



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Pharmakologische Bedeutung der Glykosylierung des IL-6 Co-Rezeptorproteins Gp130 in Melanomzelllinien“

verfasst von / submitted by

Katharina Svoboda

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2019 / Vienna, 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Prof. Dr. Martin Hohenegger

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Martin Hohenegger für die Bereitstellung dieses spannenden Themas und die Möglichkeit meine Diplomarbeit an der Medizinischen Universität Wien am Department für Pharmakologie zu absolvieren. Ich möchte mich für die viele Zeit für Fragen und Anliegen bedanken und die Chance mich sowohl fachlich, als auch persönlich weiter zu entwickeln.

Weiters danke ich Univ. Professor Mag. Dr. Walter Jäger für die Co-Betreuung an der Universität Wien, Fakultät für Pharmazie, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzliches Dankeschön an Mag. Christine Wasinger PhD, für die gute fachliche Einschulung und Betreuung während der Zeit im Labor. Weiters möchte ich mich für den persönlichen Einsatz und die viele Zeit und Geduld bedanken.

Ich möchte mich bei meiner Familie, meinem Freund und all meinen Freunden und Kollegen bedanken, die mich auf dem Weg durchs Studium begleitet und in schwierigen Situationen motiviert und unterstützt haben.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	2
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	3
3.1	Das Melanom.....	3
3.1.1	Risikofaktoren .....	3
3.1.2	Derzeitige Therapie .....	4
3.1.3	Negative Faktoren für Therapie.....	4
3.1	Der IL-6-Signalweg .....	5
3.1.1	IL-6 Rezeptor und Gp130.....	5
3.1.2	JAK/Stat Signalweg .....	6
3.1.3	PI3kinase Signalweg .....	7
3.1.4	MAPkinase Signalweg .....	7
3.2	Glykosylierung .....	8
3.2.1	N-Glykosylierung .....	8
3.2.2	Hemmung der Glykosylierung .....	9
3.2.3	ER-Stress .....	10
<b>4</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	14
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	15
5.1	Zelllinien.....	15
5.1	Medien und Substanzen:.....	15
5.2	Geräte.....	16
5.3	Antikörperliste .....	16
5.4	Zellkultur .....	17
5.4.1	Die 5 Zelllinien.....	17
5.4.2	Zellen splitten .....	17
5.4.3	Glykoylierungsinhibitoren.....	18

5.5	Lysate.....	18
5.5.1	Isolierung.....	19
5.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Methode .....	20
5.6	Gelelektrophorese.....	20
5.7	Nachweis der veränderten Glykosylierung mittels PNGase F .....	24
5.8	Proliferationstest.....	24
5.9	Statistische Auswertung .....	25
<b>6</b>	<b>Resultate</b> .....	<b>26</b>
6.1	Charakterisierung der Melanomzelllinien: .....	26
6.1.1	Basale Gp130 Expression.....	26
6.1.2	Basale Stat3 Expression .....	28
6.2	Verwendung unterschiedlicher Antikörper .....	29
6.3	PNGase Behandlung als Beweis für Veränderte Glykosylierung .....	31
6.4	Zeitabhängige Hemmung der Glykosylierung durch Tunicamycin (0,5µM).....	32
6.5	Verminderte Glykosylierung führt zu Inaktivierung von Stat3.....	33
6.6	Stadienabhängiger Einfluss von Simvastatin .....	35
6.6.1	Simvastatin und Glykosylierung .....	35
6.6.2	Wirkung von Simvastatin auf die IL-6 Kaskade .....	35
6.6.3	Stadienabhängiger Einfluss auf Stat3.....	36
6.7	Inaktiviertes Stat3 führt zu verminderter Proliferation und Apoptose .....	37
6.8	Hemmung der Glykosylierung führt zu verminderter Proliferation und fördert Apoptose. ....	38
6.9	PARP als Nachweis für Apoptose .....	38
6.10	Einfluss der Hemmung der Glykosylierung auf andere Signalwege.....	40
6.10.1	Aktivierung des Map-Kinase Signalweges .....	41
6.10.2	Basale Aktivierung von NFκB .....	41
6.10.3	Verstärkte Aktivierung von NFκB .....	42

6.10.4	Konzentrations- und zeitabhängige Aktivierung von Stat3 unter der Behandlung mit Simvastatin 3µM und 10µM in der WM-Zelllinie WM278.....	43
6.10.5	Konzentrations- und zeitabhängige Aktivierung von und AKT unter der Behandlung mit Simvastatin in der WM-Zelllinie WM278.....	44
6.10.6	Konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss auf die Aktivierung von und ERK unter der Behandlung mit Simvastatin 3µM und 10µM in der WM-Zelllinie WM278 .....	45
6.10.7	Basale COX 2 Expression .....	46
6.10.8	Konzentrationsabhängige und Zeit Aktivierung von COX 2 unter der Behandlung mit Simvastatin 3µM und 10µM in der WM-Zelllinien WM278 ....	47
<b>7</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>48</b>
7.1	Beantwortung der Zielsetzung.....	49
7.1.1	Tunicamycin zeigt stadienunabhängige Effekte, während Simvastatin die Glykosylierung selektiv in den metastasierenden Melanomzellen beeinflusst. ...	49
7.1.2	Effekte von Tunicamycin auf die Glykosylierung sind zeitabhängig und Simvastatin zeigt zeit- und konzentrationsabhängige Effekte.....	51
7.1.3	Einfluss auf nachgeschaltete Signalwege der IL-6 Kaskade.....	52
7.1.4	Verwendung von Tunicamycin und Simvastatin .....	53
<b>8</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>58</b>
9.1	Quellenangaben zum Abbildungsverzeichnis .....	60
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>61</b>
<b>11</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>62</b>
<b>12</b>	<b>Veröffentlichung der Arbeit</b> .....	<b>66</b>

# 1 Zusammenfassung

Das maligne Melanom stellt weltweit eine der aggressivsten und häufigsten Krebsarten mit steigender Inzidenz dar. Bei seiner Entstehung spielen sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse eine wesentliche Rolle. Erhöhte IL-6 Plasma Spiegel können sowohl bei entzündlichen Prozessen, als auch bei verschiedenen Krebsarten festgestellt werden und stehen in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose des Melanoms. Auch in vitro werden in metastasierenden Melanom Zelllinien erhöhte IL-6 Spiegel gefunden. IL-6 ist ein wichtiges Zytokin, welches über den IL-6 Rezeptor und dem Signal übertragenden Glykoprotein Gp130 verschiedene Signalwege beeinflusst. Preliminäre Studien haben gezeigt, dass das Cholesterinsenkende Medikament Simvastatin stadienabhängig die Glykosylierung von Gp130 in Melanomzellen reduziert. Es stellte sich somit die Frage, ob die Reduktion der Glykosylierung von Gp130 zu einer veränderten Signaltransduktion in Melanomzellen führt.

In fünf verschiedenen Melanomzelllinien unterschiedlicher Wachstumsstadien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Tunicamycin wesentlich den Glykosylierungsstatus von Gp130 reduziert, was Simvastatin verstärkt in metastasierenden Melanomzellen macht. Während unter Tunicamycin verhindert gänzlich die Aktivierung von Stat3 in allen Melanomzellen, wo hingegen Simvastatin dies hauptsächlich in metastasierenden Melanomzellen macht. Die Kinetik der Inaktivierung von Stat3 ist konkordant mit der Reduzierung der Glykosylierung in Gp130 und führt mit Tunicamycin zu einer gleichzeitigen Aktivierung von ERK1/2, NFkB und einer beginnenden Apoptose, welche durch Degradation des Apoptosemarkers PARP nachgewiesen wurde. Unter Simvastatin Behandlung waren diese Effekte vor allem in metastasierenden Melanomzellen beobachtbar.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Reduktion der Glykosylierung von Gp130 die endogene Aktivierung nachgeschalteter Signalwege beeinflusst und auf diese Weise eine proapoptotische Situation schafft. Die stadienabhängigen Effekte von Simvastatin zeigen, dass eine pharmakologische und damit eine therapeutische Regulation dieser Signalwege möglich ist.

## 2 Abstract

The malignant melanoma is one of the most common and aggressive cancers in the world with rising incidence. Genetic factors and environmental influences play an important role in its formation. Elevated IL-6 plasma levels can be detected in inflammatory processes and different cancers and correlate with bad prognosis of melanoma. Elevated IL-6 plasma levels could also be detected in metastatic cell lines in vitro. IL-6 is an important cytokine, which has an influence on different signaling pathways through the IL-6 Receptor and the signal transducing Glycoprotein GP130. Preliminary studies have proven, that the Cholesterol lowering drug Simvastatin reduces the Glycosylation of GP130 in melanoma cells, in a stage dependent manner. The question was, if reduction of glycosylation of Gp130 leads to a changed signal transduction in melanoma cells.

In five melanoma cell lines from different stages it could be observed that treatment with tunicamycin significantly reduced the glycosylation status of Gp130, which simvastatin has already increasingly shown in the metastatic cells. Tunicamycin prevents the activation of Stat3 altogether, whereas simvastatin mainly does this in the metastatic cells. The kinetic of inactivation of Stat3, is unanimously with the reduction of glycosylation in Gp130 and with tunicamycin it simultaneously leads to activation of ERK1/2, NFkB and a beginning of apoptosis, which could be detected through degradation of the marker of apoptosis PARP. Using simvastatin treatment, these effects could be mainly observed in the metastatic cells.

In summary one can see, that the reduction of glycosylation of Gp130 influences the endogenous activation of downstream signaling pathways and creates a proapoptotic situation in this way. The stage dependent effects of simvastatin reveal, that a pharmacological and thus a therapeutic regulation of these signaling pathways is possible.



## **3 Einleitung**

### **3.1 Das Melanom**

Das maligne Melanom ist meist tiefbraun bis blau-schwarz gefärbt und gehört zu den bösartigen Hauttumoren, die durch Entartung von Melanozyten entstehen. Es wird auch als dunkler bzw. schwarzer Hautkrebs bezeichnet. Die rasche Ausbreitung von Metastasen vor allem in Lunge und Gehirn ist charakteristisch wodurch das Melanom zu einer der aggressivsten Krebsarten gehört. Melanome entwickeln sich meist auf klinisch normaler Haut (Mutschler Ernst et al. 2013) Veränderte Muttermale stellen einen Risikofaktor für die Entstehung von Melanomen dar. Nach Clark und Kollegen wird das Melanom seit 1969 in 5 Stadien eingeteilt wobei die Einteilung nach der maximalen Eindringtiefe in die verschiedenen Schichten der Haut und des Unterhautbindegewebes erfolgt (Clark et al 1996). Seit 1970 gilt, nach der Methode von Breslow die Tumordicke als verlässliches Kriterium für die Prognose. Hierfür wird die vertikale Größe des Melanoms mit einem Okularmikrometer in Millimetern vermessen. Dies stellt eine relativ einfache Methode zur Bestimmung der Eindringtiefe des Melanoms in Korrelation mit der Überlebensrate dar (Breslow 1970, 1975). Die Kombination beider Methoden stellt einen wesentlichen Parameter für die Überlebensrate und wichtige Richtlinien für das Patientenmanagement dar. (Breslow 1970, 1975) (Clark et al. 1969)

#### **3.1.1 Risikofaktoren**

##### **3.1.1.1 Genetische Faktoren**

Das Risiko für die Entstehung eines Melanoms ist für Patienten mit einer signifikanten familiären Vorgeschichte 30 bis 70-fach erhöht (Kefford et al. 1999; Måsbäck et al. 2002) Atypische Muttermale werden meist als Naevuszellnaevi oder Leberflecken mit einem Durchmesser größer 5mm beschrieben. Ihre unregelmäßige asymmetrische Begrenzung, unterschiedlich starke Pigmentierung und eine erhabene Beschaffenheit sind charakteristisch. Sie stellen einen großen Risikofaktor für die Entstehung von Melanomen dar. (Bataille et al. 1996)

##### **3.1.1.2 BRAF Mutation**

Die Entdeckung der BRAF Mutation eröffnet neue Therapiemöglichkeiten des Melanoms. BRAF ist in nahezu 8% aller Krebsarten mutiert (Davies et al. 2002). Die meisten Missens Mutationen treten in der Aktivierungsschleife des Proteins um die Aminosäure Valin an Position 600, oder in der GSGSFG Phosphat Bindungsschleife an Position 464-469 auf (Garnett and Marais 2004).

Normalerweise werden die Aminosäuren T599 und S602 in der Aktivierungsschleife phosphoryliert wodurch das Zusammenspiel von Aktivierungsschleife und Phosphatbindungsschleife gesteuert wird. BRAF kann zwischen aktiver und inaktiver Kinaseform wechseln. Im mutierten BRAF kommt es zur Substitution in einer der beiden Schleifen. Dadurch wird die Phosphorylierung von T599 und S602 nachgeahmt und das Gleichgewicht verschiebt sich auf die durch die Kinase aktivierte Seite. (Holderfield et al. 2014). Eine Raf Mutation ist in ca. 40% der malignen Melanome zu finden (Mutschler Ernst et al. 2013).

## **3.1.2 Derzeitige Therapie**

### **3.1.2.1 BRAF-V600E Kinase Inhibitoren**

In 70 % der humanen Melanome findet sich eine BRAF<sup>V600E</sup> Mutation auf, wodurch es zu einer autonomen Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges kommt (Karasarides et al. 2004). Aufgrund seiner Tumorgenetik scheint das Melanom ideal zur Testung von BRAF<sup>V600E</sup> Inhibitoren geeignet zu sein (Tsai et al. 2008). Sorafenib wurde als erster RAF-Hemmer zur Behandlung von RAS mutierten Krebsarten in klinischen Studien zugelassen (Lyons et al. 2001). Der Wirkmechanismus von Sorafenib beruht auf der kompetitiven Hemmung der ATP Bindung auf der aktiven Seite der CRAF Kinase Domäne. Da Inhibitoren von CRAF in BRAF mutierten Melanomen unzureichende Wirkung zeigten, wurde mit Vemurafenib und Dabrafenib eine zweite Generation von ATP-kompetitiven RAF Inhibitoren entwickelt, die speziell BRAF<sup>V600E</sup> blockieren (Tsai et al. 2008)

### **3.1.2.2 MEK-Inhibitoren**

Da es unter BRAF-Hemmung zu einer Reaktivierung des MAPkinase Signalweges kommen kann (Shi et al. 2014), werden Vemurafenib und Dabrafenib häufig in Kombination mit den MEK Inhibitoren Trametinib (Ryu et al. 2017) und Cobimetinib zur Behandlung des BRAF<sup>V600E</sup> mutierten Melanom verwendet (Mackiewicz and Mackiewicz 2018).

## **3.1.3 Negative Faktoren für Therapie**

Für die Therapie spielt der Zeitpunkt der Diagnose (Friedman, Rigel, and Kopf 1985) und die Beurteilung des Stadiums nach Clark und Breslow eine wesentliche Rolle. Während die frühen Stadien gut auf die Behandlung ansprechen, stellt die Therapie des metastasierten Melanoms eine Herausforderung dar (Breslow 1970, 1975) (Clark et al. 1969).

Die Mutationen von BRAF, RAS oder MEK stellen eine zusätzliche Herausforderung für die Therapie dar (Davies et al. 2002). Weiters kann es während der Therapie zu Resistenzen kommen.

So zeigten BRAF Hemmer nach einiger Zeit eine verstärkte Aktivierung des MAPkinase Signalweges, und somit eine Resistenz gegen die Behandlung (Shi et al. 2014).

IL-6 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumoren, da es das Tumorwachstum, durch Hemmung der Apoptose, begünstigt. Bei vielen Krebsarten kann eine Fehlregulation von IL-6 festgestellt werden. Erhöhte IL-6 Serumkonzentrationen bei Patienten mit Melanom stehen in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose (Mouawad et al. 1996). Dies ist gut nachvollziehbar, da IL-6 als proinflammatorisches Zytokin wirkt. Laut Alberto Mantovani und Kollegen können Entzündungen, welche durch Zytokine und Chemokine hervorgerufen werden mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht werden (Mantovani et al. 2008). Des Weiteren kann bei vielen Krebsarten eine erhöhte Stat3 (Yu, Pardoll, and Jove 2009a) und PARP Aktivität nachgewiesen werden (Nosho et al. 2006). Das heisst, dass der Signalweg über IL-6 verstärkt wird und DNA Reparaturmechanismen über PARP vermehrt aktiviert werden.

## **3.1 Der IL-6-Signalweg**

### **3.1.1 IL-6 Rezeptor und Gp130**

IL-6 ist ein Glykoprotein, das zur Gruppe der Zytokine gezählt wird und von den verschiedensten Zelltypen, wie Makrophagen, Monozyten, Keratinozyten, Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten, aber auch von Tumorzellen produziert wird (Hoejberg, Bastholt, und Schmidt 2012). Der membrangebundene IL-6 Rezeptor besteht aus einer den Liganden bindenden Domäne, welche für die Bindung von IL-6 verantwortlich ist und dem signalübertragenden Glykoprotein Gp130, das stark N-glykosyliert ist und im ER synthetisiert wird (Heinrich et al. 1998). Das glykosylierte Protein verlässt das ER und wird durch den Golgi Apparat über Vesikeltransport als transmembranäres Glykoprotein in die Plasmamembran eingebaut, wo es für die Signalweiterleitung verantwortlich ist (Dettmer Ulf et al. 2005).

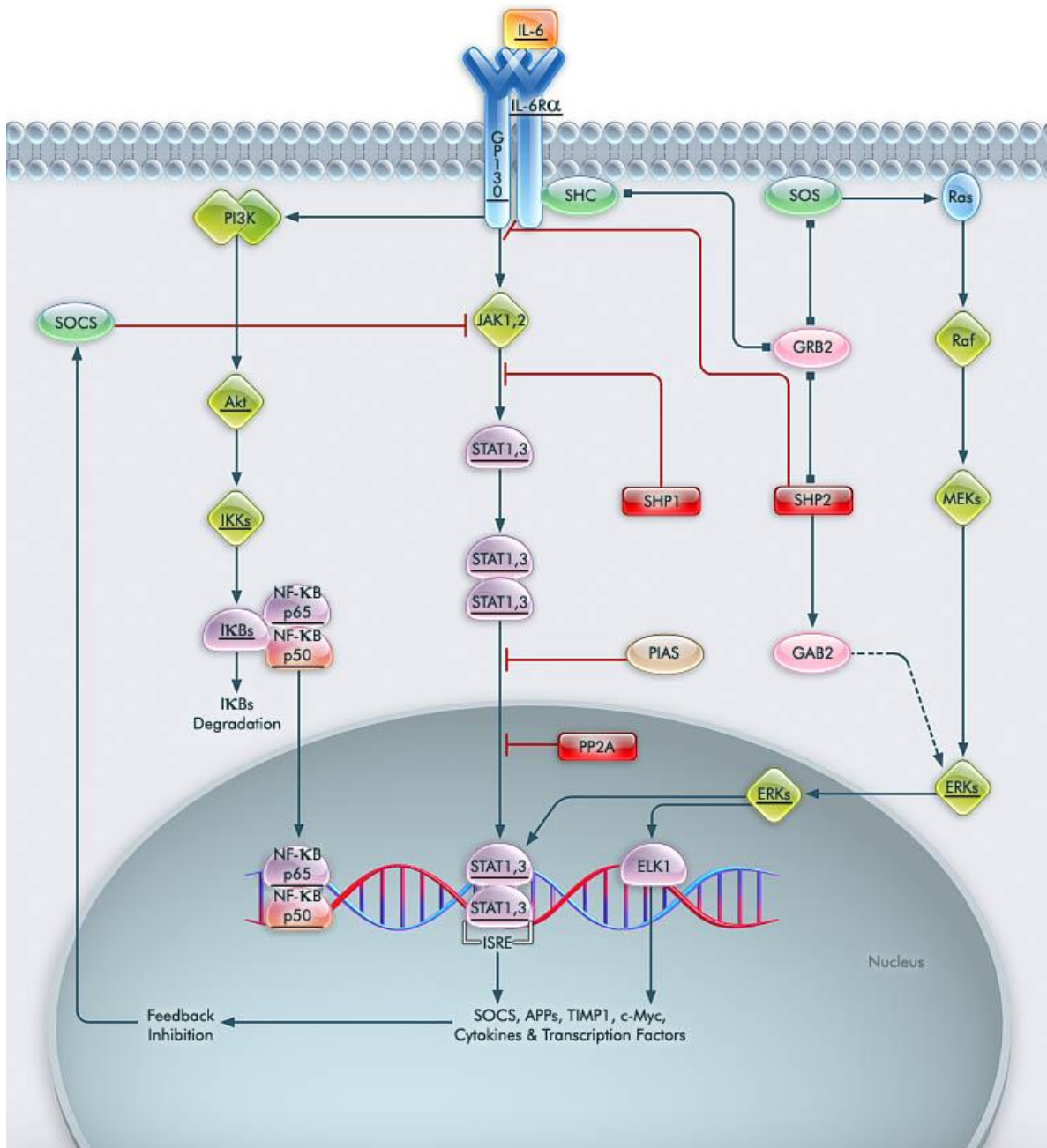


Abbildung 1.: IL-6 Signalweg (www.eBioscience.com © 2012 eBioscience)

Durch Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor wird über das transmembranäre Glykoprotein Gp130 das Signal ins Zellinnere weitergeleitet. Dadurch können 3 verschiedene Signalwege aktiviert werden: Der JAK/Stat3 Signalweg, der PI3kinase Signalweg und der MAPkinase Signalweg (Müller-Esterl Werner 2011).

