellen als auch der transiente Hif1 α -*Knockdown* sich in den Proteinlevel der beiden Transkriptionsfaktoren widerspiegeln. Deutlich erkennbar war die Reduzierung der Hif1 α -Bande nach Induktion durch Hypoxie. Der Stat3-*Knockdown* blieb stabil in den Zellen erhalten. Nach Überprüfung der Proteinlevel wurden zusätzlich die mRNA-Level der tumorpromotenden Zielgene untersucht.

Unter Hypoxie zeigten beide Zelllinien in den Kontrollen keine starke Induktion der Transkription der Zielgene außer VEGF (Abbildung 6.21 B). Die nun zusätzliche Aktivierung von Hif1 α schien nicht maßgeblich zur Erhöhung der mRNA-Level

beizutragen. Wurde nun Hif1 α und Stat3 in den Zellen ausgeschaltet kam es in der Zelllinie Tu-2449 zur signifikanten Verringerung der mRNA-Level von MMP2, Twist und Snail. Diese Veränderungen waren zwar statistisch signifikant aber zeugten in der prozentual gemessenen Erniedrigung von keinem additiven Effekt des nun zusätzlich eingeführten Hif1 α -*Knockdowns*. In der Zelllinie Tu-9648 war unter Hypoxie trotz des Wegfalls von Hif1 α nur die Transkription von Snail signifikant erniedrigt, die mRNA Level von MMP2 und Twist gleichen denen eines reinen Stat3-*Knockdowns* unter normoxischen Bedingungen.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien durch Hypoxie keine vermehrte Induktion der tumorpromotenden Gene erfahren. Die durch Sauerstoffmangel eingeleitete Stabilisierung und Aktivierung von Hif1 α als Transkriptionsfaktor zeigte auf mRNA-Ebene keine starke Expressionserhöhung der untersuchten Zielgene. Zusätzlich brachte der Hif1 α -*Knockdown* in diesen Zellen mit der konstitutiven Stat3-Aktivierung keinen additiven Effekt zum Stat3 *Knockdown*. Das deutet darauf hin, dass die hier untersuchten Zelllinien stark von Stat3 als tumorförderndem Transkriptionsfaktor abhängig zu sein scheinen und dieses Modell daher optimal für Untersuchungen der Stat3-Interferenz ist.

6.2.5 Das Überleben von Mäusen, die einen Stat3-defizienten Tu-2449 Tumor tragen ist signifikant verlängert

Die vorangegangenen Versuche zeigten auf, dass ein Stat3-*Knockdown in-vitro* die Gliom-typischen Charakteristika wie starke Invasion, erhöhte Migration und die Überexpression von tumorfördernden Zielgenen von Stat3 aber auch Hif1 α reduzieren kann. Interessant war daher, ob sich diese beobachteten Effekte auch *in-vivo* bezüglich Überleben und Beginn der Krankheitssymptomatik bemerkbar machen würden.

Den drei Wochen alten B6C3F1 Mäusen wurden 10.000 Kontrollzellen oder Zellen, die den Stat3-*Knockdown* trugen ins Striatum transplantiert. Die Zellen entstammten hier nicht den klonalen Zelllinien sondern wurden nach erfolgreicher Transduktion mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung nach ihrem Marker GFP selektiert und angereichert. Der Stat3-*Knockdown* wurde vor der Transplantation im Western Blot überprüft (siehe Abb. 6.13 B).

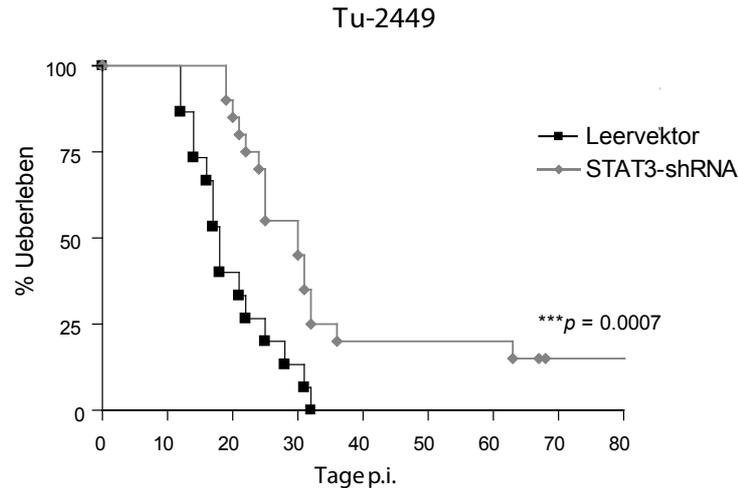


Abb. 6.22_Stat3-Knockdown in transplantierten Tu-2449 murinen Gliomzellen verlängert das Langzeitüberleben und verzögert den Krankheitsbeginn in Mäusen. 10.000 Tu-2449-Kontrollzellen und Stat3-Knockdown Zellen wurden in das Striatum von immunkompetenten B6C3F1 Mäusen transplantiert. Jede Gruppe bestand aus n=15 Mäusen. Die Auswertung erfolgte in einer Kaplan-Meier Überlebenskurve. *, $p < 0,05$; p.i.= *post implantation*.

Die Kaplan-Meier Überlebenskurven in den Tieren transplantiert mit beiden gentechnisch veränderten Tu-2449 Zellpopulationen zeigten ein signifikant längeres Überleben jener Mäuse, in deren Tumor ein Stat3-Knockdown vorlag. Neben der verlängerten Lebenszeit war zusätzlich noch ein späterer Ausbruch der Tumorsymptomatik von sieben Tagen zu beobachten. Bei den Tieren transplantiert mit den Kontrollzellen lag das mittlere Überleben bei 18 Tagen während hingegen die Tiere mit dem Stat3-defizienten-Tumor ein mittleres Überleben von 30 Tagen zeigten. Diese nahezu Verdopplung des Überlebens lässt die Rückschlüsse zu, dass die *in-vitro* untersuchten Auswirkungen der Stat3-Depletion auf die Tumorzellen auch *in-vivo* zum Tragen kommen.

In Abbildung 6.23 ist exemplarisch die Lage und das Wachstum eines Tu-2449 Kontrolltumors dargestellt. Die Bilder wurden in Marburg am Kleintier-Magnetresonanztomographie (MRT)-Imaging Zentrum mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Michael Bette gefertigt. Die Feldstärke des MRT beträgt sieben Tesla.

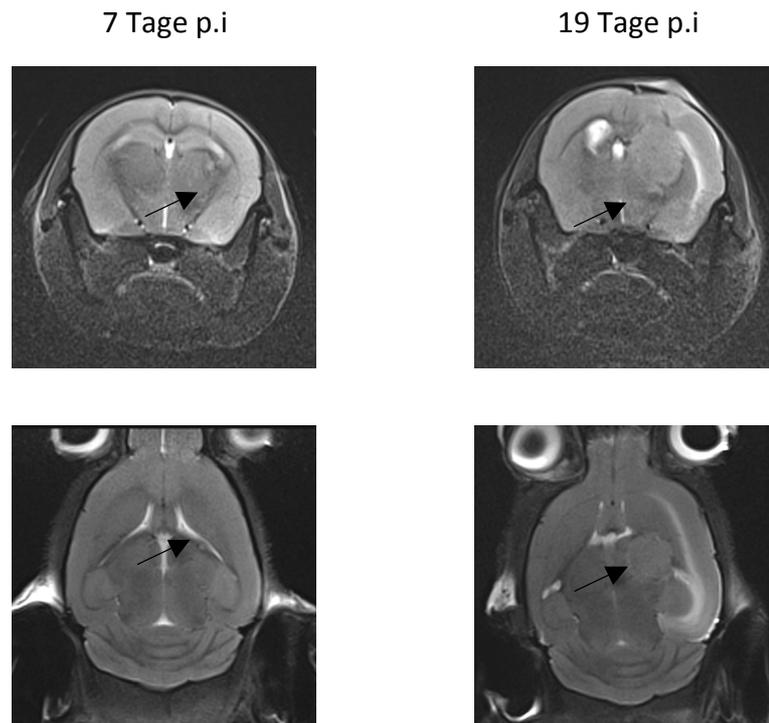


Abb. 6.23_MRT-Aufnahme eines Tu-2449 Kontrolltumors an Tag 7 und Tag 19 nach Transplantation. 10.000 Tu-2449-Kontrollzellen wurden in das Striatum von immunkompetenten B6C3F1 Mäusen transplantiert. Das Tier wurde mit Isofluran betäubt und im 7 Tesla Kleintier-MRT der Universität Marburg nach den angegebenen Zeitpunkten untersucht um die Lage des Tumors zu ermitteln. Die Pfeile markieren den Tumor. p.i.= *post implantation*.

Der Tumor zeigte keinen Reflux in den Stichkanal sondern wuchs im Gehirn ohne feste Abgrenzung. Die Lage ist okzipital zum Bregma nahe dem Ventrikel ohne aber ausschließlich dort zu wachsen sondern invasiv ins umliegende Hirnparenchym einzuwandern. Durch die Anwendung fester Koordinaten bei der Arbeit mit dem stereotaktischen Rahmen kann davon ausgegangen werden, dass die Lage bei allen transplantierten Tumoren ähnlich war unter der Berücksichtigung der Individualität jeder Maus. In die Kaplan-Meier Überlebenskurven flossen nur Tiere ein, die im MRT sichtbar die Bildung eines Tumors zeigten.

6.2.6 Verwendung von organotypischen Schnittkulturen verdeutlicht die Invasion der Gliomzellen auf Einzelzellebene

Neben den durchgeführten *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten wurde die Migration und Invasion der murinen Gliomzellen auch mit Hilfe eines *ex-vivo* Modells untersucht. Für diesen Versuchsansatz wurden aus Gehirnen von neonatalen B6C3F1-Mäusen 400 µm dicke Hirnschnitte angefertigt, die bis zu drei Wochen in Kultur viabel gehalten werden können. Dieses Modell macht es möglich

das Verhalten der Gliomzellen in ihrer natürlichen Umgebung mikroskopisch über längere Zeiträume zu beobachten.

Die eingesetzten Zellen wurden durch ihren Selektionsmarker GFP (grün) oder RFP (rot) unter einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Je nach Versuchsansatz wurden 5000 Kontrollzellen in 0,5 μ l Kulturmedium oder ein Gemisch aus 2500 Kontroll- und 2500 shStat3-Zellen mit einer Pipette auf den Hirnschnitt appliziert. Die Kulturen wurden anschließend zu den angegebenen Zeiträumen mikroskopiert und fotografiert. Exemplarisch wurden in diesem Versuch die Tu-2449 Zellen eingesetzt.

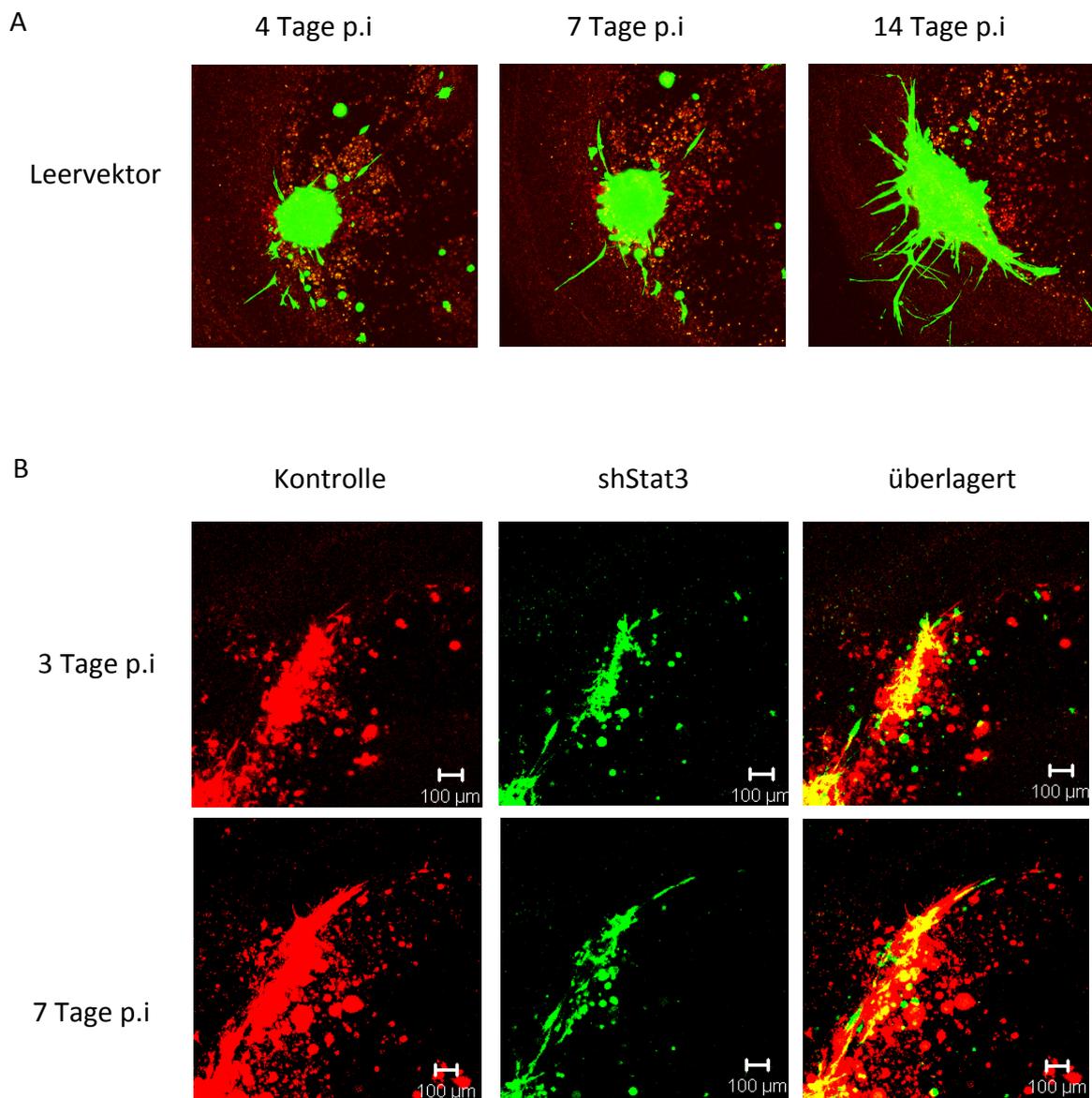


Abb. 6.24_ Organotypische Schnittkulturen verdeutlichen das infiltrative Verhalten der Gliomzellen auf der Einzelzellebene. A) 5000 Tu-2449-Kontrollzellen mit dem Marker GFP wurden mit Hilfe einer Pipette auf die Schnittkulturen von neonatalen B6C3F1 Mäusehirnen appliziert. Die Applikationsstelle wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht und fotografiert. B) In diesem Versuchansatz wurden je 2500 Zellen von RFP-markierten Kontrollzellen und GFP-markierten shStat3-tragenden Zellen gemeinsam auf die Schnittkultur gegeben. Das Verhalten der einzelnen Zellpopulationen wurde 3 und 7 Tage nach der Applikation mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht und fotografiert. p.i.= *post implantation*. In Zusammenarbeit mit Katerina Copanaki, AG Deller, Universitätsklinikum Frankfurt.

Die Arbeit mit den organotypischen Schnittkulturen verdeutlicht den invasiven Charakter des Glioblastoms. Es war zu beobachten, dass wie im Abb. 6.24 A dargestellt sich einzelne Zellen aus dem Verband lösen können und entlang distinkter Strukturen in das Hirnparenchym einwandern. Weiterhin zeigten diese Aufnahmen, dass auch nach 14 Tagen in Kultur der Hirnschnitt sowie die applizierten Zellen viabel waren und die Gliomzellen zusätzlich noch proliferierten. Innerhalb von 14 Tagen waren viele Zellen vom Ursprungsort wegmigriert. Dieses Verhalten konnte in unserem Versuchsansatz bildlich dargestellt werden.

In Abbildung 6.24 B wurde dem Verhalten der Kontrollzellen im Vergleich zu den Stat3-*Knockdown* Zellen dargestellt. Es wurde deutlich, dass nach der gemeinsamen Applikation der Zellen auf dem Hirnschnitt das Verhalten über den Beobachtungszeitraum unterschiedlich war. Im Gegensatz zu den Kontrollgliomzellen wanderten die GFP-markierten shStat3-Zellen nicht vergleichbar weit von dem Applikationsursprung weg das heißt sie zeigten die schon *in-vitro* untersuchte Beeinträchtigung ihrer Migrations- und Invasionsfähigkeit auch im *ex-vivo* Modell. Zusätzlich wurde deutlich, dass die Stat3-*Knockdown*-Zellen sich nicht optimal an das Milieu anpassen konnten, da sie nicht die gleiche Prolifertionsrate aufzeigten wie die Kontrollzellen. Nach 4 Tagen Inkubation auf dem Hirnschnitt zeigten die Fluoreszenzaufnahmen der Leervektorzellen eine deutliche Zunahme der Zellmenge hingegen die shStat3-Zellen innerhalb dieses Zeitraumes keine vergleichbare Vermehrung der Zellpopulation aufwiesen. Die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen veranschaulicht noch mal, wie konzentriert die Stat3-*Knockdown*-Zellen an dem Applikationsort verharrten während die Kontrollzellen eine ungleich größere Fläche auf dem Hirnschnitt einnahmen.

Der *ex-vivo* Versuchsansatz ist in der Lage, die Eigenschaften eines Glioms gut abzubilden und stellt somit ein Modell dar, dass geeignet ist für Interventionsansätze die auf Migration, Invasion und Proliferation von Gliomzellen abzielen.

7 Diskussion

7.1 Der Einfluss von Kurkumin auf den Jak/Stat3 Signalweg in Glioblastomen

Das Glioblastom multiforme (WHO Grad IV) ist der häufigste und zugleich bösartigste hirneigene Tumor im Erwachsenenalter. Die Erkrankung tritt mit einer Inzidenz von 3 bis 3,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Europa und den USA auf (Ohgaki und Kleihues 2005). Bis heute ist das Glioblastom trotz multimodalen Therapien und verbesserten Operationstechniken nicht heilbar. Die momentane Therapie besteht je nach Konstitution des Patienten und der Lokalisation des Tumors meist aus der Operation mit angeschlossener Strahlen- und adjuvanter Chemotherapie. Das aggressive Wachstum und die ausgeprägte Resistenz gegenüber den verfügbaren Therapien der Bestrahlung und Chemotherapie sind Hauptgründe für die schlechte Prognose für Patienten mit Glioblastomen, deren medianes Überleben immer noch unter der Zwei-Jahres-Grenze liegt (Stupp et al., 2005, Stummer et al., 2006, Bahr et al., 2009, Senft et al., 2010b). Daher ist es von Nöten neue therapeutische Strategien zu entwickeln, die selektiv wichtige Signalwege der Krebszelle angreifen.

Für die klinische Anwendung steht im Vordergrund, dass das betreffende Therapeutikum effektiv aber auch selektiv die Tumorzellen angreift ohne das umliegende Hirnparenchym negativ zu beeinflussen.

