

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. E.B. Ringelstein-

**Vergleich der Aktivierung von Signalkaskaden und Genen durch Oncostatin M in  
humanen Glioblastomzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Postert, Christiane  
aus Münster  
2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. F. Stögbauer
  2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. H. Wassmann
- Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. E.B. Ringelstein-  
Referent: Priv.-Doz. Dr. F. Stögbauer  
Koreferent: Prof. Dr. H. Wassmann

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Vergleich der Aktivierung von Signalkaskaden und Genen durch Oncostatin M in  
humanen Glioblastomzellen  
Christiane Postert

Oncostatin M (OSM) und Leukemia Inhibitory Factor (LIF) sind zwei Zytokine aus der Interleukin-6 (IL-6)-Familie hämatopoetischer und neuropoetischer Zytokine. Beide lösen Effekte auf Zellen durch Bindung an einen gemeinsamen Rezeptor, den Typ I OSM-Rezeptor, aus. OSM kann zusätzlich an einen für das Zytokin spezifischen Rezeptor, den Typ II OSM-Rezeptor binden.

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden nach Behandlung von Zellen mit OSM und LIF verglichen. Da eine nur durch OSM induzierte, höchstwahrscheinlich über den Typ II OSM-Rezeptor übertragene, signifikante Wachstumsinhibition auf bestimmte Tumorzelllinien bekannt war, sollten durch den Vergleich der aktivierten Signalmoleküle diejenigen identifiziert werden, die an der Übertragung dieses Effektes beteiligt sein könnten.

Insgesamt war die Tyrosinphosphorylierung der Signalproteine, die ihre Aktivierung anzeigte, unabhängig vom Zytokin und der Zelllinie sehr ähnlich. Die meisten Proteine der Jak/Stat- und der MAPK-Signalkaskaden wurden nach Stimulation mit OSM und LIF phosphoryliert. Lediglich Stat5b wurde nur nach Behandlung der Zellen mit OSM aktiviert. Allerdings wurde es auch in Zelllinien aktiviert, in denen keine Wachstumsinhibition erreicht wurde, so dass Stat5b in den Gliomzelllinien keine erhebliche Rolle für die Übertragung des antiproliferativen Effektes haben kann. Offensichtlich war eine insgesamt wesentlich stärkere Tyrosinphosphorylierung der Proteine nach Stimulation mit OSM. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des Jak-Stat- und des MAPK-Signalweges nicht ausreichend ist, um eine Wachstumsinhibition zu induzieren. Daher müssen für den antiproliferativen Effekt essentielle Signalkaskaden durch weitere Metaanalysen identifiziert werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2004

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Oncostatin M (OSM) und Leukemia Inhibitory Factor (LIF)</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Rezeptoren</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Die intrazellulären Signalkaskaden</b>	<b>5</b>
1.3.1 Die Jak (Janus-Kinasen)/Stat (Signal Transducers and Activators of Transcription)-Signalkaskade	5
1.3.2 Die MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) -Signalkaskade	6
<b>1.4 Gliome</b>	<b>8</b>
1.4.1 Klassifikation der World Health Organisation (WHO)	8
1.4.2 Prognose	9
1.4.3 Therapeutische Ansätze	9
<b>1.5 Zielsetzung</b>	<b>10</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Chemikalien</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Antikörper</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Enzyme</b>	<b>13</b>
<b>2.4 Primer</b>	<b>13</b>
<b>2.5 Puffer</b>	<b>13</b>
<b>2.6 Medien</b>	<b>14</b>
<b>2.7 Zelllinien</b>	<b>15</b>

<b>2.8</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>15</b>
<b>2.9</b>	<b>Molekulargenetische Methoden</b>	<b>16</b>
2.9.1	Isolation von RNA aus Zellen	16
2.9.2	Quantifizierung von RNA	16
2.9.3	cDNA-Synthese	16
2.9.4	Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)	17
2.9.5	Gelelektrophorese von DNA	18
2.9.6	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	18
<b>2.10</b>	<b>Analyse von Proteinen</b>	<b>19</b>
2.10.1	Anfertigung von Gesamtzell-Lysaten	19
2.10.2	Immunopräzipitation	19
2.10.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	20
2.10.4	SDS-Polyacrylamidelektrophorese	20
2.10.5	Western Blot	20
2.10.6	Detektion mit dem ECL-Verfahren	21
2.10.7	Entfernen der Antikörper von PVDF-Membranen	21
2.10.8	Kernextraktion	22
2.10.9	Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay (EMSA)	22
2.10.10	Gel Supershift Assay	23
2.10.11	Native Tris/Glycin-Acrylamidelektrophorese	23
2.10.12	Autoradiographie	23
<b>2.11</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>24</b>
2.11.1	Kultivierung der Zellen	24
2.11.2	Teilen der Zellen	24
2.11.3	Einfrieren der Zellen	24
2.11.4	Auftauen der Zellen	25
<b>2.12</b>	<b>Bestimmung der Zellproliferation</b>	<b>25</b>
2.12.1	BrdU-Test	25
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>26</b>

<b>3.1</b>	<b>Expression der Rezeptorkomponenten gp130, OSMR<math>\beta</math> und LIFR<math>\beta</math> in den Gliomzelllinien</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Effekt von OSM auf die Proliferation der Gliomzellen</b>	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>Analyse der Tyrosinphosphorylierung durch OSM und LIF in Zell-Lysaten</b>	<b>29</b>
3.3.1	Tyrosinphosphorylierung in Abhängigkeit von der Zeit	30
3.3.2	Tyrosinphosphorylierung in Abhängigkeit vom Zytokin	31
3.3.3	Tyrosinphosphorylierung in Abhängigkeit von der Zelllinie	32
<b>3.4</b>	<b>Identifizierung des 42 kD-Proteins</b>	<b>33</b>
<b>3.5</b>	<b>Aktivierung der Rezeptorkomponente gp130</b>	<b>34</b>
<b>3.6</b>	<b>Aktivierung der Signalkaskaden</b>	<b>35</b>
3.6.1	Die Jak/Stat-Signalkaskade	36
3.6.1.1	Aktivierung der Janus-Kinasen	36
3.6.1.2	Aktivierung der Stat-Proteine	37
3.6.2	Die MAPK-Signalkaskade	38
<b>3.7</b>	<b>DNA-Bindung der aktivierten Signalmoleküle</b>	<b>39</b>
3.7.1	Bindung an das Oligonukleotid SIE	40
3.7.1.1	Ergebnisse des Elektrophoretischen Mobilitätsshift-Assays	41
3.7.1.2	Ergebnisse des Gel Supershift Assays	41
3.7.2	Bindung an das Oligonukleotid Stat5	42
3.7.2.1	Ergebnisse des Elektrophoretischen Mobilitätsshift-Assays	43
3.7.2.2	Ergebnisse des Gel Supershift Assays	43
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Expression der OSM-Rezeptoren in den Gliomzelllinien</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>OSM hemmt die Proliferationsrate von GOS 3 über den Typ II OSM-Rezeptor</b>	<b>46</b>

<b>4.3</b>	<b>OSM erreicht in vielen verschiedenen Zelllinien trotz unterschiedlicher Effekte ähnliche Tyrosinphosphorylierung</b>	<b>47</b>
<b>4.4</b>	<b>Aktivierung der Jak/Stat- und der MAPK-Signalkaskade über den Typ I und Typ II OSM-Rezeptor</b>	<b>49</b>
<b>4.5</b>	<b>DNA-Bindung von Stat-Proteinen nach OSM-Behandlung</b>	<b>52</b>
<b>4.6</b>	<b>Die Bedeutung der Zelllinie A 172<sup>2</sup></b>	<b>57</b>
<b>4.7</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>57</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>61</b>
	LEBENS LAUF	79
	DANKSAGUNG	80

## Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APP	Akute-Phase-Proteine
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Temperatur in Grad Celsius
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	DNA-Kopie der mRNA
Ci	Curie
CNTF(R)	Ciliary Neurotrophic Factor (Receptor)
CREB	Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element-binding Protein
CT	Cardiotrophin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholol
DTT	Dithiotreithol
ECL	Enhanced Chemiluminescent
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylenglykol-bis ( $\beta$ -Aminoethylether)- Tetraacetylsäure
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay

ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
Jak	Janus-Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LIF(R)	Leukemia Inhibitory Factor (Receptor)
MAPK(K)	Mitogen-Activated Protein Kinase (Kinase)
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar (Konzentration)
µM	Mikromolar (Konzentration)
mm	Millimeter
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
(h, m) OSM(R)	(humanes, mouse) Oncostatin M (Receptor)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten Reaktion
pM	Pikomolar (Konzentration)

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Penicillin/Neomycin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRF	Serum Response Factor
Stat	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TCF	Ternary Complex Factor
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)1,3-propandiol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	Zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Oncostatin M (OSM) und Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

Oncostatin M und Leukemia Inhibitory Factor sind Mitglieder der Familie hämatopoetischer und neuropoetischer Zytokine, zu der weiterhin Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) und Cardiotrophin-1 (CT-1) gehören. Diese Zytokine zeichnen sich durch strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten aus. Sie vermitteln die Kontrolle von Wachstum, Differenzierung und Funktionen der immunologischen und hämatopoetischen Zellen (Arai et al., 1990).

OSM wurde zunächst als wachstumshemmendes Protein für humane Melanomzellen identifiziert (Rose et al., 1991, Zarling et al., 1986, Brown et al., 1987, Malik et al., 1989), LIF als wachstumshemmendes Molekül für myeloische Leukämie M 1-Zellen (Hilton and Gough, 1991).

Im Folgenden wurden zahlreiche weitere Aktivitäten beschrieben. Alle Zytokine dieser Familie induzieren in Leberzellen die Synthese von Akute-Phase-Proteinen (Richards et al., 1992) und im hämatopoetischen System die Produktion von Megakaryozyten, die Proliferation von hämatopoetischen Progenitorzellen sowie von Myelomzellen, die Thrombopoese und die Resorption von Knochen. Weiterhin können sie die Differenzierungsfähigkeit von embryonalen Stammzellen aufrechterhalten, indem sie deren Ausdifferenzierung hemmen (Rose et al., 1994).

Im zentralen Nervensystem können OSM, LIF, CNTF und IL-6 die Differenzierung von gliären Zellen fördern und an der Entstehung einer reaktiven Gliose beteiligt sein (Bonni et al., 1997, Rajan et al., 1998, Richards et al., 1996). An neuronalen Zellen induzieren die IL-6 Zytokine Differenzierungsprozesse, z. B. die Differenzierung cholinergischer Nerven (Rao et al., 1992).

Neben gemeinsamen Effekten findet man einige Aktivitäten, die jeweils nur durch ein Zytokin ausgelöst werden können. OSM wirkt vor allem als wachstumshemmendes Molekül für zahlreiche Tumoren. Neben intrakraniellen Tumoren, z.B. verschiedene Gliomzelllinien (Halfter et al., 2000) und Meningeomzelllinien (Schrell et al., 1998), gehören dazu auch Tumoren aus Lunge, Mammae, Ovarien und Magen (Horn et al., 1990, Grant et al., 1999). Der wachstumshemmende Effekt von OSM auf Gliomzellen konnte auch *in vivo* dargestellt werden (Friedrich et al., 2001).

Andererseits stimuliert OSM die Proliferation von Fibroblasten, von glatten Muskelzellen der Gefäßwände (Grove et al., 1993) und von Endothelzellen (Brown et al., 1990). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass OSM die Proliferation von Spindelzellen aus AIDS-abhängigen Kaposi-Sarkomen fördert (Nair et al., 1992, Miles et al., 1992, Radka et al., 1993, Cai et al., 1994, Murakami-Mori et al., 1995).

An Zellen des zentralen Nervensystems sind ebenfalls zahlreiche Funktionen von OSM beschrieben worden. Unter anderem ist es in Astrozyten an der Regulation der Expression von  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (Kordula et al., 1998), MMP-1 (eine interstitielle Kollagenase), MMP-3 (Stromelysin 1) (Korzus et al., 1997) und von IL-6 (Van Wagoner et al., 1999, Van Wagoner et al., 2000) beteiligt.

## **1.2 Die Rezeptoren**

Die Zytokine der IL-6 Familie verwenden für die Signaltransduktion heteromere Rezeptorkomplexe, deren gemeinsamer Bestandteil das Glykoprotein gp130 ist. Das Zytokin bindet an eine Untereinheit, die als  $\alpha$ -Komponente bezeichnet wird. Daraufhin binden eine oder zwei als  $\beta$ -Komponenten bezeichnete Rezeptormoleküle an die  $\alpha$ -Komponente. Dieser Vorgang führt zu einer starken Erhöhung der Affinität des Rezeptormoleküls für seinen Liganden und zu einer Signaltransduktion in die Zelle hinein.

OSM und LIF können an einen Rezeptor binden, der aus einem Heterodimer der Rezeptorkomponenten Leukemia Inhibitory Factor Receptor  $\beta$  (LIFR $\beta$ ) und dem

signalübertragendem Protein gp130 besteht. Dieser Rezeptorkomplex wird als Typ I OSM-Rezeptor bezeichnet (Gearing and Bruce, 1992, Gearing et al., 1992).

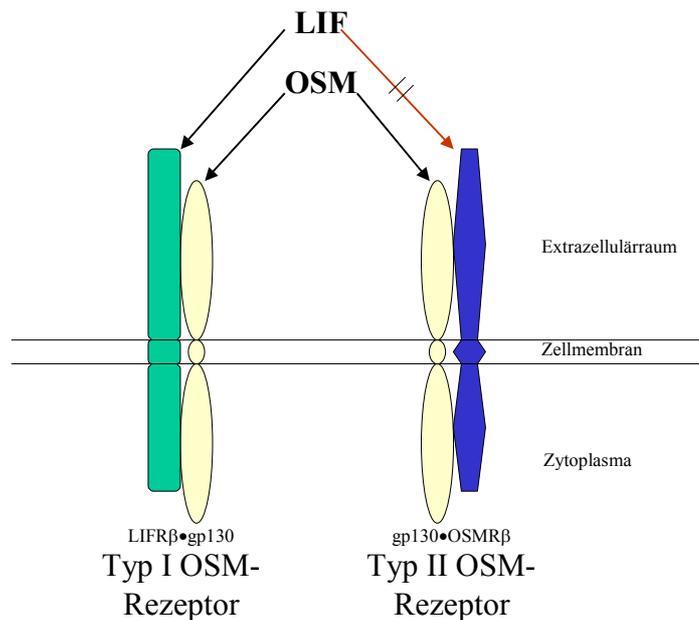
Wahrscheinlich wird die große Zahl gemeinsamer Effekte der beiden Zytokine durch die Möglichkeit der Bindung an einen gemeinsamen Rezeptor erreicht. Ein Unterschied besteht in der Lokalisation der Bindungsstelle: OSM bindet direkt an gp130, LIF jedoch an LIFR $\beta$  (Gearing et al., 1992, Sporeno et al., 1994).

Gp130•LIFR $\beta$  sind ebenfalls Bestandteile der Rezeptoren für CT-1 und CNTF.

Während bei der Signalvermittlung von CNTF bereits eine weitere Rezeptorkomponente beschrieben wurde (CNTFR $\alpha$ ) (Davis et al., 1993, Stahl et al., 1993), wird momentan eine solche spezifische Untereinheit ebenfalls für CT-1 postuliert (Pennica et al., 1995).

OSM kann an einen weiteren Rezeptorkomplex binden, der spezifisch für OSM ist, und ebenfalls dadurch eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden auslösen. Dieser wurde als Komplex aus gp130 und einer für OSM spezifischen Untereinheit (OSMR $\beta$ ) identifiziert. Er wird als Typ II OSM-Rezeptor bezeichnet (Thoma et al., 1994, Gearing et al. 1992, Mosley et al., 1996).

LIF kann an diesen Komplex nicht binden und deshalb keine Signale über ihn in die Zelle hinein vermitteln. Deshalb könnten durch diesen Rezeptor für OSM spezifische Effekte ausgelöst werden.



**Abbildung 1-1:** LIF bindet nur an den Typ I OSM-Rezeptor, während OSM an den Typ I und Typ II OSM-Rezeptor binden kann. Die Dreiteilung der Rezeptorkomponenten zeigt ihre Gliederung in einen intrazellulären, transmembranösen und extrazellulären Bereich, die für die Funktion der Rezeptoren von Bedeutung sind.

In Mauszellen findet man ein anderes Konzept der Zytokinbindung an die Rezeptoren. Der für mouse OSM (mOSM) spezifische Rezeptorkomplex besteht aus den Untereinheiten c12 (=mOSMRβ) und gp130. Mouse OSM kann in Mauszellen nur an diesen Komplex binden, jedoch nicht an gp130•LIFRβ. Humanes OSM (hOSM) kann nicht an den mOSMR binden, obwohl die Struktur des hOSMR ähnlich ist und in großen Bereichen sogar homolog (Lindberg et al., 1998).

Diese Ergebnisse muss man bei der Beurteilung von Experimenten berücksichtigen, die mit hOSM an Mauszellen durchgeführt wurden, bevor man den mOSMR charakterisiert hatte.

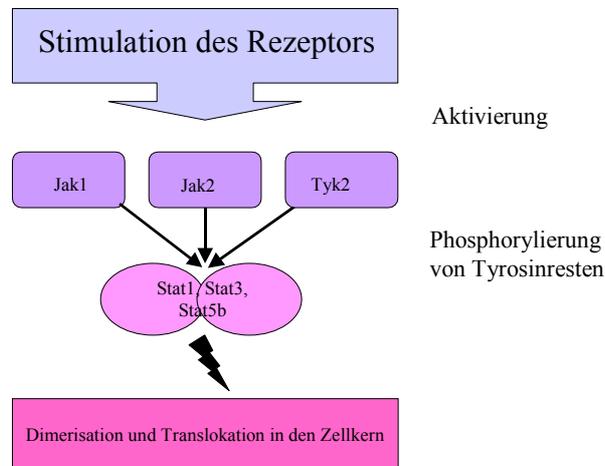
### 1.3 Die intrazellulären Signalkaskaden

#### 1.3.1 Die Jak (Janus-Kinasen)/Stat (Signal Transducers and Activators of Transcription)-Signalkaskade

Die Tyrosin-Kinasen der Jak-Familie sind mit dem intrazellulären Bereich der Rezeptorkomponenten bereits in inaktivem Zustand assoziiert (Tanner et al., 1995, Lütticken et al., 1994, Taga et al., 1992). Die Zytokinbindung und anschließende Dimerisation der entsprechenden Rezeptorkomponenten führt zur Aktivierung der angelagerten Kinasen, die daraufhin sowohl sich selbst wechselseitig als auch Teile der Rezeptoren phosphorylieren (Davis et al., 1993, Murakami et al., 1993).

Nach Stimulation von Zellen durch Zytokine aus der Interleukin-6 Familie werden drei Mitglieder aus der Familie der Janus-Kinasen aktiviert: Jak1, Jak2 und Tyk2 (Lütticken et al., 1994, Narazaki et al., 1994, Stahl et al., 1994).

Durch die folgende Phosphorylierung intrazellulärer Rezeptorbereiche werden Bindungsstellen für zytoplasmatische Proteine geschaffen (Heim et al., 1995), die nach ihrer Bindung ebenfalls durch die Janus-Kinasen phosphoryliert werden. Hierzu gehören vor allem die Stat-Proteine (Lütticken et al., 1994, Zhong et al., 1994, Sadowski et al., 1993, Lai et al., 1995). Nach ihrer Phosphorylierung dimerisieren die Stat-Proteine (Homo- oder Heterodimerisation) und translozieren in den Zellkern. Dort sind sie an der Regulation der Transkription beteiligt, indem sie sich an spezifische DNA-Sequenzen anlagern (Abbildung 1-2) (Shuai et al., 1994).