### 3.1.2 JAK/Stat Signalweg

Nach Bindung von IL-6 an seinen IL-6 Rezeptor werden Januskinasen, welche mit Gp130 assoziiert sind, durch Phosphorylierung aktiviert und diese wiederum phosphorylieren Stat3. Aktiviertes Stat3 wandert als Transkriptionsfaktor in den Zellkern und kann somit Zellwachstum,

Entzündung und Gefäßneubildung beeinflussen. Stat3 reguliert die Genexpression vieler Zytokine und Chemokine, unter anderem auch proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, NFkB und COX2 (Yu, Pardoll, and Jove 2009b), auf welche später noch näher eingegangen wird. Des Weiteren schützt Stat3 die Zelle vor Apoptose. In vielen Tumorzellen kann eine erhöhte Stat3 Aktivität nachgewiesen werden, wodurch dessen Hemmung einen interessanten Ansatzpunkt für die Krebstherapie bringt (Chesnokov, Sun, and Itakura 2009).

### **3.1.3 PI3kinase Signalweg**

Ein weiterer Signalweg, der über IL-6 aktiviert werden kann ist der PI3kinase Signalweg. Die PI3kinase ist für die Phosphorylierung von PIP2 verantwortlich und wird über spezifische Tyrosinphosphat Reste im Zytosol rekruiert. PIP3 dient als Anker für AKT, welches durch die proapoptischen Faktoren Bad und FOXO Bcl 2 hemmt, welches für die Freisetzung von Cytochrom c in den Mitochondrien verantwortlich ist. Aktivierung von Bad aber auch Bax führt zur Apoptose durch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die anschliessende Freisetzung von Cytochrom c. Der Gegenspieler von PI3kinase ist Pten, welches PIP3 dephosphoryliert und somit zu Inaktivierung des Signalweges führt (Müller-Esterl Werner 2011). Mutationen in Pten führen zu einer dauerhaften Aktivierung des Signalweges und begünstigen die Entstehung von Krebsarten wie Melanom (Celebi et al. 2000; Stahl et al. 2003).

### **3.1.4 MAPkinase Signalweg**

RAF MEK und ERK zählen zu den MAPKinasen, welche wiederum Serin/Threonin Proteinkinasen sind. RAF wird durch das kleine G-Protein Ras, welches als transmembranäres Protein Rezeptortyrosinkinase Aktivität besitzt und am Zellzyklus beteiligt ist, aktiviert. RAF aktiviert daraufhin MEK und dieses wiederum ERK, welches daraufhin in den Zellkern wandert, wo es verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NFkB aktivieren kann (Müller-Esterl Werner 2011). Mutationen von Ras und BRAF führen zu einer anhaltenden autonomen Aktivierung des MAPkinase Signalweges in Melanomen (Davies et al. 2002).

#### **3.1.4.1 Weitere Signalmoleküle**

##### **3.1.4.1.1 NFkB**

Der Transkriptionsfaktor NFkB liegt als Komplex mit IkB gebunden im Cytoplasma vor, wodurch NFkB gehindert wird in den Zellkern zu gelangen. Die schnelle Aktivierung von NFkB lässt sich dadurch erklären, dass NFkB nicht erst synthetisiert werden muss, sondern schon funktionsbereit im Cytoplasma vorliegt (Müller-Esterl Werner 2011). NFkB kann durch zahlreiche Mechanismen

aktiviert werden, welche vorwiegend dessen Hemmung durch I $\kappa$ B aufheben. Dies geschieht durch Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch I $\kappa$ Bkinasen, welche auch durch Cytokine aktiviert werden können. Hua Yu und Kollegen beschreiben die vielfältige Rolle der Signalweiterleitung von NF $\kappa$ B und seinen Bezug zu Stat3. Es konnte weiters gezeigt werden, dass Stat3 und NF $\kappa$ B sich in vielen gemeinsamen, aber auch gegensätzlichen Mechanismen beeinflussen können, wobei die Hemmung von I $\kappa$ B durch Stat3 (Yu, Pardoll, and Jove 2009a) für diese Arbeit relevant ist. Das heißt, dass IL-6 und Inaktivierung von Stat3 zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B führen können.

#### **3.1.4.1.2 COX 2**

COX2 wird bei Entzündungen induziert und ist für die Prostaglandin Synthese verantwortlich. Entzündung und Krebs stehen in Zusammenhang (Mantovani et al. 2008) und die Expression von COX2, wird durch Stat3 beeinflusst (Yu, Pardoll, and Jove 2009a). In einer Studie von S. Tsutsumi und Kollegen mit Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) konnte gezeigt werden, dass die in Magenzellen von Meerschweinchen Apoptose durch ER-Stress, vor allem durch den Transkriptionsfaktor CHOP induziert werden konnte (Tsutsumi et al. 2004).

## **3.2 Glykosylierung**

Die Glykosylierung von Proteinen ist ein wesentlicher Bestandteil der Proteinbiosynthese und damit ein wichtiger Beitrag zur Stabilität, und dem Export und der Funktion des Proteins (Zhao et al. 2008). Man unterscheidet zwischen N- und O-Glykosylierung. Die N-Glykosylierung findet während der Translation im Endoplasmatischen Retikulum statt. Die O-Glykosylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die im Golgi-Apparat stattfindet. Dort werden Zuckerreste durch Glykosyltransferasen auf Serin und Threonin übertragen (Dettmer Ulf et al. 2005)

### **3.2.1 N-Glykosylierung**

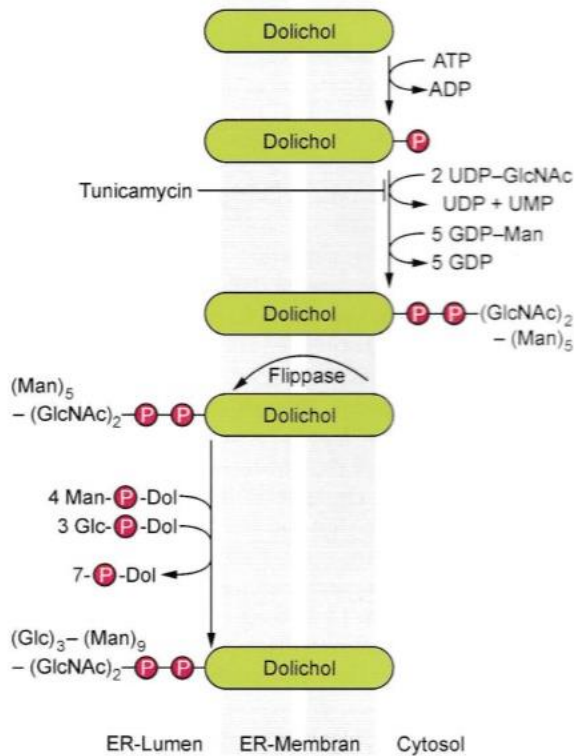
Nahezu alle Membranproteine sind N-glykosyliert, wobei Zuckerreste an Asparagin angehängt werden. Als Zucker werden Mannose, Glucose, und N-Acetylglucosamin verwendet. Das so genannte Kern-Glykosid wird an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums zusammgebaut. Als Träger für das Oligosaccharid dient das Isoprenderivat Dolicholphosphat, das mit seinem Isoprenanteil im Endoplasmatischen Retikulum verankert ist und dessen Phosphatanteil ins Cytosol ragt. Dort werden 2 N-Acetylglucosamine und 5 Mannosereste angehängt. Dieser Vorgang wird als Kernglykosylierung bezeichnet. Durch die Flippase kommt es zur Translokation der Zuckerreste von der Cytosolseite ins Endoplasmatische Retikulum, wo

weitere Zuckerreste angehängt werden. Die Abspaltung von Dolicholphosphat und die Übertragung auf ein Polypeptid findet ebenfalls im ER statt (Müller-Esterl Werner 2011).

### **3.2.2 Hemmung der Glykosylierung**

Durch Hemmung der Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum (ER) kommt es zu einer Vielzahl von Veränderungen in Bezug auf Stabilität, Funktion und Transport des Proteins. Die Glykosylierung ist essentiell für die Stabilität, nicht immer aber für die Funktion (Waetzig et al. 2010). Die Qualitätskontrolle, welche für eine korrekte Faltung der glykosylierten Proteine im rauhen ER sorgt, (Dettmer Ulf et al. 2005) scheitert bei der Hemmung der Glykosylierung (Hammond, Braakman, and Helenius 1994) und es kommt zum sog. „unfolded-protein response“ oder ER-stress.

Als spezifische Hemmer der Glykosylierung wird Tunicamycin für Forschungszwecke verwendet (McDowell and Schwarz 1988). Weiters konnte Viktor Chesnokov mit Glucosamin, welches für die Anwendung am Menschen geeignet ist, eine Hemmung auf die N-Glykosylierung verschiedener Proteine zeigen (Chesnokov et al. 2014). Simvastatin ist ein cholesterin-senkendes Medikament und hemmt die HMG-CoA Reduktase, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der endogenen Cholesterinsynthese. Damit wird auch die Dolicholsynthese reduziert, was sich in der reduzierten Glykosylierung von Proteinen auswirkt. So konnte bereit gezeigt werden, dass der ABCB1 Transporter (P-Glykoprotein) reduziert glykosyliert wird und dadurch die Transportfunktion reduziert wird, was zu einer verstärkten intrazellulären Anreicherung des Zytostatikums Doxorubicin führt. Dies konnte in Rhabdomyosarkomzellen und Neuroblastomzellen, die mit Simvastatin behandelt wurden, beobachtet werden (Scieczkowski und Werner).



**Abbildung 2: Hemmung der Glykosylierung durch unterschiedliche Mechanismen** (Müller-Esterl Werner 2011)

Tunicamycin greift über die Hemmung der Oligosaccharidsynthese in die Glykosylierung ein. Dolichol ist für die Beförderung der Oligosaccharide von der Cytosolseite auf die luminal Seite des ERs essentiell (Müller-Esterl Werner) Simvastatin hemmt die HMGCoA-Reduktase, welche die Bildung von Mevalonsäure aus HMGCoA katalysiert. Dadurch kommt es auch zu einer Verminderung der Dolicholspiegel (Brown and Goldstein 1980) wodurch die Glykosylierung ebenfalls beeinflusst werden kann.

### 3.2.3 ER-Stress

Proteine werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und korrekt gefaltet. Weiters kommt es während der Translation zu Modifizierung und N-Glykosylierung der Proteine. Kommt es zu einer Fehlregulation bei der Proteinbiosynthese werden unvollständig modifizierte Proteine im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und reichern sich dort an (Kadowaki und Nishitoh 2013). Dies bedeutet Stress für die Zelle und es kommt zu Mechanismen, wie dem ER Stress oder “unfolded Protein response” (Fribley, Zhang, and Kaufman 2009). Hält der Zustand des ER-stress jedoch zu lange an, kommt es zur Apoptose.

#### 3.2.3.1 Zellzyklus

Die Zelle durchläuft unter normalen Bedingungen einen Zellzyklus. Dabei werden verschiedene Phasen durchlaufen mit dem Ziel der Verdopplung der DNA in der Synthesephase und Trennung

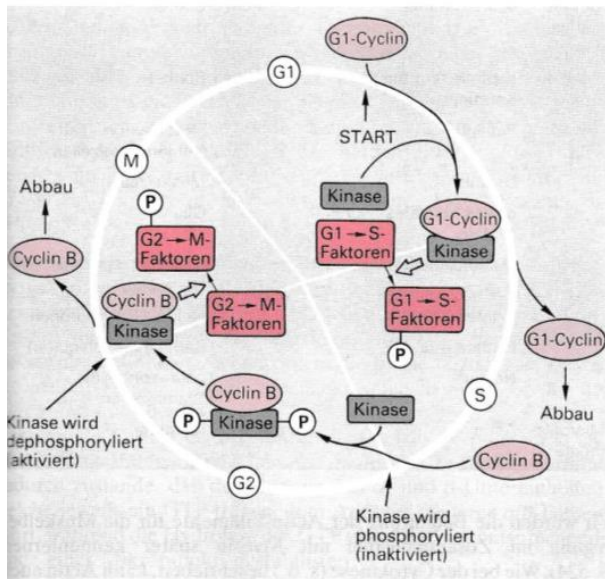


und Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen in der Mitosephase. Synthese- und Mitosephase sind durch zwei Wachstumsphasen unterbrochen. Die G<sub>1</sub>-Phase dient hauptsächlich der Protein- und RNA-Synthese für die Synthesephase, in der DNA synthetisiert wird, die G<sub>2</sub>-Phase bereitet die Zelle auf die Mitose vor (Barnum and O'Connell 2014).

Nach Paul Nurse ist die Zellgröße ein wichtiges Kriterium für die Zellteilung. Das temperaturempfindliche *cdc 2* Gen ist bei der Kontrolle des Zellzyklus der Spaltheefe *Saccharomyces pombe* für den Eintritt in die S-Phase verantwortlich und ein limitierender Faktor für den Beginn der Mitose. Es konnte auch ein humanes *cdc* Gen identifiziert werden. Für den Eintritt in die G<sub>1</sub>/S-Phase und G<sub>2</sub>/M-Phase spielen Cyclin abhängige Kinasen (CDKs) eine wesentliche Rolle, wobei in Eukaryonten zwei unterschiedliche CDKs dafür verantwortlich sind, in der Spaltheefe ist nur eine CDK zuständig (Nurse 2002).

Zellen, die sich gerade nicht im Teilungszyklus befinden bleiben in der Interphase, in der so genannten G<sub>0</sub> Phase. Auch Krebszellen können sich wieder in einen inaktiven Zustand begeben und sind somit nicht mehr für die Therapie zugänglich. Bevor die Zelle in die nächste Phase übertritt wird durch Kontrolle, der bereits durchlaufenen Phase, dafür gesorgt, dass eventuelle Zellschäden nicht übernommen werden. Diese so genannten „checkpoints“ sind am Ende der G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> und M-Phase zu finden. Hier spielen Proteine, welche den Zellzyklus anhalten eine wesentliche Rolle (Herdegen Thomas et al. 2014).

Das Tumorsupressorprotein p53, übernimmt im regulären Zellzyklus diese Aufgabe. Die Proteine p16 und p21 sind Cyclin-abhängige Kinasen Inhibitoren (CKIs). Das Protein p53 aktiviert p21 wodurch die Zelle in der G<sub>1</sub>-Phase zurückgehalten wird mit dem Ziel der DNA Reparatur. Gelingt dies nicht leitet p 53 Apoptose ein. Mutationen von p53 führen dazu, dass der Zellzyklus ohne Reparatur fortgesetzt wird und Zellen die Möglichkeit haben Veränderungen weiter zu geben (Mutschler Ernst et al. 2013).



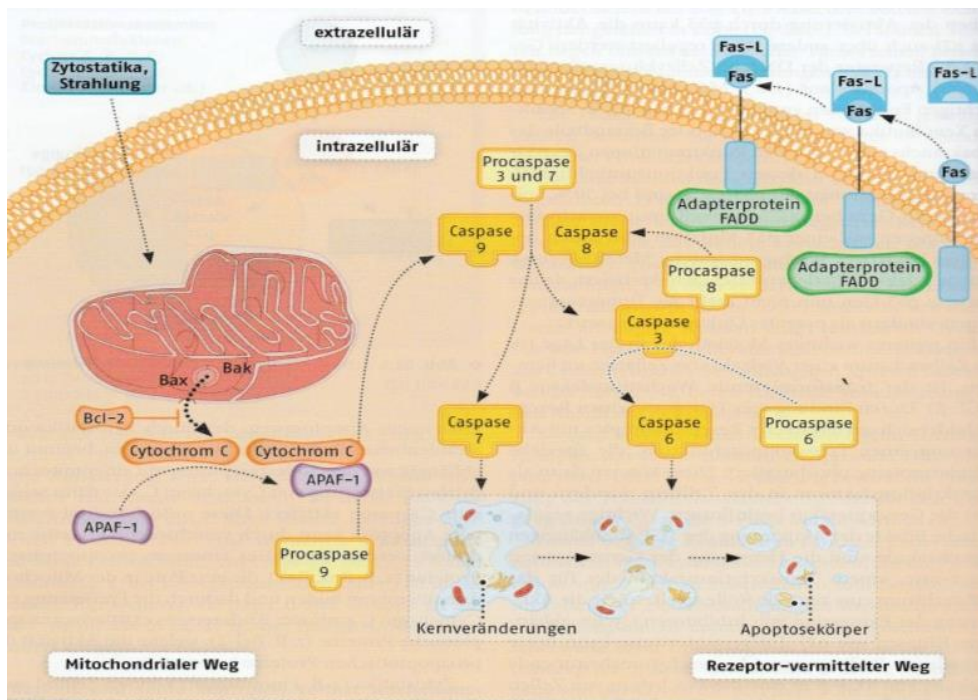
**Abbildung 3.: Einfluss der Cyclin abhängigen Kinasen (CDKs) auf den Zellzyklus** (Karlson Peter, Doenecke Detlef, and Koolman Jan 1994)

### 3.2.3.2 Apoptose

Der programmierte Zelltod ist ein physiologischer Mechanismus, der in vielen Bereichen von lebenden Organismen zu finden ist. Apoptose spielt bei der Zellteilung eine wichtige Rolle. Zellen, die während des Zellzyklus einen DNA Schaden erleiden bekommen die Chance, dass dieser durch Reparaturmechanismen repariert werden kann. Ist dies nicht möglich wird die Zelle durch Apoptose zerstört (Mutschler Ernst et al. 2013).

Die Zelle erfährt im Laufe ihres Sterbeprozesses bis zu einem gewissen Punkt reversible Veränderungen. Irreversible Veränderungen werden ab dem so genannten „point of no return“ aktiviert. Dabei kommt es zur Aktivierung von Signalwegen und zu morphologischen Veränderungen (Kroemer et al. 2005).

Es sind vor allem zwei Signalwege, die zur Apoptose führen. Der Todesrezeptor vermittelte Signalweg über die Caspase 8 und der mitochondriale Weg über die Bildung der Mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore und der Formation des Proteasom- Komplexes mit der Aktivierung von Caspase 9 (Kroemer 1999). Beide Proteasen, Caspase 8 und Caspase 9 aktivieren Caspase 3/7 und in weiterer Folge degradiert die Caspase 3 Poly- ADP-Ribose Polymerase PARP (Green and Kroemer 1998).



**Abbildung 4.: Rezeptor und Mitochondrien regulierte Signalwege der Apoptose** (Mutschler Ernst et al. 2013)

### 3.2.3.2.1 Krebs und Apoptose

Bei der Entstehung von Krebs kommt es zum Verlust von Differenzierung und ungehemmter Proliferation. Die Zellen sind durch autonome Stimulation meist nicht mehr auf externe Signale angewiesen. Weiters gibt es verschiedene Mechanismen, die das Tumorwachstum begünstigen (Mutschler Ernst et al. 2013). Die Mutation  $BRAF^{V600E}$  führt in Melanomzellen zu einer verstärkten Aktivierung des MAPkinase Signalweges. Durch Mutation von Pten kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des PI3kinase Signalwegs und dadurch zu einer verstärkten Hemmung der Apoptose (Celebi et al. 2000; Stahl et al. 2003). Weiters kann in Krebszellen eine Erhöhung der Stat3 (Yu and Jove 2004) und PARP Spiegel (Nosho et al. 2006) nachgewiesen werden, welche die Zelle vor Apoptose schützen.

### 3.2.3.2.2 PARP-1 als Marker für Apoptose

Die Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) stellt ein Schlüsselenzym in der DNA-Reparatur dar. Bei einigen Krebsarten, wie Magen-, Kolorektal-Karzinom und Melanom kann erhöhte PARP-1 Aktivierung nachgewiesen werden (Liu et al. 2016; Nosho et al. 2006; Staibano et al. 2005). Der Abbau von PARP-1 durch Proteolyse stellt einen Zwischenschritt bei der Apoptose der Zelle dar. PARP-1 wird dabei durch verschiedene Caspasen geschnitten (Liu et al. 2016), wobei vor allem Caspase 3 eine wichtige Funktion in Bezug auf Apoptose und der Spaltung von PARP hat (Cohen 1997). Das fragmentierte PARP kann dann mit Antikörpern nachgewiesen werden.

## 4 Ziele der Arbeit

Vorangehende Arbeitsgruppen konnten feststellen, dass die metastasierende Melanomzelllinien A375 und 518A2 im Vergleich zu den frühen Stadien erhöhte IL-6 Spiegel aufweisen. Weiters konnte gezeigt werden, dass die durch Simvastatin induzierte Apoptose durch endogenes IL-6 verstärkt wird, während die WM35 Zelllinie exogenes IL-6 für eine Verstärkung der Apoptose durch Simvastatin benötigt (Minichsdorfer et al. 2014)

Viktor Chesnokov und Kollegen konnten zeigen, dass die Hemmung der N-Glykosylierung von Gp130 durch Glucosamin Einfluss auf die Proliferation und den JAK/Stat3 Signalweg in der humanen Prostatazelllinie DHU145 hat (Chesnokov et al. 2014; Chesnokov, Sun, and Itakura 2009). Weiters konnte Kollegin Wasinger einen stadienabhängigen Effekt von Simvastatin auf die Gp130 Expression feststellen (Wasinger, Svoboda, Hohenegger, Posterpräsentation, Skin Cancer Meeting, Wien, 2016).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen war das Ziel dieser Arbeit

- i) Die Glykosylierung des IL-6 Co-Rezeptor Proteins Gp130 in fünf Melanomzelllinien unterschiedlicher Stadien durch Hemmung der Glykosylierung mittels Tunicamycin und Simvastatin zu untersuchen.
- ii) Die Tunicamycin und Simvastatin Effekte sollten auch auf Konzentrations- und Zeitabhängigkeit untersucht werden.
- iii) Weiters sollte die Wirkung auf die IL-6 Kaskade unter Tunicamycin und Simvastatin untersucht werden, mit besonderem Augenmerk auf die nachgeschalteten Signalwege Stat3, ERK1/2 und NFkB. All diese Untersuchungen sollen in fünf Melanomzelllinien unterschiedlicher Stadien durchgeführt und verglichen werden.