Kurkumin, gewonnen aus dem Rhizom der Pflanze *Curcuma longa*, ist die pharmakologisch aktive Substanz des Gewürzes Kurkuma, welches eine Hauptzutat des Currys darstellt. Da diese dietätische Substanz täglicher Bestandteil der Nahrung von Millionen von Menschen ist, kann sie, trotz fehlender Langezeitstudien im Tier oder Mensch, als unbedenklich eingestuft werden (Lopez-Lazaro, 2008, Ravindran et al., 2009, Aggarwal et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Kurkumin ein breites Wirkspektrum besitzt welches anti-oxidative, anti-virale, anti-bakterielle und anti-inflammatorische Effekte vermittelt (Aggarwal et al., 2007). Daneben wurden auch therapeutische Effekte von Kurkumin bei Krebserkrankungen festgestellt (Bayet-Robert et al., 2010, Patel et al., 2010). Neben zytotoxischen Effekten auf die transformierten Zellen selbst konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der Einsatz von Kurkumin auch Radio- und Chemosensitivität des Tumors erhöht (Dhandapani et al., 2007, Sandur et al., 2009).

Kurkumin hat pleiotrope Effekte auf mehrere Signaltransduktionswege und seine anti-karzinogenen Effekte wurden zurückgeführt auf die Beeinflussung der Signalwege von NF- κ B, ERK, AKT oder mTOR (Luthra et al., 2009., Aoki et al., 2007, Kim et al., 2005, Aggrawal et al., 2007). Trotz des Wissens, dass Stat3 in vielen verschiedenen Krebsarten dereguliert, das heißt konstitutiv aktiv ist, ist der Einfluss von Kurkumin auf den Stat3-Signalweg weniger gut untersucht (Weissenberger und Priester et al., 2010, Senft et al., 2010). Stat3 wirkt in transformierten Zellen als onkogener Transkriptionsfaktor und zeigt auch in Gliomen eine konstitutive Aktivierung, die mit dem Überleben der Patienten korreliert (siehe Kapitel 1.3 und 1.3.1, Birner et al., 2010). Im Kontrast dazu sind normale Zellen relativ tolerant gegenüber der Hemmung des Stat3-Signalweges was Stat3 zu einem exzellenten Zielmolekül für die molekulare Krebstherapie macht (Yu et al., 2009, Buettner et al., 2002).

7.1.1 Effekte von Kurkumin auf die Stat3-Phosphorylierung und Proliferation

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Stat3 in drei murinen Gliomzelllinien bei Behandlung mit Kurkumin konzentrationsabhängig gehemmt werden konnte. Diese Abnahme der konstitutiven Phosphorylierung wurde vermittelt durch die Dephosphorylierung der *upstream* liegenden Januskinasen 1/2, was im Western Blot ebenfalls abhängig von der eingesetzten Kurkuminkonzentration nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung legt nahe, dass Kurkumin in der Lage sein kann, eine Tyrosin-Phosphatase zu beeinflussen, die letztendlich den Jak/Stat3-Signalweg regulieren kann. Kim et al. identifizierten 2003 in Mikroglia die Phosphatase SHP-2 (*Src homology 2-containing tyrosine phosphatase*), deren Aktivierung durch Kurkumin den Stat3-Signalweg hemmt (Kim et al., 2003). Diese Phosphatase wirkt zusätzlich auch auf den mutierten EGF-Rezeptor EGFRvIII, was in Glioblastomzellen die fortschreitende Transformation und Migration der Zellen hemmen kann (Kapoor und O'Rourke, 2010). Diese Publikationen zeigen, dass Kurkumin Januskinasen ebenso wie Rezeptortyrosinkinasen dephosphoryliert und somit den Stat3-Signalweg, der ebenfalls durch den EGF-Rezeptor seine initiale Phosphorylierung erhalten kann, beeinflusst (Raptis et al., 2009). Das Kurkumin nicht exklusiv über die Januskinasen 1/2 wirkt wird ebenfalls deutlich, vergleicht man den Phosphorylierungsstatus von Stat3 und den der Kinasen bei gleicher Kurkuminkonzentration. Abbildung 6.1 macht deutlich, dass bereits bei 20 μ M eingesetztem Kurkumin Stat3 nahezu vollständig in allen drei murinen Zelllinien dephosphoryliert vorliegt, hingegen die Januskinasen erst bei 50 μ M Kurkumin vollständig unphosphoryliert waren. Kurkumin muss somit auch die Dephosphorylierung oder anderweitige Hemmung der Aktivität anderer Kinasen

wie die bereits beschriebene EGFRvIII-Tyrosinkinase beeinflussen können. In Frage kommt hierbei einer der Hauptmediatoren des Stat3-Signalweges, das Interleukin-6 (IL-6). IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das eine Schlüsselrolle in der angeborenen und erworbenen Immunität spielt. Sein membranboundener Rezeptor befindet sich zwar nur auf Leberzellen und Leukozyten, der lösliche Rezeptor allerdings kann nach Bindung von IL-6 an das Glykoprotein gp130 binden, welches in der Zellmembran vieler Zelltypen vorhanden ist (Jones, 2005, Heinrich et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Kurkumin die Synthese von IL-6 hemmen kann (Aggarwal, 2010). Dadurch können weniger IL-6-gebundene Rezeptoren an gp130 binden und die Phosphorylierung der Januskinasen einleiten. Ein Effekt hiervon wäre unter anderem die beobachtete Abnahme des Phosphorylierungsstatus der Kinasen nach Kurkuminbehandlung. Dieser Effekt kann zusätzlich selbstverstärkend wirken, da es die IL-6/Stat3 autokrine Schleife hemmt und somit die Wirkung des Kurkumins potenzieren kann (Hartman et al., 2011).

Die beobachtete Hemmung der Stat3-Phosphorylierung durch Kurkumin verläuft zusätzlich schneller (2 h, Daten nicht gezeigt) und bei niedrigeren Dosen im Vergleich zu anderen Januskinasen-Inhibitoren wie zum Beispiel Tyrphostin AG490. Senft et al. erzielten eine Inhibierung der Stat3-Aktivierung in humanen Gliomzelllinien erst bei 100 μM eingesetzter Substanz (Senft et al., 2010c). *Stattic* hingegen, ein niedermolekularer selektiver Inhibitor der Stat3-Phosphorylierung und Dimerisierung, wirkt bei den gleichen niedrigen Konzentrationen wie Kurkumin (Schust et al., 2006). Kurkumin wäre allerdings als *multi-target drug* für eine Anwendung im Patienten vorzuziehen, da somit verschiedene deregulierte Signalwege der Krebszellen angegriffen werden würden.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Kurkumin einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von transformierten Zellen hat (siehe Abbildung 6.2). Die murinen Gliomzelllinien zeigten im MTT-Assay ab einer eingesetzten Konzentration von 20 beziehungsweise 25 μM eine Hemmung ihrer Proliferation und einen stagnierenden bis negativen Wachstumsverlauf über die 72 h Behandlungszeit. Diese Ergebnisse sind kohärent mit anderen Daten aus der Literatur betreffend Brustkrebs, Kopf-Hals Tumore und weiteren Studien an Gliomen (Beevers et al., 2009, LoTempio et al., 2005, Aggarwal et al., 2004, Rahaman et al., 2002, Senft et al., 2010c). Primäre Rattenastrozyten hingegen zeigten keine vergleichbare Beeinflussung ihrer Wachstumsrate durch die Behandlung mit Kurkumin (Abbildung 6.3). Kurkumin wird von transformierten Zellen schneller aufgenommen als von normalen Zellen und verteilt sich hauptsächlich im Zytoplasma und Zellkern (Kunawar et al., 2008). Die Dosis scheint daher durch die größere Akkumulation für Krebszellen höher auszufallen als für normale Zellen. Eine weitere Annahme für die erhöhte Sensitivität von Krebszellen sind ihre meist niedrigeren Glutathionspiegel. Sing-Ai et al. konnten

zeigen, dass Kurkumin in MCF-7, MDAMB und Hep-G2 Zelllinien Apoptose durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) auslöst (Syng-Ai et al., 2004). Glutathion als zelleigenes Antioxidant neutralisiert ROS indem es selbst oxidiert wird und daraufhin dimerisiert (Aslund et al., 1997). Nicht-transformierte Zellen scheinen toleranter gegenüber Kurkumin-induzierter ROS-Bildung zu sein da ihre Glutathionlevel meist höher sind (Scharstuhl et al., 2008).

Neben dem MTT-Assay zeigte sich auch in der quantitativen *real-time-PCR* eine dosisabhängige Reduktion der mRNA-Level des Proliferationsmarkers Ki67. Mit Hilfe dieses Proteins ist es möglich, die Wachstumsgeschwindigkeit einer Zellpopulation zu bestimmen, da dieses Protein nur in den aktiven Zellzyklusphasen und nicht in der Ruhephase exprimiert wird (Scholzen et al., 2000). Die veränderte Menge an Ki-67-mRNA nach der Behandlung mit Kurkumin zeigte, dass es innerhalb des Zellzyklusverteilung der betreffenden Zellen zu einer Verschiebung der Phasen gekommen sein musste. Dieses Ergebnis konnte durch eine Zellzyklusanalyse der mit Kurkumin behandelten Gliomzellen bestätigt werden. Abbildung 6.6 zeigt auf, dass es nach 48 h Behandlungsdauer im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einer Verschiebung des Zellzyklus hin zur G2-Phase kommt. Dieser G2-Arrest zeigt, dass weniger Zellen die Mitose durchlaufen haben und sich in der G1-Phase befinden. So kommt es zur Akkumulation von Zellen in der G2-Phase die wir mittels FACS-Analyse feststellen konnten. Da bekannt ist, dass Stat3 G2/M-Phase Regulatoren in Epithelzellen transkriptionell kontrolliert kann davon ausgegangen werden, dass die Hemmung von Stat3 durch Kurkumin auch hier ähnliche Effekte hervorrufen kann (Bollrath et al., 2009). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Kurkumin auch in transformierten Zellen die Zellzyklusphasen kontrollieren kann indem es Cyklin-abhängige-Kinasen (CDK)-Inhibitoren wie p16, p21 und p27 induziert oder aber wie bei den beschriebenen Epithzellen die Expression von CyclinD1 und CyclinE runterreguliert (Srivastava et al., 2007, Aggarwal et al., 2007b). Die in dieser Arbeit durchgeführten FACS-Analysen zeigten nur wenige apoptotische Zellen im Sub-G1-Bereich, was darauf schließen lässt, dass die zelluläre DNA nicht fragmentiert ist und somit vermutlich kein apoptotischer Zelltod durch Kurkumin in den murinen Gliomzelllinien induziert wird. Die Auswertung des Caspase-Assays (Abbildung 6.5) bestätigte diese Annahme durch die Feststellung, dass keine aktive Caspase-3, ein Hauptmediator der apoptotischen Kaskade, (Hengartner 2000), nach Kurkuminbehandlung freigesetzt wird. Obwohl in der Literatur viele Studien zu finden sind, die in transformierten Zellen Apoptose nach Behandlung mit Kurkumin feststellen konnten, wurde das in vorliegende Arbeit nicht bestätigt (Wilken et al., 2011, Bangaru et al., 2011, Luthra et al., 2009). Es ist anzunehmen, dass dieses Resultat mit der außerordentlichen Apoptoseresistenz von Gliomzellen zusammen hängt (Ziegler et al., 2008, Steinbach und Weller, 2004). Diese Apoptoseresistenz lässt sich unter anderem an Hand der Level der

antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L in den Gliomzellen feststellen (Kögel et al., 2010). In dieser Arbeit zeigte sich, dass nach Behandlung mit Kurkumin, die mRNA-Level dieser beiden antiapoptotischen Mediatoren in den untersuchten murinen Gliomzelllinien nicht reguliert waren. Auch in den höchsten eingesetzten Dosen wurde die Transkriptionsrate von Bcl-2 und Bcl-X_L maximal um 20% gesenkt. Dieser geringe Einfluss von Kurkumin auf die antiapoptotischen Gene macht nochmals deutlich, dass der beobachtete Proliferationsstopp der gemessenen Zellzyklusverschiebung zuzuordnen ist und bestätigt den Caspase-Assay, der keine Induktion von Apoptose aufzeigte. Da wir feststellen konnten, dass Kurkumin die konstitutive Aktivierung von Stat3 inhibieren kann liegt es nahe die untersuchten Effekte der Hemmung der Jak/Stat3 Signalkaskade mit dem Wegfall von aktivem Stat3 in den Zellen zu korrelieren. Es ist bekannt, dass Stat3 eine Rolle während der Zellproliferation spielt und seine Hemmung durch Tyrphostin AG490 in Gliomzellen einen Proliferationsstopp hervorruft (Rahaman et al., 2002). Daneben ist der Signalüberträger und Transkriptionsfaktor auch in anderen Krebszellarten konstitutiv aktiv und führt zu Tumorbildung, Progression und Immunevasion (Yu und Jove, 2004). Eine Hemmung durch den Einsatz pharmakologischer Stoffe oder genetisch mittels siRNA gegen Stat3 führt in verschiedenen Krebsarten zur Beeinträchtigung der Proliferation ähnlich dem durch Kurkumin ausgelösten Effekten (Konnikova et al., 2003, Turkson et al., 2004, Brantley et al., 2008, Yu et al., 2009)

Auf die Rolle von Stat3 in den murinen Gliomzelllinien soll im Folgenden noch mal zurückgekommen werden.

7.1.2 Effekte von Kurkumin auf die Migration und Invasion von murinen Gliomzellen

Ein wesentlicher Grund für die sehr ungünstige Prognose ein Glioblastoms ist die Migration und damit verbundene Invasion einzelner Tumorzellen bereits im frühen Stadium weit in das umgebene Hirnparenchym hinein. Diese diffuse Invasion der Glioblastome macht eine vollständige operative Entfernung des Tumors unmöglich. Die tief in andere Hirnregionen vorgedrungenen Tumorzellen des Glioblastoms führen zwangsläufig zu neuen Tumorherden und zum Rezidiv (Holland 2000, Claes et al., 2007).

In Abbildung 6.7 wurde dargelegt, dass Kurkumin einen negativen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit der drei untersuchten murinen Gliomzelllinien hat. Konzentrationsabhängig wurde die Invasion der Zellen durch eine Matrigel-beschichtete Boyden-Kammer gehemmt. Gleichzeitig konnte aber auch gezeigt werden, dass der gesehene Effekt nicht mit einer eventuellen unspezifischen Zytotoxizität von Kurkumin zusammenhängt sondern durch distinkte Signalkaskaden gesteuert wird. Die Ergebnisse der *real-time*-PCR machten

deutlich, dass die Transkription der Matrix-Metalloproteasen (MMP) 2 und 9 durch Kurkumin konzentrationsabhängig gehemmt wurden. Senft et al. konnten diese Effekte ebenfalls in humanen Glioblastomzellen beobachten und reproduzieren (Senft et al., 2010). Kurkumin vermittelt diese Effekte wie von uns angenommen hauptsächlich über die Hemmung von Stat3, da MMP2 und auch MMP9 transkriptionelle Ziele des Jak/Stat3-Signalwegs darstellen (Glienke et al., 2010, Xi et al., 2004, Schröder et al., 2011). Kim et al. konnten zusätzlich zeigen, dass Kurkumin auch durch Einflussnahme auf den MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Weg die Transkription und somit Aktivität der Matrix-Metalloproteasen steuern kann (Kim et al., 2005).

Neben den für die Degradierung der extrazellulären Matrix zuständigen Proteasen sind für die Invasion weitere Proteine und Signalwege von Bedeutung. Eine Voraussetzung für erfolgreiche Migration und Invasion ist die Veränderung des Phänotyps der Zelle. Dabei lösen sich die Zellen aus ihrem Verband und verändern ihren Phänotyp und Genexpressionssignatur von epithelial zu mesenchymal. Dieser Vorgang wird epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) genannt (Carro et al., 2010, Floor et al., 2011, Thiery, 2002). Die nun spindelförmigen Krebszellen sind in der Lage, durch teilweise oder vollständige Aktivierung dieses Programms den Zell-Zell-Kontakt zu ihren Nachbarzellen zu lösen und die Zell-Stroma-Kontakte zu verstärken um aktiv in gesundes Gewebe einwandern zu können (Voulgari und Pintzas, 2009). Involviert in das EMT-Programm sind mitunter die Transkriptionsfaktoren Twist, Snail, Slug und Zeb 1/2 (*zinc finger E-box-binding homeobox 1/2*), ursprünglich als Proteine bekannt welche die embryonale Entwicklung steuern. Es konnte gezeigt werden, dass diese Transkriptionsfaktoren auch in Tumoren aktiv sind und eine ektopische Überexpression zu Metastasierung in der Maus führt (Taube et al., 2010). In Abbildung 6.4 der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren Snail und Twist durch Kurkumin in zwei murinen Glioblastomzelllinien in ihrer Transkriptionsrate reprimiert sind. Diese Beobachtung könnte nahelegen, dass nicht nur die verminderte Expression der Matrix-Metalloproteasen sondern zusätzlich der schwindende mesenchymale Phänotyp der Zellen die Invasionsfähigkeit inhibiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass diese beobachteten Effekte vornehmlich über die Hemmung der Stat3-Aktivität laufen. Twist und Snail sind direkte Zielgene des aktivierten Stat3 und Carro et al konnten zeigen, dass Stat3 ein Hauptregulator des mesenchymalen Phänotyps in Gliomen darstellt (Cheng et al., 2008, Sullivan et al., 2009, Carro et al., 2010). Zusätzlich stellt Kurkumin aber auch ein *multi-target* Pharmakon dar, dass nicht ausschließlich über den Jak/Stat3-Signalweg seine anti-kanzerogenen Effekte vermittelt. Bezüglich der Zellinvasion konnte gezeigt werden, dass Kurkumin die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und auch auf der Oberfläche von Pankreaskrebszellen inhibieren kann, vermittelt durch die Hemmung des TNF (*tumor necrosis factor*)-Signalweges (Nan et al., 2005,

Kunnumakkara et al., 2007). Die Expression von Zelloberflächenproteinen wie intrazellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM) und vaskulären Adhäsionsmolekülen (VCAM) auf Endothelzellen ist ein kritischer Schritt und eine Voraussetzung für Zellinvasion und Metastasierung (Ohene-Abuakwa und Pignatelli, 2000). Des Weiteren kann die festgestellte Verminderung der Invasionsfähigkeit auch auf die Beeinflussung Kurkumins bezüglich der Expression von Integrinen zurückgeführt werden. Integrin $\alpha_6\beta_4$ ist ein Lamininrezeptor in der extrazellulären Matrix der an der Bildung von Hemidesmosomen beteiligt ist (Borradori et al., 1999). Bei aggressiven Krebserkrankungen allerdings vermittelt das Tumorstroma die Mobilisierung der Krebszellen mit und Integrin $\alpha_6\beta_4$ wird in Lamellopodien und Filopodien rekrutiert (Mercurio et al., 2001). Neben den mechanischen Funktionen fungieren Integrine auch zusätzlich als Signalmoleküle, die im Fall von Integrin $\alpha_6\beta_4$ den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren und somit Kaskaden steuern können die für Proliferation, Überleben und Migration verantwortlich sind (Chung et al., 2002, Hussain et al., 2006). Kim et al. konnten zeigen, dass Kurkumin in der Lage ist über Integrin $\alpha_6\beta_4$ die Krebszellmobilität und -invasion zu steuern sowie die Phosphorylierung von Akt, einem Zielgen von Integrin $\alpha_6\beta_4$. Wie in der vorliegenden Arbeit konnte auch hier bestätigt werden, dass die verminderte Invasions- und Migrationsfähigkeit nicht durch Zelltod oder zytotoxische Effekte ausgelöst wurde, sondern dosisabhängig durch den Einfluss von Kurkumin auf die erwähnten Signalwege vermittelt wurde (Kim et al., 2008).