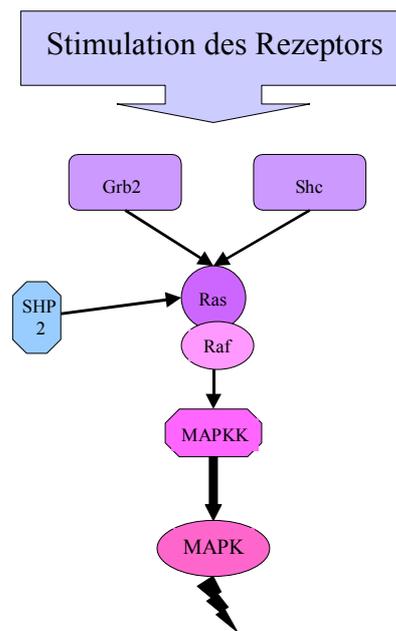
**Abbildung 1-2:** Die Jak/Stat-Signalkaskade. Zytokinbindung an die Rezeptoren führt zunächst zur Aktivierung der Janus-Kinasen, die anschließend die Stat-Proteine durch Phosphorylierung aktivieren.

Über gp130 enthaltene Rezeptoren wird insbesondere Stat3 aktiviert (Heim et al., 1995, Sadowski et al., 1993, Zhong et al., 1994, Boulton et al., 1995), in geringerem Maße werden ebenfalls Stat1 und Stat5b aktiviert. Die Janus-Kinasen weisen keine Spezifität für bestimmte Stat-Proteine auf, mehrere Janus-Kinasen können also das gleiche Substrat aktivieren (Kohlhuber et al., 1997, Ihle et al., 1995). Spezifität in der Stat-Aktivierung wird durch die Rezeptoren erreicht, an die jeweils nur typische Mitglieder der Stat-Familie binden können.

### 1.3.2 Die MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) -Signalkaskade

Die MAPK-Signalmoleküle sind zentrale Schaltstellen in den Signalkaskaden unterschiedlicher Faktoren, u.a. von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Dieser Signalweg wird häufig über Rezeptoren aktiviert, die gp130 enthalten (Lütticken et al., 1994, Stahl et al., 1994, Boulton et al., 1994). Gp130 stimuliert die MAPK-Kaskade

über mehrere Adaptermoleküle wie Shc und Grb2 (Boulton et al., 1994, Kumar et al., 1994), die zunächst zur Aktivierung von Ras führen. Dieses Molekül bewirkt über die Serin-/Threonin-Kinasen Raf1 und MAPKK (MAPK-Kinase) die Aktivierung der MAPK-Proteine ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase) 1 und ERK2 durch Phosphorylierung (Abbildung 1-3) (Moodie et al., 1993, Howe et al., 1992, Macdonald et al., 1993, Dent et al., 1992, Kyriakis et al., 1992, Moodie et al., 1994).



**Abbildung 1-3:** Die Signalkaskade, die zur Aktivierung der MAPK führt. Das Protein SHP-2 unterstützt die Aktivität von Ras.

Die Tyrosin-Phosphatase SHP-2 fördert die Signalübertragung über Ras, indem sie Tyrosinreste dephosphoryliert, die sonst die Signaltransduktion hemmen würden. Daneben existieren zytoplasmatische Tyrosinphosphatasen, die demgegenüber zur Hemmung von Ras führen (Duchesne et al., 1993).

Die aktivierten MAPK-Proteine phosphorylieren zunächst zytosolische Proteine, unter anderem auch Stat-Proteine (Denton et al., 1995). Zahlreiche der aktivierten zytosolischen Proteine können in den Zellkern translozieren und dort nukleäre Proteine aktivieren. Eine mögliche Translokation aktivierter Moleküle in den Zellkern wurde in

Kapitel 1.3.1 bereits am Beispiel der Stat-Proteine erwähnt. Dieser Weg wird innerhalb der Regulation des Zellstoffwechsels häufig verwendet. Zum Beispiel transloziert die ribosomale Protein-Kinase pp90<sup>rsk</sup> nach ihrer Aktivierung in den Zellkern und phosphoryliert dort das Protein Nur77 und den Serum Response Factor (SRF) (Chen et al., 1992), die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind.

Die aktivierten MAPK-Proteine selbst können ebenfalls in den Zellkern translozieren (Lenormand et al., 1993) und dort direkt Proteine phosphorylieren, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Dazu gehören die Ternary Complex Factors (TCF) Elk-1, SAP-1 und wahrscheinlich SAP-2 (Marais et al., 1993, Hill et al., 1993, Gille et al., 1995). Diese bilden einen Komplex mit dem SRF, der daraufhin an der Promotorregion von c-fos binden kann. Für die Transkription von c-fos sind allerdings weitere aktivierte Proteine notwendig, z.B. CREB (Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element-binding Protein), ein Protein, dass durch cAMP aktiviert wird (Ginty et al., 1994).

## 1.4 Gliome

### 1.4.1 Klassifikation der World Health Organisation (WHO)

Die World Health Organisation klassifiziert die Gehirntumoren aus Gliazellen in mehrere Grade. Diese Einteilung ist möglich, da immunhistochemische Methoden eine zuverlässige histopathologische Zuordnung ermöglichen (Kleihues et al., 1993):

#### *Astrozytäre Tumoren*

Pilozytisches Astrozytom	WHO Grad I
Astrozytom	WHO Grad II
Anaplastisches Astrozytom	WHO Grad III
Glioblastoma multiforme	WHO Grad IV

### *Nichtastrozytäre Tumoren*

Oligodendrogliom	WHO Grad II
Anaplastisches Oligodendrogliom	WHO Grad III
Oligoastrozytom (sog. Mischgliom)	WHO Grad II
Anaplastisches Oligoastrozytom	WHO Grad III
Ependymom	WHO Grad II
Anaplastisches Ependymom	WHO Grad III

Tumoren mit Grad I oder II werden als gutartig oder semibenigne eingestuft, Tumoren mit Grad III oder IV als bösartig. Niedriggradige Astrozytome bergen allerdings ein hohes Potential für eine Progression in anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) oder in das Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV).

#### 1.4.2 Prognose

Obwohl intensiv an der Verbesserung der bestehenden therapeutischen Verfahren und der Entwicklung neuer Lösungsstrategien gearbeitet wird, konnte bis zum heutigen Tag keine wesentliche Verbesserung der Prognose für Patienten mit malignen Gliomen erzielt werden. Nur bis zu 20 % der Patienten mit anaplastischen Gliomen (WHO Grad III) leben länger als fünf Jahre.

#### 1.4.3 Therapeutische Ansätze

Für die Therapie maligner Gliome werden zahlreiche Verfahren eingesetzt. Dazu gehören neurochirurgische Therapien, Strahlentherapien, Chemotherapien und lokale Therapieformen wie die lokale Applikation von Chemotherapeutika, lokale Immuntherapie und die Gentherapie.

Bei der *lokalen Immuntherapie* werden entweder spezifische Antikörper gegen Gliomzellen oder immunstimulierende Substanzen intratumoral angebracht.

Ziel der *Gentherapie* ist es, Tumorzellen selektiv mit einem Gen zu transduzieren, welches sie einer Therapie zugänglich macht. Gegenwärtig existieren zahlreiche Ansätze bezüglich der Zellfunktionen, die den günstigsten Angriffspunkt für diese Therapieform bieten (Kramm et al., 1995). Man versucht z.B. funktionsunfähige Tumorsuppressorgene zu ersetzen, die Zellen immunogen oder empfindlich für eine Chemotherapie zu machen.

Ein weiterer Ansatzpunkt für eine Gentherapie ist die Transduktion des Thymidinkinasegens des Herpes simplex Virus über einen retroviralen Vektor in humane Tumorzellen. Nach intravenöser Gabe von Ganciclovir wird über die Thymidinkinase und zelluläre Kinasen ein toxisches Genprodukt, ein Triphosphat, gebildet, das dann den Zelltod auslöst (Ram et al., 1997, Rainov et al., 2000).

## **1.5 Zielsetzung**

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung von Signalkaskaden in humanen Gliomzelllinien nach Stimulation mit OSM untersucht.

Durch den Vergleich der Zelllinie GOS 3, deren Wachstum durch OSM stark inhibiert wird, mit Zelllinien, deren Wachstum dagegen kaum gehemmt wird, sollten Proteine oder Signalkaskaden identifiziert werden, die an der Entstehung des antiproliferativen Effektes beteiligt sind. Die Proteine, die nur in GOS 3 aktiviert werden, können ursächlich für die Auslösung der Wachstumsinhibition sein.

Die Identifikation solcher Proteine könnte neue therapeutische Ansätze für die Behandlung maligner Gliome eröffnen. Diese Hypothese wird durch Experimente unterstützt, in denen sich der wachstumsinhibierende Effekt von OSM auf maligne Gliomzellen auch in vivo darstellen ließ (Friedrich et al., 2001).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agarose	FMC Bioproducts (Rockland)
Aprotinin	Bayer (Leverkusen)
APS (Ammoniumperoxydisulfat)	Fluka (Buchs)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Brij 96	Fluka (Buchs)
BSA (Rinderserumalbumin)	Pierce (Rockford)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
dNTP's (Desoxynucleotide)	Pharmacia (Freiburg)
DOC (Desoxycholat)	Sigma (Deisenhofen)
DTT (Dithiotreithol)	Gibco BRL (Eggenstein)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Boehringer (Mannheim)
EGTA (Ethylenglykol- bis( $\beta$ -Aminoethyl ether)-Tetraacetylsäure)	Sigma (Deisenhofen)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Amresco
Glycerol	Sigma (Deisenhofen)
Glycin	Merck (Darmstadt)
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Sigma (Deisenhofen)
Insulin	Sigma (Deisenhofen)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Leupeptin	Boehringer (Ingelheim)

L-Glutamin	Gibco BRL (Eggenstein)
LIF (Leukemia Inhibitory Factor)	Sigma (Deisenhofen)
Methanol	Riedel De Haën
NaCl (Natriumchlorid)	Merck (Darmstadt)
NaF (Natriumfluorid)	Sigma (Deisenhofen)
Natriumpyrophosphat	Sigma (Deisenhofen)
NP-40 (Nonidet P-40)	Pierce (Rockford)
Orthovanadat	Sigma (Deisenhofen)
OSM (Oncostatin M)	Sigma (Deisenhofen)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma (Deisenhofen)
PNS (Penicillin/Neomycin/Streptomycin)	Gibco BRL (Eggenstein)
Ponceau S	Sigma (Deisenhofen)
Protein A/G-Agarose	Santa Cruz (Kalifornien)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck (Darmstadt)
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Fluka (Buchs)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	ICN Biomedicals (Ohio)
Trizol	Gibco BRL (Eggenstein)
Trypsin	Gibco BRL (Eggenstein)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen)

## 2.2 Antikörper

Der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper, Anti-Jak2 und Anti-gp130 wurden von der Firma Biomol (Hamburg) geliefert und die Zweitantikörper (Peroxidase-gekoppelter Maus- bzw. Kaninchen-Antikörper) von der Firma DAKO (Glostrup).

Alle anderen Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz (Kalifornien) bezogen.

### 2.3 Enzyme

Die M-MLV (Moloney murine leukemia virus) Reverse Transcriptase wurde von der Firma Promega (Heidelberg), die Taq DNA-Polymerase von Beckmann (München) und die T<sub>4</sub> Polynukleotid-Kinase von Biolabs (New England) geliefert.

### 2.4 Primer

Gp130: 5'-GGA CCA AAG ATG CCT CAA CTT G-3' und  
5'-GGT CCC ACT CTA AGA CAG CTT-3' (0,84 kb) bzw.

5'-GTG GGA TCA CCT ATG AAG ATA GAC-3' und  
5'-GCA GGA ACT ACT AGT CCT TCA C-3' (1,82 kb)

LIFR $\beta$ : 5'-CCA TAC TCC TAC TTC ATT CAA AG-3' und  
5'-GAC ACT GTT AAT CGT TTG GTT TG-3' (2,01 kb)

OSMR $\beta$ : 5'-CAG GTG TTC CTA CCA AAT CTG CGT C-3' und  
5'- ATC GGC ATG CTG GTT AGC AGT AGT G-3' (1,46 kb)

Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

### 2.5 Puffer

PBS: 137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
80,9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH=7,4 (HCl)

TBE (10 ×):	89	mM Tris
	89	mM Borsäure
	2	mM EDTA
TBST:	50	mM Tris/HCl (pH=8,0)
	150	mM NaCl
	0,05	% Tween 20
TE:	10	mM Tris/HCl (pH=8,0)
	1	mM EDTA

## 2.6 Medien

FCS (Fetales Kälberserum) wurde von der Firma Gibco BRL (Eggenstein) bezogen. Alle anderen Materialien, die für die Medien benötigt wurden und nicht unter den Materialien aufgeführt wurden, lieferte die Firma Sigma (Deisenhofen).

FCS-Medium: DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) mit

5-10	% FCS	
5	µg/ml Penicillin	} PNS
5	µg/ml Streptomycin	
10	µg/ml Neomycin	

N 1-Medium: DMEM mit

2,5	mg/ml BSA	} N 1-Mix
5	µg/ml Transferrin	
16	µg/ml Putreszin	
5	µg/ml Progesteron	
5	ng/ml Natriumselenit	
25	µg/ml Insulin	

## 2.7 Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Bezugsquelle</i>
A 172 <sup>1</sup>	Glioblastom	Medizinische Klinik und Poliklinik, Innere Medizin A, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
A 172 <sup>2</sup>	Glioblastom	Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
GOS 3	Gemischtes Astro-Oligodendrogliom Grad II/III	Klinik und Poliklinik für Neurologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
U343MG	Glioblastom	Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen.

## 2.8 Oligonukleotide

Die doppelsträngigen Oligonukleotide SIE (5'-CTA GGA TTT ACG GGA AAT G-3') und Stat5 (5'-AGA TTT CTA GGA ATT CAA TCC-3') wurden von Santa Cruz Biotechnology, CA, geliefert.

## 2.9 Molekulargenetische Methoden

### 2.9.1 Isolation von RNA aus Zellen

Die RNA-Extraktion wurde modifiziert nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Konfluent gewachsene Zellen wurden mittels Trizol-Reagenz von den Kulturschalen abgelöst und lysiert. Nach Zugabe von Chloroform wurde das Lysat kräftig vermischt. Durch Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, 4°C) entstanden drei Phasen. Die obere Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene RNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (5 min, 14000 rpm, 4°C). Nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde die RNA in DEPC-Wasser aufgenommen. Nicht sofort verwendete RNA wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.9.2 Quantifizierung von RNA

Die durch Extraktion aus Zellen gewonnene RNA wurde photometrisch (Beckmann) quantifiziert. Dafür wurde die Extinktion der RNA-Lösung bei 260, 280 und 320 nm bestimmt. Eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm beträgt bei einer reinen RNA-Lösung 1,8-2,0.

### 2.9.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 2,5 µg der gereinigten RNA eingesetzt, die vor Zugabe der anderen Reagenzien für 5 min auf 65°C erhitzt wurde. Ein 50 µl-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

2,5	µg	RNA
10	µl	5 x Reverse Transkriptase Puffer (Promega, Madison)
1	mM	dNTPs
2	µg	Oligo d(T) <sub>12-18</sub> Primer (Pharmacia, Freiburg)
10	mM	DTT
20	U	RNAsin (Pharmacia, Freiburg)
200	U	M-MLV Reverse Transkriptase

Der Reaktionsansatz wurde 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C beendet.

#### 2.9.4 Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten Reaktion wurde in dem Gene Amp<sup>®</sup> Gerät von PE Applied Biosystems in 50 µl-Ansätzen mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

3	µl	cDNA-Gemisch
0,2	mM	dNTPs
10	x	PCR-Puffer (Perkin Elmer)
1	µM	je Primer

Erste Denaturierung: 94°C, 5 min

Während der folgenden Abkühlung wurden bei 85°C 2 U Taq-Polymerase dazugegeben.

Die Amplifikation der DNA erfolgte während 30 Zyklen:

1. Hybridisierung: Schmelztemperatur ( $T_m$  der Primer minus 2°C, wobei jeweils die niedrigere Schmelztemperatur der beiden Primer als  $T_m$  benutzt wurde), 30 s

2. Synthese: 72°C, 45 s

3. Denaturierung 94°C, 30 s

Letzte Synthese: 72°C, 5 min

Anschließend wurden die Ansätze auf 4°C abgekühlt.

### 2.9.5 Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden in 1,0-1,5 %igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Die Ethidiumbromid-Konzentration im Gel betrug 1 µg/ml. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 6 x DNA-Auftragspuffer vermischt. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für 20 bis 30 min in einem 1 x TBE-Puffer durchgeführt. Der Größenvergleich der DNA-Fragmente erfolgte mit geschnittener Lambda-DNA (Eco 91 I: 8454, 7242, 6369, 5686, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224, 117 bp, MBI Fermentas) als Längenstandard. Unter UV-Licht wurden die Banden mittels Ethidiumbromidfluoreszenz sichtbar gemacht und durch einen Orange-Filter abfotografiert.

### 2.9.6 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden in dem folgenden 30 µl-Reaktionsansatz markiert:

0,78-1,56 pM Oligonukleotid

10 x Puffer

50 µCi [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (NEN Research Products, Boston, MA)

10 U T4 Polynukleotid-Kinase

Nach 45minütiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz mit TE-Puffer auf 50 µl aufgefüllt und über eine Gelfiltrationssäule (Bio-Rad, Bad Homburg) gegeben. Die Einbaurate wurde in einem Szintillationszähler (LKB Wallac, Liquid Scintillation Counter) bestimmt.

## 2.10 Analyse von Proteinen

### 2.10.1 Anfertigung von Gesamtzell-Lysaten

Auf 60 mm-Petrischalen wurden  $8 \times 10^5$  (A 172<sup>1</sup>),  $4 \times 10^5$  (A 172<sup>2</sup>),  $9 \times 10^5$  (U343MG) und  $1 \times 10^6$  (GOS 3) Zellen in FCS-Medium ausgesät. Nach 16 bis 24 h wurde das Medium für weitere 24 h durch N1-Medium ersetzt. Dann erfolgte die Zugabe der in N1-Medium aufgenommenen Zytokine (LIF und OSM, 100 ng/ml Endkonzentration). Die Inkubation mit den Zytokinen wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten durch Waschen mit eiskaltem PBS-Puffer, der 1 mM Orthovanadat und 0,1 mM PMSF enthielt, beendet. Die Lyse wurde mit einem modifizierten RIPA-Puffer (50 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0,25% DOC, 0,1% SDS, 1 mM Orthovanadat, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin) durchgeführt und der Zelldebris wurde abzentrifugiert (14 000 rpm, 15 min, 4°C). Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden die Lysate mit 4 × SDS-Auftragspuffer versetzt und durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt.

### 2.10.2 Immunopräzipitation

Mit einem Lysis-Puffer (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5% Glycerin, 0,5% NP-40, 0,5% Brij, 0,25% DOC, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 1 mM Natrium-Pyrophosphat, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 0,1 mM Pefabloc, 10 mM NaF, 1 µg/ml Trasolyl) wurden Zell-Lysate angefertigt. Die Proteinmengen der Lysate wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen angeglichen. Nach Vorklärung der Zell-Lysate mit Protein A/G-Agarose (Santa Cruz, Kalifornien) für 30 min bei 4°C erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern über Nacht (16 bis 20 h). Für 1 h wurde erneut Protein A/G-Agarose zugegeben, die anschließend abzentrifugiert wurde (30 s, 10 000 rpm, 4°C). Die Agarose wurde mit Lysis-Puffer, der 0,1 % NP-40 enthielt, gewaschen. Die Proteine wurden im Waschpuffer durch Zugabe von 4 × SDS-Auftragspuffer und

Erhitzen (5 min, 100°C) eluiert. Die weitere Analyse erfolgte durch Auftragen der Präzipitate auf ein SDS-Polyacrylamidgel und folgenden Western Blot.