# 5 Material und Methoden

## 5.1 Zelllinien

WM35: Humane Melanomzellen (radiales Wachstum); Coriell Institut (WC00060); B-RAF (V600E) aktivierende Mutation

WM278: Humane Melanomzellen (verticales Wachstum); Coriell Institut (WC00054); B-RAF (V600E) aktivierende Mutation

WM793b: Humane Melanomzellen (verticales Wachstum); Coriell Institut (WC00062); B-RAF (V600E) aktivierende Mutation

A375: Humane metastasierte Melanomzellen; Krebsforschung MUW; Walter Berger; B-RAF (V600E) aktivierende Mutation

518A2: Humane metastasierte Melanomzellen; AKH Vienna; B-RAF (V600E) aktivierende Mutation

## 5.1 Medien und Substanzen:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM/Ham's 1:1)  
Zelllinien: WM35, WM278 und WM793b Mit 20mmol/l Hepes (pH 7.4), 2% fetales Rinderserum (FBS), 20mmol/l L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin; Sigma Aldrich; Missouri, USA

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (4,5g/l); Zelllinien: A375 und 518A2 Mit 10% fetales Rinderserum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin; Sigma Aldrich; Missouri, USA

Simvastatin: Spezifikation: HMG-CoA Reduktase Inhibitor; Lösungsmittel: DMSO; Sigma Aldrich; Missouri, USA

PNGase: Spezifikation: Rekombinante Endoglykosidase alle Asn verknüpften Oligosachharide  
Lösungsmittel 2.5 U\*/ml (in 20 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl 1 mM EDTA) Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547 4006094 Rev A

Tunicamycin: Spezifikation Glycosyl-aminoglycan-transferase Inhibitor Lösungsmittel Methanol; Sigma Aldrich; Missouri, USA

## 5.2 Geräte

Eppendorf Zentrifuge 5415R; Rotor F45-24-11, Radius: 82.65mm; Firma: Eppendorf

Multi-Funktion Tischzentrifuge BR4i; Rotor: S40, Ausschwingrotor, Radius: 161mm; Firma: Jourdan

Sigma Zentrifuge 3-30KS; Rotor sigma 12370 50/R; Firma: Sigma

Implen NanoPhotometer; Firma: Implen

## 5.3 Antikörperliste

Primärer Antikörper:

GP130: Wirt: Maus; Proteingröße (kDa) 130; Verdünnung: 1/1000; Spezifikation: Mensch; Diaclone; Besançon, FR

GP130: Wirt: Kaninchen; Proteingröße (kDa) 130; Verdünnung: 1/1000; Spezifikation: Mensch; Millipore

Stat3: Wirt: Kaninchen; Proteingröße (kDa) 79/86; Verdünnung 1/1000; Spezifikation: Mensch, Maus, Ratte; Cell Signaling; Cambridge, UK

pSTAT3(Tyr705): Wirt: Kaninchen; Proteingröße (kDa) 79/86; Verdünnung: 1/1000; Spezifikation Mensch, Maus, Ratte, Katze; Cell Signaling; Cambridge, UK

PARP: Wirt: Kaninchen; Proteingröße (kDa) 89,116; Verdünnung 1/1000; Spezifikation Mensch, Maus, Ratte, Affe; Cell Signaling; Cambridge, UK

P-p44/42 MAPK (ERK1/2): Wirt: Kaninchen; Proteingröße (kDa) 42/44; Verdünnung: 1/1000; Spezifikation Mensch, Maus, Ratte, Huhn; Cell Signaling; Cambridge, UK

p44/42 MAPK (ERK1/2): Wirt: Kaninchen; Proteingröße (kDa) 42/44; Verdünnung: 1/1000; Spezifikation Mensch, Maus, Ratte; Cell Signaling; Cambridge, UK

AKT: Wirt: Kaninchen; Proteingröße (kDa) 60; Verdünnung 1/1000; Spezifikation: Mensch, Maus, Ratte; Cell Signaling; Cambridge, UK

pAKT: Wirt: Kaninchen; Proteingröße (kDa) 60; Verdünnung 1/1000; Spezifikation: Mensch, Maus, Ratte; Cell Signaling; Cambridge, UK

COX 2: Wirt: Maus; Proteingröße (kDa) 72; Verdünnung 1/1000; Spezifikation: Mensch, Rind, Affe; Cayman Chemical, USA

$\alpha$ -Tubulin: Wirt Maus Proteingröße (kDa)52 Verdünnung 1/5000 Spezifikation: Mensch, Maus, Ratte, Huhn Quelle Sigma Aldrich;

Aktin:Wirt:Proteingröße(kDa)42Verdünnung:1/5000;Spezifikation:Mensch,Maus,Ratte;Quelle: Sigma Aldrich;

Sekundärer Antikörper:

Anti-mouse, IgG HRP-linked Antikörper Wirt Ziege Verdünnung 1/10000 Spezifikation Maus Quelle Cell Signaling; Cambridge, UK

Anti-rabbit, IgG HRP-linked Antikörper Wirt Ziege Verdünnung 1/10000 Spezifikation Kaninchen Quelle Cell Signaling; Cambridge, UK

## 5.4 Zellkultur

### 5.4.1 Die 5 Zelllinien

Für die Versuche wurden 5 verschiedene Zelllinien, welche die 3 Stadien des Melanoms repräsentieren, verwendet. Die Zelllinien WM35 und WM278 sind für das radiale Wachstum charakteristisch, während die Zellen der Linie WM793 durch transversales Wachstum gekennzeichnet sind. Die Zelllinien A375 und 518A2 repräsentieren das metastasierte Zellwachstum. Alle 5 Zelllinien weisen eine BRAF<sup>V600E</sup> Mutation auf.

### 5.4.2 Zellen splitten

Die für die Versuche verwendeten Zellen wurden in 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen herangezüchtet und im Inkubator bei 37 Grad Celsius bebrütet. Für die Kultivierung der metastasierten Zelllinien wurde das Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM/Ham's 1:1) verwendet. Für die WM-Zellen wurde das Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (4,5g/l) verwendet.

Nach Beurteilung des Wachstums unter dem Mikroskop wurden die Zellen Montag und Freitag gesplittet. Mittwochs wurde meist das Medium gewechselt. Die Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank behandelt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und mit 6 ml PBS gewaschen. Nach dem Absaugen, wurden 2 ml Trypsin zum Ablösen der Zellen hinzugegeben und die Kulturflaschen maximal 5 Minuten in den Inkubator gestellt. Die abgelösten Zellen wurden mit 5ml Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Wenn das Medium stark getrübt war wurden 5 bis 10 ml PBS hinzugefügt, um einen besseren Überblick beim Auszählen im

Mikroskop zu gewährleisten. Aus dem Zentrifugenröhrchen wurden 10µl entnommen, mit 10µl Trypanblau auf einem Objektträger vermenget und 10µl davon auf einen Objektträger mit Zählkammer aufgetragen. Es wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen in 13 ml Medium eingesetzt und wieder im Inkubator bei 37 Grad Celsius bebrütet.

### **5.4.3 Glykoylierungsinhibitoren**

#### **5.4.3.1 Tunicamycin**

Tunicamycin ist ein spezifischer Inhibitor der N-Glykosylierung von Proteinen. Es blockiert den ersten Schritt in der Oligosaccharidsynthese, indem es die Übertragung von N-Acetylglukosamin auf Dolichol verhindert (McDowell and Schwarz 1988). Tunicamycin ist für die Anwendung am Menschen zu toxisch (Bourke and Carrigan 1993). Stocklösung war 12mM und die finale Konzentration in den Versuchen 0.5 µM.

#### **5.4.3.2 Simvastatin**

Simvastatin gehört zur Arzneimittelgruppe der Cholesterinsenker. Es hemmt die HMGCoA-Reduktase, welche die Bildung von Mevalonsäure aus HMGCoA katalysiert.(Brown and Goldstein 1980) Die Stockkonzentration wurde in DMSO hergestellt und betrug 10 mM.

#### **5.4.3.3 PNGase F als Beweis für veränderte Glykosylierung**

PNGase F ist eine rekombinante Endoglykosidase, welche an der Verbindung von N-glykosylierten Oligosacchariden schneidet und diese in zwei Glykoproteine spaltet. Für die Versuche wurde der Kohlenhydrate Analysen Kit 170-6883 PNGase F, 2.5 U/ml, 0.04 ml verwendet. (Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547)

## **5.5 Lysate**

Je nach Versuchsplanung wurden die Zellen vorbehandelt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wurde bei allen Zelllinien die gleiche Zellzahl zu Beginn eingesetzt. Eine Million Zellen wurden in 10cm Petrischalen gleichmäßig ausgesät und 24 Stunden bebrütet. Um gleiche Wachstumsbedingungen zu schaffen wurde am darauffolgenden Tag überall das Medium gewechselt. Die Behandlung erfolgte je nach Experiment entweder mit Tunicamycin (0,5 µM) oder Simvastatin (3, 10µM). In den Versuchen wurde der Einfluss von Tunicamycin über einen Zeitraum von 3, 6, 14 24 und 48 Stunden, und von Simvastatin nach 14 und 48 Stunden in den 5 verschiedenen Zelllinien ermittelt.



## 5.5.1 Isolierung

Nach Kontrolle im Mikroskop wurden die Petrischalen auf Eis gestellt. Das Medium wurde in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und in der Zentrifuge (BRi4) bei 1.200 rpm/4 min / 4°C zentrifugiert. Die Petrischalen wurden 2 Mal mit PBS gewaschen, die restliche Flüssigkeit abgesaugt, 1ml Trypsin zum Ablösen der Zellen hinzugefügt und bei Raumtemperatur 5 Minuten bebrütet. Nach dem Zentrifugieren wurde das Medium in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und bei -20 Grad Celsius gelagert. Die Zellen wurden in 2 x 4 ml PBS aufgenommen mit dem Pellet des überstehenden Mediums vermischt, und bei 1.200 rpm/4 min /4°C (BRi4) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 1ml PBS resuspendiert. Aliquots (10µl) davon wurden in ein Eppendorf Gefäß überführt. Der Rest wurde bei 1.400 rpm/3,5min 4°C in der Zentrifuge (5415R) + 16sec bei maximaler Geschwindigkeit, zentrifugiert. Das Pellet wurde in IP Puffer (Tabelle 1) (WM-Zellen: 130µl, A375 und 518A2: Kontrollen: 500µl A375 und 518A2: mit Tunicamycin 0,5µl behandelte Zellen: 200µl) resuspendiert und in flüssigen Stickstoff gegeben. Die IP-Lysate wurden maximal 5 Minuten in ein Wasserbad mit 37 Grad Celsius wieder aufgetaut. Dieser Einfrier-Auftau- Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Zuletzt wurden die Zellen für ca. 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt und danach bei 13.500rpm/4°C/ 40 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt.

**Tabelle 1: Zusammensetzung des IP Puffers**

IP-Lysis Puffer	
50mM	Tris-HCl(pH=8,0)
150mM	NaCl
0,1	SDS
1%	NP-40
10mM	Glycerolphosphat
100ml M.Q.	
bei -20°C gelagert	

## 5.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Methode

Nach der Isolation erfolgte die photometrische Proteinbestimmung nach der Bradford Methode (Bradford 1976) und mit dem BioRad Proteinfarbstoff (Bio-Rad Laboratories Inc.; California, USA) Jeweils 10 $\mu$ l IP-Lysat oder 10 $\mu$ l reiner IP Puffer wurden mit 990 $\mu$ l H<sub>2</sub>O wurde mit einer einer 1:5 verdünnten Biorad Lösung versetzt. Als Leerwert dienten die reine Bioradlösung und der IP Puffer (Tabelle 1) ohne Probe. Die Messung erfolgte mit dem Implen NanoPhotometer bei einer Wellenlänge von 595nm. Die Proteinkonzentration ( $\mu$ g/ $\mu$ l) wurde unter Zuhilfenahme der Eichgeraden berechnet. Anschließend wurden gleiche Mengen an Protein mit einer entsprechenden Menge 4-fach Sample-Puffer aufgenommen und im Thermoshaker bei 95 Grad Celsius erhitzt. Dadurch werden die Proteine denaturiert und Disulfidbrücken geöffnet. Nach Abkühlen der Proben wurden die Lysate bei -20 Grad Celsius gelagert oder direkt auf ein Gel geladen.

**Tabelle 2: Zusammensetzung des 4×Sample Puffer**

4×Sample Puffer	
60mM	Tris-HCl(pH=6,8)
14,4mM	Mercapto-ethanol
25%	Glycerin
2%	SDS
0,1%	Bromphenolblau
10ml M.Q.	
bei -20°C gelagert	

## 5.6 Gelelektrophorese

Die Sodiumdodecylsulfatpolyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach Ladung und Größe. Die aufgetrennten Proteine werden auf eine

Nitrozellulosemembran übertragen und die Proteinbanden mittels Western Blot Analyse dargestellt.

**Vorbereitung:**

Die Gele wurden am Vortag gegossen um ausreichende Polymerisation zu gewährleisten. Hierfür wurde ein 75mm dickes Trennungsgel (Tabelle 5) vorbereitet, das kurzfristig mit Isopropanol überschichtet um eventuell entstandene Luftblasen zu verdrängen. Nach 20 Minuten wurde Isopropanol entfernt und mit einem Stacking Gel (Tabelle 5) überschichtet und ein Kamm eingesetzt, der die Taschen zum Beladen mit den Proteinen vorgibt. Die Gele wurden mit einem nassen Tuch, zur Verhinderung des Austrocknens, über Nacht im Kühlraum bei 4 Grad Celsius gelagert. Die benötigten Puffer wurden auch am Vortag hergestellt. Der benötigte Laufpuffer und der Transferpuffer wurden auch am Vortag hergestellt (Tabelle 6).

**Tabelle 3: Prozentueller Anteil des Gels von Acrylamide-bisacrylamid in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Proteins**

Protein MG (kDa)	Prozent des Gels (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Gelelektrophorese Gels**

1,5M Tris-HCl Puffer	0,5M Tris-HCl Puffer
1,5M Tris-HCl	0,5M Tris-HCl
gelöst in MQ, pH eingestellt auf 8,8 gelagert bei 4°C	gelöst in MQ, pH eingestellt auf 6,8 gelagert bei 4°C

**Tabelle 4: Fortsetzung**

10% SDS	10% Ammonium Persulfat
10%(w/v) Natrium Dodecyl Sulfat	10%(w/v) Ammonium Persulfat
gelöst in MQ, gelagert bei Raumtemperatur	gelöst in MQ, gelagert bei -20°C

**Tabelle 5: Rezeptur zur Bereitung des Trennungs und Stacking Gels für die SDS-PAGE**

Trennungs Gel (Volumen in µl)	8%	9%	10%
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl
H <sub>2</sub> O	4,62 ml	4,29 ml	3,96 ml
30%-0,8% Acryl-Bisacryl	2,67 ml	3,00 ml	3,33 ml
10% Ammonium Persulfate	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
Gesamtvolumen - 10ml			

Stacking Gel (Volumen in µl)	5%
0,5 M Tris (pH6,8)	1,25ml
10%SDS	50 µl
H <sub>2</sub> O	2,81 ml
30%-0,8% Acryl-Bisacryl	835 µl
10% Ammonium Persulfate	50 µl
TEMED	5 µl
Gesamtvolumen - 5ml	

**Tabelle 6: Rezeptur zur Bereitung des 1×/10×Lauf- und des 1×/10×Transferpuffers**

10×Laufpuffer	10×Transferpuffer
Tris 25mM	Tris25mM
Glycin 192mM	Glycin 192mM
EDTA Na <sub>2</sub> 1mM	SDS 0,1%
SDS 1,75mM	
gelöst in 2 Litern MQ, eingestellt auf pH=8,3 gelagert bei Raumtemperatur	gelöst in 2 Litern MQ, eingestellt auf pH=8,3 gelagert bei Raumtemperatur

**Tabelle 6: Fortsetzung**

1×Laufpuffer	1×Transferpuffer
100ml von 10×Laufpuffer	100ml von 10×Transferpuffer
900ml H <sub>2</sub> O	700ml H <sub>2</sub> O
	200ml Methanol
Gesamt 1 Liter	Gesamt 1 Liter
gelagert bei Raumtemperatur	gelagert bei Raumtemperatur

**Ablauf:**

Die beiden Gele wurden mit, den für das Experiment vorgesehenen, Lysaten beladen, wobei links ein Marker Spectra™ (# 26634, Thermo Scientific; Massachusetts, USA) als Proteinstandard, zur Orientierung und Bestimmung der Proteingröße, aufgetragen wurde. Die Laufzeit betrug ca. 2 Stunde bei 150 mV. Nach der Auftrennung im Gel erfolgte die Übertragung auf eine Membran mittels „Semi-Dry Blotting Methode“. Anschließend wurde die Membran mit MQ Wasser vorsichtig von eventuellen Gel Resten befreit und für die Ponceau Färbung 5 Minuten auf den Schwenker gestellt. Danach wurde 2 Mal mit MQ Wasser gewaschen, auf der Rückseite wurde der Marker eingezeichnet und die Membranen so geschnitten, dass sie die entsprechenden Proteinbanden enthalten, die man nachweisen wollte. Zur Orientierung und Dokumentation wurden die gefärbten Membranen eingescannt und danach zum Blocken mit einer Blocklösung (5% BSA/TBST 0,1%) 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde kurz mit TBST<sub>0,1%</sub> gewaschen und der erste Antikörper über Nacht auf die Membranen gegeben und am darauffolgenden Tag wieder gesammelt. Die Membran wurde 3x 10 Minuten mit TBST<sub>0,1%</sub> gewaschen und anschließend mit einem sekundären Antikörper für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper ist Horseradish peroxidase konjugiert und essentiell für die Detektion. Danach wird die Membran 3x 15 Minuten mit TBST<sub>0,1%</sub> gewaschen und zuletzt 20 Minuten mit TBS (Tabelle 7). Anschließend wurde die Membranen mit einem Chemolumineszenz Substrat (Western Bright™ Sirius, USA) je nach Intensität 1-5 Minuten inkubiert, und am Licor ECL Detektor gescannt. Falls das Signal am Licor zu schwach war wurde zusätzlich noch ein Röntgenfilm exponiert und entwickelt.

**Tabelle 7: Rezeptur zur Herstellung von 10× und 1×TBS, 1×TBST und BSA/TBST**

10×TBS	1×TBST
0,2M Tris (pH=7,5)	100ml von 10×TBS
1,5M NaCl	2ml Tween 20
gelöst in MQ, gesamt 1Liter gelagert bei Raumtemperatur	gelöst in MQ, gesamt 1 Liter gelagert bei Raumtemperatur

1×TBS	BSA/TBST
100ml 10×TBS	100ml 1×TBST
900ml H <sub>2</sub> O	5g BSA
gelöst in MQ, gesamt 1Liter gelagert bei Raumtemperatur	Gesamt 100ml gelagert bei -20°C

## 5.7 Nachweis der veränderten Glykosylierung mittels PNGase F

Für diesen Versuch wurden die Zelllysate nach dem PNGase F Protokoll (New England BioLabs InG) behandelt, wobei jeweils 15µg Protein verwendet wurden. Die Reaktion wurde einmal unter denaturierenden Bedingungen und einmal unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Gelelektrophorese, wobei jeweils 15µg Protein geladen und mit den unbehandelten Kontrolllysaten verglichen wurden.

## 5.8 Proliferationstest

Die Zellen wurden in gleicher Zellzahl in Kulturflaschen angesetzt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt, eine Hälfte der Kulturflaschen mit Tunicamycin 0,5µM versetzt, die andere Hälfte diente als Kontrollgruppe. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 6, 24 und 48 Stunden) mit Trypsin abgelöst mit 4% PFA in PBS/ fixiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte direkt, ohne Färbung mit Trypanblau.

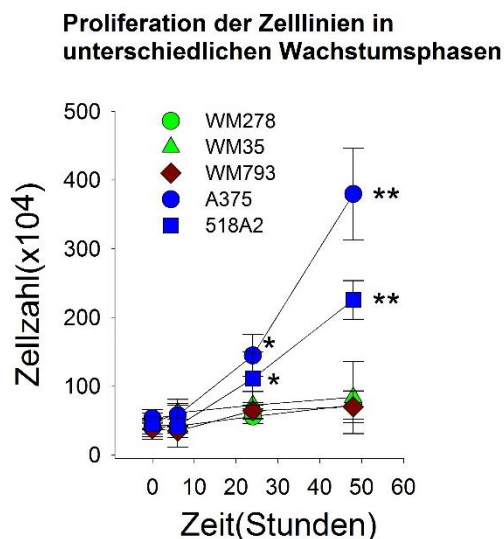
## 5.9 Statistische Auswertung

Für die Auswertung wurde deskriptive Statistik verwendet, wobei behandelte und unbehandelte Proben verglichen wurden. Für den Vergleich aller Zelllinien miteinander wurde ANOVA verwendet, wobei anschließend für den Vergleich einzelner Zelllinien untereinander zumeist noch ein Dunnett, Student Newman Keuls oder Tukey Test gemacht wurde. Ein p-Wert  $< 0.05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Falls nicht anders angegeben, wurde der Mittelwert und die  $\pm$  Standardabweichung von drei bis fünf Versuchen angegeben. Die durchschnittliche Standardabweichung wurde durch Fehlerbalken dargestellt. Für den Vergleich der Zelllinien mit der Behandlung wurde der Student T-Test verwendet. Die statistische Signifikanz ist mit Sternen vermerkt (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

## 6 Resultate

### 6.1 Charakterisierung der Melanomzelllinien:

Als Modell für das Melanom wurden fünf verschiedene humane Melanomzelllinien abhängig von ihrem Wachstumsstadium in Bezug auf Proliferation verglichen. Dafür wurden die Zellen mit der gleichen Zellzahl in Kultur gesetzt und nach 6, 24 und 48 Stunden wurde die Zellzahl ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die WM278 und WM35 eine sehr geringe Proliferationsrate haben und erst nach 48h eine Verdopplung der Zellzahl erreichen, während die metastasierten Zelllinien A375 und 518a2 schon nach 24 Stunden eine signifikante Zunahme der Zellzahl aufweisen (Abbildung 5).