Bei der angesprochenen Vermittlung von Zell-Matrix-Kontakten durch Integrine und Filamente ist hervorzuheben, dass auch Podoplanin, Bestandteil des Podosoms in der vorliegenden Arbeit bei murinen Gliomzellen durch Kurkumin transkriptionell reguliert wird. Podosomen vermitteln transiente Zell-Matrix-Kontakte und werden in transformierten Zellen auch Invadopodien genannt (Yilmaz et al., 2009). Die Expression von Podoplanin ist hochreguliert an der invasiven Front verschiedener Krebserkrankungen wie zum Beispiel Lungenkrebs, Plattenepithelkarzinoma, Hautkrebs und Krebserkrankungen des zentralen Nervensystems (Kato et al., 2005, Martin-Villar et al., 2005, Shibahara et al., 2006, Wicki et al., 2006). Transfektionsversuche zeigten, dass eine Überexpression von Podoplanin eine dramatische Veränderung in der Zellmorphologie auslöste und die Anzahl von filopodia-ähnlichen Strukturen signifikant zunahm. Damit einher ging die Adhäsion und Wanderung dieser Zellen entlang dem extrazellulären Matrix-Protein Fibronectin. Scheinbar ist diese Form von Invasion unabhängig davon, ob in der betreffenden Zelle das EMT-Programm aktiviert ist oder nicht. Diese podoplanin-vermittelte Invasion konnte durch Gabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen β_1 -Integrin blockiert werden (Hoshino et al., 2011, Scholl et al., 1999, Wicki et al., 2006). Die bisher bekannten Effekte und in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass obwohl die physiologische Rolle von Podoplanin noch ungeklärt ist, dieses Protein nicht nur als prognostischen

Marker zu verwenden sondern auch als Zielstruktur für die Therapie in Gehirntumorenmin Betracht zu ziehen (Mishima et al., 2006).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das migratorische sowie das invasive Potential der untersuchten murinen Gliomzellen durch Kurkumin verringert wird. Die gesammelten *in-vitro* Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die durch Kurkumin ausgelösten Effekte sich auch in *in-vivo* Versuchen beobachten lassen.

7.1.3 Effekte von Kurkumin in tumortragenden Tieren

Zur Untersuchung der anti-tumorigenen Auswirkungen von Kurkumin auf transplantierte Tumore in der Maus wurde das in Kapitel 2.5 beschriebene syngene Mausmodell verwendet. Der Vorteil dieses Modells ist die Verwendung von immunkompetenten Mäusen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Applikation des Kurkumins zielt zusätzlich darauf ab, möglichst nah an einer klinisch relevanten Darreichungsform zu bleiben.

Ungerechtete nahm im Schnitt jede Maus pro Tag 100 µg Kurkumin durch ihr Futter auf. Ungerechtet auf einen 80 kg schweren Menschen bedeutet das die Einnahme von 8 g pro Tag. Es konnte gezeigt werden, dass Dosen bis 12 g Kurkumin pro Tag im Menschen keine Toxizität zeigten und bereits ab 8 g therapeutische Effekte bei Patienten mit Darmkrebs festgestellt werden konnten (Sharma et al., 2005). In unseren Ergebnissen (Abbildung 6.12) zeigte sich, dass von den beiden verwendeten Zelllinien nur die Tu-9648 ein signifikant verlängertes Überleben der Mäuse zeigte, wenn diese Kurkumin diätätisch aufnahmen. Allerdings zeigte sich auch bei der Zelllinie Tu-2449 ein positiver Effekt auf das Überleben wenn die transplantierten Mäuse Zugang zu Kurkumin hatten. Obwohl die Mäuse über den Zeitraum von einer Woche mit dem Kontroll- oder Kurkuminpellets vorgefüttert wurden, zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des Krankheitsbeginns. Es ist anzunehmen, dass erst in der folgenden Tumorentwicklung die Blut-Hirn-Schranke so stark gestört ist, dass der Zugang von Kurkumin zur Neoplasie therapeutische Dosen erreicht (Wolburg et al., 2003). Dieser Effekt wird durch die vermehrte Sekretion von VEGF durch den Tumor gefördert, der die Durchlässigkeit der Endothelien weiter erhöht (Jain et al., 2007, Plate et al., 1992). Durch Neoangiogenese im Tumor die im Kontrast zur normalen Entwicklung meist unreife und durchlässige Blutgefäße hervorbringt kommt es zu einer besseren Akkumulation des Kurkumins im Tumor und damit erst im Folgenden zu messbaren Effekten auf das Überleben (Nagy et al., 2010, de Vries et al., 2006.). An Hand dieser Grundlagen lässt sich für eine eventuelle Therapie sagen, dass die adjuvante Gabe von Kurkumin zu einer Antiangiogenese-Therapie zum Beispiel mit Bevacizumab möglicherweise keine zusätzlichen positiven Effekte mit sich bringen würde (Wick et al., 2009).

Die im vorliegenden *in-vitro* Modell verwendeten Tumorzellen stammen ursprünglich aus einer genetisch veränderten Maus (Überexpression von v-Src

unter einem GFAP-Promotor) mit dem Hintergrund des B6C3F1-Stammes, die auch für die *in-vivo* Versuche verwendet wurden (siehe Kapitel 2.5). Die vorausgegangenen *in-vitro* Versuche haben verdeutlicht, dass Kurkumin Einfluss auf die Proliferation, die Invasion und Migration nimmt und nicht zuletzt auch transkriptionell auf Stat3-Zielgene wirken kann. All diese Faktoren nehmen positiven Einfluss auf das Überleben der tumortragenden Mäuse, die das Kurkuminfutter erhielten. Die gliomtypische diffuse Wanderung von Zellen entlang der Marklager im Gehirn sind das Hauptproblem bei der Behandlung von Gliomen (Claes 2007). Eine durchgeführte Histopathologie hatte ergeben, dass das vorliegende Modell dieses Charakteristikum gut abbilden kann und Kurkumin die Wanderung der Zellen über den Balken weg vom ursprünglichen Transplantationsort signifikant reduzieren kann (Weissenberger et al., 2010). Der Zusammenhang kann in der transkriptionellen Beeinflussung von Kurkumin auf die Expression von MMP2 und MMP9 hergestellt werden sowie der Beeinflussung von Podoplanin, einem wichtigen Protein in der Bildung von Invadopodien. Clark et al. konnten unsere *in-vitro* Befunde *in-vivo* bestätigen bezüglich der Expression von MMP9 bei Kopf-Hals Tumoren. Dafür wurde ein Xenograft-Modell verwendet und ein Kanzerogen-Modell, bei dem ein Tabakderivat mit oder ohne Kurkumin versetzt auf die Zunge von Mäusen gegeben wurde. Beide Modelle zeigten eine Reduktion der Migration und Invasion, die zurückzuführen war auf eine verminderte MMP9-Expression (Clark et al., 2010). Auch in Gliom-Xenograftmodellen, die entweder subkutan oder intrazerebral transplantiert wurden, konnte nach Gabe von Kurkumin eine Reduktion der MMP9-Level und zusätzlich ein Rückgang der Angiogenese beobachtet werden (Perry et al., 2010). Ein weiterer Vorteil des in dieser Arbeit angewandten Modells ist das funktionierende Immunsystem der verwendeten Mäuse. Dadurch ist es möglich, die Effekte der systemischen Gabe von Kurkumin unter Einbeziehung des Immunsystems zu untersuchen. Es ist bekannt, dass das Immunsystem in der Lage ist, bestimmte Krebserkrankungen, meist viralen Ursprungs erfolgreich zu bekämpfen (Hanahan und Weinberg, 2011). Diese Neoplasien werden von der patrouillierenden Immunabwehr erkannt und effektiv bekämpft; das wird deutlich wenn man den signifikanten Anstieg von Krebserkrankungen diesen Ursprungs in Individuen mit supprimierten Immunsystem beachtet (Vajdic et al., 2009). Zusätzlich kann der Tumor die Zellen der Immunabwehr in Schach halten und aktiv regulatorische T-Zellen, die immunsuppressiv wirken, rekrutieren (Yang et al., 2010). Bhattacharyya et al. konnten zeigen, dass der oftmals beobachtete Verlust von zytotoxischen T-Zellpopulationen in Anwesenheit eines Tumors durch Kurkumin reduziert werden konnte. Vor allem die Anzahl von T-Gedächtniszellen konnte in tumortragenden Tieren erhöht werden. Zusätzlich reduzierte Kurkumin in diesem Versuch die Population an T_{REG}-Zellen, die immunsuppressiv wirken, indem es die Ausschüttung der Zytokine IL-10 und TGF-beta verminderte und es

kam zusätzlich zu einer Aktivierung von T-Effektorzellen, die zytotoxisch auf die Tumorzellen wirkten (Bhattacharyya et al., 2010).

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann angenommen werden, dass das verlängerte Überleben und die beobachteten langzeitüberlebenden Mäuse in der Kurkumin-Gruppe potentiell mit der Involvierung des adaptiven Immunsystems zu tun haben könnten.

Ein Problem in der Formulierung von Kurkumin stellt seine ausgeprägte Hydrophobizität dar. Gibt man die in diesem Versuche entsprechende Dosis an Kurkumin intraperitoneal in die Vene lassen sich Plasmakonzentrationen von circa 6 $\mu\text{M/L}$ innerhalb einer Stunde messen (Pan et al., 1999). Allerdings wird das Kurkumin extrem schnell metabolisiert und ist 2 h nach Administration im Gehirn nicht mehr detektierbar (Purkayastha et al., 2009). Durch eine verbesserte Darreichungsform von Kurkumin könnte man in der Lage sein, die positiven Effekte dieser nicht-toxischen Substanz in Gliomen und anderen Krebserkrankungen besser nutzen zu können. Grundsätzlich lässt sich hier zwischen drei Methoden unterscheiden: zum einen die Verwendung von Kurkumin in Kombination mit einem Adjuvanz, zum anderen unterschiedliche Formulierungen von Kurkumin und der Einsatz von Kurkumin-Analoga.

Als Adjuvanz ist Piperidin hervorzuheben. Piperidin, der aktive Wirkstoff aus dem schwarzen Pfeffer ist ein Inhibitor der Glucuronidierung von Kurkumin in der Leber und Verdauungstrakt und der damit verbundenen Verstoffwechslung (Shehzad et al., 2010). Verabreichte man Kurkumin und Piperin gemeinsam konnte eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit im Menschen von bis zu 2000% erreicht werden (Shoba et al., 1998). Die signifikant erhöhten Serumlevel von Kurkumin resultierten dann auch in einer um 48% gesteigerten Aufnahme im Gehirn im Vergleich zur Kurkumingabe ohne Piperidin (Ryu et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Nanopartikeln, die als Carrier für das Kurkumin dienen. Es ist bekannt, dass Nanopartikel in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu passieren um therapeutische Substanzen zum Beispiel zu einem Gliom zu befördern (Wohlfart et al., 2011). Tiyaboonchai et al. konnten feststellen, dass Kurkumin gekoppelt an wasserlösliche Nanopartikel weniger licht- und sauerstoffempfindlich ist und *in-vitro* eine verlängerte Freisetzung von Kurkumin zeigte sowie bei Applikation eine doppelt so hohe Serumkonzentration herbeiführte im Vergleich zu freiem Kurkumin (Tiyaboonchai et al., 2007, Anand et al., 2010, Nair et al., 2010).

Daneben existieren zusätzlich Ansätze, die die Bioverfügbarkeit von Kurkumin und anderen Stoffen erhöhen können indem sie in Liposomen oder Micellen verpackt werden. Liposomen können sowohl hydrophile als auch hydrophobe Substanzen verpacken und stellen ein exzellentes Transportsystem für Therapeutika dar (Sharma et al., 2010). Die antioxidanten Eigenschaften von Kurkumin im Plasma waren nach oraler Gabe von liposomalem Kurkumin signifikant erhöht und auch

die antikanzerogenen Effekte in Mausmodellen waren im Vergleich zu freiem Kurkumin verstärkt (Krishnankutty et al., 1998, Ireson et al., 2001, Wang et al., 2008). Allerdings existieren keine präklinischen Studien, die die Bioverfügbarkeit im Zielgewebe oder etwaige Toxizität untersucht haben (Padhye et al., 2010).

Die Verpackung von Kurkumin in Micellen zeigte eine sechzigfach erhöhte Halbwertszeit gegenüber freiem Kurkumin; die intestinale Absorption war aber *in-vitro* nur von 47 auf 56% erhöht im Vergleich zu freiem Kurkumin (Ma et al., 2007, Suresh et al., 2007).

Bei der Verwendung von Kurkumin-Analoga zeigte sich, dass durch zum Beispiel die Veränderung von Seitenketten des Kurkuminmoleküls die schnelle Metabolisierung der Substanz blockiert werden kann. Hier wird einfach die Tautomerisierung des Moleküls verhindert indem man mittels einer sogenannten Knoevenagel-Kondensation die aktive Methylgruppe, die die Verstoffwechslung katalysiert, verändert (Zambre et al., 2006). Ein solches Difluorkurkumin-Knoevenagel-Kondensat (CDF) zeigte größere metabolische Stabilität und damit verbundene längere Zirkulationszeiten in der Maus sowie die Akkumulation in der Bauchspeicheldrüse (Padhye et al., 2009).

FLLL11 und FLLL12, ebenfalls Kurkumin-Analoga, zeigten die Inhibierung der Stat3-Phosphorylierung in Brust- und Protatakrebszelllinien und eine damit verbundene Hemmung der Proliferation und Migration der Zellen (Lin et al., 2009).

Behandelt man Eierstockkrebszellen mit dem Analogon EF24 zeigten die Zellen eine zehnfach erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu der Behandlung mit normalem Kurkumin. EF-24 scheint hier über den NF κ B-Signalweg seine Wirkung zu vermitteln (Kasinski et al., 2008).

Diese Ergebnisse zeigt deutlich, dass die chemische Veränderung von Kurkumin auch seine pleiotropische Wirkweise beeinflusst, was aber durchaus Nutzen mit sich bringen würde, da man selektiver die Zielmoleküle von Kurkumin bestimmen und beeinflussen kann.

7.1.4 Kurkumin und der Jak/Stat3-Signalweg

Die in Kapitel 6.1.7 dargelegten Ergebnisse zeigen auf, dass Kurkumin über den Jak/Stat3-Signalweg die Invasion- und Migrationsfähigkeit von murinen Gliomzellen reduzieren kann. Durch Überexprimierung einer konstitutiv aktiven Stat3-Mutante (Stat3C), die nicht mehr durch Phosphorylierung der *upstream*-Kinasen aktiviert werden muss, können die Effekte ermittelt werden, die Kurkumin durch Hemmung der Stat3-Phosphorylierung auslöst (Yoo et al., 2001). Annahme war, dass Kurkumin den Jak/Stat3-Signalweg beeinflussen kann, indem es die Phosphorylierung der Janus-Kinasen und die darauffolgende Aktivierung von Stat3 inhibiert. Die Transfektion der murinen Gliomzellen mit dem Stat3C-

Konstrukt führte zu Überexpression der Mutante (Abbildung 6.10). Der Stat3-Signalweg war nun in diesen Zellen hyperaktiviert und nicht mehr von der Phosphorylierung durch die Kinasen abhängig. Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit Kurkumin in diesen genetisch veränderten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen keine vergleichbare Verminderung ihres Migrations- und Invasionspotential zeigten (Abbildung 6.11). Der Effekt von Kurkumin wird also durch die Verwendung von Stat3C aufgehoben, was impliziert, dass Kurkumin tatsächlich über die Regulation des Stat3-Signalwegs Einfluss auf Migration und Invasion der hier verwendeten Zellen nimmt.

Auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass bei einer Behandlung von Krebszellen mit Kurkumin der Stat3-Signalweg die untersuchten antikanzerogenen Effekte vermittelt. Saydmohammed et al. blockierten mittels Kurkumin ebenfalls konstitutive aktives Stat3 im Ovariakarzinom und Endometriosezellen und Mackenzie et al. zeigten, dass in Hodgkin-Lymphomzellen Kurkumin den beobachtete Zellzyklus-Arrest und die Apoptose über die Blockade des Stat3-Signalweges bewirkt (Saydmohammed et al., 2010, Mackenzie et al., 2008). In Gliomzellen allerdings wurden die Effekte von Kurkumin auf diesen Signalweg erst wenig untersucht (Weissenberger und Priester et al., 2010, Senft et al., 2010).

Die schon angesprochenen Analoga von Kurkumin, deren Modifizierungen eine höhere Bioverfügbarkeit und spezifischer bestimmbarer Zielmoleküle versprechen, zeigen in aktuellen Publikationen, dass die vermittelten antikanzerogenen Effekte über den Stat3-Signalweg laufen. FLLL32, eine Weiterentwicklung des erwähnten FLLL12, zeigt, dass durch Herabsetzung der Stat3-Bindungsaktivität und Verhinderung des Stat3-Phosphorylierung Apoptose und weitere anti-tumorigene Effekte in Krebszellen vermittelt werden (Fossey et al., 2011, Wie et al., 2011, Liu et al., 2010, Lin et al., 2010).

Offen bleibt allerdings die Frage, ob die positiven Effekte von Kurkumin im Bezug auf die Anwendung im Menschen besser durch ein pleiotropisches Naturprodukt oder einem spezifischen Analogon vermittelt werden können. Hierfür müssen erste klinische Studien abgewartet werden.