### 2.10.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford) ermittelt. Nach Erstellen einer Eichkurve mittels Lösungen bekannter Proteinkonzentrationen (BSA von Pierce, Rockford) wurden die Extinktionen der Proben bei 595 nm photometrisch bestimmt und ihre Konzentrationen durch Vergleich mit der Eichkurve festgestellt.

### 2.10.4 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine wurde in vertikalen SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Konzentrationen variierten zwischen 8% (z.B. Auftrennung der Gesamtzell-Lysate) und 12% (Auftrennung von Proteinen mit niedriger molarer Masse, z.B. 43 kDa). Die Dicke betrug 1 mm. Die Gele wurden nach der Methode von Laemmli (1970) hergestellt. Die Gele bestanden aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 4 × SDS-Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese fand während des Durchlaufens des Sammelgels bei 120 V statt und beim Durchlaufen des Trenngels bei 180 V. Die Dauer einer Auftrennung betrug 1,5 h (8%iges Gel) bis 2 h (12%iges Gel). Als Molekulargewichtsstandard wurde eine Protein-Standardmischung (Protein-Standardmischung VIII von Merck, Darmstadt) verwendet.

### 2.10.5 Western Blot

Die in einem Gel aufgetrennten Proteine wurden in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran (Millipore Immobilon™-P) transferiert

(Schnelltransfer: 2 h, 70 V oder Transfer über Nacht: 16 bis 18 h, 20 V). Die Qualität des Transfers wurde durch Anfärbung der auf der Membran gebundenen Proteine mit Ponceau S festgestellt. Nach Abwaschen aller Farbstoffreste mit TBST-Puffer wurden unspezifische Bindungsstellen durch einstündiges Bewegen der Membran in einem Blockierungspuffer (Pierce, Rockford) blockiert. Dann wurde der entsprechende Erstantikörper dazugegeben und für 2 h oder über Nacht (16 bis 18 h) mit dem Blot inkubiert.

#### 2.10.6 Detektion mit dem ECL-Verfahren

Nach Abwaschen des Erstantikörpers mit TBST-Puffer wurde die PVDF-Membran für 1 h mit einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus- oder Ziege-anti-Kaninchenantikörper inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden mit TBST-Puffer abgewaschen, bevor die Membran nach den Anweisungen des Herstellers mit dem Chemilumineszenzsubstrat (Pierce, Rockford) inkubiert wurde. Der Blot wurde auf einen X-OMAT-MS- oder auf einen X-OMAT-AR-Röntgenfilm (Kodak, Rochester) aufgelegt. Die Expositionszeit betrug in Abhängigkeit von der Stärke der Reaktion 10 bis 90 s.

#### 2.10.7 Entfernen der Antikörper von PVDF-Membranen

Zur Entfernung der an einen Blot gebundenen Antikörper wurde die Membran für 40 min bei 50°C unter ständiger Bewegung in einem Strip-Puffer (2% SDS, 62,5 mM Tris pH 6,8, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) inkubiert und daraufhin mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend konnte sie erneut verwendet werden.

### 2.10.8 Kernextraktion

Für Kernextraktionen wurden  $4 \times 10^6$  (A 172) bis  $6 \times 10^6$  (GOS 3 und U343MG) Zellen auf große Petrischalen ( $\varnothing = 15$  cm) ausgesät. Nach Aushungern (24 h in N1-Medium) und Zytokinbehandlung (LIF oder OSM, 100 ng/ml, 15 min) wurden die Zellen lysiert (0,2% NP-40, 20 mM Hepes pH=7,9, 10% Glycerol, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0,2 mM  $\text{NaVO}_3$ , 0,5 mM PMSF, 10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin). Die Zellkerne wurden sedimentiert (3 000 x g, 2°C, 10 min) und die Proteine durch Zugabe von Extraktionspuffer (20 mM Hepes pH=7,9, 420 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 20% Glycerol, 0,5 mM DTT, 0,2 mM  $\text{NaVO}_3$ , 0,5 mM PMSF, 10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin) extrahiert. Der Zelldebris wurde abzentrifugiert (16 000 x g, 2°C, 20 min) und der Überstand gegen Puffer A (20 mM Hepes pH=7,9, 100 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 20% Glycerol, 0,2 mM  $\text{NaVO}_3$ , 0,5 mM PMSF) dialysiert (16 bis 20 h). Die Kernextrakte wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen entweder sofort verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

### 2.10.9 Elektrophoretischer Mobilitätshift-Assay (EMSA)

Für einen Reaktionsansatz zur Bestimmung der DNA-Bindungskapazität wurden 10  $\mu\text{g}$  der Kernextrakte eingesetzt und 20 min bei Raumtemperatur mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden Sie und Stat5b (20 000 cpm) inkubiert. Die Reaktion fand in einem Reaktionspuffer (10 mM Tris pH=7,5, 50 mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 5% Glycerol) statt, der Poly(dI-dC) • Poly(dI-dC) (Pharmacia, Freiburg) als Kompetitor zur Unterdrückung unspezifischer DNA-Bindung enthielt. Nach 20 min Inkubationsdauer wurden die Proben auf ein natives Tris/Glycin-Acrylamidgel aufgetragen.

#### 2.10.10 Gel Supershift Assay

10 µg der Kernextrakte wurden zusammen mit einem Antikörper (5µg/ml) gegen eines der DNA-bindenden Proteine in einem Reaktionspuffer inkubiert (30 min, Raumtemperatur). Dann wurde ein EMSA, wie unter 2.10.9 beschrieben, durchgeführt.

#### 2.10.11 Native Tris/Glycin-Acrylamidelektrophorese

Die Auftrennung wurde in vertikalen Elektrophoresekammern mit 4 %igen Acrylamidgelen, die eine Schichtdicke von 1,5 mm hatten, durchgeführt. Nach einem 30 bis 60 min langen Vorlauf bei 100 V wurden die Proben in die gespülten Kammern gefüllt. Die Dauer der Elektrophorese betrug 2 bis 3 h und wurde bei 120 bis 180 V im Kühlschrank durchgeführt.

#### 2.10.12 Autoradiographie

In einem Gel aufgetrennte, radioaktiv markierte Moleküle wurden durch Auflegen des Gels auf einen X-OMAT-AR-Film oder X-OMAT-MS-Film (Kodak, Rochester) mit Verstärkerfolie detektiert. Die Exposition fand bei -80°C statt und dauerte in Abhängigkeit von der Signalstärke 3 bis 24 h.

## 2.11 Zellkultur

### 2.11.1 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden bei 6% CO<sub>2</sub>, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank (Heraeus) kultiviert. Als Nährmedium wurde 5 bis 10%iges FCS-Medium verwendet. Nach 4 bis 6 Tagen waren die Zellen konfluent gewachsen und mussten geteilt werden. Das Aussetzen und Versorgen der Zellen wurde an einer sterilen Werkbank durchgeführt (Labortech Göttingen).

### 2.11.2 Teilen der Zellen

Das Medium wurde von den Kulturflaschen (Nunc) abgenommen und Reste wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Das Ablösen der Zellen wurde durch dreiminütige Inkubation mit 0,1% Trypsin/EDTA im Brutschrank erreicht. Die Zellen wurden in FCS-Medium aufgenommen und 4 min bei 1000 rpm (Heraeus) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in FCS-Medium resuspendiert. Geteilt wurden sie in einem Verhältnis von 1:40 (GOS 3 und U343MG) oder von 1:60 (A 172).

Die genaue Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 2.11.3 Einfrieren der Zellen

Konfluent gewachsene Zellen wurden von den Kulturschalen abgelöst und nach der Sedimentation in 1,8 ml FCS-Medium einschließlich 10% DMSO resuspendiert. Sie wurden in Gefriererörchen (Nunc) gefüllt, die für 24 h bei –20°C gelagert und anschließend in einem Stickstoffbehälter (KSeries) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

#### 2.11.4 Auftauen der Zellen

Die Gefrierröhrchen wurden bei 37°C im Wasserbad angetaut. Dann wurden die Zellen in FCS-Medium überführt und sedimentiert (4 min, 1000 rpm), sobald sie aufgetaut waren. Nach Resuspension in frischem Medium wurden sie in Kulturflaschen im Brutschrank kultiviert.

### 2.12 Bestimmung der Zellproliferation

#### 2.12.1 BrdU-Test

Für die Bestimmung der Zellvermehrung wurde ein Zellproliferationstest (Boehringer Mannheim) verwendet. Auf 96-well-Platten (Nunc) wurden 1000 bis 1500 Zellen pro well ausgesät, die jeweils 24 h in FCS-Medium und anschließend in N1-Medium inkubiert wurden. Die Zytokine (LIF und OSM) wurden in N1-Medium aufgenommen, in dem die Zellen für weitere 24 bis 48 h inkubiert wurden. BrdU (10 µM Endkonzentration) wurde direkt in das Medium gegeben. Nach 24 h wurde der Test nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Absorption wurde in einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) -Reader (Behring-Werke, Marburg) bei 450 nm gemessen.

Alle Ergebnisse einschließlich der Negativproben (Inkubation von wells ohne Zellen und von wells mit Zellen, aber ohne BrdU) sind die Mittelwerte von Triplets.

### **3 Ergebnisse**

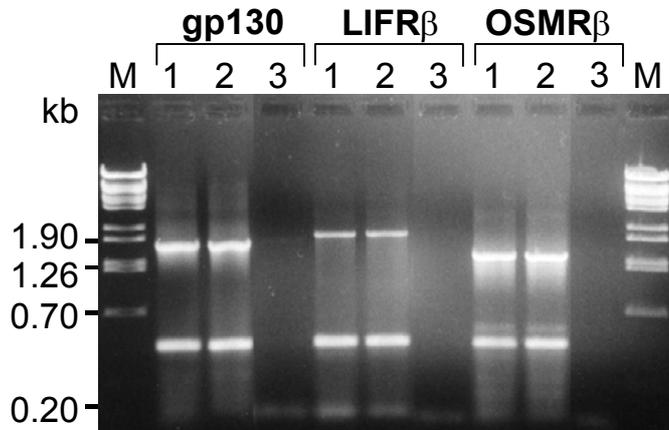
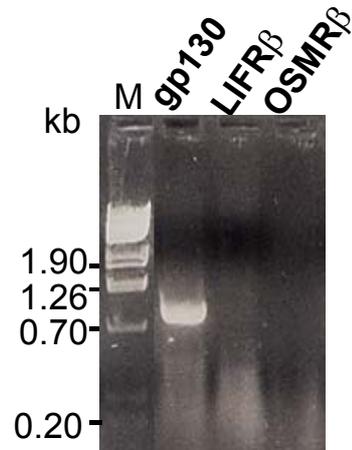
#### **3.1 Expression der Rezeptorkomponenten gp130, OSMR $\beta$ und LIFR $\beta$ in den Gliomzelllinien**

Die Voraussetzung für den Vergleich der Signalkaskaden in den Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup> und U343MG nach Stimulation mit OSM und LIF war die Expression der Rezeptorkomponenten gp130, OSMR $\beta$  und LIFR $\beta$ . Durch diese Rezeptorkomponenten werden der Typ I OSM-Rezeptor und der Typ II OSM-Rezeptor gebildet, so dass beim Vorhandensein beider Rezeptortypen beide Zytokine Signale in die Zelle vermitteln können.

Aus unstimulierten, logarithmisch wachsenden Zellen wurde mRNA isoliert, die für die Synthese von cDNA eingesetzt wurde. In einer folgenden PCR-Reaktion konnte nun überprüft werden, ob alle Rezeptorkomponenten exprimiert wurden.

In den Zelllinien U343MG und A 172<sup>1</sup> wurden die drei Rezeptorkomponenten nachgewiesen. Die Expression von gp130, OSMR $\beta$  und LIFR $\beta$  in der Zelllinie GOS 3 war bekannt (Halfter et al., 1999).

In der Zelllinie A 172<sup>2</sup> war nur gp130 in der PCR-Reaktion nachweisbar (Abbildung 3-1).

**A.****B. A 172<sup>2</sup>**

**Abbildung 3-1:** A: Nachweis der Rezeptorkomponenten gp130, OSMR $\beta$  und LIFR $\beta$  in den Zelllinien A 172<sup>1</sup> (1) und U343MG (2). In der 3. Spur wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. B: In der Zelllinie A 172<sup>2</sup> ließ sich nur die Rezeptorkomponente gp130 nachweisen. In der mit M bezeichneten Spur findet sich der Proteinstandard.

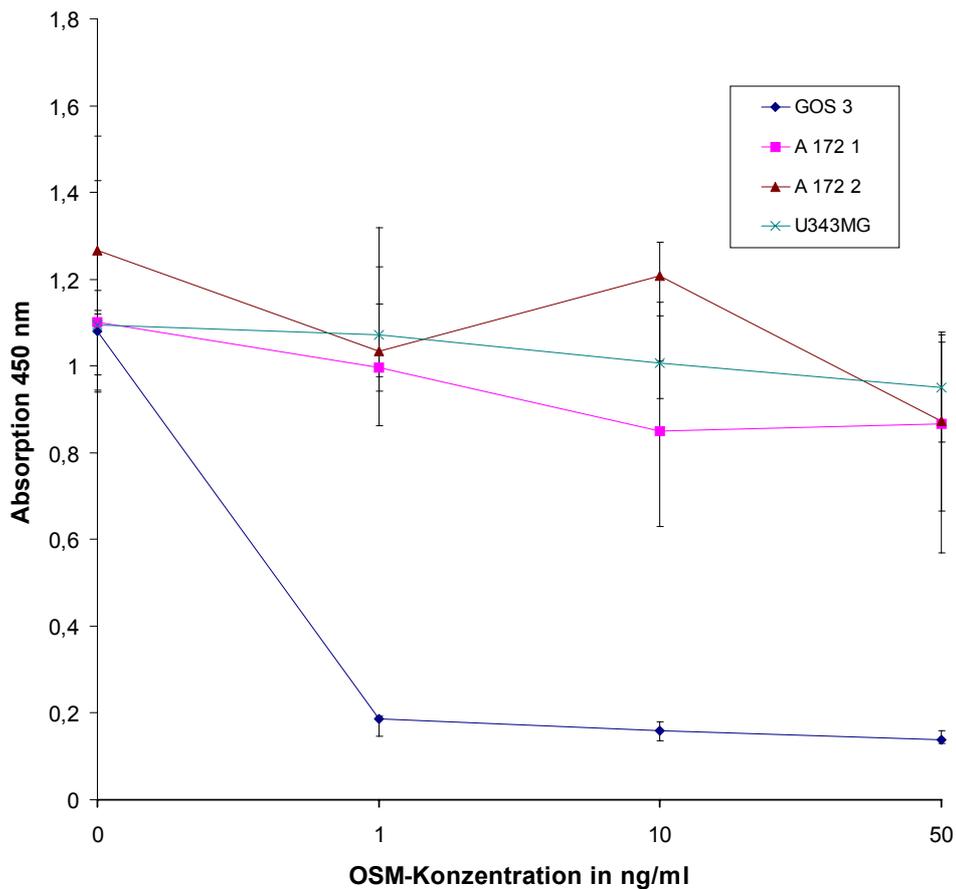
### 3.2 Effekt von OSM auf die Proliferation der Gliomzellen

Mittels eines BrdU-Tests wurde die proliferative Aktivität der Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup>, A 172<sup>2</sup> und U343MG nach Behandlung mit OSM untersucht.

Die Zelllinie GOS 3, bei der eine signifikante Wachstumsinhibition durch OSM bekannt war (Halfter et al., 1998), wurde als Referenz für den Effekt von OSM in die Experimente einbezogen.

Die Zelllinie A 172<sup>2</sup> exprimiert, wie in Abschnitt 3.1 dargestellt, keine OSM-Rezeptoren und diente als Kontrolle für Effekte, die über diese Rezeptoren ausgelöst wurden.

Die Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup> und U343MG exprimierten beide OSM-Rezeptortypen auf ihren Zelloberflächen und konnten deshalb nach Stimulation mit OSM und LIF intrazelluläre Signalwege aktivieren.



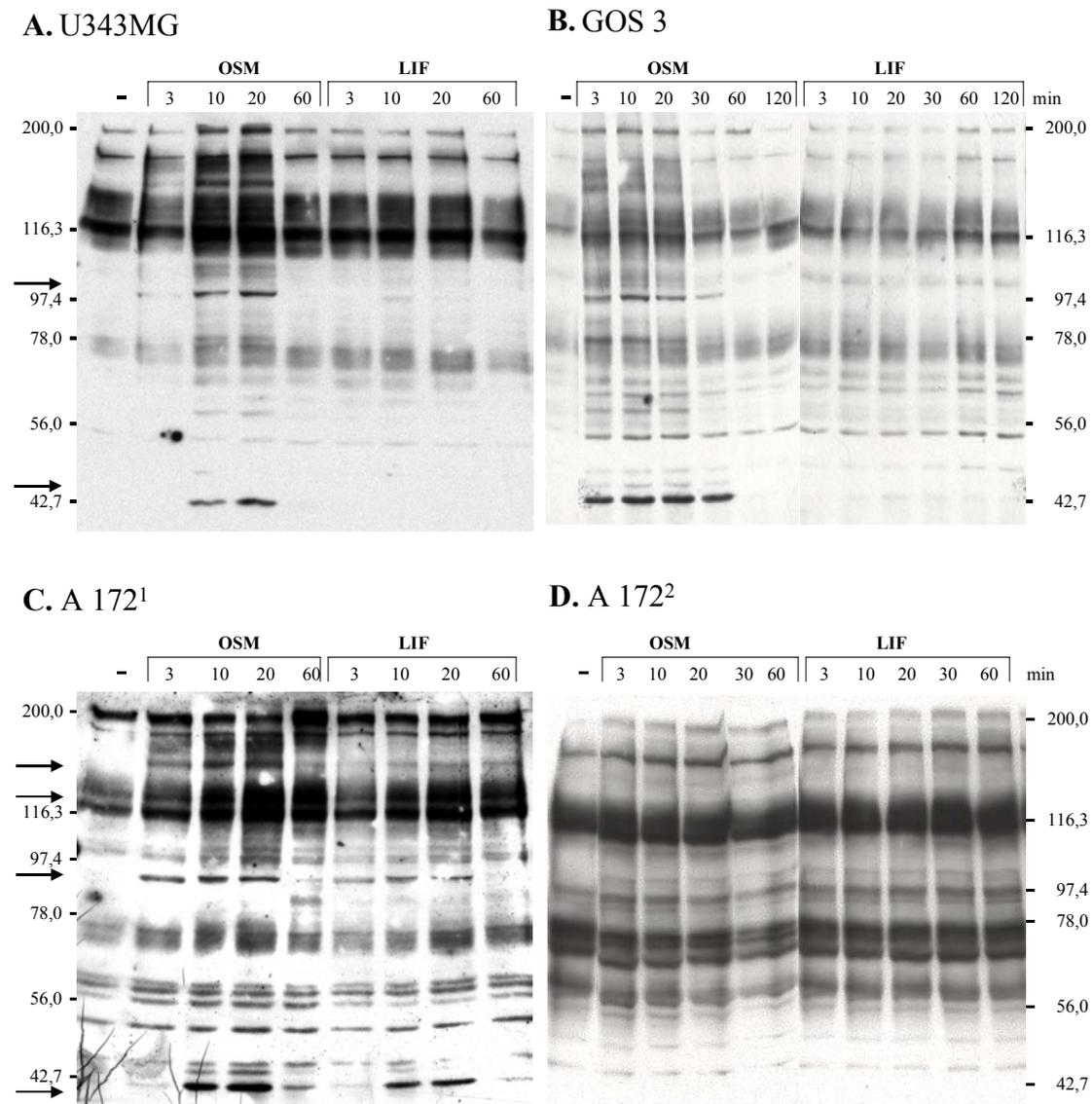
**Abbildung 1:** Das Wachstumsverhalten der Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup>, A 172<sup>2</sup> und U343MG nach Stimulation mit OSM als Dosis-Wirkungskurve in Abhängigkeit von der OSM-Konzentration. Ein Punkt stellt den Mittelwert eines Triplets dar und wird mit höchster und niedrigster Abweichung angegeben. Die Absorption ist ein Parameter für den Einbau von BrdU in die DNA der Zellen und zeigt damit direkt ihre Wachstumsrate an.

