

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. D. Henne-Bruns

Einfluss des Interleukin-4-Rezeptors auf den malignen Phänotyp kultivierter Kolonkarzinomzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von
Sebastian Schmidt
Lauchhammer

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marko Kornmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. hc. Peter Radermacher

Tag der Promotion: 17.10.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
------------------------------------	------------

1	Einleitung.....	1
1.1	Das humane kolorektale Karzinom.....	1
1.2	Zelllinien	3
1.3	Zytokine und ihre Rezeptoren	3
1.4	Interleukin-4.....	3
1.5	Rezeptoren und Signalwege für IL-4	4
1.5.1	Der IL-4-Rezeptor-Komplex.....	4
1.5.2	Signaltransduktion durch den IL-4R	4
1.6	Ziel der Studie	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Material.....	7
2.2	Zellkulturen	9
2.3	Transfektion.....	9
2.4	Western Blot.....	10
2.4.1	Zelllyse	10
2.4.2	Interleukin-4-Rezeptor-Signalkaskade	10
2.4.3	Protein-Assay	11
2.4.4	Western-Blot.....	12
2.5	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	14
2.5.1	RNA-Extraktion.....	14
2.5.2	cDNA-Synthese	15
2.5.3	PCR.....	15
2.6	MTT-Assay	17
2.7	Soft-Agar-Assay	17
2.8	Immunfluoreszenz	18

2.9	Modifizierte Boyden-Kammer – Zellmigrationsassay	19
2.10	Statistische Analyse	19
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Expression von IL-4R α in kultivierten Kolonkarzinomzelllinien	21
3.2	Etablierung von Klonen und Screening der IL-4R α -Expression.....	22
3.3	Basales Zellwachstum mittels MTT-Assay	23
3.4	Einfluss von IL-4R α auf das Aktin-Zytoskelett	24
3.5	Basale Koloniebildungsrate im Soft-Agar-Assay	26
3.6	Zellmigrationsassay – Modifizierte Boyden-Kammer-Untersuchung ...	28
3.7	Aktivierung der IL-4R α -Signalkaskade	30
4	Diskussion	34
5	Zusammenfassung	41
6	Literaturverzeichnis	43

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
1-2, 4-9	HT29-Zellen mit Knockdown von IL4-R α
5-FU	5-Fluoruracil
A	Ampere
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
Akt-1/2/3	v-akt murine thymoma viral oncogene homologue-1/2/3
AP-1	Activator Protein 1
APC	Adenomatous-polyposis-coli
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATF2	Activating Transcriptionfactor 2
BCGF	B-cell-growth-factor
β -GP	Beta-Glycerophosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
Capan-1	Humane Pankreaskarzinomzelllinie
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-Jun	Transkriptionsfaktor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF	Colony stimulating factor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal-regulated-Kinase
Fc	Kristallisierbares Fragment
FKS	Fetales Kälberserum

G	Gauge
G-418	Geneticin
GDP	Guanosindiphosphat
Grb-2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
γc	Gemeinsame γ-Kette
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HCT116	Humane Kolonkarzinomzelllinie
HT29	Humane Kolonkarzinomzelllinie
I4R-Motiv	Insulin-IL-4-Rezeptor-Motiv
Ig	Immunglobulin
IGF-I	Insulin-like-growth-factor-I
IL	Interleukin
IL-13	Interleukin 13
IL-13Rα1	Alpha-1-Kette des Interleukin-13-Rezeptors
IL-4	Interleukin 4
IL-4R	Interleukin-4-Rezeptor
IL-4Rα	Alpha-Kette des Interleukin-4-Rezeptors
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
JAK	Janus-Kinase
JNK	Jun-N-terminal Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	Mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Normalität
N-2, N-7	HT29-Negativkontrollklone
NaCl	Natriumchlorid
NOV	Natriumorthovanadat
p-	Phosphorylierte Aminosäure/Proteinform

p16	Tumorsuppressorgen (Protein 16)
p38	p38-Mitogenaktivierte Proteinkinase
p53	Tumorsuppressorgen (Protein 53)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3	Phosphoinositid-3
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma virus assoziierte GTPase
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
rTaq	Rekombinante DNA-Polymerase Taq
RT-PCR	Reverse-transkriptase PCR
S6	S6 Ribosomal Protein
S6-K	S6-Kinase
SDS	Sodium dodecylsulfate
SEM	Standard error of mean
SF	Natriumfluorid
shRNA	Small hairpin Ribonukleinsäure
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
Sos	Son of Sevenless
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SW480	Humane Kolonkarzinomzelllinie
SW620	Humane Kolonkarzinomzelllinie
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	T-Helferzelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine sothiocyanate

TTBS	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Units
UICC	Union internationale contre le cancer
UV	Ultraviolet
V	Volt
Vol	Volumen
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das humane kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist mit einer Inzidenz von 84 (Männer) und 69 (Frauen) je 100000 Personen jährlich die dritt- (Männer) bzw. zweithäufigste (Frauen) Krebserkrankung. Geschlechterunabhängig stellt es die dritthäufigste Krebstodesursache in Deutschland und die dritthäufigste Krebstodesursache in den USA dar (Robert Koch-Institut, 2017, Siegel et al., 2018).

Histologisch betrachtet finden sich in der großen Mehrzahl der Fälle mit circa 85 % Adenokarzinome (Robert Koch-Institut (Hrsg.), 2013). Etwa zwei Drittel der Tumore befinden sich im Kolon und circa 30 % betreffen das Rektum. Die übrigen Lokalisationen betreffen den rektosigmoidalen Übergang bzw. den Analkanal (Robert Koch-Institut, 2017). Den größten Risikofaktor für das sporadische kolorektale Karzinom, das die große Mehrheit der Fälle ausmacht, stellt das zunehmende Alter dar; 85 % der Fälle treten bei Patienten über 65 Jahren auf (Ballinger und Anggiansah, 2007). Lediglich in 5 % der Fälle liegt eine erbliche Variante des kolorektalen Karzinoms vor (Labianca et al., 2010). Das kolorektale Karzinom wird in der Regel erst in fortgeschrittenen Stadien symptomatisch, sodass Früherkennungsuntersuchungen einen wichtigen Stellenwert einnehmen (Labianca et al., 2010). Zudem sind die zuerst auftretenden Symptome häufig unspezifisch und umfassen am häufigsten abdominalen Schmerz, rektalen Blutabgang sowie Veränderungen des Darmverhaltens (Ballinger und Anggiansah, 2007).

Die chirurgische Resektion stellt die primäre Therapieoption bei potentiell kurativ zu behandelnden Patienten mit Kolonkarzinom dar. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren im lymphknotenpositiven UICC-Stadium III wird zusätzlich eine adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluoruracil und Oxaliplatin durchgeführt (Labianca et al., 2010). Beim Rektumkarzinom im unteren und mittleren Drittel wird ab UICC-Stadium II vor der Operation die neoadjuvante Radiochemotherapie empfohlen (Schmiegel et al., 2017).

In der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms spielt die Adenom-Karzinom-Sequenz eine wichtige Rolle (Vogelstein et al., 1988). Inzwischen wurde eine Reihe von Gendefekten beschrieben, die in dieser Sequenz eine Rolle spielen und

das kolorektale Karzinom ist zu einem guten Modell für das Verständnis der Karzinogenese insgesamt geworden (Labianca et al., 2010). Im Laufe der Karzinogenese kommt es in der Regel zu zunehmender genomischer Instabilität, dem Verlust von Tumorsuppressorgenen und darauffolgend zu zunehmender Dysplasie. In 85 % der sporadischen Kolon- und Rektumkarzinome kommt es zum Verlust des Tumorsuppressorgens APC (Markowitz und Bertagnolli, 2009). Eine Keimbahnmutation von APC führt zur familiären adenomatösen Polyposis (Lynch et al., 2008). Ein weiterer wichtiger Schritt zur Entstehung des kolorektalen Karzinoms ist der Verlust des Tumorsuppressors p53, der in 35-55 % der Fälle vorliegt (Markowitz und Bertagnolli, 2009). Der Verlust von p53 fällt häufig mit dem Übergang vom Adenom zum invasiven Karzinom zusammen (Baker et al., 1990).

Neben den mit den durch die beschriebenen Veränderungen verbundenen Störungen der Wachstumskontrolle sind im kolorektalen Karzinom auch weitere Veränderungen von Wachstumsrezeptoren und ihren Liganden gezeigt worden (Formentini et al., 2012). Auch die Bedeutung des in dieser Studie untersuchten Interleukin-4-Rezeptors (IL-4R) konnte bereits gezeigt werden. Es liegen Studien vor, die einen gegensätzlichen Einfluss von Interleukin-4 (IL-4) auf kolorektale Karzinome zeigen (Lahm et al., 1994, Kanai et al., 2000, Todaro et al., 2007, Todaro et al., 2008).

Ein neuer Denkansatz zur Aufklärung der Pathogenese von Karzinomen ist das Vorhandensein einer Subpopulation von Tumorstammzellen, die Oberflächenmarker wie CD133 exprimieren und etwa 2 % der Zellen eines kolorektalen Karzinoms ausmachen (Todaro et al., 2007). Diese CD133-positiven Zellen zeichnen sich durch autokrine Stimulation mittels IL-4 aus, wodurch sie ihre Apoptose-Resistenz steigern können (Todaro et al., 2007, Todaro et al., 2008).

In der Vergangenheit wurden bereits Fortschritte in der Therapie des kolorektalen Karzinoms erzielt, sodass die 5-Jahresüberlebensraten seit 1975 um 14 % auf 61 % gesteigert werden konnten (Siegel et al., 2014). Im Gegensatz zu den erzielten Fortschritten in frühen Stadien sind metastasierte Kolon- und Rektumkarzinome im UICC-Stadium IV trotz verbesserter Überlebensraten weiterhin nur selten heilbar (Labianca et al., 2010).

1.2 Zelllinien

Bei HT29 handelt es sich um eine Zelllinie eines humanen Adenokarzinoms des Kolons, die 1964 aus einem Primärtumor extrahiert wurde (Fogh und Trempe, 1975). SW480 wurde aus dem Primärtumor eines kolorektalen Adenokarzinoms extrahiert, während SW620 aus einer Lymphknotenmetastase desselben Patienten stammt (Leibovitz et al., 1976). Bei HCT116 handelt es sich ebenfalls um eine Zelllinie aus einem Primärtumor eines Kolonkarzinoms (Brattain et al., 1981).

1.3 Zytokine und ihre Rezeptoren

Zytokine sind eine Familie löslicher Mediatoren, die für die Zell-Zell-Kommunikation eine erhebliche Bedeutung besitzen. Zu den Zytokinen werden Interleukine (IL), Interferone sowie koloniestimulierende Faktoren (CSF) gezählt (Taniguchi, 1995). Die zelluläre Wirkung der Zytokine wird durch Bindung an spezifische Rezeptoren hervorgerufen (Robb, 2007). Die meisten Rezeptoren setzen sich aus mehreren Untereinheiten zusammen, die sich durch Homo- oder Heterodimerisierung verbinden, wobei eine Untereinheit Bestandteil mehrerer Rezeptoren sein kann (Robb, 2007).

1.4 Interleukin-4

Interleukin-4 ist ein Typ-I-Zytokin, das von einer Untergruppe der CD4⁺-T-Zellen, den TH2-Zellen, sowie von basophilen Granulozyten und Mastzellen produziert wird (Nelms et al., 1999). Es besteht aus einer Sequenz von 129 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht, das aufgrund variabler Glykosilierung zwischen 12 und 20 kDa schwankt (Luzina et al., 2012, Yokota et al., 1986). Das Gen für IL-4 liegt auf Chromosom 5q31, wo es zusammen mit den Genen weiterer Zytokine (IL-3, IL-5, IL-13, und CSF-2) einen Cluster bildet (Schmutz et al., 2004).

IL-4 wurde unter dem Namen B-cell-growth-factor (BCGF) erstmals 1981 beschrieben. Es trat eine mit Anti-IgM-Antikörpern synergistische Wirkung als Wachstumsfaktor für B-Zellen auf (Howard et al., 1982). IL-4 teilt sich homologe Sequenzen, Rezeptoren und intrazelluläre Signalkaskaden sowie teilweise funktionelle Effekte auf Zellen mit IL-13 (Kelly-Welch et al., 2005).

1.5 Rezeptoren und Signalwege für IL-4

1.5.1 Der IL-4-Rezeptor-Komplex

Rezeptoren für IL-4 werden von zahlreichen Geweben exprimiert, was die breite Funktion dieses Zytokins widerspiegelt. (Nelms et al., 1999). Der Rezeptor enthält die IL-4R α -Kette mit einem Molekulargewicht von 140 kDa, die IL-4 mit einer hohen Affinität bindet. Der IL-4R α gehört zur Gruppe der Typ-I-Zytokinrezeptoren, die auch als Hämatopoetinrezeptoren bezeichnet werden und sich dadurch auszeichnen, dass die Bindung eines Liganden zur Oligomerisierung des Rezeptors führt (Wang et al., 2009). Eine intrinsische Kinaseaktivität fehlt beim IL-4R (Nelms et al., 1999).

Die Bindung von IL-4 an IL-4R α führt zur Heterodimerisation der Rezeptorkette, wobei sich je nach Partner der IL-4R vom Typ I oder Typ II unterscheiden lässt (Hallett et al., 2012). Bei der Bildung des Typ-I-Rezeptors wird durch IL-4 die Heterodimerisation mit der gamma-common-Kette (γ_c) vermittelt, die zunächst als Bestandteil des IL-2-Rezeptors beschrieben wurde (Russell et al., 1993). Die Heterodimerisation von IL-4R α mit IL-13R α_1 führt zur Bildung des Typ-II-Rezeptors (Ito et al., 2009). Der Typ-II-Rezeptor kann ebenfalls durch die Bindung von IL-13 an IL-13R α_1 und folgender Heterodimerisation mit IL-4R α generiert werden (Wills-Karp und Finkelman, 2008). Der Typ-I-Rezeptor ist hauptsächlich auf hämatopoetischen Zellen zu finden, während der Typ-II-Rezeptor vor allem von nichthämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Murata et al., 1998).

1.5.2 Signaltransduktion durch den IL-4R

Da der IL-4R keine intrinsische Kinaseaktivität besitzt, ist dieser auf der zytoplasmatischen Seite mit Tyrosinkinasen der Janus-Familie (JAK) assoziiert, die durch die Dimerisation des IL-4R aktiviert werden (Nelms et al., 1999, Wang et al., 2009). JAK1 ist mit IL-4R α assoziiert, während JAK3 mit γ_c interagiert (Wang et al., 2009). JAK2 ist mit IL-13R α_1 verbunden, während in einigen Zelllinien auch eine Assoziation mit IL-4R α gezeigt werden konnte (Kelly-Welch et al., 2005, Nelms et al., 1999). Die Aktivierung dieser Kinasen führt zur Tyrosin-Phosphorylierung der IL-4R α -Kette selbst (Smerz-Bertling und Duschl, 1995). Die zytoplasmatische Domäne des IL-4R α enthält dazu konservierte Tyrosinreste, die

für die Aktivierung der folgenden Signalkaskaden entscheidend sind (Nelms et al., 1999). Hierbei sind vor allem die Reste Y575, Y603 und Y631 zu nennen, die für die Signaltransduktion zur Aktivierung einiger durch IL-4 induzierter Gene eine wichtige Rolle spielen (Ryan et al., 1996).

Ein Signalweg der IL-4R-Kaskade ist die Aktivierung von Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS-)1/2. IRS-1 und IRS-2 spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellmetabolismus und agieren als Vermittlerproteine zwischen Tyrosinkinaserezeptoren und intrazellulären Signalproteinen (Giovannone et al., 2000). Die Aktivierung dieses Signalwegs erfolgt über die Phosphorylierung des konservierten Tyrosinrests Y497, der in einer Sequenz liegt, die große Übereinstimmungen mit Sequenzen in den zytoplasmatischen Abschnitten des Insulin- und IGF-I-Rezeptors aufweist und deshalb auch als Insulin-IL-4-Rezeptor-Motiv (I4R) bezeichnet wird (Nelms et al., 1999). Durch das I4R-Motiv kommt es zur Aktivierung von weiteren Signalwegen über IRS-1/2. So wird die p85-Untereinheit der PI3-Kinase und darüber hinaus weitere Effektoren wie Akt und PKC aktiviert (Nelms et al., 1999).

Die Aktivierung des IRS-1/2-Signalwegs durch einige Zytokine ist mit der Aktivierung des Ras/MAPK-Signalwegs assoziiert, wobei eine Aktivierung dieses Signalwegs durch IL-4 nicht regelmäßig beobachtet werden kann (Nelms et al., 1999).

