



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Pharmakologische Regulation der IL-6 bzw. Oncostatin M me-
dierte Signalwege in Gegenwart des SOS-RAS Interaktionsin-
hibitors BAY293 in humane Melanomzellen unterschiedlicher
Wachstumsphasen“

verfasst von / submitted by

Nadine Szorger, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien, 2023 / Vienna 2023

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

UA 066 605

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

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Prof. Dr. Martin Hohenegger

Danksagung

Zuerst ein großes Danke an Professor Dr. Martin Hohenegger, der mir einen Platz für die Masterarbeit in seinem Labor an der Medizinische Universität im Department für Pharmakologie zur Verfügung gestellt hat. Des Weiteren möchte ich mich für die gute Betreuung und die Beurteilung meiner Masterarbeit bedanken. Ich habe während dieser Zeit sehr viele neue Erfahrungen gemacht und unter anderem auch das selbstständige Arbeiten im Labor erlernt.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner gesamten Familie, meinem Freund und seiner Familie für die tagtägliche Unterstützung und die vielen motivierenden Worte während meiner gesamten Zeit an der Universität Wien.

An dieser Stelle auch ein Dankeschön an meine Studienkollegin Razia Mirzahi, die mich während der gesamten Zeit an der Medizinischen Universität und der Universität Wien motiviert und in schwierigen Situationen aufgemuntert hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	2
3	Einleitung	3
3.1	Melanom	3
3.1.1	Häufigkeit	3
3.1.2	Risikofaktoren	4
3.1.2.1	BRAF-Mutation	4
3.1.3	Diagnose	5
3.1.4	Therapiemöglichkeiten	5
3.1.5	Prognosen	6
3.2	Signalwege	7
3.2.1	IL6 bzw. Oncostatin M vermittelte Signalwege	7
3.2.1.1	MAP-Kinase-Signalweg	9
3.2.1.1.1	SOS1-Ras Interaktionsinhibitor (BAY293)	9
3.2.1.2	JAK-STAT-Signalweg	11
3.2.1.3	P38-Signalweg	12
3.2.1.4	AKT-Signalweg	13
4	Ziele	14
5	Material und Methoden	15
5.1	Substanzen	15
5.2	Antikörper	15
5.2.1	Primäre Antikörper	15
5.2.1.1	ERK1/2	15
5.2.1.2	Phospho ERK1/2	15
5.2.1.3	STAT3	16
5.2.1.4	Phospho STAT3	16
5.2.1.5	p38	16
5.2.1.6	Phospho p38	16
5.2.1.7	AKT	16
5.2.1.8	Phospho AKT	16
5.2.2	Sekundärer Antikörper	16
5.3	Puffer	17
5.3.1	RIPA-Puffer (Lyse-Puffer)	17
5.3.2	Laufpuffer	18
5.3.3	Semidry-Transfer-Puffer	18
5.3.4	Stripping-Puffer	19
5.4	Weitere Lösungen	20
5.5	Geräte	21

5.6	Zelllinien	22
5.7	Zellkultur	23
5.7.1	Medien.....	23
5.7.2	Zellen splitten	23
5.8	Proteinisolation	25
5.8.1.1	Proteinisolation von den 6cm Petrischalen	25
5.8.1.2	Isolation von den 10cm Petrischalen.....	26
5.8.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford und BCA.....	27
5.9	Western Blot	28
5.9.1	Acrylamidgele	28
5.9.2	Durchführung.....	31
5.9.2.1	Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
5.9.2.2	Transfer (Semidry Blotting Methode)	33
5.9.2.3	Färbung	33
5.9.2.4	Blockieren.....	34
5.9.2.5	Antikörper Inkubation.....	34
5.9.2.6	Messung und Auswertung mit Li-COR.....	35
5.10	MTT-Assay	35
5.11	Statistische Auswertung	36
6	Resultate	37
6.1	Konzentrationsabhängige Hemmung	37
6.1.1	A375	37
6.1.2	518a2.....	41
6.1.3	WM35	45
6.1.4	WM278	49
6.2	Zeitabhängige Stimulation bzw. Hemmung	52
6.2.1	Behandlung mit OSM und BAY293 nach 60 Minuten Inkubationszeit	53
6.2.1.1	A375	53
6.2.1.2	518a2.....	55
6.2.1.3	WM35	57
6.2.1.4	WM278	59
6.2.2	Behandlung mit IL6 und BAY293 nach 60 Minuten Inkubationszeit	61
6.2.2.1	A375	61
6.2.2.2	518a2.....	63
6.2.2.3	WM35	65
6.2.2.4	WM278	67
6.2.3	Zeitabhängige Stimulation bzw. Hemmung durch OSM bzw. BAY293.....	69
6.2.3.1	A375	70
6.2.3.2	518a2.....	72
6.2.3.3	WM35	74
6.2.3.4	WM278	77
6.2.4	Zeitabhängige Stimulation bzw. Hemmung durch IL6 bzw. BAY293	79
6.2.4.1	A375	79
6.2.4.2	518a2.....	81

6.2.4.3	WM35.....	84
6.2.4.4	WM278.....	86
6.3	Viabilität (MTT-Assay)	88
6.3.1	Viabilität nach 24 Stunden Inkubationszeit.....	88
6.3.2	Viabilität nach 48 Stunden Inkubationszeit.....	93
7	Diskussion.....	97
7.1	Zeitabhängige Stimulation bzw. Hemmung des MAPK- und des JAK/STAT3-Signalwegs durch IL6/OSM/BAY293 nach 30, 60 und 120 Minuten	97
7.1.1	Auswirkungen auf die Zellen durch exogenes IL6.....	97
7.1.1.1	Phosphorylierung von ERK1/2.....	97
7.1.1.2	Phosphorylierung von STAT3.....	98
7.1.2	Auswirkungen auf die Zellen durch exogenes OSM	98
7.1.2.1	Phosphorylierung von ERK1/2.....	98
7.1.2.2	Phosphorylierung von STAT3.....	99
7.1.2.3	Vergleiche von den Auswirkungen der Zytokine auf die Zellen in Abhängigkeit ihrer Wachstumsphase	100
7.1.2.3.1	Frühe Wachstumsphase	100
7.1.2.3.2	Metastasierte Zellen.....	100
7.1.3	Auswirkungen auf die Zellen durch BAY293 nach kurzer Expositionszeit	101
7.1.3.1	Phosphorylierung von ERK1/2.....	101
7.1.3.2	Phosphorylierung von STAT3.....	101
7.1.3.3	Auswirkungen auf die Signalwege und Unterschiede zwischen den Zelllinien nach der Behandlung mit dem SOS1-RAS Interaktionsinhibitor BAY293 in Abhängigkeit des Stadiums 101	
7.1.3.3.1	Frühe Wachstumsphase	102
7.1.3.3.2	Metastasierte Zellen.....	102
7.2	Konzentrationsabhängige Hemmung durch BAY293 nach 24 Stunden	102
7.2.1	Phosphorylierung von ERK1/2.....	102
7.2.2	Phosphorylierung von STAT3.....	103
7.2.3	Phosphorylierung von p38	103
7.2.4	Phosphorylierung von AKT	103
7.2.5	Auswirkungen auf die Signalwege nach der Behandlung mit dem SOS1-RAS Interaktionsinhibitor BAY293	104
7.2.5.1	Frühe Wachstumsphase	104
7.2.5.2	Metastasierte Zellen	104
7.3	Viabilität.....	105
7.3.1	Beeinflussung der Viabilität nach Behandlung mit IL6, OSM und BAY293 in Abhängigkeit des Stadiums der humanen Melanomzellen	105
7.3.1.1	Frühe Wachstumsphase	105
7.3.1.2	Metastasierte Zellen	106
7.4	Limitierungen	106
7.4.1	Western Blot	106
7.4.2	Viabilität	107

7.5	Konklusion.....	108
8	Abkürzungen.....	109
9	Abbildungsverzeichnis.....	111
10	Tabellenverzeichnis.....	124
11	Referenzen	125

1 ZUSAMMENFASSUNG

Beim malignen Melanom handelt es sich um eine sehr aggressive Form von Hautkrebs, welcher nach erfolgter Metastasierung kaum heilbar ist. Die Inzidenz des malignen Melanoms nimmt stetig zu, jedoch steigt die Überlebensrate dank neuerer Therapiemöglichkeiten. Die Ursachen sind genetisch oder durch exogene Faktoren, wie zum Beispiel UV-Strahlen, bedingt. Wichtige Signalwege in den Melanomzellen sind unter anderem der MAPK-, der JAK/STAT-, der PI3K/AKT- und der p38-Signalweg. Diese Signalwege sollen durch die beiden Zytokine, Interleukin 6 und Oncostatin M, aktiviert werden. Der Inhibitor BAY293 hemmt die Interaktion zwischen SOS und dem Protoonkogen Ras und somit auch die nachgeschaltete Signalkaskade des MAPK-Signalwegs.

Es wurden mittels Western Blot- Analyse und MTT-Assay die Auswirkungen durch die Behandlungen mit den beiden Zytokinen und dem Inhibitor (wie zuvor erwähnt) auf vier verschiedene humane Melanomzelllinien unterschiedlicher Wachstumsphase untersucht. Die Zelllinien weisen alle ein B-RAF (V600E) Mutation auf. Die beiden Zelllinien, A375 und 518a2 stammen von metastasierten Melanomen, wohingegen die Zelllinien WM35 aus radialem und WM278 aus vertikalem Wachstum isoliert wurden.

Interleukin 6 stimuliert die ERK_{1/2}-Phosphorylierung in allen untersuchten Zelllinien und das Zytokin zeigte in diesen Zellen eher eine hemmende Wirkung auf den JAK/STAT₃-Signalweg. Durch OSM wird nicht in allen Zelllinien eine Stimulation der ERK_{1/2}-Phosphorylierung beobachtet, sondern teilweise sogar Hemmungen dieses Signalweges. Der JAK/STAT₃-Signalweg wird in allen Zelllinien, außer in WM278, durch OSM gehemmt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es einige Hinweise auf ein „biased signalling“ (eine „Kommunikation“) zwischen den Signalwegen (JAK/STAT₃ aber auch p38 und PI3K/AKT) gibt. Die Viabilität kann durch die Behandlungen mit den Zytokinen ebenfalls beeinflusst werden und durch BAY293 allein eher weniger.

2 ABSTRACT

The malignant melanoma is a very aggressive form of skin cancer that is virtually incurable once it has metastasized. The incidence of malignant melanoma is steadily increasing, but the survival rate is rising thanks to newer therapy options. The causes are genetic or due to exogenous factors, such as UV radiation. Important signaling pathways in melanoma cells include the MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT, and p38 signaling pathway. These signaling pathways are thought to be activated by the two cytokines, interleukin 6 and oncostatin M. The inhibitor BAY293 inhibits the interaction between SOS and the protooncogene Ras and therefore also the downstream signaling cascade of the MAPK pathway.

The effects of the treatments with the two cytokines and the inhibitor (mentioned before) on four different cell lines of different growth phase were investigated by Western blot analysis and MTT assay. The cell lines all have a B-RAF (V600E) mutation. The two cell lines, A375 and 518a2 were derived from metastatic melanoma, whereas cell lines WM35 were isolated from radial growth and WM278 from vertical growth.

Interleukin 6 stimulates ERK_{1/2} phosphorylation in all cell lines and the cytokine tended to show an inhibitory effect on the JAK/STAT₃ pathway in these cells. Stimulation of ERK_{1/2} phosphorylation is not observed by OSM in all cell lines, but in some cases inhibition of this pathway is observed. The JAK/STAT₃ pathway is inhibited by OSM in all cell lines except WM278.

In summary, there is some evidence of biased signaling (a "communication") between the signaling pathways (JAK/STAT₃ but also p38 and PI3K/AKT). Viability may also be affected by the treatments with the cytokines and rather less with BAY293 alone.

3 EINLEITUNG

3.1 Melanom

Das maligne Melanom ist die häufigste Form von Krebs und ist jene Art von Hautkrebs, die auch am häufigsten zum Tod führt. (Guy et al., 2015) Beim Hautkrebs handelt es sich um eine Art von Krebs der Pigmentzellen der Haut, der unter anderem durch ultraviolette Strahlung aus dem Sonnenlicht oder auch durch künstliche UV-Strahlen (wie zum Beispiel Solarien) verursacht werden kann. (Whiteman, Green, & Olsen, 2016) Das Melanom ist eine gefährliche Krebsart mit einem hohen Potential zur Metastasierung. Eine frühzeitige Erkennung ist entscheidend, um die negativen Auswirkungen auf die Patienten zu verringern. Das maligne Melanom tritt hauptsächlich in den Melanozyten der Haut auf, kann aber, wenn auch seltener, in anderen Körperregionen vorkommen, wie zum Beispiel auf den Schleimhäuten, der Uvea und den Hirnhäuten. Das Melanom macht zirka 5% der bösartigen Erkrankungen der Haut aus. (Roccuzzo et al., 2023)

3.1.1 Häufigkeit

In den vergangenen Jahrzehnten ist die Inzidenz von Melanomen vor allem in den Bevölkerungsgruppen mit eher hellerem Hautton stetig gestiegen. (Whiteman, Green, & Olsen, 2016)

Es sind vorwiegend Menschen zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr davon betroffen, wobei jedoch Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Etwa 85% der jährlich neu auftretenden Hautmelanome betreffen die Bevölkerungsgruppen in Nordamerika, Europa und Ozeanien. Derzeit gibt es schätzungsweise 132.000 neue Fälle weltweit pro Jahr und etwa 58.000 Todesfälle. Parallel zu den steigenden Inzidenzraten ist auch die Sterblichkeitsrate in den meisten Teilen der Welt gestiegen, jedoch wurde die Therapie des nicht behandelbaren Melanoms im Stadium III und IV in jüngster Zeit durch Immuntherapien und zielgerichtete Therapien revolutioniert. Daraus resultiert eine verbesserte Überlebensrate im Vergleich zu früheren Chemotherapien bei Hautkrebs. (Roccuzzo et al., 2023)

3.1.2 Risikofaktoren

Das maligne Melanom ist ein sehr aggressiver Hautkrebs. Schätzungsweise sind 5 bis 10 Prozent der zugrunde liegenden Mutationen erblich und für das familiäre (oder eben auch erbliche) Melanom verantwortlich. Diese Patienten neigen zu einer frühen Entwicklung des schwarzen Hautkrebses und einem höheren Risiko für multiple Melanome. Das Melanom hat eine multifaktorielle Ätiologie, da seine Entstehung aus dem Zusammenspiel von intrinsischen und extrinsischen Risikofaktoren hervorgeht. Zu den intrinsischen (oder konstitutionellen) Risikofaktoren gehören die positive persönliche und/oder familiäre Vorgeschichte, Immunsuppression, Rasse, Phototyp, das Vorhandensein vieler und atypischer Nävi sowie auch genetische Mutationen, die für familiäre Häufungen von Melanomen verantwortlich sind. (Roccuzzo et al., 2023) Personen mit hellem Haar und heller Haut haben ein höheres Risiko an Hautkrebs zu erkranken. Außerdem sind eine große Anzahl von Muttermalen sowie atypische Muttermale die wichtigsten bisher gefundenen Risikofaktoren. (Bataille et al., 1996)

Der wichtigste extrinsische Risikofaktor ist, wie zuvor bereits erwähnt, die Exposition gegenüber natürlichen oder künstlichen Quellen von ultravioletter Strahlung aufgrund ihrer genotoxischen Wirkung. (Roccuzzo et al., 2023)

3.1.2.1 BRAF-Mutation

Die BRAF-Mutationen kommen beim malignen Melanom am häufigsten vor. Dies scheint aber nicht mit den Auswirkungen von ultraviolettem Licht, dem einzigen bekannten Umweltrisikofaktor für diese Krankheit, zusammenzuhängen. Die Tatsache, dass ein wichtiger Melanozyten-spezifischer Signalweg, der die Proliferation und Differenzierung steuert, durch die Aktivierung von BRAF funktioniert und dass dieses Gen in den meisten Melanomen mutiert ist, bietet eine mögliche Erklärung für die hohe Häufigkeit von BRAF-Mutationen in Melanomen im Vergleich zu anderen Krebsarten. (Davies et al., 2002)

Bei der BRAF^{V600E} wird die Aminosäure Valin im Codon 600 zu Glutaminsäure ausgetauscht. (Hummel et al., 2021)

3.1.3 Diagnose

In den letzten Jahren wurde durch systematische Sequenzierung von Melanomen eine zunehmende Anzahl von Genen identifiziert, die mit einem erhöhten genetischen Risiko einhergehen. Obwohl die endgültige Diagnose des Melanoms auf histopathologischen Kriterien beruht, basiert der erste Ansatz auf der dermatoskopischen Beurteilung. (Rocuzzo et al., 2023)

3.1.4 Therapiemöglichkeiten

Melanome treten immer häufiger auf und sind mittlerweile gut behandelbar bzw. heilbar, unter der Voraussetzung, dass sie früh genug erkannt werden. Das fortgeschrittene Melanom allerdings ist durch sein Potential zur Metastasierung und eine mittlere Überlebenszeit von weniger als 10 Monaten charakterisiert. In den letzten Jahren wurden jedoch große Fortschritte in Bezug auf das Verständnis der molekularen Zusammenhänge zwischen Melanom und der Interaktion mit dem Immunsystem gemacht. Diese Fortschritte haben zu mehreren neuen therapeutischen Strategien geführt, die einen erheblichen klinischen Nutzen zeigen. Die derzeitigen therapeutischen Ansätze umfassen die chirurgische Entfernung des Melanoms, Chemotherapie, Immuntherapie und zielgerichtete Therapie. Interleukin-2, Dacarbazin, Ipilimumab und Vemurafenib sind für die Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms zugelassen. Darüber hinaus erweisen sich neue Chemotherapie-Kombinationen, monoklonale Antikörper, die den Weg des programmierten Zelltodes (PD-1) / PD-Ligand 1 blockieren, und gezielte Therapien gegen CKIT oder mitogen-aktiviertes Protein (MEK) und andere mögliche Signalwege beim Melanom in frühen klinischen Versuchen als vielversprechend. (Batus et al., 2013)

Eine Phase III Studie aus dem Jahr 2022 zeigte, dass verbesserte klinische Ergebnisse mit der Kombination von Nivolumab und Ipilimumab anstatt Ipilimumab allein oder Nivolumab allein bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom erzielt werden. Der primäre Endpunkt dieser Studie war das Gesamtüberleben der Patienten. Die Forschungsgruppe fand heraus, dass diese Kombination eine sichere und effektive Behandlung für Patienten mit unbehandeltem fortgeschrittenem Melanom ist. (Wolchok et al., 2022) Die Kombination von Relatlimab und Nivolumab soll das

progressionsfreie Überleben der Patienten mit zuvor unbehandeltem fortgeschrittenem Melanom verlängern, im Vergleich zur Behandlung mit Nivolumab allein. Die Autoren fanden heraus, dass diese Kombination ebenfalls eine sichere und effektive Behandlung für Patienten mit fortgeschrittenem Melanom sei. (Tawbi et al., 2022) Eine weitere klinische Phase III Studie untersuchte den Unterschied zwischen neoadjuvanter (vor der Operation) und adjuvanter (nach der Operation) Gabe von Pembrolizumab im Vergleich zu adjuvanter Gabe von Pembrolizumab. Die Resultate dieser Studie zeigten, dass die Therapie mit neoadjuvante-adjuvante Pembrolizumab dem adjuvanten alleinigen Pembrolizumab überlegen war. (Patel et al., 2023)

Wie bereits erwähnt gab es in den letzten Jahren einige Fortschritte in der systemischen Therapie des Melanoms. Vemurafenib, Dabrafenib und Trametinib, sowie Immuntherapeutika wie Pembrolizumab und Nivolumab wurden nach und nach in die klinische Praxis eingeführt. (Mou & Tan, 2023) Die Tumordicke nach Breslow und das Stadium der Erkrankung sind zwei wichtige Kriterien zur Beurteilung der Prognose des Patienten. (Breslow, 1970)

3.1.5 Prognosen

Als Hautkrebs mit der höchsten Sterblichkeitsrate hängt die Diagnose, Behandlung und Prognose vom Melanom wesentlich von einer genauen Tumoreinstufung ab. Die Unterscheidung zwischen Tumoren im Frühstadium (Stadium I und II) und im Spätstadium (ab Stadium III) hängt in erster Linie davon ab, ob bei den Patienten lymphatische Metastasen vorhanden oder nicht vorhanden sind. Das Melanom ist durch eine ausgeprägte Malignität gekennzeichnet und neigt zu einer frühen Ausbildung von lymphatischen und hämatogenen Metastasen, wodurch es nach einer Metastasierung praktisch unheilbar ist. (Mou & Tan, 2023)

Eine häufige Eigenschaft von Melanomen ist, dass sie im Vergleich zu anderen Krebsarten sehr starke Metastasen im Gehirn bilden. Ein Großteil der Patienten des Spätstadiums weisen solche Metastasen im zentralen Nervensystem auf. (Rigg et al., 2023)

In Europa steigt allerdings die Überlebensrate von Patienten mit Hautkrebs. (Crocetti et al., 2015)

3.2 Signalwege

3.2.1 IL6 bzw. Oncostatin M vermittelte Signalwege

Oncostatin M (OSM) ist ein Glykoprotein, welches von aktivierten Monozyten und T-Lymphozyten gebildet wird. OSM soll das Wachstum von Melanomen und anderen Tumoren hemmen (Rose & Bruce, 1991) und es gehört zu der IL6-Familie und ist ebenso ein Zytokin. (Hergovits et al., 2017) Die Mitglieder der IL-6-Familie nutzen das Glykoprotein 130 (gp130) für die Signaltransduktion. Der Rezeptor für OSM besteht aus gp130 und OSMR. (Ikeda et al., 2009)

In Abbildung 1 ist der OSM-Rezeptor, sein Ligand und sein nachgeschalteter Signalweg zu sehen.

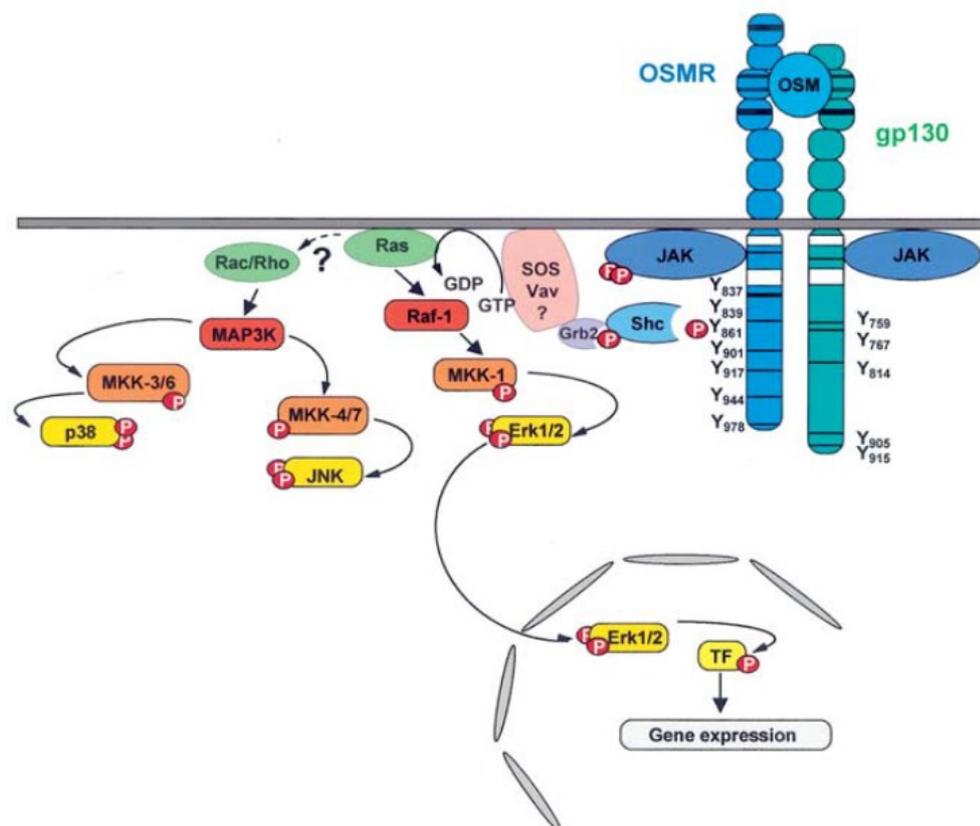


Abbildung 1: Aktivierung der MAPK Kaskade via OSM-Rezeptor (Heinrich et al., 2003)

IL6 ist Teil der IL6-like Zytokinfamilie, zu der auch IL-11, der leukozytenhemmende Faktor, Oncostatin M, der ziliare neurotrophe Faktor und Cardiotrophin 1 gehören. Das Zytokin IL-6 ist ein wichtiger Akteur bei Entzündungsprozessen. Es hat sich gezeigt, dass fast 50 % der metastasierenden Melanome IL-6 mRNA exprimieren und IL-6 sezernieren, was zur Folge hat, dass eine Proliferation in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren ermöglicht wird. (Minichsdorfer et al., 2015) Interleukin 6 und IL6-like Zytokine aktivieren den gp130/Jak/STAT-Signalweg. (Siewert et al., 1999) Darüber hinaus wurde überprüft, dass die Dysregulation des Interleukin-6-vermittelten JAK/STAT₃-Signalwegs in engem Zusammenhang mit der Entwicklung verschiedener solider Tumoren steht. (Wang & Sun, 2014) Der Serumspiegel von Interleukin (IL)-6 ist also ein prognostischer Faktor bei Melanomen. (Minichsdorfer et al., 2015) Hohe IL6-Werte sind eine Vorhersage für ein verkürztes Überleben bei Patienten mit metastasiertem Melanom (Soubrane et al., 2005) und auch für eine hohe Tumorlast. (Mouawad et al., 1996) Interleukin-6 hemmt das Wachstum von Melanomzellen des frühen Stadiums, jedoch nicht jenes von den metastasierenden Zellen. Genauer gesagt wird das Wachstum von nicht transformierten Melanozyten und Melanomen im Frühstadium gehemmt, während metastasierende Melanomzellen gegen die antiproliferative Wirkung von IL6 resistent sind. Die Hälfte der metastatischen Melanome exprimiert die mRNA für IL6 und sezernieren es selbst, daraus folgt eine Proliferation ohne die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren. (Minichsdorfer et al., 2015)

In Abbildung 2 ist der IL6-Rezeptor mit seinem Liganden (IL6) und die beiden nachgeschalteten Signalwege (MAPK und JAK/STAT₃) zu sehen.

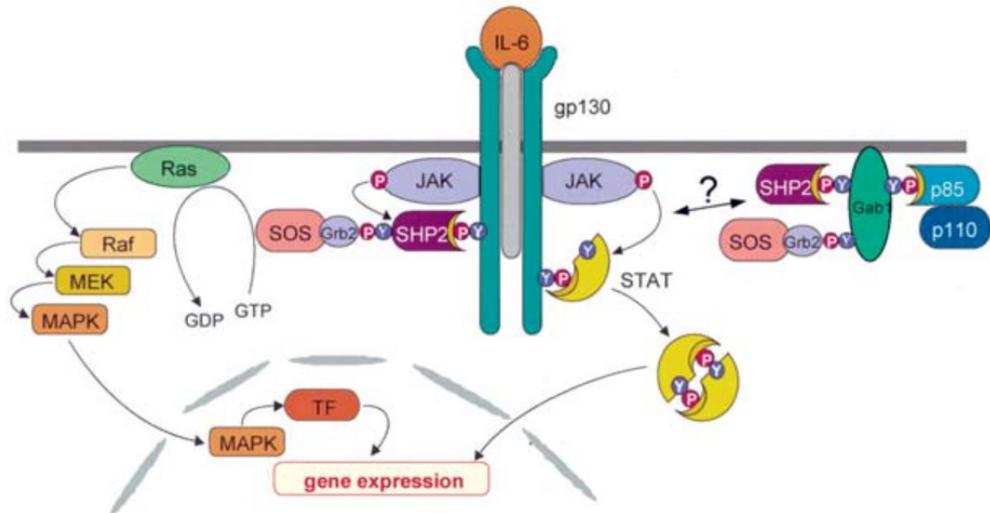


Abbildung 2: IL6 aktiviert den JAK/STAT-Signalweg und die MAPK Kaskade (Heinrich et al., 2003)

Der IL6-GP130-JAK-STAT₃-Signalweg liefert einen wichtigen Beitrag zu entzündungsbedingten Krebserkrankungen. Dies führt dazu, dass diese Signalkaskade zu einem attraktiven Ziel für die Behandlung und/oder Verhinderung von Entzündungen, die das Fortschreiten von Krebs begünstigen, wird. (Yu, Pardoll, & Jove, 2009)

3.2.1.1 MAP-Kinase-Signalweg

Der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalweg (MAPK/ERK) wird durch ein extrazelluläres Signal reguliert und er umfasst die SOS1-, RAS-, RAF-, MEK- und ERK-Proteine. Der MAPK-Signalweg koppelt extrazelluläre Wachstumsfaktorsignale von Rezeptor-Tyrosinkinase an intrazelluläre Reaktionen und moduliert die Zellproliferation und das Überleben der Zellen. Es hat sich gezeigt, dass Mutationen in den Komponenten dieses Signalweges als onkogene Triebkräfte in vielen menschlichen Krebsarten dienen. (Rasco et al., 2023)

3.2.1.1.1 SOS1-Ras Interaktionsinhibitor (BAY293)

Die Verbindung BAY293 hemmt selektiv die Interaktion zwischen KRAS und SOS1. (Hillig et al., 2019) Die Ergebnisse einer Studie von 2022 zeigen, dass BAY293 in Kombination mit Modulatoren der Glukoseverwertung, Inhibitoren des nachgeschalteten MAPK-Signalwegs und verschiedenen Chemotherapeutika in

Abhängigkeit vom spezifischen KRAS-Status der humanen Pankreaskrebs-Zelllinien (BxPC3, MIA PaCa-2 und AsPC-1) synergistisch wirkt. (Plangger et al., 2022)

Auch die Untersuchungen derselben Erstautorin im vorherigen Jahr zeigten synergistische Effekte in Kombinationen mit anderen Arzneistoffen in Lungenkrebszellen (NCI-H23 und Osimertinib-resistente Lungenkrebs-Zelllinie). Diese Studie wurde durchgeführt, um einen maximalen synergistischen Effekt von BAY293 in Kombinationen mit anderen Arzneistoffen zu beschreiben. (Plangger et al., 2021)

Der Inhibitor BAY293 wurde in mehreren Untersuchungen als wertvolle Verbindung beschrieben und zeigt, wie bereits erwähnt, einen synergistischen Effekt in Kombination mit anderen Arzneimitteln, wie zum Beispiel Trametinib (MEK_{1/2} Inhibitor), auch Rapamycin (mTOR-Inhibitor) und anderen Chemotherapeutika. Jedoch ist der klinische Einsatz dieses Inhibitors noch nicht ausgereift, da die Dosis durch die Schädigung von gesundem Gewebe begrenzt sein kann. Die Studie „Cytotoxicity of combinations of the pan-KRAS inhibitor BAY-293 against primary non-small lung cancer cells“ vom Jahr 2021 untersuchte deshalb viele Kombinationen mit BAY293 in Lungenkrebszellen, um einen maximalen synergistischen Effekt zu finden. (Plangger et al., 2021)

In Abbildung 3 ist eine vereinfachte Darstellung des MAPK-Signalweges dargestellt. Anders als in Abbildung 2 wird hier die SOS-Ras Interaktion nicht gezeigt.