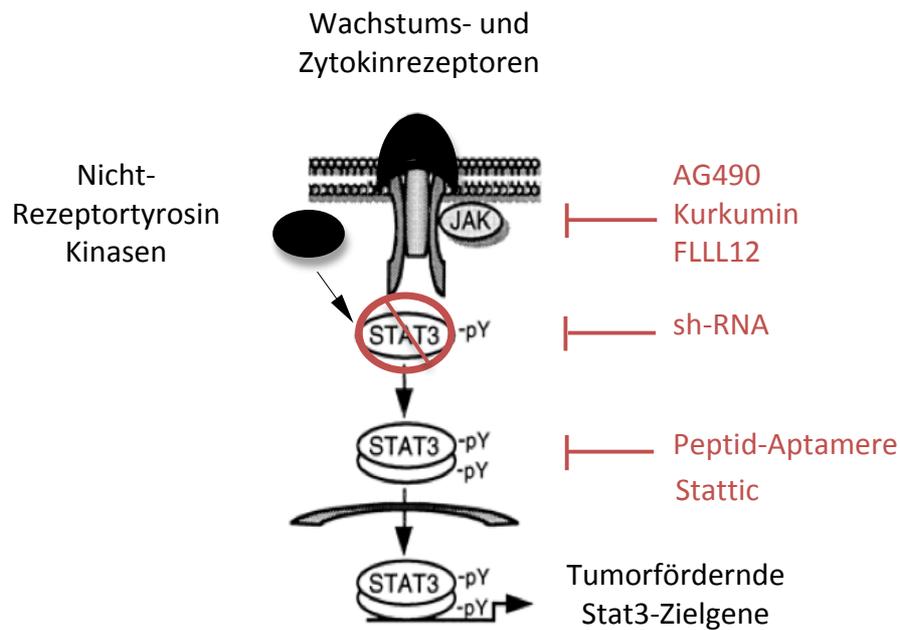


Abb. 7.1_Angriffspunkte des Jak/Stat3-Signalweges. Die Aktivierung der Stat3-Signalkaskade kann an diversen Punkten unterbrochen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Kurkumin die Phosphorylierung der Januskinase (JAK) und damit auch von Stat3 unterbrochen, was auch durch das Kurkumin-Analogon FLLL12 und Tyrphostin AG490 erreicht werden kann. Zusätzlich kann durch die Verwendung Stat3-spezifischer Peptid-Aptamere die Dimerisierung und damit die Translokation in den Kern verhindert werden. Mit Hilfe der siRNA-Technik ist es möglich, die Translation von Stat3 zu inhibieren was den Signalweg ebenfalls zum Erliegen bringt.

7.2 Der Einfluss des Stat3-*Knockdowns* in murinen Gliomen *in-vitro* und *in-vivo*

Um untersuchen zu können, welche spezifische Rolle Stat3 bezüglich der Charakteristika von murinen Gliomenzellen wie gesteigerter Proliferation, Infiltration und Migration spielt, wurde die Translation des Proteins mittels RNAi-Technik unterbunden. Hierfür wurde eine virale Transduktion der siRNA gerichtet gegen Stat3 entschieden verwendet. Durch Dreifachtransfektion von HEK-293T-Zellen mit dem Gentransferplasmid, einem Verpackungsplasmid und einem Hüllplasmid entstehen replikationsinkompetente Viren, die den gewünschten Vektor, der für die siRNA codiert, tragen. Da dieses System aus Lentiviren abgeleitet wurde integriert das Gentransferplasmid stabil in das Genom der Wirtszelle und das auch in ruhenden Zellen. Durch Verwendung dieses Systems kann davon ausgegangen werden, dass es in den Zielzellen zu einem stabilen *Knockdown* des entsprechenden Proteins kommt. Als Marker für die erfolgreiche Transduktion wurde GFP gewählt und mit Hilfe von fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie eine Population GFP-positiver Zellen hergestellt. Aus dieser Mischpopulation wurden klonale Zelllinien gewonnen, die aus einer Einzelzelle hervorgegangen waren und jene Zelllinie für die Versuche verwendet, die den stärksten Stat3-*Knockdown* zeigte.

In Abbildung 6.13 ist zu sehen, dass die Einführung der siRNA gerichtet gegen Stat3 zu einer deutlichen Verminderung der Stat3-Expression in den murinen Glioblastomzelllinien Tu-2449 und Tu-9648 führte. Für alle folgenden Versuche wurde der *Knockdown* im Western Blot kontrolliert.

7.2.1 Effekte des Stat3-*Knockdowns* auf die Expression pro-tumorigener Stat3-Zielgene

In Kapitel 2.3 wurde bereits dargelegt, dass Stat3 in seiner Funktion als Signalüberträger und Transkriptionsfaktor bei konstitutiver Aktivierung in der Lage ist, die maligne Transformation von Zellen zu initiieren und die Tumorprogression zu fördern (Yu und Jove, 2009, Lesina et al., 2011). Die konstitutive Aktivierung des Stat3-Signalweges kann auch als prognostischer Marker angesehen werden, korreliert doch die Phosphorylierung von Stat3 negativ mit dem Überleben von Gliompatienten (Carro et al., 2010, Weissenberger et al., 2002).

Diese tumorfördernden Effekte werden durch Aktivierung der Stat3-Zielgene in den betreffenden Zellen eingeleitet. In der vorliegenden Arbeit wurden einige wichtige von ihnen auf ihre Protein- und mRNA-Expressionslevel hin untersucht, wenn Stat3 als Transkriptionsfaktor ausfiel. Es zeigte sich in der Gliomzelllinie Tu-

9648 besonders deutlich, dass der Wegfall von Stat3 auch eine Reduktion an CyclinD-Protein mit sich brachte (Abbildung 6.14). CyclinD gehört zur Familie der Cycline welche den Eintritt in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus steuern. Sie interagieren mit cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) und aktivieren so deren Kinasefunktion was letztendlich im Falle von CyclinD und Cdk-4 und 6 den Übergang von der G1- zur S-Phase einleitet (Bloom und Cross, 2007). In entarteten Zellen kann eine Überexpression von CyclinD die G1-Phase verkürzen und somit den Eintritt in die Synthesephase und damit verbunden auch die Zellproliferation beschleunigen. Des Weiteren führt die Bildung des CyclinD-Cdk4/6-Komplexes zur Phosphorylierung und somit Inaktivierung von Rb (*retinoblastoma tumor suppressor protein*). Rb, ein Tumorsuppressor, reguliert ebenfalls den Zellzyklus und kann verhindern, dass Zellen den G1-Checkpoint passieren. Fällt dieses Protein weg fehlt der Zelle ein entscheidender Regulator des Zellzyklus was zu ungehemmter Proliferation führen kann und somit CyclinD zu einem tumorfördernden Protein macht, dessen Expressionslevel mit dem Überleben in Brustkrebspatienten korreliert (Paternot et al., 2010, Nielsen et al., 1997, Pelosio et al., 1996). Die Expressionslevel von CyclinD sind unter anderem von dem Phosphorylierungsstatus von Stat3 abhängig, was von Yang et al. auch in Glioblastomzellen gezeigt werden konnte (Germain und Frank, 2007, Oh et al., 2011, Yang et al., 2010). Durch den in dieser Arbeit eingebrachten *Knockdown* von Stat3 in Gliomzellen kommt es auf Grund der nur noch sehr geringen Expressionslevel des Stat3-Proteins ebenfalls zu sehr geringen Leveln an Phospho-Stat3 und dem damit verbundenen Rückgang der CyclinD Transkription und Translation und der damit verbundenen Malignität der Zellen.

Ähnlich verhält es sich mit den Protein- und mRNA-Expressionsleveln des Transkriptionsfaktors Snail. Auf beiden Expressionsebenen zeigte sich, dass der Wegfall von Stat3 auch hier zur Reduktion der Snail-Expression führte. Das erwähnte EMT-Programm, wichtig während der Embryogenese aber auch für die Tumorprogression, wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor Snail gesteuert (Voulgari und Pintzas, 2009). Snail, ein Marker für EMT, fungiert wie Slug (Snail2) auch als E-Cadherin-Repressor. Das führt zum Abbau der Zell-Zell-Kontakte innerhalb des Tumors und damit zur erhöhter Zellmobilität resultierend in gesteigertem Invasions- und Metastasierungspotential, ersteres ein Hauptproblem bei der Glioblastomkrankung (Cano et al., 2000, Battle et al., 2000, Wu und Zhou, 2010). Durch die gezeigte transkriptionelle und dadurch auch translationale Repression von Snail durch den Stat3-*Knockdown* kann deutlich gemacht werden, dass Stat3 als übergeordneter onkogener Transkriptionsfaktor weitere entscheidende Transkriptionsfaktoren für die Malignität der murinen Glioblastomzellen kontrolliert und sich somit erneut als vielversprechende Zielstruktur für die Therapie erweist.

Ebenfalls verbunden mit der Invasion von Krebszellen in das umliegende Gewebe sind Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Diese MMPs degradieren die extrazelluläre

Matrix in der Zell- und Organstrukturen eingebettet sind und erlauben im Falle von transformierten Zellen Invasion, Metastasierung und Neoangiogenese des Tumors (Overall und Lopez-Otin, 2002). Da die extrazelluläre Matrix hauptsächlich aus Kollagenen besteht heißen die in dieser Arbeit untersuchten zink-abhängigen Proteasen MMP2 und 9 auch Kollagenase A und B, welche als lohnende Zielmoleküle in der Krebstherapie gelten (Zucker und Cao, 2009). In Abbildung 6.14 und 6.15 konnte gezeigt werden, dass fehlendes Stat3 in den murinen Gliomzellen zur Verminderung der Protein- und mRNA-Level von MMP2 führte sowie zu einem drastischen Rückgang der MMP9-Expression auf mRNA-Ebene. Diese Befunde sind mit den Kurkumin-Daten vereinbar. Es wurde gezeigt, dass Stimulation von humanen Glioblastomzellen mit IL-6 zur Induktion von MMP9 aber nicht MMP2 führte (Liu et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit kam es in den murinen Glioblastomzellen zur verringerten Expression beider Proteasen, da neben dem IL-6 Rezeptor auch weitere *upstream*-Kinasen von Stat3, nämlich Src und Erk, die Induktion von MMP2 und MMP9 veranlassen können (Luo et al., 2009). Da die hier untersuchten Zellen durch den Stat3-*Knockdown* in beiden Signalwegen gehemmt sind, kommt es zur Expressionsverminderung von beiden Proteasen. Auch Senft et al. konnten mit einer pharmakologischen Inhibierung von Stat3 zeigen, dass sowohl MMP2 als auch MMP9 Zielgene von Stat3 sind (Senft et al., 2010c). Diese Veränderung auf molekularer Ebene führte höchstwahrscheinlich auf zellulärer Ebene zu der beobachteten Verminderung der Invasionsfähigkeit jener Zellen, in denen Stat3 depletiert war.

Ein weiteres hier untersuchtes Zielgen von Stat3 ist VEGF. Dieser Wachstumsfaktor wirkt auf Endothelzellen und führt bei Ausschüttung durch den Tumor zur Rekrutierung und Neubildung von Blutgefäßen aus dem umliegenden Milieu.

Auf dem Weg vom mikroskopischen zu einem makroskopischen Tumor ist der „angiogene-*switch*“ eine bedeutende Veränderung im Tumor und Tumormilieu. Es bedeutet, dass der Tumor Lieferung und Abtransport von limitierenden Faktoren wie Nährstoffen, Sauerstoff, Stoffwechselmetaboliten und CO₂ nicht mehr alleine durch Diffusion bewältigen kann. Vielmehr ist es nun von Nöten die Vaskularisierung des Tumors einzuleiten (Holgrem et al., 1995). Der vaskuläre Wachstumsfaktor VEGF, TGF-beta (*transforming growth factor*) und FGF (*fibroblast growth factor*) werden durch onkogene Signalkasaden sowie durch Hypoxie stimuliert und leiten die Rekrutierung von Endothelzellen ins Tumormilieu ein (Ferrara 2009). Die vaskuläre Architektur eines Tumors unterscheidet sich stark von der eines intakten Gewebes. Durch die chronische Aktivierung der Neoangiogenese entstehen unreife Gefäße mit unkontrollierter Kapillarsprossung, deregulierte und exzessive Gefäßverzweigungen einhergehend mit unstemtem Blutfluss und Mikroeinblutungen in den Tumor durch poröse Gefäßwände (Nagy et al., 2010). Zusätzlich wirkt VEGF in Anwesenheit eines Tumors immunsuppressiv, das heißt, dass es die Reifung der dendritischen Zellen

des Immunsystems hemmt, die zur Bekämpfung des Tumors beitragen (Yu, Kortylewski und Pardoll, 2007). VEGF ist ein weiteres transkriptionelles Zielgen von Stat3, dass tumorfördernd in verschiedenen Krebsarten sowie in Gliomen wirkt (Niu et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Stat3 sowohl über IL-6 als auch über Oncostatin M (OSM), beides Mitglieder der IL-6 Zytokinfamilie, eingeleitet wird (Loeffler et al., 2005, Kujawski et al., 2008). In Abbildung 6.15 ist zu erkennen, dass der Stat3-*Knockdown* in den murinen Gliomzelllinien Tu-9648 und Tu-2449 zu einer Verringerung der mRNA-Expression von VEGF führt. Stat3 ist also auch in den hier untersuchten Zellen in der Lage, transkriptionell die Produktion des proangiogenen Faktors dahingehend zu beeinflussen, dass ein Wegfall der konstitutiven Aktivierung von Stat3 zu geringeren VEGF-Leveln führt, was im Umkehrschluss bedeutet, dass Stat3 als übergeordneter Transkriptionsfaktor in der Lage ist den für das Tumorstadium entscheidenden „angiogenen-*switch*“ zu steuern. Neben der Überprüfung der mRNA Expression von VEGF wurde zusätzlich noch ein ELISA durchgeführt. Mittels des ELISA war es möglich, die Menge an sekretiertem und damit reifem Wachstumsfaktor im Zellüberstand zu bestimmen. Abbildung 6.16 zeigt eine signifikante Verringerung der VEGF-Menge sekretiert von den Stat3 *Knockdown*-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen in beiden untersuchten Zelllinien. Es fällt auf, dass in der Zelllinie Tu-9648 die Gesamtmenge an sekretiertem VEGF deutlich geringer ausfällt als in der Tu-2449 Zelllinie obwohl die Menge an Phospho-Stat3 in beiden Zellen vergleichbar stark ist (siehe Abbildung 6.1 A). Dieses Resultat kann mit den *in-vivo* Versuchen der Kurkumin-Experimente in Verbindung gebracht werden die zeigten, dass die Kontrolltiere transplantiert mit der Tu-9648 Zelllinie einen späteren Krankheitsbeginn und längeres Überleben zeigten als die stark VEGF-sekretierende Tu-2449 Zelllinie.

7.2.2 Einfluss der Stat3-Depletion auf das Migrations- und Invasionspotential muriner Gliomzellen

Wie bereits erwähnt ist eines der Hauptmerkmale des Glioms seine Einzelzellinvasion in das umliegende Hirnparenchym was gleichzeitig auch den Hauptgrund für die ungünstigen Prognosen dieser Erkrankung darstellt. Interessant war daher, ob der Wegfall eines wichtigen, dem in den vorliegenden Zellen konstitutiv aktivem Onkogen Stat3 einen Einfluss auf das migratorische und invasive Verhalten hat. Zu diesem Zweck wurde auch hier ein Invasionsversuch durchgeführt bei dem die Zellen, getrieben durch Serumentzug im Medium, eine extrazelluläre Matrix durchqueren müssen um im Folgenden durch Poren in das neue, serumhaltige Milieu wandern zu können. Wie die Genexpressionsversuche schon vermuten ließen, führten die Veränderungen auf der transkriptionellen Ebene zu Änderungen des Zellverhaltens was sich in der verringerten Invasion der

Stat3-defizienten Zellen widerspiegelte (siehe Abbildung 6.17 A). Die Ergebnisse der *real-time*-PCR-Analyse haben schon vermuten lassen, dass durch die reduzierte Expression des EMT-Transkriptionsfaktors Snail und den Matrix-Metalloproteasen 2 und 9, auf der einen Seite die Morphologie des Zytoskelett nicht optimal für ein Invasion ist und die Reduktion der Proteasen ein Durchqueren der extrazellulären Matrix deutlich erschweren.

Gleichzeitig führte der Stat3-*Knockdown* in diesen Zellen per se nicht zu vermehrter Apoptose (Daten nicht gezeigt), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die verminderte Invasion sowie alle im Folgenden gezeigten Ergebnisse auf zellulärer Ebene durch Veränderungen des Genexpressionsprofils entstanden sind und nicht durch Zelltod hervorgerufen wurden (siehe Abbildung 6.17 B). Obwohl einige Publikation zeigen konnten, dass die pharmakologische oder gentechnische Inhibierung von Stat3 zu Apoptose führt, kann die vorliegende Arbeit das nicht bestätigen (Kunigal et al., 2009, Chen et al., 2010, Iwamaru et al., 2007, Verma et al., 2010). Eine Hypothese zur Erklärung ist, dass diese Tatsache mit der genetischen Besonderheit der verwendeten Gliomzellen zusammenhängt, nämlich der Überexpression der Stat3-*upstream*-Kinase v-Src. Diese Kinase aktiviert nicht exklusiv den Stat3-Signalweg sondern auch andere Signalwege wie den PI3K-Signalweg oder den MAP-Kinase-Signalweg in Gliomen (de Groot und Milano, 2009). Beide Signalwege wirken pro-tumorigen und anti-apoptotisch in vielen verschiedenen Krebsarten (Sebolt-Leopold und 2007, Castellion et al., 2007). Die Src-Kinase spielt zusätzlich auch eine Rolle in Migration und Invasion von transformierten Zellen, da sie mit FAK (*focal adhesion kinase*) interagiert die wiederum über Paxillin und Integrine die Auflösung von Fokalkontakten einleitet, was die Motilität der Zelle erhöht (Badgwell et al., 2011, Lindemann et al., 2011, Cox et al., 2006, Yeatman, 2004). Daher führte der Einsatz der siRNA gegen Stat3 nicht zu einer vollständigen Hemmung der Invasion, denn ein solch komplexer Vorgang kann nicht durch einen einzelnen Faktor allein bestimmt werden.

Stat3 steuert den migratorischen und invasiven Phänotyp in Gliomen unter anderem als einer von zwei identifizierten Transkriptionsfaktoren, die den mesenchymalen Phänotyp initiieren und aufrechterhalten können (Carro et al., 2010). Zusammen mit dem Transkriptionsfaktor C/EBP β wirkt Stat3 auf die mesenchymalen Marker Fibronectin, Collagen 5a1 und YKL40. *In-vitro* führte der Doppel-*Knockdown* dieser beiden Transkriptionsfaktoren zu verminderter Invasion und *in-vivo* transplantiert zeigten die entstandenen Tumore mit dem Doppel-*Knockdown* nicht die typische diffuse Invasionsfront sondern einen abgegrenzten Rand zum umgebenden Hirnparenchym (Carro et al., 2010). Aber auch Stat3 alleine scheint in der Lage zu sein das mesenchymale EMT-Programm im Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom, in Darmkrebs und in Brusttumoren zu steuern, indem es die Expression von E-Cadherin hemmt und die Expression der Transkriptionsfaktoren Snail und Twist einleitet (Colomiere et al., 2009, Taylor et

al., 2004, Ferrand et al., 2004, Thomas et al., 2005). Zusätzlich ist eine konstitutive Aktivierung von Stat3 in der Lage die Expression von Integrin β 6 und seinem Ligand Fibronectin zu inhibieren, was die Zellmotilität ebenfalls erhöht und die Voraussetzung für eine Invasion schafft (Azare et al., 2007).