Über das phosphorylierte IRS-1/2 kommt es zur Interaktion mit dem Adapter Grb2, der mit dem Guanin-Nukleotidaustauschprotein Sos verbunden ist (Chardin et al., 1993, Sun et al., 1993). Sos katalysiert den Austausch von GDP mit GTP in Ras und führt somit zur Aktivierung von Ras (Downward, 1996). Es kommt darüber hinaus zu einer positiven Rückkopplung, da die Interaktion von IRS-1/2 mit dem Grb2-Sos-Komplex die Konzentration von Sos und damit die weitere Aktivierung von Ras steigert (Nelms et al., 1999).

Bei den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) handelt es sich um eine Familie von Serin-/Threonin-Kinasen, die zahlreiche Funktionen in intrazellulären Signalkaskaden übernehmen (Pearson et al., 2001). Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs erfolgt über Kinasekaskaden, die die Aktivierung vorgeschalteter Kinasen (MAPKK und MAPKKK) beinhalten (Pearson et al., 2001). Eine MAPKKK ist Raf, die durch Ras-GTP aktiviert wird und eine Kaskade in Gang setzt, die schließlich zur Aktivierung der Extracellular-signal-regulated-Kinasen ERK-1 und ERK-2 führt (Nelms et al., 1999). Die aktiven Formen von ERK regulieren die zel-

luläre Proliferation und Differenzierung sowie Migration (Dhillon et al., 2007). Mutationen dieses Signalwegs kommen in zahlreichen Malignomen vor und sind auch für das kolorektale Karzinom beschrieben (Garnett und Marais, 2004). Bei 45 % der kolorektalen Karzinome liegt eine Mutation von Ras und in 12 % von B-Raf vor (Downward, 2003).

Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von IRS-1 und IRS-2 eine deutliche Rolle für Aggressivität, Progression und Metastasierung spielt (Esposito et al., 2012, Vigneri et al., 2015). Die Überexpression von IRS-2 aktiviert den onkogenen PI3-Kinase-Signalweg, der zur Phosphorylierung von Akt und damit einem Schritt zur Invasivität führt (Day et al., 2013).

1.6 Ziel der Studie

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss des Zytokins Interleukin 4 auf das Wachstum und das Verhalten von kultivierten humanen Kolonkarzinom-Zelllinien zu untersuchen. Für das humane Pankreaskarzinom konnte bereits ein stimulierender Effekt von Interleukin-4 nachgewiesen werden (Prokopchuk et al., 2005). In weiteren Voruntersuchungen in unserem Labor konnte bereits gezeigt werden, dass IL-4 und IL-13 sowie die Expression ihrer Rezeptoren einen Einfluss auf die Entstehung lokaler Metastasen des kolorektalen Karzinoms haben (Formentini et al., 2009). Bisher wurden verschiedene Effekte von IL-4 auf das kolorektale Karzinom beschrieben, wobei ein klarer Trend in Richtung Förderung oder Hemmung des Tumorwachstums nicht zu erkennen ist. (Mager et al., 2016).

Mit dieser Studie sollte daher der Einfluss der IL-4-Rezeptorkaskade auf den malignen Phänotyp weiter untersucht werden. Dazu wurde der Phänotyp von kultivierten humanen Kolonkarzinomzellen, in denen IL-4R α durch stabile Expression einer gegen IL-4R α gerichteten shRNA herunterreguliert wurde, charakterisiert. Zur Analyse des Wachstums der kultivierten Zellen kamen der MTT-Assay sowie der Soft-Agar-Assay zum Einsatz. Die Migrationsfähigkeit wurde in der modifizierten Boyden-Kammer untersucht, während die Immunfluoreszenzfärbung der Analyse der Zellmorphologie diente. Mittels Western Blot wurde die Aktivierung der an der IL-4R-Signalkaskade beteiligten Proteine untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Anti-CD133 antibody (ab19898) von **Abcam plc**; Affinity Script Multi Temperature cDNA Synthesis Kit von **Agilent Technologies**; Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA), Sodiumfluoride von **AppliChem GmbH**; sterile Wattestäbchen von **Applimed SA**; Capan-1 humane Pankreaskarzinomzellen, HCT116 humane kolorektale Karzinomzellen, HT29 humane kolorektale Karzinomzellen, SW480 humane kolorektale Karzinomzellen, SW620 humane kolorektale Karzinomzellen von **AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION**; Sterican Einmal-Injektionskanüle 27G und 24G von **B. Braun Medical AG**; BD Falcon Tube (15 ml und 50 ml), Multiwell 24-well steril, Cell culture dish (10 cm), 1 ml Luer Einwegspritzen, Zellsieb 40 µm von **BD Bioscience**; Vortex Genie 2 von **Bender & Hobein AG**; Fötales Kälberserum (FKS) von **Biochrom AG**; Mini-Protean 3 Cell, Mini Trans-Blot Cell, PowerPac 200, Precision Plus Protein Standards Dual Color von **BioRad**; Biozym Plaque GeneticPure Agarose von **Biozym Scientific**; Neubauer-Zählkammer (0,0025²/0,1 mm) von **Blaubrand**; Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1), SDS ultrapure von **Carl Roth GmbH**; AxioCam ICC 1, ZEN 2012 (blue edition) von **Carl Zeiss AG**; Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Rabbit Antibody #2211S von **Cell Signaling Technology, Inc**; Transwell Membraneinsätze 24-well 8.0, Cell Lifter, Costar Stripette (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) von **Corning Inc**; AEC Substrate-Chromogen, Dako REAL Peroxidase- Blocking Solution von **Dako Denmark A/S**; Pipettenspitzen (verschiedene Größen), Eppendorf Tubes (verschiedene Größen), 8-fach Multipipetten (Volumen: 10 - 100 µl und 30 - 300 µl), Pipetten (Volumen: 0,1 µl – 2,5 µl bis 500 µl – 5000 µl), Centrifuge 5417 R, Thermomixer comfort von **Eppendorf research**; β-Actin Primer, IL-4Rα Primer von **Eurofins MWG Operon**; Ampuwa Spüllösung von **Fresenius Kabi Deutschland GmbH**; ECL Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody, ECL Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase-linked whole antibody, rTaq-DNA-Polymerase von **GE Healthcare**; Brutschrank HERA cell, Sterilarbeitsbank HERA safe, Zentrifuge Laborfuge 400 R von **Heracus Instruments**; Schüttler IKA KS 260 basic von **IKA-Werke**; Pipettierhilfe Pipettboy von **Integra Bioscience**; Entwicklermaschine

ZBE 30-10 Nr.: 038804, Entwicklerkassette BioMax von **Kodak**; Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x (DPBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x (DMEM), Penicillin-Streptomycin, von **Life Technologies**; Human Serum AB (14-490E), SeaKem LE Agarose von **Lonza Group Ltd**; 22x22 mm Deckgläser von **Menzel-Gläser**; Natriumhydrogencarbonat, OmniPur G418 Sulfat, Entellan, von **Merck Millipore**; Feinwaage Mettler AE 50, MP 220 pH-Meter von **Mettler-Toledo GmbH**; PTC 100 Thermal Cycler von **MJ Research Inc**; ImageJ, V1.48v von **National Institute of Health, USA**; Cellometer Auto Counter V 3.3.5.11 von **Nexcelom Bioscience LLC**; Midori Green DNA-Stain von **Nippon Genetics Europe GmbH**; Mikroskop Olympus CK 2, IX81 motorisiertes inverses Mikroskop von **Olympus Corp**; Leibovitz's L15 Medium, McCoy's 5A Medium, Trypsin-EDTA 1x, Bovine Serum Albumin Fraction V pH 7,0 von **PAA the Cell Culture Company**; Coverslips von **Paul Marienfeld GmbH & Co. KG**; Einmal-Zählkammern SD 100, Cellometer Auto T4 von **Peqlab**; SureSilencing shRNA Plasmid for Human IL-4R, RNeasy Mini Kit, RNase freies H₂O, Effectene Transfection Reagent von **Qiagen**; Complete, PVDF Western Blotting Membranes von **Roche GmbH**; p-Akt (1/2/3) (Ser 473-R): sc-7985-R, p-ATF-2 (103C4111): sc-52941, p-c-Jun (KM-1): sc-822, p-ERK (E-4): sc-7383, p-p38 (D-8): sc-7973, p-Stat3 (B-7): sc-8059, IL-4R α (H-4): sc-28361, von **Santa Cruz Biotechnology**; Sterilfilter Filtropur S0.2, TC Plate 6-Well von **Sarstedt AG & Co**; Eosin Y solution (alcoholic, with phloxine), Haematoxylin solution, Gill No 3, Ethanol ($\geq 99,8\%$), DAPI, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), Benzamidine, Aprotinin, Pepstatin A, Phenylmethansulfonylfluoride (PMSF), Leupeptin, Tunicamycin from *Streptomyces* sp., Glycerol 99,0-101,0%, Bromophenolblue, β -Mercaptoethanol, Ammoniumpersulfate (APS), Glycine, Natriumchlorid (NaCl), Tween-20, Methanol, Bisbenzimid (Hoechst 33258), Paraformaldehyde, Skim Milk Powder, Interleukin-4, human (I4269), Interleukin-13, human (I1771), Insulin-like Growth Factor-I human (I3769), Triton X-100, Luminol, p-Coumaric acid, Phalloidin-TRITC, Monoclonal Anti- β -Actin Clone AC-15, Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethane), konzentrierte Essigsäure, Polyvinylalkohol, TEMED, DTT, Sodium Orthovanadate, Xylenes, β -Glycerophosphat, McCoy's 5A Medium (modified) powder (M4892) von **Sigma Aldrich**; SigmaPlot Version 12.0 von **Systat Software Inc**; 100 mM dNTP Set, Tecan Spectra Reader Classic von **Tecan Deutschland GmbH**; BCA Protein Assay Kit, 96-Micro-Well-Platten (steril), 96-Micro-Well-Platten (unsteril), Nunclon Surface (15cm dishes), Gene

Ruler 1 kb DNA Ladder, 6x DNA Loading Dye, Adhäsionsobjektträger Super-Frost® Plus Menzel-Gläser von **Thermo Fisher Scientific Inc**; Medical X-Ray Film CX-BL+ von **Typon Röntgen-Film GmbH**; 24x60 mm Deckgläser, Propan-2-ol, Hydrochloric acid 1 N von **VWR International GmbH**.

2.2 Zellkulturen

Die humanen Kolonkarzinomzelllinien HCT116, HT29, SW480 und SW620 wurden bei 37 °C in einem Inkubator in wassergesättigter Luft mit 5 % CO₂ als Monolayer kultiviert. Als Nährmedium diente McCoy's 5A Medium für HCT116 und HT29, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) für SW480 sowie Leibovitz's L15 Medium für SW620. Den Medien wurden 10 % FKS, 1 % Penicillin-Streptomycin und 1 % L-Glutamin zugesetzt. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde dem Medium 0,6 mg/ml G-418 für HT29 zugesetzt. Diese Konzentration wurde in Vorversuchen bestimmt, mit der Zielvorgabe, dass Wildtypzellen im Durchschnitt nach sieben Tagen abstarben. Für die Zellkulturversuche wurde, wenn nicht anders angegeben, komplettes Medium ohne Zusatz von G-418 verwendet.

2.3 Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden Zellen des Wildtyps (WT) von HT29 in fünf Löcher einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am Tag der Transfektion waren die Zellen zu 60 – 80 % konfluent.

Zur Transfektion wurden vier verschiedene shRNA-Plasmide, die gegen den humanen IL-4R α gerichtet sind, sowie ein Negativ-Kontrollplasmid, welches nur eine unspezifische Sequenz enthält, verwendet. Alle fünf Plasmide enthielten zusätzlich ein Resistenzgen gegen Neomycin, das zur späteren Selektion der Klone diente. Die Transfektion erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers mit dem Effectene-Kit von QIAGEN. Dazu wurden 2 μ g DNA mit den Kit-Reagenzien vermischt und nach der geforderten Inkubationszeit zusammen mit 1 ml komplettem Zellkulturmedium tröpfchenweise auf jeweils einem Loch der Platte verteilt. Nun wurden die Platten für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss mit PBS gewaschen, um verbliebenes Reagenz zu entfernen. Nach dem Waschen erfolgte erneut eine Inkubation über 24 Stunden in komplettem Medium. Die Zellen wurden dann mit Trypsin

von der Platte gelöst und verdünnt auf jeweils vier 10 cm-Platten verteilt, um Kolonien aus einzelnen Zellen zu erhalten. Hier wurden sie mit Selektionsmedium mit Zusatz von 0,6 mg/ml G-418 inkubiert, bis sich nach 2-3 Wochen einzelne Kolonien bildeten. Diese Kolonien wurden jeweils einzeln mit einer Pipettenspitze isoliert und dann getrennt voneinander weiterkultiviert, bis genügend Zellen zur Lyse und zum Screening mittels Western Blot vorhanden waren.

Die Transfektion wurde von Frau C. Dreschler (Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie) durchgeführt.

2.4 Western Blot

2.4.1 Zelllyse

Die Zellen wurden in 10-cm-Schalen bis zu 70-80 prozentiger Konfluenz kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit je 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten auf Eis gestellt und je 500 µl SDS-Lysepuffer hinzugegeben. 1 ml Lysepuffer setzte sich wie folgt zusammen: 100 µl 1,25 M TrisHCl pH 6,6; 90 µl 10 % SDS, 775 µl ddH₂O, 10 µl Aprotinin 0,25 mg/ml, 10 µl Pepstatin A 1 mg/ml, 10 µl Benzamidin 100 mM und 5 µl PMSF 200 mM. Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Zellen mittels eines Cell Scrapers von den Platten geschabt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Das Lysat wurde dann mittels mehrmaligen Aufziehens in eine 1 ml Spritze durch eine 27G-Kanüle homogenisiert und somit die Viskosität herabgesetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis mit nachfolgender Zentrifugation der Zelllysate bei 4 °C und 14000 rpm für fünf Minuten. Die proteinhaltige Zytosolfraktion im Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und entweder zur anschließenden Proteinbestimmung wieder auf Eis gestellt oder alternativ zur Lagerung bei -20 °C eingefroren, wenn der Western Blot nicht am selben Tag durchgeführt wurde. Das Pellet wurde verworfen.

2.4.2 Interleukin-4-Rezeptor-Signalkaskade

Zur Analyse der Expression der an der IL-4R-Signalkaskade beteiligten Proteine wurden zunächst 1×10^6 Zellen in 10 cm-Platten ausgesät. Nach 48 Stunden er-

folgte die Serumreduktion durch Entfernen des Mediums mit 10 % FKS und Zugabe von Medium mit 1,5 % FKS. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit IL-4 und IL-13 sowie IGF-I (Positivkontrolle) stimuliert (je 5 nM in 5 ml serumfreiem Medium). Als Negativkontrolle diente serumfreies Medium. Hierfür wurden HT29-WT sowie die Klone N-2 und 1-2 verwendet.

Nach Behandlung der Zellen erfolgte ein zweimaliges Waschen der Platten mit PBS. Nach vollständiger Entfernung des PBS wurden die Platten in Alufolie verpackt und umgedreht für 24 h bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von jeweils 200 µl Lysepuffer, dessen Zusammensetzung Tabelle 1 entnommen werden kann. Das weitere Vorgehen erfolgte wie im Abschnitt Zelllyse angegeben. Die Lysate wurden anschließend bei -80 °C gelagert und die Proteinkonzentration erst unmittelbar vor dem Laden der Gele bestimmt.

Tabelle 1: Lysepuffer zur Schonung der phosphorylierten Proteine. (DTT: Dithiothreitol, PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid, NOV: Natriumorthovanadat, β -GP: β -Glycerolphosphat, SF: Natriumfluorid)

Lysepuffer	1 ml (Ansatz: 1,5ml 1M TRIS pH 7,4, 1,5 ml 5 M NaCl, 0,5ml Triton 100%, 5ml Glycerol 99%, 41,5ml H ₂ O + 1 Tablette Complete)
DTT 1M	2 µl
PMSF 100 mM	5 µl
NOV 0,1 M	10 µl
β -GP 0,1 M	10 µl
SF 0,5 M	100 µl

2.4.3 Protein-Assay

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mittels BCA Protein Assay Kit bestimmt. Als Standard dienten verdünnte BSA-Lösungen, die wie folgt hergestellt wurden: 0,1 µg/µl: 45 µl ddH₂O + 5 µl BSA (1 mg/ml); 0,3 µg/µl: 35 µl ddH₂O + 15 µl BSA; 0,5 µg/µl: 25 µl ddH₂O + 25 µl BSA; 0,7 µg/µl: 15 µl ddH₂O + 35 µl BSA. Aus je 10 µl Proteinprobe und 70 µl ddH₂O wurden 1:8-Verdünnungen hergestellt, die als Probe für die Proteinbestimmung verwendet wurden. Je Standard und Probe wurden 10 µl in eine 96-Loch-Platte pipettiert, wobei je 3 Löcher pro Standard und Probe verwendet wurden. Die Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 50:1

gemischt und 200 µl zu jeder Probe pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgte die Auswertung mittels eines Plate Readers durch Messung der spektrophotometrischen Absorption bei 562 nm durch die Software Tecan® Magellan3.