Nach Stimulation mit OSM reduzierten die Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup> und U343MG ihre Wachstumsraten. Die als Referenz benutzte Zelllinie GOS 3 zeigte die stärkste Wachstumsinhibition auf 20-30% bereits bei einer OSM-Konzentration von 1 ng/ml. A 172<sup>1</sup> und U343MG zeigten nur eine geringfügige Wachstumsverlangsamung, A 172<sup>2</sup> keine.

### **3.3 Analyse der Tyrosinphosphorylierung durch OSM und LIF in Zell-Lysaten**

Durch die Assoziation der Rezeptoruntereinheiten mit den zytoplasmatischen Tyrosin-Kinasen der Jak-Familie lässt sich die Signalübertragung in die Zelle hinein anhand des Nachweises tyrosinphosphorylierter Proteine beweisen. Diese Tyrosinphosphorylierung wurde in Gesamtzelllysaten gezeigt.

Die Zellen wurden für verschiedene Zeitspannen mit den Zytokinen OSM und LIF behandelt und anschließend lysiert. Die Proteine wurden auf 8 %igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und danach auf PVDF-Membranen transferiert. Hier wurden die an ihren Tyrosinresten phosphorylierten Proteine durch Inkubation mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper markiert und nach Inkubation mit einem Anti-Maus-Antikörper mit dem ECL-Verfahren detektiert. Als Ausgangswert diente ein Totalzell-Lysat von unstimulierten Zellen.



**Abbildung 3-2:** Vergleich der durch die Zytokine OSM und LIF induzierten Tyrosinphosphorylierung in den Zelllinien U343MG (A), GOS 3 (B), A 172<sup>1</sup> (C) und A 172<sup>2</sup> (D). Zur Darstellung der zytokininduzierten Effekte wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle eingesetzt. Die molaren Massen der Proteine werden in kD angegeben. Durch Pfeile werden auffällige Signale markiert.

### 3.3.1 Tyrosinphosphorylierung in Abhängigkeit von der Zeit

Die Signalübertragung in die Gliomzellen durch OSM oder LIF wurde bereits nach drei Minuten durch Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Proteine nachweisbar.

In den *GOS 3*-Zellen wurde zu diesem Zeitpunkt eine maximale Phosphorylierung erreicht, die für 20 min aufrechterhalten wurde. Nach 30 min nahm sie leicht ab und nach 60 min war die Tyrosinphosphorylierung nicht mehr nachweisbar.

In den Zelllinien *A 172*<sup>1</sup> und *U343MG* wurde eine maximale Tyrosinphosphorylierung nach 10 min erreicht und für 10 min aufrechterhalten. Danach sanken Zahl und Intensität der phosphorylierten Proteine. Nach 60 min war kein Effekt mehr sichtbar.

In *A 172*<sup>2</sup> wurde durch die Stimulation mit den Zytokinen im beobachteten Zeitraum keine Tyrosinphosphorylierung induziert. Auffällig war hier die hohe Zahl konstitutiv phosphorylierter Proteine.

### 3.3.2 Tyrosinphosphorylierung in Abhängigkeit vom Zytokin

In der Zelllinie *GOS 3* wurde nach Stimulation mit OSM eine stärkere Tyrosinphosphorylierung sichtbar, als nach Behandlung mit LIF. Einige Proteine wurden spezifisch nur nach OSM-Behandlung an Tyrosinresten phosphoryliert. Diese Proteine entsprachen apparenten molaren Massen von 150, 98 und 85 kD. Eine weitere Gruppe von Proteinen wurde zwar auch nach Stimulation mit LIF phosphoryliert, aber wesentlich stärker nach Stimulation mit OSM. Dabei handelte es sich um Proteine mit molaren Massen von 145 bis 160, 130, 89, 55 und 42 kD. Ein Protein mit einer apparenten molaren Masse von 92 kD wurde nach Behandlung der Zellen mit OSM und LIF jeweils gleich stark aktiviert.

In der Zelllinie *A 172*<sup>1</sup> war die Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation mit OSM und LIF ungefähr gleich stark. Das Muster der phosphorylierten Proteine war sehr ähnlich. Proteine mit molaren Massen von 130, 98, 92, 89, 85, 55 und 42 kD wurden nach Behandlung der Zellen mit OSM und LIF vom Anti-Phosphotyrosin-Antikörper erkannt. Eine Gruppe von Proteinen mit einer apparenten molaren Masse von 145 bis 160 kD wurde stärker nach Behandlung mit OSM phosphoryliert als nach Behandlung mit LIF.

Die molaren Massen der tyrosinphosphorylierten Proteine nach Behandlung mit OSM und LIF in *U343MG* glichen denen in GOS 3. Die Zellen der Zelllinie *U343MG* reagierten auf die Stimulation mit OSM gegenüber der mit LIF mit einer deutlich stärkeren Phosphorylierung der Proteine. Proteine, die nach Stimulation der Zellen mit OSM stärker detektiert wurden, hatten molare Massen von 130, 89, 55 und 42 kD. Proteine mit molaren Massen von 150, 98 und 85 kD wurden nur nach Stimulation mit OSM phosphoryliert.

In *A 172*<sup>2</sup> waren weder Quantität noch molare Massen der tyrosinphosphorylierten Proteine nach Stimulation der Zellen mit OSM und LIF im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen verändert.

### 3.3.3 Tyrosinphosphorylierung in Abhängigkeit von der Zelllinie

In den Zelllinien GOS 3, *A 172*<sup>1</sup> und *U343MG* wurde durch Stimulation mit OSM eine starke Tyrosinphosphorylierung der intrazellulären Proteine bewirkt. Unabhängig von der Zelllinie wurden die gleichen Proteine phosphoryliert. Wegen der starken Reaktion bei der Detektion mit dem ECL-Verfahren fielen besonders Proteine mit molaren Massen von 150, 130, 98, 92, 89, 85, 55 und 42 kD auf.

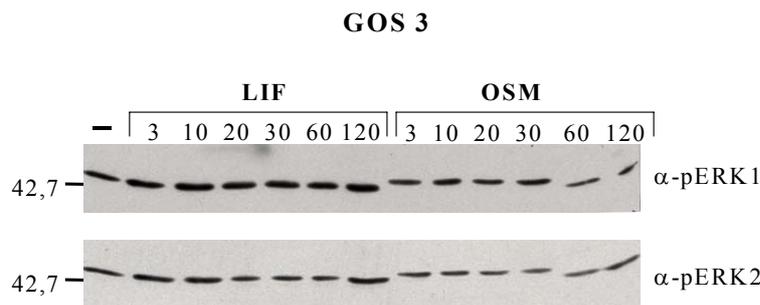
In der Zelllinie *A 172*<sup>1</sup> wurden diese Proteine nach Stimulation der Zellen mit LIF gleich stark phosphoryliert.

In den beiden anderen Zelllinien war die Tyrosinphosphorylierung nach Behandlung mit LIF deutlich schwächer als nach Stimulation mit OSM. Nur schwach phosphoryliert wurden Proteine mit molaren Massen 130, 89, 55, und 42 kD, nicht phosphoryliert wurden Proteine mit molaren Massen von 150, 98 und 85 kD. Jeweils gleich stark nach OSM- und LIF-Stimulation wurde ein Protein mit einer molaren Masse von 92 kD detektiert.

### 3.4 Identifizierung des 42 kD-Proteins

Da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass ERK1 und ERK2, zwei Proteine der MAPK-Signalkaskade, molare Massen von 42 und 44 kD haben (Marshall, 1994), war es naheliegend, das im Abschnitt 3.3 in den Ganzzell-Lysaten beschriebene 42 kD-Protein in diesem Zusammenhang zu überprüfen.

Dazu wurden Anti-Phosphotyrosin-Antikörper von PVDF-Membranen, auf denen sich transferierte Ganzzell-Lysate von GOS 3 befanden, entfernt. Die Membranen wurden entweder mit einem Anti-ERK1- oder Anti-ERK2-Antikörper inkubiert. Durch die Zugabe eines Anti-Maus-Antikörpers wurden ihre Bindungsstellen mit dem ECL-Verfahren sichtbar gemacht.



**Abbildung 3-3:** Aktivierung der MAPK-Proteine ERK1 und ERK2.

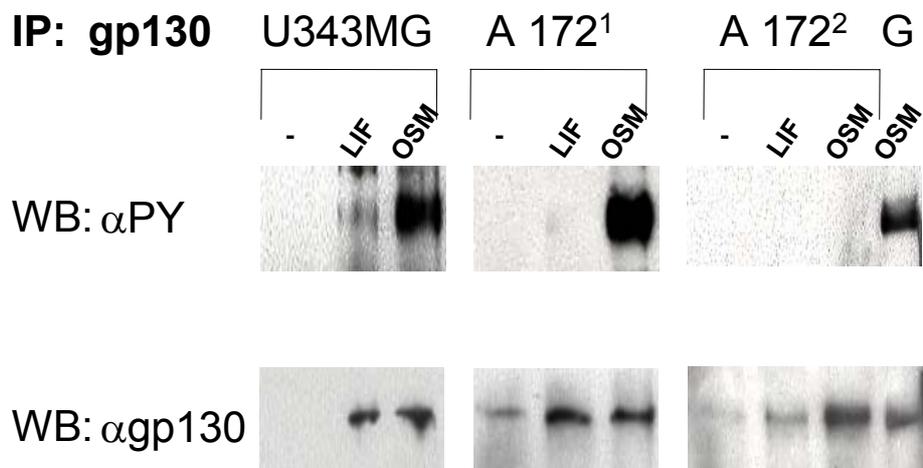
Die Bindungsstellen des ERK1- und des ERK2-Antikörpers waren an der gleichen Stelle wie das mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper dargestellte 42 kD-Protein lokalisiert. Das bewies, dass es sich um die beiden Moleküle der MAPK-Signalkaskade handelte.

Die detektierten Signale wiesen in allen Spuren eine vergleichbare Intensität auf.

### 3.5 Aktivierung der Rezeptorkomponente gp130

Nach Bindung der Liganden OSM oder LIF kommt es zu der Aktivierung der Signalkaskaden, die zu einer Tyrosinphosphorylierung der Rezeptorkomponenten führt. Zum Nachweis der Aktivierung der Rezeptorkomplexe durch OSM und LIF in den Zelllinien A 172<sup>1</sup> und U343MG wurde die Tyrosinphosphorylierung von gp130 nach Stimulation mit den Zytokinen untersucht.

Das Protein wurde nach Stimulation der Zellen mit OSM und LIF für 10 min durch Immunopräzipitation immobilisiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach einem Western Blot wurde es auf der PVDF-Membran aufeinanderfolgend zunächst mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper und dann mit einem Anti-gp130-Antikörper dargestellt.



**Abbildung 3-4:** Aktivierung der Rezeptorkomponente gp130, dargestellt durch Immunopräzipitation (IP). In einem ersten Versuch wurden die präzipitierten Proteine mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY) dargestellt, in einem zweiten Versuch mit dem spezifischen Antikörper gegen gp130 ( $\alpha$ gp130). Als Positivkontrolle wurde GOS 3 (G) in die Versuche einbezogen.

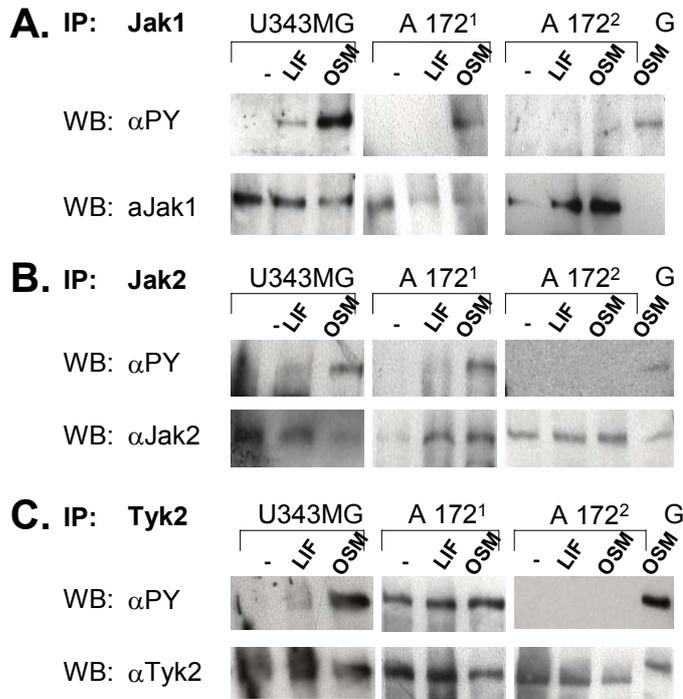
Gp130 wurde nach Behandlung mit OSM und LIF in der Zelllinie U343MG phosphoryliert. Die Phosphorylierung war nach Stimulation der Zellen mit OSM deutlich stärker als nach Stimulation mit LIF. In der Zelllinie A 172<sup>1</sup> führte die Stimulation mit LIF nicht zu der Aktivierung von gp130, während die Stimulation mit OSM zu einer starken Aktivierung der Rezeptorkomponente führte. In der Zelllinie A 172<sup>2</sup> wurde gp130 weder durch Stimulation mit OSM noch durch Stimulation mit LIF aktiviert.

### **3.6 Aktivierung der Signalkaskaden**

Die Proteine der bekannten OSMR-/LIFR-Signalkaskaden wurden mittels Immunopräzipitationen aus Ganzzell-Lysaten präzipitiert, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und dann auf eine PVDF-Membran transferiert. Hier wurden die Tyrosinphosphorylierung und die Quantität der präzipitierten Proteine untersucht. Dazu wurden in einem ersten Versuch Antikörper eingesetzt, die tyrosinphosphorylierte Proteine erkannten, und in einem zweiten Versuch spezifische Antikörper gegen das relevante Protein. Bei den Proteinen aus den Signalkaskaden handelte es sich um Jak1, Jak2 und Tyk2 (Mitglieder aus der Familie der Janus-Kinasen), um Stat1, Stat3 und Stat5b (Mitglieder aus der Stat-Familie) sowie um MAPK und SHP-2 (Proteine aus der MAPK-Signalkaskade).

### 3.6.1 Die Jak/Stat-Signalkaskade

#### 3.6.1.1 Aktivierung der Janus-Kinasen



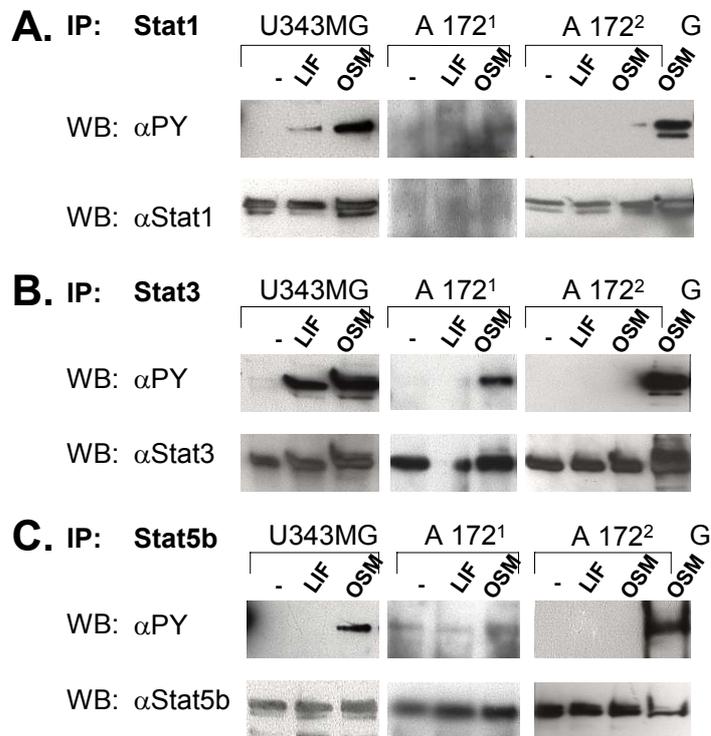
**Abbildung 3-5:** Tyrosinphosphorylierung der Janus-Kinasen Jak1 (A), Jak2 (B) und Tyk2 (C) in Abhängigkeit von OSM und LIF. Kontrollzellen (-) wurden nicht behandelt. GOS 3 (G) wurde als Kontrolle des OSM-Effektes mit OSM inkubiert.

Jak1, Jak2 und Tyk2 wurden in den Zelllinien A 172<sup>1</sup> und U343MG nach Stimulation mit OSM und LIF aktiviert. Die Tyrosinphosphorylierung der Proteine war nach Behandlung der Zellen mit OSM wesentlich stärker als nach Stimulation mit LIF. Der stärkste Effekt wurde nach OSM-Stimulation in der Zelllinie GOS 3 (GOS 3 wurde als Kontrolle ebenfalls mit OSM behandelt) erreicht.

Ausschließlich in der Zelllinie A 172<sup>1</sup> war eine konstitutive Aktivierung von Tyk2 nachzuweisen.

In A 172<sup>2</sup> wurde keine Kinase aus der Janus-Familie phosphoryliert.

### 3.6.1.2 Aktivierung der Stat-Proteine



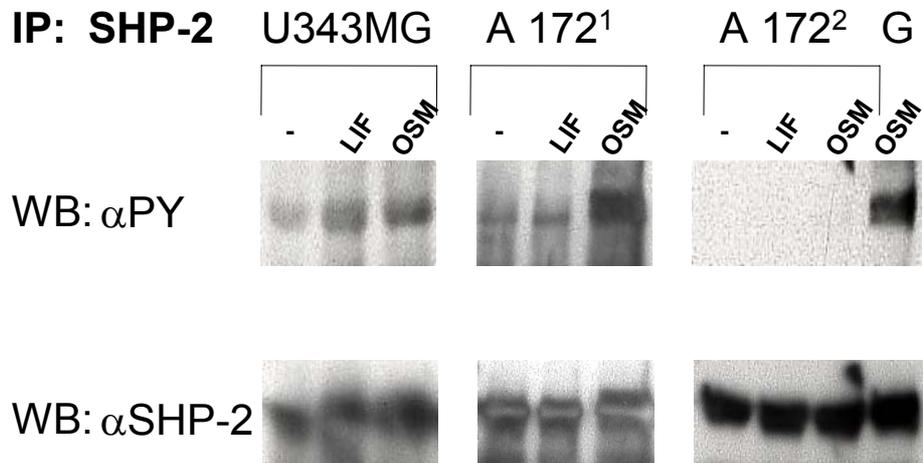
**Abbildung 3-6:** Aktivierung der Stat-Proteine Stat1 (A), Stat 3 (B) und Stat5b (C) durch die Zytokine OSM und LIF. Als Kontrolle wurde eine Immunopräzipitation bei unstimulierten Zellen (-) und bei OSM-stimulierten GOS 3-Zellen (G) durchgeführt.

Stat1 und Stat3 wurden nach Behandlung der Zelllinien A 172<sup>1</sup> und U343MG mit OSM und LIF phosphoryliert, wobei die Aktivierung nach Stimulation mit LIF schwächer war. Stat5b wurde nur nach Inkubation der Zellen mit OSM phosphoryliert, die Stimulation mit LIF hatte keinen Effekt auf dieses Protein.

Die stärkste Tyrosinphosphorylierung wurde bei Stat3 beobachtet.