Neben den Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 (Collagenase A und B) wird auch MMP1 eine Rolle bei der Invasion von malignant transformierten Zellen zugeschrieben was bis zur Korrelation der MMP1-Expression mit dem Krankheitsverlauf bei Darmkrebs reicht (Wong et al., 2011, Sun et al., 2010). Um feststellen zu können, inwiefern die Expression von MMP1, 2 und 9 von Stat3 als Transkriptionsfaktor abhängig ist, wurde in der vorliegenden Arbeit ein weiterer Invasionsversuch durchgeführt in dem Kontroll- und Stat3-Knockdownzellen mit spezifischen Inhibitoren für jede der drei MMPs behandelt wurden. Die Ergebnisse der Tu-2449-Zelllinie ließen den Schluss zu, dass MMP1 durch den Stat3-*Knockdown* nicht so stark beeinflusst wurde wie etwa MMP2 und 9. Der Einsatz des MMP2-Inhibitors machte deutlich, dass die Invasion der Knockdown-Zellen nicht im gleichen Maße wie in den Kontrollzellen verhindert wurde. Daher kann angenommen werden, dass MMP2 durch Stat3 reguliert wird aber trotz allem noch aktiv Funktionen während der Invasion übernimmt, reguliert zum Beispiel über die Aktivierung durch Src-Kinase-Signalwege (Yeatman, 2004). Der Versuch mit dem MMP9-Inhibitor in der shStat3-Zelllinie bestätigte den Befund aus der Genexpressionsanalyse, die gezeigt hatte, dass die Transkription der MMP9-mRNA durch Wegfall von Stat3 um rund 80% reduziert war. In der Zelllinie Tu-9648 bestätigte sich ebenfalls der Befund der Genexpressionsanalyse der gezeigt hatte, dass der Stat3-*Knockdown* die mRNA-Level von MMP2 nicht signifikant reduzierte. Der Einsatz des MMP1-Inhibitors in den shStat3-tragenden Zellen allerdings zeigte eine Verringerung des Invasionspotential von nahezu 50 %. Durch die Zugabe eines MMP2-Inhibitors in der shStat3-tragenden Zelllinie ließ sich die Invasion zusätzlich um rund 50 % hemmen. Vielmehr schien hier die Reduktion des invasiven Potentials der *Knockdown*-Zellen auf die verminderte Expression von MMP9 oder MMP1 zurückzuführen sein. Die Behandlung mit beiden Inhibitoren führte in den Stat3-defizienten Zellen zu keinen additiven Effekten.

Die beschriebene Invasion der Gliomzellen hängt unmittelbar auch mit ihrer Fähigkeit zur Migration zusammen. Die Voraussetzung ist in beiden Fällen ein mesenchymaler Phänotyp und die Verminderung der Zell-Zell-Adhäsion zu Gunsten einer Zell-Matrix-Adhäsion (Moreno-Bueno, Portillo und Cano, 2008). Um die Rolle von Stat3 während der Migration untersuchen zu können, wurde ein sogenannter Wundheilungsversuch durchgeführt, bei dem ein konfluenter Zellrasen mit einer Pipette partiell verwundet wurde. Nach 16 h wurden dann die Zellen gezählt, die zurück in die Wunde gewandert waren und an Hand der Anzahl die Migrationsfähigkeit bestimmt. Der Stat3-*Knockdown* in den murinen Glioblastomzellen führte in beiden Zelllinien, Tu-2449 und Tu-9648, zu einer

signifikanten Verringerung des Migrationspotentials im Vergleich zu den Kontrollzellen (siehe Abbildung 6.20). Auch hier wurde zuvor die Expression von Podoplanin auf mRNA-Ebene und Proteinebene untersucht, vergleichbar mit den Kurkuminexperimenten. Podoplanin, exprimiert in Podosomen und Invadopodien, interagiert zum Beispiel mit dem Fibronectin der extrazellulären Matrix und ist hochreguliert an den invasiven Fronten verschiedener Krebserkrankungen (siehe auch Kapitel 5.1.2). Es konnte gezeigt werden, dass Podoplanin transkriptionell anhängig von Stat3 zu sein scheint, führte der Stat3-*Knockdown* doch zu signifikant verringerten Podoplanin-mRNA-Leveln. Auf Proteinebene ließ sich das allerdings nur bei der Zelllinie Tu-2449 beobachten, die auch eine höhere endogene Expression des Podoplanins zeigte. Eine Verbindung des Jak/Stat3-Signalweges und der Expression von Podoplanin wurde sonst bisher nur von Morris et al. nachgewiesen, die in Kaposi's Sarkoma eine direkte Verbindung der Aktivierung von gp130 und der damit verbundenen Phosphorylierung von Stat3 und Akt nachweisen konnten (Morris et al., 2008). Wicki et al., konnten durch Überexpression von Podoplanin verdeutlichen, dass das EMT-Programm keine Voraussetzung für den invasiven Phänotyp ist sondern Podoplanin alleine die Remodellierung des Zytoskeletts einleiten kann. Deutlich wurde dass durch die gleichbleibende Expression von E-Cadherin und keiner Induktion der mesenchymalen Marker trotz des invasiven Verhaltens und Morphologie der Zellen (Wicki et al., 2006). Ein Stat3-*Knockdown* bewirkt somit nicht nur wie beschrieben die Hemmung des EMT-Programms durch Beeinflussung von wichtigen Transkriptionsfaktoren wie Snail sondern auch die Hemmung alternativer Signalwege wie die Expression von Podoplanin. Der migratorische und invasive Phänotyp der Gliomzellen wird somit durch Wegfall von Stat3 an unterschiedlichen Fronten inhibiert, was die Rolle von Stat3 als therapeutisches Zielgen noch mal verstärkt.

Es wurde klar, dass die Remodellierung des Zytoskeletts eine Voraussetzung für die Migration von Zellen darstellt. Stat3 kontrolliert wie beschrieben viele Gene, die hierfür verantwortlich sind transkriptionell, kann aber auch direkt als Bindungspartner fungieren. Stat3 ist in der Lage, die Veränderungen des Zytoskeletts durch Bindung an Stathmin zu vermitteln. Stathmin wiederum ist in der Lage an Tubulin zu binden und Mikrotubuli zu destabilisieren, da deren Polymerisation verhindert wird. Diese Funktion schränkt das Migrationspotential der Zellen ein (Ng et al., 2006, Gao und Bromberg, 2006). Indem Stat3 an Stathmin bindet kann dieses nicht mehr seine Funktion erfüllen und durch die Polymerisation der Mikrotubuli ist eine Voraussetzung für Zellmigration geschaffen (Verma et al., 2009). Der untersuchte Stat3-*Knockdown* würde somit nicht nur in seiner Funktion als onkogener Transkriptionsfaktor Einfluss auf das Invasions- und Migrationsverhalten der murinen Gliomzellen nehmen sondern auch als direkter Bindungspartner in unphosphorylierter Form.

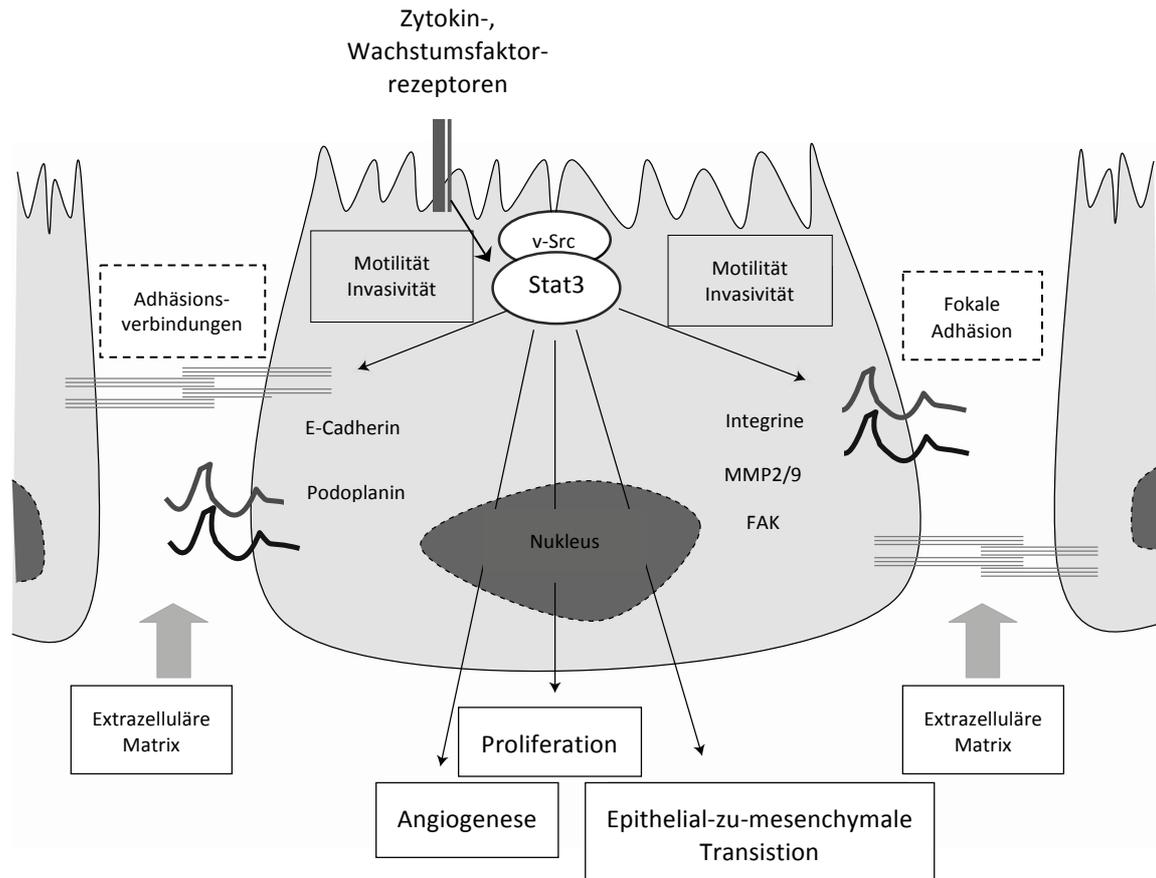


Abb. 7.2_Funktionen von Stat3 in der Zellmotilität und Tumorentstehung. Stat3 beeinflusst die Zellmotilität und damit verbunden auch die Invasion der Tumorzellen, indem es die Expression wichtiger Proteine wie Integrine, E-Cadherin, Matrix-Metalloproteasen und Podoplanin steuert. Hiervon sind Zell-Zell- aber auch Zell-Matrix-Kontakte betroffen (verändert nach Homsí, Cubitt und Daud, 2000) .

7.2.3 Einfluss von Stat3 auf den Hypoxie-induzierten Faktor 1 (Hif1 α) in murinen Gliomzelllinien

Ein weiteres Charakteristikum des malignen Gliomes sind nekrotische Areale innerhalb der Tumormasse. Diese Nekrosen entstehen, wenn der Tumormasse nicht mehr genügend Sauerstoff und Nährstoffe zur Verfügung stehen. Ein Mechanismus der Zellen um sich der Hypoxie im Tumormillieu anzupassen ist die Induktion von Hif1 α einem Transkriptionsfaktor der hauptsächlich die Umstellung der Energiegewinnung auf Glykolyse, Angiogenese und autarkes Zellwachstum infolge der Sekretion von Wachstumsfaktoren fördert (Harris, 2002, Semeza, 2010). Der resultierende Selektionsdruck führt zur Entstehung von hypoxie-adaptierten Tumorzellen die sauerstoffunabhängig proliferieren und daher eine Tumorentstehung trotz hypoxischer Mikromilieubedingungen ermöglichen (Majmundar et al., 2010). Auch an der Migration und Invasion sowie der Metastasierung von Krebszellen ist Hif1 α beteiligt (Semenza et al., 2010). Es

konnte gezeigt werden, dass aber auch Stat3 die Angiogenese und Migration in Glioblastomen ausgelöst durch Hypoxie steuern kann (Kang et al., 2010). Daher scheint Hif1 α ein weiteres Zielgen von Stat3 zu sein; Es konnte gezeigt werden dass Stat3 die Expression von Hif1 α im Tumor und Tumormillieu fördert und zusätzlich Hif1 α transkriptionell supprimieren kann (Yu, Pardoll und Jove, 2009, Papadakis et al 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch in den murinen Gliomzellen Hif1 α transkriptionell abhängig vom Stat3-Status zu sein scheint. Die Ergebnisse der *realtime*-PCR zeigten deutlich, dass in den beiden Zelllinien Tu-2449 und Tu-9648 die Expression von Hif1 α -mRNA signifikant verringert war (circa 50%), wenn die untersuchten Zellen den Stat3-*Knockdown* trugen (siehe Abbildung 6.15). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass Stat3 eventuell auch unter hypoxischen Bedingungen Einfluss auf die von Hif1 α -vermittelten Effekte hat und somit unter Normoxie und Hypoxie *Master*-Regulator der Tumorprogression in den murinen Gliomzellen ist. Um diese Rückschlüsse experimentell zu untermauern, wurde in den eingesetzten Zelllinien zusätzlich zu dem Stat3-*Knockdown* noch ein transienter Hif-*Knockdown* eingeführt (siehe Abbildung 6.21 A und B). Ziel war es, unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen die Expression der für die Tumorprogression verantwortlichen Zielgene zu untersuchen (siehe Abbildung 6.21 C). Dafür wurde die mRNA-Expression dieser Gene unter dem Stat3-*Knockdown* mit der unter dem Doppel-*Knockdown* von Stat3 und Hif1 α verglichen. Die Versuche hierfür wurden unter Hypoxie vorgenommen denn nur dann wird das Hif1 α -Protein im Zytoplasma stabilisiert und kann im Kern als Transkriptionsfaktor fungieren. Unerwarteterweise zeigte sich keine starke Induktion der Zielgene unter hypoxischen Bedingungen in den Kontrollzellen. Es ist anzunehmen, dass dieses Ergebnis mit der Eigenart der verwendeten Zellen zusammenhängt, dass Stat3 durch v-Src konstitutiv aktiviert ist. Die Expression der gemeinsamen Zielgene von Hif1 α und Stat3 könnte unter diesen Bedingungen bereits maximal sein, so dass eine zusätzliche Induktion durch Hif1 α unter hypoxischen Bedingungen zu keinem deutlichen Ausschlag in den mRNA-Expressionsleveln führt. Es zeigte sich unter dem Doppel-*Knockdown* von Stat3 und Hif1 α lediglich bei dem mRNA-Level von Snail in beiden untersuchten Zelllinien ein additiver Effekt in der Expressionsverminderung.

Zusammenfassend ergibt sich das Bild, dass Stat3 unter Normoxie sowie Hypoxie Haupregulator eines Großteil der untersuchten tumorpromotenden Gene ist, vermittelt durch seinen transkriptionellen Einfluss auf Hif1 α aber auch Hif1 α -unabhängig auf die Zielgene wirken kann, betrachtet man die fehlenden additiven Effekte bei zusätzlichem Hif1 α -*Knockdown*, sowie fehlende Induktion der Zielgene unter Hypoxie in den Kontrollzellen. Eine Therapiestrategie gerichtete gegen überaktiviertes Stat3 würde somit auch die tumorfördernden Eigenschaften von Hif1 α unterdrücken können.

7.2.4 Einfluss der Stat3-Depletion *ex-vivo* und *in-vivo*

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro* Versuche zielten auf die genaue Charakterisierung der murinen Gliomzellen ab, die durch einen stabilen Stat3-*Knockdown* genetisch verändert wurden. Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte festgestellt werden, dass die fehlende Expression von Stat3 unter anderem zu verminderter Invasion und Migration der Zellen führte, was zurückzuführen war auf die transkriptionelle Repression der tumorfördernden Zielgene von Stat3 wie Matrix-Metalloproteasen, Snail, Hif1 α und VEGF. Diese Ergebnisse sollten nun in *ex-vivo*- und *in-vivo*-Anwendungen verifiziert werden.

Um die für Gliome typische Einzelzellinvasion genauer untersuchen zu können, wurden die *Knockdown*- und Kontrollzellen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und ihre Wanderung auf organotypischen Schnittkulturen beobachtet. Es zeigte sich, dass die Stat3-defizienten Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen weit weniger proliferierten als die Kontrollzellen und sich nicht so weit von Applikationsort entfernten, was die *in-vitro* Versuche bereits vermuten ließen betrachtet man die verminderte Expression von Podoplanin, den Matrix-Metalloproteasen und nicht zuletzt den EMT-promotenden Gene. Allerdings zeigten die Stat3-defizienten Zellen in der vorliegenden Arbeit *in-vitro* keine Beschränkung ihrer Proliferationsrate obwohl nachgewiesen werden konnte, dass Stat3 in verschiedenen Krebsarten und auch Gliomen eine Rolle in der Proliferation und Steuerung des Zellzyklus spielt (Bollrath und Greten, 2009, Brantley und Benveniste, 2008, Yu und Jove, 2004). Vielmehr kommt der Stat3-*Knockdown* hier auf Ebene der Proliferation erst dann zum Tragen, wenn sich die Zellen in ihrer natürlichen Tumormilieu befinden. Dieses Milieu ist in der Lage über Aktivierung von Stat3 zum Beispiel in Epithelzellen die Produktion von Zytokinen wie IL-6 und IL-11 anzutreiben, die wiederum Stat3 in den Tumorzellen aktivieren, was in Förderung und Aktivierung der pro-onkogenen Signalwege resultiert (Fukuda et al., 2011, Lesina et al., 2011, Yu, Pardoll und Jove, 2009). Im Gegensatz zu den *in-vitro* Versuchen, bei denen keine zusätzliche Aktivierung der Stat3-Signalwege über Zytokine erfolgte, zeigte dieser Versuchsansatz, dass Stimulation ausgehend vom Tumormilieu eine gesteigerte Proliferation der Kontrollzellen induzieren kann im Gegensatz zu den Stat3-defizienten Zellen, deren Signalweg gehemmt ist. Neben der Proliferation gilt diese Aktivierung von Stat3 in den Tumorzellen durch Stat3 im Tumorstroma auch für die anderen bereits beschriebenen proonkogenen Signalkaskaden, die durch Stat3 ausgelöst werden.

Es fiel weiterhin auf, dass sich die Kontrollzellen an der Struktur der weißen Substanz orientierten und entlang dieser Fasern migrierten. Dieses Verhalten ist auch bekannt aus der Gliomerkrankung beim Menschen wodurch es zu sogenannten Schmetterlingsgliomen kommen kann bei denen der Tumor über den

Balken wandert und die andere Hemisphäre infiltriert (Louis et al., 2007, Kleihues und Ohgaki, 2000). Mit Hilfe dieser *ex-vivo* Anwendung konnte die gehemmte Migration und Invasion der Stat3-*Knockdown*-Zellen auch auf Einzelzellebene nachgewiesen werden deren positive Effekte auf das Überleben im Mausmodell im folgenden diskutiert werden sollen.