2.4.4 Western-Blot

Für den Western Blot wurden die Proteinproben auf eine Konzentration von 1,5 µg/µl in einem Probenvolumen von 200 µl verdünnt. Es wurden 50 µl 5-fach konzentrierter SDS-Ladepuffer (Ansatz: 250 mM TRIS-HCl pH 6,8, 10 % SDS, 0,5 % Bromphenolblau, 50 % Glycerol, 25 % β-Mercaptoethanol) dazu gegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 250 µl ergab und der Puffer in einfacher Konzentration vorlag. Die Proteine wurden für 5 min bei 98 °C denaturiert und die Proben im Anschluss bei Raumtemperatur für 5 min mit 14000 rpm zentrifugiert.

Das 10 % SDS-Gel wurde nach der in Tabelle 2 einsehbaren Rezeptur hergestellt.

Tabelle 2: Rezeptur der SDS-Gele. (APS: Ammoniumpersulfat, H₂O: Wasser, M: molar, SDS: Natrium-dodecylsulfat, TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)

	Trenngel	Sammelgel
1,25 M Tris	4,0 ml (pH 8,8)	1,25 ml (pH 6,6)
30 % Acrylamidstock	5,3 ml	0,75 ml
H ₂ O	6,4 ml	3,0 ml
10 % SDS	300 µl	100 µl
10 % APS	150 µl	30 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Zuerst wurde das untere Trenngel in den Gießstand gegossen und mit 70 % Isopropanol übergossen, um eine gerade Kante zu erhalten. Nach circa 30 Minuten Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das obere Sammelgel hineingegossen sowie ein Kamm mit zehn Taschen hinzugefügt. Nach etwa 30 weiteren Minuten Zeit zur Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Laufpuffer (500 ml 10x Laufpuffer (720 g Glycin + 150 g TRIS + 50 g SDS in 5 l ddH₂O) + 4500 ml ddH₂O) gespült. Anschließend wurde die Trennkammer in die Elektrophoresekammer gestellt und die Taschen des Gels mit jeweils 20 µl der vorbereiteten Proteinproben gefüllt, sodass jede Tasche 30 µg Protein enthielt. Als Standardmarker dienten 7,5 µl des Precision Plus Protein Standard Dual Color von Bio-Rad. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst für 30 Minuten bei 80 V, anschließend für ungefähr 90 Minuten bei 120 V. Zur Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran diente die Mini-Trans-Blot Cell Kammer von

Bio-Rad. Die Membranen wurden auf eine dem Gel angepasste Größe zugeschnitten und vor Beginn des Transfers für eine Minute in 100 % Methanol und für 20 Minuten in 1x Transferpuffer (500 ml 10X Transferpuffer (292,8 g Glycin + 121,1 g TRIS in 2 l ddH₂O) + 4500 ml ddH₂O) inkubiert. Der Transfer der Proteine erfolgte für zwei Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA. Nach dem Transfer wurden die Membranen für 10 Minuten in 1x TTBS (100 ml 10x TBS (48,46 g TRIS + 161,32 g NaCl in 2 l ddH₂O, pH 7,6) + 900 ml ddH₂O + 1 ml Tween-20) gewaschen. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur in 3 % Milchlösung (TTBS + Milchpulver) inkubiert. Antikörper gegen phosphorylierte Proteine wurden stattdessen mit 5 % BSA-Lösung (BSA in TTBS) blockiert. Über Nacht wurden die Membranen im Anschluss bei 4 °C in 50 ml Falcons mit dem Erstantikörper inkubiert. Die Erstantikörper wurden in Milch- bzw. BSA-Lösung verdünnt. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper können Tabelle 4 entnommen werden. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 min in TTBS gewaschen, bevor der in 3 % Milch gelöste Zweitantikörper hinzugefügt wurde. Nach der einstündigen Inkubation mit dem Zweitantikörper bei Raumtemperatur wurden die Membranen erneut dreimal für 10 min mit TTBS gewaschen.

Danach wurden die Membranen für eine Minute in je 10 ml ECL-Reagenz A+B geschwenkt. Dieses Reagenz wurde für jeden Western Blot frisch unmittelbar vor der Verwendung vorbereitet (siehe Tabelle 3). Die Banden zeigten sich nach der Entwicklung der Röntgenfilme von Typon in der Dunkelkammer.

Tabelle 3: Enhanced Chemoluminescence-Entwicklerlösung (ECL). (HCl: Salzsäure, H₂O: Wasser, H₂O₂: Wasserstoffperoxid)

Reagenz A	Reagenz B
1 ml TRIS-HCl pH 8,5	1 ml TRIS-HCl pH 8,5
9 ml ddH ₂ O	9 ml ddH ₂ O
100 µl Luminol	15 µl H ₂ O ₂
44 µl Cumarin	

Wenn notwendig, wurden die Membranen nach folgendem Waschprotokoll gestrippt:

10 min Strippingbuffer → 10 min Strippingbuffer → 10 min PBS → 10 min PBS → 5 min TBST → 5 min TBST → Block für 1 Stunde in 3% Milch

Ansatz Strippingbuffer: Lösung von 15 g Glycin, 1 g SDS und 10 ml Tween-20 in 1 l H₂O und Anpassung des pH-Wertes auf 2,2.

Beim Western Blot der phosphorylierten Proteine wurde auf ein Strippen verzichtet, um einen Verlust der instabilen Proteine zu vermeiden. Stattdessen wurden auf diesen Membranen nur Antikörper gegen Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht verwendet. Der Nachweis gleicher Proteinmengen auf den Membranen erfolgte mit Anti- β -Aktin in 3 % Milch über Nacht bei 4 °C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur. In Tabelle 4 sind die beim Western Blot verwendeten Antikörper dargestellt.

Tabelle 4: Beim Western Blot verwendete Antikörper. (Akt-1/2/3: v-akt murine thymoma viral oncogene homologue-1/2/3, ATF2: Activating Transcriptionfactor 2, ERK: Extracellular-signal-regulated-Kinase, IL-4R α : Alpha-Kette des Interleukin-4-Rezeptors, p38: p38-mitogenaktivierte Proteinkinase, c-Jun: Transkriptionsfaktor, S6: S6 Ribosomal Protein, p-: phosphorylierte Proteinform, kDa: Kilodalton)

1.Antikörper	kDa		2. Antikörper	
IL-4R α (monoklonal, Epitop: humane AS-Sequenz 527-825 des IL-4R α)	140	1:100	Anti-Mouse	1:2500
p-Akt (polyklonal, Epitop: humane AS-Sequenz um p-Serin 473 in Akt1)	60	1:200	Anti-Rabbit	1:2500
p-S6 (polyklonal, Epitop: synthetische AS-Sequenz um p-Serin 235/236 des humanen Proteins)	25	1:1000	Anti-Rabbit	1:5000
p-ERK-1/2 (monoklonal, Epitop: humane AS-Sequenz um p-Tyrosin 204)	42+44	1:200	Anti-Mouse	1:2500
p-p38 (monoklonal, Epitop: humane AS-Sequenz um p-Tyrosin 182)	38	1:100	Anti-Mouse	1:2500
p-c-Jun (monoklonal, Epitop: humane AS-Sequenz um p-Serin 63)	40	1:100	Anti-Mouse	1:2500
p-ATF2 (monoklonal, Epitop: humane AS-Sequenz um p-Threonin 71)	70	1:200	Anti-Mouse	1:2500
β -Aktin (monoklonal, Epitop: synthetische, leicht modifizierte Nterminale-AS-Sequenz)	42	1:5000	Anti-Mouse	1:5000

2.5 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.5.1 RNA-Extraktion

Die Zellen wurden in 10-cm-Schalen bis zu 80-prozentiger Konfluenz kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Zellsuspension wurde mit Medium versetzt, um die

Trypsinwirkung zu stoppen, in ein 2 ml-Röhrchen gegeben und bei 300-facher Erdbeschleunigung (g) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen und erneut für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes erfolgte die weitere RNA-Extraktion mit dem RNeasy MiniKit von QIAGEN nach dem entsprechenden Protokoll des Herstellers.

2.5.2 cDNA-Synthese

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde photometrisch gemessen. 4 µg der RNA wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 14,7 µl verdünnt. Nach Zugabe von 1 µl Oligo(dT)-Primer wurden die Proben für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur für 10 Minuten abgekühlt. Im Anschluss wurden die folgenden Komponenten dazu pipettiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe ergab.

- + 2,0 µl 10× AffinityScript RT Buffer
- + 0,8 µl dNTP-Mix (25 mM pro dNTP)
- + 0,5 µl RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)
- + 1 µl AffinityScript Multiple Temperature RT

Die Proben wurden im Thermocycler für 5 min auf 42 °C erhitzt, danach für 60 min auf 55 °C und schließlich zum Beenden der Reaktion für 15 min auf 70 °C erhitzt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert und mittels PCR amplifiziert.

2.5.3 PCR

Die Quantifizierung der mRNA eines spezifischen Gens erfolgte mittels PCR der zuvor synthetisierten cDNA. Dabei wurde folgender Ansatz verwendet.

- + 1 µl cDNA
- + 13,8 µl RNase-freies Wasser
- + 2,5 µl 10x PicoMaxx PCR Buffer
- + 2,5 µl dNTP-Mix (2,5 mM)
- + 2,5 µl Primer upstream (100pmol/l) 1:100
- + 2,5 µl Primer downstream (100pmol/l) 1:100
- + 0,2 µl PicoMaxx DNA-Polymerase

Die verwendeten Primer hatten folgende Sequenz (5' – 3'):

IL-4R α (upstream): AAATCGTGAACCTTTGTCTCCGT

IL-4R α (downstream): CCCAGTGCCCTCTACTCTCAT

β -Actin (upstream): GGCATCCTCACCTGAAGTA

β -Actin (downstream): GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT

Somit ergab sich insgesamt ein Ansatz von 25 μ l. Für den IL-4R α erfolgte die Durchführung der PCR im Thermocycler nach folgendem Programm:

5 min	95 °C	} 25x
1 min	95 °C	
1 min	59 °C	
1 min	72 °C	
10 min	72 °C	

Als Ladekontrolle diente die PCR von β -Aktin. Hierfür wurde folgendes Programm verwendet:

5 min	95 °C	} 30x
40 s	95 °C	
40 s	62 °C	
30 s	72 °C	
7 min	72 °C	

Zur Auftrennung der DNA wurde ein einprozentiges Elektrophoresegel verwendet. Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Sea Kem LE Agarose in 150 ml TBE-Puffer (242 g TRIS, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA) in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Anschließend wurden 1,5 μ l Midori Green hinzugegeben und das Gel zum Aushärten bei Raumtemperatur in eine Form gegossen. Nach Zugabe von 5 μ l 6x DNA Loading Buffer zu 25 μ l Probe wurden 20 μ l dieses Ansatzes in die Geltaschen pipettiert und für 45 min bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker dienten 10 μ l des Gene Ruler 1 kb. Anschließend wurden die Gele unter UV-Durchleuchtung fotografiert.

2.6 MTT-Assay

Für das basale Wachstum wurden für HT29 10000 Zellen pro Loch in einer sterilen 96-Loch-Platte in 200 µl komplettem Medium ausgesät. Nach 48 Stunden Wachstum im Inkubator wurden 25 µl einer fünfprozentigen Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid-Lösung (MTT-Lösung) in jedes Loch pipettiert. Zur Herstellung der MTT-Lösung wurde das Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid in sterilem einfachen PBS gelöst und steril filtriert. Nach weiteren vier Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Medium abgesaugt, ohne dabei Zellen zu entfernen. Zur Lösung der Farbkristalle von der Platte wurde in jedes Loch 100 µl saures Isopropanol (180 ml Isopropanol + 20 ml HCl 1N) gegeben und für 15 Minuten in Dunkelheit geschüttelt. Schließlich erfolgte die spektrophotometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm in einem Plattenleser mithilfe der Software Tecan Magellan 3.

2.7 Soft-Agar-Assay

Zunächst wurde das Medium hergestellt. Da das Medium mit der Agarlösung verdünnt werden musste, wurde ein zehnfacher Medium-Ansatz erstellt. Hierzu wurden 11,9 g McCoy's 5A Medium-Pulver in 90 ml H₂O aufgelöst und anschließend steril filtriert.

Zur Herstellung der Agarlösungen (0,9 % für die Basisschicht, 0,35 % für die obere Schicht) wurden 0,9 g bzw. 0,35 g Agar in 80 ml H₂O gegeben und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung des Agars erhitzt. Der Agar wurde anschließend im Wasserbad bei 37 °C bis zur Weiterverwendung gelagert. Nach der Abkühlung auf 37 °C wurde dem Agar 10 ml FKS, 9 ml des vorbereiteten zehnfach Mediums sowie 1 ml Penicillin-Streptomycin zugegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 100 ml ergab.

Für die Basisschicht wurden jeweils 2,5 ml der 0,9 % Agarlösung in jedes Loch einer 6-Loch-Platte pipettiert und anschließend bei Raumtemperatur bis zur Aushärtung gelagert. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der Zellen. Diese wurden nach Waschen mit PBS trypsinisiert und nach Überführung in Suspension und Bestimmung der Zellzahl zur 0,35 % Agarlösung gegeben. Dabei wurde das Volumen der Zellsuspension so gewählt, dass sich eine Zellzahl von 10000 Zellen

pro 2,5 ml ergab. Nach Aushärten der Basisschicht wurden in jedes Loch der 6-Loch-Platte 2,5 ml der Agar-Zellsuspension vorsichtig aufgetropft, ohne die Basisschicht zu beschädigen. Nach Aushärtung der oberen Schicht bei Raumtemperatur wurden die Platten im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für 21 Tage inkubiert. Nach 21 Tagen wurden pro Loch sechs Fotos an zufällig ausgewählten Stellen in jeweils zwei verschiedenen Ebenen mit vierfacher Vergrößerung aufgenommen. Anschließend wurden pro Loch 500 µl MTT-Lösung auf den Agar pipettiert und die Platten nach vier Stunden eingescannt.

2.8 Immunfluoreszenz

Für HT29-WT sowie die bei der Transfektion gewonnenen Klone N-2, N-7, 1-2 und 4-9 wurden je 100000 Zellen in einem Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät, nachdem in jedes Loch je ein Cover Slip eingelegt worden war. Am darauffolgenden Tag wurden die Cover Slips nach erfolgter Zelladhärenz entnommen und in einen Träger gestellt. Hierbei und bei allen folgenden Schritten wurde stets darauf geachtet, dass die Zellen zu derselben Seite orientiert waren. Zunächst wurden die Zellen auf dem Träger in einer Kammer in 50 ml 4 % PFA-Lösung (8 g Paraformaldehyd in 200 ml PBS, pH 7,2-7,4) für 20 Minuten bei 4 °C fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen für zehn Minuten mit 50 ml 0,3 % Triton (300 µl Triton-X-100 in 100 ml PBS) bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach erneutem Waschen für fünf Minuten in PBS wurden die Cover Slips mit den Zellen nach oben in einer lichtgeschützten Kammer ausgelegt. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden auf jeden Cover Slip 50 µl 2 % BSA (400 mg BSA in 20 ml PBS) gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf dem Träger erneut mit PBS gewaschen. Zur Färbung des Aktin-Zytoskeletts erfolgte die Inkubation mit 50 µl Phalloidin-TRITC 1:500 in 2 % BSA bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut mit 50 ml PBS für zehn Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellkerne mit je 50 µl DAPI 1:1000 in 2 % BSA für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Färbung wurden die Zellen erneut gewaschen, zunächst dreimal für jeweils zehn Minuten in PBS, dann für zehn Minuten in ddH₂O. Während der Waschschrte wurde das Mounting Medium (5 g Polyvinylalkohol, 90 ml PBS, 10 ml Glycin) auf 70 °C erhitzt, um es zu verflüssigen. Die Cover Slips wurden

dann mit je 5 µl Mounting Medium mit den Zellen nach unten auf einem Glas-Objektträger eingebettet. Die Aushärtung erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur für mehrere Stunden oder über Nacht. Anschließend wurden die Objektträger dauerhaft bei 4 °C gelagert.