In der Zelllinie A 172<sup>2</sup> sah man weder nach OSM-Behandlung noch nach Behandlung mit LIF einen Effekt auf die Stat-Proteine.

### 3.6.2 Die MAPK-Signalkaskade



**Abbildung 3-7:** Darstellung der Tyrosinphosphorylierung von SHP-2 in Abhängigkeit von OSM und LIF. Zum Vergleich wurden auch unbehandelte Zellen (-) und OSM-behandelte GOS 3-Zellen (G) untersucht.

SHP-2 wurde nach Stimulation mit OSM und LIF in den Zelllinien A 172<sup>1</sup> und U343MG phosphoryliert. Die Tyrosinphosphorylierung war nach Behandlung mit LIF etwas schwächer. In beiden Zelllinien wurde eine konstitutive Aktivierung von SHP-2 festgestellt.

Bereits in den Ganzzell-Lysaten wurde gezeigt, dass die MAPK in den Zelllinien A 172<sup>1</sup> und U343MG nach Stimulation mit OSM und LIF phosphoryliert wurde. Der Effekt war nach Einfluss von LIF im Vergleich mit OSM schwächer ausgeprägt. Die stärkste Aktivierung der MAPK bewirkte OSM in der Zelllinie GOS 3.

In der Zelllinie A 172<sup>2</sup> wurden beide Proteine weder nach Stimulation mit OSM noch nach Behandlung mit LIF aktiviert.

### 3.7 DNA-Bindung der aktivierten Signalmoleküle

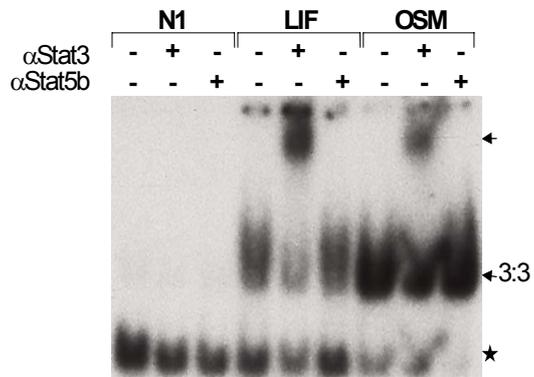
Die Stat-Proteine translozieren nach ihrer Aktivierung in den Zellkern, wo sie sequenzspezifisch an DNA binden.

Um die Aktivierung, die anschließende Translokation in den Zellkern und die DNA-Bindung der Stat-Proteine in den Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup> und U343MG vergleichen zu können, wurden die Proteine aus den Zellkernen extrahiert, nachdem die Stimulation mit OSM und LIF stattgefunden hatte. Die Kernextrakte wurden mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden, SIE mit Stat1- und Stat3-Bindungsstellen und Stat5 mit einer Konsensussequenz für das Protein Stat5b, inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde auf einem nativen Tris/Glycin-Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay = EMSA).

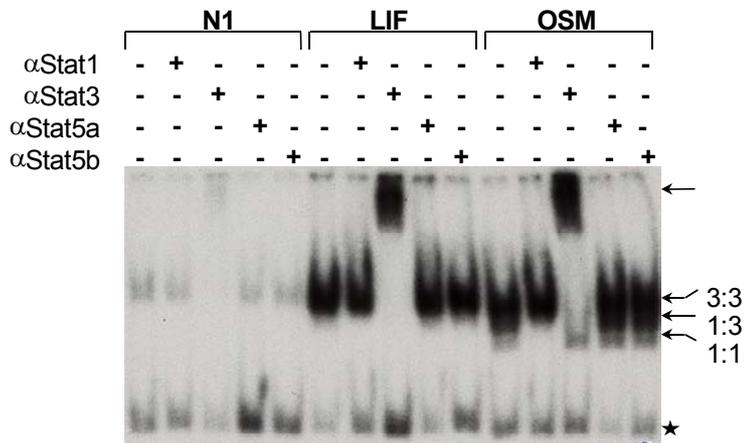
In parallelen Ansätzen wurden die Kernextrakte vor der Zugabe der Oligonukleotide mit Antikörpern gegen verschiedene Mitglieder der Stat-Familie im Gel Supershift Assay inkubiert. Dadurch konnte die Zusammensetzung der DNA-bindenden Komplexe identifiziert werden. Komplexe aus Antikörper, Stat-Protein und Oligonukleotid besitzen die niedrigste Mobilität im Gel.

3.7.1 Bindung an das Oligonukleotid SIE

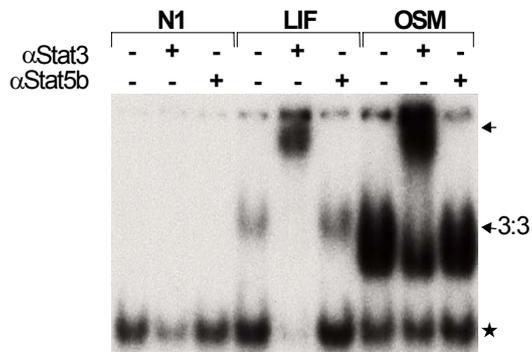
**A. U343MG**



**B. A 172<sup>1</sup>**



**C. GOS 3**



**Abbildung 3-8:** Identifizierung der an das SIE-Fragment bindenden Stat-Proteine aus Kernextrakten im EMSA und im Gel Supershift Assay nach Stimulation mit OSM und LIF.

### *3.7.1.1 Ergebnisse des Elektrophoretischen Mobilitätshift-Assays*

In der Zelllinie A 172<sup>1</sup> fand DNA-Bindung bereits bei Anwendung von Kernextrakten aus unstimulierten Zellen statt. Sie verstärkte sich nach Stimulation mit LIF. Nach Behandlung mit OSM wurde ein zusätzlicher Komplex mit höherer Mobilität im Gel gebildet. In den anderen Zelllinien wurde keine konstitutive DNA-Bindung beobachtet, die DNA-Bindung nach Stimulation mit LIF und OSM war vergleichbar mit der Zelllinie A 172<sup>1</sup>.

### *3.7.1.2 Ergebnisse des Gel Supershift Assays*

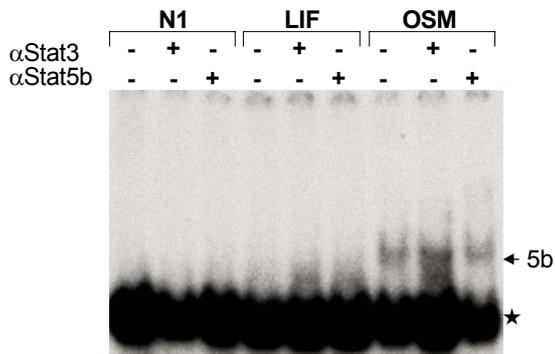
Die Komplexe, die sich in der Zelllinie A 172<sup>1</sup> bereits ohne Zytokinstimulation und verstärkt nach Stimulation mit LIF gebildet hatten, und die ebenfalls in den Zelllinien GOS 3 und U343MG nach Behandlung mit LIF beobachtet wurden, wurden nur von einem Stat3-Antikörper erkannt. Der Komplex, der zusätzlich nach Stimulation mit OSM entstanden war, wurde von einem Antikörper gegen Stat1 erkannt, ein kleinerer Teil der Komplexe wurde von beiden Antikörpern gebunden.

Die Inkubation mit einem Antikörper gegen Stat5b bewirkte in keiner Zelllinie einen Supershift der Komplexe mit dem Oligonukleotid SIE.

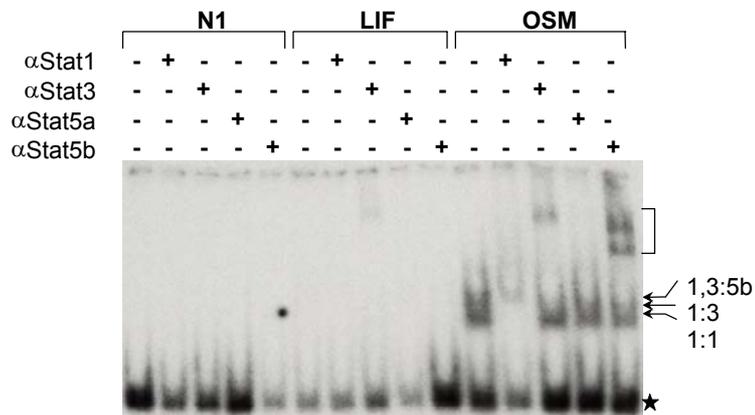
Zusammengefasst fanden sich in den unstimulierten Zellen sowie nach Stimulation mit LIF nur Homodimere aus Stat3. Nach Stimulation mit OSM entstanden außerdem Heterodimere aus den Signalmolekülen Stat3 und Stat1 sowie Homodimere aus Stat1. Das Signal, das durch den Komplex aus Oligonukleotid, Protein und den Antikörper gegen Stat1 erzeugt wurde, war nur diffus detektierbar. Der Beweis für den stattgefundenen Supershift war die Verkleinerung des Signals, das durch den Komplex aus Oligonukleotid und Protein ausgelöst wurde.

### 3.7.2 Bindung an das Oligonukleotid Stat5

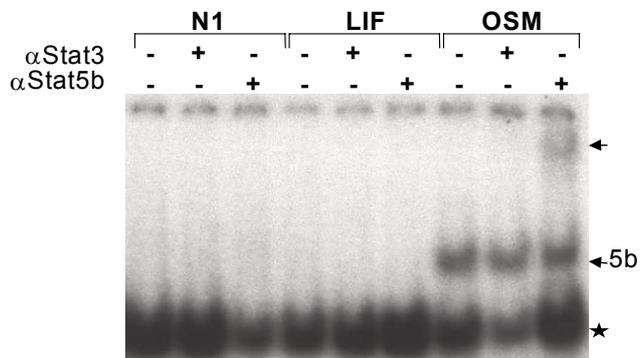
#### A. U343MG



#### B. A 172<sup>1</sup>



#### C. GOS 3



**Abbildung 3-9:** Vergleich der DNA-Bindung der Stat-Proteine nach Stimulation mit OSM und LIF an das Oligonukleotid Stat5.

### *3.7.2.1 Ergebnisse des Elektrophoretischen Mobilitätsshift-Assays*

Bei Verwendung der Kernextrakten aus den Zelllinien GOS 3 und U343MG wurde das Oligonukleotid Stat5 nur nach vorhergehender Stimulation der Zellen mit OSM gebunden. Die Stimulation mit LIF blieb ohne Wirkung. In der Zelllinie A 172<sup>1</sup> fand DNA-Bindung auch schwach nach Stimulation der Zellen mit LIF statt.

### *3.7.2.2 Ergebnisse des Gel Supershift Assays*

Ein Supershift fand nach Inkubation der Kernextrakte aus den Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup> und U343MG mit einem Antikörper gegen Stat5b statt, in der Zelllinie A 172<sup>1</sup> ebenfalls nach Inkubation des Kernextraktes mit Antikörpern gegen Stat1 und Stat3. In den anderen Zelllinien erkannten diese Antikörper den Komplex aus Oligonukleotid und Stat-Protein nicht.

In den Zelllinien GOS 3 und U343MG ließen sich also nach Stimulation mit OSM nur Homodimere des Signalmoleküls Stat5b nachweisen. In der Zelllinie A 172<sup>1</sup> war zudem eine Bindung von Heterodimeren aus Stat1 bzw. Stat3 und Stat5b, von Heterodimeren aus Stat1 und Stat3 sowie von Homodimeren aus Stat1 nachweisbar.

## 4 Diskussion

Die Mitglieder der IL-6-Familie hämatopoetischer und neuropoetischer Zytokine werden wegen ihrer strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten zu einer Gruppe zusammengefasst. Ein wichtiges Merkmal ist ihre Fähigkeit, das Wachstumsverhalten verschiedener Zellen zu modifizieren. Insbesondere OSM inhibiert die Proliferation verschiedener Tumorzelllinien (Zarling et al., 1986), unter anderem das von Brusttumor-, Lungentumor- und Gliomzellen (Horn et al., 1990, Grove et al., 1993, Zhang et al., 1994). Die intrazellulären Mechanismen, über die OSM Zellwachstum reguliert, wurden bisher noch nicht aufgedeckt.

In dieser Arbeit wurden die durch OSM aktivierten Signalwege in mehreren Gliomzelllinien miteinander verglichen. Die Stimulation mit OSM führte bei der Zelllinie GOS 3 zur Wachstumsinhibition, bei den anderen untersuchten Zelllinien wurde durch Einfluss von OSM keine signifikante Wachstumsinhibition erreicht.

Es existieren zwei OSM-Rezeptortypen. LIF kann nur über den Typ I OSM-Rezeptor Signale vermitteln, während OSM auch Effekte über den Typ II OSM-Rezeptor bewirken kann. Da bei jeder Stimulation der Zelllinien mit OSM als Kontrolle gleichzeitig eine Stimulation mit LIF durchgeführt wurde, konnten die Effekte, die nach Aktivierung des Typ I OSM-Rezeptors erzeugt werden, identifiziert und von den spezifisch über den Typ II OSM-Rezeptor vermittelten unterschieden werden. Der Vergleich der intrazellulären Signalwege, die nach Bindung von OSM an den Typ II OSM-Rezeptor aktiviert werden, könnte Hinweise auf den Mechanismus geben, über den OSM den wachstumshemmenden Effekt induziert.

### 4.1 Die Expression der OSM-Rezeptoren in den Gliomzelllinien

Durch eine PCR-Reaktion wurde zunächst sichergestellt, dass alle Rezeptorkomponenten für die OSM-Rezeptoren in den Zelllinien exprimiert wurden, so

dass eine Signaltransduktion in die Zellen hinein nach Stimulation mit OSM und LIF stattfinden konnte.

Die Rezeptorkomponente gp130 wird in nahezu allen Geweben exprimiert und ist an der Bildung weiterer Rezeptorkomplexe beteiligt. Die ligandenspezifischen Komponenten dagegen sind gewebespezifischer verteilt. Dadurch ist die Reaktion unterschiedlicher Gewebe auf äußere Reize variabel (Saito et al., 1992). Durch die gewebespezifische Expression der Rezeptoren ist also eine Möglichkeit für die Regulation von Zellantworten gegeben.

In den Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup> und U343MG wurde die Expression der Rezeptorkomponenten gp130, OSMR $\beta$  und LIFR $\beta$  nachgewiesen. Durch die Assoziation von gp130 mit LIFR $\beta$  entsteht der Typ I OSM-Rezeptor, an den OSM und LIF binden können. Durch Assoziation von gp130 mit OSMR $\beta$  entsteht der Typ II OSM-Rezeptor, an den nur OSM binden kann. Die drei Zelllinien hatten im Hinblick auf die untersuchten Zytokine die gleiche Rezeptorausstattung, so dass Unterschiede in den Zellreaktionen andere Ursachen als die zellspezifische Expression von Rezeptorkomponenten haben mussten.

Bekannt ist, dass die OSM-Rezeptoren-Komponenten in zahlreichen Geweben exprimiert werden. Dazu gehören insbesondere Zellen des Nervensystems wie Astrozytome, Glioblastome und Medulloblastome. Unsere Ergebnisse lassen sich dort gut einordnen. Ein Vorkommen in Tumorzellen vieler unterschiedlicher Gewebe und in Fibroblasten ist ebenfalls bekannt (Weis et al., 1999, Zaheer et al., 1995, Mosley et al., 1996).

Durch die Aktivierung gleicher Rezeptoren innerhalb verschiedener Zelllinien werden üblicherweise die gleichen Signalwege aktiviert. Die Rezeptoren der IL-6 Familie hämatopoetischer Zytokine aktivieren die Jak/Stat-Signalkaskade und die MAPK-Signalkaskade. Dennoch sind die Reaktionen der Zellen nach Stimulation mit den Zytokinen sehr divergierend. Innerhalb der Zellen müssen demnach weitere Regulationsmöglichkeiten für Zellantworten vorhanden sein. Mögliche Regulationswege könnten die zellspezifische Expression bekannter Signalmoleküle oder

die Existenz bisher noch nicht identifizierter Signalmoleküle sein. Ebenso ist es denkbar, dass es in manchen Zelllinien zu einer Mutation von Signalmolekülen gekommen sein könnte.

Im Weiteren wurden die durch OSM aktivierten Signalkaskaden innerhalb der verschiedenen Gliomzelllinien untersucht und miteinander verglichen mit dem Ziel, Unterschiede aufzudecken, die an der Regulation der Zellantworten beteiligt sein könnten.

In der Zelllinie A 172<sup>2</sup> wurden OSMR $\beta$  und LIFR $\beta$  nicht exprimiert, obwohl die Expression der Rezeptorkomponente OSMR $\beta$  in der Zelllinie A 172 bereits in der Literatur beschrieben wurde (Mosley et al., 1996) und in dieser Arbeit auch anhand der Zelllinie A 172<sup>1</sup> dargestellt werden konnte.

#### **4.2 OSM hemmt die Proliferationsrate von GOS 3 über den Typ II OSM-Rezeptor**

Aus der Literatur war bekannt, dass die Stimulation mit OSM die Proliferationsgeschwindigkeit der Zelllinie GOS 3 signifikant reduziert. Im Vergleich war die durch OSM bewirkte Wachstumsinhibition der Zelllinien A 172<sup>1</sup>, A 172<sup>2</sup> und U343MG wesentlich geringer bzw. gar nicht nachweisbar. Auch die durch LIF ausgelöste Wachstumsinhibition war nicht signifikant.

Eine Arbeit, in der die antiproliferative Aktivität von OSM mit der anderer Zytokine aus der IL-6-Familie auf Meningeomzellen in vitro verglichen wurde, kam zu einem vergleichbaren Ergebnis. LIF und IL-6 induzierten entweder nur einen schwachen oder keinen wachstumsinhibierenden Effekt, während OSM das Zellwachstum signifikant reduzierte (Schrell et al., 1998). Der wachstumsinhibierende Effekt von OSM ist demnach relativ spezifisch im Vergleich zu den anderen Zytokinen der IL-6 Familie und er wurde bereits anhand mehrerer Zelllinien, auch aus anderen Tumoren, reproduzierbar nachgewiesen. Das eröffnet Perspektiven im Hinblick auf umfassende klinische Anwendungsmöglichkeiten von OSM.

Da LIF an den Typ I OSM-Rezeptor bindet ohne eine Wachstumsinhibition auszulösen, wird dieser Effekt von OSM höchstwahrscheinlich nicht durch Zytokinbindung an diesen Rezeptor übertragen. In diesem Fall würde auch LIF in der Zelllinie GOS 3 eine signifikante Wachstumsinhibition auslösen. Also führt höchstwahrscheinlich die Bindung von OSM an den Typ II OSM-Rezeptor in der Zelllinie GOS 3 zu der Abnahme ihrer Proliferationsrate.

Diese Überlegung wird durch eine Untersuchung unterstützt, in der durch Experimente mit Astrozyten Anhaltspunkte dafür gefunden wurden, dass OSM vorwiegend über den Typ II OSM-Rezeptor Signale in die Zelle überträgt (Van Wagoner et al., 2000).

Da die Zelllinien A 172<sup>1</sup> und U343MG ihre Proliferationsraten nach Bindung von OSM an den Typ II OSM-Rezeptor kaum reduzierten, könnten Unterschiede in den Signalkaskaden im Vergleich mit der Zelllinie GOS 3 Hinweise auf die Ursache für die antiproliferative Aktivität von OSM geben.