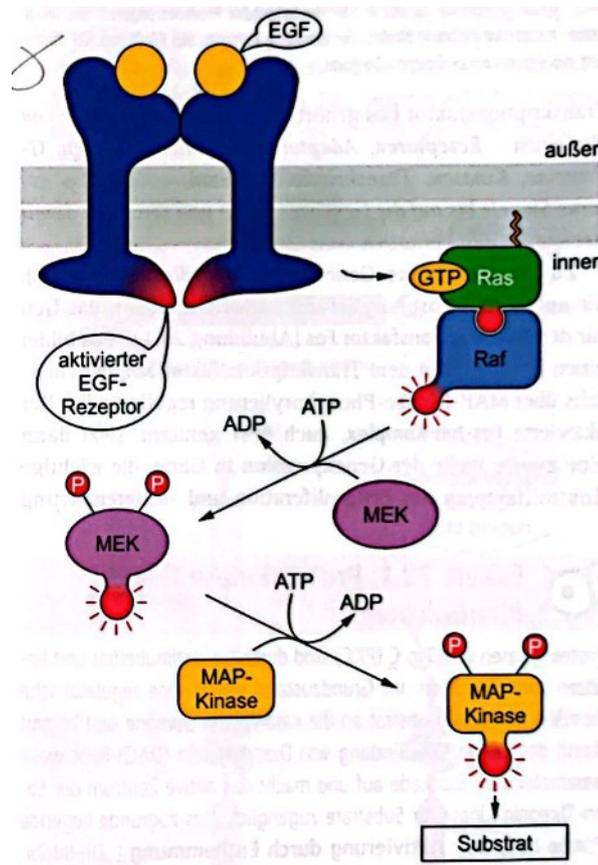


Abbildung 3: MAP-Kinase-Signalweg (Müller-Esterl, 2018)

3.2.1.2 JAK-STAT-Signalweg

Die STAT-Familie (Signal Transducers and Activators of Transcription) von Transkriptionsfaktoren stellt einen Signalweg dar, der aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Komplexe mit dem Zellkern für die Regulierung der Transkription verbindet. (Campbell et al., 1995)

Hämatopoetische Zytokine, darunter Interleukin-3, Interleukin-6 und der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), induzieren die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Zellen der hämatopoetischen Linie. Diese Zytokine aktivieren den JAK/STAT-vermittelten Signalweg, der für die biologischen Aktivitäten dieser Zytokine wichtig ist. (Matsuda & Hirano, 1994)

Obwohl alle STATs einem ähnlichen molekularen Aktivierungsweg folgen, weisen STAT1, STAT2, STAT4 und STAT6 spezifische biologische Profile auf, die mit einem begrenzteren Aktivierungsmuster durch Zytokine verbunden sind. STAT3 und

STAT5A sowie STAT5B haben pleiotrope Funktionen im Körper und können als kritische Onkogene fungieren, die viele an der Krebsentwicklung beteiligte Prozesse fördern. STAT1, STAT3 und STAT5 haben auch eine tumorsuppressive Wirkung bei bestimmten Mutationen und Krebsarten. (Erdogan et al., 2022)

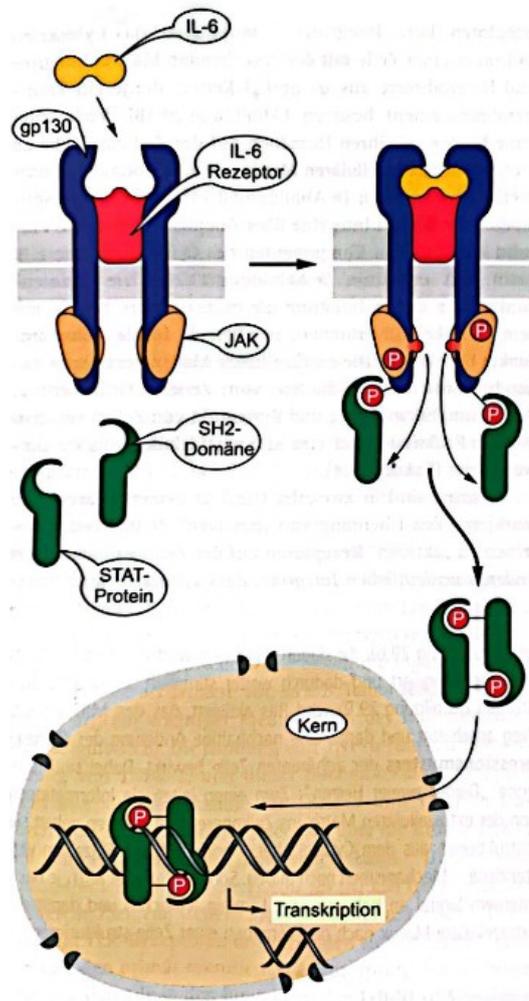


Abbildung 4: JAK-STAT-Signalweg (Müller-Esterl, 2018)

3.2.1.3 P38-Signalweg

P38 ist eine Untergruppe der sogenannten MAP-Kinasen (mitogen aktivierte Protein-Kinasen). Diese Kinase wird durch verschiedene Stressfaktoren aktiviert und spielt bei den Entzündungsreaktionen eine Schlüsselrolle. (Zhang et al., 1995)

Eine Dysregulation geht unter anderem mit Krebs und chronischen Entzündungen einher. (Barata & Dick, 2020)

In einer Übersichtsarbeit wurde beschrieben, dass einige Studien gezeigt haben, dass die JNK- und p38-MAPK-Signalwege hauptsächlich mit Stress und Apoptose von Zellen assoziiert sind, während der ERK/MAPK-Signalweg mit der Zellproliferation und -differenzierung zusammenhängt. (Guo et al., 2020)

3.2.1.4 AKT-Signalweg

AKT ist ein Protoonkogen und kodiert eine Serin-Threonin-Proteinkinase, die durch Wachstumsfaktoren über die Phosphatidyl- Inositol-3*-Kinase (PI3-K) aktiviert wird. AKT ist ein direktes Target von PI3-K. (Datta et al., 1996)

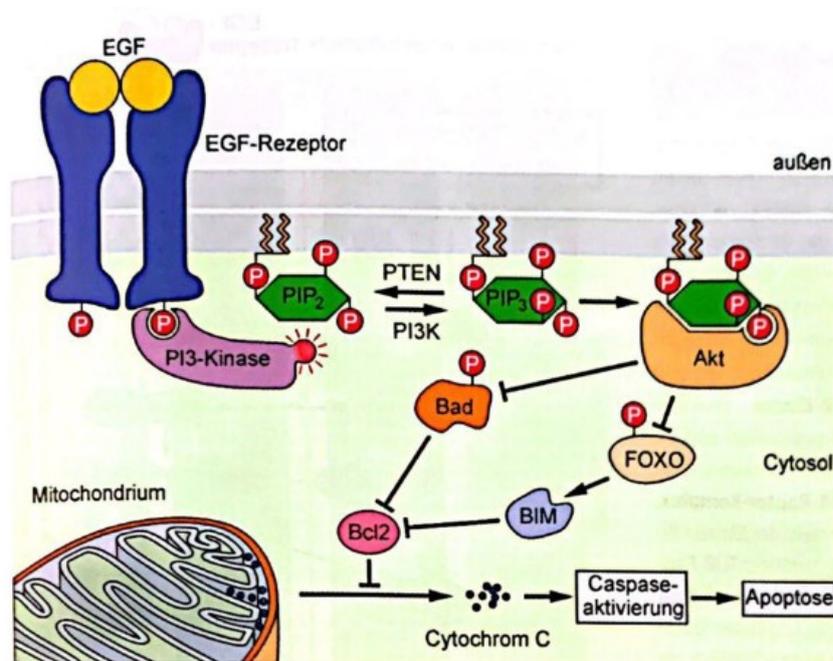


Abbildung 5: PI3-Kinase-Signalweg (Müller-Esterl, 2018)

4 ZIELE

Melanompatienten, die einen erhöhten IL-6 Plasmaspiegel aufweisen, haben eine eher ungünstigere Prognose, denn das Überleben dieser Patienten ist reduziert. (Soubrane et al., 2005) Humane Melanomzellen setzen sogar in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsphase Interleukin-6 frei, insbesondere die metastatischen Melanomzellen. In vitro konnte gezeigt werden, dass Interleukin-6 in Melanomzellen des Frühstadiums als Wachstumsinhibitor und in der Spätphase als Stimulator fungiert. (Minichsdorfer et al., 2015) Aus diesen Vorkenntnissen ergaben sich drei wichtige Zielsetzungen:

1. Das Zytokin Interleukin-6 und sein Familienverwandter Oncostatin M (OSM) sollen auf nachgeschaltete Signalwege in humanen Melanomzellen unterschiedlicher Stadien (frühe Wachstumsphase: WM278, WM35; metastatisches Stadium: A375, 518a2) verglichen werden und bezüglich der Aktivierung des JAK/STAT₃-, MAPKinase- Signalwegs untersucht werden.
2. Der SOS1-RAS Interaktionsinhibitor BAY293 sollte einen Teil des MAPK-Signalwegs blockieren, wodurch die Frage im Raum steht, ob dadurch die verbliebenen Signalwege (JAK/STAT₃-, PI3Kinase- und p38-Signalweg) verstärkt werden („biased signalling“).
3. Zuletzt soll geklärt werden, ob die Viabilität durch Interleukin-6 oder Oncostatin M in der Kombination mit BAY293 stadienabhängig in humanen Melanomzellen beeinflusst wird.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Substanzen

BAY293: Aobious a new experience, Katalognummer: AOB17686, CSA Nummer: 2244904-70-7

Chemische Bezeichnung: (R)-6,7-Dimethoxy-2-methyl-N-(1-(4-(2-((methylamino)methyl)phenyl)thiophen-2-yl)ethyl)quinazolin-4-amin, Molekulargewicht 448,59 kDa

Oncostatin M (209aa): human, rekombinant in E. Coli exprimiert, Sigma-Aldrich™, Produktnummer SRP3130, Molekulargewicht 23,9 kDa, Lyophilisat, Lagerung bei -20°C

Humanes Interleukin 6: PeproTech®, Katalognummer 200-06-20ug

5.2 Antikörper

5.2.1 Primäre Antikörper

5.2.1.1 ERK1/2

p44/42 MAPK (Erk_{1/2}) Antikörper #9102, Cell Signalling Technology®, Molekulargewicht 44/42 kDa, Anti-Kaninchen

5.2.1.2 Phospho ERK1/2

Phospho-p44/42 MAPK (Erk_{1/2}) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4)E XP® Antikörper #4370, Cell Signalling Technology®, Molekulargewicht 44/42 kDa, Anti-Kaninchen

5.2.1.3 STAT3

STAT₃ (D3Z2G) Antikörper #12640, Cell Signalling Technology®, Molekulargewicht 86/79 kDa, Anti-Kaninchen

5.2.1.4 Phospho STAT3

Phospho-STAT₃ (Tyr705) (D3A7) XP® Antikörper #9145, Cell Signalling Technology®, Molekulargewicht 86/79 kDa, Anti-Kaninchen

5.2.1.5 p38

p38 MAPK-Antikörper #9212S, Cell Signalling Technology®, Molekulargewicht 40 kDa, Anti-Kaninchen

5.2.1.6 Phospho p38

Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP® Antikörper #4511, Cell Signalling Technology®, Molekulargewicht 43 kDa, Anti-Kaninchen

5.2.1.7 AKT

Akt Antikörper #9272, Cell Signalling Technology®, Molekulargewicht 60 kDa, Anti-Kaninchen

5.2.1.8 Phospho AKT

Phospho-Akt (Ser473) Antikörper #9271, Cell Signalling Technology®, Molekulargewicht 60 kDa, Anti-Kaninchen

5.2.2 Sekundärer Antikörper

Anti-Kaninchen IgG Antikörper #7074S HRP (engl.: horse raddish peroxidase) gekoppelt, Cell Signalling Technology®

5.3 Puffer

5.3.1 RIPA-Puffer (Lyse-Puffer)

Tabelle 1: RIPA-Puffer

RIPA-Puffer (neuer IP-Puffer)
50 mM Tris-HCl, pH=8.0 (5 ml 1M Tris-HCl, pH=8.0)
150 mM NaCl (876.6 mg)
0.1% SDS (1 ml 10% SDS)
1% NP-40 (1 ml)
10 mM Glycerolphosphate (<i>disodium salt hydrate, by Helmuth</i>) (216.04 mg)
Σ 100 ml M.Q.

Tabelle 2: Sample Puffer

4x Sample Puffer
60 mM Tris, pH= 6.8 (1.2 ml 0.5 M Tris)
14.4 mM Mercaptoethanol (0.5 ml)

25% Glycerin (5 ml 50% Glycerin)
2% SDS (2 ml 10% SDS)
0.1% Bromphenolblau (1 ml 1% Bromphenolblau)

5.3.2 Laufpuffer

Tabelle 2: Laufpuffer

10 x Laufpuffer
250 mM Tris (30,29g)
1.92 M Glycin (144,13g)
10 mM EDTA.Na ₂ (3,72g)
1 % SDS (10,0g)
Σ 1 l M.Q.
pH: 8.3

5.3.3 Semidry-Transfer-Puffer

Tabelle 3: Semidry-Transfer-Puffer

1 x Semidry-Transfer-Puffer
25 mM Tris (3,028g)
150 mM Glycin (11,26g)
10% Methanol (100ml)
Σ 1 l M.Q.
pH 8,3

5.3.4 Stripping-Puffer

Tabelle 4: Milder Stripping-Puffer für Western Blot Membranen (Nitrocellulose)

Milder Stripping-Puffer
Glycin (7,5g)
SDS (0,5g)
Tween 20 (5ml)
Σ 500ml MQ, pH= 2,2

Tabelle 5: Stripping-Puffer für Western Blot Membranen (Nitrocellulose) unter härteren Bedingungen. Da 2-Mercaptoethanol enthalten ist, wurde der gesamte Herstellungsprozess und das Strippen der Membranen unter einem Abzug durchgeführt

Stripping-Puffer (härtere Bedingungen)
10%iges SDS (20ml)
0,5M Tris HCl (12,5ml), pH= 6,8
2-Mercaptoethanol 0,8ml
Σ 100ml MQ

5.4 Weitere Lösungen

Tabelle 6: 10x TBS

10x TBS
0.2 M Tris (24.22 g)
1.5 M NaCl (87.66 g)
Σ 1 l M.Q., pH= 7.6

Tabelle 7: 1x TBST

1x TBST

10x TBS (200ml)
TWEEN 20 (2ml)
Σ 2 l M.Q.

Tabelle 8: 5% BSA-Lösung für das Blockieren der Nitrocellulose Membranen

5% BSA-Lösung
5% BSA (10g)
Σ 200ml TBST

Tabelle 9: 2% BSA-Lösung (in TBST) zum Verdünnen für die ersten (1:1000) und den zweiten (1:2000) Antikörper

2% BSA-Lösung
2% BSA (4g)
Σ 200ml TBST

5.5 Geräte

Inkubator: BINDER CB220 CO₂-Inkubator, BINDER GmbH

Elektrophorese: Bio-Rad PowerPac 1000 Electrophoresis Power Supply und Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc

Trasferkasette: Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad Laboratories, Inc

Blot Scanner: C-DiGit Blot Scanner, Li-COR Biosciences GmbH

Photometer: Victor3V Multilabel Plate Reader, PerkinElmer

Zentrifugen: Sigma 1-16K und 3-30KS, Sigma Laborzentrifugen GmbH

Thermomixer: Eppendorf® Thermomixer® comfort, Eppendorf AG

Vortex: Bender & Hobein GmbH

5.6 Zelllinien

Tabelle 10: Zelllinien und deren Eigenschaften bzw. Herkunft

Zelllinie	Gewebe	Mutation	Herkunft
A375	Humane metastasierende Melanomzellen	B-RAF (V600E)	Institut für Krebsforschung; Medizinische Universität Wien; Prof. Dr. Walter Berger
518a2	Humane metastasierende Melanomzellen	B-RAF (V600E)	Prof. Dr.- Edgar Selzer, Klinik für Strahlentherapie, AKH Wien
WM35	Humane Melanomzellen aus radial stammendem Wachstum	B-RAF (V600E)	Coriell Institut (WC00060)

WM278	Humane Melanomzellen aus vertikal stammendem Wachstum	B-RAF (V600E)	Coriell Institut (WC00054)
--------------	---	---------------	----------------------------

5.7 Zellkultur

5.7.1 Medien

Die Zelllinien, die für die einzelnen Experimente verwendet wurden, wurden in 75cm² Kulturflaschen in einem Inkubator von BINDER bei 37°C, 20% [Vol.-%] O₂, 5% [Vol.-%] CO₂ und bei einer Luftfeuchtigkeit von rund 70% [%rH] herangezüchtet. Für die A375 und die 518a2 Zelllinien wurde das Medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12 (DMEM/Ham's F-12) von Capricorn Scientific mit L-Glutamin von Sigma[®] verwendet und mit 10% FBS (fetales Kälberserum) von Eximus the choice of science (Cat.: BS-2022-500, Lot.: BSS0418) und 1% Penicillin-Streptomycin (P/S, enthält 10,000 units Penicillin und 10mg Streptomycin/mL) von SIGMA-ALDRICH (Lot.: 0000139996) ergänzt. wurden noch hinzugefügt). Die beiden WM-Zelllinien, WM35 und WM278, wurden in einem Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose (Sigma Life Science) und Ham's Nutrient Mixture F12 (SAFC) Medium (1:1 gemischt) kultiviert, das mit 2% FBS, 20mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure) von Sigma-Aldrich™ (CAS-Nummer 7365-45-9), 20mM L-Glutamin und 1% P/S versetzt wurde.

5.7.2 Zellen splitten

Haben die Zellen eine Konfluenz von 60-100% erreicht, mussten sie gesplittet werden. Die Zelllinien 518a2 und A375 mussten bereits bei 60% gesplittet werden, da sie sonst abgestorben sind. Die Zellen des frühen Stadiums (WM35, WM278) wurden erst bei einer 90-100%igen Konfluenz gesplittet. Haben die Zellen noch nicht

diese Konfluenz erreicht wurde nur das Medium beurteilt. Wenn das Medium eine eher orange-gelbliche Farbe hatte anstatt rötlich, wurde es lediglich ausgetauscht. Das Wachstum der Zellen wurde stets unter dem Mikroskop beobachtet und beurteilt. Das Aufteilen der Zellen hat immer unter dem Laminar air flow (LAF) von Steril-Polaris stattgefunden. Der LAF wurde vor der Verwendung immer mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Kulturflaschen wurden aus dem Inkubator geholt. Dabei wurden immer Handschuhe getragen, um die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Kontamination zu verringern und bevor diese in den Laminar Air Flow gestellt wurden, wurden diese ebenfalls mit Ethanol gereinigt, damit keine Keime in den LAF eingebracht werden. Die entsprechenden Medien und die Trypsin-Lösung (2,5g Trypsin mit 0,2g EDTA 4Na pro Liter Hanks' Balanced Salzlösung mit Phenolrot von der Firma Sigma-Aldrich®) wurden aus dem Kühlschrank genommen und im Wasserbad auf ca. 37°C erwärmt. Dabei war es wichtig den Verschluss vorher mit Parafilm abzudichten, um auch hier zu verhindern, dass Keime in das Gefäß eindringen bzw. dass Flüssigkeit aus dem Wasserbad durch die Öffnung ins Gefäß gelangt. Bevor die benötigten Utensilien (Pipetten, Falcon, Medium, usw.) in den LAF gestellt wurden, wurden diese desinfiziert. Das Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen anschließend mit 5ml PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen, geschwenkt und wieder abgesaugt. Danach wurden 2ml Trypsin hinzugefügt, die Zellen für 5 Minuten in den Inkubator (37°C, 20% O₂ und 5% CO₂) gestellt, um die Zellen vom Boden zu lösen bzw. zu lysieren. Unter dem Mikroskop wurde dann kontrolliert, ob sich alle Zellen abgelöst haben. Die abgelösten Zellen, inklusive des Trypsins wurden unter dem LAF in einen 15ml Falcon kollektiert. Die Kulturflasche wurde noch zweimal mit 5ml PBS nachgewaschen, und ebenfalls ins Falcon überführt. Nun befanden sich 12ml im Falcon, dieser wurde für 4 Minuten bei 1100rpm in einem Swing-out-Rotor (Kühlzentrifuge Jouan BR4 i) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde unter dem LAF der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 5ml PBS resuspendiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde der Überstand wieder abgesaugt und das Pellet in 2 ml Medium pro Flask resuspendiert. Je nach experimentellem Bedarf wurden die Zellen 1:10 bis 1:30 in 10ml vorgelegtem Medium (10ml) verdünnt. Durch die Benetzung der ganzen Oberfläche mit dem vorgelegtem Medium wurde verhindert, dass am Boden des Flasks Zellen inhomogen verteilt werden.

5.8 Proteinisolation

Alle Isolationen wurden außerhalb des Lamina Air Flow durchgeführt, die Behandlungen der Zellen vor der Inkubation fand jedoch immer innerhalb des LAFs statt.

5.8.1.1 Proteinisolation von den 6cm Petrischalen

Sobald die Melanomzellen eine Dichte von 80-90% erreicht haben, wurden die Substanzen (Zytokine und BAY293) in den entsprechenden Konzentrationen ergänzt. Dafür wurde von den 3ml Medium je ein 1ml Medium entnommen und zu den nun 2ml die Substanzen unter dem Laminar Air Flow (LAF) ergänzt.

Der Inhibitor BAY293 wurde in den Konzentrationen 0,3 μ M und 3 μ M für 30 Minuten bei 37°C vorgelegt und erst anschließend die Zellen mit weiteren Substanzen inkubiert. Der Wirkstoff BAY293 hat einen intrazellulären Angriffspunkt und mehr Zeit benötigt somit mehr Zeit, um an den Wirkort zu gelangen. Ab der Zugabe der Zytokine wurde die Inkubationszeit gestoppt und die Zellen in den Inkubator gegeben. Alle Behandlungen wurden in Dreifachproben durchgeführt und die Zellen nach 30, 60 und bei 120 Minuten isoliert und lysiert.

Während der Inkubationszeit wurde PBS auf Eis gestellt. Nach der Inkubation wurde das gesamte Medium abgesaugt, verworfen und die Zellen in einem ersten Waschschrift mit 4ml PBS und danach mit 2ml PBS gewaschen. Diese Schritte erfolgen bereit außerhalb des LAF. Nach dem Waschen wurden die adhärenen, behandelten Zellen in den Petrischalen mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei Bedarf in einem -80°C Kühlschranks gelagert, um zu einem späteren Zeitpunkt isoliert werden.

Die Lyse der schockgefrorenen Zellen erfolgt mit RIPA-Puffer, der entsprechend der benötigten Menge (100 μ l per Schale) frisch zubereitet wurde. Dem RIPA-Puffer wurden frisch Protease- (Leupeptin, Aprotinin und PMSF) und Phosphatase-Inhibitoren (Na₂VO₃ und NaF) im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. Die Platten wurden nacheinander aus dem -80°C Kühlfach aufgetaut, auf Eis gestellt und sequenziell präpariert, sodass die Proben nie auf Raumtemperatur standen. Zuerst wurden die

Zellen mit 50µl RIPA-Puffer ca. 1-2 Minuten lysiert und die konzentrierte Zellsuspension in ein Eppendorf Gefäß (1.5ml) überführt. Danach wurde die ursprüngliche Schale nochmals mit 50µl RIPA-Puffer nachgewaschen, um die Materialverluste der Proben zu minimieren. Auch diese Suspension wurde in jeweiligen Eppendorf Gefäß gesammelt und in flüssigem Stickstoff erneut schockgefroren. Anschließend wurden die Eppendorf Gefäße für 30 Sekunden im Ultraschallbad sonikiert um eine homogene Zellsuspension zu erhalten. Diese wurden dann bei 18700rpm bei 4°C für 30 Minuten mit der Zentrifuge (Sigma 3-30KS, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Rotor sigma 12370 50/R) zentrifugiert. Im Pellet befindet sich DNA und unlösliche Zellbestandteile, im Überstand die löslichen Proteine. Von diesem Überstand wurden 90µl Aliquots entnommen und mit 30µl 4x Sample-Puffer versetzt. Diese Proben wurden dann bei 95°C für 5 Minuten im Thermomixer Comfort von Eppendorf erhitzt. Dieser Schritt führt zur kompletten Denaturierung der Proteine, deren Disulfidbrücken gespalten werden und die damit als Monomere vorliegen. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert, bis ein Western Blot durchgeführt wurde.

5.8.1.2 Isolation von den 10cm Petrischalen

Analog zur Proteinisolation in 6 cm Petrischalen wurden Melanomzellen in 10 cm Schalen bei einer Konfluenz von 80-90% mit Substanzen versetzt und für 24 (ein Experiment für 65) Stunden inkubiert. Da durch die Behandlung über diesen Zeitraum auch Zellen abgestorben sind, wurde nun das Medium (10ml) in jeweils einem 50ml Falcon kollektiert. Danach wurden alle Petrischalen mit 5ml PBS gewaschen und anschließend mit je 1ml Trypsin (0,25%) versetzt, bei 37°C für 5 Minuten im Inkubator inkubiert und die abgelösten Zellen auch in das 50ml Falcon übergeführt. Danach wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich alle Zellen abgelöst haben. Die Petrischalen wurden dann zweimal mit jeweils 5ml PBS gewaschen und im Falcons gesammelt. Die Falcons wurden anschließend bei 1500rpm für 4 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Sigma 30-3KS). Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellsuspensionen auf Eis gestellt werden. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt oder abgegossen und die Pellets in jeweils 5ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurde nochmals unter denselben Bedingungen zentrifugiert, der Überstand erneut abgesaugt und die Pellets mit je 200µL RIPA-Puffer (ergänzt

durch Protease- und Phosphataseinhibitoren) verdünnt beziehungsweise resuspendiert. Diese Zellsuspensionen bzw. Lysate wurden in 1,5ml Eppendorf Gefäße überführt und dann mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und für 30 Sekunden im Ultraschallbad sonikiert. Mit einer Ultrazentrifuge wurden die Eppendorf Gefäße nun bei 18700rpm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit den löslichen Zellbestandteilen gesammelt. Ein Aliquot von 20µl wurde für die Proteinkonzentrationsbestimmung abgezweigt (siehe unten). Der Rest der Lysate wurde mit 4x Sample Buffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten gekocht. Diese Proben wurden dann bei -20°C gelagert, um damit zu einem späteren Zeitpunkt Western Blots durchzuführen.

5.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford und BCA

Die Proteinkonzentration wurde nur bei den Isolationen der 10cm Petrischalen bestimmt. Die Inkubationszeiten von 30-120 Minuten der Zellen in den 6cm Petrischalen reichen nicht aus, um durch Proliferation oder Proteinsynthese zu einer Verschiebung des Proteingehalts zu führen. Im Rahmen der Western blots wurde daher auch eine Ladekontrolle durchgeführt.

Nach der zuvor beschriebenen Isolation wurden jeweils 20µl der Lysate 1:1 mit MQ-Wasser verdünnt. In eine 96-Well-Platte wurden zuerst 200µl BCA-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 12) vorgelegt und danach jeweils 10µl Probe hinzu pipettiert. Jede Probe wurde als Doppelprobe gemessen. Ebenso wurde ein Blank (10µl MQ-Wasser anstatt Proteinlysate) gemessen, und ein Pufferleerwert (10µl RIPA-Puffer anstatt Proteinlysate). Im nächsten Schritt wurden die Proben für 30 Minuten bei 37°C im Inkubator inkubiert und anschließend mit dem Viktor³V Multilabel Counter (PerkinElmer) Detektor die optische Dichte bei 544nm gemessen. Die Absorptionsdaten wurden anschließend in ein Excel Format exportiert und die Proteinkonzentrationen unter Berücksichtigung der entsprechenden Eichkurve berechnet. Gleichzeitig wurde auch die Menge berechnet, die auf das Gel für die Elektrophorese aufgetragen werden muss, um die Kammern mit gleich viel Protein (im Bereich zwischen 15-35µg) zu beladen.

Tabelle 11: BCA-Lösung für die Bestimmung der Proteinkonzentration; Pierce® BCA Protein Assay Reagens A, Produktnummer: 23228 von Thermo scientific

BCA: für 25 Wells a 200 µl (= Σ5ml)
Bicinchoninsäure (BCA, 4,9 ml)
4N CuSO ₄ (100 µl)

5.9 Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine Methode, um Proteine mittels Antikörpern zu identifizieren. Zunächst müssen die Proteine mittels SDS-PAGE (auf Englisch: sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis) nach Masse/Größe aufgetrennt werden. (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979) Das Natriumdodecylsulfat ist nötig, um die Eigenladung der Proteine mit einer negativen Ladung zu überdecken, damit diese Eigenladung keinen Einfluss auf die Auftrennung mehr hat. (Helmut Plattner, 2017) Des Weiteren ist SDS dafür verantwortlich, die multimeren Proteine in Monomere zu zerlegen. Anschließend müssen die aufgetrennten Proteine auf eine Membran (aus Nitrocellulose oder Polyvinylidendifluorid) transferiert werden. In den folgenden Unterkapiteln werden die einzelnen Schritte anhand der Durchführung der Experimente genauer erklärt.

5.9.1 Acrylamidgele

Es wurden immer 10%ige Separating Gele und 5%ige Stacking Gele verwendet. Die Proteine, die für diese Untersuchung interessant waren, haben eine molekulare Masse von 35-100 kDa und können deshalb in einem 10% Trenngel gut dargestellt werden.

Tabelle 12: Bestandteile Separating Gel 10%

Separating Gel 10%
1,5M Tris (2,5ml) pH=8,8
10% SDS (100µl)
H ₂ O (3,96ml)
30%-0,8% Acryl-Bisacryl (3,33ml)
10% Ammoniumpersulfat (100µl)
TEMED (10µl)
Σ10ml

Tabelle 13: Bestandteile Stacking Gel 5%

Stacking Gel 5%
0,5M Tris (1,25ml) pH=6,8
10% SDS (50µl)
H ₂ O (2,81ml)
30%-0,8% Acryl-Bisacryl (835µl)

10% Ammoniumpersulfat (50µl)
TEMED (5µl)
Σ 5ml

Tabelle 14: Bestandteile des Polyacrylamidgels

1,5M TRIS-Puffer	0,5M Tris-HCl Buffer
45,5g TRIS Σ250ml M.Q., pH= 8,8	6g TRIS Σ100ml M.Q., pH=6,8
30%-0,8% Acryl-Bisacryl	10% SDS
30g Acrylamid 0,80g Methylen-bis-acrylamid Σ100ml M.Q.	10g SDS Σ100ml M.Q.
10% APS	
5g Ammoniumpersulfat Σ50ml M.Q.	

Zu Beginn wurde die Gießvorrichtung mit den Gläsern von BioRad aufgebaut. Alle Bestandteile (außer TEMED) wurden zunächst gemischt und TEMED erst kurz vor dem Gießen hinzugefügt (es aktiviert die Polymerisation). Mit der 5000µl Pipette wurde das Separating Gel zwischen die beiden Gläser (0,75mm Abstand) pipetiert. Anschließend wurden mit der Hamilton-Spritze die Luftbläschen an die Ränder geschoben bzw. entfernt. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet und somit die übrigen Bläschen aufschwimmen lässt und zum anderen das Trenngel horizontal glättet (das geringere spezifische Gewicht von Isopropanol lässt es auf dem Gel „schwimmen“). Bis das Gel polymerisiert dauerte es zirka 60 Minuten. Wenn die Apparatur zur Seite gekippt wird, kann festgestellt werden, ob das Gel bereits polymerisiert ist, denn dann sollte es nicht zur Seite rinnen, dass sollte man nur machen, wenn im Becherglas das verbliebene Gel nicht polymerisiert ist. Danach wurde das Isopropanol vorsichtig mit Filterpapier entfernt und kurz gewartet, bis das restliche Isopropanol verdampft ist. Jetzt wurde das TEMED zum 5%igen Stacking Gel hinzugefügt und anschließend auf das Trenngel gegossen, bis es fast überläuft. Der Kamm wird schräg eingeführt, sodass die Bläschen zur Seite gedrängt werden. Dann wurde wieder gewartet, bis das Gel fest wird. Übergebliebenes Gel wird im Becher gelassen, um zu sehen, ob es polymerisiert (und es ist dann in diesem Zustand auch nicht mehr toxisch). Da die Gele nie am selben Tag beladen wurden, um sicher zu stellen, dass sie auch komplett auspolymerisiert sind, wurden sie in nassem Zellstoff und Frischhaltefolie eingepackt und im Kühlraum bei 4°C gelagert, bis sie verwendet wurden. Der nasse Zellstoff ist notwendig, damit die Gele nicht austrocknen, bzw. schrumpfen.

5.9.2 Durchführung

5.9.2.1 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zunächst müssen alle Teile der Apparatur vorbereitet werden (Halterung für die Gläser, auf der die Elektroden befestigt sind und die Gläser, welche die noch nicht beladenen Gele enthalten). Bevor die Gele verwendet wurden, wurde der Plastikamm entfernt und die Kammern mit Laufpuffer befüllt bzw. befeuchtet. Die mit Samplepuffer verdünnten Proben (25% Puffer) wurden kurz vor dem Beladen aus

dem -20°C Gefrierfach genommen und wurden in der Hand aufgetaut und anschließend gevortext. Nun wurden die Gläser mit den Gelen aus der Gießvorrichtung entfernt und in die Kassette für die Elektrophorese eingebaut. Beim „Zusammenbauen“ der Gläser mit der Halterung musste auf die Kerbe geachtet werden, damit alles dicht verschlossen ist, denn sonst besteht die Gefahr, dass der Laufpuffer, während dem Beladen sehr schnell ausläuft. Pro Halterung können zwei Gele beladen werden. In die Kammer dazwischen wurde frischer Laufpuffer bis zum oberen Rand gefüllt und in eine passende Schale gestellt, um Puffer aufzufangen, falls die Flüssigkeit raustropft. Die Gele konnten nun mit den Proben beladen werden. Es war wichtig darauf zu achten, dass der Flüssigkeitsspiegel des Laufpuffers stets oberhalb der Gelkammern lag, damit beim Pipettieren unbeabsichtigt übergelaufene Probe nicht in die anderen Kammern gelangt, sondern in den Puffer hineinläuft. Bevor die Gele beladen wurden, wurde die Elektrophoresekammer mit bereits benutzten Laufpuffer bis zirka zur Hälfte befüllt und auf Eis gestellt, damit der Puffer vorgekühlt wurde. Bei den Lysaten der 10cm Petrischalen wurde anschließend die zuvor errechnete Menge an Probe auf die Gele aufgetragen (30-35 μg Protein) und bei den 6cm Lysaten wurde immer dieselbe Menge aufgetragen, da davon ausgegangen wurde, dass überall die gleiche Menge an Protein vorhanden war. Parallel wurden auf die Gele auch immer ein Proteinstandard (Low Molecular Weight Marker, GE Healthcare) und eine Proteinleiter (Rainbow colour, Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder oder RegularPage) aufgetragen, diese dienten der Orientierung und als Referenz zur Bestimmung der Größe der Proteine. Wurden nun die Gele beladen mussten die Kassetten richtig in die Kammer hineingestellt werden, sodass die Elektroden der Halterung mit jenen des Deckels übereinstimmen. Dann wurde die Kammer bis zur Markierung „4Gels“ mit Laufpuffer befüllt. Der Deckel wurde anschließend so auf die Kammer aufgesetzt, dass die Elektroden mit der Halterung übereinstimmen und am Netzgerät (BioRad, Power Pac 1000) angeschlossen. Nun wurde die Elektrophorese gestartet, damit die durch SDS negativ geladenen Proteine von der Kathode in Richtung Anode nach der Proteinmasse aufgetrennt werden. Die Laufzeit betrug zunächst 15 Minuten bei 100V (Proben werden am Übergang von Stacking Gel zum Trenngel konzentriert) und danach 90-120 Minuten bei 120V. Generell wurde die Lauffront am Ende des Trenngels als Richtwert herangezogen. Sobald Bromphenolblau zirka 10-15 Minuten bei 120V das Gel verlassen hat wurde die

Elektrophorese gestoppt. Dies gewährleistete eine ausreichende Auftrennung der Proteinbanden im gewünschten Molekulargewichtsbereich.

5.9.2.2 Transfer (Semidry Blotting Methode)

Hierbei wurde zunächst eine Schale mit Semidry-Transfer-Puffer (siehe Tabelle 4) befüllt, dieser sollte allerdings nicht zu lange an der Luft stehen, da das enthaltene Methanol sonst verdunstet und der Transfer dann nicht mehr so gut funktioniert. Dieser Puffer sollte auch regelmäßig neu hergestellt werden. Filterpapier 200x200mm (GB 005) von Whatman™ (Produkt 10426981) und 0,45 µm Nitrocellulose-Membran 300mm x 4m von Amersham™ Protran™ (Produkt 10600002) wurden zuerst auf die benötigte Größe zugeschnitten und anschließend in die Schale mit dem Puffer hineingelegt und gut befeuchtet. Die Membranen dürfen nicht direkt mit den Fingern berührt werden. Zuerst wurde ein Filter, dann die Membran, anschließend das Gel, bei dem zuvor das Stacking Gel abgetrennt wurde, und zuletzt wieder ein Filter übereinandergelegt, sodass ein sogenanntes „Sandwich“ entsteht. Die Reihenfolge ist wichtig, da die Proteine von oben nach unten auf die Membran übertragen werden (von der Anode in Richtung Kathode). Dieses „Sandwich“ wurde mit einem Roller von eingeschlossener Luft befreit und dann in die die Kassette des Geräts (BioRad, Trans-Blot® Turbo™) hineingelegt, dort wurde es nochmals mit dem Quick Transfer Puffer gut befeuchtet. Wurde die Kassette in dieses Gerät eingeführt und folgende Einstellungen wurden ausgewählt:

Die Proteine wurden innerhalb von 10 Minuten bei maximal 25V und konstanten 2,5A auf die Membran transferiert.

5.9.2.3 Färbung

Ist der Transfer beendet, wurden die Membranen in einem Schälchen mit MQ-Wasser gespült und dann mit einem Farbstoff (2% PonceauS/ 5% Essigsäureanhydrid) gefärbt. Nach 10 Minuten auf einem Schwenker wurden die gefärbten Membranen zwei bis drei Mal mit MQ-Wasser gewaschen und entfärbt, bis die

Proteinbanden sichtbar wurden. Die Membranen wurden dann beschriftet, eingescannt und als TIFF-Dateien abgespeichert.

5.9.2.4 Blockieren

Um die Spezifität der Antikörper zu erhöhen und unspezifische Bindungen zu reduzieren werden die Membranen „geblockt“. Die Membranen wurden 60 Minuten mit 5%igem Bovinen Serum Albumin (5% BSA gelöst in 1x TBST) blockiert. Diese Absättigung ist nötig, da der primäre Antikörper selbst ein Protein ist und eine sonst zustande kommende unspezifische Bindung verhindert werden soll.

Anschließend wurden die Membranen zweimal mit TBST für jeweils zirka 5 Minuten gewaschen.