Zur Auswertung wurden die Zellen mit Laser-Belichtung fluoreszenzmikroskopisch fotografiert, als Übersichtsaufnahme bei 40-facher Vergrößerung sowie im Detail bei 60 x 1,6-facher Vergrößerung. Die Auswertung erfolgte gemeinsam mit Prof. Dr. U. Knippschild (Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie).

2.9 Modifizierte Boyden-Kammer – Zellmigrationsassay

Grundlage des Versuches waren Polykarbonat-Membraneinsätze mit 8 µm Porengröße in 24-Loch-Platten. Die Membranen wurden für mindestens zwei Stunden mit Medium entsprechend dem späteren Versuchsansatz hydriert. Anschließend wurden 100000 Zellen auf die Oberseite jeder Membran in 100 µl Medium mit 1 % FKS ausgesät. In die 24-Loch-Platte wurden je Loch 600 µl Medium mit 10 % FKS pipettiert und der Membraneinsatz eingebracht. FKS diente so als Chemogradient. Nach 48 Stunden wurde das Medium auf der Oberseite abgesaugt und mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen auf der Membran erfolgte mit 3,5-4 % neutral gepuffertem Formalin für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nun wurden die Zellen auf der Membranoberseite durch zweimaliges Abwischen mit einem Wattestäbchen und Spülen mit PBS entfernt. Zur Fluoreszenzfärbung der verbliebenen Zellen auf der Unterseite wurden die Membranen für fünf Minuten mit Bisbenzimid (Hoechst 33258) 2 mg/ml 1:500 inkubiert. Nun wurden die Membranen aus den Einsätzen herausgeschnitten und auf einen Objektträger gebracht. Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden von jeder Membran sechs Fotos an zufälligen Stellen bei einer zehnfachen Vergrößerung aufgenommen und die migrierten Zellen mittels ImageJ 1.48v ausgezählt.

2.10 Statistische Analyse

Die dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwerte mit jeweiligem SEM (Standard error of mean) angegeben. Zur orientierenden statistischen Testung wurde bei normalverteilten Ergebnissen der zweiseitige Student's t-Test und bei nicht nor-

malverteilten Ergebnissen der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe von SigmaPlot 12.0.

3 Ergebnisse

Als Grundlage der Arbeit diente die Bestätigung der Expression von IL-4R α in vier etablierten Zelllinien des humanen Kolonkarzinoms, deren biologische Funktionalität in Vorversuchen in unserem Labor bereits bestätigt wurde. Für die Zelllinie HT29 wurden anschließend Klone mit reduzierter Expression von IL-4R α selektiert, an denen der Einfluss der IL-4-IL-4-Rezeptor-Signalachse auf den malignen Phänotyp dieser Zellen untersucht wurde. Die Selektion erfolgte durch stabile Expression einer IL-4R α -shRNA in Geneticin (G-418).

3.1 Expression von IL-4R α in kultivierten Kolonkarzinomzelllinien

Zur Bestätigung und Erweiterung der bisher in unserem Labor durchgeführten Arbeiten wurden die Wildtyp-Zellen der vier Zelllinien HCT116, HT29, SW480 und SW620 vor der Transfektion des IL-4R α -shRNA-Plasmids auf ihre IL-4R α -Expression untersucht. Dazu wurden Lysate der vier Zelllinien mittels Western Blot aufgetrennt und anschließend durch spezifische Antikörper IL-4R α in der zu erwartenden Größe (140 kDa) nachgewiesen. Es zeigte sich hier für HT29 die höchste Expression des IL-4R α (siehe Abbildung 1), sodass diese Zelllinie für die weiteren Versuche verwendet wurde. Eine zweite Bande bei 90 kDa zeigte sich erst bei längerer Belichtungsdauer des Röntgenfilms.

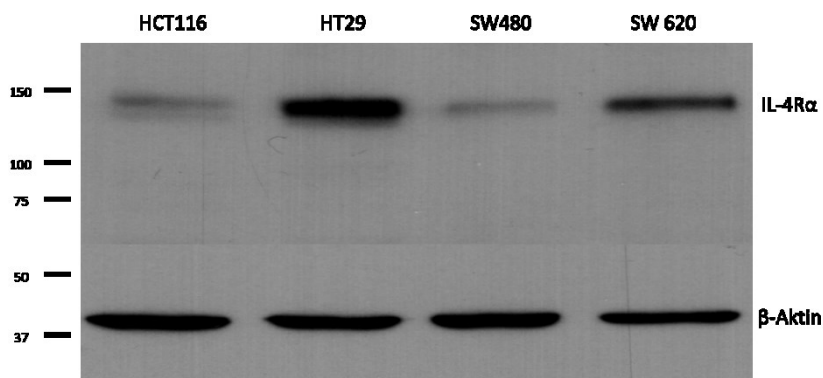


Abbildung 1: Immunoblot-Analyse mit Anti-human IL-4R α -Antikörper (1:100). Die Analyse zeigt ein Signal bei ca. 140 kDa. Der Rezeptor ist in allen Zelllinien nachweisbar, zeigt jedoch deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke. Für IL-4R α konnte bei längerer Expositionsdauer eine zweite, schwächere Bande bei ca. 90 kDa nachgewiesen werden. β -Aktin diente als Ladungskontrolle. (IL-4R α : Alpha-Kette des Interleukin-4-Rezeptors, kDa: Kilodalton).

3.2 Etablierung von Klonen und Screening der IL-4R α -Expression

Insgesamt wurden 45 HT29-Klone auf ihre Interleukin-4-Rezeptor-Expression untersucht. Mittels Western Blot konnte zwischen Klonen mit erfolgreicher Herunterregulation von IL-4R α und Klonen, die nur das Neomycin-Resistenzgen in ihr Genom integrierten und so in G-418-haltigem Medium (0,6 mg/ml) wachsen konnten, unterschieden werden. Weiterhin wurde die Stärke der erfolgten Herunterregulation bewertet. Dabei fanden sich lediglich fünf Klone mit einer herabgesetzten IL-4R α -Expression. Für die weiteren Versuche wurden die beiden Klone mit der niedrigsten IL-4R α -Expression, 1-2 und 4-9, verwendet. Beim Klon 1-2 gelang sogar ein beinahe kompletter Knockout des IL-4R α . Als Negativkontrolle wurden die beiden Neomycin-transfizierten Klone N-2 und N-7 gewählt, die im Vergleich zum HT29-WT keinen Unterschied in der Rezeptorexpression zeigten. Die Ergebnisse des Screenings der beschriebenen Klone sind in Abbildung 2A dargestellt.

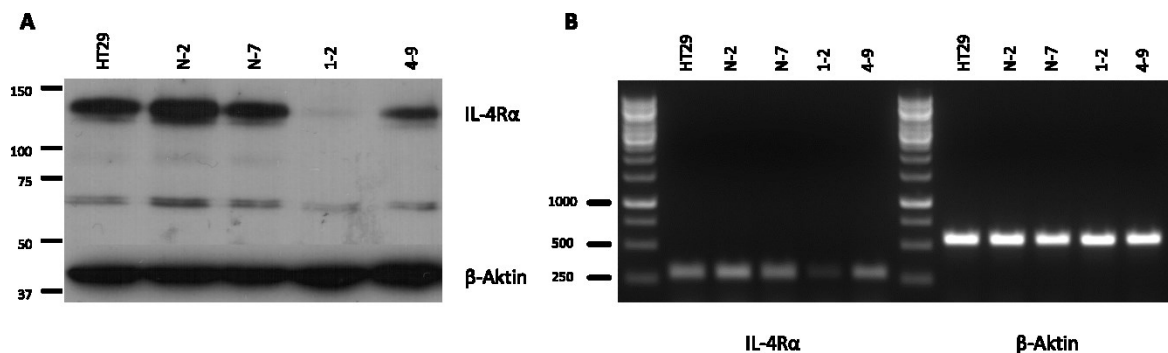


Abbildung 2: Expression von IL-4R α -Protein (**A**) und -mRNA (**B**) in HT29-WT und transfizierten Zellklonen N-2, N-7, 1-2 und 4-9. Marker in Kilodalton (**A**) bzw. Basenpaaren (**B**). (IL-4R α :Alpha-Kette des Interleukin-4-Rezeptors, WT: HT29-Wildtypzellen, N-2, N-7: Kontrollklone, 1-2, 4-9: Klone mit herunterreguliertem IL-4R α).

Zusätzlich zum Screening auf Proteinebene mittels Western Blot wurde für die vier ausgewählten Klone N-2, N-7, 1-2 und 4-9 eine RT-PCR durchgeführt, um Veränderungen der IL-4R α -Expression auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Dabei zeigte sich für den Klon 1-2 ebenfalls eine verminderte IL-4R α -Expression. Für den Klon 4-9 konnte keine Reduktion auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der PCR sind in Abbildung 2B dargestellt.

3.3 Basales Zellwachstum mittels MTT-Assay

Um den Einfluss des IL-4R α -Spiegels auf das basale Zellwachstum zu untersuchen, wurde die relative Zellzahl von HT29-WT, N-2, N-7, 1-2 und 4-9 nach 48 Stunden Inkubation unter Zellkulturbedingungen durch Einsatz von MTT bestimmt. Die Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen sind in Abbildung 3 dargestellt. Beide IL-4R α -Knockdown-Klone zeigten dabei ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp von HT29. Die beiden Kontrollklone N-2 und N-7 wiesen im Vergleich zu WT mit 94,5 % bzw. 95,1 % ein leicht vermindertes Wachstum auf. Das Wachstum von N-2 war im Vergleich zu WT signifikant reduziert ($p=0,02$), während sich der Unterschied bei N-7 als nicht signifikant herausstellte.

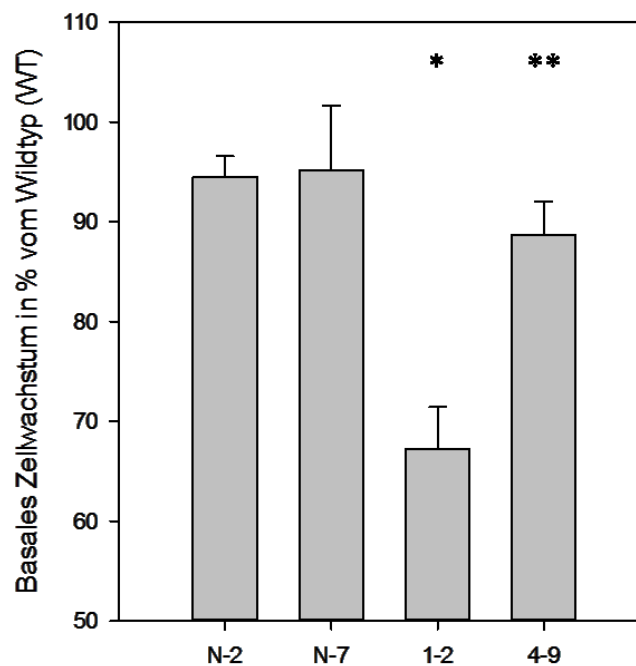


Abbildung 3: Basales Zellwachstum (MTT) von N-2, N-7, 1-2 und 4-9 über 48 h in Relation zu HT29-WT. Wachstum von HT29-WT ist als 100 % auf der y-Achse definiert. Klon 1-2 zeigt ein signifikant reduziertes Zellwachstum (* mit $p<0,05$) im Vergleich zu den Kontrollklonen sowie WT. Klon 4-9 zeigt lediglich ein signifikant reduziertes Wachstum (** mit $p<0,05$) im Vergleich zu WT. Pro Zelllinie wurden in jedem Versuch 4×10^4 Zellen ausgesät und das Wachstum nach 48 Stunden bestimmt. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ($\pm$ SEM) vierer unabhängiger Versuche mit je vier Messpunkten. (WT: HT29-Wildtypzellen, N-2, N-7: Kontrollklone, 1-2, 4-9: Klone mit herunterreguliertem IL-4R α).

Im Vergleich der Knockdown-Klone mit den Kontrollklonen konnte nur für den Klon 1-2 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Das Wachstum von Klon 1-2 war mit $67,2 \pm 4,2$ % SEM um 27,3 % gegenüber N-2 ($p=0,001$) sowie um 27,9 % gegenüber N-7 ($p=0,007$) verringert. Der Klon 4-9 wuchs mit $88,7 \pm 3,3$ % SEM des Wachstums von WT-Zellen im Vergleich zu diesen signifikant weniger ($p=0,009$). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen 4-9 und N-2 ($p=0,21$) sowie zwischen 4-9 und N-7 ($p=0,38$) festgestellt werden.

3.4 Einfluss von IL-4R α auf das Aktin-Zytoskelett

Zur Darstellung des Aktin-Zytoskeletts wurden HT29-WT, N-2, N-7, 1-2 und 4-9 mit Phalloidin angefärbt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 gezeigt.

Zellen von HT29-WT stellten sich in der Färbung mit Phalloidin-TRITC als kleine ovale Zellen mit großem Zellkern und wenig Zytoplasma dar, die in Konglomeraten von mehreren Zellen wachsen. Die Aktin-Filamente liegen in einem ungeordneten Netz. Dies entspricht dem Bild einer volltransformierten, malignen Zelle.

Erwartungsgemäß stellten sich Zellen der Kontrollklone N-2 und N-7 in der Immunfluoreszenz ebenso dar. Auch in den Klonen mit herabgesetzter IL-4R α -Expression (1-2 und 4-9) konnte kein Unterschied der Morphologie im Vergleich zu WT-Zellen und somit auch keine Korrelate einer verringerten Malignität gezeigt werden.

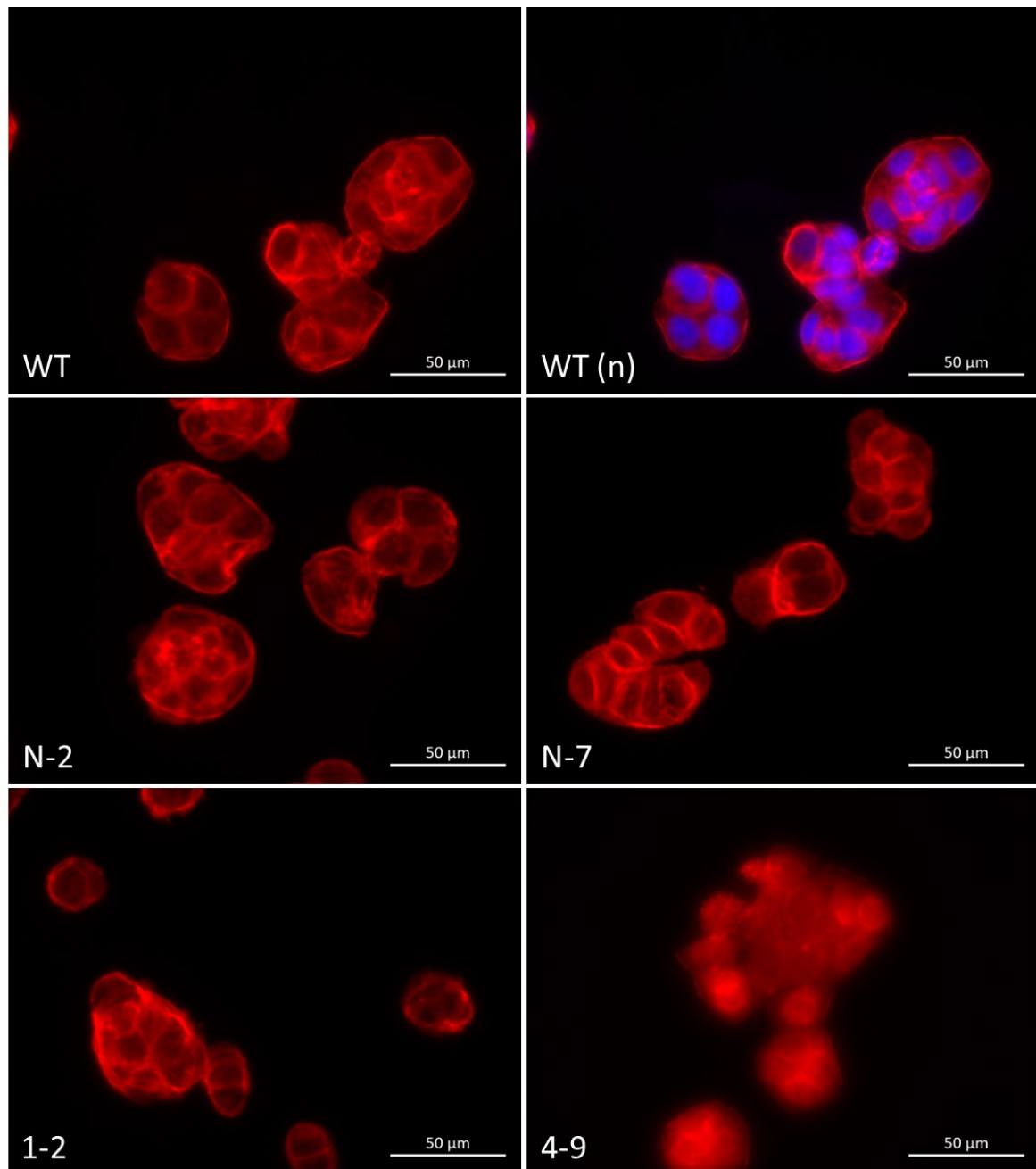


Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung der Aktin-Filamente mit Phalloidin. Die Präparate wurden mit einer Vergrößerung von 40x aufgenommen, der Maßstab entspricht 50 µm. Exemplarisch ist für WT zusätzlich eine zusätzliche Kernfärbung mit DAPI dargestellt (WT (n)). Die Herunterregulation von IL-4R α führte dabei zu keiner ersichtlichen Veränderung der morphologischen Malignitätskriterien im Vergleich zu WT und den Kontrollklonen N-2 und N-7. Jeweils 100000 Zellen wurden in einem Loch einer 6-Loch-Platte auf einem Cover-Slip kultiviert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte die Färbung der Aktin-Filamente mit Phalloidin-TRITC 1:500. (WT: HT29-Wildtypzellen, N-2, N-7: Kontrollklone, 1-2, 4-9: Klone mit herunterreguliertem IL-4R α).