Das Verhalten der Stat3-*Knockdown* und Kontrollzellen *in-vivo* wurde mit Hilfe des in Kapitel 2.5 vorgestellten syngenesischen Mausmodells untersucht. Die vorausgegangene *in-vitro* und *ex-vivo* Charakterisierung des Stat3-*Knockdown* in den murinen, v-*Src* überexprimierenden Gliomzellen zeigte eine Reihe antitumorigener Effekte, die einen positiven Einfluss auf das Überleben der Mäuse haben sollten. Hierzu wurden erfolgreich transduzierte Zellen in die Tiere transplantiert ohne vorher eine klonale Zelllinie daraus herzustellen. Es hatte sich gezeigt, dass klonale Zellen in diesem Modell nicht anwachsen, was auf das intakte Immunsystem der verwendeten Mäuse zurück zu führen ist. In Abbildung 6.22 wird deutlich, dass die Tiergruppe, die einen Stat3-defizienten Tumor trug ein deutlich signifikant verlängertes Überleben zeigte sowie Langzeitüberlebende hervorbrachte. Des Weiteren zeigte die Kaplan-Meier-Kurve, dass der Krankheitsbeginn nach hinten verschoben war trugen die Tiere die Stat3-*Knockdown*-Zellen in sich. An diesem Punkt unterscheidet sich die Überlebenskurve mit der der Kurkuminbehandlung (Abbildung 6.12). Die Stat3-defizienten Tumore scheinen langsamer zu wachsen da sich erst später Krankheitssymptome zeigten, hauptsächlich ausgelöst durch steigenden Hirndruck (Huse und Holland, 2010). Die Tumorprogression nach Transplantation der *Knockdown*-Zellen scheint verlangsamt was auf Hemmung der Proliferation und damit verbunden der Neovaskularisierung deutet, die erst einen deutlichen Wachstumsschub vom mikro- zum makroskopischen Tumor induziert, was im Folgenden zur Gliom-Symptomatik führte (Hanahan und Weinberg, 2010). Der in Abbildung 6.16 dargelegte Versuch zeigte deutlich, dass sich die Sekretion von VEGF um nahezu 80% verringerte, war Stat3 in den Zellen gentechnisch ausgeschaltet. Einen Einfluss von Stat3 auf die Proliferation der murinen Gliomzellen konnte zwar in der vorliegenden Arbeit *in-vitro* nicht bestätigt werden, die *ex-vivo* Resultate lassen aber vermuten, dass die beobachtete Tatsache des späteren Krankheitsbeginns auch durch Stat3 gesteuert wird, hier allerdings ausgehend durch Stimulation vom Tumormilieu, was erst im *ex-vivo*-Ansatz zum Tragen kam. Diese Hemmung der Neoangiogenese und Proliferation des Tumors durch Wegfall von Stat3 in den transplantierten Tumorzellen führte wahrscheinlich zur Verschiebung des Krankheitsbeginns und wirkte sich positiv auf das Gesamtüberleben der Mäuse aus.

Die bereits untersuchten und beschriebenen Effekte von Stat3 auf die Invasion und Migration der Gliomzellen, gesteuert durch Matrix-Metalloprotease 2 und 9, Podoplanin und den Regulatoren des mesenchymalen Phänotyps Snail und Twist beeinflussen aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls positiv den Krankheitsverlauf

in den Mäusen, die einen Stat3-defizienten Tumor trugen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine histologischen Untersuchungen der Tumore durchgeführt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass der Tumor hervorgegangen aus den Stat3-*Knockdown*-Zellen weniger tief in das umliegende Hirnparenchym invadieren kann und somit das Charakteristika des diffusen Tumorwachstums beeinflusst. Die Bildung multifokaler Gliome wäre damit auch weit unwahrscheinlicher (Showalter et al., 2007). Es besteht Grund zur Annahme, dass auch die vorherrschende Hypoxie im Inneren des Tumors an der Invasion der Tumorzellen beteiligt ist, betrachtet man ein weiteres Charakteristikum des Glioms, die Pseudopalisaden, die nekrotische Areale säumen (Rong et al., 2006). Diese Zellen mit klar mesenchymalem Phänotyp scheinen sich vom Ort der Nekrose, an dem Sauerstoff- und Nährstoffmangel herrscht, zu entfernen. Es ist bekannt, dass sie Hif1 α exprimieren sowie Matrix-metalloproteasen und ihre Proliferationsrate gemindert ist, was auch aktiv migrierende Zellen schließen lässt (Brat et al., 2006). Es ist vorstellbar, dass die Stat3-defizienten Tumore durch ihre transkriptionellen Änderung der Hif1 α -Expression die Invasion der Tumorzellen auch auf dieser Ebene gehemmt ist und somit ein weiteres Charakteristikum des Glioblastoms für den Krankheitsverlauf positiv durch den Stat3-*Knockdown* in den Tumorzellen beeinflusst ist.

Eine Besonderheit des hier eingesetzten Tiermodells ist das intakte Immunsystem der Mäuse, da eine Xenotransplantation mit humanen Zellen durch die Verwendung der murinen Gliomzellen entstanden aus GFAP-v-*Src* transgenen Mäusen nicht mehr notwendig ist (siehe Kapitel 1.5). Es ist daher zu berücksichtigen, dass das Immunsystem einen Beitrag zur Lebensverlängerung der tumortragenden Mäuse in beiden eingesetzten Zellpopulationen, Kontroll- und Stat3-*Knockdown*-Zellen, leisten kann. Das signifikant verlängerte Überleben der Mäuse mit dem Stat3-defizienten Tumor lässt vermuten, dass Stat3 auch in dem vorliegenden Modell einen Einfluss auf die immunsupprimierende Wirkung des Tumors hat. Es konnte gezeigt werden, dass aktives Stat3 im Tumor durch Sezernierung immunsupprimierender Faktoren wie VEGF, IL-6 und IL-10 die Reifung dendritischer Zellen verhindert und immunsupprimierende T_{Reg}-Zellen aktiviert, was seinerseits in der Inhibierung zytotoxischer T-Zellen und Killerzellen resultiert. Zudem ist dieser Vorgang auch selbsterhaltend da sie sezernierten Faktoren wiederum Stat3 aktivieren können (Yu, Kortylewski und Pardoll, 2007, Kortylewski et al., 2005). Versuche mit Stat3-defizienten dendritischen Zellen, appliziert in ein humanes subkutanes Colonkarzinom im Mausmodell, zeigte trotz immunsupprimierenden Faktoren des Tumors und des Tumormilieus eine potente antitumorale Aktivität (Iwata-Kajihara et al., 2011). Ebenso die CD8⁺-T-Zellpopulationen konnten durch Stat3-*Knockdown* nicht mehr durch den Tumor oder sein Milieu beeinflusst werden, was in einer vergrößerten Population dieser zytotoxischen T-Zellen resultierte und einer gesteigerten antitumoralen Aktivität (Kujawski et al., 2010). Da gezeigt werden konnte, dass auch in Gliom-

Stammzellen eine immunsupprimierende Wirkung auf den Tumor und das Tumormilieu hat, hier auf Mikroglia den Immunzellen des Gehirns, liegt es nahe, dass das verlängerte Überleben der Mäuse, die einen Stat3-defizienten Tumor trugen, mit der Aufhebung der immunsupprimierenden Wirkung von Stat3 zusammen hängt (Wu et al., 2010, Wei et al., 2010)

Die molekulare und zelluläre Heterogenität eines Glioms lässt sich nur schwer mit der Hypothese erklären, dass der Tumor allein aus entdifferenzierten Astrozyten hervorgegangen ist. Vielmehr machen besonders Mischgliome deutlich, dass auch gliale Vorläuferzellen sowie neurale Stammzellen am Prozess der Tumorgenese beteiligt sein könnten (Huse und Holland, 2010, Bonavia et al. 2011). Die sogenannte *cancer stem cells* (CSC)-Hypothese besagt, dass Eigenschaften wie Pluripotenz und Selbstreplikation zur Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation sowie eine ausgeprägte Therapieresistenz die typischen Merkmale eines Glioms erklären können (Fine, 2009). Neben den verschiedenen Zelltypen in einem Tumor könnte die CSC-Hypothese auch erklären, warum es nach Behandlung des Patienten trotzdem häufig zu Rezidiven kommt (Campos et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Stat3 an der Erhaltung der Pluripotenz dieser Stammzellen beteiligt ist und somit die Tumorigenität dieser Zellpopulation fördert (Guryanova et al., 2011, Villalva et al., 2011, Sherry et al., 2009, Wang et al., 2009). Der therapeutische Wegfall von Stat3 hätte unter dieser Annahme nicht nur die direkte Beeinflussung der Tumormasse bezüglich Proliferation, Invasion und allgemein Tumorigenität zur Folge sondern könnte auch die Tumoringenierung und das klinisch hochrelevante Problem der Rezidive zum Nutzen des Patienten beeinflussen.

8 Literaturverzeichnis

- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC: Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003, 23(1A):363-398.
- Aggarwal BB, Sethi G, Baladandayuthapani V, Krishnan S, Shishodia S. Targeting cell signaling pathways for drug discovery: an old lock needs a new key. *J Cell Biochem.* 2007b ;102:580–92.
- Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:1–75.
- Aggarwal, BB, (2010) "Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals." *Annu Rev Nutr* 30: 173-99.
- Aggarwal, BB, Sethi, G., Ahn, K.S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Kunnumakkara, A.B., Sung, B. and Ichikawa, H. (2006). Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann N Y Acad Sci* 1091:151-169.
- Akira, S., Y. Nishio, et al. (1994). "Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway." *Cell* 77(1): 63-71.
- Al Zaid Siddiquee, K. and J. Turkson (2008). "STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors." *Cell Res* 18(2): 254-67.
- Almairac, F., M. Frenay, et al. (2010) "[Genetic diseases and glioblastomas]." *Neurochirurgie* 56(6): 455-8.
- Amit, I., Citri, A., Shay, T., Lu, Y., Katz, M., Zhang, F., Tarcic, G., Siwak, D., Lahad, J., Jacob-Hirsch, J., et al. (2007). A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat. Genet.* 39, 503–512.
- Anand P, Nair HB, Sung B, Kunnumakkara AB, Yadav VR, Tekmal RR, et al. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability
- Anand, P., A. B. Kunnumakkara, et al. (2007). "Bioavailability of curcumin: problems and promises." *Mol Pharm* 4(6): 807-18.
- Ashby L, Ryken T (2006) Management of malignant glioma: steady progress with multimodal approaches. *Neurosurg Focus* 20:E3.
- Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol* 2007;72:29–39.
- Aslund, F., K. D. Berndt, et al. (1997). "Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria." *J Biol Chem* 272(49): 30780-6.
- Azare, J., K. Leslie, et al. (2007). "Constitutively activated Stat3 induces tumorigenesis and enhances cell motility of prostate epithelial cells through integrin beta 6." *Mol Cell Biol* 27(12): 4444-53.
- Badgwell, D. B., Z. Lu, et al. "The tumor-suppressor gene ARHI (DIRAS3) suppresses ovarian cancer cell migration through inhibition of the Stat3 and FAK/Rho signaling pathways." *Oncogene.*
- Bahr O, Herrlinger U, Weller M, Steinbach JP. Very late relapses in glioblastoma long-term survivors. *J Neurol* 2009;256:1756–8.

- Bangaru, M. L. (2011). "Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis and blocks migration of human medulloblastoma cells." *Anticancer Res* 30(2): 499-504.
- Bartoli, M. et al. VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells. *FASEB J.* 17, 1562–1564 (2003).
- Batlle, E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida, H.A. Garcia De, The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 84–89.
- Bayet-Robert M, Kwiatkowski F, Leheurteur M, Gachon F, Planchat E, Abrial C, Mouret-Reynier MA, Durando X, Barthomeuf C, Chollet P: Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2010, 9(1):8-14.
- Beevers, C. S., L. Chen, et al. (2009). "Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin-raptor complex." *Cancer Res* 69(3): 1000-8.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP (2007) CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67:4010-4015.
- Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003129.
- Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol* 2003;171(7):3863– 71.
- Bhattacharyya, S., D. Md Sakib Hossain, et al. "Curcumin reverses T cell-mediated adaptive immune dysfunctions in tumor-bearing hosts." *Cell Mol Immunol* 7(4) 2010: 306-15.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.
- Biedermann KA, Sun JR, Giaccia AJ, Tosto LM, Brown JM. 1991. Scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1394–1397.
- Birner P, Toumangelova-Uzeir K, Natchev S, Guentchev M. (2010) STAT3 tyrosine phosphorylation influences survival in glioblastoma. *J Neurooncol.*
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622.
- Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebti SM. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res* 2003;63: 1270 – 9.
- Bloom, J. and F. R. Cross (2007). "Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2): 149-60.
- Bollrath J, Pheese TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer cell* 2009; 15:91–102.
- Bollrath, J. and F. R. Greten (2009). "IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis." *EMBO Rep* 10(12): 1314-9.
- Bonavia, R., M. D. Inda, et al. (2011)"Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network." *Cancer Res* 71(12): 4055-60.
- Bonni, A., Y. Sun, et al. (1997). "Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway." *Science* 278(5337): 477-83.
- Bowman, T. et al. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 7319–7324 (2001).
- Bowman, T., R. Garcia, et al. (2000). "STATs in oncogenesis." *Oncogene* 19(21): 2474-88.

- Brantley, E. C. and E. N. Benveniste (2008). "Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas." *Mol Cancer Res* 6(5): 675-84.
- Brat, D. J., A. A. Castellano-Sanchez, et al. (2004). "Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population." *Cancer Res* 64(3): 920-7.
- Brennan C, Momota H, Hambarzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, Holland E. 2009. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One* 4:e7752.
- Brinster RL, Chen HY, Messing A, van Dyke T, Levine AJ, Palmiter RD. 1984. Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. *Cell* 37:367-379.
- Bromberg J, Darnell JE, Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19:2468-2473
- Buettner R, Mora LB, Jove R: Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer*
- Campos, B., F. Wan, et al.(2010) "Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells." *Clin Cancer Res* 16(10): 2715-28.
- Cano, M.A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M.J. Blanco, M.G. del Barrio, F. Portillo, M.A. Nieto, The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 76-83.
- Cao X, Tay A, Guy GR, Tan YH. 1996. Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol*, 16 (4):1595-1603.
- Carro, M.S., Lim, W.K., Alvarez, M.J., Bollo, R.J., Zhao, X., Snyder, E.Y., Sulman, E.P., Anne, S.L., Doetsch, F., Colman, H., et al. (2010). The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* 463, 318-325.
- Castellino RC, Durden DL (2007) Mechanisms of disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node-an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nat Clin Pract Neuro*
- Catlett-Falcone, R. et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105-115 (1999).
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118-132.
- Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S (2008) CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118:2111-2120.
- Chen, F., Y. Xu, et al. (2010) "Down-regulation of Stat3 decreases invasion activity and induces apoptosis of human glioma cells." *J Mol Neurosci* 40(3): 353-9.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* 6, 1521-1533.
- Chong, S. Y. and J. R. Chan "Tapping into the glial reservoir: cells committed to remaining uncommitted." *J Cell Biol* 188(3): 305-12.
- Ciardello F, Caputo R, Bianco R, et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2053 - 63.
- Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* 2007;114:443-58.
- Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* 2007;114:443-58.

- Clark CA, McEachern MD, Shah SH, Rong Y, Rong X, Smelley CL, Caldito G, Abreo F, Nathan CA: Curcumin Inhibits Carcinogen and Nicotine-induced Mammalian Target of Rapamycin Pathway Activation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Prev Res* 2010, 3:1586-1595.
- Collins VP (1995) Gene amplification in human gliomas. *Glia* 15: 289-296.
- Collins VP (2004) Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75 Suppl 2:ii2
- Colomiere, M., A. C. Ward, et al. (2009). "Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas." *Br J Cancer* 100(1): 134-44.
- Cox BD, Natarajan M, Stettner MR et al (2006) New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J Cell Biochem* 99:35–52.
- Curto, M., Cole, B.K., Lallemand, D., Liu, C.H., and McClatchey, A.I. (2007). Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J. Cell Biol.* 177, 893–903.
- Dang, C. V. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1–11 (1999).
- Darnell JE, Jr. (1997) Stats and gene regulation. *Science* 277:1630-1635
- Davies, M.A., and Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 29, 5545–5555.
- de Groot, J. and V. Milano (2009). "Improving the prognosis for patients with glioblastoma: the rationale for targeting Src." *J Neurooncol* 95(2): 151-63.
- de la Iglesia, N., Puram, S.V., and Bonni, A. (2009). STAT3 regulation of glioblastoma pathogenesis. *Curr. Mol. Med.* 9, 580–590.
- de Vries, N. A., J. H. Beijnen, et al. (2009). "High-grade glioma mouse models and their applicability for preclinical testing." *Cancer Treat Rev* 35(8): 714-23.
- de Vries, N. A., Beijnen, J. H., Boogerd, W., van Tellingen, O., Blood-brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors. *Exp. Rev. Neurother.* 2006, 6, 1199–1209.
- DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316.
- Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors *J Neurochem* 2007;102:522–38.
- Dorsett, Y. and T. Tuschl (2004). "siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics." *Nat Rev Drug Discov* 3(4): 318-29.
- Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, and Collins VP (1991) Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 51: 2164-2172
- Etcheverry, A., M. Aubry, et al. "DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome." *BMC Genomics* 11: 701.
- Felsher DW (2003) Cancer revoked: oncogenes as therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 3:375-380
- Ferrand A, Kowalski-Chauvel A, Bertrand C, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M, Seva C (2004) Involvement of JAK2 upstream of the PI 3-kinase in cell-cell adhesion regulation by gastrin. *Exp Cell Res* 301: 128–138
- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 789–791.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.
- Fine, H. A. (2009). "Glioma stem cells: not all created equal." *Cancer Cell* 15(4): 247-9.
- Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006, 7(5):392-401.