#### **4.3 OSM erreicht in vielen verschiedenen Zelllinien trotz unterschiedlicher Effekte ähnliche Tyrosinphosphorylierung**

Anhand der Ganzzell-Lysate wurde gezeigt, dass die Stimulation mit OSM und LIF in den Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup> und U343MG die Phosphorylierung zahlreicher gleicher Proteine bewirkte. Die molaren Massen der tyrosinphosphorylierten Proteine waren nach der Behandlung mit beiden Zytokinen unabhängig von der Zelllinie sehr ähnlich. Die durch OSM und LIF induzierte Tyrosinphosphorylierung wurde bereits in mehreren Zelllinien untersucht. Dazu gehören HEC- (human endothelial cells) Zellen (Brown et al., 1991), die Zelllinien KSL-1, KSL-8 und EDS (Kaposi-Sarkome) (Miles et al., 1992, Nair et al., 1992), HeLa (Zervixkarzinom), EW-1 (Ewing-Sarkom), NIH3T4 (Fibroblasten), MAH (sympathoadrenale Progenitorzelllinie) (Boulton et al., 1994), murine und menschliche Osteoblastenzelllinien und die Zelllinie U2OS (Osteosarkom) (Levy et al., 1996). Die durch OSM ausgelöste Tyrosinphosphorylierung war unabhängig von der Zelllinie und sogar vom Zelltyp oft sehr ähnlich, aber nicht

identisch. Häufig wurden Proteine mit apparenten molaren Massen von 190, 160, 150, 145, 120, 110, 89, 85, 70, 44, 42 oder 40 kD phosphoryliert. In manchen Zelllinien erschienen Proteine, deren apparenten molaren Massen sich leicht von den hier angegebenen unterschieden und die auch nur vereinzelt in einer Zelllinie gefunden wurden. Ein Protein mit einer apparenten molaren Masse von 72 kD wurde nur in den Osteoblastenzelllinien und der Osteosarkomzelllinie phosphoryliert (Levy et al., 1996). Proteine mit apparenten molaren Massen von 165, 122, 90 und 88 kD wurden nur in Kaposi-Sarkom-Zelllinien phosphoryliert (Miles et al., 1992). Mutmaßlich handelt es sich bei diesen Molekülen um die bereits beschriebenen und eine variierende Versuchsanordnung führte zu den geringfügigen Abweichungen der apparenten molaren Massen. Divergierende Ergebnisse können unter anderem durch Verwendung von Antikörpern unterschiedlicher Herkunft artifiziell vorgetäuscht werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Moleküle mit apparenten molaren Massen von 160, 150, 145, 130, 89, 85 und 44 kD wurden in anderen Zelllinien ebenfalls nach Stimulation mit OSM phosphoryliert. Dagegen wurden Proteine mit apparenten molaren Massen von 98, 92 und 55 kD in den oben genannten Zelllinien nicht beschrieben, jedoch Proteine mit apparenten molaren Massen von 94, 90, 88 und 54 kD. Höchstwahrscheinlich handelt es sich auch hier um die gleichen Proteine, deren apparenten molaren Massen aufgrund der abweichenden Versuchsanordnungen etwas unterschiedlich festgelegt wurden.

Zusammengefasst wurde in vielen verschiedenen Zelllinien ein sehr ähnliches Spektrum phosphorylierter Proteine nach Stimulation mit OSM beobachtet. Die hier beschriebenen Ergebnisse lassen sich dort gut einordnen.

Die Gemeinsamkeiten im Muster der Tyrosinphosphorylierung fanden sich trotz der unterschiedlichen Effekte, die durch Stimulation mit OSM in den Zelllinien erreicht werden. In HEC induziert OSM die Expression von IL-6 (Brown et al., 1991) und für KSL-1 stellt OSM ein starkes Mitogen dar (Miles et al., 1992, Nair et al., 1992). Im Gegensatz dazu inhibiert es die Proliferationsrate der Zelllinie GOS 3.

Zahlreiche der beschriebenen Proteine wurden inzwischen identifiziert. Das Protein mit einer apparenten molaren Masse von 190 kD als LIFR $\beta$ , von 160 kD als die für OSM spezifische Rezeptorkomponente (Schieven et al., 1992), von 145 kD als gp130, von 125-130 kD als ein Mitglied aus der Familie der Janus-Kinasen, von 88-89 kD als Stat3, von 50-60 kD als eine Isoform von dem Adaptermolekül Shc, von 44 kD als ERK1 und von 42 kD als ERK2 (Boulton et al., 1994, Ip et al., 1992, Stahl et al., 1993, Levy et al., 1996, Horowitz et al., 1995). Einige dieser Proteine wurden nur nach Behandlung der Zelllinien mit OSM (HeLa) phosphoryliert, andere ebenfalls nach Stimulation mit LIF. Auch die Zytokine CNTF und IL-6 können unabhängig vom Zelltyp eine ähnliche Tyrosinphosphorylierung erzeugen (Boulton et al., 1994), z.B. in einer Ewing-Sarkom-Zelllinie (EW-1) und einer sympathoadrenalen Progenitorzelllinie (MAH). Das belegt, dass prinzipiell alle Zytokine der IL-6 Familie in der Lage sind, eine Tyrosinphosphorylierung dieser Substrate zu induzieren.

#### **4.4 Aktivierung der Jak/Stat- und der MAPK-Signalkaskade über den Typ I und Typ II OSM-Rezeptor**

In dieser Arbeit wurden verschiedene Proteine der Signalkaskaden hinsichtlich ihrer Aktivierung nach Stimulation mit OSM und LIF überprüft. Die Aktivierung wurde durch Tyrosinphosphorylierung angezeigt.

Nach Stimulation mit OSM wurden die Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2, die Mitglieder der Stat-Familie Stat1, Stat3 und Stat5b sowie MAPK und SHP-2, zwei Proteine aus der MAPK-Signalkaskade, phosphoryliert. Alle Proteine, außer Stat5b, wurden in den Zelllinien A 172<sup>1</sup> und U343MG ebenfalls nach Stimulation mit LIF phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Stat5b war in den untersuchten Gliomzelllinien spezifisch für OSM. Dieses Protein wurde demnach nur nach Bindung eines Zytokins an den Typ II OSM-Rezeptor aktiviert, obwohl es in anderen Zelllinien auch über den LIF-Rezeptor phosphoryliert wird (Kuropatwinski et al., 1997). Alle anderen Proteine wurden ebenfalls nach Stimulation mit LIF, also über den Typ I OSM-Rezeptor, phosphoryliert.

In allen Versuchen war die Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation mit OSM wesentlich stärker als nach Stimulation mit LIF. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dass OSM die Aktivierung der Proteine über den OSM-spezifischen Rezeptor erreicht. Bisher konnte jedoch noch keine Erklärung dafür gefunden werden, warum dieser Rezeptor ein stärkeres Signal in die Zelle hinein transduziert. Möglicherweise führen Proteine, die mit der Rezeptoruntereinheit OSMR $\beta$  assoziieren, zu einer stärkeren Aktivierung der Janus-Kinasen.

Auffallend war eine konstitutive Aktivierung von Tyk2 in der Zelllinie A 172<sup>1</sup>, die auf OSMR-unabhängige Aktivierungswege hinweist.

Innerhalb der verschiedenen Zelllinien unterschieden sich die Signalkaskaden hinsichtlich der überprüften Moleküle nicht.

Die Rezeptorkomponente gp130, die Bestandteil beider OSM-Rezeptoren ist und deren Tyrosinphosphorylierung die Aktivierung der Signalkaskaden einleitet, wurde relativ spezifisch durch Stimulation mit OSM, also durch die Aktivierung des Typ II OSM-Rezeptors phosphoryliert. LIF führte nur zu einer schwachen Aktivierung von gp130.

In der Literatur wurde bereits anhand verschiedener Zelllinien beschrieben, dass die Homo- oder Heterodimerisation der Rezeptorkomponente gp130, z. B. als gp130/LIFR $\beta$ -Dimer oder Typ I OSM-Rezeptor, die Aktivierung von Jak1, Jak2 und Tyk2 induziert (Stahl et al., 1994, Boulton et al., 1995, Baumann et al., 1993). Später wurde anhand der Zelllinie A 375 (Melanomzellen) nachgewiesen, dass diese Moleküle ebenfalls aktiviert werden, wenn gp130 mit der Rezeptorkomponente OSMR $\beta$  zum Typ II OSM-Rezeptor assoziiert ist (Auguste et al., 1997). Die Aktivierung von Tyk2 war nach Stimulation mit mehreren Mitgliedern der IL-6 Familie schwächer als die von Jak1 und Jak2 (Stahl et al., 1994). In den hier überprüften Gliomzelllinien war die Aktivierung entgegengesetzt: Tyk2 wurde stärker als Jak1 und Jak2 phosphoryliert.

Auch die Aktivierung der Stat-Proteine war in den Melanomzellen vergleichbar: Stat5b wurde nur über den Typ II OSM-Rezeptor aktiviert, Stat3 über beide OSM-Rezeptoren (Kuropatwinski et al., 1997). In humanen Hepatozyten dagegen wurde nachgewiesen, dass OSM und LIF Stat5 aktivieren können (Kuropatwinski et al., 1997). Die

Aktivierung von Stat5b wurde auch durch Stimulation von Rattenleberzellen mit IL-6 (Ripperger et al., 1995) und mit GH (Growth Hormone) (Ram et al., 1996, Wood et al., 1995) erreicht.

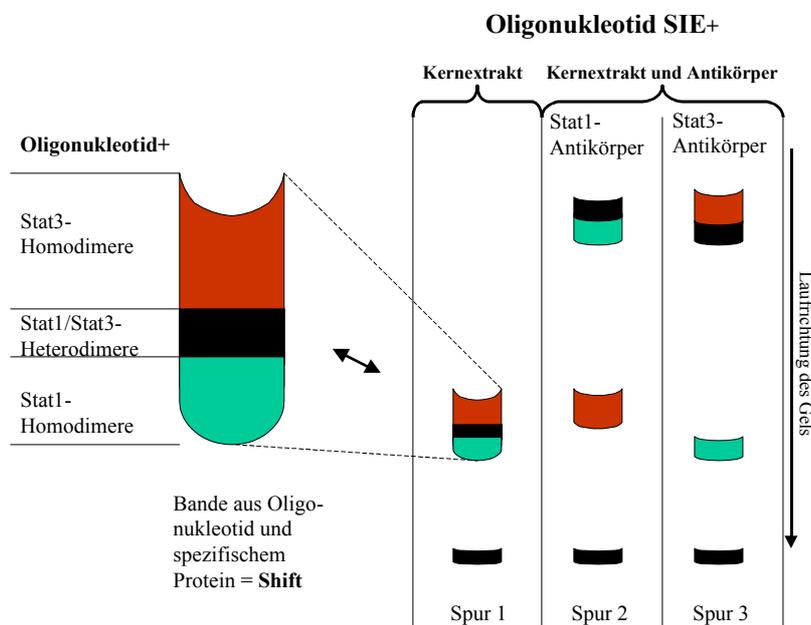
Stat3 wird ebenfalls nach Stimulation mit zahlreichen Zytokinen der IL-6 Familie phosphoryliert. Es stellt ein wichtiges Molekül für die Aktivierung der Transkription von Akute-Phase-Proteinen (APP) in Leberzellen dar (Sadowski et al., 1993, Baumann et al., 1994, Lütticken et al., 1994, Schindler et al., 1995). Die Promotoren von APP enthalten eine Bindungsstelle für Stat3 und werden durch Stat3 entweder induziert (Wang et al., 1995, Seidel et al., 1995) oder inhibiert (Caldenhoven et al., 1996, Minami et al., 1996).

Die Bedeutung von Stat5b ist weitestgehend noch nicht aufgeklärt worden. Man weiß, dass das Protein zahlreiche biologische Funktionen vermittelt, die von Zelldifferenzierung und Zellwachstum bis zur Zelltransformation reichen. Die Aktivierung von Stat5b ist innerhalb der Zytokine der IL-6 Familie spezifisch für OSM, lediglich IL-6 bewirkt ebenfalls eine leichte Phosphorylierung des Proteins. In der Hepatomzelllinie HepG2 konnte gezeigt werden, dass der wachstumshemmende Effekt von OSM von Stat5b abhängig ist (Klausen et al., 2000).

Die Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung für die Aktivierung der MAPK wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Anderson et al., 1990, Blenis et al., 1991, Boulton et al., 1991, Ettehadieh et al., 1992, Ray et al., 1988, Sanghers et al., 1991). In den Melanomzelllinien A 375 und WM 239 wurde eine konstitutive Aktivierung der MAPK-Moleküle ERK1 und ERK2 beschrieben, die begünstigend für das Tumorstadium sein soll (Kortylewski et al., 2001). Die Regulation der Expression von Interleukin-6 in Astrozyten durch OSM ist ebenfalls von der Aktivität von ERK1 und ERK2 abhängig (Van Wagoner et al., 2000). Das Molekül wurde in dieser Arbeit in den Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup> und U343MG nach Stimulation mit OSM sehr stark phosphoryliert und wurde in den Ganzzell-Lysaten als das Protein mit dem Molekulargewicht von 42 kD identifiziert.

#### 4.5 DNA-Bindung von Stat-Proteinen nach OSM-Behandlung

In EMSAs und Gel Supershift Assays wurde dargestellt, welche der Stat-Proteine durch OSM oder LIF aktiviert werden. Das doppelsträngige Oligonukleotid SIE mit einer Stat3-Bindungssequenz wurde von Proteinen aus den Kernextrakten der Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup> und U343MG nach Stimulation mit OSM und LIF gebunden. Durch die Inkubation des Reaktionsansatzes mit spezifischen Antikörpern konnten die Stat-Oligonukleotid-Komplexe identifiziert werden. Diese Signalmoleküle binden in Form von Homo- oder Heterodimeren an DNA.



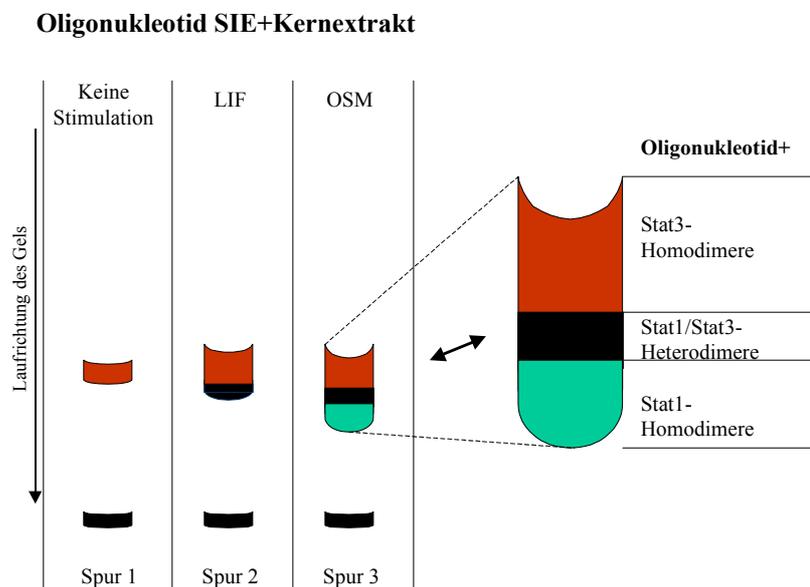
**Abbildung 4-1:** Die Aufschlüsselung der Signale, die durch Bindung spezifischer Proteine an das Oligonukleotid SIE entstanden, durch die Zugabe spezifischer Antikörper im Gel Supershift Assay. Der Antikörper gegen Stat1 erkannte alle Komplexe, an deren Bildung das Protein Stat1 beteiligt war und der Antikörper gegen Stat3 erkannte alle Komplexe, an deren Bildung das Protein Stat3 beteiligt war. DNA-Bindung war nach Stimulation mit OSM und mit LIF zu beobachten, nach Stimulation mit LIF wurde nur Stat3 aktiviert.

Nach Stimulation mit LIF entstanden Komplexe, die nur von einem Antikörper gegen Stat3 erkannt wurden. Da die anderen Antikörper diese Komplexe nicht erkannten, lagen Homodimere aus Stat3 vor.

Nur in der Zelllinie A 172<sup>1</sup> fand sich eine zytokinunabhängige basale Stat3-Aktivität, die durch die Behandlung mit LIF verstärkt wurde. Das zeigte möglicherweise die Aktivität eines weiteren Rezeptors an, der in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Dabei könnte es sich z.B. um den EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) handeln, der häufig in Tumorzellen aktiv ist und der ebenfalls Stat-Proteine aktiviert.

Nach Stimulation mit OSM wurde ein weiterer Komplex mit einer höheren Mobilität im Gel gebildet, der nur durch einen Antikörper gegen Stat1 erkannt wurde und dadurch eine Bindung von Stat1-Homodimeren anzeigte.

Ein Teil der Komplexe wurde durch beide Antikörper erkannt. Hier fanden sich also Stat1/Stat3-Heterodimere (Abbildung 4-1). Eine geringe Stat1-Aktivierung und die Bildung von Stat1/Stat3-Heterodimeren nach Stimulation mit LIF ließ sich nicht sicher beurteilen (Abbildung 4-2).



**Abbildung 4-2:** Vergleich der Aktivierung der Stat-Proteine durch OSM und LIF in EMSAs. Ohne Stimulation waren die Stat3-Homodimere nur in der Zelllinie A 172<sup>1</sup> nachweisbar.

Diese Zusammensetzung der SIE-bindenden Proteine wurde ebenfalls nach Stimulation von Zellen mit  $\gamma$ -Interferon, IL-6 und OSM beobachtet (Wagner et al., 1990, Zhong et al., 1994). Also werden auch nach Stimulation von Zellen mit anderen Zytokinen Homodimere aus Stat1 sowie Stat3 und Heterodimere aus diesen beiden Signalmolekülen gebildet. Es handelt sich folglich um einen Signalweg, der durch weitere Zytokine aktiviert wird. Durch welche Mechanismen die Spezifität einzelner Zytokine generiert wird, ist bislang nicht bekannt.

Antikörper gegen Stat5a und Stat5b bewirkten keinen Supershift. Das Oligonukleotid SIE enthielt demnach keine Bindungsstellen für diese Proteine, denn die Aktivierung von Stat5b nach Stimulation mit OSM war bereits gezeigt worden.

Das Signal, das durch den Antikörper-Stat1-Oligonukleotid-Komplex hätte erzeugt werden sollen, war nicht detektierbar. Möglicherweise waren diese Komplexe zu diffus im Gel verteilt und ließen sich deshalb nicht als eine kompakte Bande lokalisieren oder sie waren zu groß und konnten deshalb nicht in das Gel einlaufen.

Die Effekte, die durch die Aktivierung der Stat-Moleküle erzeugt werden, wurden in einigen Zelllinien aufgedeckt. Im zentralen Nervensystem wurde gezeigt, dass die Jak/Stat-Signalkaskade für die CNTF-induzierte Differenzierung von Gliavorläuferzellen von zentraler Bedeutung ist (Bonni et al., 1997, Rajan and McKay, 1998). Die Aktivierung von Stat3 ist für die Differenzierung von myeloischen M1-Zellen in makrophagenähnliche Zellen notwendig (Minami et al., 1996, Nakajima et al., 1996). Die durch LIF ausgelöste Inhibition der Differenzierung von embryonalen Stammzellen, die dadurch ihre Fähigkeit zur Pluripotenz aufrechterhalten, ist ebenfalls von Stat3 abhängig (Boeuf et al., 1997).

Bekannt ist, dass Stat3 in einer Reihe von Tumorzelllinien aktiviert ist. Es handelt sich um Leukämie-, Brustkrebs-, Melanom-, multiple Myelom- und Plattenepithelzelllinien (Garcia et al., 1997, Ni et al., 2000, Niu et al., 1999). Anhand von Myelomzellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Stat3 die Apoptose verhinderte, indem das Protein ein Gen aktivierte, das den Zelltod inhibiert (Catlett-Falcone et al., 1999). In diesem Fall ist Stat3 nicht an der Inhibition des Tumorwachstums beteiligt, sondern wirkt auf dieses im Gegenteil begünstigend.