3.5 Basale Koloniebildungsrate im Soft-Agar-Assay

Der Soft-Agar-Assay ermöglicht im Vergleich zum adhärenenten Wachstum eine Einschätzung der Fähigkeit zur Tumorinitiierung von Zelllinien sowie eine realistischere Wachstumsbeurteilung durch ein dem menschlichen Körper ähnlicheres Milieu mit dreidimensionalem Wachstum. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche sind in Abbildung 5A dargestellt. Kolonien von WT-Zellen erreichten im Mittel eine Größe von $145,4 \pm 1,5 \mu\text{m}$ SEM. Hiervon unterschieden sich Kolonien des Kontrollklons N-2 mit durchschnittlich $142,3 \pm 1,4 \mu\text{m}$ SEM nicht wesentlich. Im Vergleich zu WT und N-2 wiesen Kolonien von 1-2 mit $87,1 \pm 0,8 \mu\text{m}$ SEM (jeweils $p < 0,001$ vs. WT und N-2) und 4-9 mit $105,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ SEM ($p < 0,001$) ein signifikant reduziertes Wachstum sowohl im Vergleich zu WT als auch im Vergleich zu N-2 auf. Für die mittlere Koloniegröße repräsentative Bilder sind in Abbildung 6 dargestellt.

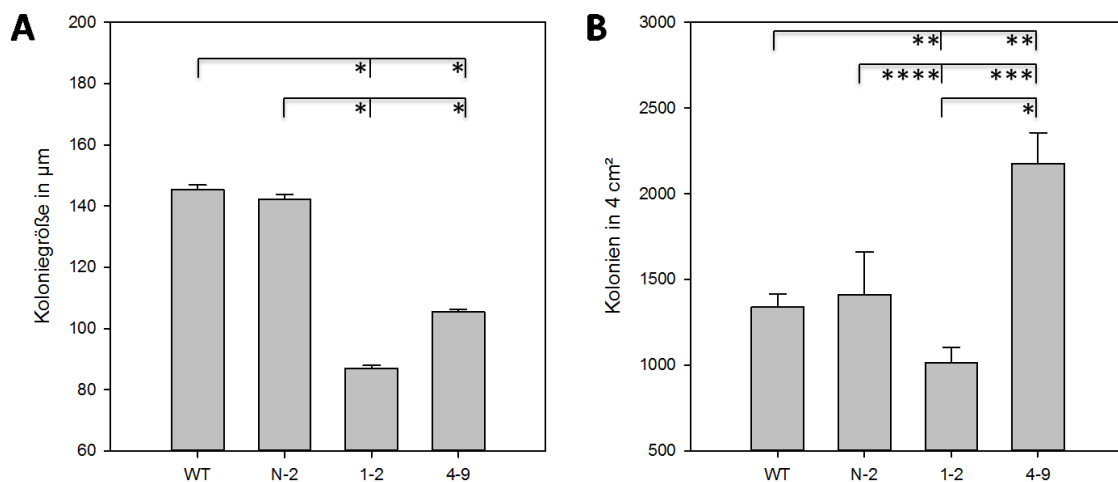


Abbildung 5A: Koloniegröße im Soft-Agar-Assay. Die Klone 1-2 und 4-9 bildeten im Vergleich zu WT und N-2 signifikant kleinere Kolonien (* mit $p < 0,001$). Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert dreier unabhängiger Versuche mit je 2 Messpunkten ($\pm$ SEM).

Abbildung 5B: Koloniezahl im Soft-Agar-Assay. Kolonien der Klone 1-2 und 4-9 zeigten ein unterschiedliches Koloniebildungsverhalten (* mit $p < 0,001$). 1-2 bildete weniger Kolonien als WT und N-2 (** mit $p < 0,02$ und **** ohne signifikanten Unterschied). 4-9 hingegen bildete mehr Kolonien im Vergleich zu den Kontrollen (** mit $p < 0,02$ und *** mit $p < 0,05$).

Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert dreier unabhängiger Versuche mit je 2 Messpunkten ($\pm$ SEM)

(WT: HT29-Wildtypzellen, N-2: Kontrollklon, 1-2, 4-9: Klone mit herunterreguliertem IL-4R α).

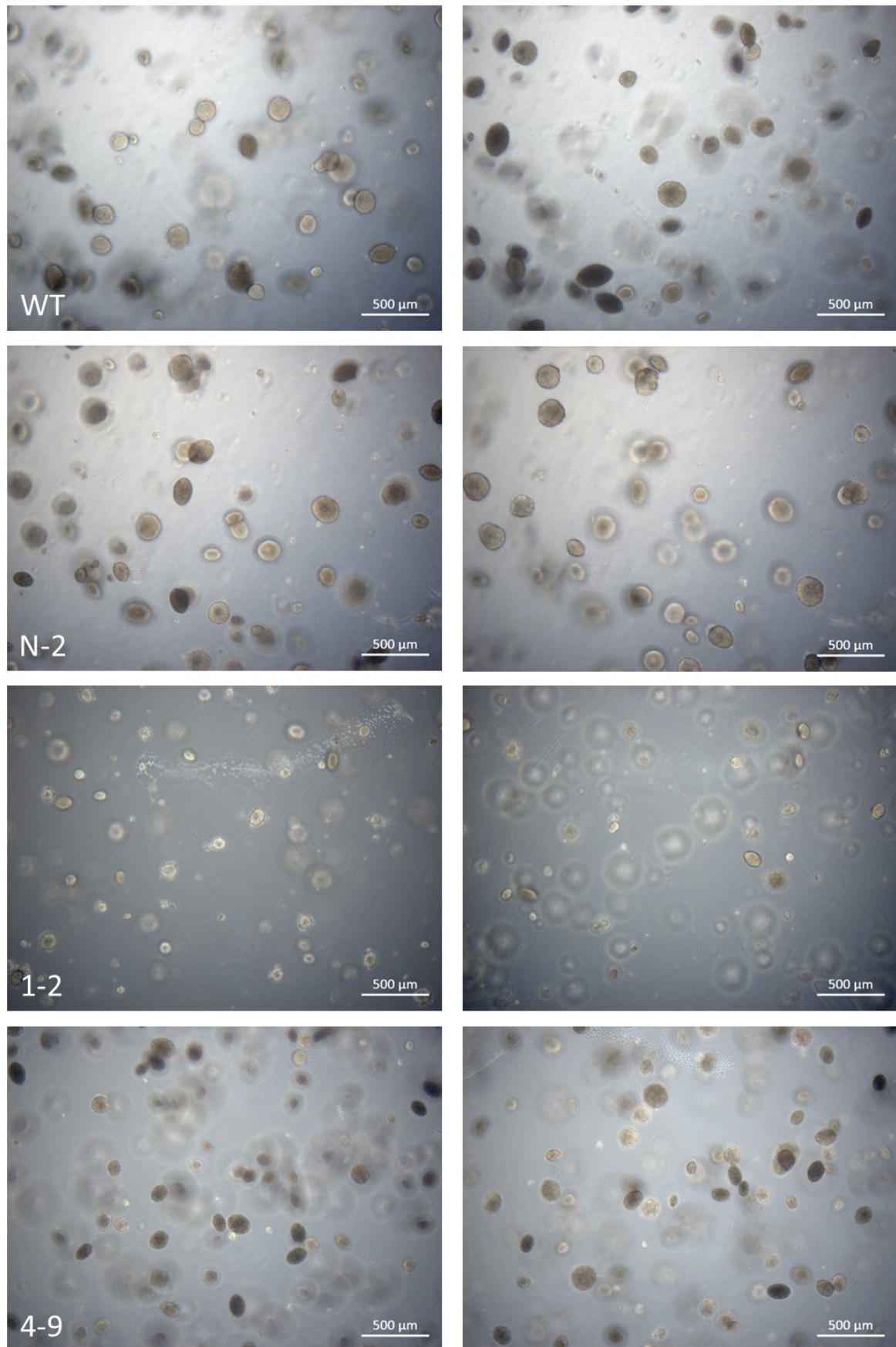


Abbildung 6: Beispielbilder des Soft-Agar-Assays mit 4-facher Vergrößerung. Die mittleren Koloniegrößen der gezeigten Bilder kommen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen am nächsten. Maßstab mit 500 µm (WT: HT29-Wildtypzellen, N-2: Kontrollklon, 1-2, 4-9: Klone mit herunterreguliertem IL-4Rα).

Neben der Koloniegröße wurde auch die Gesamtzahl der gebildeten Kolonien in einer Fläche von 4 cm² bestimmt. Im Mittel bildeten Zellen von WT 1340,3±75,0 SEM Kolonien und Zellen von N-2 1411,5±250,9 SEM Kolonien. Der Klon 1-2 zeigte mit 1015,33±89,2 SEM Kolonien eine verringerte Koloniebildungsrate ($p=0,019$ vs. WT und $p=0,24$ vs. N-2), während 4-9 mit 2176,3±179,6 SEM Kolonien vermehrt Kolonien bildete ($p=0,002$ vs. WT und $p=0,033$ vs. N-2). Der Unterschied zwischen N-2 und 1-2 war somit nicht signifikant. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen 1-2 und 4-9 ($p<0,001$). In Abbildung 7 sind repräsentative Bilder dargestellt und Abbildung 5B zeigt die statistische Auswertung dieser Ergebnisse.

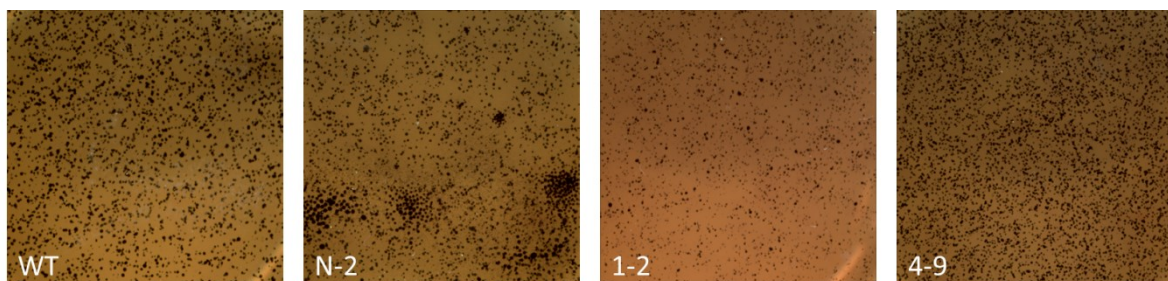


Abbildung 7: Übersicht der Koloniebildung im Soft Agar. Die Kolonien wurden nach 21 Tagen mit MTT-Lösung angefärbt und anschließend eingescannt. Die Abbildungen zeigen Ausschnitte von 4 cm² Größe, in denen die jeweilige Koloniezahl bestimmt wurde. Die gezeigten Beispiele kommen dem Mittelwert der jeweiligen Zelllinie am nächsten. Jeweils 10000 Zellen von WT, N-2, 1-2 und 4-9 wurden je Loch einer 6-Loch-Platte in den Weichagar ausgesät. Es wurden 3 unabhängige Versuche mit je 2 Löchern pro Zelllinie durchgeführt (WT: HT29-Wildtypzellen, N-2: Kontrollklon, 1-2, 4-9: Klone mit herunterreguliertem IL-4R α).

3.6 Zellmigrationsassay – Modifizierte Boyden-Kammer-Untersuchung

Zur Messung der Migrationsfähigkeit der transfizierten Zellklone wurde die modifizierte Boyden-Kammer-Untersuchung verwendet. Nach 48 Stunden Inkubation migrierten im Mittel pro Bildausschnitt 11,39±0,74 SEM Zellen von WT, 7,39±0,78 SEM Zellen von N-2, 11,94±0,78 SEM Zellen von N-7, 4,97±0,42 SEM Zellen von 1-2 und 6,03±0,82 SEM Zellen von 4-9. In Abbildung 8 ist die statistische Auswertung dreier unabhängiger Versuche dargestellt und in Abbildung 9 sind repräsentative Bilder dargestellt.

Während sich Zellen von WT und N-7 in ihrem Migrationsverhalten nicht signifikant unterschieden, migrierten Zellen von N-2 signifikant weniger als Zellen von WT bzw. N-7 ($p < 0,001$). Der Klon 1-2 wies mit jeweils $p < 0,001$ ein signifikant verringertes Migrationsverhalten im Vergleich zu WT (-56,3 %) und N-7 (-58,3 %) auf, sowie im Vergleich zu N-2 (-32,7 %) mit $p = 0,023$. Auch der Klon 4-9 migrierte im Vergleich zu WT (-47,1 % mit $p < 0,001$) und N-7 (-49,5 % mit $p < 0,001$) signifikant weniger, während der Unterschied zu N-2 (-18,4 % mit $p = 0,12$) ebenfalls nicht signifikant war.

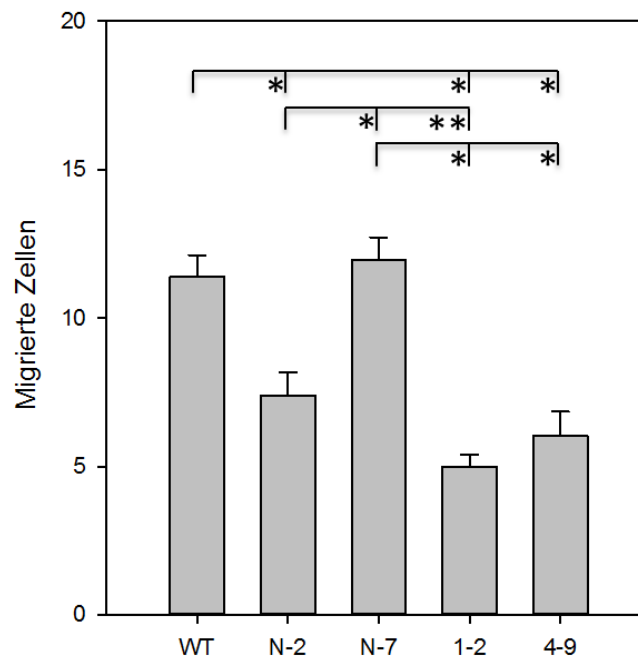


Abbildung 8: Zellmigration im modifizierten Boyden-Kammer-Assay. Es zeigt sich ein Trend zu einer reduzierten Migrationsfähigkeit der Klone mit reduzierter IL-4R α -Expression. Die Klone 1-2 und 4-9 migrierten signifikant weniger als WT und die Kontrollklone (* mit $p < 0,001$, ** mit $p < 0,025$). Der Unterschied zwischen N-2 und 4-9 war nicht signifikant ($p = 0,12$), während N-2 signifikant weniger als WT und N-7 migrierte (* mit $p < 0,001$). Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert dreier unabhängiger Versuche mit je zwei Messpunkten (WT: HT29-Wildtypzellen, N-2, N-7: Kontrollklone, 1-2, 4-9: Klone mit herunterreguliertem IL-4R α).