- Fossey, S. L., M. D. Bear, et al. (2011) "The novel curcumin analog FLLL32 decreases STAT3 DNA binding activity and expression, and induces apoptosis in osteosarcoma cell lines." *BMC Cancer* 11: 112.
- Fu, X. Y. and J. J. Zhang (1993). "Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the c-fos gene promoter." *Cell* 74(6): 1135-45.
- Fukuda, A., S. C. Wang, et al. (2011) "Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression." *Cancer Cell* 19(4): 441-55.
- Garcia, R. et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20, 2499–2513 (2001).
- Gao, S. P. and J. F. Bromberg (2006). "Touched and moved by STAT3." *Sci STKE* 2006(343): pe30.
- Germain, D. and D. A. Frank (2007). "Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy." *Clin Cancer Res* 13(19): 5665-9.
- Gerson, S. L. (2004). "MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics." *Nat Rev Cancer* 4(4): 296-307.
- Ghosh, A. and S. Chaudhuri "Microglial action in glioma: a boon turns bane." *Immunol Lett* 131(1): 3-9.
- Glienke W, Maute L, Wicht J, Bergmann L: Curcumin inhibits constitutive STAT3 phosphorylation in human pancreatic cancer cell lines and downregulation of survivin/BIRC5 gene expression. *Cancer Invest* 2010, 28(2):166-171.
- Globus J, Kuhlenbeck H (1942). " Tumors of the striatohalamic and related regions: their propable source of origin and more common forms" *Arch Pathol*, 24:674-734
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Guryanova, O. A., Q. Wu, et al. (2011) "Nonreceptor Tyrosine Kinase BMX Maintains Self-Renewal and Tumorigenic Potential of Glioblastoma Stem Cells by Activating STAT3." *Cancer Cell* 19(4): 498-511.
- Guryanova, O. A., Q. Wu, et al. (2011) "Nonreceptor tyrosine kinase BMX maintains self-renewal and tumorigenic potential of glioblastoma stem cells by activating STAT3." *Cancer Cell* 19(4): 498-511.
- Hambardzumyan, D., L. F. Parada, et al. "Genetic modeling of gliomas in mice: New tools to tackle old problems." *Glia* 59(2011): 1155-68.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-74.
- Haque SJ: Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 2002, 21(55):8404-8413.
- Harris AL. (2002) Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2: 38-47.
- Hartman, Z. C., X. Y. Yang, et al. (2011) "HER2 overexpression elicits a pro-inflammatory IL-6 autocrine signaling loop that is critical for tumorigenesis." *Cancer Res*.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-6.
- Hilfiker-Kleiner, D., A. Hilfiker, and H. Drexler, Many good reasons to have
- Hlubek, F., Brabletz, T., Budczies, J., Pfeiffer, S., Jung, A., and Kirchner, T. (2007). Heterogeneous expression of Wnt/beta-catenin target genes within colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 121, 1941–1948
- Holland, EC (2001). "Progenitor cells and glioma formation." *Curr Opin Neurol* 14(6): 683-8.
- Holland, EC. (2000) Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci USA*;97:6242–4.
- Homsy, J., C. Cubitt, et al. (2007). "The Src signaling pathway: a potential target in melanoma and other malignancies." *Expert Opin Ther Targets* 11(1): 91-100.
- Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med* 1995; 1: 149–53.
- Hoshino, A., G. Ishii, et al. (2011) "Podoplanin-positive fibroblasts enhance lung adenocarcinoma

- tumor formation." *Cancer Res.*
- Huse, J. T. and E. C. Holland "Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma." *Nat Rev Cancer* (2010)10(5): 319-31.
- Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, and Collins VP (1996) Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4a, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 13: 1065-1072.
- Iwamaru, A., S. Szymanski, et al. (2007). "A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo." *Oncogene* 26(17): 2435-44.
- Ireson C, Orr S, Jones DJ, Verschoyle R, Lim CK, Luo JL, Howells L, Plummer S, Jukes R, Williams M, Steward WP, Gescher A. Characterization of metabolites of the chemo-preventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res.* 2001;
- Iwata-Kajihara, T., H. Sumimoto, et al.(2011) "Enhanced Cancer Immunotherapy Using STAT3-Depleted Dendritic Cells with High Th1-Inducing Ability and Resistance to Cancer Cell-Derived Inhibitory Factors." *J Immunol* 187(1): 27-36.
- Jain, R. K., E. di Tomaso, et al. (2007). "Angiogenesis in brain tumours." *Nat Rev Neurosci* 8(8): 610-22.
- Jiang, B.H., and Liu, L.Z. (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* 102, 19–65.
- Jing N, Li Y, Xiong W, et al. G-quartet oligonucleotides: a new class of signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors that suppresses growth of prostate and breast tumors through induction of apoptosis. *Cancer Res* 2004;64(18):6603–9.
- Jones, S. A. (2005). "Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6." *J Immunol* 175(6): 3463-8.
- Joyce Ja, Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9: 239–252
- Jurenka JS: Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev* 2009, 14:141-153.
- Kang, S. H., M. O. Yu, et al. "Activated STAT3 regulates hypoxia-induced angiogenesis and cell migration in human glioblastoma." *Neurosurgery* 67(2010): 1386-95;.
- Kang, Y., and J. Massague. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118:277–279.
- Kapoor, G. S. and D. M. O'Rourke "SIRPalpha1 receptors interfere with the EGFRvIII signalosome to inhibit glioblastoma cell transformation and migration." *Oncogene* 29(2010): 4130-44.
- Kasinski AL, Du Y, Thomas SL, Zhao J, Sun SY, Khuri FR, Wang CY, Shoji M, Sun A, Snyder JP, Liotta D, Fu H. Inhibition of I κ B kinase-nuclear factor- κ B signaling pathway by 3,5-bis(2-fluorobenzylidene)piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin. *Mol. Pharmacol.* 2008; 74:654–661.
- Kim HY, Park EJ, Joe EH, Jou I. Curcumin suppresses Janus kinase-STAT inflammatory signaling through activation of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain microglia. *J Immunol* 2003;171:6072–9.
- Kim SY, Jung SH, Kim HS. Curcumin is a potent broad spectrum inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression in human astro-glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:510–6.
- Kleihues P, Ohgaki H (2000) „Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors“. *Toxicol Pathol* 28:164-170.
- Kleihues, P., D. N. Louis, et al. (2002). "The WHO classification of tumors of the nervous system." *J Neuropathol Exp Neurol* 61(3): 215-25; discussion 226-9.
- Kogel, D., S. Fulda, et al. "Therapeutic exploitation of apoptosis and autophagy for glioblastoma." *Anticancer Agents Med Chem* 2010(6): 438-49.
- Konnikova L, Kotecki M, Kruger MM, Cochran BH: Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces

- apoptosis in astrocytoma cells. *BMC cancer* 2003, 3:23.
- Kortylewski, M., M. Kujawski, et al. (2005). "Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity." *Nat Med* 11(12): 1314-21.
- Kotha A, Sekharam M, Cilenti L, et al. Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Mol Cancer Ther* 2006;5(3):621-9.
- Krishnankutty K, Venugopalan P. Unsaturated beta-Keto esters and their Ni(II), Cu(II), Zn(II) complexes. *Synth. Pract. Inorg. Met. Org. Chem.* 1998; 28:1313.
- Kujawski, M. et al. Stat3 mediates myeloid cell- dependent tumor angiogenesis in mice. *J. Kujawski, M., C. Zhang, et al.* (2010) "Targeting STAT3 in adoptively transferred T cells promotes their in vivo expansion and antitumor effects." *Cancer Res* 70(23): 9599-610.
- Kunigal, S., S. S. Lakka, et al. (2009). "Stat3-siRNA induces Fas-mediated apoptosis in vitro and in vivo in breast cancer." *Int J Oncol* 34(5): 1209-20.
- Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB: Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett* 2008, 269(2):199-225.
- Kunwar A, Barik A, Mishra B, Rathinasamy K, Pandey R, Priyadarsini KI. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780:673-9.
- Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, et al. 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9:391-403.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117-1134.
- Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, et al. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(7):4138-43. [PubMed: 12640143]
- Lesina, M., M. U. Kurkowski, et al. (2011)"Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer." *Cancer Cell* 19(4): 456-69.
- Levy DE, Lee CK (2002) What does Stat3 do? *J Clin Invest* 109:1143-1148.
- Levy, D. E. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 651-62.
- Li J, Yen C, and Liaw D (1997) PTEN, a putative protein tyrosin phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-1947
- Lin L, Hutzen B, Ball S, Foust E, Sobol M, Deangelis S, Pandit B, Friedman L, Li C, Li PK, Fuchs J, Lin J. New curcumin analogues exhibit enhanced growth-suppressive activity and inhibit AKT and signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation in breast and prostate cancer cells. *Cancer Sci.* 2009; 100:1719-1727.
- Lin, L., B. Hutzen, et al.(2010) "Novel STAT3 phosphorylation inhibitors exhibit potent growth-suppressive activity in pancreatic and breast cancer cells." *Cancer Res* 70(6): 2445-54.
- Lindemann, C., O. Hackmann, et al.(2011) "SOCS3 promoter methylation is mutually exclusive to EGFR amplification in gliomas and promotes glioma cell invasion through STAT3 and FAK activation." *Acta Neuropathol.*
- Liu, Q., G. Li, et al. (2010) "IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines." *J Neurooncol* 100(2): 165-76.
- Liu, Y., J. Fuchs, et al. (2010)"IL-6, a risk factor for hepatocellular carcinoma: FLLL32 inhibits IL-6-induced STAT3 phosphorylation in human hepatocellular cancer cells." *Cell Cycle* 9(17): 3423-7.

- Loeffler, S., B. Fayard, et al. (2005). "Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1." *Int J Cancer* 115(2): 202-13.
- Lopez-Lazaro M: Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res* 2008 S103-127.
- LoTempio, M. M., M. S. Veena, et al. (2005). "Curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res* 11(19 Pt 1): 6994-7002.
- Lou, W., Ni, Z., Dyer, K., Twardy, D. J. & Gao, A. C. Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of stat3 signaling pathway. *Prostate* 42, 239–242 (2000).
- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." *Acta Neuropathol* 114(2): 97-109.
- Luo, Y., F. Liang, et al. (2009). "PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways." *Biochemistry* 48(8): 1838-46.
- Luthra PM, Kumar R, Prakash A. Demethoxycurcumin induces Bcl-2 mediated G2/M arrest and apoptosis in human glioma U87 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;384:420–5
- Ma, J., T. Zhang, et al. (2003). "A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation." *J Biol Chem* 278(31): 29252-60.
- Ma, Z.; Shayeganpour, A.; Brocks, D. R.; Lavasanifar, A.; Samuel, J. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin. *Biomed. Chromatogr.* 2007, 21 (5), 546–52.
- Mackenzie, G. G., N. Queisser, et al. (2008). "Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-kappaB and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells." *Int J Cancer* 123(1): 56-65.
- Macleod KF, Jacks T. 1999. Insights into cancer from transgenic mouse models. *J Pathol* 187:43–60.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 2001;15:1311–33.
- Majmundar, A. J., W. J. Wong, et al. "Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress." *Mol Cell* 40(2010): 294-309.
- Marg, A., Y. Shan, et al. (2004). "Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1." *J Cell Biol* 165(6): 823-33.
- Martini, M., R. Pallini, et al. (2008). "Prognostic relevance of SOCS3 hypermethylation in patients with glioblastoma multiforme." *Int J Cancer* 123(12): 2955-60.
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T and Yokota T (1999) "Stat3 is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells" *EMBO J* 18 (15): 4261–4269.
- McCarty, J. H. (2009). "Cell adhesion and signaling networks in brain neurovascular units." *Curr Opin Hematol* 16(3): 209-14.
- Mohapatra G, Kim DH and Feuerstein BG (1995) Detection of multiple gains and losses of genetic material in ten glioma cell lines by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 13: 86-93.
- Mollenhauer J, Wiemann S, and Scheurlen W (1997) DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumors. *Nat Genet* 17: 32-39.
- Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2006). Oncogene-induced cell senescence— halting on the road to cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 1037–1046.
- Mora, L. B. et al. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 62, 6659–6666 (2002).

- Moreno-Bueno, G., F. Portillo, et al. (2008). "Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer." *Oncogene* 27(55): 6958-69.
- Morris, V. A., A. S. Punjabi, et al. (2008). "Activation of Akt through gp130 receptor signaling is required for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced lymphatic reprogramming of endothelial cells." *J Virol* 82(17): 8771-9.
- Muleris M, Almeida A, and Dutrillaux AM (1994) Oncogene amplification in human gliomas: a molecular cytogenetic analysis. *Oncogene* 9: 2717-2722.
- Naar, A. M., B. D. Lemon, et al. (2001). "Transcriptional coactivator complexes." *Annu Rev Biochem* 70: 475-501.
- Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, et al. The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. *Mol Cancer Res* 2004;2(3):170–82.
- Nagy, J.A., Chang, S.H., Shih, S.C., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.* 36, 321–331.
- Nair, H. B., B. Sung, et al. (2010) "Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer." *Biochem Pharmacol* 80(12): 1833-43.
- Negoro S., et al., „Activation of JAK/ST A T pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction.“ *Cardiovasc Res*, 2000. 47(4): p. 797
- Nakagawa R., Naka T., Tsutsui H., Fujimoto M., Kimura A., Abe T., Seki E., Sato S., Takeuchi O., Takeda K., Akira S., Yamanishi K., Kawase I., Nakanishi K. and Kishimoto T. (2002) SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 17, 677-87.
- Nelson, B.H. (2008). The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol. Rev.* 222, 101–116.
- Ng DC, Lin BH, Lim CP, et al. (2006)“Stat3 regulates micro- tubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. " *J Cell Biol* 2006;172:245 57.
- Nielsen NH, Emdin SO, Cajander J, Landberg G. Deregulation of cyclin E and D1 in breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein. *Oncogene* 1997;14:295 -304.
- Niu, G. et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21, 2000–2008 (2002).
- Niu, G. et al. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21, 7001–7010 (2002).
- Niu, G., K. L. Wright, et al. (2002). "Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis." *Oncogene* 21(13): 2000-8.
- Niu, G., K. L. Wright, et al. (2005). "Role of Stat3 in regulating p53 expression and function." *Mol Cell Biol* 25(17): 7432-40.
- Oh, J. H., M. C. Cho, et al. (2011)"IL-32gamma inhibits cancer cell growth through inactivation of NF-kappaB and STAT3 signals." *Oncogene*.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Epidemiology and etiology of gliomas." *Acta Neuropathol* 109(1): 93-108.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2009). "Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas." *Cancer Sci* 100(12): 2235-41.
- Ohgaki, H (2005) Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 25:1-7.
- Okada, T., Lopez-Lago, M., and Giancotti, F.G. (2005). Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 171, 361–371.
- Overall, C. M. and C. Lopez-Otin (2002). "Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era." *Nat Rev Cancer* 2(9): 657-72.
- Padhye S, Banerjee S, Chavan D, Pandye S, Swamy KV, Ali S, Li J, Dou QP, Sarkar FH. Fluorocurcumins as Cyclooxygenase-2 Inhibitor: Molecular Docking, Pharmacokinetics and Tissue Distribution in Mice. *Pharm. Res.* 2009; 26(11):2438–2445.

- Padhye, S., D. Chavan, et al. (2010) "Perspectives on chemopreventive and therapeutic potential of curcumin analogs in medicinal chemistry." *Mini Rev Med Chem* 10(5): 372-87.
- Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 1999;27:486-94.
- Papadakis, A. I., E. Paraskeva, et al. "eIF2{alpha} Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1{alpha}." *Cancer Res* 70(2010): 7820-9.
- Park, D.M., and Rich, J.N. (2009). Biology of glioma cancer stem cells. *Mol. Cells* 28, 7-12.
- Patel BB, Gupta D, Elliott AA, Sengupta V, Yu Y, Majumdar AP: Curcumin targets FOLFOX-surviving colon cancer cells via inhibition of EGFRs and IGF-1R. *Anticancer Res* 2010, 30(2):319-325.
- Paternot, S., L. Bockstaele, et al. (2010) "Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase." *Cell Cycle* 9(4): 689-99.
- Pedersen, P. H., G. J. Rucklidge, et al. (1994). "Leptomeningeal tissue: a barrier against brain tumor cell invasion." *J Natl Cancer Inst* 86(21): 1593-9.
- Pelosio P, Barbareschi M, Bonoldi E, et al. Clinical significance of cyclin D1 expression in patients with node-positive breast carcinoma treated with adjuvant therapy. *Ann Oncol* 1996;7:695-703.
- Perry, M. C., M. Demeule, et al. "Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts." *Mol Nutr Food Res* 54(8): 1192-201.
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrester WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, et al. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9:157-173.
- Pietsch, T., A. Waha, et al. (1997). "Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of Drosophila patched." *Cancer Res* 57(11): 2085-8.
- Plate, K. H., G. Breier, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo." *Nature* 359(6398): 845-8.
- Polyak K, Weinberg Ra (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265-273
- Polyak, K., Haviv, I., and Campbell, I.G. (2009). Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet.* 25, 30-38.
- Purkayastha, S., A. Berliner, et al. (2009). "Curcumin Blocks Brain Tumor Formation." *Brain Res.*
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.
- Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O, Barnett GH, Vogelbaum MA, Haque SJ. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 2002;21: 8404 - 13.
- Rainov N, Soling A, Heidecke V (2006) Novel therapies for malignant gliomas: a local affair? *Neurosurg Focus* 20:E9.
- Rahaman, S. O., P. C. Harbor, et al. (2002). "Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells." *Oncogene* 21(55): 8404-13.
- Rajan, P. and R. D. McKay (1998). "Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS." *J Neurosci* 18(10): 3620-9.
- Rajan, P., D. M. Panchision, et al. (2003). "BMPs signal alternately through a SMAD or FRAP-STAT pathway to regulate fate choice in CNS stem cells." *J Cell Biol* 161(5): 911-21.
- Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB: Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J* 2009, 11(3):495-510.
- Reich, N. C. and L. Liu (2006). "Tracking STAT nuclear traffic." *Nat Rev Immunol* 6(8): 602-12.

- Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers JM, Oberstrass J, An H-X, Niederacher D, Wechsler W, and Reifenberger G (1996) Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 824-833.
- Rong, Y., D. L. Durden, et al. (2006). "Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis." *J Neuropathol Exp Neurol* 65(6): 529-39.
- Rosen, J.M., and Jordan, C.T. (2009). The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324, 1670–1673.
- Ryu MJ, Cho M, Song JY, Yun YS, Choi IW, Kim DE, et al. Natural derivatives of curcumin attenuate the Wnt/beta-catenin pathway through down-regulation of the transcriptional coactivator p300. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:1304–8.
- Ryu, E. K.; Choe, Y. S.; Lee, K. H.; Choi, Y.; Kim, B. T. Curcumin and dehydrozingerone derivatives: synthesis, radiolabeling, and evaluation for β -amyloid plaque imaging. *J. Med. Chem.* 2006, 49 (20), 6111–9.
- Sanai, N., A. Alvarez-Buylla, et al. (2005). "Neural stem cells and the origin of gliomas." *N Engl J Med* 353(8): 811-22.
- Sandur SK, Deorukhkar A, Pandey MK, Pabon AM, Shentu S, Guha S, Aggarwal BB, Krishnan S: Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF- κ B activity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009, 75(2):534-542.
- Sano S, Itami S, Takeda K, et al. 1999. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO.J* 18:4657-4668.
- Sarasin, A. (2003) An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation research*, 544, 99-106.
- Saydmohammed, M., D. Joseph, et al.(2010) "Curcumin suppresses constitutive activation of STAT-3 by up-regulating protein inhibitor of activated STAT-3 (PIAS-3) in ovarian and endometrial cancer cells." *J Cell Biochem* 110(2): 447-56.
- Schaefer LK, Ren Z, Fuller GN, Schaefer TS. Constitutive activation of Stat3a in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene* 2002;21: 2058 – 65.
- Scharstuhl A, Mutsaers HA, Pennings SW, Szarek WA, Russel FG, Wagener FA (2008) Curcumin-Induced Fibroblast Apoptosis and in Vitro Wound Contraction Are Regulated by Antioxidants and Heme Oxygenase: Implications for Scar Formation. *J Cell Mol Med*
- Schlessinger, K. and D. E. Levy (2005). "Malignant transformation but not normal cell growth depends on signal transducer and activator of transcription 3." *Cancer Res* 65(13): 5828-34.
- Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* 182(3): 311-22.
- Schröck E, Thiel G, and Lozanova T (1994) Comparative genomic hybridisation of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol* 144: 1203-1218.
- Schroer, N., J. Pahne, et al. (2011) "Molecular pathobiology of human cervical high-grade lesions: paracrine STAT3 activation in tumor-instructed myeloid cells drives local MMP-9 expression." *Cancer Res* 71(1): 87-97.
- Schust, J et al. (2006). "Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization." *Chem Biol* 13(11): 1235-42.
- Sebolt-Leopold, J. S., R. Herrera, et al. (2007). "The mitogen-activated protein kinase pathway for molecular-targeted cancer treatment." *Recent Results Cancer Res* 172: 155-67.
- Sehgal P. B., Helfgott D. C, et al. (1988) Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. *J Exp Med* 167, 1951-6.

- Seidel, H. M., L. H. Milocco, et al. (1995). "Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7): 3041-5.
- Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010;29:625–34.
- Senft C, Franz K, Ulrich CT, Bink A, Szelenyi A, Gasser T, Seifert V: Low field intraoperative MRI-guided surgery of gliomas: a single center experience. *Clin Neurol Neurosurg* 2010b, 112(3):237-243.
- Senft, C. (2010c) "Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells." *J Neurooncol* 101(3): 393-403.
- Senft, C. et al. "The nontoxic natural compound Curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas." *BMC Cancer* 2010: 491.
- Sharma A, Gupta NK, Dixit VK (2010) Complexation with phosphatidyl choline as a strategy for absorption enhancement of boswellic acid. *Drug Deliv* 17:587–595
- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005;41:1955–68.
- Shehzad, A., F. Wahid, et al. "Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials." *Arch Pharm (Weinheim)* 343(9): 489-99.
- Sherry, M. M., A. Reeves, et al. (2009). "STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells." *Stem Cells* 27(10): 2383-92.
- Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK,
- Shoba, G; Joy, D; Joseph, T; Majeed, M; Rajendran, R; Srinivas, P. S. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 1998, 64 (4), 353– 6.
- Showalter, T. N., J. Andrel, et al. (2007). "Multifocal glioblastoma multiforme: prognostic factors and patterns of progression." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69(3): 820-4.
- Shuai K (2000) Modulation of Stat signaling by Stat-interacting proteins. *Oncogene* 19:2638-2644
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* 432(7015): 396-401.
- Smilowitz HM, Weissenberger J, Weis J, Brown JD, O'Neill RJ, Laissue JA. Orthotopic transplantation of v-src-expressing glioma cell lines into immunocompetent mice: establishment of a new transplantable in vivo model for malignant glioma. *J Neurosurg* 2007; 106:652–9.
- Smith J and Jenkins R (2000) Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci* 5:D213-231.
- Song H, Wang R, Wang S, Lin J. A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102 (13):4700–5
- Song, J. I. & Grandis, J. R. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene* 19, 2489–2495 (2000).
- Song, L., Turkson, J., Karras, J. G., Jove, R. & Haura, E. B. Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene* 22, 4150–4165 (2003).
- Srivastava RK, Chen Q, Siddiqui I, Sarva K, Shankar S. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21(/WAF1/CIP1). *Cell Cycle*. 2007;6: 2953–61.
- STAT inflammatory signaling through activation of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain microglia. *J Immunol* 2003;171:6072–9.
- Statistisches Bundesamt, Fachserie 12, Reihe 4, 2009
- Steck PA, Pershouse MA, and Jasser SA (1997) Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15: 356-362

- Stehelin D., Varmus H.E., Bishop J.M., Vogt P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170-173.
- Steinbach JP, Weller M (2004) Apoptosis in gliomas: molecular mechanisms and therapeutic implications. *JNeurooncol* 70:245-254.
- Stover, D. R., M. Becker, et al. (1995). "Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha." *J Biol Chem* 270(26): 15591-7.
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ:
Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* 2005, 352(10):987-996.
- Stupp, R., M. E. Hegi, et al. (2007). "Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions." *J Clin Oncol* 25(26): 4127-36.
- Sun, X., L. Wei, et al. (2010) "CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression." *Mol Cancer* 9: 17.
- Suresh, D; Srinivasan, K. Studies on the in vitro absorption of spice principles—Curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food Chem. Toxicol.* 2007, 45 (8), 1437–42.
- Syng-Ai, C., A. L. Kumari, et al. (2004). "Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2." *Mol Cancer Ther* 3(9): 1101-8.
- Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, et al. 1998. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol.* 161:4652-4660.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (8):3801-3804.
- Takeda, K. et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10, 39–49 (1999).
- Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. 2007. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol* 170:793–804.
- Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., Zhou, A.Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T.T., Gupta, P.B., Evans, K.W., et al. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 15449–15454.
- Taylor KM, Hiscox S, Nicholson RI (2004) Zinc transporter LIV-1: a link between cellular development and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab* 15: 461–463
- Tharakan ST, Inamoto T, Sung B, Aggarwal BB, Kamat AM: Curcumin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in an orthotopic model of human bladder cancer through suppression of proliferative and angiogenic biomarkers. *Biochem Pharmacol* 2010, 79(2):218-228.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142.
- Thomas SM, Grandis JR, Wentzel AL, Gooding WE, Lui VW, Siegfried JM (2005) Gastrin-releasing peptide receptor. *Neoplasia* 7: 426–431
- Tiyaboonchai, W.; Tungpradit, W.; Plianbangchang, P. .Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2007, 337 (1–2), 299–306.
- Tomida, M., T. Heike, et al. (1999). "Cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor required for STAT3 activation, differentiation, and growth arrest of myeloid leukemic cells." *Blood* 93(6): 1934-41.
- Tomita N, Ogihara T, Morishita R. Transcription factors as molecular targets: molecular mechanisms of decoy ODN and their design. *Curr Drug Targets* 2003;4(8):603–8.
- Turkson J, Ryan D, Kim JS, et al. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* 2001;276(48):45443–55.

- Turkson J, Zhang S, Mora LB, et al. A novel platinum compound inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells. *J Biol Chem* 2005;280(38):32979–88.
- Turkson, J. and R. Jove (2000). "STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery." *Oncogene* 19(56): 6613-26.
- Turkson, J., S. Zhang, et al. (2004). "Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity." *Mol Cancer Ther* 3(12): 1533-42.
- Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efrid JT, Deimling A von, and Louis DN (1996) CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56: 150-153.
- Vajdic, C.M., and van Leeuwen, M.T. (2009). Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer* 125, 1747–1754.
- van den Bent, M. J., M. E. Hegi, et al. (2006). "Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours." *Eur J Cancer* 42(5): 582-8.
- van der Geer, P., T. Hunter, et al. (1994). "Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways." *Annu Rev Cell Biol* 10: 251-337.
- van Wagoner NJ, Benveniste EN. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol* 1999;100:124–39.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98–110.
- Verma, A., S. Kambhampati, et al. (2003). "Jak family of kinases in cancer." *Cancer Metastasis Rev* 22(4): 423-34.
- Verma, N. K., J. Dourlat, et al. (2009). "STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells." *J Biol Chem* 284(18): 12349-62.
- Villalva, C., S. Martin-Lannere, et al. (2011) "STAT3 is essential for the maintenance of neurosphere-initiating tumor cells in patients with glioblastomas: a potential for targeted therapy?" *Int J Cancer* 128(4): 826-38.
- Viti, J., A. Feathers, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptors control competence to interpret leukemia inhibitory factor as an astrocyte inducer in developing cortex." *J Neurosci* 23(8): 3385-93.
- Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. 2003. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res* 9:4227–4239.
- Voulgari, A. and A. Pintzas (2009). "Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic." *Biochim Biophys Acta* 1796(2): 75-90.
- Wang D, Veena MS, Stevenson K, Tang C, Ho B, Suh JD, Duarte VM, Faull KF, Mehta K, Srivatsan ES, Wang MB. Liposome-encapsulated curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in xenografts through the inhibition of nuclear factor kappaB by an AKT-independent pathway. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:6228–6236. [PubMed: 18829502]61:1058–1064.
- Wang, H., J. D. Lathia, et al. (2009). "Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth." *Stem Cells* 27(10): 2393-404.
- Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, and Ohgaki H (1996) Over-expression of EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6: 217-223
- Wei, C. C., S. Ball, et al. (2011) "Two small molecule compounds, LLL12 and FLLL32, exhibit potent inhibitory activity on STAT3 in human rhabdomyosarcoma cells." *Int J Oncol* 38(1): 279-85.

- Wei, D. et al. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 22, 319–329 (2003).
- Wei, J., J. Barr, et al. (2010) "Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway." *Mol Cancer Ther* 9(1): 67-78.
- Weinberg, R.A. (1996) How cancer arises. *Scientific American*, 275, 62-70.
- Weissenberger J, Loeffler S, Kappeler A, et al. IL-6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene* 2004;23:3308–16.
- Weissenberger J, Steinbach JP, Malin G, Spada S, Rulicke T, Aguzzi A. Development and malignant progression of astrocytomas in GFAP- v-src transgenic mice. *Oncogene* 1997;14:2005–13.
- Weissenberger, J., M. Priester, et al. "Dietary curcumin attenuates glioma growth in a syngeneic mouse model by inhibition of the JAK1,2/STAT3 signaling pathway." *Clin Cancer Res* 2010(23): 5781-95.
- Weller, M., J. P. Steinbach, et al. (2005). "Temozolomide: a milestone in the pharmacotherapy of brain tumors." *Future Oncol* 1(6): 747-54
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995;82:241 – 50.
- Wen, P. Y. and S. Kesari (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 359: 492-507.
- WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (4th Edition)
- Wick W, Weller M, van den Bent M, Stupp R. Bevacizumab and recurrent malignant gliomas: a European perspective. *J Clin Oncol*. 2009; 1;27:4733-40.
- Wilken, R., M. S. Veena, et al. "Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma." *Mol Cancer* 2011: 12.
- Wohlfart, S., A. S. Khalansky, et al. (2011) "Treatment of glioblastoma with poly(isohexyl cyanoacrylate) nanoparticles." *Int J Pharm*.
- Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, et al. (2003). "Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme." *Acta Neuropathol* 105(6): 586-92.
- Wong, J. C., S. K. Chan, et al. "Absence of MMP2 Expression Correlates with Poor Clinical Outcomes in Rectal Cancer, and Is Distinct from MMP1-Related Outcomes in Colon Cancer." *Clin Cancer Res* 17(12): 4167-76.
- Wu, A., J. Wei, et al. (2010) "Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia." *Neuro Oncol* 12(11): 1113-25.
- Wu, Y. and B. P. Zhou (2010) "TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion." *Br J Cancer* 102(4): 639-44.
- Xie TX et al.: STAT3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 23: 3550–3560, 2004
- Xie, T. X., D. Wei, et al. (2004). "Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis." *Oncogene* 23(20): 3550-60.
- Xu, Q., J. Briggs, et al. (2005). "Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways." *Oncogene* 24(36): 5552-60.
- Yang, A. S. & Lattime, E. C. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. *Cancer Res*. 63, 2150–2157 (2003).
- Yang, F., C. Brown, et al.(2010) "Sorafenib induces growth arrest and apoptosis of human glioblastoma cells through the dephosphorylation of signal transducers and activators of transcription 3." *Mol Cancer Ther* 9(4): 953-62.
- Yang, L., Pang, Y., and Moses, H.L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*. 31, 220–227.
- Yeatman TJ (2004) A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4:470–480
- Yoo, J. Y., W. Wang, et al. (2001). "Synergistic activity of STAT3 and c-Jun at a specific array of DNA elements in the alpha 2-macroglobulin promoter." *J Biol Chem* 276(28): 26421-9.

- Yu H, Pardoll D, Jove R: STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009, 9(11):798-809.
- Yu, H. and R. Jove (2004). "The STATs of cancer--new molecular targets come of age." *Nat Rev Cancer* 4(2): 97-105.
- Yu, H., D. Pardoll, et al. (2009). "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3." *Nat Rev Cancer* 9(11): 798-809.
- Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. „Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment.“ *Nature Rev. Immunol.* 7, 41–51 (2007).
- Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497–5510.
- Yue, P. and J. Turkson (2009). "Targeting STAT3 in cancer: how successful are we?" *Expert Opin Investig Drugs* 18(1): 45-56.
- Zambre AP, Kulkarni VM, Padhye S, Sandur SK, Aggarwal BB. Novel curcumin analogs targeting TNF-induced NFkappaB activation and proliferation in human leukemic KBM-5 cells. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14:7196–7204.
- Zamo, A. et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* 21, 1038–1047 (2002).
- Zhang, M. X., X. Zhao, et al. (2010) "Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 regulates expression of vascular endothelial growth factor in human meningioma differentiation." *J Cancer Res Clin Oncol* 136(7): 981-8.
- Ziegler DS, Kung AL, Kieran MW (2008) Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas. *J Clin Oncol* 26:493-500
- Zucker, S. and J. Cao (2009). "Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors in cancer therapy: ready for prime time?" *Cancer Biol Ther* 8(24): 2371-3.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ac-DEVD-AMC	Acetyl-DEVD-7-amido-methylcoumarin
add	auffüllen auf
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APRE	<i>acute phase response element</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	<i>copy</i> DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
Da	Dalton
DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium / F12</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-DesoxyNukleotid-5'-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia Coli (Dickdarm-Bakterium)
E 6,5	6,5ter Tag des Embryos nach der Empfängnis
ECL	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat
engl.	englisch
et al.	et altera (und andere)
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
g	Gramm
GBM	Glioblastom multiforme
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde(n)
Hif1	hypoxia inducebel factor
k	Kilo-

Kon	Kontrolle
Konz	Konzentration
LB	<i>Luria broth</i>
m	milli
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- diphenyltetrazoliumbromid
n	nano
n=	Stichprobenumfang, Anzahl an unabhängigen Experimenten
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p-	phosphoryliert
P/S	Penicillin/ Streptomycin-Lösung
p=	Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidium Jodid
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	<i>RNA-Interferenz</i>
RNase	Ribonuclease
rpm	<i>round per minute</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SH2-Domäne	Src-Homologie-Domäne
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>silencer RNA</i>
STS	Staurosporin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS/T	TBS mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TMZ	Temozolomid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	Übernacht

V	Volt
wt	Wildtyp-Allel
ZNS	Zentrales Nervensystem
µ	mikro

9.2 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen:

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Weissenberger J*, Priester M*, Bernreuther C, Rakel S, Glatzel M, Seifert V, Kögel D. (2010) "Dietary curcumin attenuates glioma growth in a syngeneic mouse model by inhibition of the JAK1,2/STAT3 signaling pathway." Clin Cancer Res (23): 5781-95.

Senft C, Priester M, Polacin M, Schröder K, Seifert V, Kögel D, Weissenberger J (2010) "Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells." J Neurooncol 101(3): 393-403.

Senft C, Polacin M, Priester M, Seifert V, Kögel D, Weissenberger J (2010) "The nontoxic natural compound Curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas." BMC Cancer: 491.

* = geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge:

Poster:

M. Priester, V. Seifert, D. Kögel, J. Weissenberger

„Curcumin influences Stat3-target genes and inhibits migration and invasion of murine tumor cells“

1. UCT Science Day 2009, Frankfurt am Main

M. Priester, E. Copanaki, V. Seifert, D. Kögel, J. Weissenberger

“Inhibition of STAT3 signaling inhibits glioma cell infiltration and tumour growth”

2. UCT Science Day 2010, Frankfurt am Main

M. Priester, E. Copanaki, V. Seifert, D. Kögel, J. Weissenberger
“Stat3 silencing inhibits glioma cell infiltration and tumour growth”
International Brain Tumor Research Conference 2010, Seeheim-Jugenheim

M. Priester, E. Copanaki, V. Seifert, D. Kögel, J. Weissenberger
Inhibition of Stat3 signaling inhibits glioma cell infiltration and tumour growth
Neurosektionstagung 2010, Frankfurt am Main

M. Priester, E. Copanaki, V. Seifert, D. Kögel, J. Weissenberger
“Targeting Stat3 inhibits tumor growth and infiltration in a syngeneic glioma
mouse-model”
Brain Tumor 2011, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin Berlin

M. Priester, E. Copanaki, V. Seifert, D. Kögel, J. Weissenberger
“Targeting of Stat3 in glioblastoma cells inhibits single-cell infiltration and tumor
growth in immunocompetent mice”
EANO-EORTC 2011, Bukarest, Rumänien

Vortrag :

M. Priester, E. Copanaki, V. Seifert, D. Kögel, J. Weissenberger
STAT3 silencing inhibits glioma cell infiltration and tumour growth
DGNN 2010, Mannheim

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2008 bis Juli 2011 in der Arbeitsgruppe „Experimentellen Neurochirurgie“ der Uniklinik Frankfurt am Main unter Leitung von PD Dr. Donat Kögel angefertigt.

Bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Donat Kögel für die Zweit-Betreuung sowie die Diskussionsbereitschaft und Anregungen bezüglich der Fragestellungen dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt Frau Prof. Anna Starzinski-Powitz für die unkomplizierte Übernahme und Erst-Betreuung dieser Dissertation sowie ihre Hilfe bei der Annahme als Doktorandin für Fachhochschul-Abgänger.

Des Weiteren danke ich Dr. Jakob Weissenberger für die Bereitstellung dieses interessanten Projektes, die direkte Betreuung im Labor und den wissenschaftlichen Austausch.

Weiterer Dank gilt Dr. Katerina Copanaki und Prof. Thomas Deller (Institut für Neuroanatomie, Uniklinikum Frankfurt am Main) für die Bereitstellung der Geräte und des *Know-How's* bei den organotypischen Schnittkulturen, PD Dr. Michael Bette (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Marburg) für die MRT-Aufnahmen, Prof. Bernd Groner (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main) für die Zusammenarbeit am DFG-Projekt „Experimentelle Therapie von Gliomen: Interferenz mit der Expression und der Funktion des Transkriptionsfaktors Stat3 in Kulturzellen und in immunokompetenten, syngenen Mäusen“ und der AG Auburger (Experimentelle Neurologie, Uniklinikum Frankfurt am Main) für die Hilfe und Benutzung am *real-time*-PCR-Gerät.

Daneben danke ich meiner ganzen Arbeitsgruppe herzlich für die fortwährende Unterstützung und die schöne Arbeitsatmosphäre sowie auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Auburger für ein kollegiales bis freundschaftliches Verhältnis.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und natürlich und vorallem meiner Familie, ohne deren finanzielle und emotionale Unterstützung diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Maike Priester

Geboren am 11.05.1984
Frankfurt am Main
deutsch, ledig

Ausbildung

Hochschule

- heute – 01.2008 Promotion am Fachbereich Biowissenschaften der Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin am Uniklinikum Frankfurt am Main, Abteilung Experimentelle Neurochirurgie, Arbeitsgruppe Kögel
Thema: „Die Rolle von STAT3 in Gliomen“
- 12.2007 – 03.2007 Diplomarbeit am Uniklinikum Mainz, HNO-Klinik Molekulare und Zelluläre Onkologie, Arbeitsgruppe Stauber
Thema: „Regulationsmechanismen des intrazellulärer Transports des BMP4-Proteins“

Abschluss: Dipl.-Ing. Biotechnologie (FH)
- 2007 – 2003 Diplomstudiengang Biotechnologie, Fachhochschule Darmstadt

Schule

- 2000 – 2003 Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt-Höchst

Abschluss: Abitur
- 1994 – 2000 Eichendorff-Schule, gymnasialer Zweig, Kelkheim
1990 – 1994 Grundschule Liederbach

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit (einschließlich Abbildungen), die anderen Ursprungs sind in jedem Einzelfall mit Angabe des Urhebers als solche kenntlich gemacht habe.

Frankfurt am Main, den 27.07.2011

Maike Priester