**Abbildung 5.: Proliferation verschiedener Melanomzellen unterschiedlicher Wachstumsstadien**

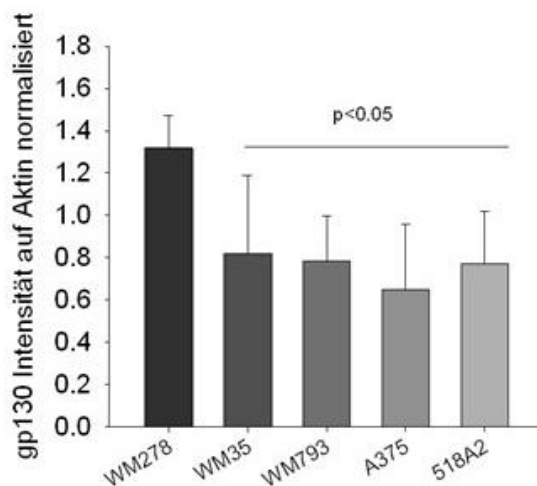
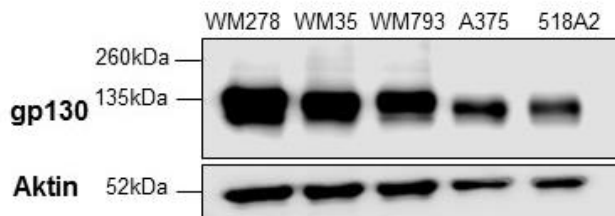
Die fünf Zelllinien wurden in der Zellkultur für den Wachstumsversuch herangezüchtet. Nach 6, 24 und 48 Stunden wurde die Zellzahl bestimmt. Die Symbole und die Fehlerbalken stellen den Mittelwert  $\pm$ SEM dar. Die statistische Signifikanz der Daten wurde durch ANOVA, post hoc Test ermittelt. Die 24 Stunden Werte wurden mit Student Newman Keuls ermittelt und ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Die 48 Stunden Werte wurden mittels Tukey Test ermittelt und ein  $p < 0,001$  als signifikant angesehen (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,001$  metastasierende Zelllinien gegen WM-Zelllinien).

#### 6.1.1 Basale Gp130 Expression

Gp130 wird als Glykoprotein im ER synthetisiert und über Vesikeltransport im Golgi-Apparat zur Zellmembran gebracht wo es als transmembranäres Protein für die Signalübertragung verantwortlich ist (Müller-Esterl Werner 2011). In Abbildung 6 kann man erkennen, dass in den



WM-Zelllinien deutlich mehr Gp130 vorhanden ist, als in den metastasierten Zelllinien. Weiters ist die Bande nicht scharf, sondern diffus, was durch die Glykosylierung erklärt werden könnte. Die statistische Analyse mit ANOVA in Abbildung 6 zeigte, dass die Zelllinie WM278 gegenüber den anderen Zelllinien signifikant mehr Gp130 aufweist.

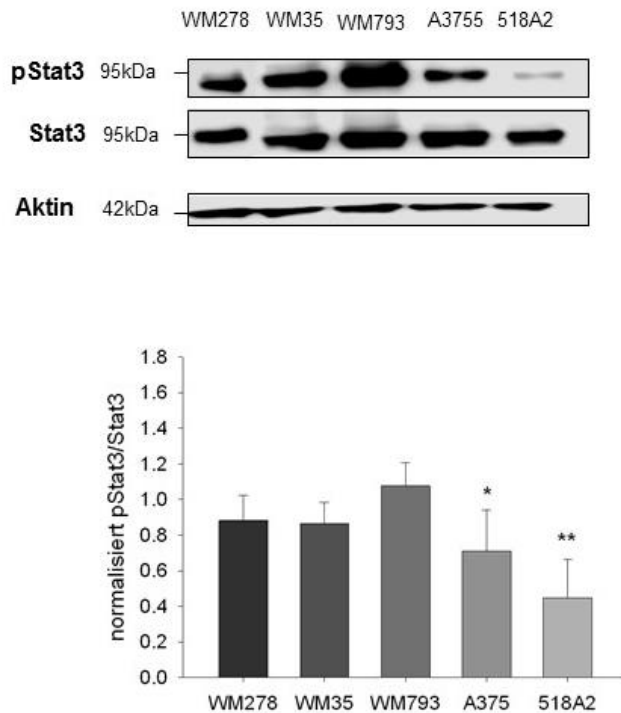


**Abbildung 6.: Expression von Gp130 in fünf Melanomzelllinien**

Die Proteine der Zelllysate der unbehandelten WM-Zelllinien WM35, WM278, WM793 und der metastasierten Zelllinien A375 und 518A2 wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Western Blot Analyse erfolgte unter Verwendung des Antikörpers GP130 (Diacclone) und die Proteinbanden wurden im Bereich von einem Molekulargewicht von 95kDa bis 260kDa dargestellt. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet und die Bandenintensitäten mit der Licor Software ausgewertet. Die normalisierten Daten wurden in einem Balkendiagramm als Mittelwert  $\pm$  S.D. dargestellt. Die Daten wurden mit Sigmaplot ausgewertet wozu drei Versuche herangezogen ( $n=3$ ) wurden. Die Statistische Signifikanz der Daten wurde mit ANOVA und anschließendem Student Newman Keuls Test ermittelt und ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen (WM278 gegen WM35, WM793, A375 und 518A2).

## 6.1.2 Basale Stat3 Expression

Da Stat3 durch Bindung von IL-6 an seinen IL-6 Rezeptor und folglich über die Signalweiterleitung durch Gp130 durch Phosphorylierung aktiviert wird, wurde als nächstes die basale Expression von Stat3 und das aktivierte pStat3 mit Western Blot Analyse dargestellt. (Abbildung 7). Die Intensitätsauswertung und Normalisierung des Signals zeigt, dass Stat3 in allen fünf Zelllinien exprimiert und basal aktiviert wird.



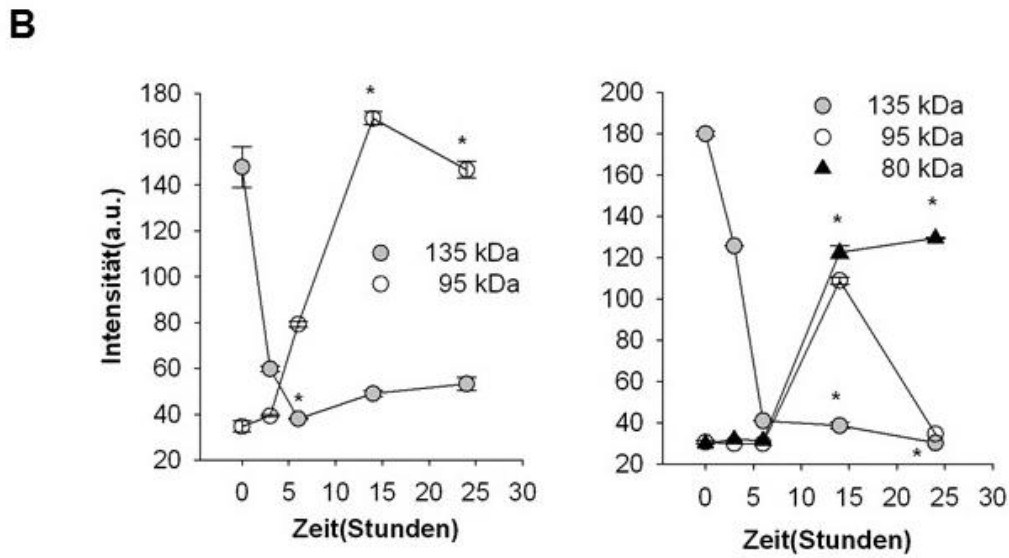
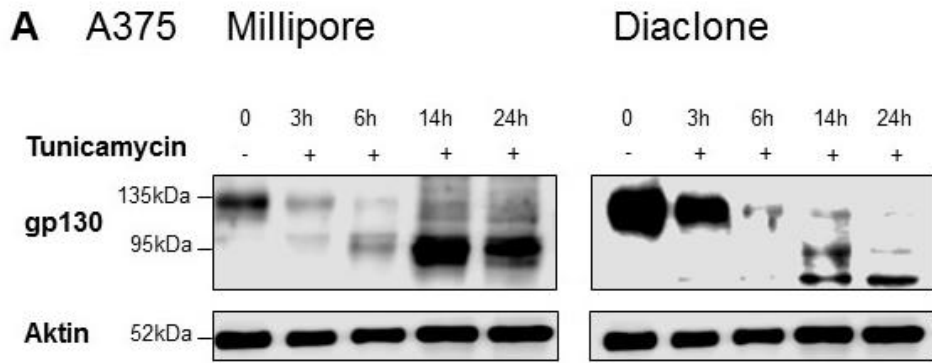
**Abbildung 7.: Expression und Aktivität von Stat3 in fünf Melanomzelllinien**

Die Proteine der Zelllysate der unbehandelten WM-Zelllinien WM35, WM278, WM793 und der metastasierten Zelllinien A375 und 518A2 wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Western Blot Analyse erfolgte mit spezifischem Antikörper gegen Stat3 und pStat3 (T705) und die Proteinbanden wurden im Bereich von einem Molekulargewicht von 95kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Analyse der Bandenintensitäten mit Image J und Normalisierung der pStat3 Signale mit Stat3. Die Daten wurden mit Sigmaplot ausgewertet wozu drei Versuche herangezogen (n=3) wurden. Die Statistische Signifikanz der Daten wurde mit ANOVA und anschließendem Student Newman Keuls Test ermittelt und ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ )

## 6.2 Verwendung unterschiedlicher Antikörper

In dieser Arbeit soll der Einfluss der Glykosylierung auf den IL-6 Signalweg analysiert werden. Für die Signalübertragung ist transmembranäres Gp130 von Bedeutung. Da Gp130 stark N-glykosyliert ist (Waetzig et al. 2010), spielt die Auswahl des Antikörpers eine wichtige Rolle bei der Versuchsplanung. Da N-glykosyliertes Gp130 in allen fünf Zelllinien basal nachweisbar ist und Tunicamycin die Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum durch Blockade der Übertragung der Oligosaccharide auf Dolichol hemmt (Elbein 1987), war die Überlegung, dass der Antikörper sowohl das glykosylierte, als auch das deglykosylierte Gp130 Protein erkennen soll von Bedeutung. Für die Untersuchung wurde die metastasierte Zelllinie A375 verwendet und die Glykosylierung mit Tunicamycin  $0,5\mu\text{M}$  gehemmt. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Detektion von Gp130 wurden die beiden spezifischen Antikörper von Diaclone und Millipore verwendet und Gp130 mit Western Blot Analyse im Bereich von 95kDa bis 135kDa dargestellt.

Der monoklonale Antikörper von Diaclone (Katalognummer: 852.090.000) ist gegen das ganze glykosylierte Protein gerichtet und erkennt spezifisch das Gp130 Protein bei einem Molekulargewicht von 130-140 kDa. Der polyklonale Antikörper von Millipore ist gegen die cytoplasmatische Domäne von Gp130 gerichtet (Aminosäuren 713-918) und erkennt dadurch sowohl das glykosylierte, als auch das nicht-glykosylierte Gp130 Protein. Dabei kann man deutlich erkennen, dass bei beiden Antikörpern die 135 kDa Bande schon nach drei Stunden abnimmt. Weiters kann man beim Antikörper Gp130 Millipore nach drei Stunden eine beginnende und nach 14 und 24 Stunden eine signifikante Zunahme des nicht-glykosylierten Proteins bei einem Molekulargewicht von 95 kDa erkennen, während der Diaclone Antikörper ein Problem bei der Erkennung der nicht-glykosylierten Form zeigt (Abbildung 8 A und B). Daher fiel die Entscheidung für weitere Versuche den Millipore Antikörper zu verwenden. Der Diaclone Antikörper wurde als zusätzliche Kontrolle für die Glykosylierung verwendet. Weiters konnte mit Hilfe der Kinetik der Abnahme von N-glykosyliertem Gp130 gezeigt werden, dass die (Abbildung 6A) Halbwertszeit des Gp130 Protein turn-overs korreliert, welche drei Stunden beträgt und in der Literatur nachzulesen ist (Siewert et al. 1999).



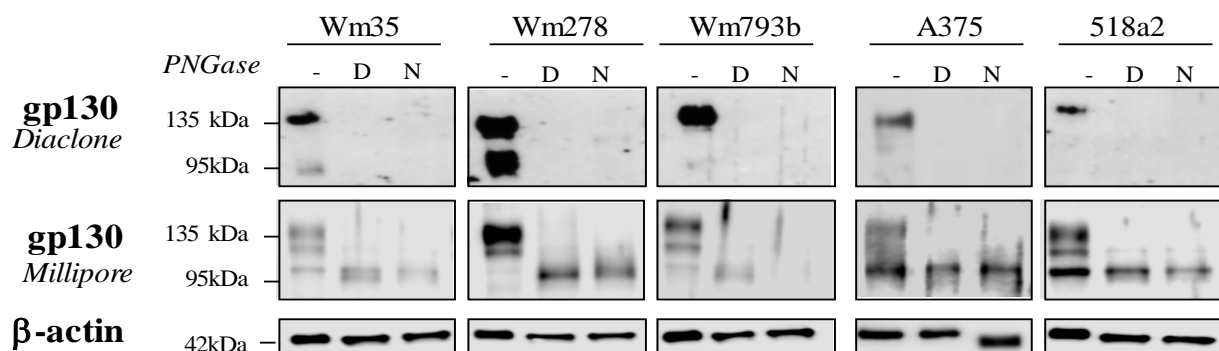
**Abbildung 8.: Vergleich der gp130 Antikörper von Diaclone und Millipore**

A375 Melanomzellen wurden mit Tunicamycin (0,5 $\mu$ M) zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert und anschließend die Proteine mittels Gelelektrophorese und Western Blot Analyse aufgetrennt. Die Auswertung der Intensitäten erfolgte mittels Image J und die Analyse wurde mit ANOVA und post hoc Dunett Test durchgeführt, wobei ein  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen wurde (\*:  $p < 0,05$ ).

## 6.3 PNGase Behandlung als Beweis für Veränderte Glykosylierung

Um festzustellen, ob die in Abbildung 6 beschriebene Abnahme von Gp130 auf eine reduzierte Glykosylierung und nicht auf Grund vermehrten Abbaus des Proteins zustande kommt, wurden Zelllysate mit PNGase F behandelt (Abbildung 7).

Es konnte gezeigt werden, dass nach der Behandlung der Lysate mit dem Enzym PNGase F kein N-glykosyliertes gp130 detektiert werden konnte. Diese Beobachtung war unabhängig davon ob die Proteine in einem nativen (N) oder denaturierendem (D) Sample Puffer aufgetragen wurden. Form. Bemerkenswert ist, dass der Diaclone Antikörper überhaupt keine Proteinbande erkennen konnte, während der Millipore Antikörper die nicht-glykosylierte Form bei einem Molekulargewicht von 95 kDa detektieren konnte, wodurch die Entscheidung den Millipore Antikörper für weitere Experimente zu verwenden bestätigt wurde.

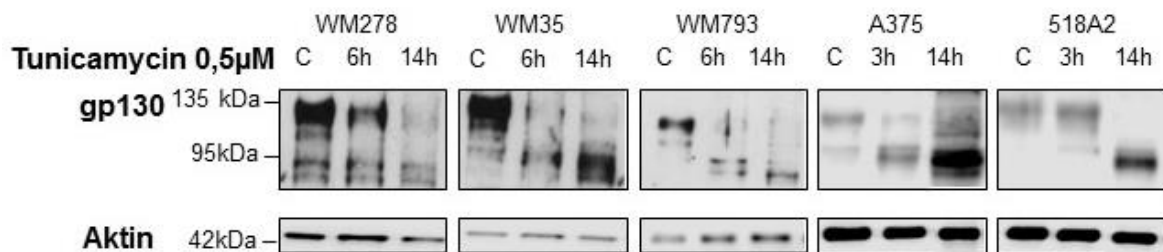


**Abbildung 9.: Deglykosylierung durch PNGase F** (die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Kollegin Christine Wasinger hergestellt)

Die Lysate der fünf Melanomzelllinien wurden jeweils mit oder ohne PNGase F behandelt. Die PNGase F Proben wurden in einem denaturierendem (D) und nichtdenaturierendem (N) Sample Puffer aufgenommen und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Gp130 wurde im Bereich von 95 kDa bis 135 kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet.

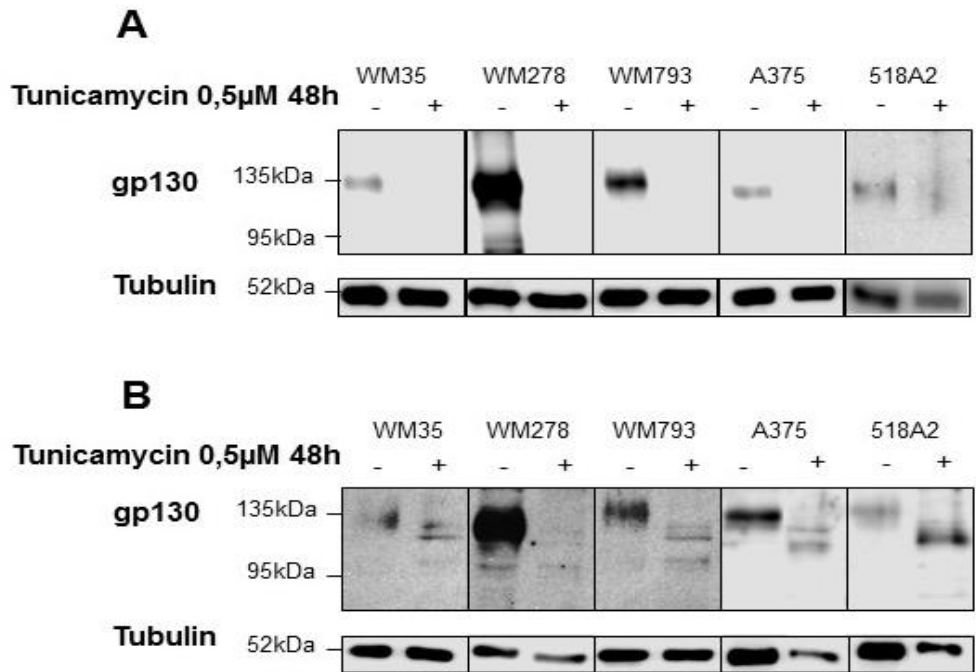
## 6.4 Zeitabhängige Hemmung der Glykosylierung durch Tunicamycin (0,5µM)

Für Hemmung der Glykosylierung wurden die fünf Melanomzelllinien mit Tunicamycin (0,5µM) behandelt. Die Glykosylierung von Gp130 wird durch Tunicamycin im ER zeitabhängig reduziert (Abbildung 8). In Abbildung 9 A wird deutlich, dass unter der Behandlung mit Tunicamycin bei Verwendung des Antikörpers Diaclone, nach 48 Stunden, in allen 5 Zelllinien, kein Gp130 detektiert werden konnte. Dies lässt sich dadurch begründen, dass das Epitop des Antikörpers mit einer Glykosylierungsstelle im Protein überlappt und das nicht glykosylierte Protein daher nicht oder nur sehr schwach erkannt wird. Der Millipore Antikörper in Abbildung 8 und 9 B erkennt sowohl das glykosylierte als auch das nicht-glykosylierte Gp130 in allen fünf Zelllinien.



**Abbildung 10.: Einfluss von Tunicamycin auf Gp130 (Millipore)**

Die fünf Zelllinien wurde über einen Zeitraum von sechs und 14 Stunden mit Tunicamycin 0,5µM behandelt und anschließend lysiert. Die Proteine wurden mit Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit Western Blot Analyse dargestellt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet.

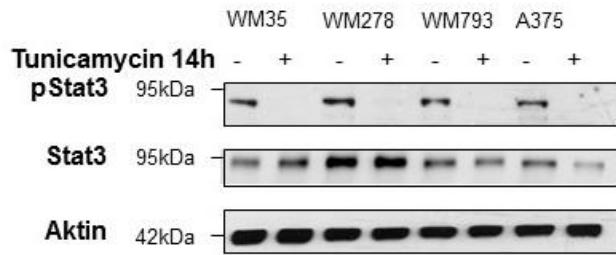


**Abbildung 11.: Einfluss von Tunicamycin auf Gp130 (Diacclone) und (Millipore)**

Die fünf Zelllinien wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden mit Tunicamycin (0,5µM) behandelt und anschließend lysiert. A.) Die Western Blot Analyse der Lysate auf ihren Gp130 Gehalt zeigte unter Verwendung des Diacclone Antikörpers nach 48h einen kompletten Verlust des Gp130 spezifischen Signals. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. B.) Die Analyse mit dem Millipore Antikörper zeigte eine Zunahme der 95 kDa Bande während die 135kDa Bande kaum mehr nachweisbar war. Als Ladenkontrolle wurde Tubulin verwendet.