5.9.2.5 Antikörper Inkubation

Tabelle 15: Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper

Erster Antikörper 1:1000 in 2% BSA (in TBST)
Zweiter Antikörper (Anti-Kaninchen-Antikörper) 1:2000 in 2% BSA (in TBST)
Horseradish peroxidase konjugiert

Bevor die Inkubation mit den Antikörpern stattgefunden hat, wurden die Membranen geschnitten. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die so entstehenden Membranhälften die zu untersuchenden Proteinbanden (ERK_{1/2} und pERK_{1/2} bei 42 und 44kDa, STAT₃ und pSTAT₃ bei 79 und 86 kDa, p38 bei 40 kDa, phosphoryliertes p38 bei 43 kDa, AKT und pAKT bei 60 kDa) enthielten. Diese Membranen wurden mit den entsprechenden primären Antikörpern eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C im Kühlraum auf der Wippe inkubiert. Das sorgfältige Waschen nach dem primären Antikörper ist sehr wichtig. Deshalb wurde

hier zweimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Membranen wurden danach ebenfalls eine Stunde mit dem sekundären Antikörper auf der Schwenke bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend einmal für 10 Minuten mit TBST und zweimal für 5 Minuten mit TBS gewaschen. Die Membranen verblieben bis zur Messung der Intensitäten der Proteinbanden (mit dem C-DiGit Blot Scanner, Li-COR Biosciences GmbH) in 1X TBS.

5.9.2.6 Messung und Auswertung mit Li-COR

Die Messung der Intensitäten der Proteinbanden wurde, wie bereits erwähnt, mit dem C-DiGit Blot Scanner, Li-COR Biosciences GmbH durchgeführt. Die zu messenden Membranen wurden jeweils mit 500µl Chemolumineszenz-Substrat (Western bright® Sirius®, Advansta Inc.) beschichtet, wobei davon 250µl direkt auf die Membran pipettiert wurde und 250µl auf die Detektionsfläche. Die Membran wurde anschließend auf die Messfläche des Geräts gelegt und mit der Einstellung „High“ 12 Minuten entwickelt. War das Signal zu stark wurde nochmals bei der Standardeinstellung für 6 Minuten gemessen. Die Auswertung fand in der Software Image Studio™ statt. Hierbei wurden Rechtecke um die einzelnen Banden gezeichnet und die Software berechnete so die einzelnen Intensitäten der Banden. Daraus resultierten Excel-Dateien, welche die einzelnen Intensitäten enthielten. Diese Werte wurden anschließend für die weiteren Berechnungen (Mittelwert, Standardabweichung, Normierung, Statistik) verwendet. Die durch die Messung entstanden Abbildungen wurden als TIFF-Datei abgespeichert und anschließend in dieser Arbeit veröffentlicht.

5.10 MTT-Assay

Der Assay wurde erstmals von Mosmann et. al. 1983 beschrieben und er erfasst alle lebenden, jedoch nicht die toten Zellen. (Mosmann, 1983)

Bei diesem Assay haben die lebensfähigen Zellen die Möglichkeit das lösliche Tetrazoliumsalz, 3-4,5-Dimethylthiazol-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT), in ein unlösliches Formazan umzuwandeln. (Twentyman & Luscombe, 1987)

Der MTT-Assay kann zur Messung der Zytotoxizität oder auch der Zellproliferation und Aktivierung der Zellen angewendet werden. (Mosmann, 1983)

Zunächst wurden die Zellen in die 69-Well Platten ausplattiert und am nächsten Tag wurden die Zellen unter dem LAF mit Substanzen behandelt und dann bei 37°C 24, 48 oder auch 72 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Substrat in 2,5ml Aktivator-Lösung gelöst und anschließend auf 37°C erwärmt. Verwendet wurde hier das EZ4U Kit (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG). Nachdem sich das Substrat vollständig gelöst hat, lag eine strohgelbe Lösung vor. Pro Well befanden sich jeweils 200µl Medium, weshalb pro Well 20µl von dem Substrat zugegeben wurden. Die Zellen wurden anschließend für mindestens 3 Stunden bei 37°C mit dem Farbstoff inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 450nm und bei 620nm (Referenzwellenlänge und dient dem Abzug des Leerwertes, der zum Beispiel von Bruchstücken der Zellen oder Fingerabdrücken herrühren kann) mit dem Viktor³V Multilabel Counter (Perkin Elmer) Detektor gemessen. Die so erhaltenen Daten wurden in eine Exceldatei eingefügt und von den Messwerten von 450nm und 620nm wurde die Differenz gebildet. Die 96-Well-Platte enthielt auch immer einen Leerwert, nur Medium (ohne Zellen) und Farbstofflösung enthielten. Von jeder Behandlung wurde jeweils ein Triplet gemessen.

5.11 Statistische Auswertung

Es wurden 15 verschiedene Experimente durchgeführt, die hier in dieser Arbeit behandelt werden. Bei der statistischen Auswertung dieser Experimente wurde One Way ANOVA angewandt. Wobei die Signifikanztests (post hoc) der Experimente bei dem MTT-Assay mit dem Bonferroni Test ausgewertet wurden und die der Western blots mit dem Turkey Test. Die gesamte statistische Auswertung wurde mit dem Programm SigmaPlot Version 11.0 durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Mittelwerte der normalisierten Daten wurden als Balkendiagramm mit Fehlerbalken (Standardabweichung) dargestellt. Wenn nicht anders vermerkt wurden immer 1-4 Versuche (n) für die Auswertung der Ergebnisse herangezogen.

6 RESULTATE

6.1 Konzentrationsabhängige Hemmung

Zu Beginn wurde das Verhalten der vier Zelllinien (A375, 518a2, WM35 und WM278) nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des SOS-Ras-Inhibitors BAY293 beobachtet. Einige Unterschiede, vor allem zwischen den metastasierten (A375, 518a2) und den nichtmetastasierten (WM35, WM278), wurden beobachtet. Diese Unterschiede werden im folgenden Kapitel gezeigt.

6.1.1 A375

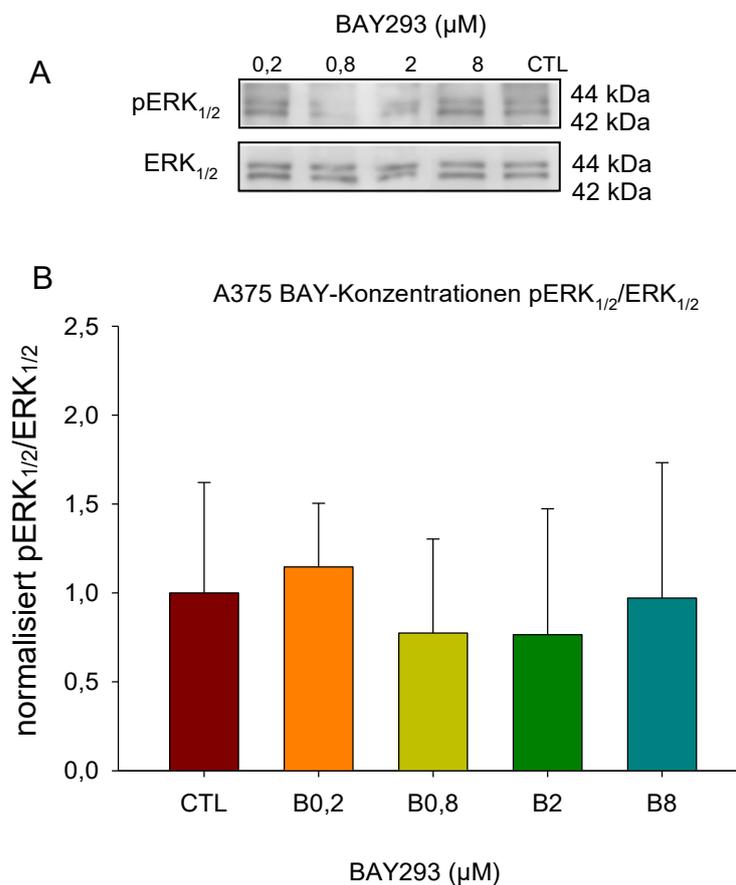


Abbildung 6: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie A375 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μ M/0,8 μ M/2 μ M/8 μ M. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit der Software LiCor

ausgewertet, in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=4) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Auf der Abbildung 6 A ist zu erkennen, dass der MAPK-Signalweg bei den Konzentrationen BAY293 0,2 μ M und 0,8 μ M gehemmt und bei 0,2 μ M eher aktiviert wird. Bei 8 μ M ist kein großer Unterschied zur Kontrolle vorhanden. Werden die Experimente jedoch zusammengefasst, ist in Abbildung 6 B zu sehen, dass die Werte eine sehr große Standardabweichung besitzen und keine Signifikanz zur Kontrolle (CTL) aufweisen.

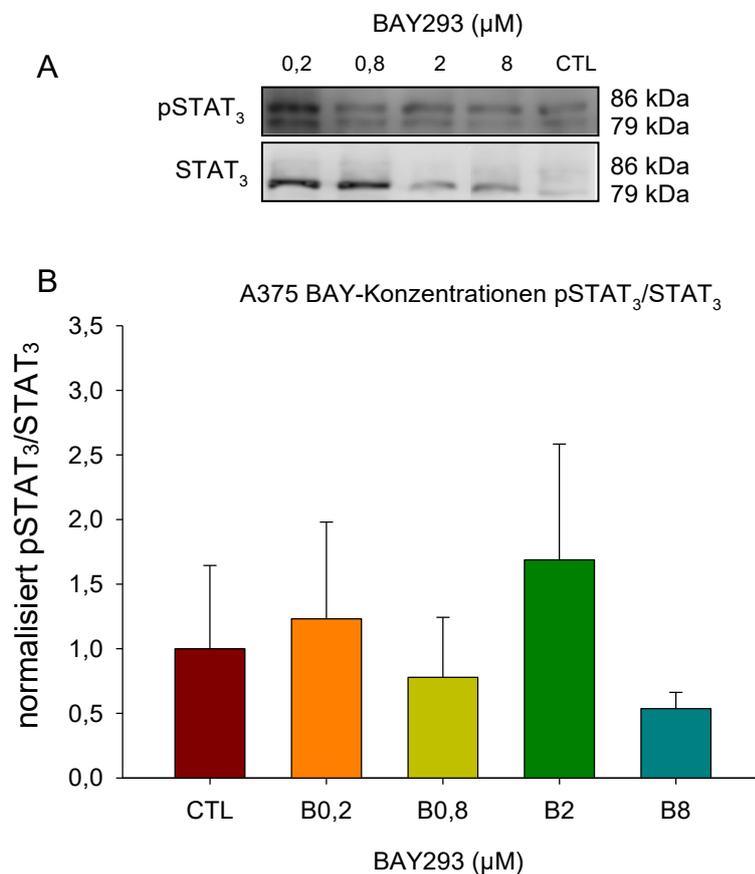


Abbildung 7: Aktivität von Janus-Kinase in der Zelllinie A375 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μ M/0,8 μ M/2 μ M/8 μ M. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

In Abbildung 7 A ist zu sehen, dass der JAK/STAT₃-Signalweg bei der niedrigsten BAY-Konzentration aktiviert wird und in den Konzentrationen 0,8µM und 8µM scheint eine Hemmung des Signalweges stattzufinden. Jedoch ist auch zu erkennen, dass die Ladekontrolle aus unbekanntem Gründen nicht gleichmäßig ist, weshalb dieses Experiment schwer zu beurteilen ist. Hier bei Abb. 7 B ist auch keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle zu sehen.

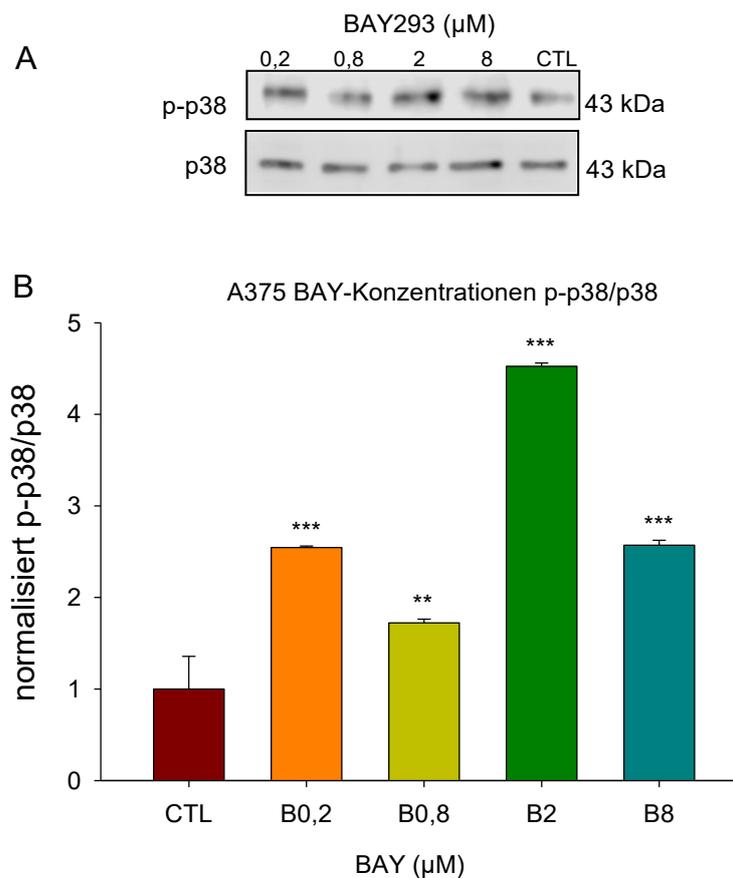


Abbildung 8: Aktivierung von p38 in der Zelllinie A375 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für p-p38 und p38 sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001)

In der Abbildung 8 A und B ist zu sehen, dass die Phosphorylierung von p38 durch die Behandlung mit dem SOS1-Ras-Inhibitor bereits bei niedriger Konzentration stimuliert wird. Bei BAY293 2µM ist die stärkste Aktivierung zu beobachten.

BAY293-Konzentrationen 0,2 μ M, 2 μ M und 8 μ M haben einen p-Wert<0,001 und die Konzentration 0,8 μ M hat einen p-Wert<0,01 und somit zeigen alle Behandlungen einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle.

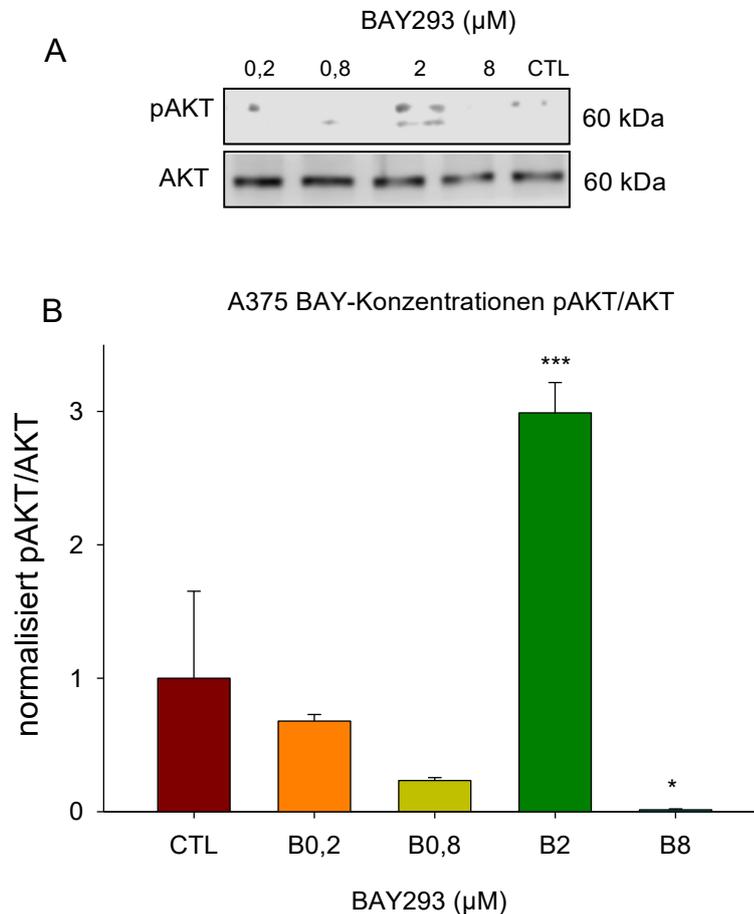


Abbildung 9: Aktivität von PDK-1 in der Zelllinie A375 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μ M/0,8 μ M/2 μ M/8 μ M. Typische Western Blots für pAKT und AKT sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, ***: p<0,001)

In Abb. 9 A und B ist eindeutig zu erkennen, dass der PI3K-Signalweg bei 2 μ M aktiviert wird und dieser Unterschied im Vergleich zur Kontrolle signifikant ist. Wohingegen die anderen Konzentrationen dieser Substanz eine Hemmung der Phosphorylierung von AKT durch PDK-1 (3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1) zeigen. Hier zeigt die Konzentration 8 μ M noch einen p-Wert<0,05.

6.1.2 518a2

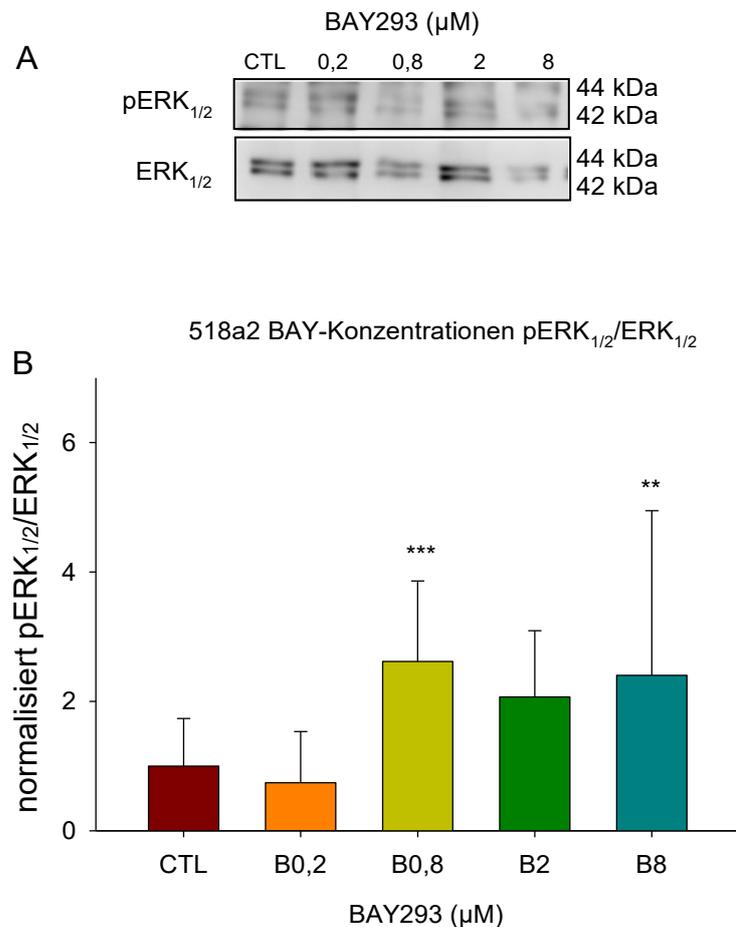


Abbildung 10: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie 518a2 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit der Software LiCor ausgewertet, in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=5) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

In Abbildung 10 A ist erneut zu erkennen, dass die Banden der Ladekontrolle nicht die gleichen Intensitäten aufweisen, jedoch scheinen diese Abweichungen auf den oberen Blot übertragbar zu sein. Durch die errechnete Ratio und anschließender Normalisierung der Daten auf die Kontrolle ergibt sich der Graph darunter (Abb. 10 B). Hier ist zu erkennen, dass eine leichte Inaktivierung des MAPK-Signalweg bei 0,2 μM stattfindet. In höheren Konzentrationen wird der Signalweg jedoch nicht gehemmt, sondern im Vergleich zur Kontrolle aktiviert, wobei die Konzentrationen 0,8 μM und 8 μM eine Signifikanz aufweisen.

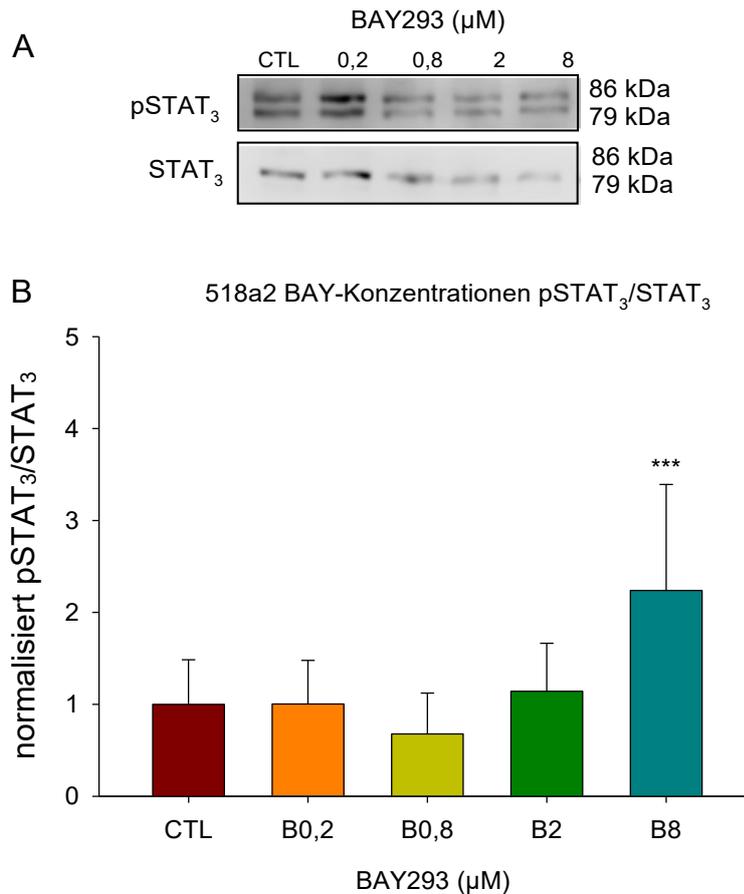


Abbildung 11: Aktivität von Janus-Kinase in der Zelllinie 518a2 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=4) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)

Abbildung 11 A zeigt erneut eine ungleichmäßige Ladekontrolle. Bei der Konzentration 0,2 μM zeigen sowohl phosphoryliertes STAT₃ als auch nicht phosphoryliertes STAT₃ eine höhere Intensität und bei 8 μM ist die Ladekontrolle (STAT₃) sehr schwach. Daraus ergibt sich das darunterliegende Balkendiagramm. Durch das errechnete Verhältnis von pSTAT₃ zu STAT₃ bei der Konzentration 8 μM ergibt sich hier eine Aktivierung des JAK/STAT₃-Signalweges bei der höchsten Konzentration mit einem p -Wert $< 0,001$. Der Grund dafür ist, dass die Intensität der Ladekontrolle im Vergleich zum phosphorylierten Protein bei 8 μM um einiges schwächer ist.

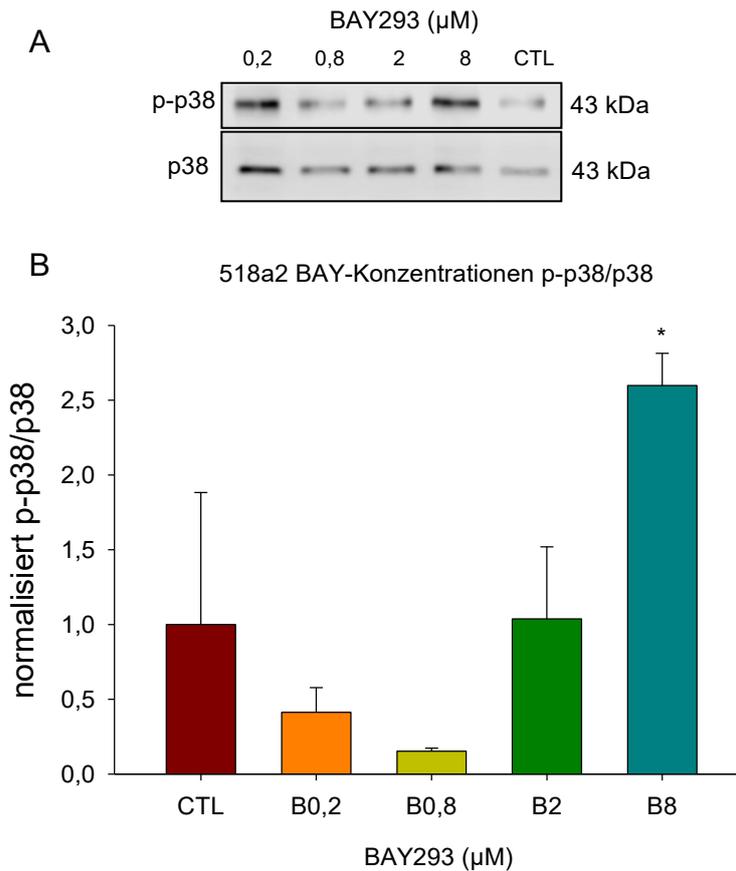


Abbildung 12: Aktivierung von p38 in der Zelllinie 518a2 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für p-p38 und p38 sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$)

In Abb. 12 A und B ist eine eindeutige Aktivierung der Phosphorylierung von p38 bei der höchsten BAY-Konzentration zu sehen (p -Wert $<0,05$). Bei 0,2 μM und 0,8 μM wurde eine Hemmung beobachtet und bei der Konzentration 2 μM wurde keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle gesehen.

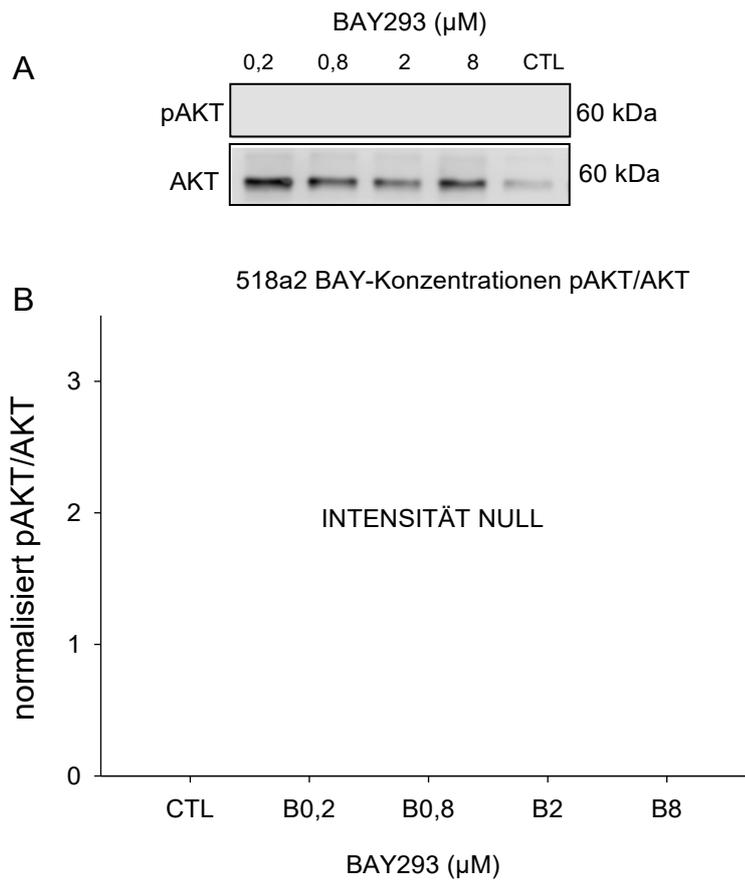


Abbildung 13: Aktivität von PDK-1 in der Zelllinie 518a2 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für pAKT und AKT sind dargestellt (A).

Bei diesem Experiment (Abb. 13 A und B) scheint der PI3K-Signalweg nicht aktiviert zu werden. Es konnte keine Phosphorylierung von AKT gemessen werden, obwohl diese Experimente wiederholt wurden. Dennoch zeigt sich, dass die Expression von AKT in Gegenwart von BAY293 zunimmt.

6.1.3 WM35

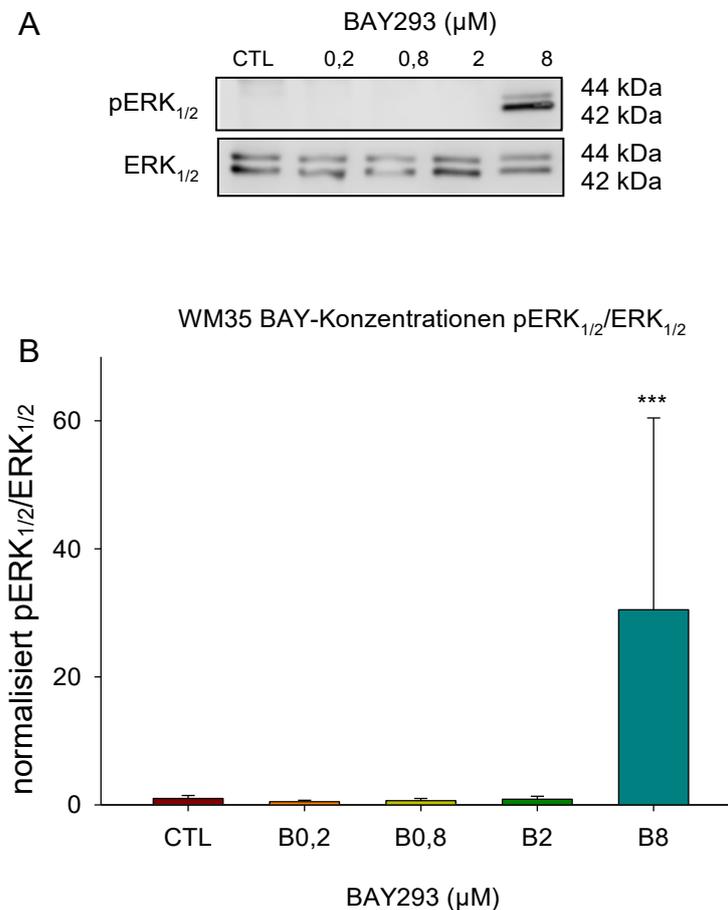


Abbildung 14: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM35 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit der Software LiCor ausgewertet, in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)

Bei der nicht metastasierenden Zelllinie WM35 tritt das Phänomen auf, dass die Substanz BAY293 in der hier höchsten Konzentration den MAPK-Signalweg mit einer statistischen Signifikanz sehr stark aktiviert (Abb. 14)

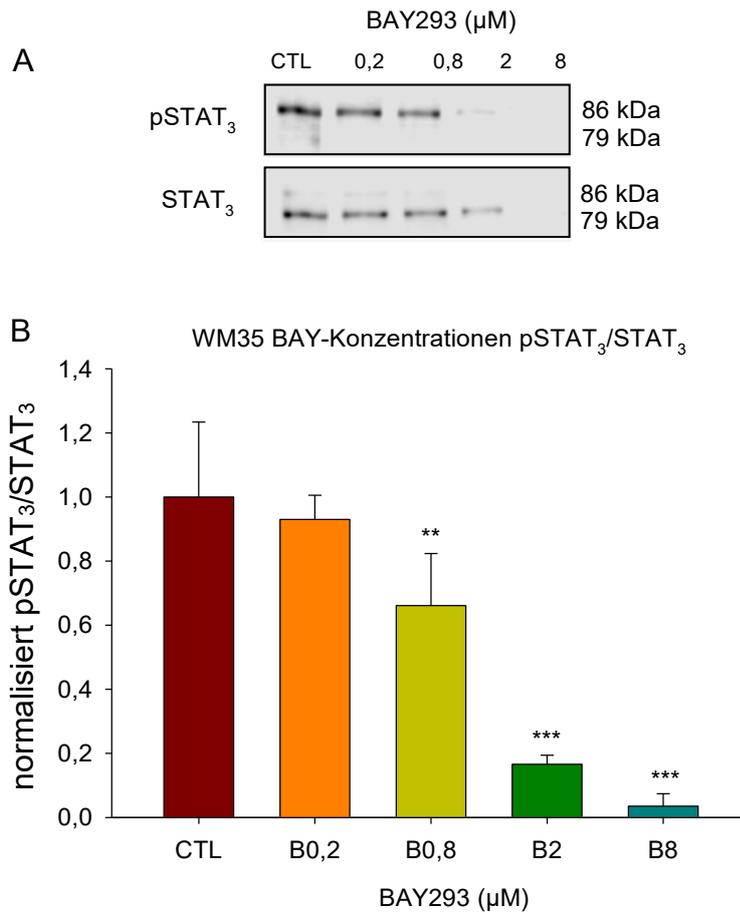


Abbildung 15: Aktivität von Janus-Kinase in der Zelllinie WM35 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

In Abb. 15 B ist mit steigender Konzentration von BAY293 eine immer stärker werdende Hemmung des JAK/STAT₃-Signalweges zu beobachten. Allerdings verläuft die Intensität von STAT₃ nicht gleichmäßig, mit steigender Konzentration von BAY293 nimmt die Expression von STAT₃ ab.

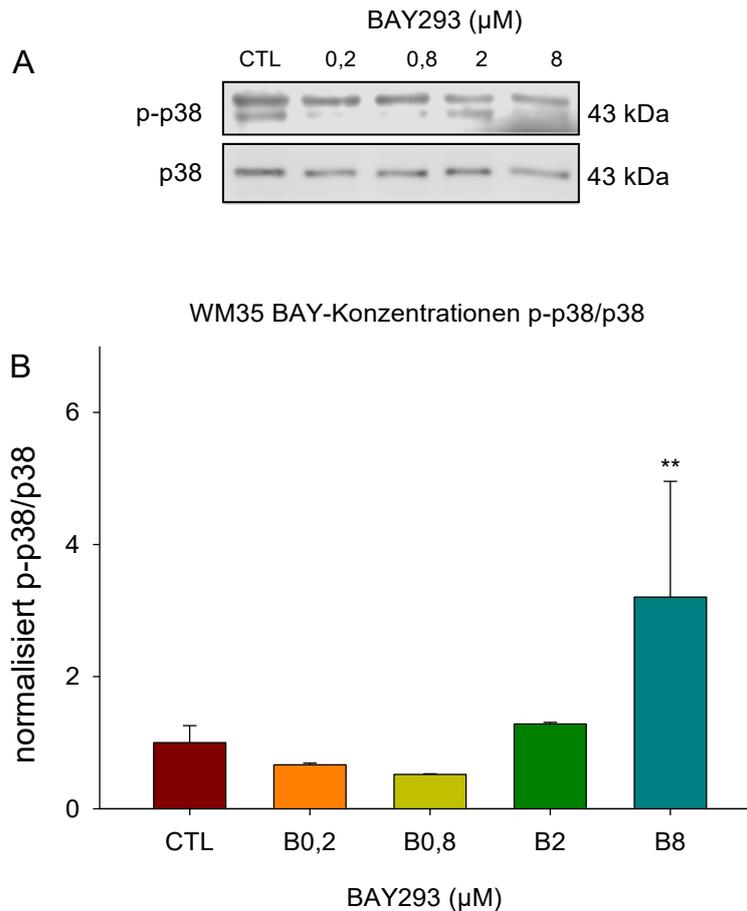


Abbildung 16: Aktivierung von p38 in der Zelllinie WM35 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für p-p38 und p38 sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01)

Bay293 aktiviert in der höchsten Konzentration (8 μM) die Phosphorylierung von p38 in den WM35 Zellen (Abb.16). Sehr ähnliche Ergebnisse lieferten die 518a2 Zellen (Abb. 12). Die anderen Behandlungen weisen hier keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle auf, jedoch findet in niedriger Konzentration des Inhibitors keine Aktivierung dieses Signalweges statt.