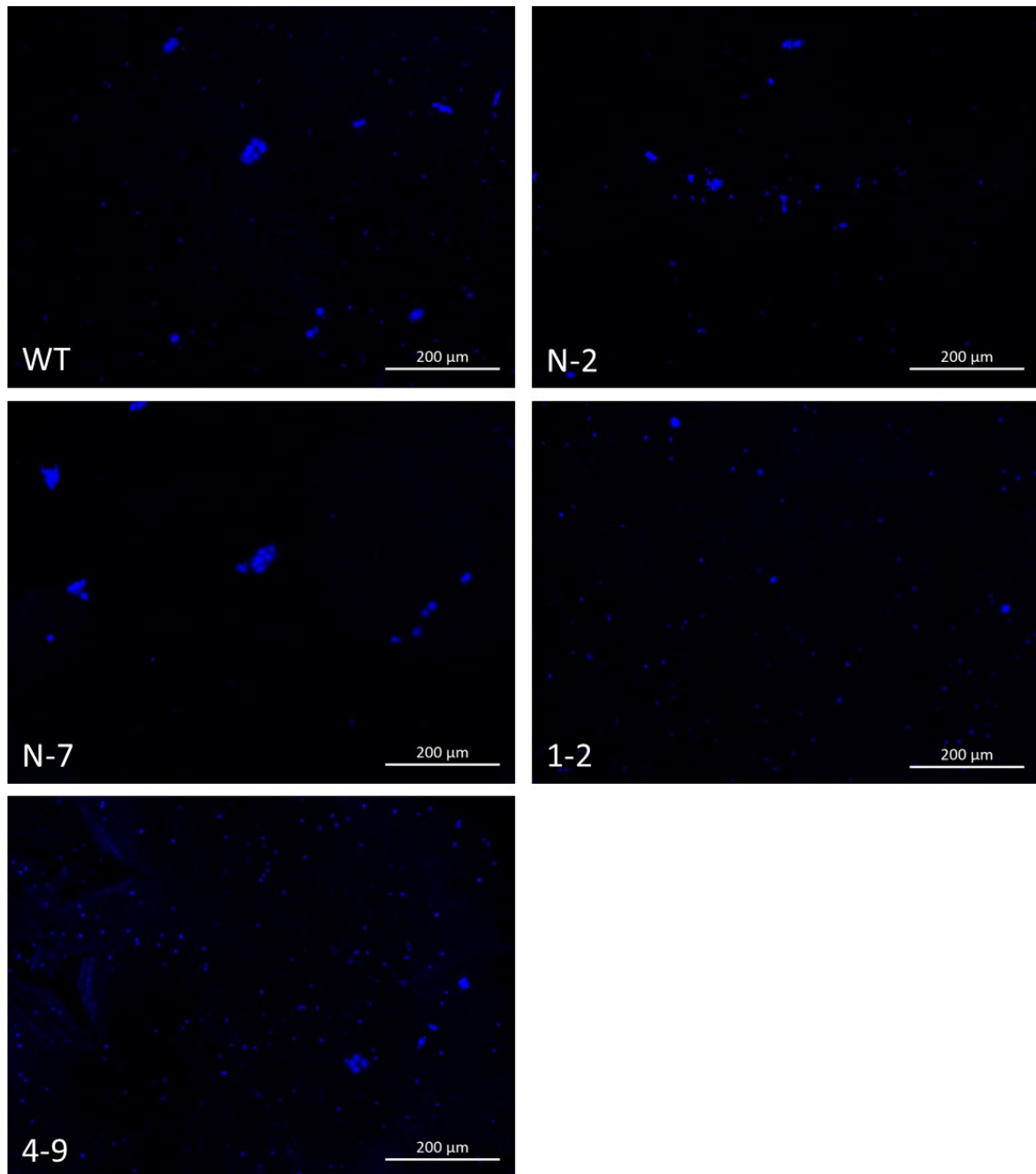


Abbildung 9: Beispielfotos des Zellmigrationsassays. Gezeigt sind Bilder, deren Zellzahl dem Mittelwert des jeweiligen Klons am nächsten kam. Pro Zelllinie wurden 100000 Zellen in Medium mit 1% FKS auf einer porösen Membran mit 8 µm Porendurchmesser ausgesät. 10 % FKS in komplettem Zellkulturmedium unter der Membran diente als Chemoattraktant. Nach der Inkubation über 36 Stunden bei Zellkulturbedingungen erfolgte die Fixierung und Färbung. Zur Auswertung wurden pro Membran 6 Fotos bei einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen (WT: HT29-Wildtypzellen, N-2: Kontrollklon, 1-2, 4-9: Klone mit herunterreguliertem IL-4R α).

3.7 Aktivierung der IL-4R α -Signalkaskade

Zur Analyse der durch IL-4 und IL-13 stimulierten Signalwege und des Effektes des IL-4R α -Knockdowns auf die Zellen wurden WT-, N-2- und 1-2-Zellen mit IL-4 und IL-13 stimuliert. Als Positivkontrolle diente IGF-I, während serumfreies Medi-

um als Negativkontrolle diente. Zum Nachweis der Stimulation wurde die Phosphorylierung relevanter Proteine mittels Western Blot untersucht.

In WT-Zellen konnte nach Stimulation sowohl für IL-4 als auch für IL-13 eine erhöhte Phosphorylierung aller untersuchten Proteine mit einer Ausnahme nachgewiesen werden. Diese Ausnahme bildete der Transkriptionsfaktor ATF2, für den sowohl für IL-4 als auch für IL-13 eine Inhibition der Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Die Positivkontrolle mit IGF-I verhielt sich gleichsinnig zu den beiden Zytokinen und führte bei ATF2 zur Inhibition der Phosphorylierung, während die Phosphorylierung aller anderen untersuchten Proteine stimuliert wurde.

Für p-STAT3 konnte weder in HT29-WT noch in einem der Klone ein Signal nachgewiesen werden. Die Signalintensitäten nach Auswertung mit ImageJ 1.48v sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Proteinphosphorylierung in HT29-WT-Zellen nach Stimulation mit IL-4, IL-13 und IGF-I (jeweils 5 nM) im Vergleich zu unbehandelter Kontrolle. Die Bandenintensität der Kontrolle wurde als 100 % definiert. (IL-4, IL-13: Interleukin-4/-13, IGF-I: Insulin-like-growth-factor-I, Akt-1/2/3: v-akt murine thymoma viral oncogene homologue-1/2/3, ATF2: Activating Transcriptionfactor 2, ERK-1/2: Extracellular-signal-regulated-Kinase-1/2, STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3, S6: S6 Ribosomal Protein, p-: phosphorylierte Proteinform).

	p-Akt-1/2/3	p-ATF2	p-c-Jun	p-ERK-1/2	p-p38	p-S6
IL-4	102%	10%	180%	394%	110%	111%
IL-13	116%	24%	259%	1329%	119%	120%
IGF-I	154%	37%	211%	1289%	132%	122%

Neben der Wirkung der Stimulation auf WT-Zellen wurde die Phosphorylierung von Signalproteinen durch Stimulation mit IL-4 und IL-13 im IL-4R α - Knockdown-Klon 1-2 im Vergleich mit dem Kontrollklon N-2 untersucht. Um eine direkte Vergleichbarkeit der Lysate von N-2 und 1-2 zu erzielen, wurden diese stets nebeneinander auf dieselbe Membran geblottet.

In vier der sechs untersuchten Proteine konnte eine Reduktion der Phosphorylierung in Zellen von 1-2 nach Stimulation mit IL-4 gezeigt werden. Am deutlichsten fiel die Reduktion für ATF2 mit 16 % des Ausgangswerts aus. Für ERK-1/2 und S6 zeigten sich im Klon mit Herunterregulation von IL-4R α hingegen verstärkte Intensitäten der phosphorylierten Formen. Dies war bei p-ERK-1/2 mit 572 % vom Kontrollklon am deutlichsten. Für IL-13 zeigten sich im Vergleich zu IL-4 gleichsinnige Tendenzen der Aktivierung bzw. Inhibition der Proteinphosphorylierung, jedoch mit

teilweise deutlichen Intensitätsunterschieden. So zeigte sich bei p-ERK-1/2 eine vermehrte Phosphorylierung mit 210 % im Vergleich zu N-2.

Für IGF-I, das eigentlich als Positivkontrolle dienen sollte, zeigten sich teils deutliche Unterschiede in der Proteinphosphorylierung im Vergleich zu IL-4 und IL-13. So wurde für ATF2 eine Verstärkung der Aktivierung in 1-2 nachgewiesen, während IL-4 und IL-13 in 1-2 eine ausgeprägte Inhibition zeigten. Für p-Akt-1/2/3 und p-S6 zeigten sich bei IGF-I nur geringe Unterschiede zur Negativkontrolle, während IL-4 und IL-13 mit einer deutlichen Aktivierung bzw. Inhibition der Phosphorylierung assoziiert waren. Die Signalintensitäten nach Auswertung mit ImageJ 1.48v sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Proteinphosphorylierung in Klon 1-2 mit Herunterregulation von IL-4R α im Vergleich zu Kontrollklon N-2 nach Stimulation mit IL-4, IL-13 und IGF-I. Die Bandenintensität von N-2 wurde als 100 % definiert und die entsprechende Bande von 1-2 hierzu ins Verhältnis gesetzt. Zur Vergleichbarkeit wurden die Lysate von N-2 und 1-2 stets nebeneinander auf dieselbe Membran geblottet (IL-4, IL-13: Interleukin-4/-13, IGF-I: Insulin-like-growth-factor-I, Akt-1/2/3: v-akt murine thymoma viral on-cogene homologue-1/2/3, ATF2: Activating Transcriptionfactor 2, ERK-1/2: Extracellular-signal-regulated-Kinase-1/2, STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3, S6: S6 Ribosomal Protein, p-: phosphorylierte Proteinform).

	p-Akt-1/2/3	p-ATF2	p-c-Jun	p-ERK-1/2	p-p38	p-S6
IL-4	82%	16%	97%	572%	71%	174%
IL-13	83%	14%	47%	210%	86%	131%
IGF-I	109%	219%	34%	170%	83%	107%

Abbildung 10 zeigt die Western Blots der phosphorylierten Proteine. Links sind die WT-Lysate und rechts die Lysate der Klone N-2 und 1-2 dargestellt. Zusätzlich dargestellt ist jeweils eine repräsentative Abbildung von β -Aktin, das zur Kontrolle gleicher Proteinmenge auf den Membranen diente.

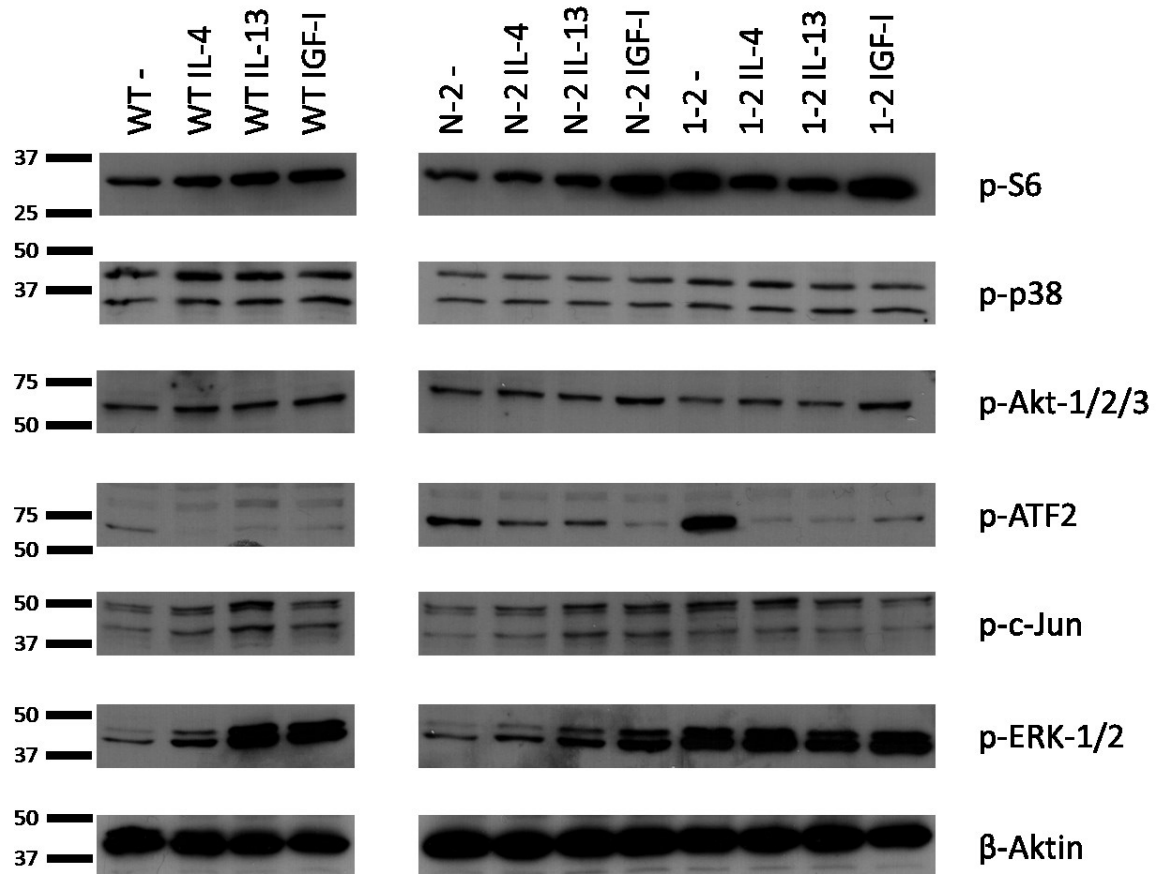


Abbildung 10: Proteinphosphorylierung durch IL-4, IL-13 und IGF-I. Gezeigt sind links die Effekte der Zytokine auf HT29 WT-Zellen im Vergleich zu unbehandelten und IGF-I-stimulierten Zellen. Rechts ist der Vergleich der Aktivierung der Signalwege nach Stimulation von Zellen von N-2 und 1-2 gezeigt.

HT29-WT, N-2 und 1-2 wurden jeweils in gleicher Zellzahl ausgesät und nach erfolgter Adhärenz für 24 h in Medium mit 1,5 % FKS konditioniert. Die Stimulation erfolgte mit IL-4, IL-13 und IGF-I, jeweils 5 nM für 5 Minuten. Eine Platte wurde als Negativkontrolle belassen. Nach schonender Lyse wurden jeweils 3 Membranen mit WT-Zelllysaten und 3 Membranen mit Lysaten von N-2 und 1-2 geblotet. Durch das Blotten auf einer Membran wurden Lysate von N-2 und 1-2 direkt vergleichbar. Die entwickelten Filme wurden eingescannt und die Signalintensität der Banden mittels ImageJ 1.48v gemessen. Alle Membranen wurden ebenfalls mit einem β-Aktin-Antikörper inkubiert. Da kein Unterschied festzustellen war, ist hier nur jeweils ein Blot für WT und transfizierte Zellen repräsentativ dargestellt (WT: HT29-Wildtypzellen, N-2: Kontrollklon, 1-2: Klon mit herunterreguliertem IL-4Rα, IL-4, IL-13: Interleukin-4/-13, IGF-I: Insulin-like-growth-factor-I, Akt-1/2/3: v-akt murine thymoma viral oncogene homologue-1/2/3, ATF2: Activating Transcriptionfactor 2, ERK-1/2: Extracellular-signal-regulated-Kinase-1/2, S6: S6 Ribosomal Protein, p-: phosphorylierte Proteinform).

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des Interleukin-4-Rezeptors für das humane Kolonkarzinom weiter charakterisiert werden. Dazu wurden die Auswirkungen der Suppression des IL-4R α auf den malignen Phänotyp der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht. Dies erfolgte, indem Klone etabliert wurden, in denen mittels einer shRNA-Transfektion die Expression des IL-4R α auf Proteinebene deutlich reduziert wurde. Im Screening mittels Western Blot und PCR wurden die Klone mit der höchsten Suppression selektiert. Die Untersuchung des Einflusses auf die Zellproliferation erfolgte als adhärenzabhängiges Wachstum mittels MTT-Assay und als adhärenzunabhängiges Wachstum mittels Soft-Agar-Assay.

Die Färbung des Zytoskeletts mit Phalloidin diente der Analyse morphologischer Unterschiede der transfizierten Zellen und zur Abschätzung einer Veränderung des Malignitätsgrads. Zur Untersuchung der Zellbeweglichkeit wurde die modifizierte Boyden-Kammer als gerichteter Migrationsassay verwendet.

Durch Stimulation mit IL-4, IL-13 und IGF-I und anschließender Analyse mittels Western Blot konnten die Auswirkungen des IL-4R α -Knockdowns auch auf subzellulärer Ebene der assoziierten Signalproteine beobachtet werden.