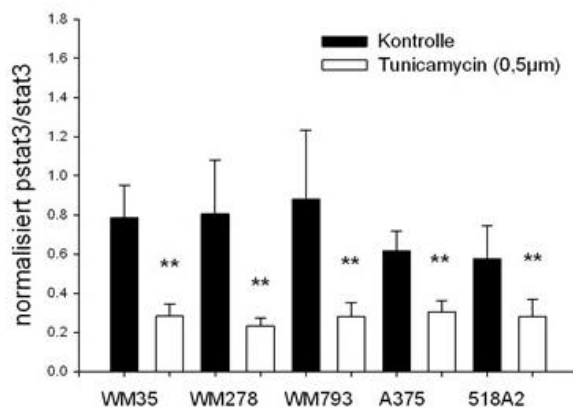
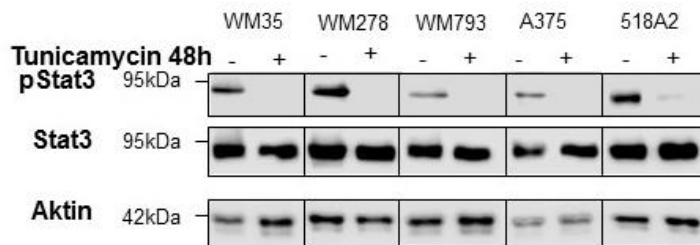
## 6.5 Verminderte Glykosylierung führt zu Inaktivierung von Stat3

Stat3 wird durch IL-6 über Gp130 aktiviert (Abbildung 1) und ist in allen Zelllinien exprimiert und aktiv (Abbildung 5 A und B). Nachdem Gp130 unter der Behandlung mit Tunicamycin (0,5µM) schon nach 14 Stunden nur mehr in der nicht-glykosylierten Form vorliegt (Abbildung 8 und 9 B), war es interessant herauszufinden, welche Auswirkung diese Beobachtung auf die Stat3 Aktivierung hat. In Abbildung 10 und 11 sieht man deutlich, dass die basale Stat3 Aktivierung, unter der Behandlung mit Tunicamycin komplett inaktiviert werden konnte.



**Abbildung 12.: Einfluss der veränderten Gp130 Expression auf Stat3 nach 14 Stunden**

Die vier Melanomzelllinien wurden über einen Zeitraum von 14 Stunden mit Tunicamycin 0,5µM behandelt und anschließend lysiert. Die Western Blot Analyse der Lysate erfolgte mittels, spezifischem Antikörper gegen Stat3 und pStat3(T705) im Vergleich zur Kontrolle der unbehandelten Lysate nach 48 Stunden. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet.



**Abbildung 13.: Hemmung der Stat3 Aktivierung durch Tunicamycin nach 48 Stunden**

A Die fünf Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden mit Tunicamycin 0,5µM behandelt und anschließend lysiert. Die Western Blot Analyse der Lysate erfolgte mittels, spezifischem Antikörper gegen Stat3 und pStat3(T705) im Vergleich zur Kontrolle der unbehandelten Lysate nach 48 Stunden. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. B Analyse der Bandenintensitäten mit Image J, wobei pStat3 mit Stat3 korreliert wurde. Für die Auswertung wurden drei Versuche herangezogen (n=3) Die statistische Signifikanz der Daten wurde durch Students T-test ermittelt und ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen (\*\*:  $p=0,005$ ).



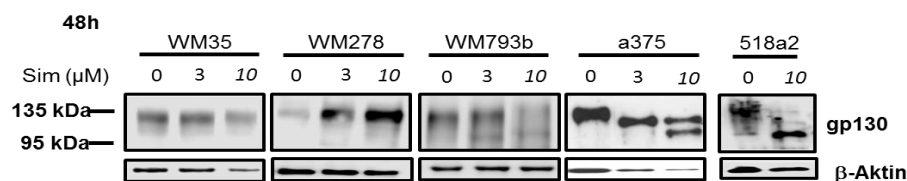
## 6.6 Stadienabhängiger Einfluss von Simvastatin

### 6.6.1 Simvastatin und Glykosylierung

Simvastatin gehört zur Arzneimittelgruppe der Cholesterinsenker und hemmt die HMG CoA-Reduktase, die die Bildung von Mevalonsäure aus HMG CoA katalysiert. Mevalonsäure ist der initiale Hauptmetabolit in der Cholesterolsynthese und bei der Synthese von Dolicholphosphat. (Brown and Goldstein 1980) De novo Synthese von Dolichol-Phosphat fördert den Transport von Oligosaccharidketten von der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran auf die luminal Seite und ist daher ein wesentlicher Schritt in der N-Glykosylierung von Proteinen (Müller-Esterl Werner 2011).

### 6.6.2 Wirkung von Simvastatin auf die IL-6 Kaskade

Unter der Behandlung mit Simvastatin konnten Kollegin Christine Wasinger (Wasinger, Svoboda und Hohenegger; Posterpräsentation, skin cancer meeting 2016) (Abbildung.:12) und Kollege Sebastian Mayer zeigen, dass Gp130 durch Simvastatinbehandlung in den fünf Melanomzelllinien unterschiedlich beeinflusst wird (Mayer Sebastian 2018). Das radiale Stadium mit den Zelllinien WM35 und WM278 zeigt unter der Behandlung mit Simvastatin 3 und 10µM keine wesentliche Veränderung der Gp130 Expression. Beim vertikalen Stadium, der Zelllinie WM793b kann man schon bei 3µM eine leichte Verschiebung der Migration sehen. Die metastasierten Zelllinien zeigen einen deutlichen Effekt von Simvastatin auf die Glykosylierung von gp130. Bei der Zelllinie A375 kann man bei einer Konzentration von 3µM eine beginnende und bei 10µM Simvastatin eine deutliche Verschiebung zur 95kDa Bande sehen, bei der 518A2 Zelllinie sieht man bei einer Konzentration von 10µM eine deutliche Verschiebung zur 95kDa Bande.



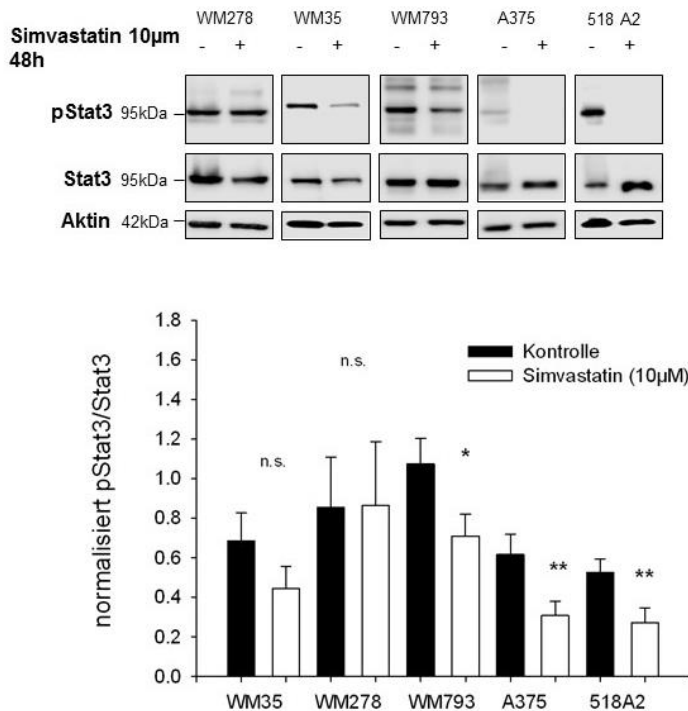
**Abbildung 14.:** (von Kollegin Christine Wasinger persönlich zur Verfügung gestellt)

#### Einfluss von Simvastatin auf die Gp130 Expression in fünf verschiedenen Melanomzelllinien

Die fünf Zelllinien wurden mit Simvastatin 3 und 10 µM 48 Stunden behandelt, lysiert und die Proteine mit Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembranen transferiert. Gp130 wurde mit einem spezifischen Gp130 Antikörper von Millipore nachgewiesen und der Bereich von 95-135 kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet.

### 6.6.3 Stadienabhängiger Einfluss auf Stat3

In Abbildung 12 konnte ein stadienabhängiger Effekt auf die Glykosylierung von Gp130 mit Simvastatin gezeigt werden. In den metastasierten Melanomzelllinien A375 und 518A2 konnte unter der Behandlung mit Simvastatin 10 $\mu$ M eine Verschiebung der 135kDa Bande hin zur 95kDa Bande festgestellt werden. Ausgehend von dieser Beobachtung und dem Wissen, dass Stat3 durch IL-6 über Gp130 aktiviert, wird eine Inaktivierung von Stat3 vermutet, welche in Abbildung 15 bestätigt wurde. Stat3 bleibt unter dem Einfluss von Simvastatin in den Zelllinien WM35, WM278 und WM793 basal aktiv, während es in den metastasierten Zelllinien A375 und 518A2 inaktiviert wird. (Abbildung 15. :) Diese Beobachtung ist insofern interessant, da Stat3 durch IL-6 über den klassischen JAK/Stat3 Signalweg durch Signalübertragung mittels GP130 aktiviert wird und die Zelle vor Apoptose schützt.

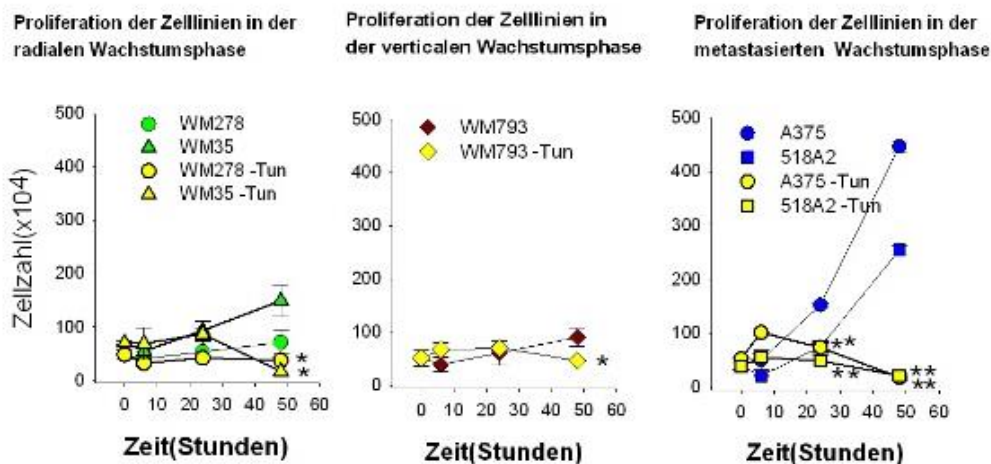


**Abbildung 15.: Simvastatin blockiert die basale Stat3 Aktivierung in metastasierenden Melanomzellen**

Die fünf Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden mit Simvastatin (10 $\mu$ M) behandelt, lysiert und die Proteine mit Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Stat3 und pStat3 wurden mit spezifischem Antikörper gegen Stat3 und pStat3 (T705) nachgewiesen und der Bereich von 95kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Die Auswertung der Intensitäten der Westernblot Daten erfolgte mit Image J. Die Daten wurden mit Sigmaplot ausgewertet wozu drei Versuche herangezogen (n=3) wurden. Die Statistische Signifikanz der Daten wurde mit Students T-Test ermittelt und ein p < 0,05 wurde als signifikant angesehen. (\*: p < 0,05; \*\*: p < 0,001)

## 6.7 Inaktiviertes Stat3 führt zu verminderter Proliferation und Apoptose

Da Stat3 mit Tunicamycin 0,5µM in allen 5 Zelllinien inaktiviert werden konnte, war es nun interessant die Folgen der Deaktivierung für das Zellverhalten zu beobachten. Stat3 ist in den unbehandelten fünf Zelllinien gut exprimiert und aktiv (Abbildung 4). Unter der Behandlung mit Tunicamycin 0,5µM ist Stat3 nach 14 Stunden inaktiv (Abbildung 10). Daher war es von großem Interesse zu sehen, wie die Zellen ihr Wachstum unter der Behandlung mit Tunicamycin 0,5µM veränderten. Die Abbildung: 19 zeigt das stadienabhängige Verhalten der fünf Melanomzelllinien unter der Behandlung mit Tunicamycin 0,5µM. Für den Proliferationstest wurden die Zellen am Vortag angesetzt und das Medium nach 24 Stunden gewechselt, wodurch gleiche Voraussetzungen für alle fünf Zelllinien geschaffen wurden. Danach wurde die eine Hälfte der Zellen unbehandelt, als Kontrolle belassen, die andere Hälfte mit Tunicamycin 0,5µM behandelt. Die Zellen wurden nach 6, 24, und 48 Stunden abgelöst, wobei das Verhalten zuvor auch im Mikroskop analysiert, und anschließend die Zellzahl bestimmt wurde (Abbildung 16).



**Abbildung 16.: Einfluss von Tunicamycin auf die Proliferation.**

Am Vortag wurden die fünf Zelllinien in jeweils zwei 10cm Petrischalen pro Zelllinie angesetzt und das Medium nach 24 Stunden gewechselt. Die Hälfte der Petrischalen wurde mit Tunicamycin 0,5 µM behandelt und die andere Hälfte als Kontrolle belassen. Die Zellen wurden jeweils nach 6, 24 und 48 Stunden abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei Versuche durchgeführt (n=3) Die Auswertung erfolgte mit Sigma Plot und die Werte wurden als Scatter Plot dargestellt. Die Statistische Signifikanz der Daten wurde durch Students T-Test ermittelt und ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; Vergleich unbehandelte Zellen gegen Behandlung mit Tunicamycin)

## 6.8 Hemmung der Glykosylierung führt zu verminderter Proliferation und fördert Apoptose.

In Abbildung 16 konnte ein deutlicher Rückgang der Proliferationsrate, vor allem bei den metastasierten Zelllinien A375 und 518A2 festgestellt werden. Die mikroskopische Beurteilung zeigte deutlich, dass die Zellen unter der Behandlung mit Tunicamycin  $0,5\mu\text{M}$  ihr Verhalten änderten. Man konnte feststellen, dass die behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Zelldichte hatten und sich mit der Behandlungsdauer immer mehr ablösten. Nach 48 Stunden waren im Mikroskop vor allem bei den metastasierten Zelllinien hauptsächlich schwimmende Zellen zu beobachten. (Abbildung 17)

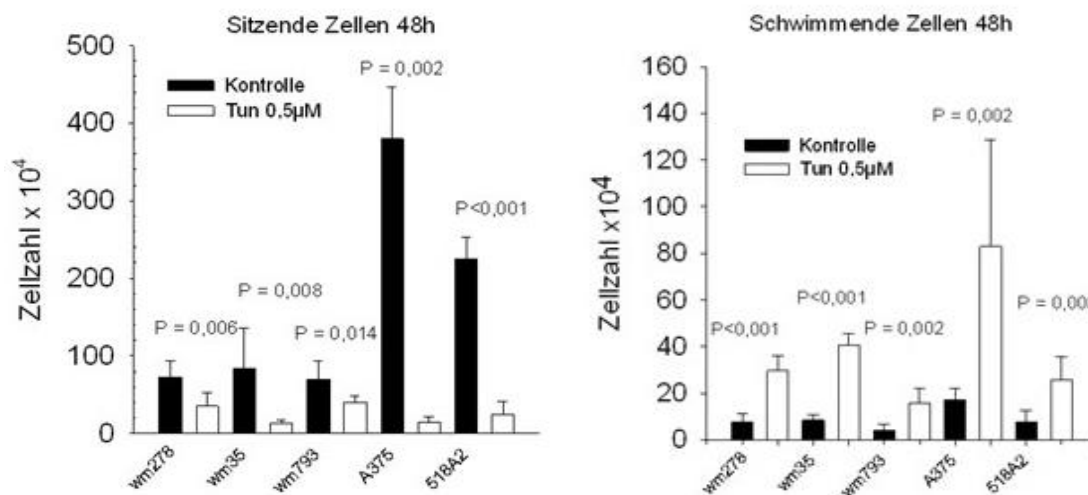


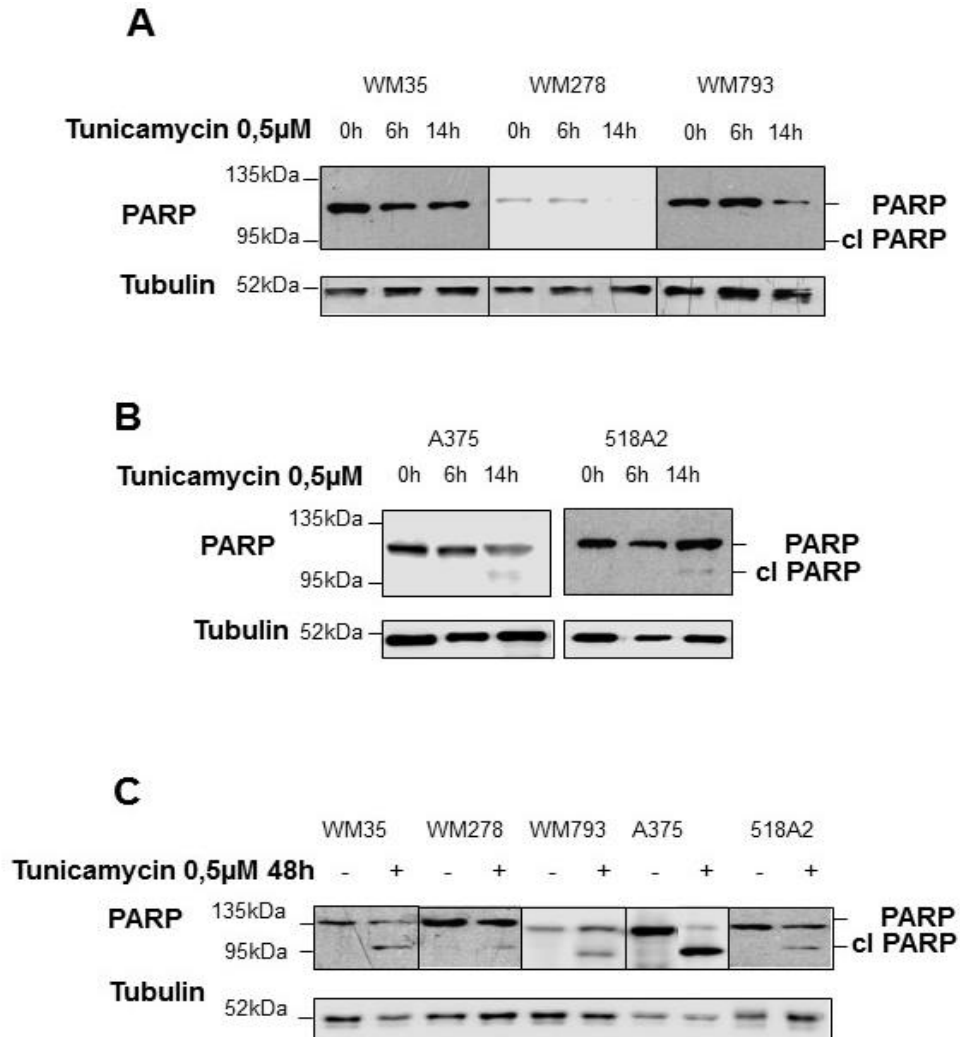
Abbildung 17.: Tunicamycin reduziert die sessilen Zellen signifikant

Am Vortag wurden die fünf Zelllinien in jeweils zwei 10cm Petrischalen pro Zelllinie angesetzt und das Medium nach 24 Stunden gewechselt. Die Hälfte der Petrischalen wurde mit Tunicamycin  $0,5\mu\text{M}$  behandelt und die andere Hälfte als Kontrolle belassen. Die Zellen wurden jeweils nach 6, 24 und 48 Stunden abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei Versuche durchgeführt ( $n=3$ ). Die Auswertung erfolgte mit Sigma Plot und die Werte wurden mittels Balkendiagramm dargestellt. Die statistische Signifikanz der Daten wurde durch Student's T-Test ermittelt und ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen. (Vergleich unbehandelte Zellen gegen Behandlung mit Tunicamycin)

## 6.9 PARP als Nachweis für Apoptose

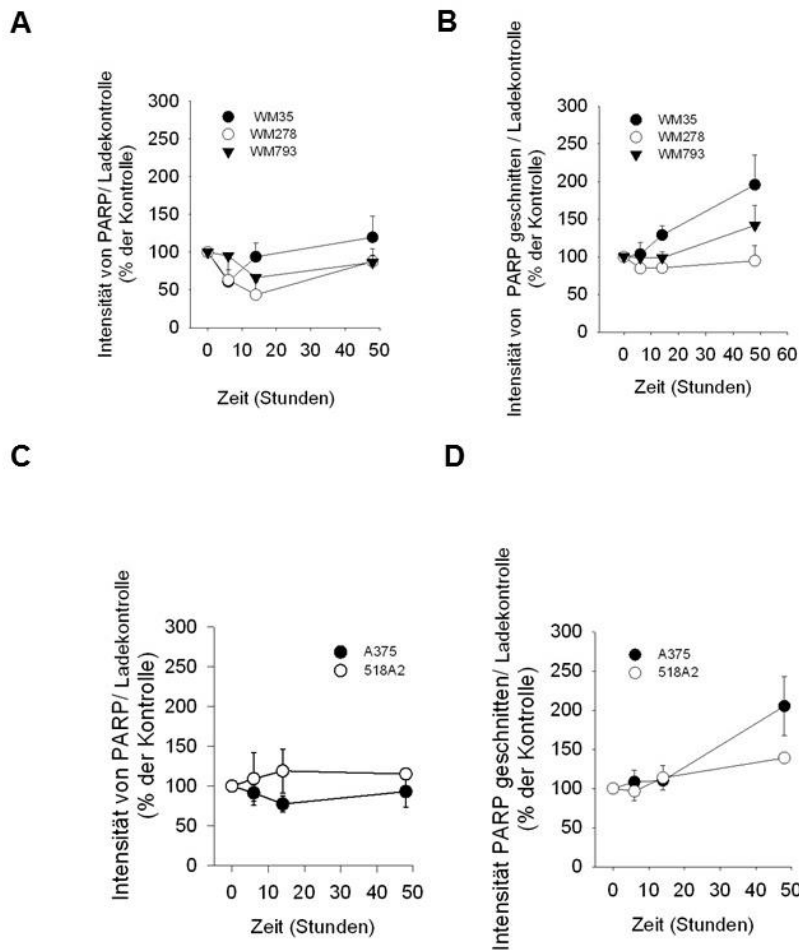
Aufgrund der Beobachtung im Mikroskop und nach Auswertung der Zellzahl der sitzenden und schwimmenden Zellen in Abbildung 20 war es weiters interessant zu wissen, ob Tunicamycin Apoptose induziert. Als spezifischer Marker für Apoptose wurde PARP verwendet, welches bei Apoptose von Caspase 3 in PARP Fragmente geschnitten und somit inaktiviert wird. Das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei 95kDa wird dann als diagnostisch erachtet. In Abbildung 18 B konnte

gezeigt werden, dass in den metastasierten Zelllinien PARP, nach Behandlung mit Tunicamycin  $0,5\mu\text{m}$ , schon nach 14 Stunden geschnitten wurde, während es in den WM-Zelllinien erst nach 48 Stunden zu einer Inaktivierung kam (Abbildung 18C)



**Abbildung 18.: Aktivierung von PARP durch Tunicamycin in fünf Melanomzelllinien**

Die fünf Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 6, 14 und 48 Stunden mit Tunicamycin ( $0,5\mu\text{M}$ ) behandelt, lysiert und die Proteine mit Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. PARP und gespaltenes (cl) PARP wurden mit spezifischem Antikörper nachgewiesen und der Bereich von 95kDa bis 135kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet.



**Abbildung 19.: Aktivierung und Inaktivierung von PARP in den fünf Zelllinien unterschiedlicher Stadien**

Die Auswertung der Intensitäten der Westernblot Daten von Abbildung 18 erfolgte mit Image J. Die Daten wurden mit Sigmaplot ausgewertet und die graphische Darstellung der Intensitäten von PARP und PARP geschnitten mittels Scatter Plot dargestellt.

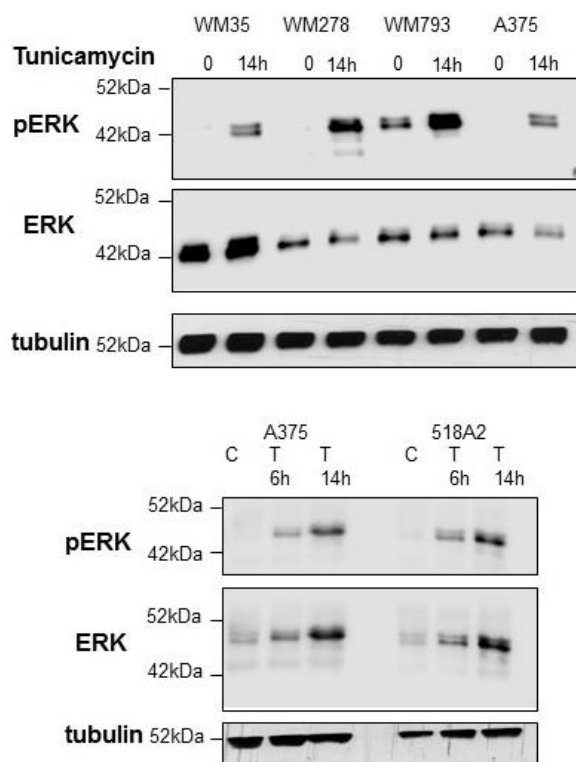
## 6.10 Einfluss der Hemmung der Glykosylierung auf andere Signalwege

Durch Hemmung der Stat3 Aktivität nach 14 Stunden konnte Apoptose mittels PARP nachgewiesen werden. Nachdem IL-6 neben dem klassischen JAK/Stat3 Signalweg auch Einfluss auf den MAPkinase Signalweg hat (Abbildung 1), wurde der Einfluss der gehemmten

Glykosylierung auf die Expression und Aktivität von ERK mittels Gelelektrophorese und anschließender Westernblot Analyse angeschaut.

### 6.10.1 Aktivierung des Map-Kinase Signalweges

Die ERK Aktivierung ist in den Zelllinien WM35, WM278, WM793 und A375 nach Behandlung mit Tunicamycin 0,5µM im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht. ERK wird unter der Behandlung mit Tunicamycin 0,5µM in allen fünf Zelllinien nach 14 Stunden aktiviert (Abbildung 20).



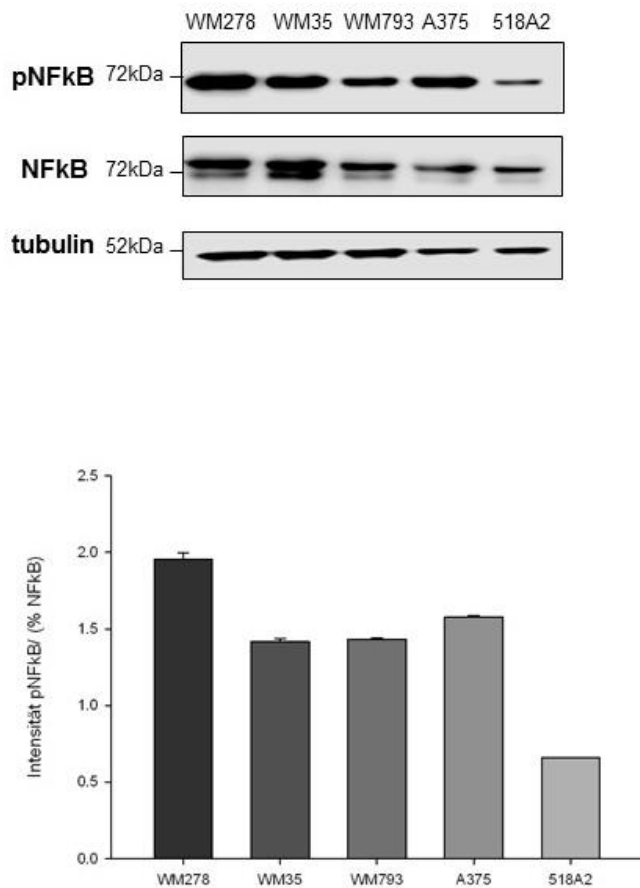
**Abbildung 20.: Zeitabhängige Aktivierung von ERK in fünf Melanomzelllinien**

Die fünf Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden mit Tunicamycin 0,5µM behandelt, lysiert und die Proteine mit Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. ERK und pERK wurden mit spezifischem Antikörper nachgewiesen und der Bereich von 42kDa-52kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet.

### 6.10.2 Basale Aktivierung von NFkB

Der Transkriptionsfaktor NFkB wird durch eine Vielzahl von Mechanismen aktiviert. Eine mögliche Aktivierung kann über den MAPkinase Signalweg erfolgen, wodurch NFkB freigesetzt wird und als Transkriptionsfaktor in den Zellkern wandert, wo er an die DNA bindet und zur

Freisetzung von Akut Phase Proteinen führt. NFκB liegt schon funktionsbereit im Zytoplasma vor und wird durch IκB gehemmt. Dies erklärt seine schnelle Freisetzung, da keine Neusynthese benötigt wird (Müller-Esterl Werner 2011). NFκB ist in allen fünf Zelllinien exprimiert und aktiv (Abbildung 21).



**Abbildung 21.: Basale Aktivität von NFκB und pNFκB in fünf Melanomzelllinien**

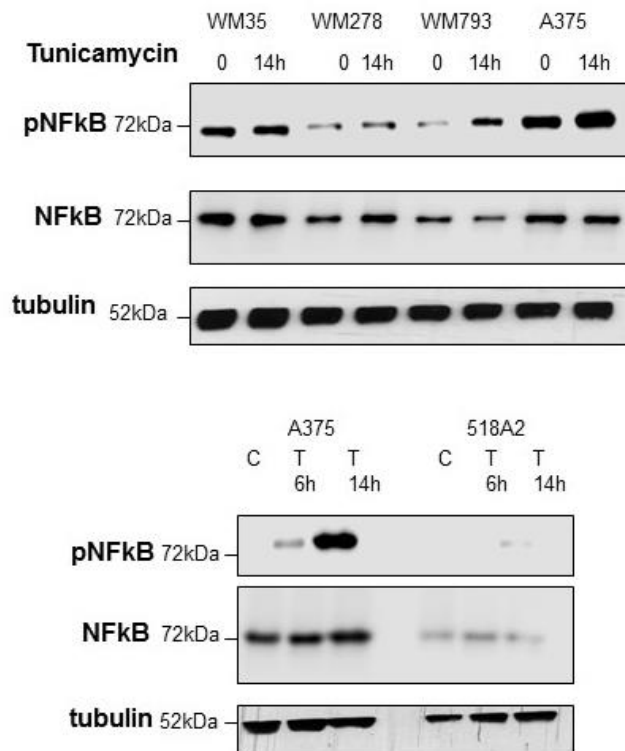
Die Proteine der Zelllysate der unbehandelten WM-Zelllinien WM35, WM278, WM793 und der metastasierten Zelllinien A375 und 518A2 wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Western Blot Analyse erfolgte mit spezifischem Antikörper gegen NFκB und pNFκB. Die Proteinbanden wurden im Bereich von einem Molekulargewicht von 95kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde α-tubulin verwendet. Analyse der Intensitäten mit Image J und Normalisierung der pNFκB Signale mit NFκB.

### 6.10.3 Verstärkte Aktivierung von NFκB

Die Expression von NFκB wird durch Stat3, welches IκB hemmt, beeinflusst. Da Stat3 in allen fünf Zelllinien inaktiviert werden konnte, wurde die Auswirkung auf die Aktivierung von NFκB analysiert. Unter der Behandlung mit Tunicamycin 0,5μM nimmt die Aktivität deutlich zu und



pNFkB kann in der Western Blot Analyse nach 6 und 14 Stunden vermehrt dargestellt werden (Abbildung 22)



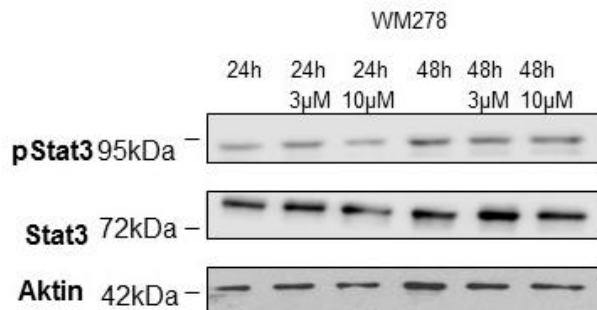
**Abbildung 22.: Aktivierung von NFkB in fünf Melanomzelllinien**

Die Proteine der Zelllysate der unbehandelten WM-Zelllinien WM35, WM278, WM793 und der metastasierten Zelllinien A375 und 518A2 wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Western Blot Analyse erfolgte mit spezifischem Antikörper gegen NFkB und pNFkB. Die Proteinbanden wurden im Bereich von einem Molekulargewicht von 95kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet.

### **6.10.4 Konzentrations- und zeitabhängige Aktivierung von Stat3 unter der Behandlung mit Simvastatin 3 $\mu$ M und 10 $\mu$ M in der WM-Zelllinie WM278**

Die basale Stat3 Aktivität wird unter der Behandlung mit Simvastatin 10 $\mu$ M in den WM-Zellen nicht verändert, während es in den metastasierten Zelllinien zu keiner Aktivierung von Stat3 kommt. (Abbildung 15) Diese Beobachtung ist in der WM-Zelllinie 278 etwas genauer analysiert

worden. Stat3 ist zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden bei einer Konzentration von 3 $\mu$ M und 10 $\mu$ M exprimiert und aktiv. (Abbildung 15). Die Aktivität von Stat3 bleibt durch die Behandlung mit Simvastatin 3 und 10 $\mu$ M in den WM 278 unbeeinflusst.

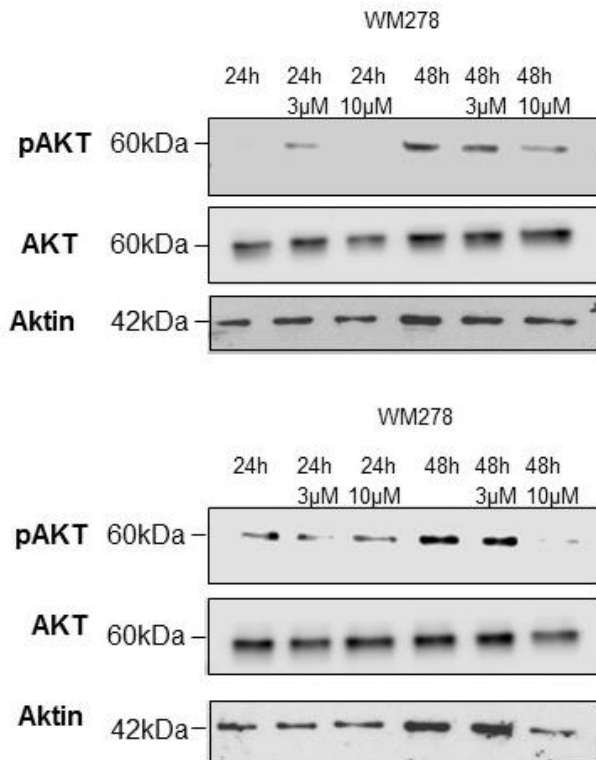


**Abbildung 23.: Simvastatin Einfluss auf die basale Aktivierung von Stat3 in der Melanomzelllinie WM278**

Die WM278 Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden mit Simvastatin (3 und 10 $\mu$ M) behandelt, lysiert und die Proteine mit Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Stat3 und pStat3 wurden mit spezifischem Antikörper gegen Stat3 und pStat3 (T705) nachgewiesen und der Bereich von 72kDa bis 95kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

### 6.10.5 Konzentrations- und zeitabhängige Aktivierung von und AKT unter der Behandlung mit Simvastatin in der WM-Zelllinie WM278

Unter der Behandlung mit Simvastatin 3 und 10 $\mu$ M kann man eine Expression von AKT nach 24 und 48 Stunden in den Lysaten der Melanomzelllinie WM278 und in den Kontroll Lysaten erkennen. In der oberen Abbildung ist eine Aktivierung von AKT nach 24 Stunden bei einer Konzentration von 3 $\mu$ M Simvastatin und nach 48 Stunden in den Kontrolllysaten und bei einer Konzentration von 3 und 10 $\mu$ M Simvastatin mit Western Blot Analyse nachweisbar. Die untere Abbildung zeigt sowohl eine Aktivierung von AKT nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden bei einer Konzentration von 3 und 10 $\mu$ M Simvastatin (Abbildung 24).

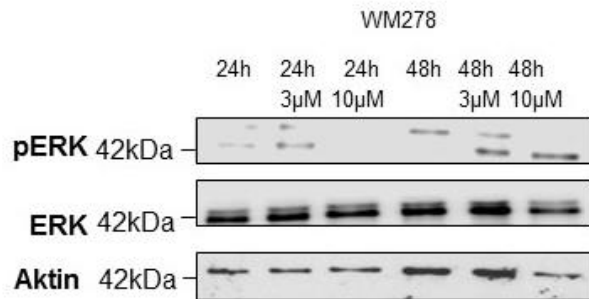


**Abbildung 24.: Simvastatin abhängige Aktivierung von AKT in der Melanomzelllinie WM278**

Die WM278 Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden mit Simvastatin 3 und 10µM behandelt, lysiert und die Proteine mit Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Es wurden 2 Versuche durchgeführt (n=2). AKT pAKT wurden mit spezifischem Antikörper nachgewiesen und der Bereich von 60kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet.

### **6.10.6 Konzentrations-und zeitabhängiger Einfluss auf die Aktivierung von und ERK unter der Behandlung mit Simvastatin 3µM und 10µM in der WM-Zelllinie WM278**

ERK ist in der WM-Zelllinie WM278 unter der Behandlung mit Simvastatin 3 und 10 µM zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden konstant exprimiert und ändert sich nicht gegenüber den Kontrolllysaten. Die schwache basale Aktivierung von ERK nimmt unter 3µM Simvastatin nach 24 und 48 Stunden leicht zu. Mit 10µM Simvastatin wird die Aktivierung von ERK kaum nachweisbar und damit eher unterdrückt. (Abbildung 25)

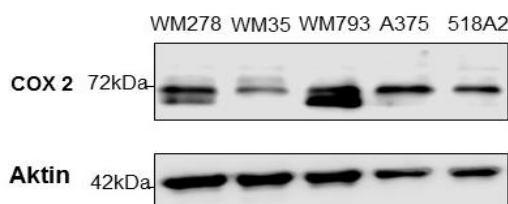


**Abbildung 25.: Simvastatin abhängige Aktivierung von ERK in der Melanomzelllinie WM278**

Die WM278 Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden mit Simvastatin behandelt, lysiert und die Proteine mit Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. ERK und pERK wurden mit spezifischem Antikörper nachgewiesen und der Bereich von 42kDa dargestellt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

### 6.10.7 Basale COX 2 Expression

Das proinflammatorische Zytokin IL-6 leitet über seinen IL-6 Rezeptor und dessen Co-Rezeptor Gp130 das Signal ins Zellinnere, wo es über die Beeinflussung unterschiedlicher Signalwege die Expression verschiedener Signalmoleküle beeinflusst. Gp 130 ist in den fünf Melanomzelllinien exprimiert, Stat3 ist ebenso exprimiert und aktiv. Auch die Nf $\kappa$ B Expression ist deutlich vorhanden und Nf $\kappa$ B ist verstärkt aktiv. Sowohl Nf $\kappa$ B als auch COX 2 sind am Entzündungsgeschehen in der Zelle beteiligt. Die COX 2 Expression, welche durch Stat3 beeinflusst wird ist in allen fünf Zelllinien vorhanden.

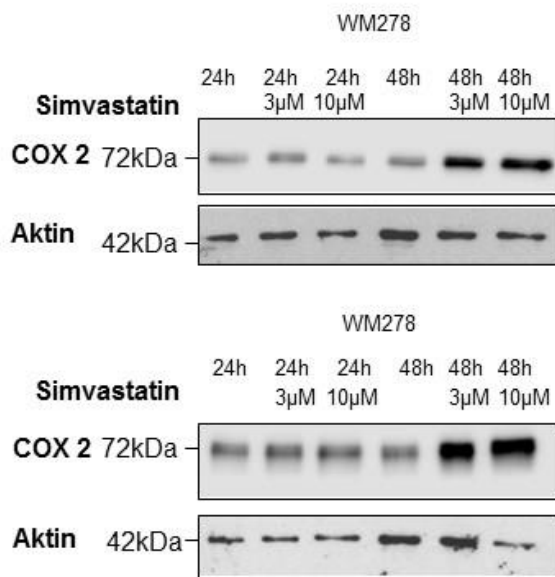


**Abbildung 26.: Expression und Aktivität von COX 2 in fünf Melanomzelllinien**

Die Proteine der Zelllysate der unbehandelten WM-Zelllinien WM35, WM278, WM793 und der metastasierten Zelllinien A375 und 518A2 wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Western Blot Analyse erfolgte mit spezifischem Antikörper gegen COX 2 und als Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin (42 kDa) verwendet.

### 6.10.8 Konzentrationsabhängige und Zeit Aktivierung von COX 2 unter der Behandlung mit Simvastatin 3 $\mu$ M und 10 $\mu$ M in der WM-Zelllinien WM278

Die Stat3 Expression wurde in der WM-Zelllinie 278, welche ein Vorstadium des Melanoms repräsentiert, näher analysiert. Unter der Behandlung mit Simvastatin 3 und 10 $\mu$ M kann man eine deutliche Zunahme der Expression mit der Dauer der Behandlung feststellen, wobei COX 2 nach 48 Stunden verstärkt exprimiert (Abbildung 27).



**Abbildung 27.: Expression von COX2 in der Melanomzelllinie WM278**

Die fünf Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden mit Tunicamycin 0,5 $\mu$ M behandelt, lysiert und die Proteine mit Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. COX2 wurde mit spezifischem Antikörper nachgewiesen und der Bereich von 72kDa dargestellt. Es wurden 2 Versuche durchgeführt (n=2). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

## 7 Diskussion

IL-6 bindet an seinen IL-6 Rezeptor, welcher mit dem transmembranären Glykoprotein Gp130 assoziiert ist. GP130 ist für die Signaltransduktion verantwortlich. Durch Bindung von IL-6 können drei unterschiedliche Signalwege aktiviert werden (Abbildung 3), JAK/Stat3, MEK/ERK und PI3K/AKT. Vorhergehende Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Hohenegger konnten zeigen, dass die metastasierten Melanomzelllinien A375 und 518A2 erhöhte IL-6 Spiegel aufweisen, (Wasinger, Minichsdorfer, and Hohenegger 2012) welche in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose stehen (Mouawad et al. 1996). Viktor Chesnokov und Kollegen zeigten, dass die Hemmung der N-Glykosylierung von Gp130 durch Glucosamin Einfluss auf die Proliferation und den JAK/Stat3 Signalweg in der humanen Prostatazelllinie DHU145 hat (Chesnokov et al. 2014; Chesnokov, Sun, and Itakura 2009). Kollegin Christine Wasinger konnte mittels Western Blot Analyse von Gp130 unter der Behandlung mit Simvastatin eine Verschiebung der 135kDa Bande zu einem niedrigeren Molekulargewicht von 95kDa feststellen. (Wasinger, Svoboda, Hohenegger, Posterpräsentation, Skin Cancer Meeting, Wien, 2016).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde der Einfluss der Glykosylierung von Gp130 auf die IL-6 Signalkaskade in fünf verschiedenen Melanomzelllinien näher betrachtet. Zur Manipulation wurden Tunicamycin und Simvastatin, welches als Medikament zugelassen ist, verwendet. Als Beweis für reduzierte Glykosylierung wurde PNGase F verwendet, ein Enzym zur Deglykosylierung. Ziel der Arbeit war die nähere Beleuchtung der stadienabhängigen Unterschiede in Bezug auf Wachstum und Signaltransduktion unter dem Einfluss von Tunicamycin und Simvastatin. Weiters sollte der Einfluss der Hemmung der Glykosylierung von Gp130 und den Folgen für die darunterliegenden Signalwege JAK/Stat3 und MAPkinase verfolgt werden. Da Tunicamycin durch Hemmung der Glykosylierung (Dricu et al. 1997) im Endoplasmatischen Retikulum zu ER-Stress führen kann (Jiang et al. 2007) wurde weiters der Einfluss auf das Wachstumsverhalten analysiert und durch den Apoptosemarker PARP (Staibano et al. 2005) auf Apoptose getestet.

Durch zeitabhängige Hemmung der Glykosylierung von Gp130 mittels Tunicamycin konnte einerseits eine Inaktivierung von Stat3 und dadurch ein Wegfall des Apoptose Schutzes gezeigt werden und andererseits eine Aktivierung des MAPkinase Signalweges und des Transkriptionsfaktors NFkB festgestellt werden. Weiters konnte mit Simvastatin, welches als Medikament zugelassen ist, ein stadienabhängiger Effekt auf die Glykosylierung und die Aktivierung von Stat3 gezeigt werden. Die metastasierten Zelllinien waren unter der Behandlung

mit Tunicamycin früher von Apoptose betroffen als die WM-Zelllinien. Der Apoptosemarker, gespaltenes PARP (cl PARP) konnte in den metastasierten Zelllinien nach 14 Stunden, in den WM-Zelllinien erst nach 48 Stunden nachgewiesen werden.

Etwas genauer wurden die Signalwege in den WM 278 Zellen untersucht. Simvastatin konnte die Stat3 Aktivierung nicht inhibieren und die Aktivierung von ERK wurde eher unterdrückt (Abbildung 24, 25). Die Aktivierung von AKT wurde durch Simvastatin über die Zeit gehemmt, die Expression von COX 2 aber verstärkt (Abbildung 27).

## **7.1 Beantwortung der Zielsetzung**

Ich konnte in meiner Diplomarbeit zeigen, dass Tunicamycin und Simvastatin die Glykosylierung von Gp130 reduzieren. Tunicamycin reduziert die Glykosylierung stadienunabhängig. Im Gegensatz dazu vermindert Simvastatin die Glykosylierung von Gp130 präferenziell in metastasierenden Zelllinien.

Die Effekte von Tunicamycin und Simvastatin waren konzentrations- und zeitabhängig.

Weiters konnte gezeigt werden, dass die dem IL-6 nachgeschalteten Signalkaskaden durch Tunicamycin und Simvastatin verändert werden. Tunicamycin hemmt die Aktivierung von Stat3 in allen Zelllinien, ebenso wie die von ERK1/2 und NFkB. Mit Simvastatin konnte ich in Bezug auf die Glykosylierung eine stadienabhängige Inaktivierung von Stat3 in den metastasierenden Zelllinien identifizieren.

### **7.1.1 Tunicamycin zeigt stadienunabhängige Effekte, während Simvastatin die Glykosylierung selektiv in den metastasierenden Melanomzellen beeinflusst.**

Zunächst wurden die Zellen charakterisiert und ihre basale Expression und Aktivität der Proteine des IL-6 Signalweges bestimmt. Dabei zeigte sich, dass sich das Verhalten der metastasierten Zelllinien in einigen Punkten von dem der WM-Zelllinien, welche die Frühstadien des Melanoms repräsentieren, unterscheidet. Das Zytokin IL-6 führt in der Melanomzelllinie WM35 zur Hemmung des Wachstums, während es in den metastasierten Melanomzelllinien A375 und 518A2 als Wachstumsfaktor fungiert. (Minichsdorfer et al. 2014) Die metastasierten Zelllinien zeigten im Vergleich zu den WM-Zellen eine signifikant erhöhte Proliferationsrate nach 24 und 48 Stunden, was typisch für dieses Stadium ist (Abbildung 5) und ihre IL-6 Spiegel sind deutlich erhöht. (Minichsdorfer et al. 2014).

Die Glykosylierung des IL-6 Co-Rezeptorproteins Gp130 hat einen wesentlichen Einfluss auf nachgeschalteten Signalwege. Die Bindung von IL-6 an seinen Co-Rezeptor Gp130 führt durch Dimerisierung zur Aktivierung des klassischen JAK/Stat3 Signalweges. JAKs sind Tyrosinkinase, die Stat3 am Tyrosin Rest auf Position 705 phosphorylieren und Stat3 aktivieren. pStat3 wandert daraufhin in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor an die DNA bindet und zur Freisetzung von Akut Phase Proteinen führt. Gp130 weist eine starke N-Glykosylierung auf und ist wesentlich an der Signalübertragung beteiligt. N-Glykosylierung spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität von Proteinen (Waetzig et al. 2010). Gp130 ist in allen fünf Zelllinien exprimiert, am stärksten in den WM 278 (Abbildung 6). Stat3, welches über Gp130 und den JAK/Stat3 Signalweg aktiviert wird, ist ebenfalls in allen fünf Zelllinien exprimiert und basal aktiv (Abbildung 7).

Bei der Wahl der Behandlung der Zellen gab es sowohl stadienabhängige, als auch zeitabhängige Einflussfaktoren, die eine wesentliche Rolle spielen. Es wurden zwei unterschiedliche Mechanismen zur Hemmung der Glykosylierung von Gp130 verwendet. Tunicamycin greift stadienunabhängig über die Hemmung der Oligosaccharidsynthese im ER in die Glykosylierung ein, während Simvastatin über Beeinflussung der Dolicholsynthese (Minichsdorfer et al. 2013) stadienabhängigen Einfluss auf die Glykosylierung zeigt.

Zunächst wurde der Einfluss von Tunicamycin auf die Glykosylierung untersucht. Für die Detektion der veränderten Glykosylierung von Gp130 wurde die metastasierte Zelllinie A375 herangezogen und wurden 2 verschiedene Antikörper verwendet, welche unterschiedliche Epitope erkennen. Die Entscheidung, welcher Antikörper für weitere Versuche verwendet werden sollte fiel auf den Antikörper, der sowohl das glykosylierte, als auch das nicht glykosylierte Gp130 Protein detektieren konnte (Abbildung 8). Es zeigte sich, dass der Gp130 Antikörper der Firma Millipore dafür geeignet war, während der Gp130 der Firma Diaclone ein Problem bei der Erkennung des nicht-glykosylierten Gp130 Proteins zeigte. Damit fiel die Entscheidung, den Gp130 Millipore Antikörper für weitere Versuche zu verwenden. Als Beweis dafür, dass es sich bei der Reduktion des Molekulargewichts um verminderte Aktivität der Glykosylierung und nicht um den Abbau des Proteins handelt, wurde Lysate mit PNGase F behandelt und die Lysate in nativen und denaturierenden Puffern elektrophoretisch aufgetrennt. (Abbildung 9) Auch hier konnte man einen Unterschied in der Erkennung der Antikörper feststellen, wodurch sich die Entscheidung für den Gp130 Millipore Antikörper bestätigte.



Als nächstes wurde gezeigt, dass Tunicamycin einen stadienunabhängigen Effekt auf die Glykosylierung von Gp130 in allen fünf Zelllinien hat (Abbildung 10 und 11).

Simvastatin greift über die Hemmung der HMG-CoA Reduktase in die Dolicholsynthese ein, reduziert die Dolicholspiegel und hat folglich über die reduzierte Bereitstellung der Dolicholanker einen Einfluss auf die Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum (Minichsdorfer et al. 2013). Dies führte zu einem stadienabhängigen Effekt auf die Glykosylierung von Gp130, wobei besonders die metastasierten Zelllinien von der Hemmung der Glykosylierung betroffen sind. Simvastatin zeigte somit einen selektiven Effekt auf die Glykosylierung der metastasierenden Zelllinien (Abbildung 14).

### **7.1.2 Effekte von Tunicamycin auf die Glykosylierung sind zeitabhängig und Simvastatin zeigt zeit- und konzentrationsabhängige Effekte**

Tunicamycin hemmt die Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum zeitabhängig, indem es die Oligosachariddolichol Synthese blockiert, wodurch keine Oligosaccharide auf den Asparaginrest eines Polypeptids übertragen werden (Elbein 1987). Dies führte in allen fünf Zelllinien zu einer zeitabhängigen Verminderung und schließlich zu einer vollständigen Hemmung der N-Glykosylierung von Gp130 (Abbildung 11).

Gp130 wird im ER synthetisiert und an der Zelloberfläche exprimiert. Dieser Proteinumsatz funktioniert jedoch nur mit intakter Glykosylierung. Wird diese gehemmt, verbleibt das Protein im ER und es kommt zur Akkumulation der nicht glykosylierten Proteine im Endoplasmatischen Retikulum, wodurch in weiterer Folge ER-stress und Apoptose eingeleitet wird. Wird kein N-glykosyliertes Gp130 mehr produziert, wird das verbleibende transmembranäre Glykoprotein mit einer Halbwertszeit von zweieinhalb Stunden abgebaut (Siewert et al. 1999). Die Hemmung der Glykosylierung von Gp130 in Melanomzelllinien unter Tunicamycin beginnt nach drei bis sechs Stunden, und ergibt einen turn-over des Glykoproteins der mit der publizierten Halbwertszeit übereinstimmt. Nach der Behandlung mit Tunicamycin 0,5µM ist nach 14h kein glykosyliertes Gp130 mehr nachweisbar (Abbildung 10) Dafür kann eine Zunahme des nicht glykosylierten Gp130 im Molekulargewichtsbereich von 95kDa nachgewiesen werden.

Mit Simvastatin zeigte Gp130 in den metastasierenden Zelllinien ebenfalls eine Verschiebung zur nicht glykosylierten Form im Molekulargewichtsbereich von 95 kDa (Abbildung 14). Da Lysate der ganzen Zellen verwendet wurden ist unklar, ob die nachgewiesene Zunahme des nicht

glykosylierten Gp130 Proteins auch mit einem Einbau in die Zellmembran einhergeht oder auf eine Akkumulation im Endoplasmatischen Retikulum hindeutet. Diese offene Frage müsste mittels FACS Analyse beantwortet werden.

### **7.1.3 Einfluss auf nachgeschaltete Signalwege der IL-6 Kaskade**

Weiters sollte die Wirkung auf die IL-6 Kaskade unter Tunicamycin und Simvastatin untersucht werden, mit besonderem Augenmerk auf die nachgeschalteten Signalwege Stat3, ERK1/2 und NFkB. All diese Untersuchungen wurden in fünf Melanomzelllinien unterschiedlicher Stadien durchgeführt und verglichen.

In vielen Tumorzellen kann eine erhöhte STAT3 Aktivität nachgewiesen werden, wodurch dessen Hemmung einen interessanten Ansatzpunkt für die Krebstherapie bringt (Chesnokov et al. 2014). Die Glykosylierung von Gp130 wurde mittels Tunicamycin gehemmt und nach 14 Stunden war nur noch nichtglykosyliertes Gp130 nachweisbar. Folglich wurde aktiviertes Stat3 nach 14 Stunden in allen fünf Zelllinien nicht gefunden (Abbildung:12). Diese Beobachtung in Bezug auf die Glykosylierung von Gp130 deckt sich mit der Aktivierung und Deaktivierung von Stat3. Stat3 alpha hat eine Halbwertszeit von 8,5 Stunden, Stat3 beta 4,5 Stunden (Siewert et al. 1999). Mit der Hemmung der Glykosylierung von Gp130 und der Inaktivierung von Stat3 nach 14h Stunden kann auch gleichzeitig Apoptose im Wachstumsversuch und mittels Apoptose Marker PARP nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass die metastasierten Zelllinien wesentlich früher und stärker von den Effekten auf die Glykosylierung betroffen sind als die WM-Zelllinien. Die metastasierenden Zelllinien zeigten unter der Behandlung mit Tunicamycin in der Zellkultur beim Wachstumsversuch eine frühere Ablösung und Vermehrung von schwimmenden Zellen unter dem Mikroskop. Die Zellzahl war schon nach 24 Stunden signifikant vermindert und gespaltenes PARP interessanter Weise schon nach 14 Stunden nachweisbar. In den WM-Zellen konnte gespaltenes PARP und eine signifikante Verminderung der Zellzahl erst nach 48 Stunden nachgewiesen werden.

Mit Simvastatin konnten stadienabhängige Effekte auf die Stat3 Aktivierung festgestellt werden. Die Glykosylierung von gp130 konnte selektiv in der metastasierenden Melanomzelllinien A375 und 518A2 reduziert werden (Abbildung 14), während die WM Zelllinien keinen Effekt auf die Glykosylierung zeigten. In Anlehnung an diese Beobachtung konnte die Aktivierung von Stat3 folglich auch selektiv in den metastasierenden Zelllinien gehemmt werden, während es in den WM Zelllinien zu keiner Verminderung der Aktivität kam (Abbildung 15). Dies konnte in der WM

Zelllinie WM278 nochmals verdeutlicht werden, indem die Aktivierung von Stat3 unter der konzentrations- und zeitabhängigen Behandlung mit Simvastatin unbeeinflusst blieb (Abbildung 23)

Weiters kann durch Hemmung der Glykosylierung von Gp130 mit Simvastatin ein besseres Verständnis der Mechanismen aufgezeigt werden, die zu einer Verschiebung der Signaltransduktion von Stat3 Richtung ERK1/2 und NFkB führen. Damit kann auch erklärt werden, wie durch den Wegfall des Apoptoseschutzes vermehrte Apoptose beobachtbar wird.

Im Gegensatz dazu wird unter der Behandlung mit Tunicamycin eine erhöhte Aktivierung von ERK1/2 nach 14h in allen fünf Zelllinien beobachtbar (Abbildung 20). Die Aktivität von NFkB wird durch Tunicamycin in den fünf Melanomzelllinien nicht beeinflusst, in den WM 793, A375 und 518A2 kommt es sogar zu einer Verstärkung der Aktivität (Abbildung 22).

#### **7.1.4 Verwendung von Tunicamycin und Simvastatin**

IL-6 wirkt in der WM35 Zelllinie hemmend auf das Wachstum, während es in den metastasierten Zelllinien A375 und 518A2 zu einem verstärkten Wachstum führt. Exogenes IL-6 hat in den metastasierten Melanomzelllinien A375 und 518A2 unter der Behandlung mit Simvastatin keinen Effekt (Minichsdorfer et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass Simvastatin den ABCB1 Transporter P-Glykoprotein direkt hemmt und zu einer verstärkten intrazellulären Anreicherung von Doxorubicin führt. (Werner et al. 2013) Simvastatin reduziert endogene Dolicholspiegel und ABCB1 in den Neuroblastomzellen SH-SY5Y. Durch Zugabe von Dolichol konnte Apoptose, die durch Simvastatin induziert wurde abgeschwächt werden. Dies konnte durch den Nachweis von geschnittenen PARP Fragmenten gezeigt werden. cl PARP wurde in Zellextrakten, die mit Simvastatin behandelten wurden vermehrt nachgewiesen. Weiters konnte Aktivierung von Caspase 3 und eine positive Annexin V/PI Färbung festgestellt werden Die Beobachtungen waren durch Zugabe von Dolichol umkehrbar (Atil et al. 2016). Ebenso konnten Christoph Minichsdorfer und Kollegen zeigen, dass Simvastatin zu einer Aktivierung von Caspase 3 führt, wobei die metastasierenden Zelllinien stärker betroffen waren im Vergleich zu der WM 35 Zelllinie des frühen Stadiums (Minichsdorfer et al. 2014).

Donavon C.Hiss und Kollegen konnten in der therapieresistenten Ovarialkrebs Zelllinie UWOV2 durch zusätzliche Gabe von Tunicamycin, eine Steigerung der Toxizität und erhöhte Sensitivität für Antikrebsmedikamente erzielen. (Hiss, Gabriels, and Folb 2007) Die Glykosylierung von Gp130 ist für die Aktivierung Stat3 essentiell (Abbildung 10-15). Stat3 ist wesentlich an der

Aufrechterhaltung des Apoptoseschutz beteiligt, was durch Verminderung der Zellzahl und Nachweis von cI<sub>1</sub>PARP verdeutlicht wird (Abbildung 16-19). Apoptose, die durch Tunicamycin induziert wird ist von der Inkubationszeit abhängig, welche mindestens 24 bis 48 Stunden betragen muss (Dricu et al. 1997). Interessanter Weise ist cI<sub>1</sub>PARP in den metastasierenden Zelllinien schon nach 14 Stunden nachweisbar und eine signifikant verminderte Zellzahl nach 24 Stunden nachweisbar. In den WM-Zelllinien konnte cI<sub>1</sub>PARP erst nach 48 Stunden nachgewiesen werden (Abbildung 19).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Glykosylierung von Gp130 einen wesentlichen Einfluss auf die nachgeschaltene Signalkaskade hat, wobei Simvastatin selektive, stadienabhängige Effekte auf metastasierende Krebszellen zeigt. Diese Effekte sind möglicherweise pharmakologisch relevant. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der IL-6 Co-Rezeptor Gp130 wesentlich an der Aufrechterhaltung des Apoptoseschutzes durch Stat3 beteiligt ist. Somit scheint die Glykosylierung von Gp130 eine wesentliche Rolle in der IL-6 Signaltransduktion in BRAF<sup>V600E</sup> mutierten Melanomzellen zu spielen. Die verstärkte Aktivierung des MAPkinase Weges, als Gegenregulation zur Stat3 Inaktivierung gibt Hinweis auf funktionelle Selektivität im IL-6 Signalweg und auf eine Rechtfertigung der Inhibition dieses Signalwegs mit BRAF<sup>V600E</sup> und MEK Inhibitoren.

## 8 Abkürzungen

ABCB1	ATP-binding cassette B1
APS	Ammoniumperoxydisulfat
Asn	Asparagin
AKT (= PKB)	V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1/ Proteinkinase B
ATP	Adenosin Triphosphat
Bad	Bcl-xL/Bcl-2 associated death promotor; Bcl-assoziierter Todespromotor
Bax	Bcl-2 associated x protein; Bcl-assoziertes X-Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-xL	Bcl-x long
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BRAF	rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma B
BSA	bovines Serumalbumin
CDK	cyclin dependent kinase
CHOP	<a href="#"><u>CCAAT/-enhancer-binding protein homologous protein</u></a>
cIPARP	cleaved PARP
COX <sub>2</sub>	Cyclooxygenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extracellular-signal regulated kinases 1/2
FBS	fetal bovine serum fetales Rinderserum

FOXO	Das Forkhead-Box-Protein O3
GP130	Glykoprotein 130
HMGCo-A	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HRP	horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IP-Puffer	Immunoprecipitations-Puffer
IkB	Inhibitor von NF-kB
Ikk	IkB spezifische Kinase
IL6	Interleukin-6
JAK	Januskinase
JPEG	Joint Photographic Experts Group
kDa	Kilodalton
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Kinase
(m/v)	mass percentage
MEK	mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
M.Q.	Milli-Q
NFkB	nuclear factor of immunoglobulin k locus in B cells
NP-40	4-Nonylphenyl-polyethylene glycol
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
PARP	Poly- ADP-Ribose Polymerase
PBS	Phosphatpufferte Salzlösung
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl Inositol 2 Phosphat

PNGase	Peptid:N-Glykanase
pAKT	phospho V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
pERK	phospho
pNFkB	phosphor
pStat3	phospho Stat3
Pten	Phospatase on chromosom ten
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodium dodecylsulfat Natriumlaurylsulfat
SDS PAGE	Sodium dodecylsulfat Gelelektrophorese
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethyl Ethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Tromethamin (INN), TRIS
TRIS-HCl	Tris hydrochloride
U/ $\mu$ l	Enzyme activity Unit / microliters
UK	United Kingdom
(v/v)	Volumsprozent

## 9 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.: IL-6 Signalweg

Seite 11

Abbildung 2.: Hemmung der Glykoslierung durch unterschiedliche Mechanismen

Seite 15

Abbildung 3.: Einfluss der Cyclin abhängigen Kinasen (CDKs) auf den Zellzyklus

Seite 17

Abbildung 4.: Rezeptor und Mitochondrien regulierte Signalwege der Apoptose

Seite 18

Abbildung 5.: Proliferation verschiedener Melanomzellen unterschiedlicher Wachstumsstadien

Seite 35

Abbildung 6.: Expression von Gp130 in fünf Melanomzelllinien

Seite 36

Abbildung 7.: Expression und Aktivität von Stat3 in fünf Melanomzelllinien

Seite 37

Abbildung 8.: Vergleich der gp130 Antikörper von Diaclone und Millipore

Seite 39

Abbildung 9.: Deglykosylierung durch PNGase F

Seite 40

Abbildung 10.: Einfluss von Tunicamycin auf Gp130 (Millipore)

Seite 41

Abbildung 11.: Einfluss von Tunicamycin auf Gp130 (Diaclone) und (Millipore)

Seite 42

Abbildung 12.: Einfluss der veränderten Gp130 Expression auf Stat3 nach 14 Stunden

Seite 43

Abbildung 13.: Hemmung der Stat3 Aktivierung durch Tunicamycin nach 48 Stunden

Seite 44



Abbildung 14.: Einfluss von Simvastatin auf die Gp130 Expression in fünf verschiedenen Melanomzelllinien

Seite 45

Abbildung 15.: Simvastatin blockiert die basale Stat3 Aktivierung in metastatisierenden Melanomzellen

Seite 46

Abbildung 16.: Einfluss von Tunicamycin auf die Proliferation

Seite 48

Abbildung 17.: Tunicamycin reduziert die sessilen Zellen signifikant

Seite 49

Abbildung 18.: Aktivierung von PARP durch Tunicamycin in fünf Melanomzelllinien

Seite 50

Abbildung 19.: Aktivierung und Inaktivierung von PARP in den fünf Zelllinien unterschiedlicher Stadien

Seite 51

Abbildung 20.: Zeitabhängige Aktivierung von ERK in fünf Melanomzelllinien

Seite 52

Abbildung 21.: Basale Aktivität von NFkB und pNFkB in fünf Melanomzelllinien

Seite 53

Abbildung 22.: Aktivierung von NFkB in fünf Melanomzelllinien

Seite 54

Abbildung 23.: Simvastatin Einfluss auf die basale Aktivierung von Stat3 in der Melanomzelllinie WM278

Seite 55

Abbildung 24.: Simvastatin abhängige Aktivierung von ERK in der Melanomzelllinie WM278

Seite 56

Abbildung 25.: Simvastatin abhängige Aktivierung von AKT in der Melanomzelllinie WM278  
Seite 57

Abbildung 26.: Expression und Aktivität von COX 2 in fünf Melanomzelllinien  
Seite 57

Abbildung 27.: Expression von COX2 in der Melanomzelllinie WM278  
Seite 58

## 9.1 Quellenangaben zum Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.: IL-6 Signalweg

<https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/cell-signaling-pathways/il-6-pathway.html>;

abgerufen am 9.03.2019

Abbildung 2.: Hemmung der Glykosylierung durch unterschiedliche Mechanismen

Müller-Esterl Werner. 2011. *Biochemie*. 2. Auflage. Spektrum; Kapitel 19: Posttranslationale Prozessierung und Sortierung von Proteinen, Seite 243

Abbildung 3.: Einfluss der Cyclin abhängigen Kinasen (CDKs) auf den Zellzyklus

Karlson Peter, Doenecke Detlef, and Koolman Jan. 1994. *Kurzes Lehrbuch Der Biochemie Für Mediziner Und Naturwissenschaftler*. 14 neubearbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, Seite 349.

Abbildung 4.: Rezeptor und Mitochondrien regulierte Signalwege der Apoptose

Mutschler Ernst, Gerd Geisslinger, Heyo K. Kroemer, Sabine Menzel, and Peter Ruth. 2013 *Mutschler Arzneimittelwechselwirkungen*. 10.Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Seite 874.

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des IP Puffers	Seite 29
Tabelle 2: Zusammensetzung des 4×Sample Puffer	Seite 30
Tabelle 3: Prozentueller Anteil des Gels von Acrylamide-bisacrylamid in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Proteins	Seite 31
Tabelle 4: Zusammensetzung des Gelelektrophorese Gels	Seite 31
Tabelle 5: Rezeptur zur Bereitung des Trennungs und Stacking Gels für die SDS-PAGE	Seite 32
Tabelle 6: Rezeptur zur Bereitung des 1×/10×Lauf- und des 1×/10×Transferpuffers	Seite 32
Tabelle 7: Rezeptur zur Herstellung von 10×und 1×TBS, 1×TBST und BSA/TBST	Seite 33

## 11 Referenzen

- Atil, Bihter, Evelyn Berger-Sieczkowski, Johanna Bardy, Martin Werner, and Martin Hohenegger. 2016. "In Vitro and in Vivo Downregulation of the ATP Binding Cassette Transporter B1 by the HMG-CoA Reductase Inhibitor Simvastatin." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 389 (1): 17–32.
- Barnum, Kevin J., and Matthew J. O'Connell. 2014. "Cell Cycle Regulation by Checkpoints." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1170: 29–40.
- Bataille, V., J. A. Bishop, P. Sasieni, A. J. Swerdlow, E. Pinney, K. Griffiths, and J. Cuzick. 1996. "Risk of Cutaneous Melanoma in Relation to the Numbers, Types and Sites of Naevi: A Case-Control Study." *British Journal of Cancer* 73 (12): 1605–11.
- Bourke, Ca, and Mj Carrigan. 1993. "Experimental Tunicamycin Toxicity in Cattle, Sheep and Pigs." *Australian Veterinary Journal* 70 (5): 188–89.
- Bradford, M. M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72 (May): 248–54.
- Breitling, Jörg, and Markus Aebi. 2013. "N-Linked Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (8).
- Breslow, A. 1970. "Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma." *Annals of Surgery* 172 (5): 902–8.
- Breslow, A. 1975. "Tumor Thickness, Level of Invasion and Node Dissection in Stage I Cutaneous Melanoma." *Annals of Surgery* 182 (5): 572–75.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1980. "Multivalent Feedback Regulation of HMG CoA Reductase, a Control Mechanism Coordinating Isoprenoid Synthesis and Cell Growth." *Journal of Lipid Research* 21 (5): 505–17.
- Celebi, J. T., I. Shendrik, D. Silvers, and M. Peacocke. 2000. "Identification of PTEN Mutations in Metastatic Melanoma Specimens." *Journal of Medical Genetics* 37 (9): 653–57.
- Chesnokov, Viktor, Beata Gong, Chao Sun, and Keiichi Itakura. 2014. "Anti-Cancer Activity of Glucosamine through Inhibition of N-Linked Glycosylation." *Cancer Cell International* 14: 45.
- Chesnokov, Viktor, Chao Sun, and Keiichi Itakura. 2009. "Glucosamine Suppresses Proliferation of Human Prostate Carcinoma DU145 Cells through Inhibition of STAT3 Signaling." *Cancer Cell International* 9 (September): 25.
- Clark, Wallace H., Lynn From, Evelina A. Bernardino, and Martin C. Mihm. 1969. "The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin." *Cancer Research* 29 (3): 705–27.
- Cohen, G M. 1997. "Caspases: The Executioners of Apoptosis." *Biochemical Journal* 326 (Pt 1): 1–16.
- Davies, Helen, Graham R. Bignell, Charles Cox, Philip Stephens, Sarah Edkins, Sheila Clegg, Jon Teague, et al. 2002. "Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer." *Nature* 417 (6892): 949–54.
- Dettmer Ulf, Folkerts Malte, Kächler Eva, and Sönnichsen Andreas. 2005. *Intensivkurs Biochemie*. 1. Auflage. München Jena: Urban und Fischer. Seite 276-90
- Dricu, Anica, Magdalena Carlberg, Min Wang, and Olle Larsson. 1997. "Inhibition of N-Linked Glycosylation Using Tunicamycin Causes Cell Death in Malignant Cells: Role of Down-Regulation of the Insulin-like Growth Factor 1 Receptor in Induction of Apoptosis." *Cancer Research* 57 (3): 543–48.
- Elbein, Alan D. 1987. "Inhibitors of the Biosynthesis and Processing of N-Linked Oligosaccharide Chains." *Annual Review of Biochemistry* 56 (1): 497–534.

- Fribley, Andrew, Kezhong Zhang, and Randal J. Kaufman. 2009. "Regulation of Apoptosis by the Unfolded Protein Response." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 559: 191–204.
- Friedman, Robert J., Darrell S. Rigel, and Alfred W. Kopf. 1985. "Early Detection of Malignant Melanoma: The Role of Physician Examination and Self-Examination of the Skin." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 35 (3): 130–51.
- Garnett, Mathew J., and Richard Marais. 2004. "Guilty as Charged: B-RAF Is a Human Oncogene." *Cancer Cell* 6 (4): 313–19. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.022>.
- Green, D., and G. Kroemer. 1998. "The Central Executioners of Apoptosis: Caspases or Mitochondria?" *Trends in Cell Biology* 8 (7): 267–71.
- Hammond, C., I. Braakman, and A. Helenius. 1994. "Role of N-Linked Oligosaccharide Recognition, Glucose Trimming, and Calnexin in Glycoprotein Folding and Quality Control." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (3): 913–17.
- Heinrich, P C, I Behrmann, G Müller-Newen, F Schaper, and L Graeve. 1998. "Interleukin-6-Type Cytokine Signalling through the gp130/Jak/STAT Pathway." *Biochemical Journal* 334 (Pt 2): 297–314.
- Herdegen Thomas, Böhm Ruwen, Culman Juraj, Gohlke Peter, Luippold Gerd, and Wätzig Vicki. 2014. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. 3.,vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag KG. Seite 530-548
- Hiss, Donavon C., Gary A. Gabriels, and Peter I. Folb. 2007. "Combination of Tunicamycin with Anticancer Drugs Synergistically Enhances Their Toxicity in Multidrug-Resistant Human Ovarian Cystadenocarcinoma Cells." *Cancer Cell International* 7 (1): 5.
- Højberg, Lise, Lars Bastholt, and Henrik Schmidt. 2012. "Interleukin-6 and Melanoma." *Melanoma Research* 22 (5): 327.
- Holderfield, Matthew, Marian M. Deuker, Frank McCormick, and Martin McMahon. 2014. "Targeting RAF Kinases for Cancer Therapy: BRAF Mutated Melanoma and beyond." *Nature Reviews. Cancer* 14 (7): 455–67.
- Jiang, Chen Chen, Li Hua Chen, Susan Gillespie, Kelly A. Kiejda, Nizar Mhaidat, Yu Fang Wang, Rick Thorne, Xu Dong Zhang, and Peter Hersey. 2007. "Tunicamycin Sensitizes Human Melanoma Cells to Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand–Induced Apoptosis by Up-Regulation of TRAIL-R2 via the Unfolded Protein Response." *Cancer Research* 67 (12): 5880–88.
- Kadowaki, Hisae, and Hideki Nishitoh. 2013. "Signaling Pathways from the Endoplasmic Reticulum and Their Roles in Disease." *Genes* 4 (3): 306–33.
- Karasarides, Maria, Antonio Chiloehes, Robert Hayward, Dan Niculescu-Duvaz, Ian Scanlon, Frank Friedlos, Lesley Ogilvie, et al. 2004. "B-RAF Is a Therapeutic Target in Melanoma." *Oncogene* 23 (37): 6292–98.
- Karlson Peter, Doenecke Detlef, and Koolman Jan. 1994. *Kurzes Lehrbuch Der Biochemie Für Mediziner Und Naturwissenschaftler*. 14 neubearbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart. Seite 349
- Kefford, R. F., J. A. Newton Bishop, W. Bergman, and M. A. Tucker. 1999. "Counseling and DNA Testing for Individuals Perceived to Be Genetically Predisposed to Melanoma: A Consensus Statement of the Melanoma Genetics Consortium." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 (10): 3245–51.
- Kroemer, G. 1999. "Mitochondrial Control of Apoptosis: An Overview." *Biochemical Society Symposium* 66: 1–15.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, et al. 2005. "Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." *Cell Death and Differentiation* 12 Suppl 2 (November): 1463–67.

- Lesinski, Gregory B. 2013. "The Potential for Targeting the STAT3 Pathway as a Novel Therapy for Melanoma." *Future Oncology (London, England)* 9 (7): 925–27.
- Liu, Ying, Yu Zhang, Ying Zhao, Dongna Gao, Jing Xing, and Hui Liu. 2016. "High PARP-1 Expression Is Associated with Tumor Invasion and Poor Prognosis in Gastric Cancer." *Oncology Letters* 12 (5): 3825–35.
- Lyons, J. F., S. Wilhelm, B. Hibner, and G. Bollag. 2001. "Discovery of a Novel Raf Kinase Inhibitor." *Endocrine-Related Cancer* 8 (3): 219–25.
- Mackiewicz, Jacek, and Andrzej Mackiewicz. 2018. "BRAF and MEK Inhibitors in the Era of Immunotherapy in Melanoma Patients." *Contemporary Oncology* 22 (1A): 68–72.
- Mantovani, Alberto, Paola Allavena, Antonio Sica, and Frances Balkwill. 2008. "Cancer-Related Inflammation." *Nature* 454 (7203): 436–44.
- Måsbäck, A., H. Olsson, J. Westerdahl, T. Sandberg, A. Borg, N. Jonsson, and C. Ingvar. 2002. "Clinical and Histopathological Features of Malignant Melanoma in Germline CDKN2A Mutation Families." *Melanoma Research* 12 (6): 549–57.
- Mayer Sebastian. 2018. *Pharmacological Regulation of the IL-6 Pathway in Stage Dependent Human Melanoma Cells*. Vol. Thesis at the Medical University of Vienna.
- McDowell, W., and R. T. Schwarz. 1988. "Dissecting Glycoprotein Biosynthesis by the Use of Specific Inhibitors." *Biochimie* 70 (11): 1535–49.
- Minichsdorfer, Christoph, Christine Wasinger, Bihter Atil, Evelyn Sieczkowski, and Martin Hohenegger. 2014. "Effects of Interleukin-6 and Tocilizumab on Statin-Induced Apoptosis in Melanoma Cells." *Journal of Clinical Oncology* 32 (15\_suppl): e22212–e22212.
- Minichsdorfer, Christoph, Christine Wasinger, Evelyn Sieczkowski, Bihter Atil, and Martin Hohenegger. 2015. "Tocilizumab Unmasks a Stage-Dependent Interleukin-6 Component in Statin-Induced Apoptosis of Metastatic Melanoma Cells." *Melanoma Research* 25 (4): 284–94.
- Minichsdorfer, Christoph, Christine Wasinger, Evelyn Sieczkowski, Atil Bihter, Gerwin Heller, Sabine Zöchbauer-Müller, and Martin Hohenegger. 2013. "Abstract 2940: Statin Induced Apoptosis in Human Melanoma Cells Is Prevented by Inhibition of Caspase 2 and Translational Activity." *Cancer Research* 73 (8 Supplement): 2940–2940.
- Mouawad, R., A. Benhammouda, O. Rixe, E. C. Antoine, C. Borel, M. Weil, D. Khayat, and C. Soubrane. 1996. "Endogenous Interleukin 6 Levels in Patients with Metastatic Malignant Melanoma: Correlation with Tumor Burden." *Clinical Cancer Research* 2 (8): 1405–9.
- Müller-Esterl Werner. 2011. *Biochemie*. 2. Auflage. Spektrum. Seite 242-46, 494-513
- Mutschler Ernst, Gerd Geisslinger, Heyo K. Kroemer, Sabine Menzel, and Peter Ruth. 2013. *Mutschler Arzneimittelwechselwirkungen*. 10. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. Seite 867-874
- Nosho, Katsuhiko, Hiroyuki Yamamoto, Masashi Mikami, Hiroaki Taniguchi, Taiga Takahashi, Yasushi Adachi, Akimichi Imamura, Kohzoh Imai, and Yasuhisa Shinomura. 2006. "Overexpression of poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in the Early Stage of Colorectal Carcinogenesis." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 42 (14): 2374–81.
- Nurse, Paul. 2002. "Cyclin Dependent Kinases and Cell Cycle Control (Nobel Lecture)." *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 3 (7): 596–603.
- Rush, Jeffrey S. 2016. "Role of Flippases in Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum." *Lipid Insights* 8 (Suppl 1): 45–53.
- Ryu, Sunhyo, Chakyung Youn, Ae Ran Moon, Amanda Howland, Cheryl A. Armstrong, and Peter I. Song. 2017. "Therapeutic Inhibitors against Mutated BRAF and MEK for the Treatment of Metastatic Melanoma." *Chonnam Medical Journal* 53 (3): 173–77.

- Shi, Hubing, Willy Hugo, Xiangju Kong, Aayoung Hong, Richard C. Koya, Gatién Moriceau, Thine Chodon, et al. 2014. "Acquired Resistance and Clonal Evolution in Melanoma during BRAF Inhibitor Therapy." *Cancer Discovery* 4 (1): 80–93.
- Siewert, E., W. Müller-Esterl, R. Starr, P. C. Heinrich, and F. Schaper. 1999. "Different Protein Turnover of Interleukin-6-Type Cytokine Signalling Components." *European Journal of Biochemistry* 265 (1): 251–57.
- Stahl, Jill M., Mitchell Cheung, Arati Sharma, Nishit R. Trivedi, Sumathi Shanmugam, and Gavin P. Robertson. 2003. "Loss of PTEN Promotes Tumor Development in Malignant Melanoma." *Cancer Research* 63 (11): 2881–90.
- Staibano, Stefania, Stefano Pepe, Lorenzo Lo Muzio, Pasquale Somma, Massimo Mascolo, Giuseppe Argenziano, Massimiliano Scalvenzi, et al. 2005. "Poly(adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase 1 Expression in Malignant Melanomas from Photoexposed Areas of the Head and Neck Region." *Human Pathology* 36 (7): 724–31.
- Tsai, James, John T. Lee, Weiru Wang, Jiazhong Zhang, Hanna Cho, Shumeye Mamo, Ryan Bremer, et al. 2008. "Discovery of a Selective Inhibitor of Oncogenic B-Raf Kinase with Potent Antimelanoma Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (8): 3041–46.
- Tsutsumi, S., T. Gotoh, W. Tomisato, S. Mima, T. Hoshino, H.-J. Hwang, H. Takenaka, T. Tsuchiya, M. Mori, and T. Mizushima. 2004. "Endoplasmic Reticulum Stress Response Is Involved in Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Apoptosis." *Cell Death and Differentiation* 11 (9): 1009–16.
- Waetzig, Georg H., Athena Chalaris, Philip Rosenstiel, Jan Suthaus, Christin Holland, Nadja Karl, Lorena Vallés Uriarte, et al. 2010. "N-Linked Glycosylation Is Essential for the Stability but Not the Signaling Function of the Interleukin-6 Signal Transducer Glycoprotein 130." *Journal of Biological Chemistry* 285 (3): 1781–89.
- Wasinger, Christine, Christoph Minichsdorfer, and Martin Hohenegger. 2012. "IL-6-Mediated Migration of Human Metastatic Melanoma Cells Is Reduced by Simvastatin Treatment." *BMC Pharmacology and Toxicology* 13 (1): A66.
- Werner, Martin, Bihter Atil, Evelyn Sieczkowski, Peter Chiba, and Martin Hohenegger. 2013. "Simvastatin-Induced Compartmentalisation of Doxorubicin Sharpens up Nuclear Topoisomerase II Inhibition in Human Rhabdomyosarcoma Cells." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 386 (7): 605–17.
- Yu, Hua, and Richard Jove. 2004. "The STATs of Cancer--New Molecular Targets Come of Age." *Nature Reviews. Cancer* 4 (2): 97–105.
- Yu, Hua, Drew Pardoll, and Richard Jove. 2009a. "STATs in Cancer Inflammation and Immunity: A Leading Role for STAT3." *Nature Reviews. Cancer* 9 (11): 798–809.
- Yu, Hua, Drew Pardoll, and Richard Jove. 2009b. "STATs in Cancer Inflammation and Immunity: A Leading Role for STAT3." *Nature Reviews. Cancer* 9 (11): 798–809.
- Zhao, Yan-Yang, Motoko Takahashi, Jian-Guo Gu, Eiji Miyoshi, Akio Matsumoto, Shinobu Kitazume, and Naoyuki Taniguchi. 2008. "Functional Roles of N-Glycans in Cell Signaling and Cell Adhesion in Cancer." *Cancer Science* 99 (7): 1304–10.

## 12 Veröffentlichung der Arbeit

### Posterpräsentationen

*Christine Wasinger, Katharina Svoboda and Martin Hohenegger* “Pharmacological targeting of the IL-6 signalling pathway in human melanoma cells of different stages”, Poster World Skin congress 2016,

*Martin Hohenegger, Katharina Svoboda and Christine Wasinger* “The IL-6 signalling pathway in human melanoma cells of different stages”, Poster Dublin 2016

### Kongressteilnahmen

24th Scientific Symposium of the Austrian Pharmacological Society (APHAR) Graz, 27–28 September 2018

*Katharina SVOBODA, Christine WASINGER, Sebastian MAYER and Martin HOHENEGGER\** “Deglycosylation of the cytokine co-receptor gp130 reveals a rapid protein turnover, which gives rise to biased signalling,”

6<sup>th</sup> ImmunoTherapy of Cancer Conference (ITOC6), April 11 – 14, 2019, Vienna, Austria

*K. Svoboda, C. Wasinger, S. Mayer, M. Hohenegger* “Glycosylation of the cytokine co-receptor gp130 reveals a rapid protein turnover, which gives raise to biased signalling in human melanoma cells from different disease stages”,

### Publikationen:

*Christine Wasinger, Katharina Svoboda and Martin Hohenegger* “Pharmacological targeting of the IL-6 signalling pathway in human melanoma cells of different stages”, (2019) *in Arbeit*