Im Gegensatz dazu wurde anhand der Melanomzelllinie A 375 nachgewiesen, dass der wachstumsinhibierende Effekt von OSM besonders von der Aktivierung von Stat3 abhängig ist, weniger von der Aktivierung von Stat1. In der Glioblastomzelllinie 86HG39 ist Stat3 nicht an der Entstehung des antiproliferativen Effektes beteiligt (Halfter et al., 2000).

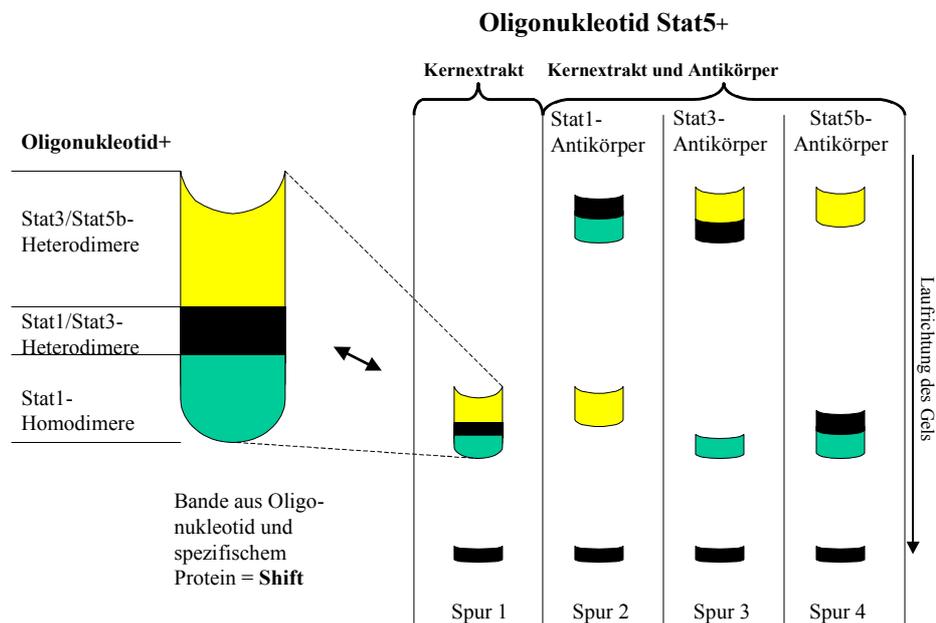
Die biologischen Funktionen des Moleküls Stat3 sind also sehr divergent und abhängig von der Ausstattung des jeweiligen Zelltyps.

Während bisher die Funktionen von Stat3 wiederholt beschrieben wurden, ist über die von Stat1 nur wenig bekannt. Aufgedeckt werden konnte, dass Stat1 (wie auch Stat3) in Astrozyten an der Aktivierung des  $\alpha_1$ -Antichymotrypsingens beteiligt ist (Kordula et al., 1998). In einer Arbeit wird postuliert, dass Stat1 nicht nur als Transkriptionsfaktor fungieren kann, sondern dass das Signalmolekül eine Brücke zu der MAPK-Signalkaskade repräsentiert, da es an der Aktivierung der Raf-Kinase beteiligt ist (Stancato et al., 1998). Das unterstützt die Ergebnisse anderer Studien, die zeigen, dass die Jak/Stat-Signalkaskade und die MAPK-Signalkaskade eng miteinander verknüpft sind (Stancato et al., 1997, David et al., 1995, Zhang et al., 1995).

Das Oligonukleotid Stat5b wurde ebenfalls nach Stimulation der Zellen mit OSM von Proteinen aus den Kernextrakten der Zelllinien GOS 3, A 172<sup>1</sup> und U343MG gebunden. Die Stimulation der Zellen mit LIF hatte keinen Effekt auf die Bindung der Stat-Moleküle an das Oligonukleotid.

In einem folgenden Gel Supershift Assay wurden die Stat-Dimere identifiziert. In der Zelllinie A 172<sup>1</sup> führte die Inkubation mit einem Antikörper gegen Stat1 zu der Bindung eines Teiles der Komplexe. Das weist darauf hin, dass hier Dimere aus Stat1 an das Oligonukleotid Stat5 banden. Die anderen Komplexe wurden nach Zugabe eines Antikörpers gegen Stat3 gebunden. In diesem Bereich banden also Dimere aus Stat3 an das Oligonukleotid. Man konnte zudem erkennen, dass Heterodimere aus Stat1 und Stat3 an das DNA-Fragment banden, da ein Teil der Komplexe von beiden Antikörpern gebunden wurde. Auch hier ließ sich die durch den Supershift mit dem Antikörper gegen Stat1 entstandene Bande nicht detektieren.

Die Inkubation mit einem Antikörper gegen Stat5b bewirkte in allen Zelllinien einen Supershift. In der Zelllinie A 172<sup>1</sup> wurden die Komplexe, die durch den Antikörper gegen Stat5b gebunden wurden, ebenfalls durch den Stat3-Antikörper erkannt. Das weist darauf hin, dass in diesem Bereich Heterodimere aus Stat3 und Stat5b an das Oligonukleotid Stat5 banden. Homodimere aus Stat5b ließen sich nicht nachweisen, denn alle vom Stat5b-Antikörper erkannten Komplexe wurden ebenfalls durch den Antikörper gegen Stat3 gebunden.



**Abbildung 4-3:** Die Bindung der Stat-Proteine an das Oligonukleotid Stat5 im EMSA und in Gel Supershift Assays. DNA-Bindung fand nur nach Stimulation mit OSM statt.

Auch die Bildung von Heterodimeren aus Stat1 und Stat5b war in dieser Arbeit möglich. Die Existenz solcher Heterodimere konnte bisher in anderen Arbeiten nicht beschrieben werden (Stevens et al., 1995, Dajee et al., 1996, Meier et al., 1994, Welte et al., 1994, Raught et al., 1995).

#### **4.6 Die Bedeutung der Zelllinie A 172<sup>2</sup>**

Die Zelllinie A 172<sup>2</sup> exprimierte nur die Rezeptorkomponente gp130, jedoch nicht OSMR $\beta$  und LIFR $\beta$ . Die Vorgeschichte dieser Zelllinie ist unklar und es wurde nicht überprüft, ob es sich um eine durch Mutation veränderte A172 -Variante handelte, oder ob durch Kontamination eine andere Zelllinie erhalten wurde. Durch ihre Aufnahme in die Versuchsreihe wurde gesichert, dass alle Effekte, die durch OSM und LIF bewirkt wurden, durch die OSM-Rezeptoren übertragen wurden.

Der Nachweis der Rezeptorkomponenten in der Zelllinie A 172 war bereits in anderen Arbeiten gelungen. Hier ergab sich als Zufallsbefund, dass die in unserem Labor kultivierte Zelllinie A 172<sup>2</sup> die Rezeptorkomponenten nicht exprimierte.

Dieses Ergebnis weist auf die Anfälligkeit von Arbeiten mit Zellkulturen hin, die als ein lebendes System einer stetigen Veränderung unterworfen sind. Gerade Tumorzellen mit ihrem instabilen Genotyp und der oft extrem schnellen Wachstumsrate können sich in den Bedingungen der Zellkultur rasch verändern. In einer Arbeit wurde gezeigt, dass in Astrozyten niedriger Passage Stat1 und Stat3 aktiviert werden, dagegen in Astrozyten hoher Passage nur noch Stat3 (Schaefer et al., 2000).

Das mindert jedoch nicht die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Zellkultur, die unter anderem ein Arbeiten mit lebenden Zellen bei gleichzeitiger Schonung von Mensch und Tier ermöglicht. Es ist jedoch eine gute Überwachung dieses Systems und eine ständige kritische Beurteilung der erzielten Ergebnisse notwendig, um sich bei Versuchen seiner Qualität und damit auch seiner Aussagekraft sicher sein zu können.

Die Zelllinie A 172<sup>1</sup>, die einer anderen Bezugsquelle entstammte, exprimierte alle Rezeptorkomponenten und konnte stattdessen in die Versuchsreihe einbezogen werden.

#### **4.7 Schlussfolgerung**

In allen Zelllinien mit beiden OSM-Rezeptoren wurden durch die Stimulation mit OSM die beiden wesentlichen Signalwege für Zytokine aus der IL-6-Familie, der Jak/Stat- und der MAPK-Signalweg, gleichermaßen aktiviert. Es wurden minimale Unterschiede

im Vergleich der Zelllinien beobachtet. Deutliche Unterschiede wurden innerhalb einer Zelllinie nach Stimulation mit OSM und LIF sichtbar.

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für die abweichenden Reaktionen von Zelllinien trotz gleicher Rezeptorausstattung. Zell- und zytokinspezifisch phosphorylierte Proteine können Substrate darstellen, die durch ihre Aktivierung die verschiedenen Zellantworten bewirken. Das gleiche Signal kann auf diesem Weg unterschiedlich interpretiert werden, so dass die Zelllinie GOS 3 ihr Wachstum verringert, während die anderen Zelllinien keine Wachstumsinhibition zeigen. Die Anwesenheit und Aktivierung spezifischer Substrate sollte sich experimentell nachweisen lassen.

In der Literatur wurden zahlreiche intrazelluläre Mechanismen beschrieben, durch die die klassischen Jak/Stat- und MAPK-Signalkaskaden modifiziert werden und die möglicherweise an der Regulation der zellspezifischen Reaktionen beteiligt sind.

Man weiß, dass die Stat-Proteine außer untereinander auch mit anderen DNA-bindenden Faktoren Komplexe bilden und ebenfalls dadurch die Aktivität von Promotoren beeinflussen können (Luo and Yu-Lee, 1997). Bekannt ist, dass Stat3 und Src assoziieren können (Cao et al., 1996), und dass diese beiden Faktoren bei der Transformation der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 zusammenwirken (Turkson et al., 1998, Bromberg et al., 1998).

Inzwischen hat man entdeckt, dass neben der Tyrosinphosphorylierung von Stat1 und Stat3 auch die Phosphorylierung ihrer Serinreste von Bedeutung ist. In manchen Tumoren sind diese Proteine bereits vor Einfluss eines externen Reizes an ihren Serinresten phosphoryliert. Man vermutet, dass diese Variation eine der Ursachen für die Entwicklung bestimmter Tumoren ist (Frank et al., 1997).

In der Literatur wird auch postuliert, dass die Serinphosphorylierung von Stat1 für seine Funktion als Transkriptionsfaktor von Bedeutung ist, während seine Tyrosinphosphorylierung neben der Fähigkeit zur DNA-Bindung für die Aktivierung von Raf von Bedeutung zu sein scheint (Stancato et al., 1998).

Die Bedeutung der Tyrosin-Phosphatase SHP-2 für die Signalübertragung der Zytokine der IL-6-Familie wird in einigen Arbeiten hervorgehoben. Ihre Aktivierung führt in

manchen Zelllinien zu Effekten, die denen durch die Stat-Moleküle bewirkten entgegengesetzt sind. Die Zellantwort ist in diesen Fällen von dem Verhältnis der SHP-2- und Stat-Aktivierung abhängig (Yamanaka et al., 1996).

In einzelnen Brustkrebszelllinien, deren Wachstum ebenfalls durch OSM inhibiert wird, unterdrückt das Zytokin die Expression des c-myc-Gens, dessen Überexpression in den Brustkrebszellen für die Entstehung der Tumoren verantwortlich gemacht wird (Spence et al., 1997).

Neben den bekannten Signalkaskaden (Jak/Stat und MAPK) werden durch die Stimulation der Rezeptorkomponente gp130 weitere Moleküle wie Vav (Lee et al., 1997) und Tyrosin-Kinasen wie Hck (Ernst et al., 1994), Tec, Btk (Matsuda et al., 1995a) und Fes (Matsuda et al., 1995b) phosphoryliert. Ihre Funktionen innerhalb der Signalkaskaden der Zytokine der IL-6-Familie konnten bisher weitestgehend noch nicht aufgeklärt werden.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass wachstumsstimulierende Signalwege durch die OSM-Behandlung herabreguliert werden.

Nur durch ein besseres Verständnis kann der mögliche therapeutische Wert von OSM ausgenutzt werden.

Denn trotz der inzwischen viele Jahre bestehenden Bemühungen, endlich eine greifende Therapieform für die Behandlung von Patienten mit malignen Gliomen zu finden, bleibt die Prognose für diese Patienten immer noch infaust. Die Notwendigkeit für die Entwicklung unterstützender Therapiekonzepte ist also offensichtlich. Inzwischen wurde an Mäusen demonstriert, dass OSM auch in vivo zur Wachstumsinhibition von Glioblastomen führen kann (Friedrich et al., 2001).

Die Einsatzmöglichkeiten von OSM bleiben selbstverständlich nicht auf die Behandlung maligner Gliome beschränkt. Auch andere Tumoren, die bisher nicht ausreichend therapierbar sind und sich durch OSM in ihrem Wachstum inhibieren lassen, könnten Anwendungsbereiche werden. Ein ernsthaftes Problem stellen bisher Meningeome dar, deren vollständige operative Entfernung nicht gelungen ist. In vitro wurde auch bei diesen Tumorzellen eine Wachstumsinhibition durch OSM nachgewiesen (Schrell et al., 1998).

Durch die Gentherapie könnte demnach in Zukunft eine neue Behandlungsform eröffnet werden. Für ihre Anwendung müssen mögliche Eingriffsstellen unter den

Zellfunktionen gefunden werden, die durch eine detaillierte Analyse der molekularen Grundlagen des OSM-Effektes herausgefunden werden könnten.

## 5. Literaturverzeichnis

Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K., Sturgill, T.W. (1990): Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**, 651-653.

Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N., Yokota, T. (1990): Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 783-836.

Baumann, H., Ziegler, S.F., Mosley, B., Morella, K.K., Pajovic, S., Gearing, D.P. (1993): Reconstitution of the response to leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 8414-8417.

Baumann, H., Gauldie, J. (1994): The acute phase response. *Immunol. Today* **15**, 74-80.

Blenis, J. (1991): Growth-regulated signal transduction by the MAP kinases and RSKs. *Cancer Cells* **3**, 445-449.

Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F.D., Baran, N., Kedinger, C. (1997): Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J. Cell. Biol.* **138**, 1207-1217.

Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D.A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G.D., Greenberg, M.E. (1997): Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**, 477-483.

Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., Yancopoulos, G.D. (1991): ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663-675.

Boulton, T.G., Stahl, N., Yancopoulos, G.D. (1994): Ciliary neurotrophic factor/ leukemia inhibitory factor/ interleukin 6/ oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J. Biol. Chem.* **269**, 11648-11655.

Boulton, T.G., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Stahl, N., Yancopoulos, G.D. (1995): STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6915-6919.

Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W., Darnell, J.E. (1998): Stat 3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2553-2558.

Brown, T.J., Lioubin, M.N., Marquardt, H. (1987): Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* **139**, 2977-2983.

Brown, T.J., Rowe, J.M., Shoyab, M., Gladstone, P. (1990) in UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology New Series, Vol. 131: Molecular Biology of the Cardiovascular System (Roberts, R., Schneider, M.D., eds.) pp. 195-206, Alan R. Liss, Inc., New York

Brown, T.J., Rowe, J.M., Liu, J., Shoyab, M. (1991): Regulation of IL-6 expression by oncostatin M. *J. Immunol.* **147**, 2175-2180.

Cai, J., Gill, P.S., Masood, R., Chandrasoma, P., Jung, B., Law, R.E., Radka, S.F. (1994): Oncostatin-M is an autocrine growth factor in Kaposi's sarcoma. *Am. J. Pathol.* **145**, 74-79.

Caldenhoven, E., van Dijk, T.B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J.A.M., Lammers, J.-W., Koenderman, L., de Groot, R.P. (1996): STAT3beta, a splice variant

of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J. Biol. Chem.* **271**, 13221-13227.

Cao, X., Tay, A., Guy, G.R., Tan, Y.H. (1996): Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1595-1603.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S., Jove, R. (1999): Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* **10**, 105-115.

Chen, R.H., Sarnecki, C., Blenis, J. (1992): Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 915-927.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

Dajee, M., Kazansky, A.V., Raught, B., Hocke, G.M., Fey, G.H., Richards, J.S. (1996): Prolactin induction of the alpha 2-Macroglobulin gene in rat ovarian granulosa cells: stat 5 activation and binding to the interleukin-6 response element. *Mol. Endocrinol.* **10**, 171-184.

David, M., Petricoin, E.F., Benjamin, C., Pine, R., Weber, M.J., Larner, A.C. (1995): Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon  $\alpha$ - and interferon  $\beta$ -stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* **269**, 1721-1723.

Davis, S., Aldrich, T.H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N.Y., Yancopoulos, G.D. (1993): LIFR $\beta$  and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* **260**, 1805-1808.

- Dent, P., Haser, W., Haystead, D.A., Vincent, L.A., Roberts, T.M., Sturgill, T.W. (1992): Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* **257**, 1404-1407.
- Denton, R.M., Tavaré, J.M. (1995): Does mitogen-activated-protein kinase have a role in insulin action? The case for and against. *Eur. J. Biochem.* **227**, 597-611.
- Duchesne, M., Schweighoffer, F., Parker, F., Clere, F., Frobert, Y., Thang, M.N., Tocque, B. (1993): Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling. *Science* **259**, 525-528.
- Ernst, M., Gearing, D.P., Dunn, A.R. (1994): Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells. *EMBO J.* **13**, 1574-1584.
- Ettehadieh, E., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Hess-Bienz, D., Watts, J., Shastri, N., Aebersold, R. (1992): Tyrosyl phosphorylation and activation of MAP kinases by p56lck. *Science* **255**, 853-855.
- Frank, D.A., Mahajan, S., Ritz, J. (1997): B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J. Clin. Invest.* **100**, 3140-3148.
- Friedrich, M., Höss, N., Stögbauer, F., Senner, V., Paulus, W., Ringelstein, E.B., Halfter, H. (2001): Complete inhibition of in vivo glioma growth by oncostatin M. *J. Neurochem.* **76**, 1589-1592.
- Garcia, R., Yu, C.L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K.L., Smithgall, T., Fujita, D.J., Ethier, S.P., Jove, R. (1997): Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* **8**, 1267-1276.

Gearing, D.P., Comeau, M.R., Friend, D.J., Gimpel, S.D., Thut, C.J., McGourty, J., Brasher, K.K., King, J.A., Gillis, S., Mosley, B., Ziegler, S.F., Cosman, D. (1992): The IL-6 signal transducer gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* **255**, 1434-1437.

Gearing, D.P., Bruce, A.G. (1992): Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor. *New Biol.* **4**, 61-65.

Gille, H., Kortenjahn, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M.H., Shaw, P.E. (1995): ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J.* **14**, 951-962.

Ginty, D.D., Bonni, A., Greenberg, M.E. (1994): Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* **77**, 713-725.

Grant, S.L., Begley, C.G. (1999): The oncostatin M signaling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol. Med. Today* **5**, 406-412.

Grove, R.I., Eberhardt, C., Abid, S., Mazzucco, C., Liu, J., Kiener, P., Todaro, G., Shoyab, M. (1993): Oncostatin M is a mitogen for rabbit vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 823-827.

Halfter, H., Lotfi, R., Westermann, R., Young, P., Ringelstein, E.B., Stögbauer, F.T. (1998): Inhibition of growth and induction of differentiation of glioma cell lines by oncostatin M (OSM). *Growth Factors* **15**, 135-147.

Halfter, H., Stögbauer, F., Friedrich, M., Serve, S., Serve, H., Ringelstein, E.B. (2000): Oncostatin M-mediated growth inhibition of human glioblastoma cells does not depend on Stat3 or on mitogen-activated protein kinase activation. *J. Neurochem.* **75**, 973-981.

Heim, M.H., Kerr, I.M., Stark, G.R., Darnell, J.E. (1995): Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* **267**, 1347-1349.

Hill, C.S., Marais, R., John, S., Wynne, J., Dalton, S., Treisman, R. (1993): Functional analysis of a growth factor responsive transcription factor complex. *Cell* **73**, 395-406.