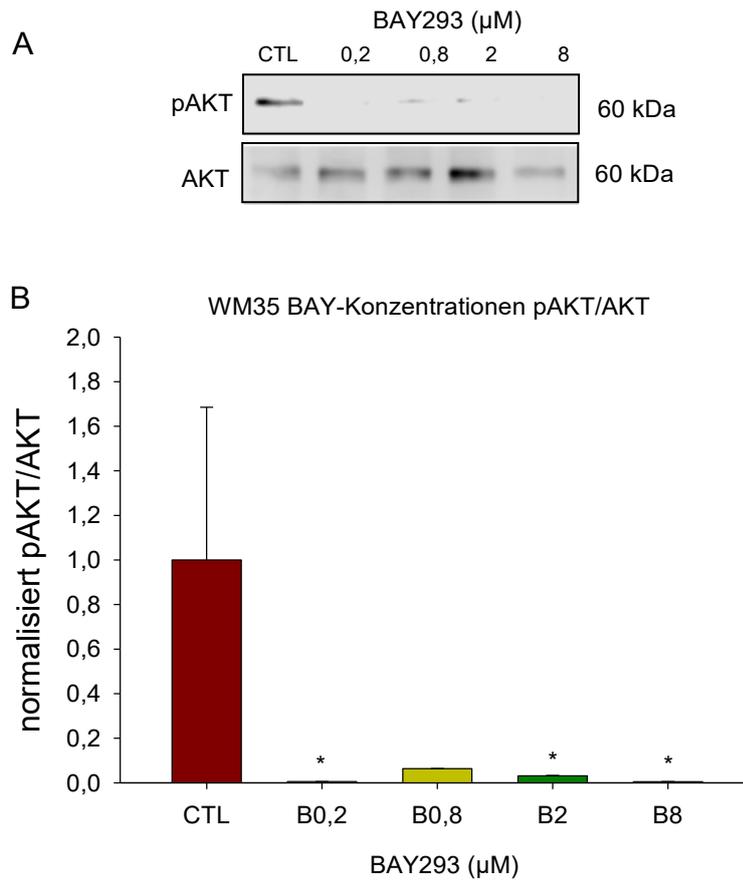


Abbildung 17: Aktivität von PDK-1 in der Zelllinie WM35 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für pAKT und AKT sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$)

Der PI3K-Signalweg wird durch keine BAY-Konzentration in den WM35 Zellen aktiviert, sondern im Vergleich zur Kontrolle eindeutig gehemmt (Abb. 17).

6.1.4 WM278

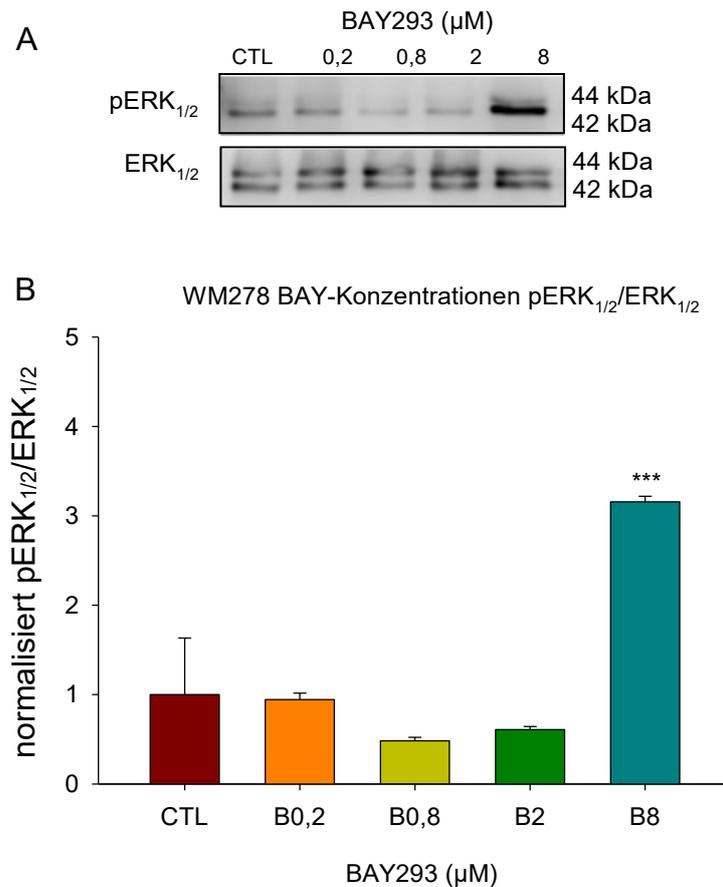


Abbildung 18: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM278 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit der Software LiCor ausgewertet, in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)

Die nicht metastasierenden Zelllinien WM35 und WM278 haben hier die Gemeinsamkeit, dass der MAPK-Signalweg bei der höchsten BAY-Konzentration stark aktiviert wird (siehe Abb. 14 und 18 A/B) Beide haben einen p-Wert<0,001.

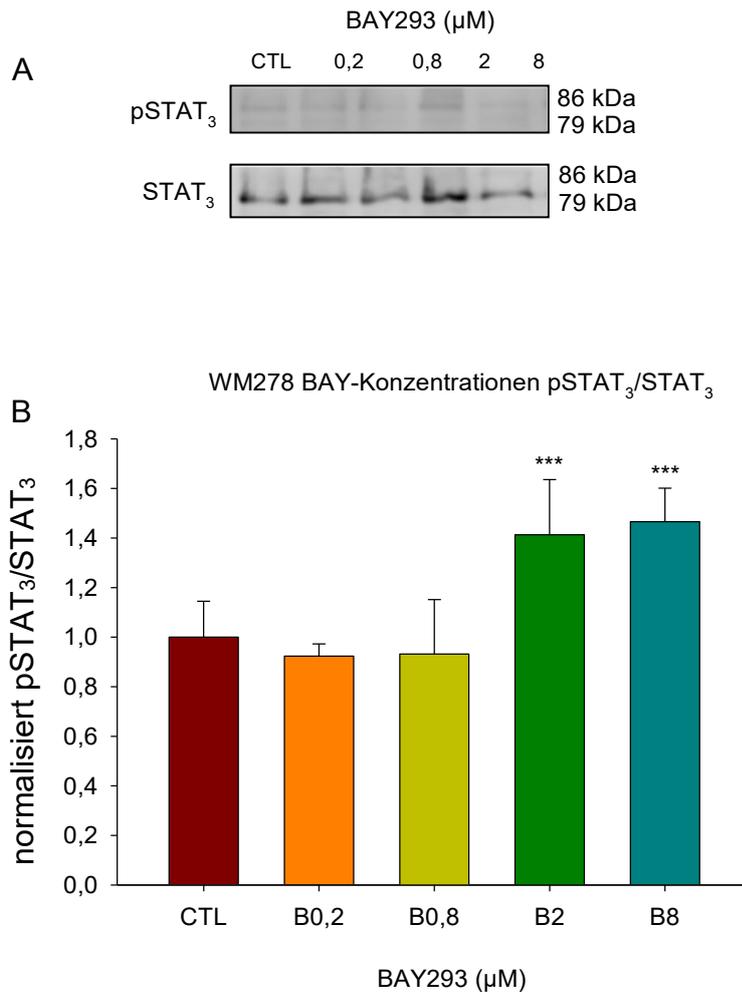


Abbildung 19: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM278 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)

Der JAK/STAT₃-Signalweg wird bei den beiden höchsten Konzentrationen (2 μM und 8 μM) aktiviert (p<0,001). Bei BAY293 0,2 μM und 0,8 μM liegen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) vor (Abb. 19).

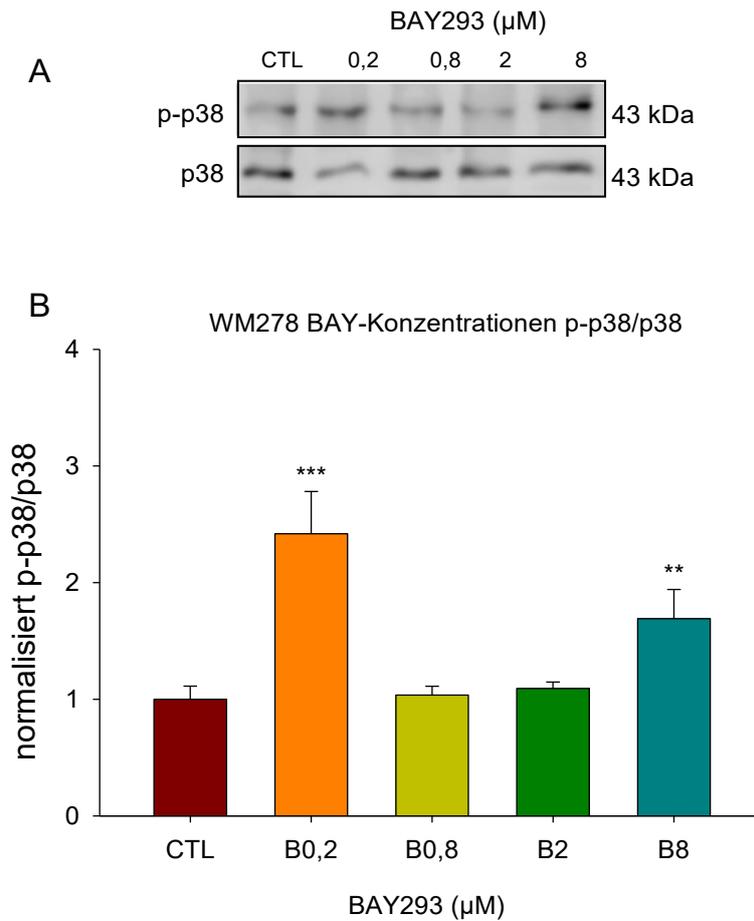


Abbildung 20: Aktivierung von p38 in der Zelllinie WM278 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μM /0,8 μM /2 μM /8 μM . Typische Western Blots für p-p38 und p38 sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

Die Aktivierung von p38 wird bei der niedrigsten und bei der höchsten Konzentration gesteigert. Die beiden anderen Konzentrationen in diesem Experiment weisen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf (Abb. 20).

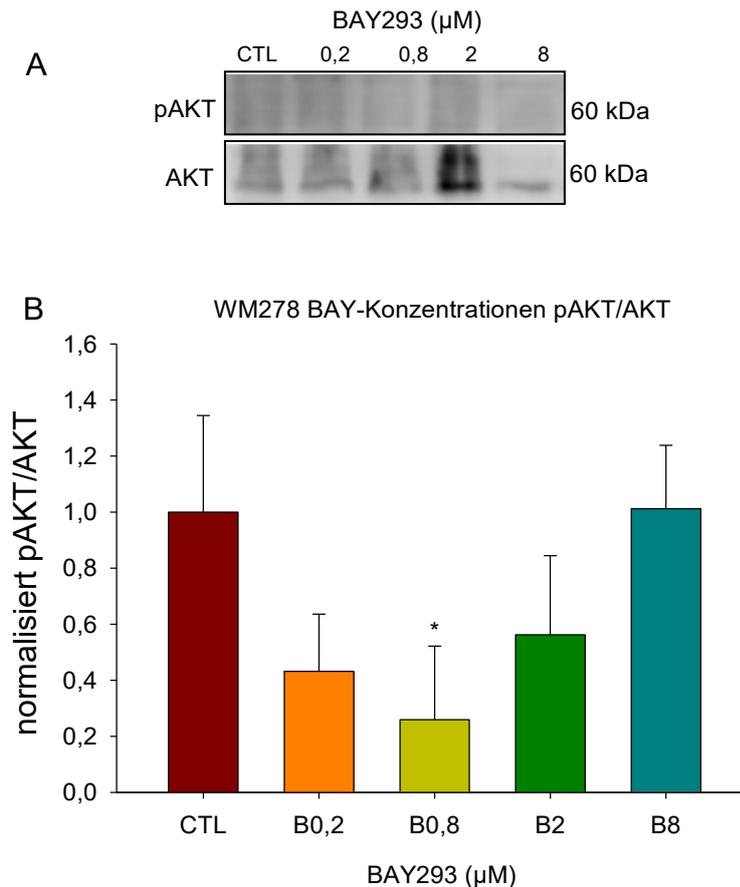


Abbildung 21: Aktivität von PDK-1 in der Zelllinie WM278 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2μM/0,8μM/2μM/8μM. Typische Western Blots für pAKT und AKT sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$)

Hier in Abbildung 21 ist am ersten Blick zu erkennen, dass die Expression von AKT in der Behandlung mit 2μM BAY293 viel stärker ist als in den anderen Proben. Der Grund hierfür ist unklar. Dennoch zeigt dieses Experiment eine Hemmung der AKT-Aktivierung, die für 0,8 μM BAY203 sogar signifikant ist.

6.2 Zeitabhängige Stimulation bzw. Hemmung

Wie im Methodenteil bereits erwähnt, wurden bei den Experimenten mit den kurzen Inkubationszeiten (30, 60 und 120 Minuten) in den 6cm Petrischalen keine Bestimmungen der Proteinkonzentrationen gemacht, da davon ausgegangen wird,

dass sich die Proteinkonzentration in dieser Zeit in den Zellen nicht wesentlich verändert und überall gleich viele Zellen ausgesät wurden.

6.2.1 Behandlung mit OSM und BAY293 nach 60 Minuten Inkubationszeit

6.2.1.1 A375

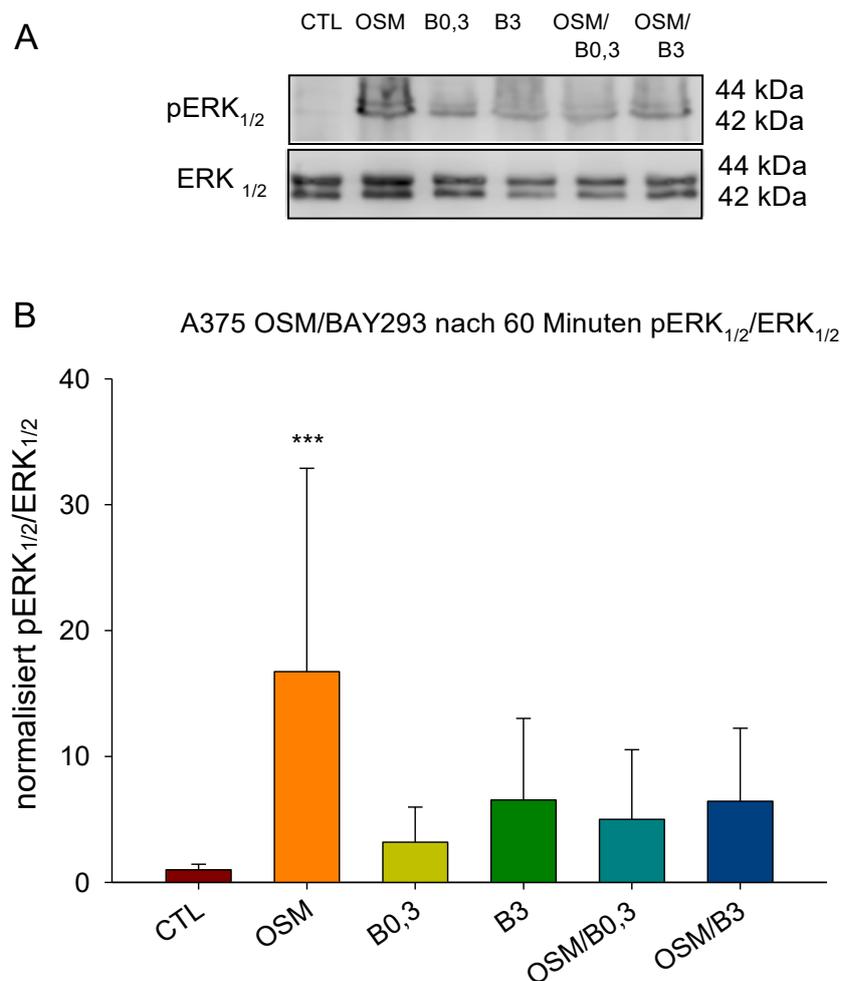


Abbildung 22: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie A375 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz

wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)

In Abbildung 22 A und B ist zu erkennen, dass das Zytokin Oncostatin M eindeutig den MAPK-Signalweg stimuliert ($p < 0,001$). BAY293 allein zeigt nach 60 Minuten keine Hemmung des Signalwegs. Zu sehen ist allerdings, dass OSM in Kombination mit BAY293 nicht mehr so stark aktiviert.

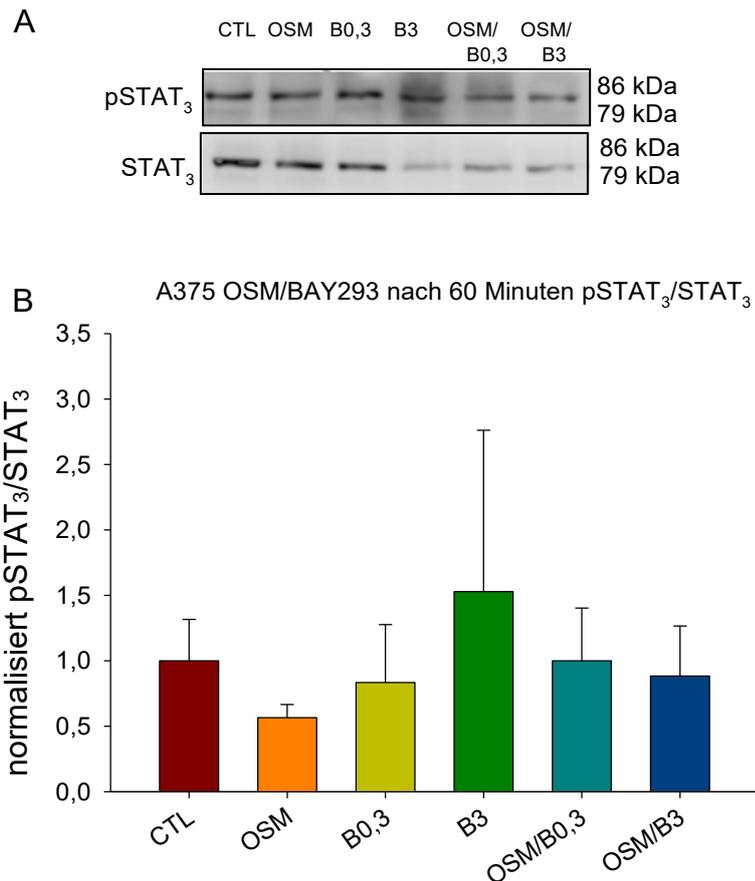


Abbildung 23: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie A375 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3 μ M/3 μ M, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Bei diesem Experiment mit den A375 Zellen liegt keine statistische Signifikanz vor. In Abb. 23 B ist zu erkennen, dass OSM hier den Signalweg nach 60 Minuten noch nicht stimuliert, BAY293 3µM hingegen schon, wobei der angegebene Fehlerbalken sehr groß ist.

6.2.1.2 518a2

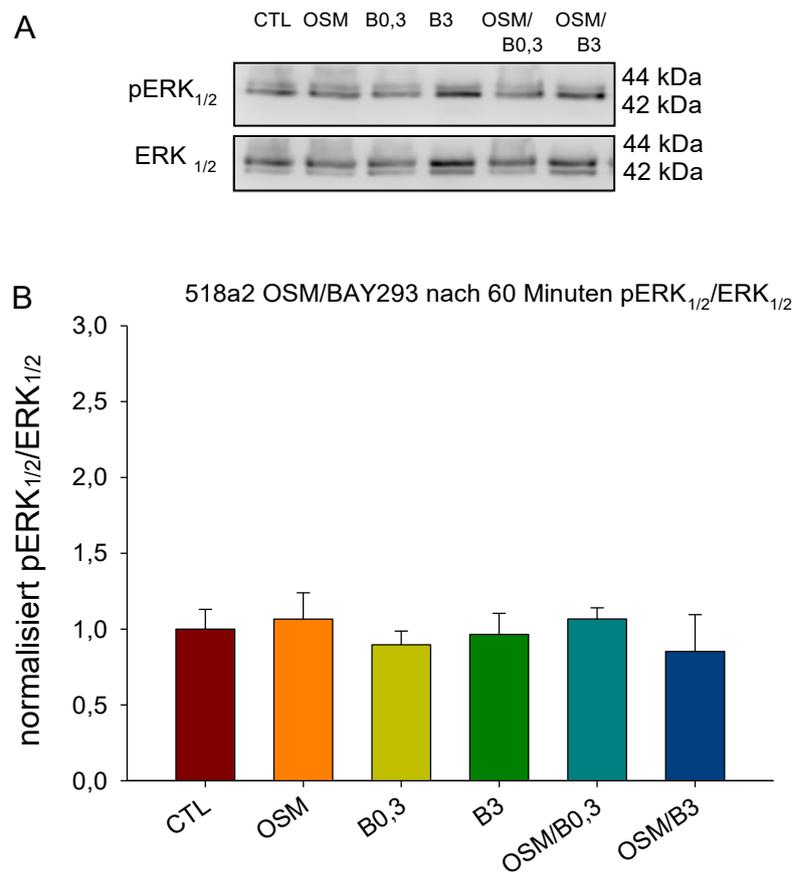


Abbildung 24: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie 518a2 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

In der Abbildung 24 B ist zu erkennen, dass bei keiner der vorliegenden Behandlungen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle vorliegt. Es findet, anders als bei

den A375 Zellen keine Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch Oncostatin M statt und auch keine starke Hemmung des Signalwegs durch den Inhibitor BAY293 nach 60 Minuten Inkubationszeit.

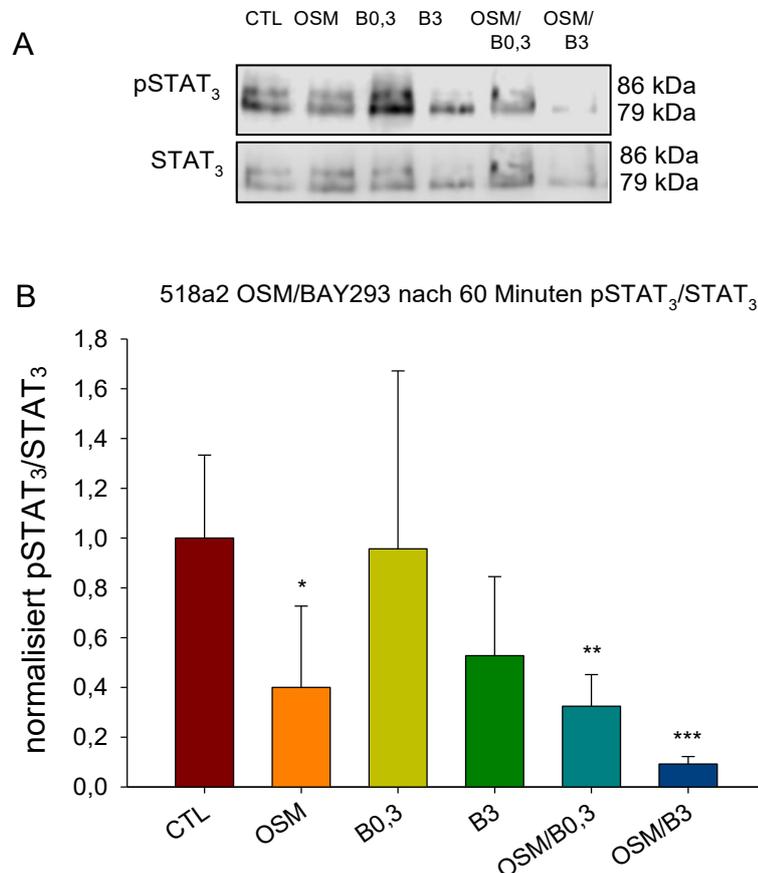


Abbildung 25: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie 518a2 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

Oncostatin M aktiviert hier den JAK/STAT₃-Signalweg nach 60 Minuten nicht und die Kombinationen des Zytokins und des Inhibitors BAY293 zeigen eine signifikante Hemmung (Abb 25).

6.2.1.3 WM35

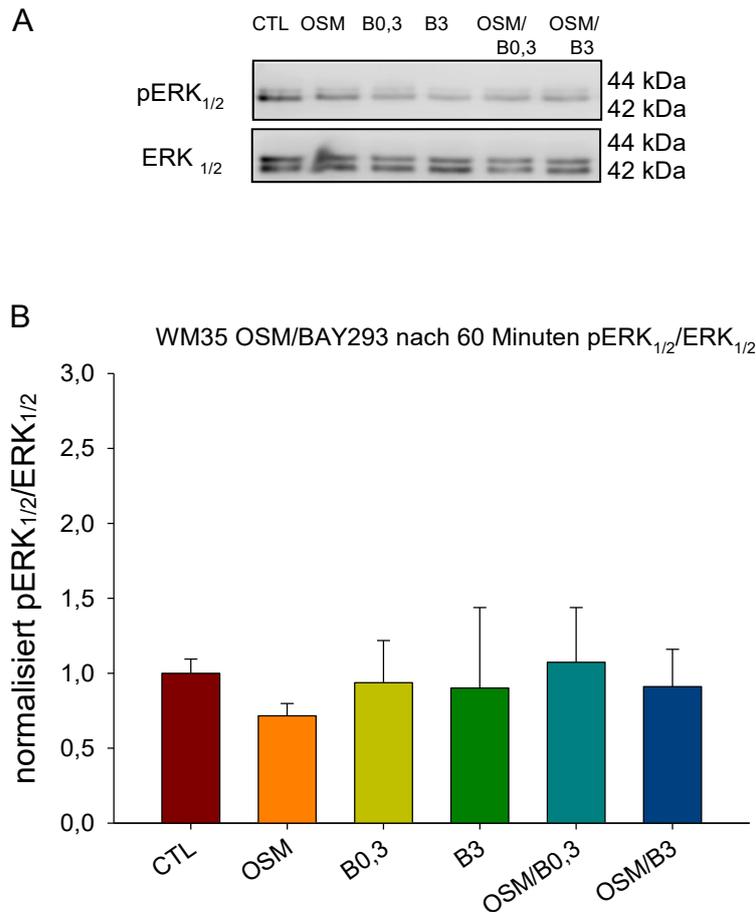


Abbildung 26: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM35 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3 μ M/3 μ M, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Die nicht metastasierenden Zellen zeigen hier, wie die 518a2 Zellen, keine Aktivierung durch OSM nach 60 Minuten. BAY293 zeigt auch hier keine signifikante Hemmung des MAPK-Signalwegs. In Abbildung 26 A ist jedoch ein Unterschied zu den, mit dem Inhibitor behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle und auch zu OSM zu erkennen, da die Intensität der Banden hier geringer ist, werden die Wiederholungen jedoch zusammengefasst, ist hier kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle vorhanden.

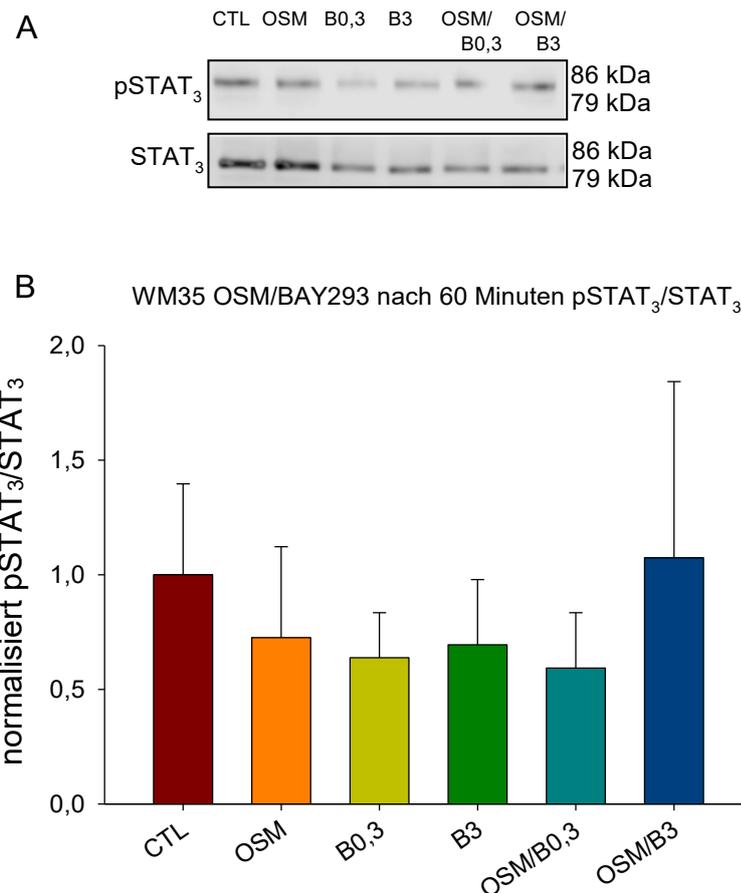


Abbildung 27: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM35 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Auch hier (Abb. 27) wurde bei keiner der Behandlungen ein signifikanter Unterschied ermittelt. Wie auch bei den metastasierenden Zelllinien wird hier der JAK/STAT₃-Signalweg durch OSM nach 60 Minuten nicht aktiviert. Ein leichter Unterschied ist allerdings bei der Kombination von OSM mit BAY293 (3µM) zu erkennen. Während die anderen Behandlungen eher eine Hemmung dieses Signalwegs zeigen, ist hier eine leichte Steigerung der Aktivität der Janus-Kinasen zu sehen, allerdings ist hier die Standardabweichung sehr groß und es wurde auch mit dem Turkey Test keine statistische Signifikanz berechnet.

6.2.1.4 WM278

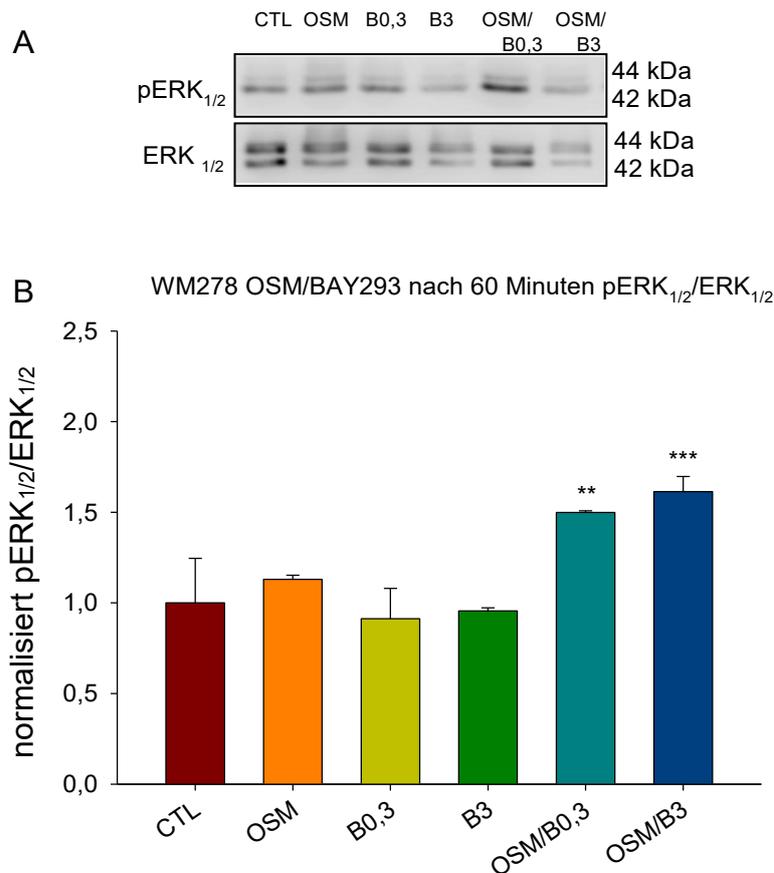


Abbildung 28: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM278 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001)

In Abbildung 28 A und B ist, im Gegensatz zu den WM35 Zellen, eine leichte Stimulation des MAPK-Signalwegs durch Oncostatin M in den nicht metastasierenden WM278 Zellen bereits nach 60 Minuten zu erkennen, allerdings ohne einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. BAY293 zeigt in beiden Konzentrationen eine leichte Hemmung dieses Signalwegs. In Kombination mit OSM scheint die Aktivität von MEK_{1/2}, das ERK_{1/2} phosphoryliert, deutlich gesteigert zu werden.

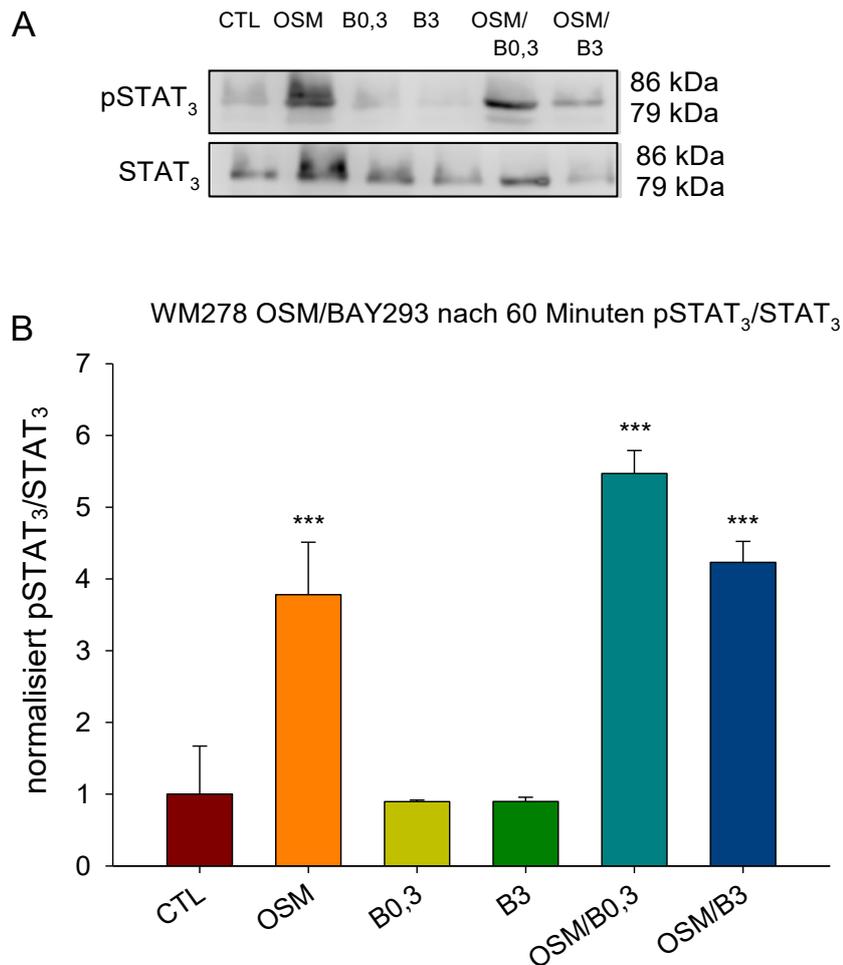


Abbildung 29: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM278 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)

Anders als bei den WM35, wird hier, wie in Abbildung 29 B, der JAK/STAT₃-Signalweg durch OSM bereits nach 60 Minuten aktiviert. Durch die Inhibition der SOS1-Ras Interaktion im MAPK-Signalweg durch BAY293 scheint hier dieser Signalweg nach 60 Minuten beeinflusst zu werden. In Kombination mit OSM wird die Phosphorylierung von STAT₃ sogar eher erhöht.