Expression von IL-4R α in kultivierten Kolonkarzinomzellen

Die Expression von IL-4R α wurde zunächst in vier verschiedenen Zelllinien getestet. Alle getesteten Zelllinien wurden aus Adenokarzinomen des Kolons gewonnen. Bei SW480, HCT116 und HT29 handelt es sich um Zellen aus Primärtumoren, während SW620 aus einer Lymphknotenmetastase gewonnen wurde (Fogh und Trempe, 1975, Brattain et al., 1981, Leibovitz et al., 1976). Der IL-4R α konnte in allen untersuchten Zelllinien mit der erwarteten Bande bei 140 kDa nachgewiesen werden, wobei sich die Expressionsstärke jedoch deutlich unterschied. HT29 zeigte die höchste Expression, gefolgt von SW620. In HCT116 und SW480 ließen sich nur sehr schwache Banden nachweisen.

Ein klarer Unterschied in der Rezeptorexpression zwischen Zelllinien aus Primärtumor und Lymphknotenmetastasen scheint nicht vorzuliegen. Bei der geringen Probenzahl (n=4) und nur einer Zelllinie aus einer Lymphknotenmetastase ist dies jedoch nicht abschließend zu bewerten. Weiterhin handelt es sich bei SW620 um

eine Lymphknotenmetastase desselben Patienten, aus dem SW480 gewonnen wurde (Leibovitz et al., 1976). Außerdem konnten Formentini et al. zeigen, dass eine erhöhte Expression von IL-4R α mit einer geringeren Rate an Lymphknotenmetastasen einhergeht (Formentini et al., 2012). Im Gegensatz dazu konnte in einer früheren Studie keine Korrelation zwischen der Expression von IL-4R α und der Häufigkeit von Lymphknotenmetastasen gezeigt werden (Kaklamanis et al., 1992).

Während für den Einfluss von IL-4 auf die Bildung von Lymphknotenmetastasen unterschiedliche Ergebnisse vorliegen, konnten Kantola et al. nachweisen, dass bei Patienten mit Fernmetastasen (M1) höhere Serumspiegel von IL-4 im Vergleich mit Patienten ohne Fernmetastasen (M0) vorliegen (Kantola et al., 2012). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass kolorektale Karzinome bei IL-4-defizienten Mäusen sowie bei Mäusen mit ausgeschaltetem IL-4R α durch Azoxymethan geringer induzierbar sind (Osawa et al., 2006, Koller et al., 2010). Hierfür scheint besonders IL-4 durch Aktivierung von IL-4R α verantwortlich zu sein, da dieser Effekt in IL-13-defizienten Mäusen deutlich auftrat. IL-13 aktiviert ebenfalls den IL-4R α , sodass bei Abstinenz von IL-13 eine Rezeptoraktivierung nur durch IL-4 stattfindet (Ingram et al., 2013).

Mittels eines gegen den humanen IL-4R α gerichteten shRNA-Plasmids wurden in dieser Arbeit HT29-WT-Zellen stabil transfiziert und Klone mit herabgesetzter IL-4R α -Expression etabliert. Als Nachweis einer geglückten Transfektion diente das Wachstum in Selektionsmedium mit Zusatz von G-418, da das verwendete Plasmid auch eine G-418-Resistenz enthielt. Von den insgesamt 45 Klonen mit geglückter Transfektion zeigte sich bei 5 Klonen eine herabgesetzte Expression von IL-4R α . Die beiden Klone mit der höchsten Herunterregulation, 1-2 und 4-9, wurden für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Bei 1-2 gelang eine subtotale Reduktion der Expression. Als Kontrollen dienten die mit einem unspezifischen Plasmid und G-418-Resistenz transfizierten Klone N-2 und N-7.

Für die fünf gewählten Zelllinien (HT29-WT, N-2, N-7, 1-2 und 4-9) wurde eine RT-PCR zum Nachweis einer möglichen mRNA-Degradation durchgeführt. Die mRNA-Degradation konnte für 1-2 nahezu vollständig gezeigt werden. Interessant ist, dass sich in vorherigen Versuchen in unserem Labor bei Transfektion der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 mit dem gleichen Ansatz und der gleichen sh-RNA keine mRNA-Degradation erzielt werden konnte (Traub, 2017). Als

Ursache hierfür kommt in Frage, dass shRNA und mRNA nicht vollständig kompatibel sind, wodurch nur die Translation blockiert wird (Maier, 2014). Für die Variabilität der mRNA-Degradation spricht, dass diese bei 4-9 nicht gelang und die gleiche sh-RNA wie für 1-2 verwendet wurde. Da die IL-4R α -Expression auf Proteinebene bei 4-9 weniger stark inhibiert war, besteht möglicherweise ein Zusammenhang mit dem fehlenden Nachweis einer mRNA-Degradation, da die PCR nur eine Teilsequenz des IL-4R α detektiert (Traub, 2017). Dies lässt sich jedoch aufgrund der kleinen Stichprobe in dieser Studie nicht bewerten.

Einfluss von Interleukin-4 auf das basale Wachstum und den malignen Phänotyp

Als bereits etablierte Methode zur Quantifizierung des basalen, adhärenzabhängigen Wachstums wurde der MTT-Assay verwendet (Heo et al., 1990). In diesem Versuchsansatz führte die reduzierte Expression von IL-4R α zu einem signifikant reduzierten Wachstum der Klone 1-2 und 4-9 gegenüber WT-Zellen. Gegenüber den Kontrollklonen zeigte sich nur teilweise reduziertes Wachstum. Dies bestätigt bisherige Ergebnisse, in denen gezeigt wurde, dass exogenes IL-4 die Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen stimuliert (Koller et al., 2010). Im Gegensatz dazu konnten unter Stimulation mit IL-4 auch bereits wachstumshemmende Effekte auf HT29 gezeigt werden (Toi et al., 1992).

Beim Soft-Agar-Assay handelt es sich um eine *in-vitro* Methode zur Messung des dreidimensionalen, Adhärenz-unabhängigen Wachstums kultivierter Zelllinien. Dieses stellt im Vergleich zum Adhärenz-abhängigen Wachstum ein besseres Modell für die *in-vivo* Verhältnisse dar (Mizushima et al., 2009).

Hier konnte nach Wachstum über 21 Tage ein signifikant reduziertes Wachstum der Klone 1-2 und 4-9 im Sinne einer reduzierten Koloniegröße beobachtet werden. Die relative Reduktion war hier deutlicher ausgeprägt als in den Vorergebnissen des MTT.

Zur morphologischen Abschätzung des malignen Phänotyps wurde eine Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit Phalloidin durchgeführt. Hier konnten zwischen den Klonen 1-2 und 4-9 sowie den Kontrollen WT und N-2 keine Unterschiede beobachtet werden. Alle untersuchten Zelllinien zeigten ein nur schwach ausgeprägtes, unstrukturiertes Netzwerk der Aktin-Filamente. Dies ist ein für maligne Zellen typischer Befund (Hirner et al., 2012).

Im Soft-Agar-Assay wurde ebenfalls die Koloniebildungsrate zur Bestimmung des malignen Phänotyps untersucht. Hier zeigte sich, dass 1-2 eine deutlich herabgesetzte Koloniebildungsrate aufwies und im Gegensatz dazu 4-9 deutlich mehr Kolonien als die Kontrollen bildete. Dies scheint im Zusammenhang mit dem im MTT nur leicht herabgesetzten Wachstum zu stehen. Als Ursache für die gesteigerte Koloniebildungsrate unter IL-4R α -Herunterregulation kommen unterschiedliche parakrine Effekte im MTT- und Soft-Agar-Assay infrage. Durch die im Soft Agar zunächst einzeln liegenden Zellen kommt es zunächst zu keiner parakrinen Stimulation, während im MTT Wachstumsfaktoren über das Kulturmedium ausgetauscht werden können (Traub, 2017).

Der Klon 1-2 wies eine gleichsam stark reduzierte Koloniebildungsrate und Koloniegroße auf. Möglicherweise liegen hier Zusammenhänge mit dem unterschiedlichen Ausmaß der IL-4R α -Reduktion bei den beiden Klonen vor, da sich bei 1-2 eine mRNA-Degradation in der PCR nachweisen ließ, während dies bei 4-9 nicht der Fall war.

Die morphologische Abschätzung der Malignität durch die Phalloidininfärbung scheint somit ein ungenauer Marker zu sein, da sich trotz gleicher Morphologie deutliche Unterschiede in der Koloniebildungsrate zeigten.

Hemmung der Zellmigration

Zur Untersuchung der gerichteten Zellmigration wurde die modifizierte Boyden-Kammer verwendet. Die verwendeten Polykarbonatmembranen wiesen eine Porengröße von 8 μm auf. Wie auf den Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar ist, liegt diese Größe deutlich unterhalb der Größe der Zellen. Somit floss auch die Fähigkeit zur Verformung durch Zytoskelett-Umstrukturierung als Faktor in die Migrationsfähigkeit ein. FKS diente als Chemoattraktant.

Es zeigten sich wechselhafte Ergebnisse. Beide Klone mit herabgesetzter IL-4R α -Expression, 1-2 und 4-9, zeigten eine signifikant verringerte Migrationsfähigkeit im Vergleich zu Kontrollzellen. Der Kontrollklon N-2 zeigte eine im Vergleich zu WT-Zellen und um anderen Kontrollklon N-7 ebenfalls signifikant herabgesetzte Migrationsfähigkeit. Somit erreichte auch der Unterschied zwischen N-2 und 4-9 keine Signifikanz. IL-4 führt in Kolonkarzinomzellen zu einer herabgesetzten Zell-Zell-Adhäsion (Kanai et al., 2000). Dies könnte die molekulare Grundlage der herabgesetzten Migrationsfähigkeit unter IL-4R α -Blockade sein.

Die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen spielt auch bei der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen eine Rolle (van Zijl et al., 2011). Klinisch wurde bereits ein verringertes Risiko lymphogener Metastasierung bei Tumoren mit hoher Expression von IL-4R α und IL-4 nachgewiesen (Formentini et al., 2012).

Weiterhin spielt bei der Etablierung von Lymphknotenmetastasen auch die Interaktion von zirkulierenden Tumorzellen mit Immunzellen eine Rolle. (Formentini et al., 2012). Aufgrund des Effektes von IL-4 auf die Reifung und das Priming von T-Zellen kann so eine Metastasierung in lymphatischem Gewebe bei Zellen mit hoher IL-4-Expression erschwert sein (Li et al., 2009).

Effekte auf subzellulärer Ebene

Zur Analyse der durch IL-4R α aktivierten Signalkaskaden wurden Zellen von HT29-WT, N-2 und 1-2 nach 24-stündiger Serumreduktion (1,5 % FKS) mit IL-4, IL-13 und IGF-I stimuliert. Die Serumreduktion diente der Reduktion einer durch 10 % FKS in komplettem Kulturmedium hervorgerufenen Kinasenaktivierung (Nakao et al., 2002). Die gewonnenen Lysate der Zellen wurden mittels Western Blot analysiert. Hierbei wurden Lysate von WT-Zellen miteinander verglichen und Lysate von 1-2 mit denen des Kontrollklons N-2. In dieser Arbeit wurden sechs Signalproteine aus der Gruppe der Kinasen (Akt-1/2/3, ERK-1/2, p38) und der Transkriptionsfaktoren (ATF2, c-Jun, S6 ribosomal Protein) untersucht.

Die Stimulation von HT29-WT-Zellen mit IL-4 und IL-13 führte in fünf von sechs untersuchten Signalproteinen zu einer gesteigerten Phosphorylierung. Die Intensität der Phosphorylierung lag nach Stimulation mit IL-4 und IL-13 jeweils in einem ähnlichen Bereich; lediglich bei ERK-1/2 gab es deutliche Abweichungen. Bei mehreren Signalproteinen wurden Phosphorylierungswerte erreicht, die im Bereich der Stimulation mit IGF-I liegen. IGF-I spielt über seinen Rezeptor IGF-IR eine Rolle bei der Entstehung und Erhaltung transformierter Zellen durch starke antiapoptotische Aktivität (Baserga et al., 2003).

Für die Proteine, bei denen eine gesteigerte Phosphorylierung nachgewiesen wurde, wurden bereits pro-onkogene Effekte auf das Kolonkarzinom beschrieben (Roy et al., 2002, Ashida et al., 2005, Blaj et al., 2017, Wagner und Nebreda, 2009, Lai und Xu, 2007).

Durch den Vergleich der Proteinphosphorylierung in 1-2 und N-2 lassen sich die Effekte der IL-4R α -Herunterregulation beobachten. ERK-1/2 und S6 wiesen eine

gesteigerte Phosphorylierung auf, während alle anderen untersuchten Signalproteine vermindert phosphoryliert wurden. Dies spiegelt die Befunde der verringerten Malignität in Bezug auf basales Wachstum und Zellmigration wider.

Auffällig ist besonders, dass es im Klon 1-2 bei ERK-1/2 zu einer deutlichen basalen Signalerhöhung kam. Es kommt somit auch ohne Stimulation zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK-1/2, die sich unter Stimulation weiter steigert. Für IL-4 lag die stärkste Steigerung der Phosphorylierung von ERK-1/2 vor. Möglicherweise kommt es bei Fehlen von IL-4R α zur Aktivierung alternativer Signalwege. Dafür spricht die bereits basale sowie auch durch IGF-I gesteigerte Phosphorylierung. Im Rahmen der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms kommt es möglicherweise auch zu einer Hochregulation des EGF-Rezeptors und dadurch verstärkte Aktivierung des ERK-MAPK-Pathways (Fang und Richardson, 2005). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die gesteigerte ERK-Aktivierung auch nach Herunterregulation von IL-4R α sein.

Bei ATF2 führte die Stimulation der HT29-WT-Zellen mit IL-4 und IL-13 zu einer geringeren Phosphorylierung. Bei der Stimulation der Zellen mit IL-4R α -Herunterregulation zeigte sich ebenfalls ein geringes Ansprechen auf die Stimulation mit IL-4 und IL-13. IGF-I führte jedoch in 1-2 zu einer deutlichen Aktivierung der Phosphorylierung von ATF2. Dies spricht für eine Aktivierung alternativer Signalwege nach Knockout von IL-4R α . Die Überexpression von ATF2 spielt eine Rolle in mehreren Karzinogenesemodellen (Lopez-Bergami et al., 2010).

Abschließende Beurteilung

Zur Pathogenese des kolorektalen Karzinoms konnten bislang zahlreiche Faktoren identifiziert werden, die zur Entwicklung eines malignen Phänotyps beitragen.

So konnte gezeigt werden, dass von Tumorzellen sezerniertes IL-4 die Proliferation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) hemmt (Volonté et al., 2014).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass IL-4 die Tumorentwicklung mehr zu fördern scheint, da die Reduktion des Einflusses von IL-4 in vitro zu einem reduzierten Wachstum sowie einer reduzierten Koloniebildung und Migrationsfähigkeit führt. Da bei Klon 1-2 eine stärkere Suppression des IL-4R α und auch eine deutlicher ausgeprägte Reduktion der Malignität im Vergleich mit Klon 4-9 vorlag, ist davon auszugehen, dass die Reduktion der Malignität mit der Stärke der Suppres-

sion von 1-2 einhergeht und der Einfluss von IL-4 möglicherweise noch stärker ist, als in dieser Studie nachgewiesen werden konnte.

In Tumoren anderen Ursprungs wie dem Nierenzellkarzinom sowie malignen Gliomen konnte auch ein hemmender Effekt von IL-4 gezeigt werden (Golumbek et al., 1991, Yu et al., 1993). Ein möglicher Mechanismus der Anti-Tumor-Aktivität von IL-4 ist die TH2-Antwort, die zu einer Aktivierung von eosinophilen Granulozyten führt (Tepper et al., 1992). Je nach Tumorlokalisation kann IL-4 die Tumorentwicklung also unterschiedlich beeinflussen. Im kolorektalen Karzinom scheint jedoch die tumorfördernde Komponente führend zu sein (Mager et al., 2016).

Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von IL-4 auf das kolorektale Karzinom sind weitere Studien notwendig. Ein Schritt wäre die Übertragung des *in-vitro* Modells in ein Tiermodell. Einen weiteren möglichen Ansatz zur Entwicklung neuer Therapiestrategien stellt die Untersuchung der CD133-positiven Subpopulation von Tumorstammzellen dar, deren Überleben maßgeblich von IL-4 beeinflusst wird (Francipane et al., 2008). Weiterhin könnte die zukünftige Therapie aus einer Kombination der konventionellen Chemotherapie mit einer zielgerichteten Therapie bestehen. Dupilumab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen den IL-4R α gerichtet ist und damit die Signalwege von IL-4 und IL-13 blockieren kann (Wenzel et al., 2013). Aus der Asthma-Therapie sind weitere gegen IL-4 und dessen Rezeptoren gerichtete Antikörper bekannt (Bankaitis und Fingleton, 2015). In diesen Antikörpern liegt nach den Ergebnissen dieser Studie ein mögliches Potential in der Therapie des kolorektalen Karzinoms.