Hilton, D.J., Gough, N.M. (1991): Leukemia inhibitory factor: a biological perspective. *J. Cell. Biochem.* **46**, 21-26.

Horn, D., Fitzpatrick, W.C., Gompper, P.T., Ochs, V., Bolton-Hansen, M., Zarling, J., Malik, N., Todaro, G.J., Linsley, P.S. (1990): Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth Factors* **2**, 157-165.

Horowitz, M.C., Levy, J.B. (1995): Differential usage of adaptor proteins in the activation of the ras pathway by oncostatin M in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **10**, 309.

Howe, L.R., Leever, S.J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., Marshall, C.J. (1992): Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* **71**, 335-342.

Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K., Silvennoinen, O. (1995): Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 369.

Ip, N.Y., Nye, S.N., Boulton, T.G., Davis, S., Taga, T., Li, Y., Birren, S.J., Yasukawa, K., Kishimoto, T., Anderson, D.J., Stahl, N., Yancopoulos, G.D. (1992): CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell* **69**, 1121-1132.

Klausen, P; Pedersen, L; Jurlander, J; Baumann, H (2000): Oncostatin M and interleukin 6 inhibit cell cycle progression by prevention of p27kip1 degradation in HepG2 cells. *Oncogene* **19**, 3675-3683.

Kleihues, P., Burger, P.C., Scheithauer, B.W. (1993): Histological typing of tumours of the central nervous system. 2ed. international histological classification of tumours. *Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo*

Kohlhuber, F., Rogers, N.C., Watling, D., Feng, J., Guschin, D., Briscoe, J., Witthuhn, B.A., Kotenko, S.V., Pestka, S., Stark, G.R., Ihle, J.N., Kerr, I.M. (1997): A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 695-706.

Kordula, T., Rydel, R.E., Brigham, E.F., Horn, F., Heinrich, P.C., Travis, J. (1998): Oncostatin M and the interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor complex regulate  $\alpha_1$ -antichymotrypsin expression in human cortical astrocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 4112-4118.

Kortylewski, M., Heinrich, P.C., Mackiewicz, A., Schniertshauer, U., Klingmüller, U., Nakajima, K., Hirano, T., Horn, F., Behrmann, I. (1999): Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* **18**, 3742-3753.

Kortylewski, M., Heinrich, P.C.; Kauffmann, M.E.; Bohm, M.; MacKiewicz, A.; Behrmann, I. (2001): Mitogen-activated protein kinases control p27/Kip1 expression and growth of human melanoma cells. *Biochem J* **357**, 297-303.

Korzus, E., Nagase, H., Rydell, R., Travis, J. (1997): The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **272**, 1188-1196.

Kramm, C.M., Sena-Esteves, M., Barnett, F.H. (1995): Gene therapy for brain tumors. *Brain Pathol.* **5**, 345-381.

Kumar, G., Gupta, S., Wang, S., Nel, A.E. (1994): Involvement of Janus kinases, p52shc, Raf-1, and MEK-1 in the IL-6-induced mitogen-activated protein kinase cascade of a growth-responsive B cell line. *J. Immunol.* **153**, 4436-4447.

Kuropatwinski, K.K., De Imus, C., Gearing, D., Baumann, H., Mosley, B. (1997): Influence of subunit combinations on signaling by receptors for oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and interleukin-6. *J. Biol. Chem.* **272**, 15135-15144.

Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, V.R., Avruch, J. (1992): Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**, 417-421.

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lai, C.-F., Ripperger, J., Morella, K.K., Wang, Y., Gearing, D.P., Horseman, N.D., Campos, S.P., Fey, G.H., Baumann, H. (1995): STAT3 and STAT5B are targets of two different signal pathways activated by hematopoietin receptors and control transcription via separate cytokine response elements. *J. Biol. Chem.* **270**, 23254-23257.

Lee, I.S., Liu, Y., Narazaki, M., Hibi, M., Kishimoto, T., Taga, T. (1997): Vav is associated with signal transducing molecules gp130, Grb2 and Erk2, and is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-6. *FEBS Lett.* **401**, 133-137.

Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G.L., Allemain, G., Brunet, A., Pouyssegur, J. (1993): Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42<sup>mapk</sup> and p44<sup>mapk</sup>) but not of their activator MAPK kinase kinase (p45<sup>mapkk</sup>) in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **122**, 1079-1088.

Levy, J.B., Schindler, C., Raz, R., Levy, D.E., Baron, R., Horowitz, M.C. (1996): Activation of the JAK-STAT Signal Transduction Pathway by Oncostatin-M in Cultured Human and Mouse Osteoblastic Cells. *Endocrinology* **137**, 1159-1165.

Lindberg, R.A., Juan, T.S.-C., Welcher, A.A., Sun, Y., Cupples, R., Guthrie, B., Fletcher, F.A. (1998): Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3357-3367.

Luo, G., Yu-Lee, L. (1997): Transcriptional inhibition by Stat5. *J. Biol. Chem.* **272**, 26841-26849.

Lütticken, C., Wegenka, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Barbieri, G., Pellegrini, S., Sendtner, M., Heinrich, P.C., Horn, F. (1994): Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* **263**, 89-92.

Macdonald, S.G., Crews, C.M., Wu, L., Driller, J., Clark, R., Erikson, R.L., McCormick, F. (1993): Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6615-6620.

Malik, N., Kallestad, J.C., Gunderson, N.L, Austin, S.D., Neubauer, M.G., Ochs, V., Marquardt, H., Zarling, J.M., Shoyab, M., Wei, C.-M., Linsley, P.E., Rose, T.M. (1989): Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2847-2853.

Marais, R., Wynne, J., Treisman, R. (1993): The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**, 381-393.

Marshall, C.J. (1994): MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 82-89.

Matsuda, T., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Okuyama, Y., Fujitani, Y., Hanazono, Y., Hirai, H., Hirano, T. (1995a): Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association. *J. Biol. Chem.* **270**, 11037-11039.

Matsuda, T., Takahashi-Tezuka, M., Fukada, T., Okuyama, Y., Fujitani, Y., Tsukada, S., Mano, H., Hirai, H., Witte, O.N., Hirano, T. (1995b): Association and activation of Btk and Tec tyrosine kinases by gp130, a signal transducer of the interleukin-6 family of cytokines. *Blood* **85**, 627-633.

Meier, V.S., Groner, B., (1994): The nuclear factor YY1 participates in repression of the beta-casein gene promoter in mammary epithelial cells and is counteracted by mammary gland factor during lactogenic hormone induction. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 128-137.

Miles, S.A., Martinez-Maza, O., Rezai, A., Magpantay, L., Kishimoto, T., Nakamura, S., Radka, S.F., Linsley, P.S. (1992): Oncostatin M as a potent mitogen for AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells. *Science* **255**, 1432-1434.

Minami, M., Inoue, M., Wei, S., Takeda, K., Matsumoto, M., Kishimoto, T., Akira, S. (1996): STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3963-3966.

Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J., Wolfman, A. (1993): Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**, 2658-1660.

Moodie, S.A., Wolfman, A. (1994): The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* **10**, 44-48.

Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L.S., Cosman, D. (1996): Dual oncostatin M (OSM) receptors – cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation.

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

Murakami-Mori, K., Taga, T., Kishimoto, T., Nakamura, S. (1995): AIDS-associated Kaposi's sarcoma (KS) cells express oncostatin M (OM)-specific receptor but not leukemia inhibitory factor/OM receptor or interleukin-6 receptor. *J. Clin. Invest.* **96**, 1319-1327.

Nair, B.C., DeVico, A.L., Nakamura, S., Copeland T.D., Chen, Y., Patel, A., O'Neill, T., Oroszlan, S., Gallo, R.C., Sarngadharan, M.G. (1992): Identification of a major growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma cells as oncostatin M. *Science* **255**, 1430-1432.

Nakajima, K., Yamanaka, Y., Nakae, K., Kojima, H., Ichiba, M., Kiuchi, N., Kitaoka, T., Fukada, T., Hibi, M., Hirano, T. (1996): A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J.* **15**, 3651-3658.

Narazaki, M., Witthuhn, B.A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J.N., Kishimoto, T., Taga, T. (1994): Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2285-2289.

Ni, Z., Lou, W., Leman, E.S., Gao, A.C. (2000): Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Research* **60**, 1225-1228.

Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R., Yu, H. (1999): Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Research* **59**, 5059-5063.

Pennica, D., Shaw, K.J., Swanson, T.A., Moore, M.W., Shelton, D.L., Zioncheck, K.A., Rosenthal, A., Taga, T., Paoni, N.F., Wood, W.I. (1995): Cardiotropin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 10915-10922.

Radka, S.F., Nakamura, S., Sakurada, S., Salahuddin, S.Z. (1993): Correlation of oncostatin M secretion by human retrovirus-infected cells with potent growth stimulation of cultured spindle cells from AIDS-Kaposi's sarcoma. *J. Immunol.* **150**, 5195-5201.

Rainov, N.G.; Kramm, C.M.; Banning, U.; Riemann, D.; Holzhausen, H.J.; Heidecke, V.; Burger, K.J.; Burkert, W.; Korholz, D. (2000): Immune response induced by retrovirus-mediated HSV-tk/GCV pharmacogene therapy in patients with glioblastoma multiforme. *Gene Ther.* **21**, 1853-1858.

Rajan, P., McKay, R.D.G. (1998): Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J. Neurosci.* **18**, 3620-3629.

Ram, P.A., Park, S.-H., Choi, H.K., Waxman, D.J. (1996): Growth hormone activation of Stat 1, Stat 3, and Stat 5 in rat liver. Differential kinetics of hormone desensitization and growth hormone stimulation of both tyrosine phosphorylation and serine/threonine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **271**, 5929-5940.

Ram, Z., Culver, K.W., Oshiro, E.M., Viola, J.J.; De Vroom, H.L.; Otto, E.; Long, Z.; Chiang, Y.; McGarrity, G.J.; Muul, L.M.; Katz, D.; Blaese, R.M.; Oldfield, E.H. (1997): Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nature Med* **3**, 1354-1361.

Rao, M.S., Symes, A., Malik, N., Shoyab, M., Fink, J.S., Landis, S.C. (1992): Oncostatin M regulates VIP expression in a human neuroblastoma cell line. *Neuroreport* **3**, 865-868.

Raught, B., Liao, W.S.L., Rosen, J.M. (1995): Developmentally and hormonally regulated CCAAT/enhancer-binding protein isoforms influence beta-casein gene expression. *Mol. Endocrinol.* **9**, 1223-1232.

Ray, L.B., Sturgill, T.W. (1988): Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 3753-3757.

Richards, C.D., Brown, T.J., Shoyab, M., Baumann, H., Gauldie, J. (1992): Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in hepatocytes in vitro. *J. Immunol.* **148**, 1731-1736.

Richards, L.J., Kilpatrick, T.J., Dutton, R., Tan, S.S., Gearing, D.P., Bartlett, P.F., Murphy, M. (1996): Leukaemia inhibitory factor or related factors promote the differentiation of neuronal and astrocytic precursors within the developing murine spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 291-299.

Ripperger, J.A., Fritz, S., Richter, K., Hocke, G.M., Lottspeich, F., Fey, G.H. (1995): Transcription factors Stat3 and Stat5b are present in rat liver nuclei late in an acute phase response and bind interleukin-6 response elements. *J. Biol. Chem.* **270**, 29998-30006.

Rose, T.M., Bruce, A.G. (1991): Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor and interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8641-8645.

Rose, T.M., Weiford, D.M., Gunderson, N.L., Bruce, A.G. (1994): Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro. *Cytokine* **6**, 48-54.

Sadowski, H.B., Shuai, K., Darnell, J.E., Gilman, M.Z. (1993): A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* **261**, 1739-1744.

Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T., Kishimoto, T. (1992): Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J. Immunol.* **148**, 4066-4071.

Sanghera, J.S., Paddon, H.B., Pelech, S.L. (1991): Role of protein phosphorylation in the maturation-induced activation of a myelin basic protein kinase from sea star oocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 6700-6707.

Schaefer, L.K., Wang, S., Schaefer, T.S. (2000): Oncostatin M activates STAT DNA binding and transcriptional activity in primary human fetal astrocytes: low- and high-passage cells have distinct patterns of STAT activation. *Cytokine* **12**, 1647-1655.

Schieven, G.L., Kallestad, J.C., Brown, T.J., Ledbetter, J.A., Linsley, P.S. (1992): Oncostatin M induces tyrosine phosphorylation in endothelial cells and activation of p62<sup>yes</sup> tyrosine kinase. *J. Immunol.* **149**, 1676-1682.

Schindler, C., Darnell, J.E. (1995): Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 621-651.

Schrell, U.M., Koch, H.U., Marschalek, R., Schrauzer, T., Anders, M., Adams, E., Fahlbusch, R. (1998): Formation of autocrine loops in human cerebral meningioma tissue by leukemia inhibitor factor, interleukin-6, and oncostatin M: inhibition of meningioma cell growth in vitro by recombinant oncostatin M. *J. Neurosurg.* **88**, 541-548.

Seidel, H.M., Milocco, L.H., Lamb, P., Darnell, J.E., Stein, R.B., Rosen, J. (1995): Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 3041-3045.

Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H.T., Qureshi, S.A., Cowburn, D., Darnell, J.E. (1994): Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* **76**, 821-828.

Spence, M.J., Vestal, R.E., Liu, J. (1997): Oncostatin M-mediated transcriptional suppression of the c-myc gene in breast cancer cells. *Cancer Research* **57**, 2223-2228.

Sporeno, E., Paonessa, G., Salvati, A.L., Graziani, R., Delmastro, P., Ciliberto, G., Toniatti, C. (1994): Oncostatin M binds directly to gp130 and behaves as interleukin-6 antagonist on a cell line expressing gp130 but lacking functional oncostatin receptors. *J. Biol. Chem.* **269**, 10991-10995.

Stahl, N., Davis, S., Wong, V., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N.Y., Yancopoulos, G.D. (1993): Cross-linking identifies leukemia inhibitory factor-binding protein as a ciliary neurotrophic factor receptor component. *J. Biol. Chem.* **268**, 7628-7631.

Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., Ihle, J., Yancopoulos, G.D. (1994): Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* **263**, 92-95.

Stancato, L.F., Sakatsume, M., David, M., Dent, P., Dong, F., Petricoin, E.F., Krolewski, J.J., Silvennoinen, O., Saharinen, P., Pierce, J., Marshall, C.J., Sturgill, T., Finbloom, D.S., Larner, A.C. (1997): Beta interferon and oncostatin M activate Raf-1 and mitogen-activated protein kinase through a JAK1-dependent pathway. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3833-3840.

Stancato, L.F., Yu, C.-R., Petricoin, E.F., Larner, A.C. (1998): Activation of raf-1 by interferon  $\gamma$  and oncostatin M requires expression of the Stat1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 18701-18704.

Stevens, A.M., Wang, Y.F., Sieger, K.A., Lu, H.F., Yu-Lee, L.Y. (1995): Biphasic transcriptional regulation of the interferon regulatory factor-1 gene by prolactin: involvement of gamma-interferon-activated sequence and Stat-related proteins. *Mol. Endocrinol.* **9**, 513-525.

Taga, T., Kishimoto, T. (1992): Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J.* **6**, 3387-3396.

Tanner, J.W., Chen, W., Young, R.L., Longmore, G.D., Shaw, A.S. (1995): The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 6523-6530.

Thoma, B., Bird, T.A., Friend, D.J., Gearing, D.P., Dower, S.K. (1994): Oncostatin M and leukemia inhibitory factor trigger overlapping and different signals through partially shared receptor complexes. *J. Biol. Chem.* **269**, 6215-6222.

Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R.P., Jove, R. (1998): Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2545-2552.

Van Wagoner, N., Oh, J.-W., Repovic, P., Benveniste, E.N. (1999): IL-6 production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. *J. Neurosci.* **19**, 5236-5244.

Van Wagoner, N.J., Choi, C., Repovic, P., Benveniste, E.N. (2000): Oncostatin M Regulation of Interleukin-6 Expression in Astrocytes: Biphasic Regulation Involving the Mitogen-Activated Protein Kinases ERK1/2 and p38. *J. Neurochem.* **75**, 563-575.

Wagner, B.J., Hayes, T.I., Hoban, C.J., Cochran, B.H. (1990): The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *EMBO J.* **9**, 4477-4484.

Wang, Y., Morella, K.K., Ripperger, J., Lai, C.-F., Gearing, D.P., Fey, G.H., Campos, S.P., Baumann, H. (1995): Receptors for interleukin-3 (IL-3) and growth hormone mediate an IL-6-type transcriptional induction in the presence of JAK2 or STAT3. *Blood* **86**, 1671-1679.

Weis, J., Schönrock, L.M., Züchner, S.L., Lie, D.C., Sure, U., Schul, C., Stögbauer, F., Ringelstein, E.B., Halfter, H. (1999): CNTF and its receptor subunits in human gliomas. *J. Neurooncol.* **44**, 243-253.

Welte, T., Garimorth, K., Philipp, S., Doppler, W. (1994): Prolactin-dependent activation of a tyrosine phosphorylated DNA binding factor in mouse mammary epithelial cells. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1091-1102.

Wood, T.J.J., Sliva, D., Lobie, P.E., Pircher, T.J., Gouilleux, F., Wakao, H., Gustafsson, J.-A., Groner, B., Norstedt, G., Haldosen, L.-A. (1995): Mediation of growth hormone-dependent transcriptional activation by mammary gland factor/Stat 5. *J. Biol. Chem.* **270**, 9448-9453.

Yamanaka, Y., Nakajima, K., Fukada, T., Hibi, M., Hirano, T. (1996): Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation. *EMBO J.* **15**, 1557-1565.

Zaheer, A., Zhong, W., Uc, E.Y., Moser, D.R., Lim, R. (1995): Expression of mRNAs of multiple growth factors and receptors by astrocytes and glioma cells: detection with reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cell. Mol. Neurobiol.* **15**, 221-237.

Zarling, J.M., Shoyab, M., Marquardt, H., Hanson, M.B., Lioubin, M.N., Todaro, G.J. (1986): Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9739-9743.

Zhang, X.G., Gu, J.J., Lu, Z.Y., Yasukawa, K., Yancopoulos, G.D. Turner, K., Shoyab, M., Taga, T., Kishimoto, T., Bataille, R., Klein, B. (1994): Ciliary neurotrophic factor,

interleukin 11, leukemia inhibitory factor and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J. Exp. Med.* **179**, 1343-1347.

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

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

## Lebenslauf

**Name:** Christiane Postert  
**Geburtsdatum und -ort:** 20.04.1974 in Münster

### Schulbildung

1980-1984 **Grundschule** in Everswinkel  
1984-1993 **Gymnasium** Laurentianum in Warendorf

### Tätigkeiten vor dem Studium

1993-1994 **Freiwilliges Soziales Jahr** im St.  
Franziskus Hospital Münster

### Studium

1994-1995 Studium der Humanmedizin an der **Georg-August-Universität Göttingen**  
1995-2000 Studium der Humanmedizin an der **Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

### Beruf

Mai 2001-Oktober 2002 Tätigkeit als **Ärztin im Praktikum** in der neurologischen Abteilung des Herz-Jesu-Krankenhauses Hilstrup  
Seit November 2002 Tätigkeit als **Assistenzärztin** in der neurologischen Abteilung des Herz-Jesu-Krankenhauses Hilstrup

**Münster, 20.09.2003**

## **Danksagung**

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Neurologie für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit.  
Mein Dank gilt insbesondere auch

Herrn Dr. H. Halfter für die stete und ausdauernde Betreuung.

Herrn Priv-Doz. Dr. F. Stögbauer für die Überlassung des Themas.

Frau Wachsmuth für ihre praktischen Anleitungen und die vielen Tipps für das Arbeiten im Labor.

Frau Laumann für die vielen kleinen Hilfestellungen in zahlreichen alltäglichen Fragestellungen.