6.2.2 Behandlung mit IL6 und BAY293 nach 60 Minuten Inkubationszeit

6.2.2.1 A375

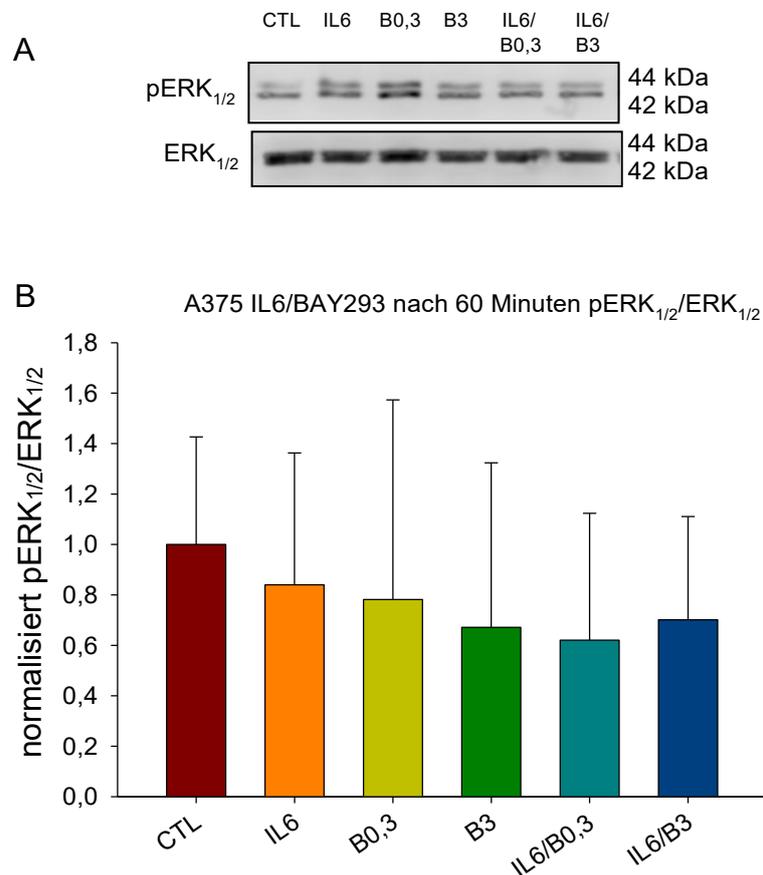


Abbildung 30: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie A375 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Hier in Abbildung 30 A hat die Behandlung mit IL6 eine stärkere Intensität als die Kontrolle, in B ist jedoch zu erkennen, dass IL6 den MAPK-Signalweg nach 60 Minuten in den zusammengefassten Wiederholungen dieses Experimentes noch nicht aktiviert. Die Standardabweichungen sind bei allen Behandlungen sehr groß

und gesamt liegen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle vor. Interessanterweise ist in Abb. 30 A zu sehen, dass BAY293 0,3 μ M zu einer leicht erhöhten Phosphorylierung von ERK_{1/2} beiträgt.

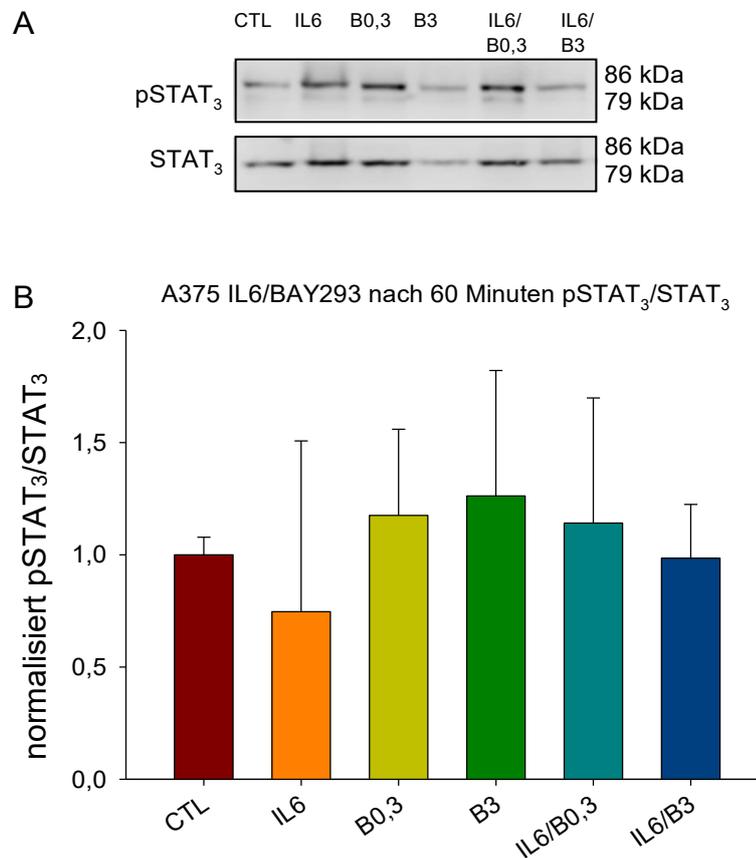


Abbildung 31: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie A375 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3 μ M/3 μ M, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

In der Abb. 31 A stimuliert Interleukin 6 den JAK/STAT₃-Signalweg. In B ist jedoch wieder zu sehen, dass die Standardabweichung (Fehlerbalken) sehr groß ist und gesamt wird der Signalweg nach 60 Minuten noch nicht aktiviert. Hingegen wird die Aktivität von Janus-Kinasen durch die Zugabe von BAY293 in beiden Konzentrationen gesteigert.

6.2.2.2 518a2

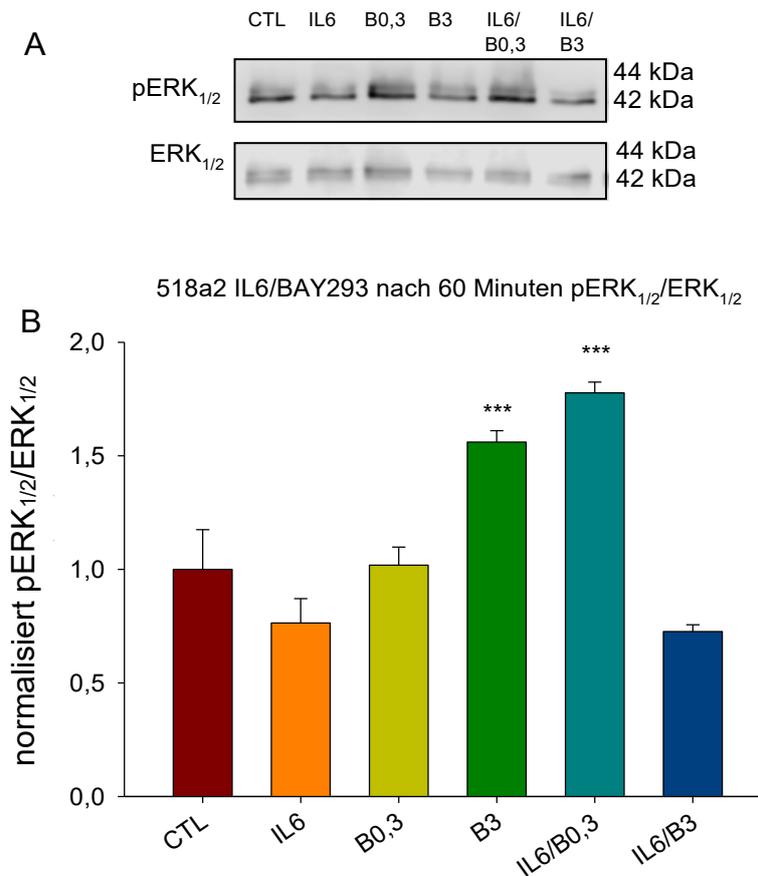


Abbildung 32: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie 518a2 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)

In den 518a2 Zellen, wie in Abbildung 32 A und B zu erkennen ist, wird die Phosphorylierung von ERK_{1/2} durch IL6 nach 60 Minuten nicht stimuliert. Die Intensitäten wurden normalisiert und anschließend wurde das Verhältnis (Ratio) von pERK_{1/2} zu ERK_{1/2} berechnet und somit ergibt sich in Abb. 32 B folgendes Balkendiagramm. Der Inhibitor BAY293 stimuliert aber die Phosphorylierung von ERK_{1/2} konzentrationsabhängig. In Gegenwart von IL6 wird diese Stimulation aber wieder konzentrationsabhängig rückgängig gemacht.

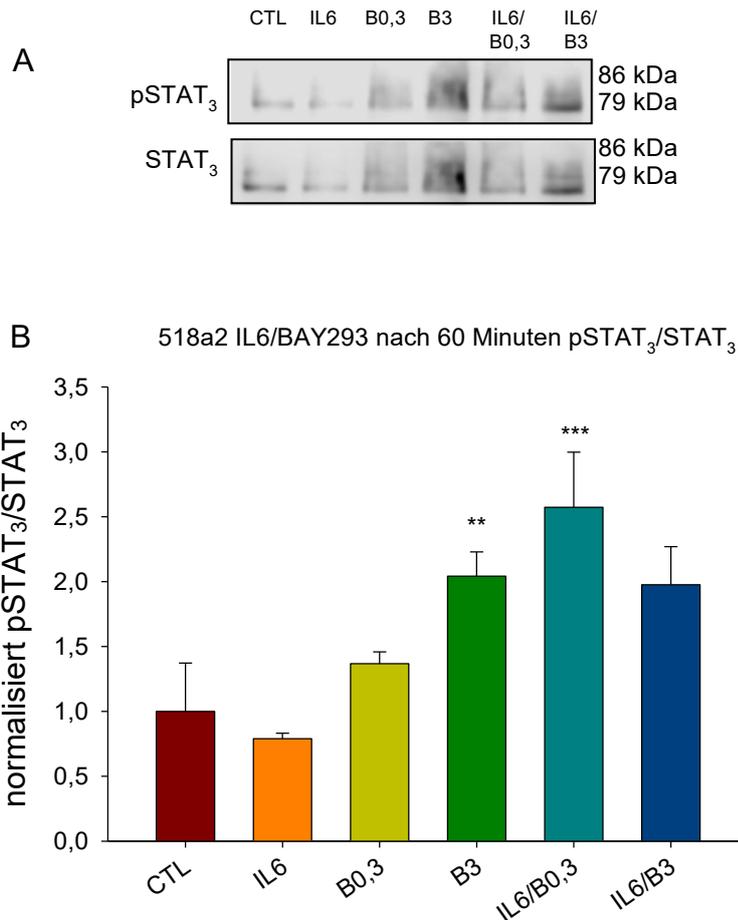


Abbildung 33: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie 518a2 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001)

In Abbildung 33 A ist der Western Blot einer gestrippten Membran zu sehen, der nicht richtig funktioniert haben dürfte. Dennoch wurden dieses Experiment ausgewertet und mittels deskriptiver Statistik wurde die Signifikanz berechnet. Analog zu Abb. 31 (A375 Zellen) zeigt IL6 keine Aktivierung des JAK/STAT₃-Signalwegs nach 60 Minuten. BAY293 stimuliert die Phosphorylierung von STAT₃ konzentrationsabhängig signifikant. In Gegenwart von IL6 wird diese Stimulation aber wieder konzentrationsabhängig rückgängig gemacht.

6.2.2.3 WM35

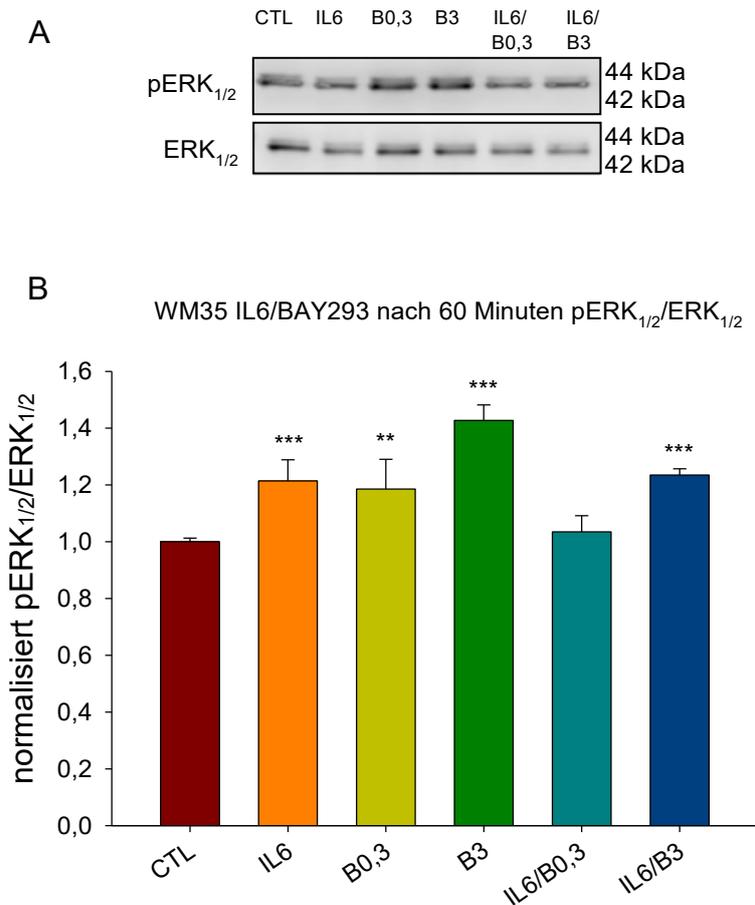


Abbildung 34: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM35 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001)

Nach 60 Minuten wird der MAPK-Signalweg, in den nicht metastasierenden WM35 Zellen durch IL6 aktiviert, wie in Abbildung 34 A und B zu erkennen ist. Auch zu sehen ist, dass BAY293 hier in der höchsten Konzentration (3µM) bereits nach 60 Minuten die Phosphorylierung von ERK_{1/2} stimuliert. Dieses Phänomen wurde be-

reits bei der Untersuchung der konzentrationsabhängigen Hemmung (Abb. 14) beobachtet. Auch die Kombination von IL6 mit BAY293 3 μ M stimuliert den Signalweg stärker als IL6 allein.

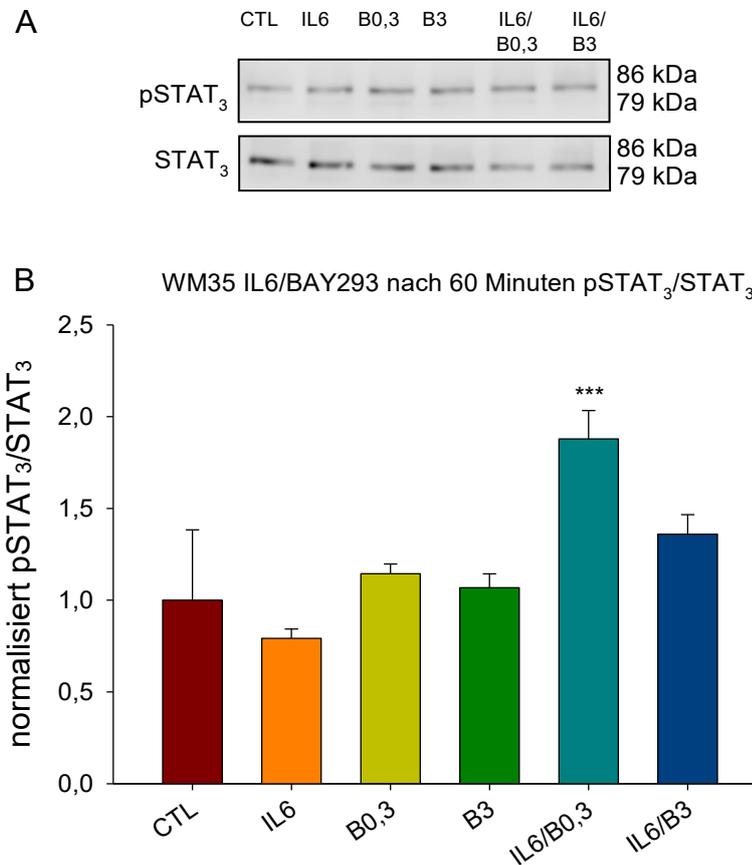


Abbildung 35: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM35 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3 μ M/3 μ M, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)

Der JAK/STAT₃-Signalweg wird in den WM35 Zellen durch IL6 nach 60 Minuten nicht aktiviert. Die Behandlung mit IL6 und BAY293 0,3 μ M erhöht die Aktivität von den Janus-Kinasen, welche STAT₃ phosphorylieren, mit einem p-Wert<0,001. In Abbildung 35 A ist zu erkennen, dass die Intensität der Bande des STAT₃ bei

IL6/B0,3 am schwächsten ist und nach nachfolgender Normalisierung und Berechnung der Ratio resultiert daraus, dass der Balken in B eine so hohe Intensität aufweist.

6.2.2.4 WM278

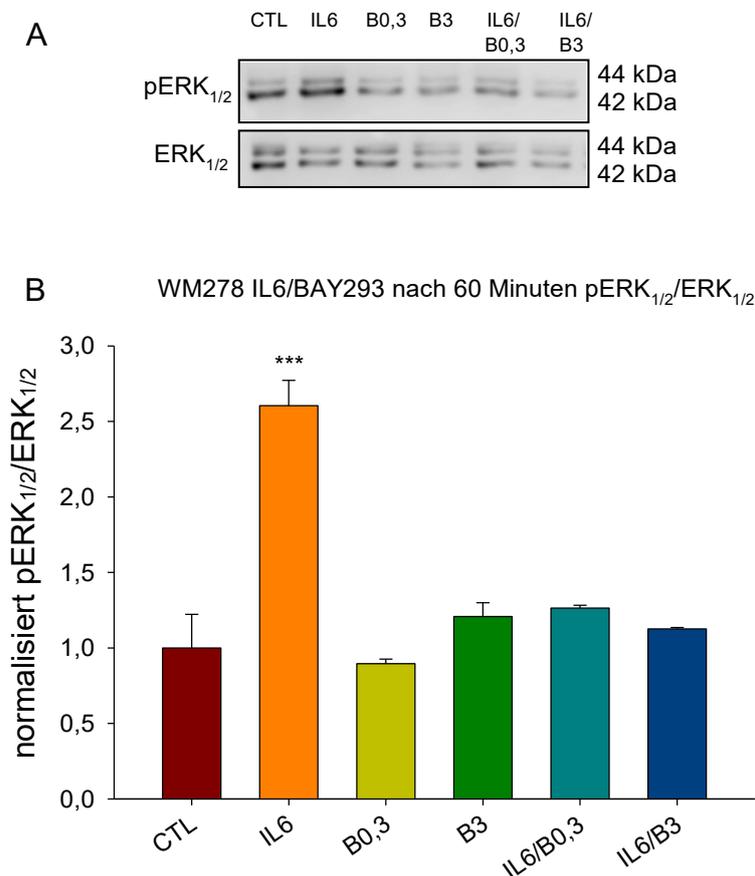


Abbildung 36: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM278 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)

In den nichtmetastasierenden WM278 Zellen ist in den Abbildungen 36 A und B eindeutig zu erkennen, dass Interleukin 6 den MAPK-Signalweg eindeutig aktiviert

($p < 0,001$). Bei allen anderen Behandlungen in diesem Experiment liegt kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle vor. Anders als bei den WM35 Zellen aktiviert BAY293 den Signalweg hier nach 60 Minuten noch nicht. In Abb. 36 A ist sogar eher eine Hemmung bei beiden Inhibitor-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

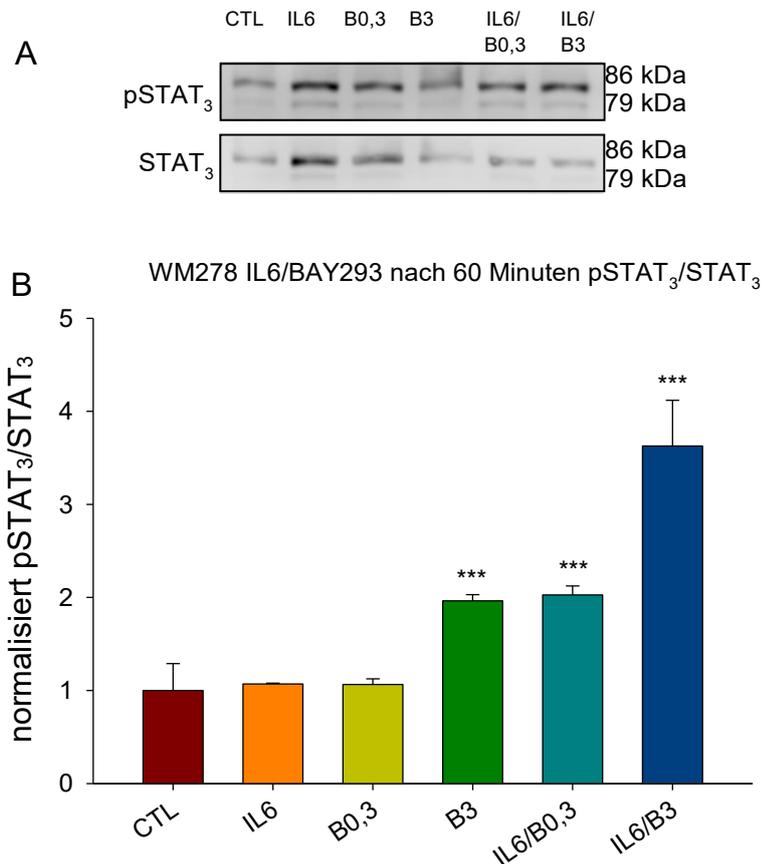


Abbildung 37: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM278 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3 μ M/3 μ M, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)

In Abbildung 37 B ist zu erkennen, dass der JAK/STAT₃-Signalweg in den WM278 Zellen durch IL6 nach 60 Minuten nicht aktiviert wird. Durch die höchste BAY293 Konzentration wird der Signalweg hingegen aktiviert und das könnte ein Beweis

für ein „biased signalling“ sein, denn der Inhibitor hemmt intrazellulär die SOS-Ras Interaktion des MAPK-Signalwegs, wodurch der JAK/STAT₃-Signalweg verstärkt ablaufen könnte und es so dennoch zu einer Zellproliferation kommen könnte. BAY293 (3µM) in Kombination mit dem Zytokin IL6 wird der Signalweg am stärksten aktiviert (p<0,001) und auch die Kombination IL6/B0,3 aktiviert den Signalweg gleichermaßen wie BAY293 3µM allein.

6.2.3 Zeitabhängige Stimulation bzw. Hemmung durch OSM bzw. BAY293

Nun werden die Versuche gezeigt, bei denen die Zeitabhängigkeit nach 30, 60 sowie 120 Minuten an den vier Zelllinien analysiert wurde. Im vorherigen Unterkapitel wurden nur die Zeitpunkte nach 60 Minuten beobachtet. Hier konnte allerdings oft keine Stimulation durch die Zytokine beobachtet werden, deshalb wurden jetzt auch noch die isolierten Proteine bei den beiden anderen Zeitpunkten auf das Polyacrylamidgel aufgetragen um anschließend eine Elektrophorese und einen Western blot durchzuführen. Hiermit sollte gezeigt werden, ob eine etwaige zeitabhängige Hemmung durch BAY293 beziehungsweise Stimulation durch die Zytokine (oder auch durch BAY293 aufgrund eines „biased signalling“) stattfindet.

6.2.3.1 A375

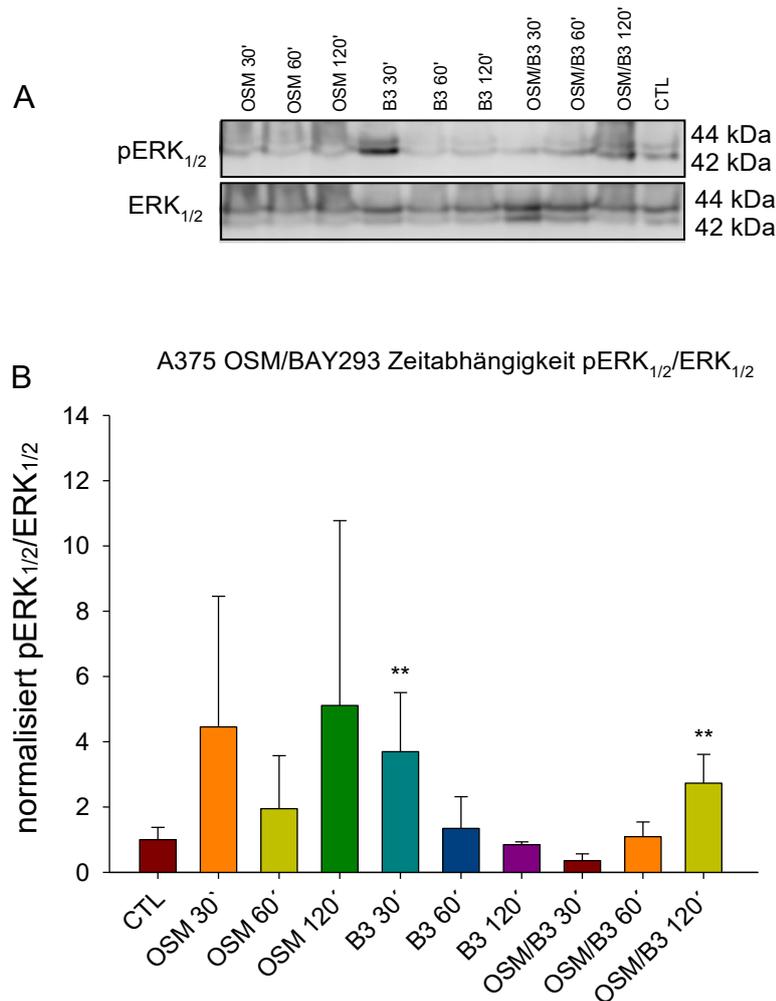


Abbildung 38: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie A375 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01)

In Abb. 38 A und B ist zu erkennen, dass OSM den MAPK-Signalweg nach 30 und 120 Minuten deutlich mehr aktiviert als bei Zeitpunkt 60 Minuten. In Abb. 22 ist eine deutlich stärkere Stimulation durch OSM nach 60 Minuten zu beobachten. Nach 30 Minuten zeigt BAY293 (3µM) eine deutliche Stimulation (p<0,01) und danach eine zeitabhängige Hemmung. Anders ist es in der Kombination mit OSM, hier wird

der Signalweg nach 30 Minuten eher gehemmt und nach 120 Minuten stimuliert ($p < 0,01$).

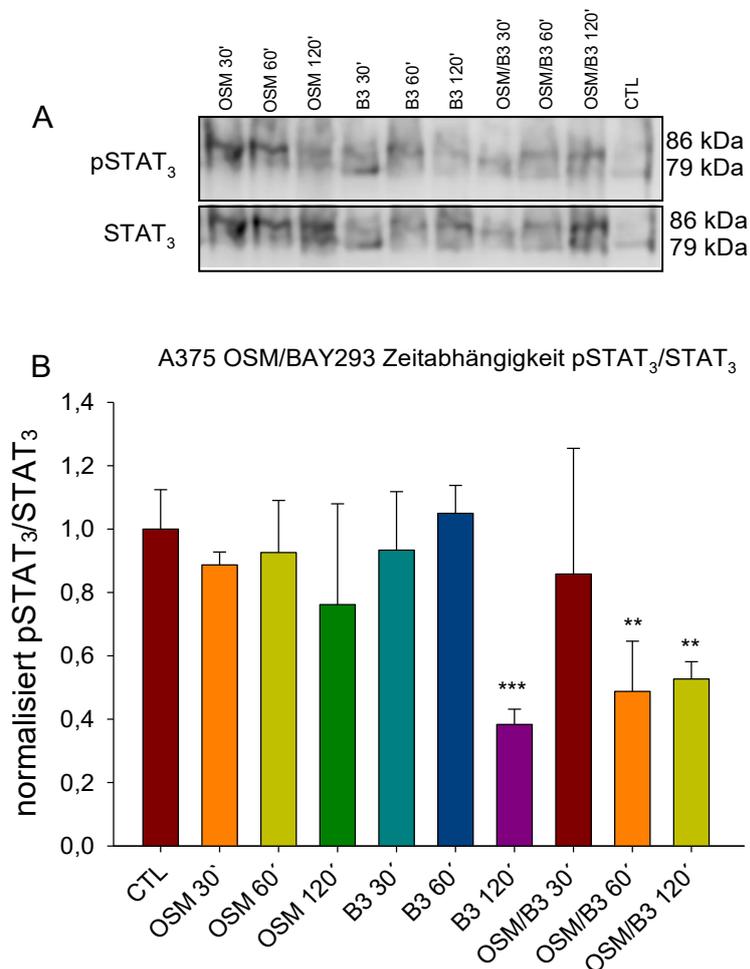


Abbildung 39: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie A375 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3 μ M) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3 μ M) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

In diesem Experiment (Abb. 39) wurde zu keinem Zeitpunkt eine Aktivierung des JAK/STAT₃-Signalwegs durch Oncostatin M beobachtet, so wie bereits in Abbildung 23 (nach 60 Minuten) zu erkennen war. Der Signalweg wird hier durch BAY293 nicht wirklich stimuliert, sondern eher nach 120 Minuten Inkubation stark gehemmt ($p < 0,001$). Nach 60 Minuten kann eine leichte Stimulation beobachtet

werden, dies war auch schon in Abbildung 23 zu erkennen und deutet auf ein mögliches „biased signalling“ hin. Auch in Kombination mit OSM wird der Signalweg mit der Zeit gehemmt und nicht aktiviert.

6.2.3.2 518a2

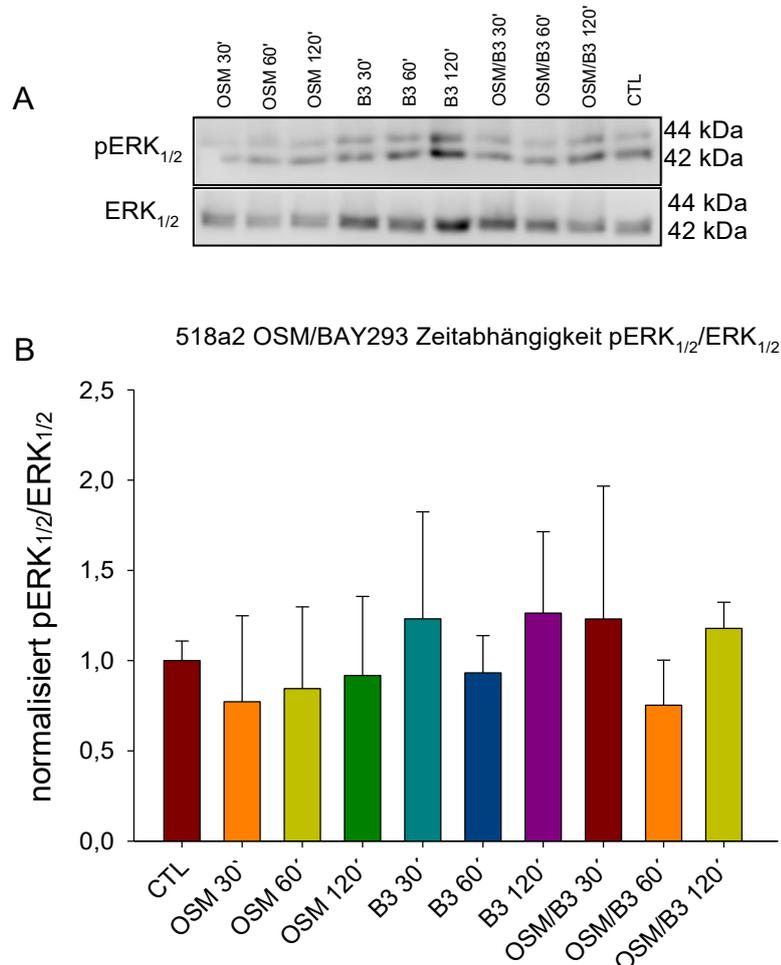


Abbildung 40: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie 518a2 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Bei dem Experiment, welches in Abbildung 40 dargestellt ist, konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Jedoch

konnte hier, anders als bei den A375 Zellen zu keinem Zeitpunkt eine Stimulation des MAPK-Signalwegs durch OSM beobachtet werden. Eine eindeutige Hemmung des Signalweges durch BAY293 konnte hier nicht bestätigt werden. Bei dem 60 Minuten Zeitpunkt der Monotherapie mit BAY293 ist eine schwache Hemmung zu sehen, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Des Weiteren zeigt die Behandlung mit der Kombination aus OSM und BAY293 (3 μ M) nach 60 Minuten eine Verringerung der Phosphorylierung von ERK_{1/2}.

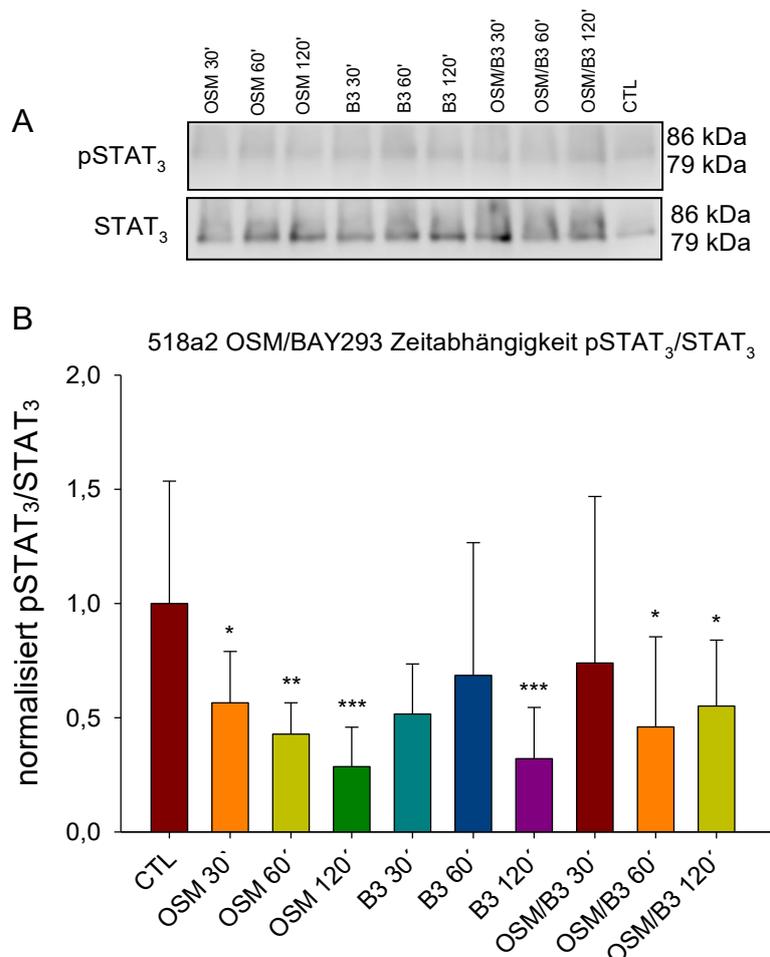


Abbildung 41: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie 518a2 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3 μ M) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3 μ M) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

Oncostatin M zeigt eine signifikant hemmende Wirkung auf den JAK/STAT₃-Signalweg in den 518a2 Zellen (Abb. 41 B). Anders als in den A375 Zellen kann hier gar keine Stimulation durch BAY293 beobachtet werden, eine Gemeinsamkeit findet sich jedoch in der starken Hemmung des Signalweges durch den Inhibitor nach 120 Minuten. Auch die Kombination von OSM und BAY293 (3µM) zeigt zu jedem Zeitpunkt eine Hemmung dieses Signalweges.

6.2.3.3 WM35

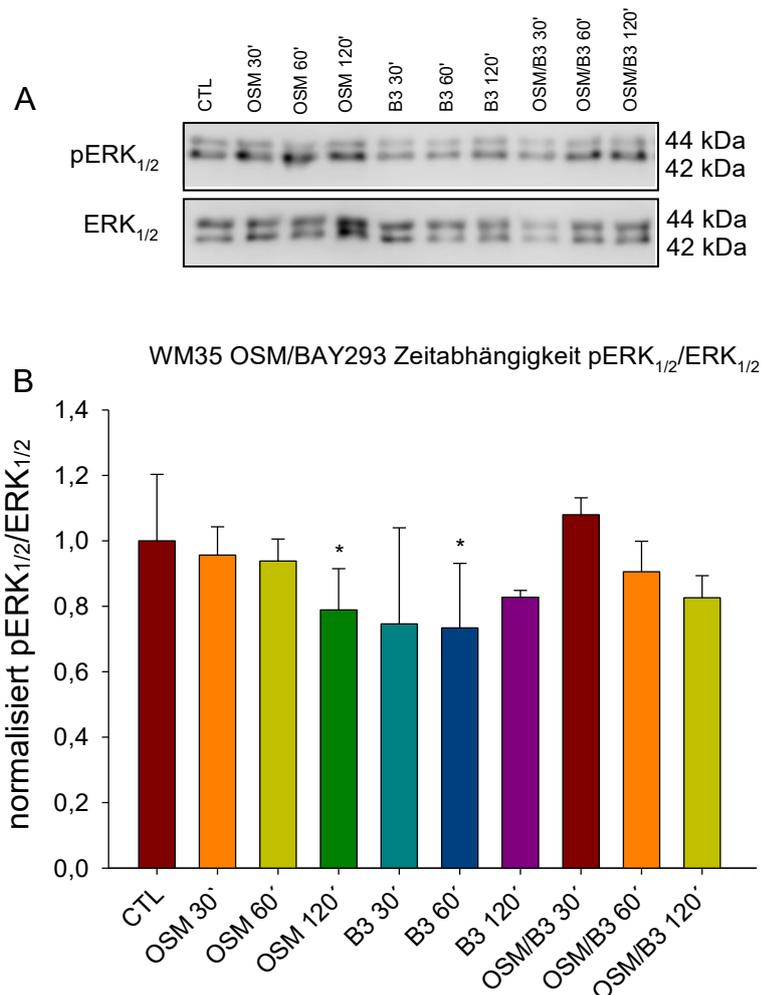


Abbildung 42: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM35 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normali-

siert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$)

Wie bereits bei dem Versuch zum Zeitpunkt nach 60 Minuten (Abb. 34) wurde auch hier (Abb. 42) keine Stimulation des MAPK-Signalwegs durch OSM zu keinem der drei Zeitpunkte beobachtet. Es findet hier eine zeitabhängige Hemmung statt, wobei der Unterschied zur Kontrolle nach 120 Minuten signifikant ($p < 0,05$) ist. Die Behandlung mit BAY293 ($3\mu\text{M}$) zeigt zu jedem Zeitpunkt eine Hemmung des MAPK-Signalwegs. Die Kombination des Zytokins und des Inhibitors zeigt nach 30 Minuten eine Stimulation und zu den beiden späteren Zeitpunkten eine Hemmung.

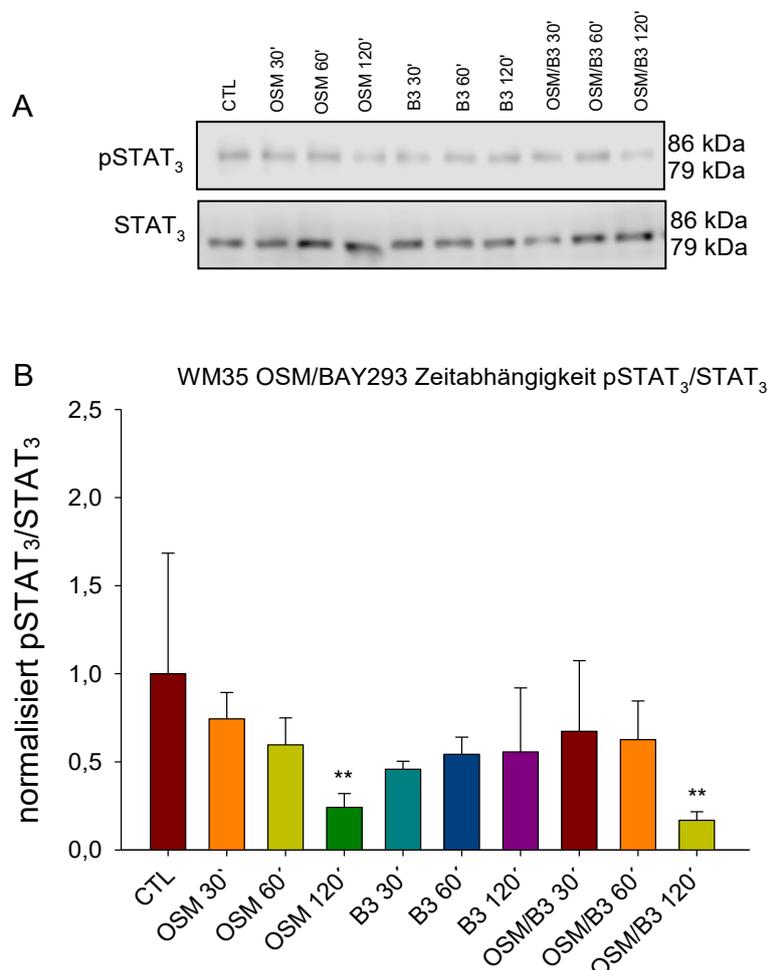


Abbildung 43: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM35 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 ($3\mu\text{M}$) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 ($3\mu\text{M}$) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in

Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: $p < 0,01$)

Wie auch bereits bei den beiden metastasierenden Zelllinien (A375 und 518a2) ist auch bei den nicht-metastasierten WM35 Zellen (Abb. 43) keine Aktivierung des JAK/STAT₃-Signalwegs bei den drei untersuchten Zeitpunkten zu sehen. Dieser Signalweg wird durch Oncostatin M eher mit der Zeit gehemmt. BAY293 zeigt keine Aktivierung der Phosphorylierung von STAT₃, weshalb hier nach den beobachteten Zeitpunkten kein Hinweis auf ein „biased signalling“ zu beobachten ist. Auch die Behandlungen mit der Kombination führt zu einer zeitabhängigen Hemmung.

6.2.3.4 WM278

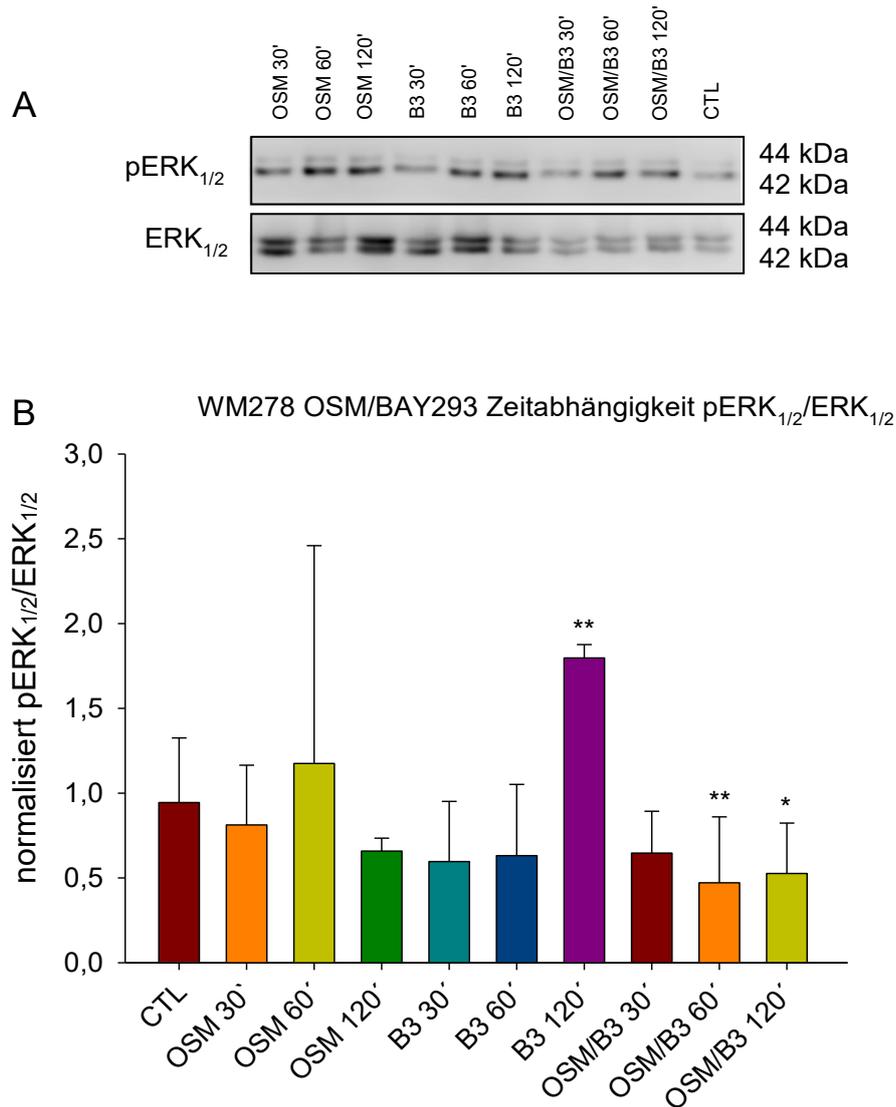


Abbildung 44: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM278 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3 μ M) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3 μ M) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001)

In Abb. 28 ist nur eine leichte Stimulation durch OSM nach 60 Minuten zu erkennen. In der Abbildung 44 A und B ist jedoch nach 60 Minuten eine deutliche Erhöhung der Aktivität von MEK_{1/2} und somit einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs

zu beobachten. Der Signalweg wird hier durch BAY293 3µM bereits nach 120 Minuten aktiviert.

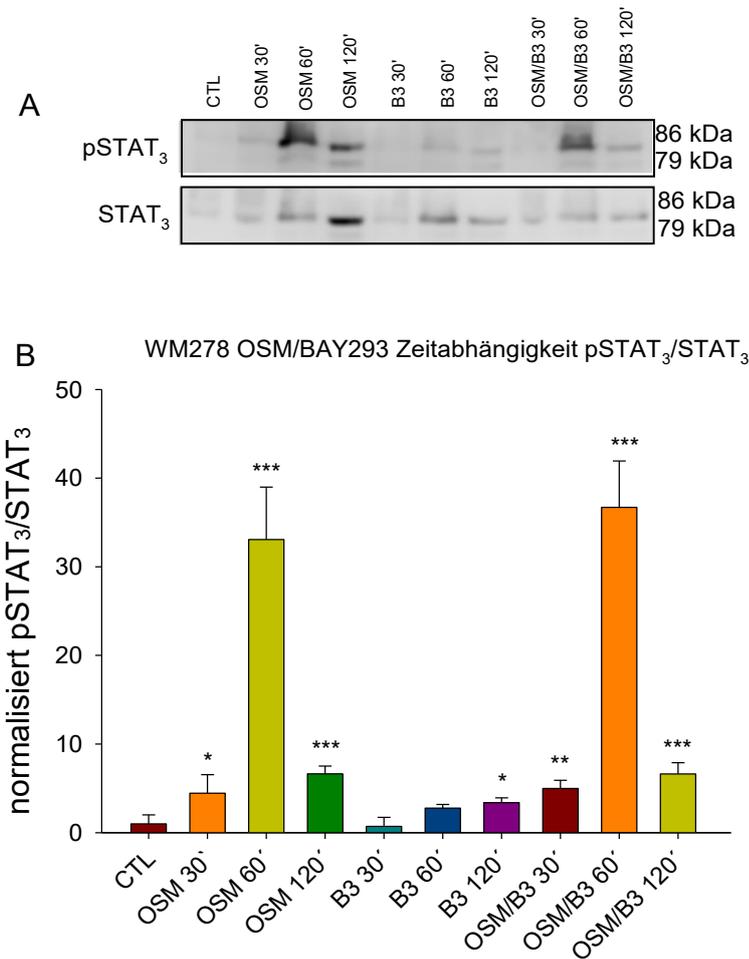


Abbildung 45: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM278 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

Wie auch bereits in Abb. 29 zu erkennen ist, stimuliert Oncostatin M in den WM278 Zellen auch hier (Abb. 45 A und B) den JAK/STAT₃-Signalweg. Dies wurde in den anderen Zelllinien nicht beobachtet. In den WM35 Zellen wird durch BAY293 eine Hemmung dieses Signalweges erreicht und in den WM278 Zellen eine statistisch

signifikante Stimulierung. Auch die Kombination des Zytokins und des Inhibitors führt zu einer Aktivierung.

6.2.4 Zeitabhängige Stimulation bzw. Hemmung durch IL6 bzw. BAY293

6.2.4.1 A375

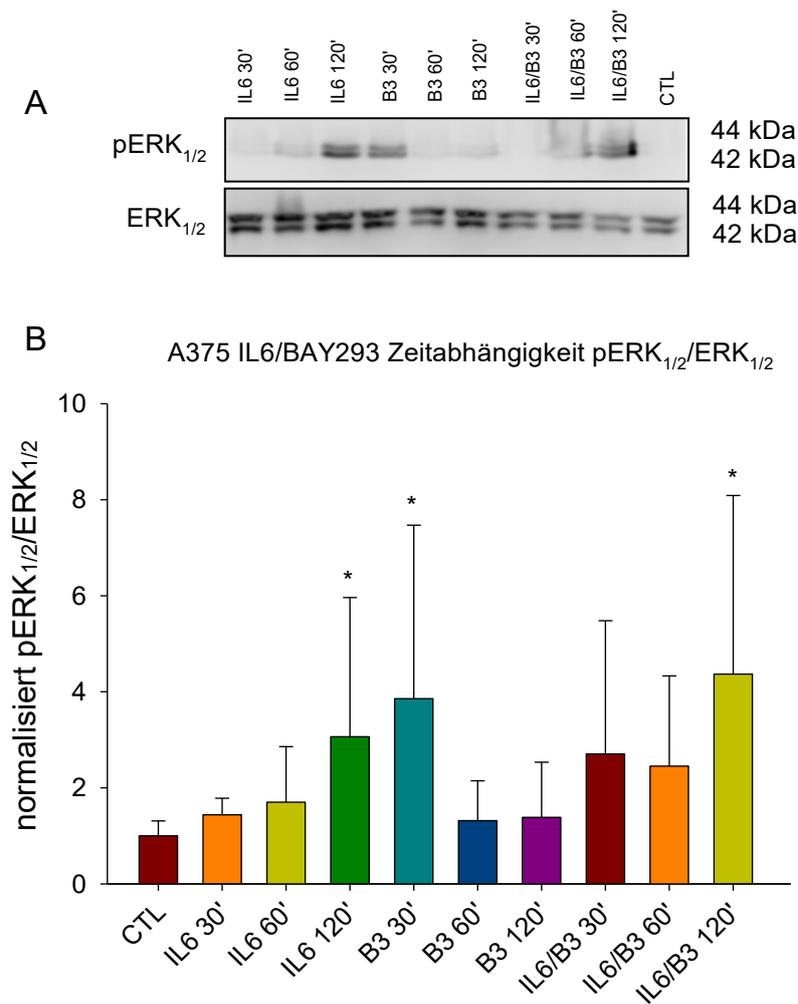


Abbildung 46: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie A375 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normali-

siert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$)

Interleukin 6 stimuliert das Wachstum in den metastasierten Zellen (A375), vor allem ist eine zeitabhängige Stimulation zu beobachten, welche mit der Zeit stärker wird (Abb. 46 A und B). Wie auch in Abb. 38 ist hier zu erkennen, dass BAY293 ($3\mu\text{M}$) nach 30 Minuten eher stimulierend auf den MAPK-Signalweg wirkt und auch die Kombination mit dem Zytokin IL6 aktiviert die Phosphorylierung von ERK_{1/2} nach 120 Minuten.

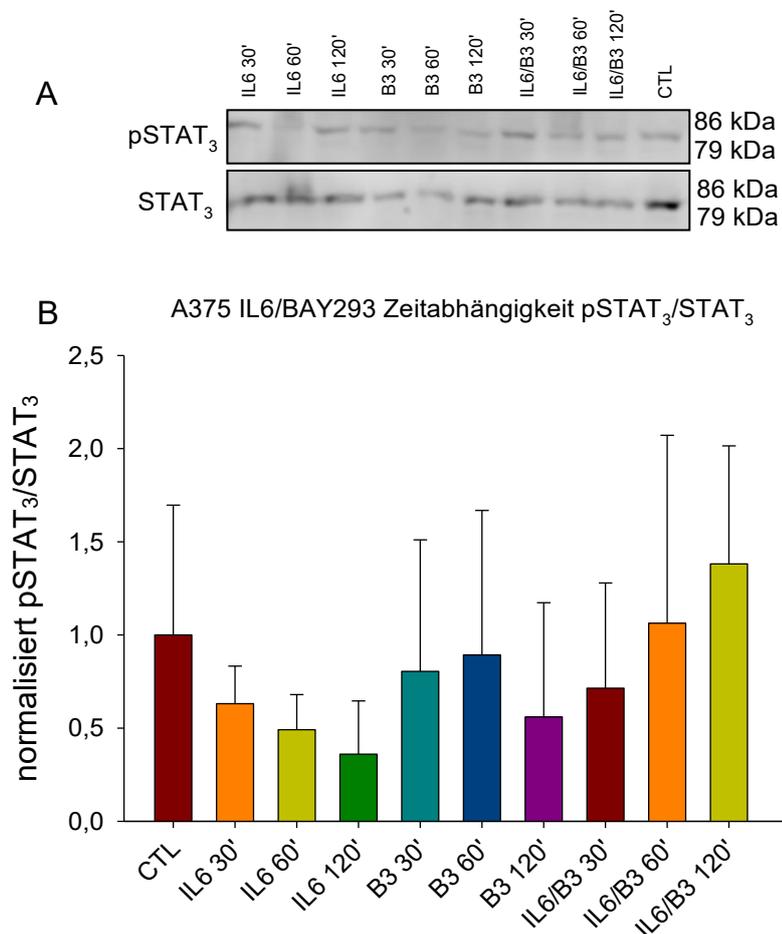


Abbildung 47: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie A375 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 ($3\mu\text{M}$) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 ($3\mu\text{M}$) in den 6cm^2 Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio

(Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

In Abbildung 47 ist zu erkennen, dass der JAK/STAT₃-Signalweg in den A375 Zellen durch Interleukin 6 zu keinem der drei Zeitpunkte aktiviert wird, dies war bereits in Abbildung 31 zu erkennen. Anders als in Abb. 31 konnte hier keine Aktivierung dieses Signalwegs durch den SOS1-Ras Inhibitor beobachtet werden, jedoch sind bei diesen Versuchen die Fehlerbalken sehr groß. Allerdings wird in Kombination mit IL6 eine zeitabhängige Stimulation des Signalwegs beobachtet.

6.2.4.2 518a2

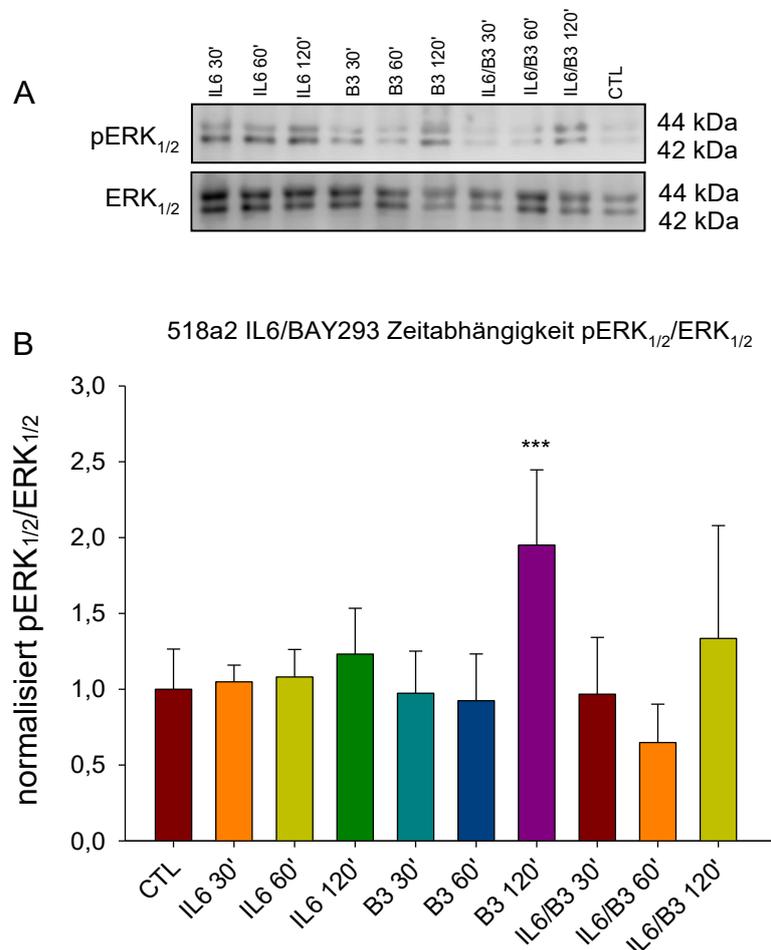


Abbildung 48: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie 518a2 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3 μ M) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3 μ M) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A).

Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)

Der MAPK-Signalweg wird in den 518a2 Zellen nur leicht durch IL6 zeitabhängig stimuliert (Abb. 48). Durch BAY293 ($3\mu\text{M}$) tritt nach 30 und 60 Minuten nur eine leichte Hemmung der Phosphorylierung von ERK_{1/2} ein und aus unbekanntem Gründen wurde hier nach 120 Minuten Inkubation mit dem Inhibitor eine starke Stimulation des Signalwegs festgestellt. Dieses Phänomen wurde zuvor nur in den WM-Zellen festgestellt. Die kombinierte Behandlung zeigt in den beiden früher Zeitpunkten auch eher eine Hemmung und nach 120 Minuten dann eine Stimulation.

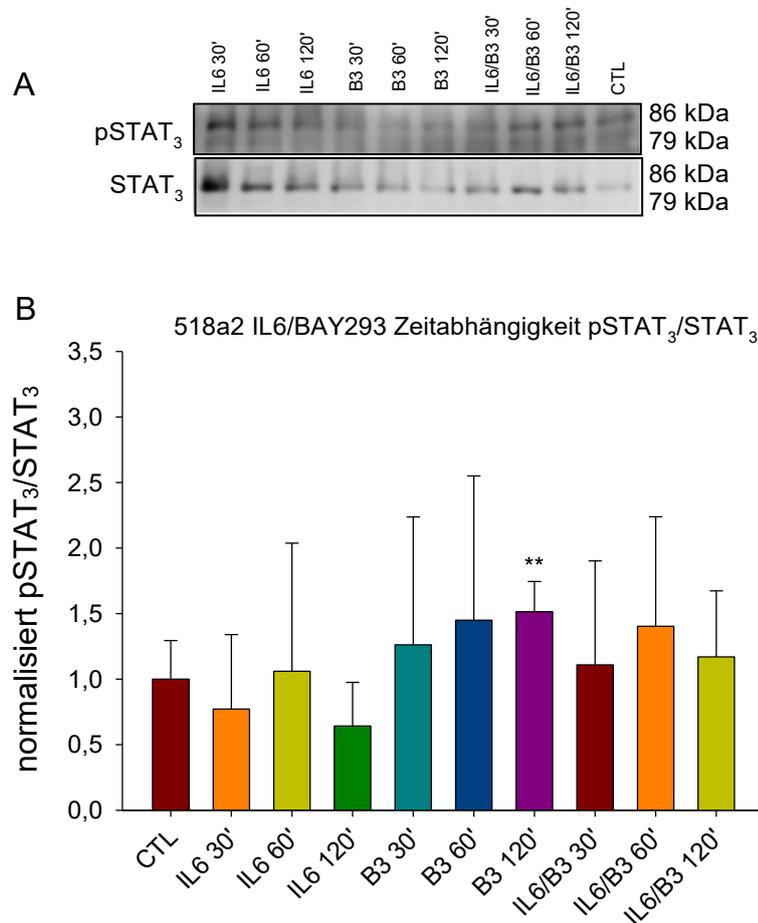


Abbildung 49: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie 518a2 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 ($3\mu\text{M}$) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 ($3\mu\text{M}$) in den 6cm^2 Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt

(A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: $p < 0,01$)

Interleukin 6 aktiviert nach 60 Minuten Inkubation den JAK/STAT₃-Signalweg nur leicht und die Standardabweichung ist hier sehr groß (Abb. 49). In Abbildung 33 ist deutlich zu erkennen, dass IL6 nach 60 Minuten den Signalweg nicht aktiviert. Im Gegensatz hierzu kann BAY293 (3 μ M) den Signalweg zu jedem hier gemessenen Zeitpunkt aktivieren, was in Abb. 33 bereits nach 60 Minuten zu erkennen war. Auch in der Kombination mit dem Inhibitor und dem Zytokin kann der Signalweg, vor allem nach 60 Minuten, stimuliert werden.

6.2.4.3 WM35

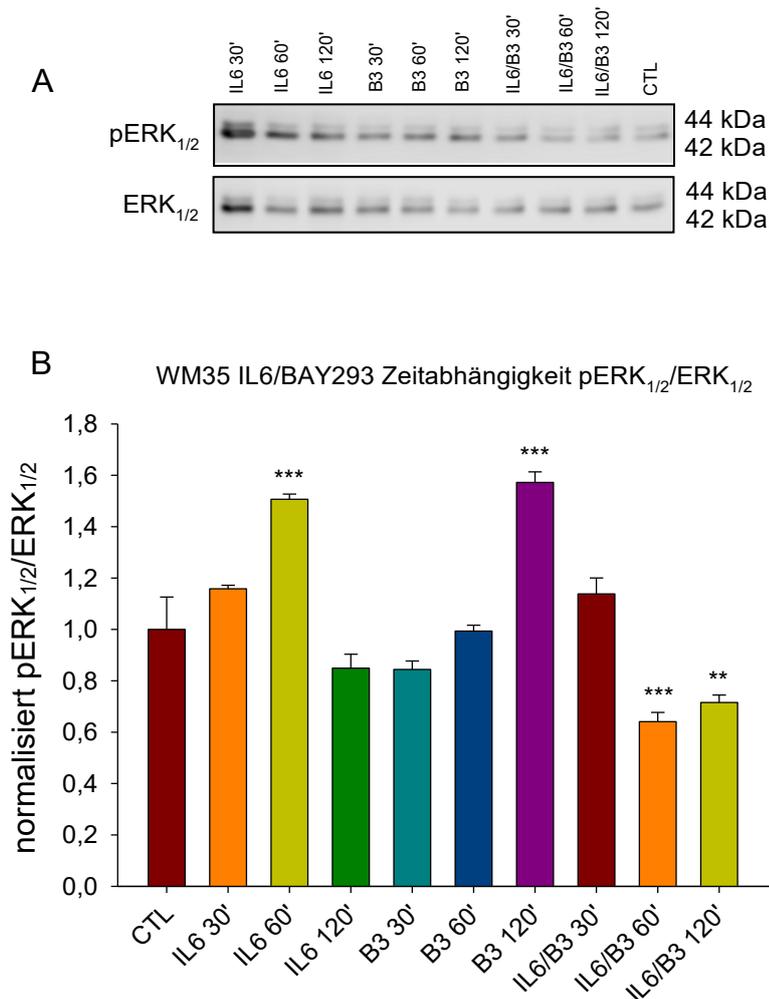


Abbildung 50: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM35 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001)

In den WM35 Zellen (Abb. 50) ist zu erkennen, dass Interleukin 6 bereits nach 30 Minuten den MAPK-Signalweg aktiviert und nach 60 Minuten den Höhepunkt der Stimulation erreicht. Nach 120 Minuten wird der Signalweg durch IL6 nicht aktiviert. Durch den Inhibitor BAY293 wird eine zeitabhängige Stimulation der Phosphory-

lierung von ERK_{1/2} durch MEK_{1/2} erreicht, dies konnte in den vorherigen Experimenten bei den nichtmetastasierten Zelllinien schon beobachtet werden. Anders als in Abbildung 34 B wird hier bei der Kombinationsbehandlung nach 60 und auch nach 120 Minuten eine Hemmung des Signalweges beobachtet.

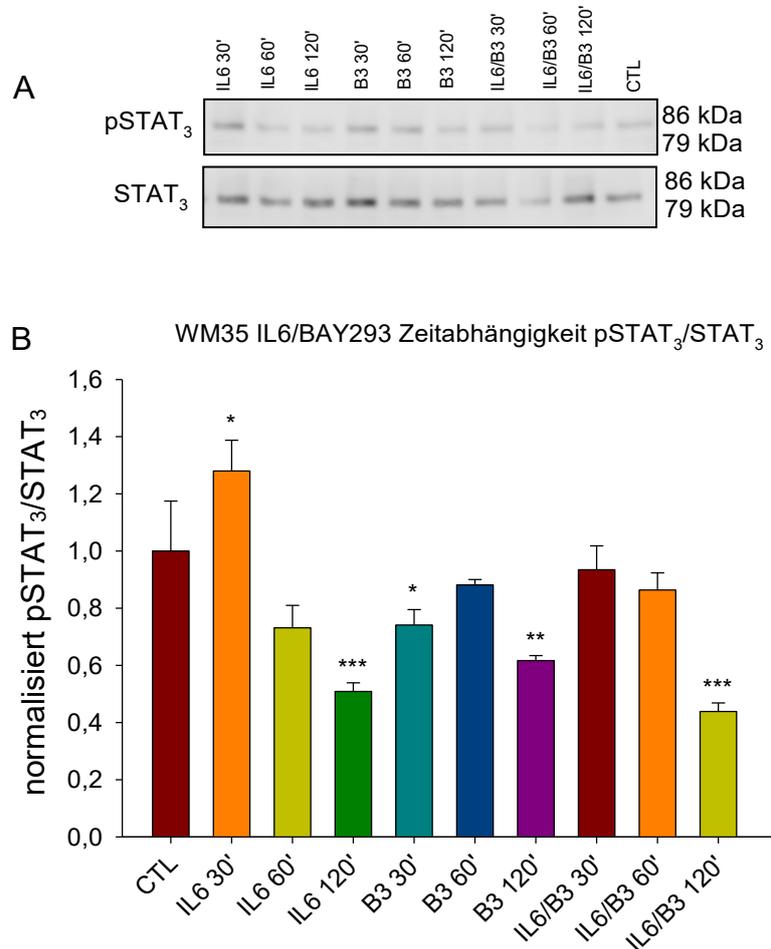


Abbildung 51: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM35 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

Der JAK/STAT₃-Signalweg kann durch Interleukin 6 in den WM35 Zellen nach 30 Minuten aktiviert werden (Abb. 51 B), jedoch tritt zu späteren Zeitpunkten eine Hemmung ein, wie es auch schon in Abbildung 35 B zu erkennen war. Durch den

SOS-Ras-Interaktionsinhibitor wird hier keine Stimulation des Signalwegs erreicht, womit hier kein Hinweis auf ein „biased signalling“ vorhanden ist.

6.2.4.4 WM278

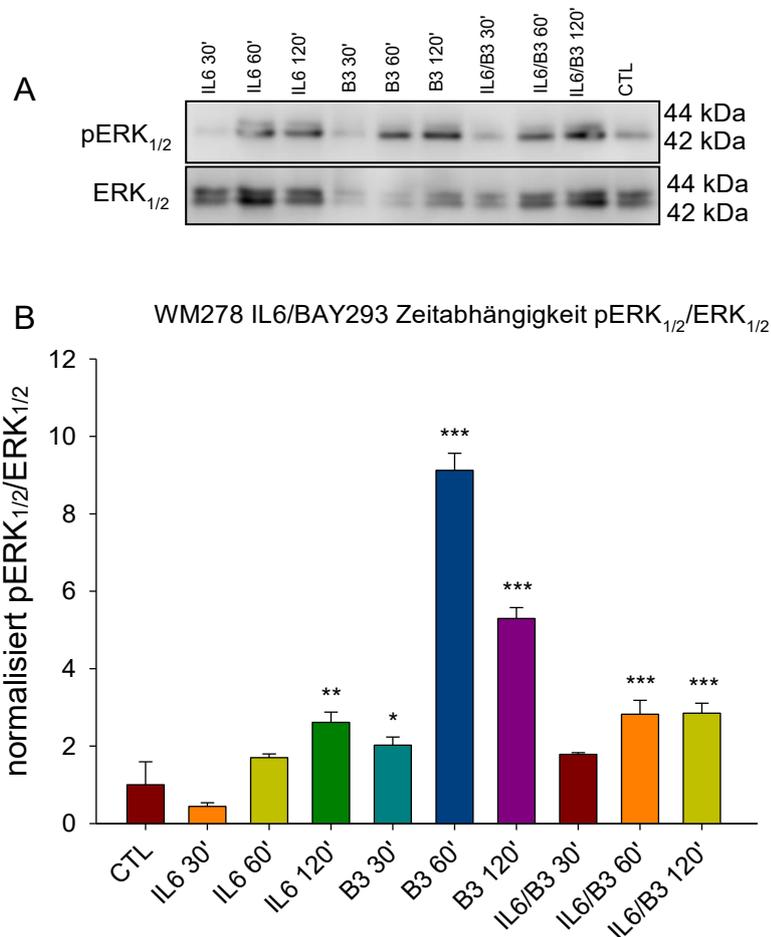


Abbildung 52: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM278 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

Durch IL6 wird der MAPK-Signalweg in den WM278 Zellen (Abb. 52), wie auch in den WM35 Zellen (Abb. 50), aktiviert. Allerdings ist hier die stärkste Aktivität nach 120 Minuten. Des Weiteren ist auch hier wieder eine starke Stimulation durch

BAY293 (3 μ M) allein und auch eine leichtere Aktivierung in der Kombination mit IL6 zu beobachten. Diese starke Aktivität von MEK_{1/2} nach 60 Minuten mit der Behandlung mit dem Inhibitor konnte in der Abb. 36 nicht gezeigt werden.

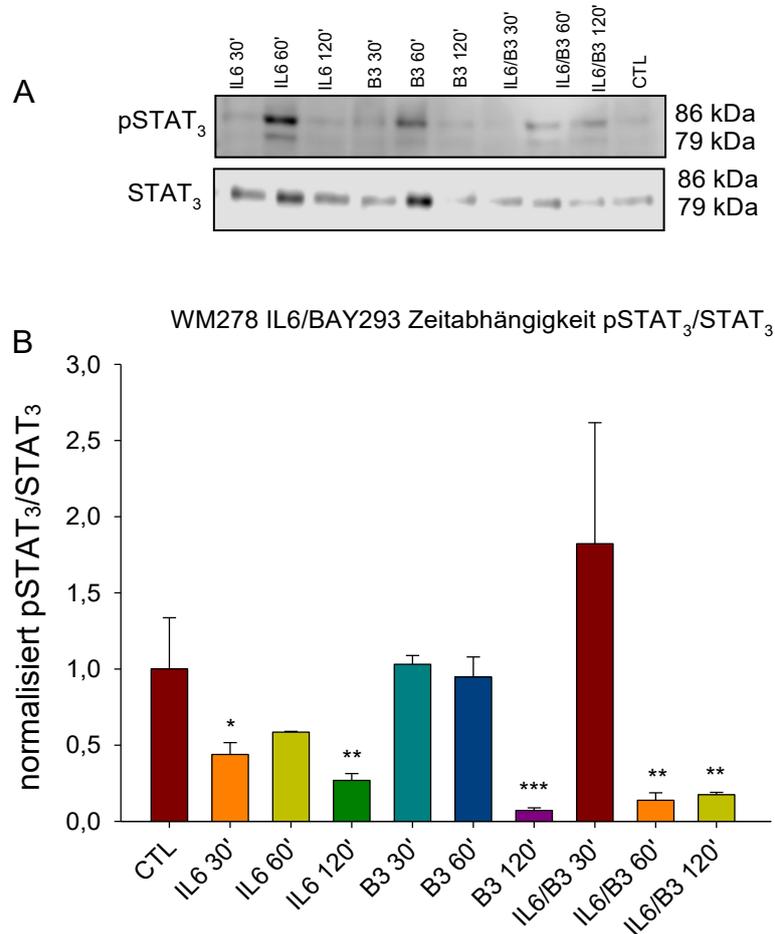


Abbildung 53: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM278 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3 μ M) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3 μ M) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolierung. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

Im Gegensatz zu den WM35 Zellen wird in den WM278 Zellen der JAK/STAT₃-Signalweg durch Interleukin 6 gehemmt (Abb. 53 B). BAY293 zeigt bei diesem Versuch keine Erhöhung der Aktivität von den Janus-Kinasen, sondern nach 120

Minuten sogar eine signifikante Hemmung der Phosphorylierung von STAT₃ durch die Janus-Kinasen.

6.3 Viabilität (MTT-Assay)

6.3.1 Viabilität nach 24 Stunden Inkubationszeit

In allen untersuchten Zelllinien (A375, 518a2, WM35 und WM278) ist zu erkennen, dass bei den folgenden BAY293 Konzentrationen, nämlich 0,1µM und 1µM, die Viabilität nach 24 Stunden stark sinkt. Ein möglicher Grund hierfür könnte die höhere Konzentration an DMSO (Dimethylsulfoxid) sein, was zu einem verstärkten Absterben der Zellen führen könnte. In Abbildung 54 B ist zu sehen, dass OSM und IL6 zu einer leichten Proliferation der A375 Zellen führt, wohingegen die Zellen, die mit OSM bzw. IL6 in Kombination mit BAY293 0,1µM (höhere DMSO-Konzentration) behandelt wurden, eine geringere Viabilität nach 24 Stunden aufweisen. Dies ist ebenso bei allen anderen Zelllinien beobachtet worden. Die anderen Kombinationen von Zytokinen und Inhibitor zeigten keine Verringerung der Viabilität nach 24 Stunden der A375 Zellen. Im Gegensatz zu den A375 Zellen zeigen die anderen metastasierenden Zellen (518a2) keine Zunahme der Viabilität durch OSM und IL6 (Abb. 55 B). In den 518a2 Zellen führen auch die beiden Kombinationen OSM/BAY293 (0,3µM) und OSM/BAY293 (3µM) zum Absterben der Zellen nach 24 Stunden, diese Unterschiede sind teilweise signifikant gegenüber der Kontrolle. Die beiden nichtmetastasierenden Zelllinien, WM35 und WM278, zeigen keine Stimulation der Zellproliferation durch die beiden Zytokine nach 24 Stunden (Abb. 56 B und 57 B). Bei den WM35 Zellen (Abb. 56 B) wird die Viabilität durch die Kombinationen OSM/BAY293 (0,03µM), OSM/BAY293 (3µM) und IL6/BAY293 (3µM) nach 24 Stunden Inkubationszeit signifikant erniedrigt. Bei den WM278 Zellen (Abb. 57) wird die Viabilität bei den Kombinationen leicht verringert, jedoch sind die Unterschiede gegenüber der Kontrolle nicht signifikant.

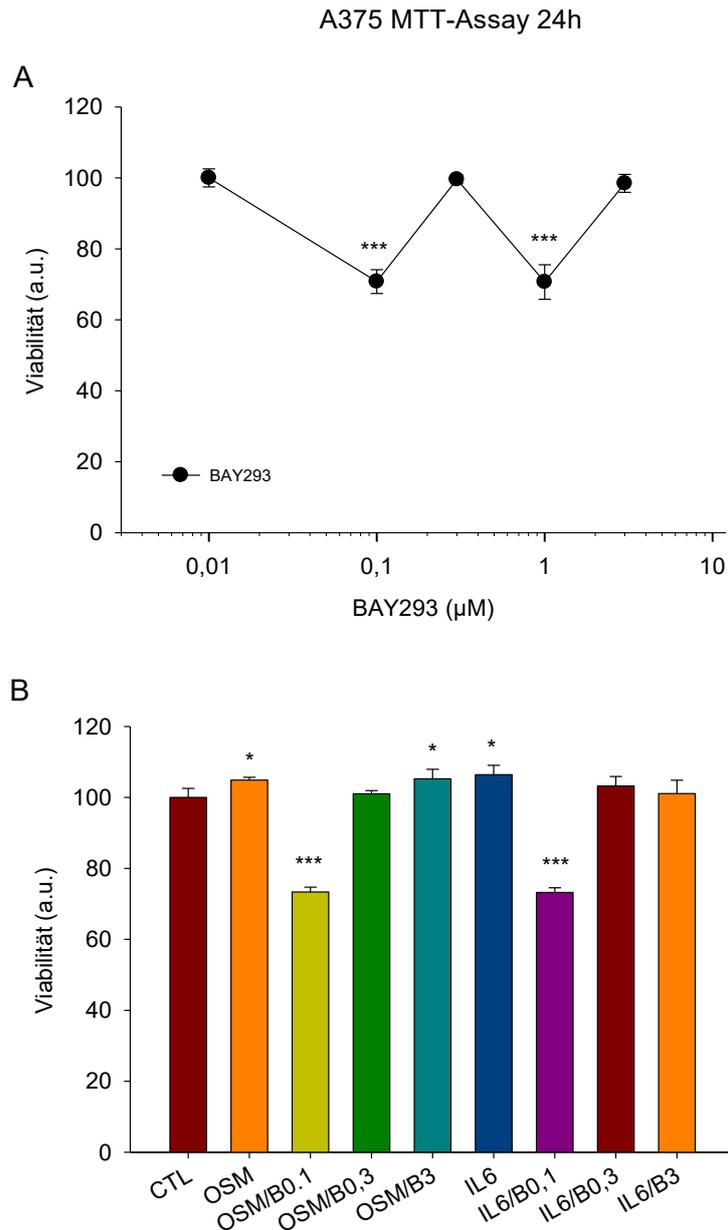


Abbildung 54: Viabilität der Zellen (A375) 24 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1µM, 0,3µM, 1µM und 3µM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1µM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$)

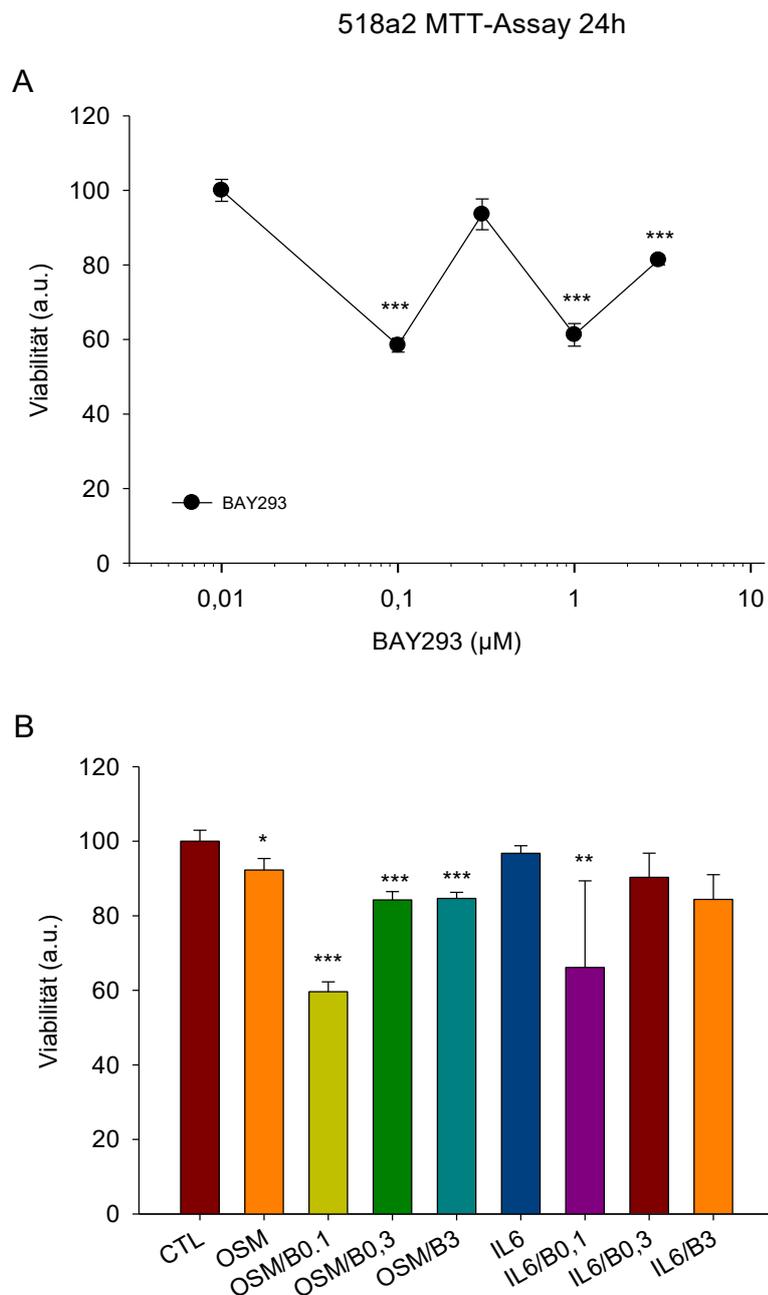


Abbildung 55: Viabilität der Zellen (518a2) 24 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1µM, 0,3µM, 1µM und 3µM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1µM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und

die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden.
 (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

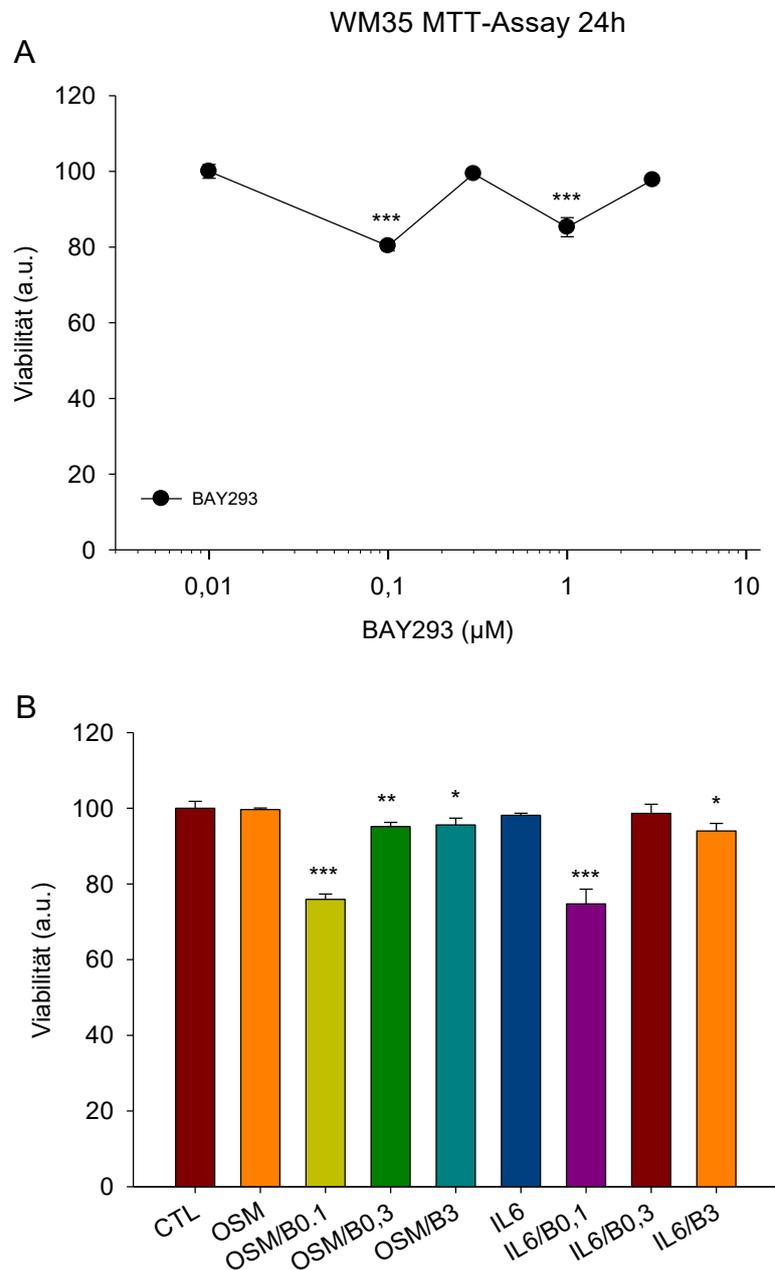


Abbildung 56: Viabilität der Zellen (WM35) 24 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1μM, 0,3μM, 1μM und 3μM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1μM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und

anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

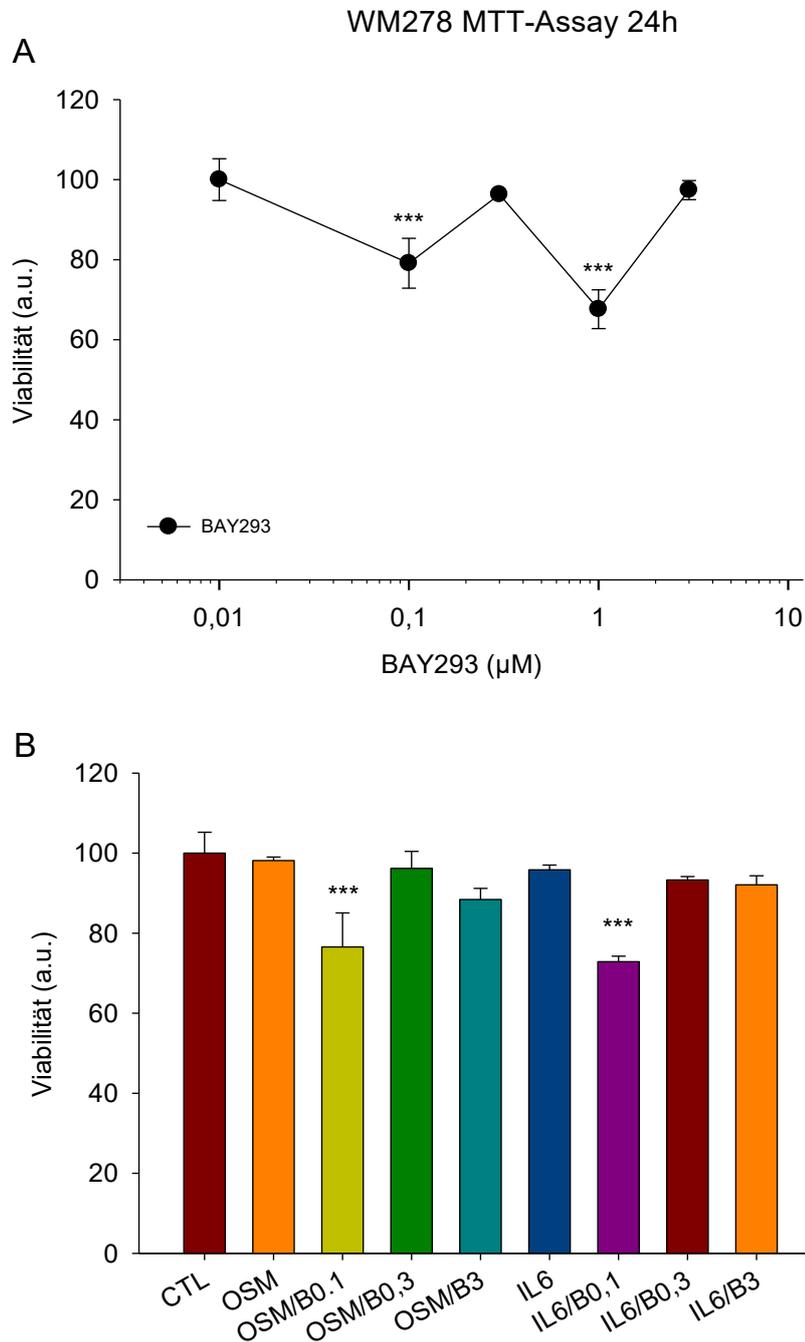


Abbildung 57: Viabilität der Zellen (WM278) 24 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1µM, 0,3µM,

1µM und 3µM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1µM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden.

(Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)

6.3.2 Viabilität nach 48 Stunden Inkubationszeit

Bei den A375 und bei den WM278 Zellen wurde die Viabilität auch noch nach 48 Stunden Inkubationszeit gemessen. Auch hier ist in Abbildung 58 und 59 zu erkennen, dass die höhere Konzentration an DMSO bei BAY293 0,1µM und 1µM eine verringerte Viabilität zu Folge haben (***: $p < 0,001$). In der Abbildung 58 B ist zu sehen, dass die beiden Zytokine das Zellwachstum in den A375 Zellen nicht anregen und es gibt somit keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Auch in Kombination mit BAY293 ist eher eine leichte Verringerung der Viabilität zu sehen. In Abbildung 59 B ist bei den WM278 Zellen, die mit den beiden Zytokinen behandelt wurden, die Viabilität ein wenig größer, jedoch liegt kein signifikanter Unterschied vor. Diese Erhöhung der Viabilität konnte nach 24 Stunden noch nicht beobachtet werden. Die Kombination von OSM und BAY293 3µM zeigt eine verringerte Viabilität in den nicht-metastasierten Zellen nach 48 Stunden und die Kombination von IL6 und BAY293 0,3µM zeigt in diesem Experiment die stärkste Erhöhung der Viabilität.

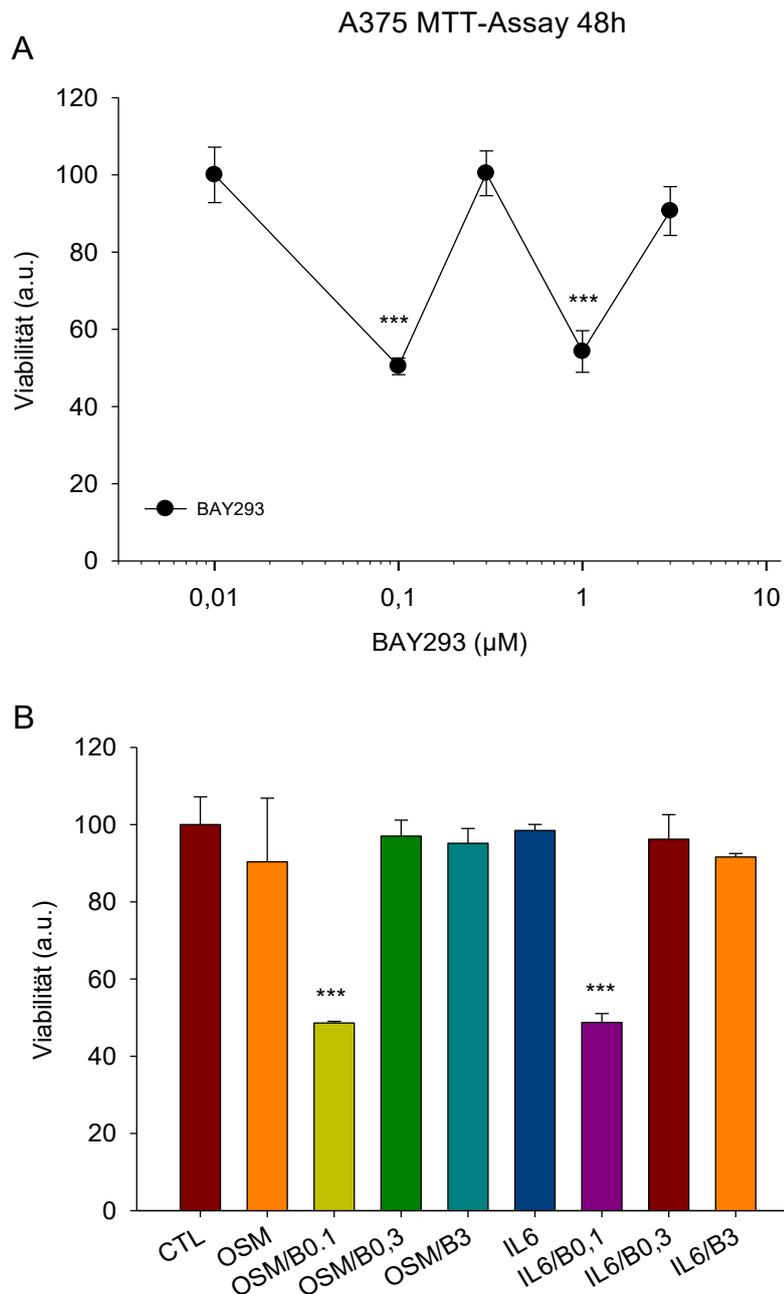


Abbildung 58: Viabilität der Zellen (A375) 48 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1µM, 0,3µM, 1µM und 3µM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1µM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den

Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden.
 (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)

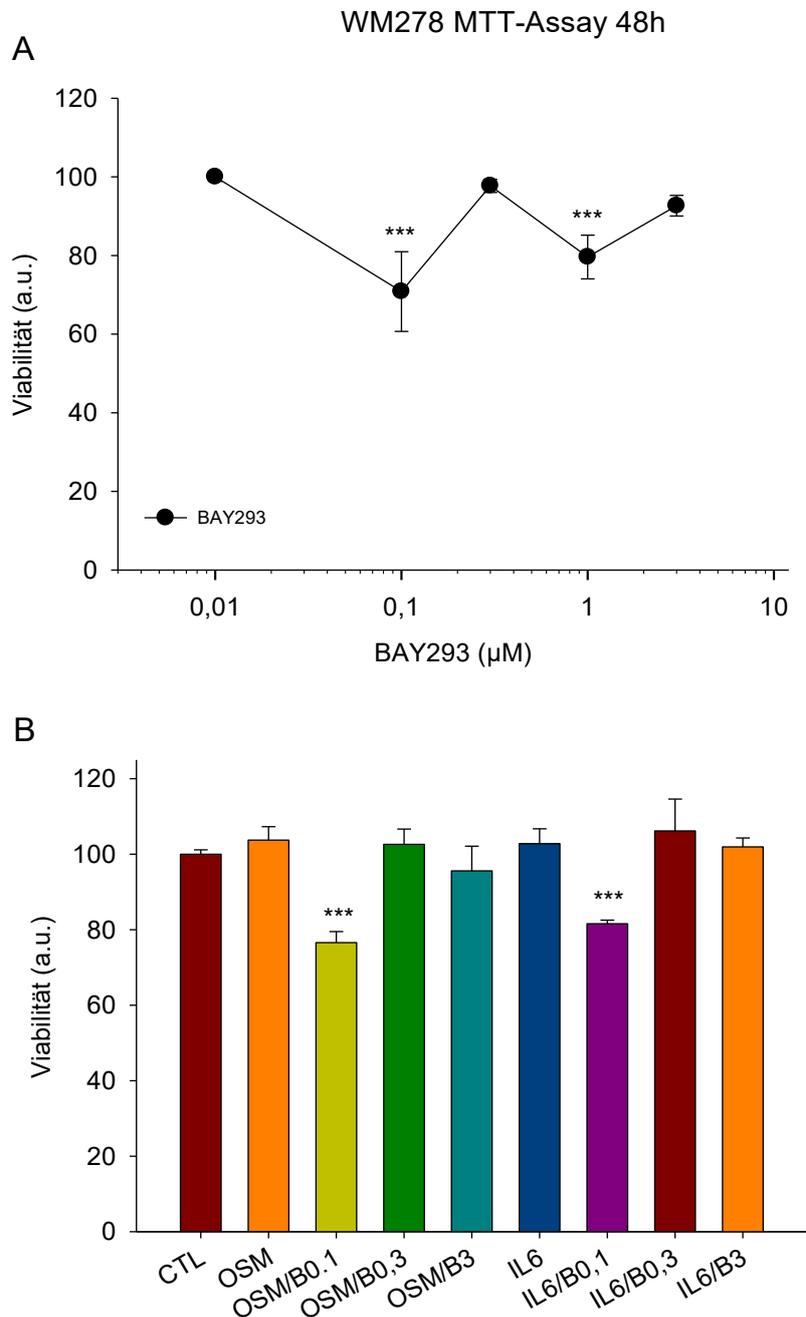


Abbildung 59: Viabilität der Zellen (WM278) 48 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1μM, 0,3μM, 1μM und 3μM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1μM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und

anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden.
(Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)

7 DISKUSSION

In meiner Arbeit sollte das Verhalten von den beiden Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293 (0,3 μ M und 3 μ M) in Melanomzellen, in Abhängigkeit ihres Stadiums (frühe Wachstumsphase und metastasiert), der Zeit (30, 60 und 120 Minuten) und der Konzentration von BAY293 (nach 24h), untersucht werden. Bei den drei kurzen Expositionszeiten wurden der MAPK- und der JAK/STAT₃-Signalweg untersucht. Um noch genauere Aussagen zu treffen, müssten hier auch noch die anderen Signalwege (p38 und PI3K/AKT) untersucht werden. Bei der Behandlung mit BAY293 (in den Konzentrationen 0,2 μ M, 0,8 μ M, 2 μ M und 8 μ M) wurden die vier Signalwege, welche in der Einleitung kurz beschrieben wurden, untersucht, um ein eventuell vorhandenes „biased signalling“, also eine „Kommunikation“, zwischen den Signalwegen nachzuweisen.

7.1 Zeitabhängige Stimulation bzw. Hemmung des MAPK- und des JAK/STAT3-Signalwegs durch IL6/OSM/BAY293 nach 30, 60 und 120 Minuten

7.1.1 Auswirkungen auf die Zellen durch exogenes IL6

Die metastasierten Zelllinien (A375 und 518a2) sezernieren im Gegensatz zu den „early stage“ Zellen (WM35 und WM278) eine hohe Menge an Interleukin 6. (Minichsdorfer et al., 2015) Diese hohen Konzentrationen an IL-6 könnten das invasive Wachstum erklären und Anreicherung von Entzündungszellen in der Mikroumgebung des Tumors.

7.1.1.1 Phosphorylierung von ERK1/2

IL6 stimuliert die Phosphorylierung von ERK_{1/2} in den A375 Zellen (Abb. 30 und 46) und etwas schwächer in 518a2 Zellen (Abb. 32 und 48), aber auch in den „early stage“ Melanomzellen, WM35 (Abb. 34 und 50) und WM278 (Abb. 36 und 52).

Das Ziel einer Studie aus dem Jahr 2021 war es, die Expression von IL6 und PD-L1 (programmed cell death ligand 1) bei Schilddrüsenkrebs zu untersuchen und

ob IL6 die PD-L1-Expression reguliert. Die Forschungsgruppe fand heraus, dass IL6 und PD-L1 im Gewebe des Schilddrüsenkrebses hoch exprimiert wurde. IL-6 stimulierte die PD-L1-Expression über die MAPK- und JAK/STAT₃-Signalwege. Die Metastasierung, die Tumorgröße und die Risikostratifizierung soll signifikant mit der IL6-Expression assoziiert sein. (Zhang et al., 2021) Durch meine Forschungsergebnisse konnte gezeigt werden, dass der MAPK-Signalweg in den vier untersuchten Melanomzellen durch exogen zugeführtes IL6 ebenso aktiviert wird.

7.1.1.2 Phosphorylierung von STAT3

Der JAK/STAT₃-Signalweg wurde durch Interleukin 6 in den A375 Zellen (Abb. 31 und 47) im Vergleich zur Kontrolle zu jedem gemessenen Zeitpunkt inhibiert und dieses Ergebnis konnte auch gut reproduziert werden. In Kombination mit BAY293 ist nach 60 Minuten eine Zunahme der Phosphorylierung bis 120 Minuten zu sehen. Auch in den WM278 Zellen (Abb. 35 und 53) wurde zu jedem Zeitpunkt eine Hemmung der Phosphorylierung von STAT₃ beobachtet, jedoch in Kombination mit BAY293 wird der Signalweg nur nach 30 Minuten stark aktiviert (Abb. 53). Die anderen nichtmetastatischen Zellen (Abb. 51) zeigten nur nach 30 Minuten eine Aktivierung des JAK/STAT₃-Signalwegs und danach eine zunehmende Hemmung und auch in Kombination mit dem Inhibitor wird der Signalweg gehemmt. Die 518a2 Zellen (Abb. 49) zeigten nur nach 60 Minuten eine leichte Stimulation, auch in Kombination mit BAY293.

Laut Literatur sollte IL6 den JAK/STAT₃-Signalweg aktivieren (Siewert et al., 1999), dies konnte im Zuge meiner Forschung in einigen Experimenten beobachtet werden.

7.1.2 Auswirkungen auf die Zellen durch exogenes OSM

7.1.2.1 Phosphorylierung von ERK1/2

Die Phosphorylierung von ERK_{1/2} fand in den A375 Zellen zu jedem Zeitpunkt statt (Abb. 22 und 38), durch BAY293 kann diese starke Stimulation etwas unterdrückt werden. In den anderen metastatischen Zellen (518a2) wurde eine Hemmung

durch OSM beobachtet (Abb.40). Die WM35 Zellen zeigten zu jedem Zeitpunkt dasselbe Ergebnis, nämlich eine Hemmung der Phosphorylierung von ERK_{1/2} (Abb. 26 und 42). Die WM278 Zellen zeigten hier nur nach 60 Minuten eine Aktivierung von ERK_{1/2} (Abb. 28 und 44), diese Aktivierung konnte mit BAY293 in diesem Experiment (Abb. 44 B) unterdrückt werden.

OSM sollte den MAPK-Signalweg aktivieren (Heinrich et al., 2003), dies konnte in einigen Experimenten gesehen werden, jedoch nicht bei den WM35 Zellen.

7.1.2.2 Phosphorylierung von STAT3

Der JAK/STAT₃-Signalweg wird in metastasierten Zellen (Abb. 23 und 39 für A375, Abb. 25 und 41 für 518a2) oder WM35 (Abb. 27 und 43) zu jedem gemessenen Zeitpunkt durch OSM kaum stimuliert, aber sehr wohl in den WM278 Zellen (Abb. 29 und 45), denn hier wird die Phosphorylierung von STAT₃ zu allen drei Zeitpunkten stark aktiviert. Diese Effekte werden durch BAY293 kaum inhibiert, lediglich die basale Phosphorylierung in WM35.

Der JAK/STAT₃-Signalweg sollte durch OSM stimuliert werden. (Heinrich et al., 2003) Die Ergebnisse in den WM278 Zellen stimmen hier eindeutig mit der Literatur überein.

Die Eine Studie aus dem Jahr 2009 beschrieb die anti-hepatitis C Aktivität von OSM und unter anderem auch die Kinetik der Phosphorylierung von STAT₃ durch OSM. Es wurde das Verhalten von transformierten Leberzellen (OR6-Zellen, welche aus ORN/C-5B/KE RNA-replizierenden HuH-7-Zellen geklont wurden) in Gegenwart von OSM erforscht und hier wurde festgestellt, dass die Phosphorylierung von STAT₃, stimuliert durch OSM, bis zu 120 Minuten konstant stattgefunden hat. (Ikeda et al., 2009) Diese Studie sollte hier nur hinsichtlich der Kinetik von der Phosphorylierung von STAT₃ erwähnt werden, jedoch können diese Ergebnisse nicht einfach auf Krebszellen übertragen werden. Meine Forschungsergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die metastasierten Melanomzellen und die WM35 Zellen auf exogen zugeführtes OSM anders reagieren.

7.1.2.3 Vergleiche von den Auswirkungen der Zytokine auf die Zellen in Abhängigkeit ihrer Wachstumsphase

In der ersten Fragestellung meiner Arbeit sollte das Verhalten der Zellen in Abhängigkeit ihrer Wachstumsphase auf nachgeschaltete Signalwege untersucht werden, um etwaige Unterschiede zwischen den Zelllinien zu finden. In den Kapiteln 7.1.2.3.1 und 7.1.2.3.2 werden diese Unterschiede nochmals kurz hervorgehoben.

7.1.2.3.1 Frühe Wachstumsphase

Die Zellen der frühen Wachstumsphase zeigten eine Stimulierung der ERK_{1/2}-Phosphorylierung durch IL6. Der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien liegt darin, dass IL6 in den WM35 Zellen bereits nach 30 Minuten den Signalweg aktiviert und die Aktivierung steigt nach 60 Minuten an und geht nach 120 Minuten in eine Hemmung über (Abb. 50). Im Gegensatz zeigten die WM278 Zellen zuerst eine Hemmung durch IL6 und dann eine stetig ansteigende Stimulierung der Phosphorylierung von ERK_{1/2} bis zu 120 Minuten (Abb. 52). IL6 stimuliert die Phosphorylierung von STAT₃ in den WM35 Zellen nach 30 Minuten (Abb. 51), nicht aber in WM278 (Abb. 53). Dafür wird diese basale STAT₃ Phosphorylierung in WM278 durch BAY293 signifikant inhibiert.

OSM stimuliert die Phosphorylierung nur in den WM278 Zellen nach 60 Minuten (Abb. 28 und 44) und nicht in den WM35 Zellen (Abb. 26 und 42). Der JAK/STAT₃-Signalweg wird in den WM35 Zellen gehemmt (Abb. 27 und 43) und in den WM278 Zellen stark aktiviert. Dies ist ein eindeutiger Unterschied zwischen den beiden Melanomzellen des frühen Stadiums.

7.1.2.3.2 Metastasierte Zellen

Die metastasierten Zellen zeigten in Gegenwart von IL6 ein ähnliches Verhalten wie die Zellen der frühen Wachstumsphase. Der Unterschied liegt darin, dass IL6 in diesen Zellen die ERK_{1/2}-Phosphorylierung zu jedem Zeitpunkt aktiviert (Abb. 46 und 48). Auch hier wird der JAK/STAT₃-Signalweg eher gehemmt (Abb. 30, 32, 47 und 49), außer in den 518a2 Zellen zum 60 Minuten Zeitpunkt wurde eine leichte Stimulation der Phosphorylierung von STAT₃ beobachtet (Abb. 49).

OSM aktiviert den MAPK-Signalweg nur in den A375 Zellen zu jedem Zeitpunkt eindeutig (Abb. 22 und 38). In den 518a2 Zellen findet eher keine Stimulation statt (Abb. 40). Die Phosphorylierung von STAT₃ wird in beiden metastatischen Zellen durch OSM inhibiert (Abb. 23, 25, 39 und 41).

7.1.3 Auswirkungen auf die Zellen durch BAY293 nach kurzer Expositionszeit

7.1.3.1 Phosphorylierung von ERK1/2

Während BAY293 in den metastasierten Zellen die ERK_{1/2}-Phosphorylierung kaum hemmt (Abb. 38 und 46 bei A375; Abb. 40 und 48 bei 518a2), wird diese in WM35 (Abb. 34 und 50) und in den WM278 Zellen (Abb. 36 und 52, Abb. 44 nur nach 120 Minuten) aktiviert.

7.1.3.2 Phosphorylierung von STAT3

In den A375 Zellen (Abb. 23, 31 und 39) und in den WM278 Zellen (Abb. 37) wird der JAK/STAT₃-Signalweg durch BAY293 aktiviert und in den 518a2 Zellen (Abb. 25 und 41) und in den WM35 Zellen (Abb. 27, 43 und 51) wird er gehemmt.

7.1.3.3 Auswirkungen auf die Signalwege und Unterschiede zwischen den Zelllinien nach der Behandlung mit dem SOS1-RAS Interaktionsinhibitor BAY293 in Abhängigkeit des Stadiums

In der zweiten Fragestellung sollten die vier Zelllinien in Gegenwart von BAY293 untersucht werden. In diesem Unterkapitel werden die Effekte auf den MAPK- und den JAK/STAT₃-Signalweg nach kurzer Expositionszeit zusammenfassend beschrieben und ob die Phosphorylierung von STAT₃ durch die Hemmung der SOS1-Ras-Interaktion aktiviert wird, um eine „Kommunikation“ zwischen den beiden Signalwegen zu finden. Wie sich herausgestellt hat gibt es in einigen Zelllinien (siehe unten) einen Hinweis auf ein „biased signalling“.

7.1.3.3.1 Frühe Wachstumsphase

Im Allgemeinen wird also die Phosphorylierung von ERK_{1/2} in den Zellen der frühen Wachstumsphase bei kurzer Expositionszeit aktiviert. Der JAK/STAT₃-Signalweg wird in den WM35 Zellen gehemmt, anders als in den WM278.

7.1.3.3.2 Metastasierte Zellen

Nach kurzer Expositionszeit wird die Phosphorylierung von ERK_{1/2} in den metastasierten Zellen nicht gehemmt und die Phosphorylierung von STAT₃ wird in den A375 Zellen, im Gegenteil zu den 518a2 Zellen, aktiviert.

7.2 Konzentrationsabhängige Hemmung durch BAY293 nach 24 Stunden

7.2.1 Phosphorylierung von ERK1/2

Mit dem SOS1-Ras Interaktionsinhibitor BAY293 ist eine Hemmung der ERK_{1/2}-Phosphorylierung in vielen Ergebnissen zu sehen und dort sind die Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle auch signifikant (Abb. 6 bei A375 und Abb. 10 bei 518a2, Abb. 14 bei WM35 und Abb. 18 bei WM278). Diese Effekte sind schon in niederen Konzentrationen beobachtbar und damit als spezifisch zu sehen.

Im Zuge meiner Forschung für die Masterarbeit habe ich herausgefunden, dass der SOS1-Ras Interaktionsinhibitor BAY293 in höherer Konzentration (8µM) die Phosphorylierung von ERK_{1/2} in den Melanomzellen des frühen Stadiums (WM35 und WM278) nach 24 Stunden sehr stark stimuliert (Abb. 14 und 18). Dieses Phänomen findet sich allerdings nicht bei den metastatischen Melanomzellen, sondern nur in den WM35 und WM278 Zellen. Die Effekte mit BAY293 in den „early stage“ Melanomzellen 8µM könnten unter anderem über unspezifische Effekte an anderen Proteinen und damit anderen Signalwegen beruhen.

7.2.2 Phosphorylierung von STAT3

Bei den Zelllinien 518a2 (Abb. 11) und WM278 (Abb. 19) konnte bei der Behandlung mit BAY293 in den beiden höheren Konzentrationen (2 μ M und 8 μ M) eine gesteigerte Phosphorylierung von STAT₃ beobachtet werden und bei den A375 Zellen bei 0,2 μ M und 2 μ M (Abb. 7). Bei den WM35 Zellen wurde eher eine konzentrationsabhängige Hemmung beobachtet (Abb. 15). Es gibt somit einige Hinweise auf ein „biased signalling“ in den Melanomzellen, wenn ein Signalweg an einer Stelle (hier SOS1-Ras Interaktion) blockiert wird, jedoch bedarf dies noch einiger Nachforschungen, da hier viele Ergebnisse eine hohe Standardabweichung aufweisen und somit einige Versuche nicht gut reproduzierbar waren.

7.2.3 Phosphorylierung von p38

Der p38-Signalweg wird in den A375 Zellen durch die Behandlung mit dem Inhibitor im Vergleich zur Kontrolle signifikant stimuliert (Abb. 8). Die metastatischen 518a2 Zellen zeigen nur in der höchsten BAY293-Konzentration (8 μ M) eine starke Aktivierung der Phosphorylierung von p38 (Abb. 12), ein ähnliches Verhalten zeigten auch die nicht-metastatischen WM35 Zellen (Abb. 16) In den WM278 Zellen wurde eine gesteigerte Aktivität bei der niedrigsten (0,2 μ M) und bei der höchsten (8 μ M) Inhibitor-Konzentration beobachtet (Abb. 20). Diese Beobachtungen deuten auch hier auf eine „Kommunikation“ zwischen den Signalwegen hin. Dieser Signalweg muss in Verbindung mit BAY293 noch genauer untersucht werden, da hierzu keine Literatur vorhanden ist.

7.2.4 Phosphorylierung von AKT

Eine weitere interessante Erkenntnis war, dass der PI3K/AKT-Signalweg in den 518a2 Zellen gar nicht aktiv war (Abb. 13) und in den A375 Zellen wurde er bei einer BAY293 Konzentration von 2 μ M im Vergleich zur Kontrolle stark aktiviert (Abb. 9). In den WM35 Zellen wurde die Phosphorylierung von AKT im Vergleich zur Kontrolle bei jeder BAY-Konzentration stark gehemmt (Abb. 17) und auch bei den anderen Zellen des Frühstadiums (WM278) ist eher eine Hemmung zu beobachten (Abb. 21).

Eine sehr aktuelle Studie aus dem Jahr 2023 zeigte, dass durch BAY293 die Phosphorylierung von AKT und ERK in Brustkrebszellen stark reduziert wird. (Ju et al., 2023) In vielen der AKT-Experimente ist eine BAY293-vermittelte Hemmung zu beobachten und diese Erkenntnisse stimmen somit mit der aktuellen Literatur überein.

7.2.5 Auswirkungen auf die Signalwege nach der Behandlung mit dem SOS1-RAS Interaktionsinhibitor BAY293

Wie im Kapitel 7.1.3.3 sollte hier die zweite Fragestellung beantwortet werden und es werden auch die Auswirkungen auf die übrigen Signalwege (JAK/STAT₃, p38 und PI3K/AKT) in den vier Zelllinien in Anwesenheit von BAY293 nach Langzeitexposition (24h) hervorgehoben. Wie oben bereits erwähnt gibt es nur einige Hinweise auf eine „Kommunikation“ zwischen den einzelnen Signalwegen.

7.2.5.1 Frühe Wachstumsphase

In den Melanomzellen der frühen Wachstumsphase wird bereits bei niedrigeren Konzentrationen eine Hemmung der Phosphorylierung von ERK_{1/2} beobachtet und in der höchsten Konzentration wird der MAPK-Signalweg plötzlich sehr stark aktiviert. In den WM35 Zellen wird der JAK/STAT₃-Signalweg konzentrationsabhängig gehemmt und in den WM278 Zellen aktiviert. Die Phosphorylierung von p38 wird in den nicht-metastasierten Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen aktiviert. Der PI3K/AKT-Signalweg wird in den WM35 und WM278 Zellen stark gehemmt.

7.2.5.2 Metastasierte Zellen

Im Gegensatz zu den „early stage“ Melanomzellen verursacht die Behandlung mit BAY293 in jeder Konzentration eher eine Hemmung der ERK_{1/2}-Phosphorylierung. Die 518a2 Zellen zeigen ein ähnliches Verhalten wie die WM278 Zellen, denn in den beiden höheren Inhibitor-Konzentrationen wird der JAK/STAT₃-Signalweg aktiviert. In den A375 Zellen sind sowohl Hemmungen (0,8µM und 8µM) als auch Stimulierungen (0,2µM und 2µM) der Phosphorylierung von STAT₃ zu beobachten.

Auch in den beiden metastasierten Zelllinien ist der p38-Signalweg aktiv. Ein Phänomen ist, dass die Phosphorylierung von AKT in den 518a2 Zellen gar nicht zu beobachten war. In den A375 Zellen wurde, anders als in den Melanomzellen der frühen Wachstumsphase, eine Aktivierung der Phosphorylierung von AKT gemessen.

7.3 Viabilität

Wie bereits erwähnt wurde der MTT-Assay zur Bestimmung der Viabilität der Zellen durchgeführt. Die Substanz BAY293 ist in dem Lösungsmittel DMSO gelöst.

DMSO wird üblicherweise als Lösungsmittel für lipophile Substanzen verwendet, also jene, die in Wasser schwer löslich sind. (Kang et al., 2017) Wie bei diesen Versuchen sofort zu erkennen ist, wird bei den Behandlungen mit BAY293 0,1µM und 1µM, bei denen eine größere Menge an DMSO in die 96-Wellen hinein pipettiert wurde, die Viabilität stark verringert. Die größere Menge an DMSO kam deshalb zustande, da keine Zwischenverdünnungen in den Wells gemacht wurde.

7.3.1 Beeinflussung der Viabilität nach Behandlung mit IL6, OSM und BAY293 in Abhängigkeit des Stadiums der humanen Melanomzellen

In meiner letzten Fragestellung soll geklärt werden, ob die Viabilität durch die beiden Zytokine in Kombination mit BAY293 stadienabhängig in humanen Melanomzellen beeinflusst wird. Es stellte sich heraus, dass diese Behandlungen nicht sehr große Auswirkungen auf die Viabilität haben, doch stellten sich einige Unterschiede als signifikant heraus. Daraus folgt, dass die Viabilität durch diese Behandlungen sehr wohl beeinflusst wird. In diesem Kapitel sollen einige Unterschiede zwischen den Zelllinien zusammengefasst werden.

7.3.1.1 Frühe Wachstumsphase

Die Resultate der WM35 Zellen zeigten nach 24 Stunden (Abb. 56) keine Erhöhung der Viabilität durch die beiden Zytokine und in Kombination mit BAY293 ist eher

eine verringerte Viabilität zu beobachten. In den WM278 Zellen ist eine geringe Erhöhung der Viabilität nach 48 Stunden (Abb.59) durch IL6 und OSM zu sehen, welche nach 24 Stunden (Abb. 57) noch nicht beobachtbar war. In Kombination mit dem Inhibitor wird die Viabilität leicht verringert.

7.3.1.2 Metastasierte Zellen

In den A375 Zellen wird die Viabilität nach 24 Stunden (Abb. 54) durch die beiden Zytokine erhöht, gleiches gilt auch in Kombination mit BAY293 (0,3 μ M und 3 μ M) und nach 48 Stunden (Abb. 58) wird sie durch OSM verringert und durch IL6 ist sie im Vergleich zur Kontrolle eher unverändert. In den 518a2 Zellen wird die Viabilität nach 24 Stunden (Abb. 55) durch OSM und IL6 verringert, in Kombination mit BAY293 ist diese Verringerung verstärkt.

Da die Viabilität der Zellen nach 48h in den A375 Zellen verringert wird, stimmen die Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt mit der Literatur überein, denn Zarling et al. fanden heraus, dass OSM eine antiproliferative Wirkung auf die A375 Zelllinie aufweist. (Zarling et al., 1986)

7.4 Limitierungen

7.4.1 Western Blot

Bei den Versuchen, bei denen die Zeitabhängigkeiten untersucht wurden, wurden die Zellen auch jeweils mit den beiden BAY293 Konzentrationen allein behandelt (sowohl bei den Versuchen mit OSM als auch bei jenen mit IL6). Werden all diese Ergebnisse zusammen betrachtet ist zu erkennen, dass diese teilweise genau das Gegenteil ergeben. Ein Beispiel hierfür wäre das Verhalten von den A375 Zellen gegenüber dem Inhibitor nach 60 Minuten. In Abbildung 22 B ist eine Stimulation der Phosphorylierung von ERK_{1/2} durch beide Konzentrationen des Inhibitors zu sehen, jedoch in Abbildung 30 B wird der MAPK-Signalweg gehemmt. Die Ergebnisse sehr vieler Experimente liefern diese widersprüchlichen Ergebnisse, weshalb hier nur schwer konkrete Aussagen getroffen werden können. Auch bei den Kombinationen des Inhibitors mit OSM bzw. mit IL6 gibt es gegenteilige Resultate. Ein

möglicher Grund hierfür könnte eine schlechte Reproduzierbarkeit der einzelnen Versuche sein. Bei einigen Experimenten dürfte das Antikörper-Stripping ebenfalls nicht so gut funktioniert haben und dies könnte zu einer Verzerrung der Ergebnisse geführt haben, allerdings ist der genaue Grund nicht bekannt, daher bedarf es in diesem Bereich weiterer Nachforschungen.

Des Weiteren ist ebenfalls kein genauer Grund bekannt, warum BAY293 in hoher Konzentration die Phosphorylierung in den Melanomzellen des frühen Stadiums sehr stark stimuliert, deshalb müssen hier ebenfalls noch weitere Nachforschungen gemacht werden, um herauszufinden wie und warum dieser Effekt zustande kommt.

Ein Artefakt ist bei der Phosphorylierung von p38 in den 518a2 Zellen zu beobachten, denn hier wird der p38-Signalweg bei der höchsten Konzentration aus nicht geklärtem Grund stark aktiviert.

Ein weiteres ungeklärtes Artefakt war, dass der PI3K-Signalweg in den 518a2 Zellen gar nicht aktiv war und in den A375 Zellen wurde die Phosphorylierung bei der Behandlung mit BAY293 2 μ M stark stimuliert. In einigen Experimenten wurde kaum ein pAKT-Signal erhalten, deshalb ist die Qualität dieser Blots zu hinterfragen.

7.4.2 Viabilität

Es stellte sich heraus, dass BAY293 alleine nur wenig Einfluss auf die Viabilität in MTT-Assays hat. Es zeigt sich auch kein klarer Unterschied zwischen Melanomzellen des Frühstadiums und metastatischen Melanomzellen bezüglich der Behandlung mit BAY293. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die stimulatorischen Effekte auf ERK_{1/2}- und STAT₃-Signalwege durch OSM und IL6 beobachtet werden durch BAY293 inhibiert werden. Dabei zeigt sich, dass die ERK_{1/2}-Signalwege stärker gehemmt werden als die STAT₃-Wege, was auch von einem SOS1-RAS-Inhibitor zu erwarten ist. Damit ist das Proliferationssignal durch STAT₃ weniger gehemmt und möglicherweise auch der kompensatorische Signalweg von AKT (und eventuell p38). Eine exakte Beurteilung dieser Signalwege ist allerdings durch die geringe Anzahl an Experimenten nicht möglich.

Vorangehende Forschungsgruppen konnten zeigen, dass die Proliferation der Melanomzellen im frühen Stadium durch IL6 gehemmt wird, dies konnte jedoch in meiner Arbeit nicht bestätigt werden. (Minichsdorfer et al., 2015)

7.5 Konklusion

Interleukin 6 stimuliert die ERK_{1/2}-Phosphorylierung in allen untersuchten Zelllinien und das Zytokin zeigte in diesen Zellen oft eine hemmende Wirkung auf den JAK/STAT₃-Signalweg, obwohl genau dieser Signalweg laut der Literatur aktiviert werden soll. In einigen Experimenten ist jedoch eine kurzzeitige Aktivierung der Phosphorylierung von STAT₃, vor allem in den WM278 Zellen, zu sehen.

Durch OSM wird nicht in allen Zelllinien, außer in den A375 Zellen, eine Stimulation der ERK_{1/2}-Phosphorylierung beobachtet, sondern teilweise sogar Hemmungen dieses Signalweges. Der JAK/STAT₃-Signalweg wird in allen Zelllinien, außer in WM278, durch OSM gehemmt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass einige Versuche sehr widersprüchliche Ergebnisse lieferten, vor allem die Behandlungen mit dem Inhibitor. Eine mögliche Ursache für diese Widersprüche wäre eine schlechte Reproduzierbarkeit meiner Experimente (wie bereits im Kapitel „Limitierungen“ erwähnt), weshalb in diesem Forschungsgebiet weitere Studien durchgeführt werden müssen. Aus diesem Grund ist es teilweise auch schwer konkrete Aussagen zu treffen. Jedoch gibt es einige Hinweise auf ein „biased signalling“ (eine „Kommunikation“) zwischen den Signalwegen. Ein interessantes Phänomen wurde in den Zellen der frühen Wachstumsphase entdeckt, nämlich, dass der Inhibitor BAY293 in höherer Konzentration den MAPK-Signalweg nicht hemmt, sondern die Phosphorylierung von ERK_{1/2} sehr stark stimuliert. Der Grund für diesen Effekt muss noch erforscht werden.

8 ABKÜRZUNGEN

AKT	Proteinkinase B (PKB)
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BRAF	V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylendiaminessäure
ERK _{1/2}	extracellular-signal regulated kinases 1/2
FBS	fetales Kälberserum
IL6	Interleukin 6
JAK	Januskinase
LAF	Laminar Air Flow
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK _{1/2}	MAPK/ERK Kinase
OSM	Oncostatin M
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDK-1	3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RAS	rat sarcoma
SDS	sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfat polyacrylamide gelelectrophoresis
SOS	son of sevenless

STAT ₃	signal transducer and activator of transcription 3
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline mit Tween 20
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aktivierung der MAPK Kaskade via OSM-Rezeptor (Heinrich et al., 2003) .	7
Abbildung 2: IL6 aktiviert den JAK/STAT-Signalweg und die MAPK Kaskade (Heinrich et al., 2003).....	9
Abbildung 3: MAP-Kinase-Signalweg (Müller-Esterl, 2018)	11
Abbildung 4: JAK-STAT-Signalweg (Müller-Esterl, 2018)	12
Abbildung 5: PI3-Kinase-Signalweg (Müller-Esterl, 2018)	13
Abbildung 6: Aktivität von MEK _{1/2} in der Zelllinie A375 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pERK _{1/2} und ERK _{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit der Software LiCor ausgewertet, in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=4) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.	37
Abbildung 7: Aktivität von Janus-Kinase in der Zelllinie A375 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pSTAT ₃ und STAT ₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.	38
Abbildung 8: Aktivierung von p38 in der Zelllinie A375 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für p-p38 und p38 sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001).....	39
Abbildung 9: Aktivität von PDK-1 in der Zelllinie A375 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pAKT und AKT sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, ***: p<0,001)	40

Abbildung 10: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie 518a2 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit der Software LiCor ausgewertet, in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=5) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001).....41

Abbildung 11: Aktivität von Janus-Kinase in der Zelllinie 518a2 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=4) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)42

Abbildung 12: Aktivierung von p38 in der Zelllinie 518a2 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für p-p38 und p38 sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05)43

Abbildung 13: Aktivität von PDK-1 in der Zelllinie 518a2 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pAKT und AKT sind dargestellt (A).44

Abbildung 14: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM35 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit der Software LiCor ausgewertet, in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)45

Abbildung 15: Aktivität von Janus-Kinase in der Zelllinie WM35 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001).....46

Abbildung 16: Aktivierung von p38 in der Zelllinie WM35 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für p-p38 und p38 sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01)..... 47

Abbildung 17: Aktivität von PDK-1 in der Zelllinie WM35 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pAKT und AKT sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05) 48

Abbildung 18: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM278 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit der Software LiCor ausgewertet, in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)..... 49

Abbildung 19: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM278 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)..... 50

Abbildung 20: Aktivierung von p38 in der Zelllinie WM278 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für p-p38 und p38 sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001)..... 51

Abbildung 21: Aktivität von PDK-1 in der Zelllinie WM278 nach 24h Inkubation mit der Substanz BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/0,8µM/2µM/8µM. Typische Western Blots für pAKT und AKT sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die

Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05)52

Abbildung 22: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie A375 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)53

Abbildung 23: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie A375 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.54

Abbildung 24: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie 518a2 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.55

Abbildung 25: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie 518a2 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA

und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)..... 56

Abbildung 26: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM35 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3 μ M/3 μ M, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. 57

Abbildung 27: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM35 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3 μ M/3 μ M, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. 58

Abbildung 28: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM278 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3 μ M/3 μ M, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)..... 59

Abbildung 29: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM278 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3 μ M/3 μ M, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA

und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)60

Abbildung 30: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie A375 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.61

Abbildung 31: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie A375 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.....62

Abbildung 32: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie 518a2 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)63

Abbildung 33: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie 518a2 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)64

Abbildung 34: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM35 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001)..... 65

Abbildung 35: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM35 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)... 66

Abbildung 36: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM278 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)..... 67

Abbildung 37: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM278 nach 60 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 allein in den Konzentrationen 0,3µM/3µM, mit dem Zytokin IL6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit den beiden BAY293 Konzentrationen in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001)... 68

Abbildung 38: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie A375 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm²

Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01).....70

Abbildung 39: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie A375 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001).....71

Abbildung 40: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie 518a2 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.72

Abbildung 41: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie 518a2 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)....73

Abbildung 42: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM35 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der

gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$) 74

Abbildung 43: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM35 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 ($3\mu\text{M}$) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 ($3\mu\text{M}$) in den 6cm^2 Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: $p < 0,01$)..... 75

Abbildung 44: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM278 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 ($3\mu\text{M}$) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 ($3\mu\text{M}$) in den 6cm^2 Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$) 77

Abbildung 45: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM278 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 ($3\mu\text{M}$) allein, mit dem Zytokin Oncostatin M 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von OSM (10ng/ml) mit BAY293 ($3\mu\text{M}$) in den 6cm^2 Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)... 78

Abbildung 46: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie A375 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 ($3\mu\text{M}$) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 ($3\mu\text{M}$) in den 6cm^2 Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: $p < 0,05$) 79

Abbildung 47: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie A375 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3 μ M) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3 μ M) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.80

Abbildung 48: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie 518a2 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3 μ M) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3 μ M) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=2) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001).....81

Abbildung 49: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie 518a2 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3 μ M) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3 μ M) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=3) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01).....82

Abbildung 50: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM35 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3 μ M) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3 μ M) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert \pm S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle **: p<0,01, ***: p<0,001)84

Abbildung 51: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM35 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3 μ M) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3 μ M) in den

6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)... 85

Abbildung 52: Aktivität von MEK_{1/2} in der Zelllinie WM278 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pERK_{1/2} und ERK_{1/2} sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001) 86

Abbildung 53: Aktivität von Janus-Kinasen in der Zelllinie WM278 nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation mit der Substanz BAY293 (3µM) allein, mit dem Zytokin Interleukin 6 10ng/ml und die jeweiligen Kombinationen von IL6 (10ng/ml) mit BAY293 (3µM) in den 6cm² Petrischalen mit anschließender Proteinisolation. Typische Western Blots für pSTAT₃ und STAT₃ sind dargestellt (A). Die Intensitäten wurden mit der Software LiCor ausgewertet. Die Daten wurden in Excel normalisiert und anschließend die Balkendiagramme der gesammelten Experimente (n=1) als Ratio (Mittelwert ± S.D.) in (B) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA und Turkey Test ermittelt. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)... 87

Abbildung 54: Viabilität der Zellen (A375) 24 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1µM, 0,3µM, 1µM und 3µM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1µM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, ***: p<0,001)..... 89

Abbildung 55: Viabilität der Zellen (518a2) 24 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde

die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1µM, 0,3µM, 1µM und 3µM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1µM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001).....90

Abbildung 56: Viabilität der Zellen (WM35) 24 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1µM, 0,3µM, 1µM und 3µM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1µM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001).....91

Abbildung 57: Viabilität der Zellen (WM278) 24 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1µM, 0,3µM, 1µM und 3µM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1µM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: p<0,001).....92

Abbildung 58: Viabilität der Zellen (A375) 48 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1µM, 0,3µM, 1µM und 3µM. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1µM weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis

zur Zugabe des Substrates und anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)..... 94

Abbildung 59: Viabilität der Zellen (WM278) 48 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen (OSM und IL6) und BAY293: Die Zellen wurden am Vortag vor der Behandlung im jeweiligen Medium in die 96-Well-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konfluenz beurteilt, lag diese bei 70-100% wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt. OSM und IL6 wurden in den Konzentrationen 10ng/ml hinzugefügt und BAY293 in 0,1 μ M, 0,3 μ M, 1 μ M und 3 μ M. Bei den Kombinationen mit den Zytokinen wurde die Konzentration von BAY293 1 μ M weggelassen. Die behandelten Zellen befanden sich bis zur Zugabe des Substrates und anschließender Messung im Inkubator. In A sind die verschiedenen BAY293 Konzentrationen und die unbehandelte Kontrolle dargestellt. B ist ein Säulendiagramm, in dem die Zellen mit den Zytokinen, sowie die jeweiligen Kombinationen mit BAY293 mit der Kontrolle verglichen werden. (Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ***: $p < 0,001$)..... 95

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: RIPA-Puffer	17
Tabelle 2: Laufpuffer	18
Tabelle 3: Semidry-Transfer-Puffer	18
Tabelle 4: Milder Stripping-Puffer für Western Blot Membranen (Nitrocellulose)	19
Tabelle 5: Stripping-Puffer für Western Blot Membranen (Nitrocellulose) unter härteren Bedingungen. Da 2-Mercaptoethanol enthalten ist, wurde der gesamte Herstellungsprozess und das Strippen der Membranen unter einem Abzug durchgeführt	20
Tabelle 6: 10x TBS	20
Tabelle 7: 1x TBST	20
Tabelle 8: 5% BSA-Lösung für das Blockieren der Nitrocellulose Membranen	21
Tabelle 9: 2% BSA-Lösung (in TBST) zum Verdünnen für die ersten (1:1000) und den zweiten (1:2000) Antikörper	21
Tabelle 10: Zelllinien und deren Eigenschaften bzw. Herkunft	22
Tabelle 11: BCA-Lösung für die Bestimmung der Proteinkonzentration; Pierce® BCA Protein Assay Reagents A, Produktnummer: 23228 von Thermo scientific	28
Tabelle 12: Bestandteile Separating Gel 10%	29
Tabelle 13: Bestandteile Stacking Gel 5%.....	29
Tabelle 14: Bestandteile des Polyacrylamidgels.....	30
Tabelle 15: Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper.....	34

11 REFERENZEN

- Barata, A. G., & Dick, T. P. (2020). A role for peroxiredoxins in H₂O₂- and MEKK-dependent activation of the p38 signaling pathway. *Redox Biol*, 28, 101340. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101340>
- Bataille, V., Bishop, J. A., Sasieni, P., Swerdlow, A. J., Pinney, E., Griffiths, K., & Cuzick, J. (1996). Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br J Cancer*, 73(12), 1605-1611. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.302>
- Batus, M., Waheed, S., Ruby, C., Petersen, L., Bines, S. D., & Kaufman, H. L. (2013). Optimal management of metastatic melanoma: current strategies and future directions. *Am J Clin Dermatol*, 14(3), 179-194. <https://doi.org/10.1007/s40257-013-0025-9>
- Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 172(5), 902-908. <https://doi.org/10.1097/00000658-197011000-00017>
- Campbell, G. S., Meyer, D. J., Raz, R., Levy, D. E., Schwartz, J., & Carter-Su, C. (1995). Activation of acute phase response factor (APRF)/Stat3 transcription factor by growth hormone. *J Biol Chem*, 270(8), 3974-3979. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.3974>
- Crocetti, E., Mallone, S., Robsahm, T. E., Gavin, A., Agius, D., Ardanaz, E., Lopez, M. C., Innos, K., Minicozzi, P., Borgognoni, L., Pierannunzio, D., Eisemann, N., & Group, E.-W. (2015). Survival of patients with skin melanoma in Europe increases further: Results of the EURO CARE-5 study. *Eur J Cancer*, 51(15), 2179-2190. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.07.039>
- Datta, K., Bellacosa, A., Chan, T. O., & Tsichlis, P. N. (1996). Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem*, 271(48), 30835-30839. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30835>
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., . . . Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- Erdogan, F., Radu, T. B., Orlova, A., Qadree, A. K., de Araujo, E. D., Israelian, J., Valent, P., Mustjoki, S. M., Herling, M., Moriggl, R., & Gunning, P. T. (2022). JAK-STAT core cancer pathway: An integrative cancer interactome analysis. *J Cell Mol Med*, 26(7), 2049-2062. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17228>
- Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., & Hu, L. L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*, 19(3), 1997-2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Guy, G. P., Jr., Thomas, C. C., Thompson, T., Watson, M., Massetti, G. M., Richardson, L. C., Centers for Disease, C., & Prevention. (2015). Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. *MMWR*

Morb Mortal Wkly Rep, 64(21), 591-596.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26042651>

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374(Pt 1), 1-20. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>

Helmut Plattner, J. H. (2017). Zellbiologie. In. Georg Thieme Verlag.

Hergovits, S., Mais, C., Haan, C., Costa-Pereira, A. P., & Hermanns, H. M. (2017). Oncostatin M induces RIG-I and MDA5 expression and enhances the double-stranded RNA response in fibroblasts. *J Cell Mol Med*, 21(11), 3087-3099. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13221>

Hillig, R. C., Sautier, B., Schroeder, J., Moosmayer, D., Hilpmann, A., Stegmann, C. M., Werbeck, N. D., Briem, H., Boemer, U., Weiske, J., Badock, V., Mastouri, J., Petersen, K., Siemeister, G., Kahmann, J. D., Wegener, D., Bohnke, N., Eis, K., Graham, K., . . . Bader, B. (2019). Discovery of potent SOS1 inhibitors that block RAS activation via disruption of the RAS-SOS1 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(7), 2551-2560. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812963116>

Hummel, M., Hegewisch-Becker, S., Neumann, J., & Vogel, A. (2021). [BRAF-V600E testing in metastatic colorectal cancer and new, chemotherapy-free therapy options. German version]. *Pathologe*, 42(6), 578-590. <https://doi.org/10.1007/s00292-021-00942-9> (BRAF-V600E-Testung beim metastasierten kolorektalen Karzinom und neue, chemotherapiefreie Therapieoptionen.)

Ikeda, M., Mori, K., Ariumi, Y., Dansako, H., & Kato, N. (2009). Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon-alpha. *FEBS Lett*, 583(9), 1434-1438. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.054>

Ju, C., Zhou, M., Du, D., Wang, C., Yao, J., Li, H., Luo, Y., He, F., & He, J. (2023). EIF4A3-mediated circ_0042881 activates the RAS pathway via miR-217/SOS1 axis to facilitate breast cancer progression. *Cell Death Dis*, 14(8), 559. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06085-4>

Kang, M. H., Das, J., Gurunathan, S., Park, H. W., Song, H., Park, C., & Kim, J. H. (2017). The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: a mechanistic study. *Theranostics*, 7(19), 4735-4752. <https://doi.org/10.7150/thno.21662>

Matsuda, T., & Hirano, T. (1994). Association of p72 tyrosine kinase with Stat factors and its activation by interleukin-3, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 83(12), 3457-3461. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7515712>

Minichsdorfer, C., Wasinger, C., Sieczkowski, E., Atil, B., & Hohenegger, M. (2015). Tocilizumab unmasks a stage-dependent interleukin-6 component in statin-induced apoptosis of metastatic melanoma cells. *Melanoma Res*, 25(4), 284-294. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000172>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

- Mou, H., & Tan, Q. (2023). Surgical Research Progress of Sentinel Lymph Node Biopsy in Melanoma. *J Invest Surg*, 36(1), 2225087. <https://doi.org/10.1080/08941939.2023.2225087>
- Mouawad, R., Benhammouda, A., Rixe, O., Antoine, E. C., Borel, C., Weil, M., Khayat, D., & Soubrane, C. (1996). Endogenous interleukin 6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumor burden. *Clin Cancer Res*, 2(8), 1405-1409. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9816314>
- Patel, S. P., Othus, M., Chen, Y., Wright, G. P., Jr., Yost, K. J., Hyingstrom, J. R., Hu-Lieskovan, S., Lao, C. D., Fecher, L. A., Truong, T. G., Eisenstein, J. L., Chandra, S., Sosman, J. A., Kendra, K. L., Wu, R. C., Devoe, C. E., Deutsch, G. B., Hegde, A., Khalil, M., . . . Ribas, A. (2023). Neoadjuvant-Adjuvant or Adjuvant-Only Pembrolizumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 388(9), 813-823. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2211437>
- Plangger, A., Rath, B., Hochmair, M., Funovics, M., & Hamilton, G. (2021). Cytotoxicity of combinations of the pan-KRAS inhibitor BAY-293 against primary non-small lung cancer cells. *Transl Oncol*, 14(12), 101230. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101230>
- Plangger, A., Rath, B., Stickler, S., Hochmair, M., Lang, C., Weigl, L., Funovics, M., & Hamilton, G. (2022). Cytotoxicity of combinations of the pan-KRAS SOS1 inhibitor BAY-293 against pancreatic cancer cell lines. *Discov Oncol*, 13(1), 84. <https://doi.org/10.1007/s12672-022-00550-w>
- Rasco, D. W., Medina, T., Corrie, P., Pavlick, A. C., Middleton, M. R., Lorigan, P., Hebert, C., Plummer, R., Larkin, J., Agarwala, S. S., Daud, A. I., Qiu, J., Bozon, V., Kneissl, M., Barry, E., & Olszanski, A. J. (2023). Phase 1 study of the pan-RAF inhibitor tovorafenib in patients with advanced solid tumors followed by dose expansion in patients with metastatic melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 92(1), 15-28. <https://doi.org/10.1007/s00280-023-04544-5>
- Rigg, E., Wang, J., Xue, Z., Lunavat, T. R., Liu, G., Hoang, T., Parajuli, H., Han, M., Bjerkgvig, R., Nazarov, P. V., Nicot, N., Kreis, S., Margue, C., Nomigni, M. T., Utikal, J., Miletic, H., Sundstrom, T., Ystaas, L. A. R., Li, X., & Thorsen, F. (2023). Inhibition of extracellular vesicle-derived miR-146a-5p decreases progression of melanoma brain metastasis via Notch pathway dysregulation in astrocytes. *J Extracell Vesicles*, 12(10), e12363. <https://doi.org/10.1002/jev2.12363>
- Rocuzzo, G., Giordano, S., Granato, T., Cavallo, F., Mastorino, L., Avallone, G., Pasini, B., Quaglino, P., & Ribero, S. (2023). Phenotypic and Dermoscopic Patterns of Familial Melanocytic Lesions: A Pilot Study in a Third-Level Center. *Cancers (Basel)*, 15(15). <https://doi.org/10.3390/cancers15153772>
- Rose, T. M., & Bruce, A. G. (1991). Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(19), 8641-8645. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8641>
- Siewert, E., Muller-Esterl, W., Starr, R., Heinrich, P. C., & Schaper, F. (1999). Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components. *Eur J Biochem*, 265(1), 251-257. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00719.x>

- Soubrane, C., Rixe, O., Meric, J. B., Khayat, D., & Mouawad, R. (2005). Pretreatment serum interleukin-6 concentration as a prognostic factor of overall survival in metastatic malignant melanoma patients treated with biochemotherapy: a retrospective study. *Melanoma Res*, 15(3), 199-204. <https://doi.org/10.1097/00008390-200506000-00009>
- Tawbi, H. A., Schadendorf, D., Lipson, E. J., Ascierto, P. A., Matamala, L., Castillo Gutierrez, E., Rutkowski, P., Gogas, H. J., Lao, C. D., De Menezes, J. J., Dalle, S., Arance, A., Grob, J. J., Srivastava, S., Abaskharoun, M., Hamilton, M., Keidel, S., Simonsen, K. L., Sobiesk, A. M., . . . Investigators, R.-. (2022). Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 386(1), 24-34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2109970>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Twentyman, P. R., & Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer*, 56(3), 279-285. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.190>
- Wang, S. W., & Sun, Y. M. (2014). The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review). *Int J Oncol*, 44(4), 1032-1040. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2259>
- Whiteman, D. C., Green, A. C., & Olsen, C. M. (2016). The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J Invest Dermatol*, 136(6), 1161-1171. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.035>
- Wolchok, J. D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Rutkowski, P., Lao, C. D., Cowey, C. L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Butler, M. O., Hill, A., Marquez-Rodas, I., Haanen, J., Guidoboni, M., Maio, M., Schoffski, P., . . . Hodi, F. S. (2022). Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*, 40(2), 127-137. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02229>
- Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, 9(11), 798-809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>
- Zarling, J. M., Shoyab, M., Marquardt, H., Hanson, M. B., Lioubin, M. N., & Todaro, G. J. (1986). Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(24), 9739-9743. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.24.9739>
- Zhang, G. Q., Jiao, Q., Shen, C. T., Song, H. J., Zhang, H. Z., Qiu, Z. L., & Luo, Q. Y. (2021). Interleukin 6 regulates the expression of programmed cell death ligand 1 in thyroid cancer. *Cancer Sci*, 112(3), 997-1010. <https://doi.org/10.1111/cas.14752>
- Zhang, S., Han, J., Sells, M. A., Chernoff, J., Knaus, U. G., Ulevitch, R. J., & Bokoch, G. M. (1995). Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem*, 270(41), 23934-23936. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.41.23934>