5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist bei Männern die dritt- und bei Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung und insgesamt die dritthäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Als kurativer Therapieansatz kommt in frühen Stadien die chirurgische Resektion in Betracht. In fortgeschrittenen Stadien mit Fernmetastasen kann jedoch häufig trotz multimodalen Therapieansätzen keine Heilung mehr erzielt werden. In der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms spielt die Adenom-Karzinom-Sequenz eine entscheidende Rolle, in deren Verlauf es durch die Mutation verschiedener Tumorsuppressorgene und Onkogene zur Entwicklung eines invasiven Karzinoms kommt.

Interleukin-4 (IL-4) ist ein immunmodulatorisches Zytokin, das unter anderem von T-Helfer-Zellen (TH) sezerniert wird. In zahlreichen Geweben finden sich Rezeptoren dieses Zytokins, die in Typ I und Typ II unterteilt werden können. In nicht-hämatopoetischen Geweben ist hauptsächlich der Typ-II-Rezeptor zu finden. Dieser setzt sich aus der Alpha-Kette des Interleukin-4-Rezeptors (IL-4R α), an die IL-4 bindet, sowie der Alpha-1-Kette des Interleukin-13-Rezeptors (IL-13R α 1) zusammen. Dieser vermittelt wachstumsstimulierende Signale durch die Aktivierung des Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) Signalwegs sowie die Aktivierung onkogener Mitogen-aktivierter-Proteinkinasen (MAPK).

In dieser Studie wurde der Einfluss von IL-4 und dessen Rezeptor IL-4R α (Alpha-Kette des Interleukin-4-Rezeptors) auf den malignen Phänotyp des kolorektalen Karzinoms untersucht. Durch stabile Transfektion einer IL-4R α -shRNA (small hairpin Ribonukleinsäure) konnte eine Suppression des IL-4R α erzielt werden. Die Selektion der Klone mit IL-4R α -Herunterregulation erfolgte mittels Western Blot und PCR (Polymerase-Kettenreaktion). Mit Hilfe des MTT-Assays (Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid) sowie des Soft-Agar-Assays konnte eine Reduktion des basalen Wachstums sowie eine Bildung von kleineren Kolonien und eine veränderte Koloniebildungsrate gezeigt werden. In der modifizierten Boyden-Kammer, einem Zellmigrationsassay, lag eine verminderte Migrationsfähigkeit der transfizierten Zellen vor. Nach Stimulation mit IL-4 und IL-13 konnte in HT29-WT-Zellen (Wildtyp) eine Aktivierung pro-onkogener Signalwege in ähnlichem Ausmaß wie IGF-I (Insulin-like-growth-factor-I) gezeigt werden. Zur Darstellung der Effekte

der Transfektion auf die zugrunde liegenden Signalkaskaden wurden die phosphorylierten Zustände der aktivierten Signalproteine nach Stimulation mittels Western Blot untersucht. Hier zeigten sich Ergebnisse, die zum Teil für die reduzierte Malignität und zum Teil für die Aktivierung alternativer Signalkaskaden unter IL-4R α -Suppression sprechen, da sich ein wechselhaftes Muster mit teilweise erhöhter Sensibilität auf die Stimulation zeigte. In einer mit Phalloidin durchgeführten Färbung des Aktin-Zytoskeletts fand sich keine morphologisch fassbare Reduktion der Malignität nach Transfektion. Die Blockade von IL-4 kann also in vitro zu reduziertem Tumorwachstum und verringerter Malignität führen.

Eine mögliche weitere Rolle von IL-4 besteht in der autokrinen Stimulation einer Subpopulation von CD133 (Cluster of differentiation)-positiven Stammzellen, die zu einer Therapieresistenz gegen konventionelle Chemotherapeutika beitragen kann. Insgesamt kann IL-4 die Tumorentwicklung in unterschiedliche Richtungen beeinflussen, im kolorektalen Karzinom scheinen jedoch tumorfördernde Eigenschaften zu überwiegen. Für die Zukunft und weitere Studien bleibt IL-4 also als Ziel einer möglichen zielgerichteten Therapie mittels monoklonaler Antikörper in Kombination mit klassischer zytostatischer Therapie oder mit Inhibitoren anderer beteiligter Signalwege interessant.

6 Literaturverzeichnis

1. Ashida R, Tominaga K, Sasaki E, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Mitsuyama S, Iwao H, Arakawa T: AP-1 and colorectal cancer. *Inflammopharmacology* 13:113–125 (2005)
2. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50:7717–7722 (1990)
3. Ballinger AB, Anggiansah C: Colorectal cancer. *BMJ* 335:715–718 (2007)
4. Bankaitis KV, Fingleton B: Targeting IL4/IL4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 32:847–856 (2015)
5. Baserga R, Peruzzi F, Reiss K: The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* 107:873–877 (2003)
6. Blaj C, Schmidt EM, Lamprecht S, Hermeking H, Jung A, Kirchner T, Horst D: Oncogenic Effects of High MAPK Activity in Colorectal Cancer Mark Progenitor Cells and Persist Irrespective of RAS Mutations. *Cancer Res* 77:1763–1774 (2017)
7. Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE: Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 41:1751–1756 (1981)
8. Chardin P, Camonis JH, Gale NW, van Aelst L, Schlessinger J, Wigler MH, Bar-Sagi D: Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260:1338–1343 (1993)
9. Day E, Poulogiannis G, McCaughan F, Mulholland S, Arends MJ, Ibrahim AEK, Dear PH: IRS2 is a candidate driver oncogene on 13q34 in colorectal cancer. *Int J Exp Pathol* 94:203–211 (2013)
10. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W: MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26:3279–3290 (2007)
11. Downward J: Control of ras activation. *Cancer Surv* 27:87–100 (1996)
12. Downward J: Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:11–22 (2003)

13. Esposito DL, Aru F, Lattanzio R, Morgano A, Abbondanza M, Malekzadeh R, Bishehsari F, Valanzano R, Russo A, Piantelli M, Moschetta A, Lotti LV, Mariani-Costantini R: The insulin receptor substrate 1 (IRS1) in intestinal epithelial differentiation and in colorectal cancer. *PLoS One* 7:e36190 (2012)
14. Fang JY, Richardson BC: The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6:322–327 (2005)
15. Fogh J, Trempe G: New Human Tumor Cell Lines. in: Fogh J (ed): *Human Tumor Cells in Vitro*. Boston, MA, Springer US, pp 115–159 (1975)
16. Formentini A, Prokopchuk O, Sträter J, Kleeff J, Grochola LF, Leder G, Henne-Bruns D, Korc M, Kornmann M: Interleukin-13 exerts autocrine growth-promoting effects on human pancreatic cancer, and its expression correlates with a propensity for lymph node metastases. *Int J Colorectal Dis* 24:57–67 (2009)
17. Formentini A, Braun P, Fricke H, Link K-H, Henne-Bruns D, Kornmann M: Expression of interleukin-4 and interleukin-13 and their receptors in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 27:1369–1376 (2012)
18. Francipane MG, Alea MP, Lombardo Y, Todaro M, Medema JP, Stassi G: Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells. *Cancer Res* 68:4022–4025 (2008)
19. Garnett MJ, Marais R: Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 6:313–319 (2004)
20. Giovannone B, Scaldaferri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G: Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res Rev* 16:434–441 (2000)
21. Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI, Jaffee LM, Karasuyama H, Baker M, Pardoll DM: Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* 254:713–716 (1991)
22. Hallett MA, Venmar KT, Fingleton B: Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13. *Cancer Res* 72:6338–6343 (2012)

23. Heo DS, Park JG, Hata K, Day R, Herberman RB, Whiteside TL: Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. *Cancer Res* 50:3681–3690 (1990)
24. Hirner H, Gunes C, Bischof J, Wolff S, Grothey A, Kuhl M, Oswald F, Wegwitz F, Bosl MR, Trauzold A, Henne-Bruns D, Peifer C, Leithauser F, Depert W, Knippschild U: Impaired CK1 delta activity attenuates SV40-induced cellular transformation in vitro and mouse mammary carcinogenesis in vivo. *PLoS One* 7:e29709 (2012)
25. Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE: Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* 155:914–923 (1982)
26. Ingram N, Northwood EL, Perry SL, Marston G, Snowden H, Taylor JC, Scott N, Bishop DT, Coletta PL, Hull MA: Reduced type II interleukin-4 receptor signalling drives initiation, but not progression, of colorectal carcinogenesis: evidence from transgenic mouse models and human case-control epidemiological observations. *Carcinogenesis* 34:2341–2349 (2013)
27. Ito T, Suzuki S, Kanaji S, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Tanaka G, Tamada T, Honjo E, Garcia KC, Kuroki R, Izuhara K: Distinct structural requirements for interleukin-4 (IL-4) and IL-13 binding to the shared IL-13 receptor facilitate cellular tuning of cytokine responsiveness. *J Biol Chem* 284:24289–24296 (2009)
28. Kaklamani L, Gatter KC, Mortensen N, Harris AL: Interleukin-4 receptor and epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer. *Br J Cancer* 66:712–716 (1992)
29. Kanai T, Watanabe M, Hayashi A, Nakazawa A, Yajima T, Okazawa A, Yamazaki M, Ishii H, Hibi T: Regulatory effect of interleukin-4 and interleukin-13 on colon cancer cell adhesion. *Br J Cancer* 82:1717–1723 (2000)
30. Kantola T, Klintrup K, Väyrynen JP, Vornanen J, Bloigu R, Karhu T, Herzig K-H, Näpänkangas J, Mäkelä J, Karttunen TJ, Tuomisto A, Mäkinen MJ: Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 107:1729–1736 (2012)
31. Kelly-Welch A, Hanson EM, Keegan AD: Interleukin-13 (IL-13) pathway. *Sci STKE* 2005:cm8 (2005)

32. Koller FL, Hwang DG, Dozier EA, Fingleton B: Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth. *Carcinogenesis* 31:1010–1017 (2010)
33. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, Pessi MA, Prochilo T, Quadri A, Gatta G, Braud F de, Wils J: Colon cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 74:106–133 (2010)
34. Lahm H, Schnyder B, Wyniger J, Borbenyi Z, Yilmaz A, Car BD, Fischer JR, Givel JC, Ryffel B: Growth inhibition of human colorectal-carcinoma cells by interleukin-4 and expression of functional interleukin-4 receptors. *Int J Cancer* 59:440–447 (1994)
35. Lai M-D, Xu J: Ribosomal proteins and colorectal cancer. *Curr Genomics* 8:43–49 (2007)
36. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND: Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36:4562–4569 (1976)
37. Li Z, Chen L, Qin Z: Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cell Mol Immunol* 6:415–422 (2009)
38. Lopez-Bergami P, Lau E, Ronai Z'e: Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer* 10:65–76 (2010)
39. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GAW, Shea-Donohue T, Atamas SP: Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J Leukoc Biol* 92:753–764 (2012)
40. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T: Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 7:27–39 (2008)
41. Mager LF, Wasmer M-H, Rau TT, Krebs P: Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol* 6:96 (2016)
42. Maier P: Wertigkeit von Fibroblastenwachstumsfaktor 5 für den malignen Phänotyp von kultivierten humanen Pankreaskarzinomzellen, Med Dissertation, Universität Ulm (2014)
43. Markowitz SD, Bertagnolli MM: Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 361:2449–2460 (2009)

44. Mizushima H, Wang X, Miyamoto S, Mekada E: Integrin signal masks growth-promotion activity of HB-EGF in monolayer cell cultures. *J Cell Sci* 122:4277–4286 (2009)
45. Murata T, Obiri NI, Puri RK: Structure of and signal transduction through interleukin-4 and interleukin-13 receptors (review). *Int J Mol Med* 1:551–557 (1998)
46. Nakao T, Kim S, Ohta K, Kawano H, Hino M, Miura K, Tatsumi N, Iwao H: Role of mitogen-activated protein kinase family in serum-induced leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 secretion by bone marrow stromal cells. *Br J Pharmacol* 136:975–984 (2002)
47. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE: The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17:701–738 (1999)
48. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, Dohi T: Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer* 118:2232–2236 (2006)
49. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153–183 (2001)
50. Prokopchuk O, Liu Y, Henne-Bruns D, Kornmann M: Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions. *Br J Cancer* 92:921–928 (2005)
51. Robb L: Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26:6715–6723 (2007)
52. Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland für 2013/2014, RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut) (2017)
53. Robert Koch-Institut (Hrsg.): Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Aufl., neue Ausg. Berlin, Robert Koch-Institut (2013)
54. Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, Smyrk TC: AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 23:201–205 (2002)
55. Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedmann MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE: Interleukin-2 receptor

- gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 262:1880–1883 (1993)
56. Ryan JJ, McReynolds LJ, Keegan A, Wang LH, Garfein E, Rothman P, Nelms K, Paul WE: Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. *Immunity* 4:123–132 (1996)
57. Schmiegeler W, Buchberger B, Follmann M, Graeven U, Heinemann V, Langer T, Nothacker M, Porschen R, Rödel C, Rösch T, Schmitt W, Wesselmann S, Pox C: S3-Leitlinie – Kolorektales Karzinom. *Z Gastroenterol* 55:1344–1498 (2017)
58. Schmutz J, Martin J, Terry A, Couronne O, Grimwood J, Lowry S, Gordon LA, Scott D, Xie G, Huang W, Hellsten U, Tran-Gyamfi M, She X, Prabhakar S, Aerts A, Altherr M, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caoile C, Challacombe JF, Chan YM, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopoulos D, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Goodstein D, Grigoriev I, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Lopez F, Lou Y, Martinez D, Medina C, Morgan J, Nandkeshwar R, Noonan JP, Pitluck S, Pollard M, Predki P, Priest J, Ramirez L, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wheeler J, Wu K, Yang J, Dickson M, Cheng J-F, Eichler EE, Olsen A, Pennacchio LA, Rokhsar DS, Richardson P, Lucas SM, Myers RM, Rubin EM: The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. *Nature* 431:268–274 (2004)
59. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A: Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64:9–29 (2014)
60. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68:7–30 (2018)
61. Smerz-Bertling C, Duschl A: Both interleukin 4 and interleukin 13 induce tyrosine phosphorylation of the 140-kDa subunit of the interleukin 4 receptor. *J Biol Chem* 270:966–970 (1995)
62. Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG, Miralpeix M, White MF: Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* 13:7418–7428 (1993)

63. Taniguchi T: Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268:251–255 (1995)
64. Tepper RI, Coffman RL, Leder P: An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 257:548–551 (1992)
65. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, Stassi G: Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1:389–402 (2007)
66. Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, Alea MP, Cammareri P, Iovino F, Di Stefano AB, Di Bernardo C, Agrusa A, Condorelli G, Walczak H, Stassi G: Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death Differ* 15:762–772 (2008)
67. Toi M, Bicknell R, Harris AL: Inhibition of colon and breast carcinoma cell growth by interleukin-4. *Cancer Res* 52:275–279 (1992)
68. Traub B: Einfluss der Interleukin-4-Interleukin-4-Rezeptor-Kaskade auf den malignen Phänotyp kultivierter Pankreaskarzinomzellen, Med Dissertation, Universität Ulm (2017)
69. van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W: Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 728:23–34 (2011)
70. Vigneri PG, Tirrò E, Pennisi MS, Massimino M, Stella S, Romano C, Manzella L: The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy. *Front Oncol* 5:230 (2015)
71. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525–532 (1988)
72. Volonté A, Di Tomaso T, Spinelli M, Todaro M, Sanvito F, Albarello L, Bisolati M, Ghirardelli L, Orsenigo E, Ferrone S, Doglioni C, Stassi G, Della-bona P, Staudacher C, Parmiani G, Maccalli C: Cancer-initiating cells from colorectal cancer patients escape from T cell-mediated immunosurveillance in vitro through membrane-bound IL-4. *J Immunol* 192:523–532 (2014)
73. Wagner EF, Nebreda AR: Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9:537–549 (2009)
74. Wang X, Lupardus P, Laporte SL, Garcia KC: Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 27:29–60 (2009)

75. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, Wang L, Kirkesseli S, Rocklin R, Bock B, Hamilton J, Ming JE, Radin A, Stahl N, Yancopoulos GD, Graham N, Pirozzi G: Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med* 368:2455–2466 (2013)
76. Wills-Karp M, Finkelman FD: Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Sci Signal* 1:pe55 (2008)
77. Yokota T, Otsuka T, Mosmann T, Banchereau J, DeFrance T, Blanchard D, Vries JE de, Lee F, Arai K: Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5894–5898 (1986)
78. Yu JS, Wei MX, Chiocca EA, Martuza RL, Tepper RI: Treatment of glioma by engineered interleukin 4-secreting cells. *Cancer Res* 53:3125–3128 (1993)

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt.