

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik Med. II  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktorin: Prof. Dr. med. Julia Mayerle

**Die Bedeutung des OSM/OSMR-Zytokin-Ligand-  
Rezeptor-Systems in intestinalen Epithelzellen  
und bei intestinaler Entzündung**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Corina Landgraf, geb. Probst  
aus Straubing

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Florian Beigel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Fritz Krombach  
Prof. Dr. med. Thomas Ochsenkühn

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Julia Diegelmann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2018

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>0. Abkürzungen und Begriffe.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1. Die Bedeutung und Funktion von Zytokinen.....	9
1.2. Die IL-6-Zytokinfamilie.....	10
1.3. Das Zytokin Oncostatin M.....	18
1.3.1. Der OSM/OSMR-Zytokin-Rezeptorkomplex.....	18
1.3.2. Verschiedene Wege der Signaltransduktion für IL-6-Zytokine.....	18
1.3.2.1. Der JAK/STAT-Signalweg.....	19
1.3.2.2. Die Ras/Raf/MAPK-Kaskade.....	20
1.3.2.3. Die PI3K-Kaskade.....	21
1.3.2.4. Die Regulierung und Modulation der Signalwege.....	22
1.3.3. Matrixmetalloproteininasen und TIMPs.....	23
1.3.4. Biologische Funktionen von Oncostatin M.....	26
1.4. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	29
1.4.1. Einteilung und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	29
1.4.2. Die Bedeutung von Zytokinen bei intestinaler Entzündung.....	34
1.4.3. Therapien chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	38
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit.....	44

<b>2. Material.....</b>	<b>45</b>
2.1. Chemikalien und Lösungen.....	45
2.2. Kits und Reaktionssysteme.....	46
2.3. Verbrauchsmaterialien.....	47
2.4. Material für zellbiologische Experimente.....	47
2.4.1. Zelllinien.....	47
2.4.2. Zellkulturmedien und -zusätze.....	48
2.5. Material für molekularbiologische Experimente.....	48
2.5.1. PCR-Material und PCR-Kits.....	48
2.5.2. PCR-Primer.....	49
2.6. Material für proteinbiochemische Experimente.....	49
2.6.1. Herstellung von Lysispuffer für die Proteinisolation.....	49
2.6.2. Durchführung der Gelelektrophorese.....	49
2.7. Material für Microarray-Untersuchungen.....	50
2.8. Antikörper.....	51
2.9. Geräte und Software.....	52
2.8.1. Geräte.....	52
2.8.2. Software.....	53

<b>3. Methoden.....</b>	<b>54</b>
3.1. Zellbiologische Methoden.....	54
3.1.1. Kultivierung der Zellen.....	54
3.1.2. Bestimmung der Zellzahl.....	54
3.1.3. Stimulation der Zellen.....	55
3.1.4. Einfrieren von Zellen.....	55
3.1.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	55
3.2. Molekularbiologische Experimente.....	56
3.2.1. Isolation der RNA.....	56
3.2.2. Photometrische Messung der RNA.....	57
3.2.3. Behandlung des RNA-Isolates mit DNase.....	57
3.2.4. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	57
3.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	58
3.2.6. Quantitative PCR (qPCR) oder <i>Real-Time-PCR</i> .....	58
3.2.7. Agarose-Gelelektrophorese und Densitometrie.....	59
3.2.8. Sequenzierung.....	60
3.2.9. siRNA-Transfektion.....	60
3.3. Proteinbiochemische Methoden.....	60
3.3.1. Isolation der Proteine.....	60
3.3.2. Messung der Proteinkonzentrationen.....	60
3.3.3. Durchführung des Western-Blots.....	61
3.3.3.1. Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	61
3.3.3.2. Transfer der Proteine.....	61
3.3.3.3. Detektionsschritt.....	62
3.3.3.4. Strippen von Membranen.....	62
3.3.4. Rezeptornachweis auf Membranproteinebene.....	62
3.4. Funktionelle Experimente.....	63
3.4.1. Experimente zur Zellproliferation.....	63
3.4.2. Wundheilungsexperimente.....	64

3.4.3. Experimente zur Apoptose.....	64
3.5. Immunfluoreszenz-Experimente.....	65
3.6. Microarray-Untersuchungen.....	65
3.6.1. Vorbereitung der Proben.....	65
3.6.2. Prüfung von Konzentration und Reinheit der Proben.....	66
3.6.3. Herstellung von Cyanin-3-markierter cRNA.....	66
3.6.4. Quantifizierung und Qualitätskontrolle der cRNA-Proben.....	67
3.6.5. Hybridisierung der Microarrays.....	67
3.6.6. Biomathematische Datenauswertung und Normalisierung.....	67
3.7. Statistische Analyse.....	69
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>70</b>
4.1. Expression von OSMR- $\beta$ , LIFR und gp-130 in intestinalen Epithelzellen.....	70
4.2. Oncostatin M-vermittelte Signaltransduktionswege in intestinalen Epithelzellen.....	73
4.2.1. Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, p-38 und SAPK/JNK.....	73
4.2.2. Aktivierung der PI-3-Kinase Akt.....	75
4.2.3. Aktivierung von STAT1 und STAT3.....	75
4.3. Transkriptionsaktivierung durch Oncostatin M in intestinalen Epithelzellen.....	76
4.3.1. Hochregulation von IL-6 und TNF $\alpha$ .....	76
4.3.2. Hochregulation von MMP-3 und TIMP-1.....	77
4.4. Stimulation der intestinalen Epithelzellproliferation durch Oncostatin M.....	78

4.5. Einfluss von Oncostatin M auf die intestinale Epithelzellmigration.....	79
4.6. Verminderte Induktion der Apoptose von intestinalen Epithelzellen durch Oncostatin M .....	81
4.7. Untersuchung der Oncostatin M-vermittelten Genregulation in Microarray-Versuchen in intestinalen Epithelzellen.....	81
4.7.1. Analyse der biologischen Prozesse, der molekularen Funktionen und der Signalwege.....	82
4.7.2. Untersuchung einzelner Gene.....	85
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>88</b>
5.1. Der OSM/OSMR-Zytokin-Rezeptorkomplex in intestinalen Epithelzellen.....	88
5.2. Der Einfluss von Oncostatin M auf die Signaltransduktion in intestinalen Epithelzellen.....	88
5.3. Die Rolle von Oncostatin M bei intestinaler Entzündung und Tumogenese.....	91
5.4. Die Wirkung von Oncostatin M auf Zellproliferation, Zellmigration und Apoptose in intestinalen Epithelzellen.....	96
<b>6. Klinische Bedeutung und Ausblick.....</b>	<b>100</b>
6.1. Oncostatin M bei der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	100
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>103</b>

<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>105</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>135</b>
<b>10. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>137</b>
<b>11. Anhang.....</b>	<b>138</b>
<b>11.1. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>138</b>
<b>11.2. Danksagung.....</b>	<b>139</b>

## 0. Abkürzungen und Begriffe

á	von je
Abb.	Abbildung
ABCA1	<i>ATP-binding cassette, subfamily A, member 1</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
APO L	Apolipoprotein L
APP	Akute-Phase-Proteine
ASK	Apoptosesignal-regulierende Kinase
ATAD4	<i>ATPase family AAA domain containing 4</i>
ATG16L1	<i>Autophagy related 16-like 1</i>
BBC3	<i>BCL2-binding component 3</i>
BCL3	<i>B-cell lymphoma-3 encoded protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Albumin aus Kälberserum)
BSF-2	B-Zellen stimulierender Faktor 2
B-Zellen	B-Lymphozyten
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CARD 15	<i>Caspase recruitment domaining protein 15</i>
CBM	<i>Cytokine binding module</i> (=Zytokin-bindendes Modul)
CCDC17	<i>Coiled-coil domain containing 17</i>
CCl <sub>4</sub>	Carbo-Tetrachlorid
CCNG2	<i>Cyclin G 2</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonucleinacid</i> (= komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CEACAM	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung/-en

CFI	<i>Complement Factor I</i>
CIS	<i>Cytokine inducible regulators of signalling</i>
CIITA	<i>Class II major histocompatibility complex transactivator</i>
CLC	<i>Cardiotrophin-like Cytokine</i>
CLF-1	<i>Cytokine-like Factor 1</i>
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CNTFR $\alpha$	<i>Ciliary Neurotrophic Factor Receptor alpha</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT-1	<i>Cardiotrophin-1</i>
cm	Zentimeter
CRC	<i>Colorectal cancer</i> (= Kolorektales Karzinom)
cRNA	<i>complementary RNA</i> (= komplementäre Ribonukleinsäure)
CU	Colitis ulcerosa
CXC	CXC Motiv Chemokin
CXCL	CXC Motiv Chemokin-Ligand
CXCR	CXC Motiv Chemokin-Rezeptor
CYP	Cytochrom-P
CYP1A1	<i>Cytochrom P450 family 1, subfamily A, polypeptide 1</i>
DLG5	<i>Disks large homolog 5</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DSS	Dextran-Sodium-Sulfat
DTX3L	<i>Deltex-3 like (Drosophila)</i>
EBI-3	<i>Epstein-Barr-virus induced gene 3</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethyldiamin-Tetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (= epidermaler Wachstumsfaktor)

EGTA	Ethylenglykol-Bis-(2-aminoethyl)-Tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
EPO	Erythropoietin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK-1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2</i>
ERP27	<i>Endoplasmic reticulum protein 27</i>
ESS	<i>Extended SH2-subdomain</i>
EtOH	Ethanol
FC	<i>Fold Change</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
g	<i>gravitation</i> ( Einheit für Gravitation)
G	Giga
Gab-1	<i>Grb2-associated binder 1</i>
G(M)-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony stimulating factor</i> (= Granulozyten-Makrophagen Kolonien-stimulierender Faktor)
gp-130	Glykoprotein 130
Gr.	Größe
Grb2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i> (Wachstumsfaktorrezeptor gebundenes Protein 2)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
hOSM	humanes OSM
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)

HSP110	Hitzeschockprotein 110
IEC	<i>intestinal epithelial cells</i> (=Intestinale Epithelzellen)
IFNE1	<i>Interferon epsilon 1</i>
INF $\alpha$	Interferon alpha
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
IL-6Ra	Interleukin-6-Rezeptor alpha
IRGM	<i>Immunity related GTPase family M protein</i>
JAB	<i>Janus kinase-binding protein</i> (=Januskinase bindendes Protein)
JAK	Janus-assoziierte Kinase
JH1/2	Janus homologe Domäne 1/2
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo-Dalton
KIR	<i>Kinase inhibitory region</i> (=inhibitorische Region der Kinase)
KCNJ10	<i>Potassium voltage-gated channel, subfamily J member 10</i>
l	Liter
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LIFRa	<i>Leukemia inhibitory factor receptor alpha</i>
log	logarithmische Funktion
LYPD1	<i>LY6/PLAUR domain containing 1</i>
M	Molar
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen- aktivierte Protein- Kinase
MAPKKs	MAPK-Kinase-Kinasen
MC	Morbus Crohn
MEKs	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinasen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

MHC-II	<i>Major compatibility complex class II</i>
min	Minute
MKKs	Isoformen der MEK
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mOSM	murines OSM
mRNA	<i>messenger-ribonucleinacid</i> (= <i>Messenger</i> -Ribonukleinsäure)
MT-MMP	Membran-Typ-Matrix-Metalloproteinase
MTS	3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)- 2H-Tetrazolium
MTX	Methotrexat
MUC-1	Mucin-1
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaVO <sub>3</sub>	Natriummetavanadat
ng	Nanogramm
NK- Zellen	Natürliche Killerzellen
NLRC	<i>NOD- like receptor</i>
NLRC5	<i>NLR family CARD domain containing 5</i>
nm	Nanometer
NOD2	<i>nucleotide binding oligomerization domain- containing protein 2</i>
NP	Neuropoietin
NP-40	Nonidet- P40
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OSM	Oncostatin M

OSMR- $\beta$	Oncostatin M- Rezeptor beta
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PARP9	<i>Poly (ADP-Ribose) Polymerase family member 9</i>
PBS	Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (=Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDK-1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
pH	Pondus hydrogenii
Phe	Phenylalanin (Aminosäure)
PI3K	<i>Phosphoinositol-3-Kinase</i>
PIAS	<i>Protein Inhibitor of activated STAT</i> (= Protein-Inhibitor der aktivierte STAT)
pmol	pico Mol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RANKL	<i>Receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B Ligand</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RECK	<i>Reversion inducing cysteine rich protein</i>
Ref.	Reference
RIN	<i>RNA integrity number</i> (= Ribonukleinsäure Integritätszahl)
RNA	<i>Ribonucleinacid</i> (= Ribonukleinsäure)
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (=Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-IVT	<i>Reverse Transcriptase- in vitro Transcription</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase- Kettenreaktion

SAPK/JNK	Stress-Aktivierte Proteinkinase/c-Jun-N-terminale Kinase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SERPIN	<i>Serine proteinase inhibitor</i> (= Serine- Protease- Inhibitor)
s-gp-130	<i>soluble gp-130</i> (= lösliches gp-130)
sh.	siehe
Shc	<i>SH2- and collagen-homology-domain-containing protein</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SH2P	<i>Src homology 2 containing protein tyrosine phosphatase</i>
SHP2	<i>Src homology containing protein tyrosine kinase pathway</i>
sIL-6R	<i>soluble IL-6 Rezeptor</i> (=löslicher IL-6-Rezeptor)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SJS2	Schwartz-Jampel Typ 2 Syndrom
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signalling</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
s-OSMR	löslicher Oncostatin M- Rezeptor
SSI	<i>STAT-induced STAT inhibitor</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier Ligases</i>
SWS	Stüve-Wiedemann Syndrom
TAKI	TGF- $\beta$ -aktivierende Kinase I
Tbc	Tuberkulose
TBS	Tris- gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris- gepufferte Salzlösung mit Tween
TFPI-2	<i>Tissue factor pathway inhibitor-2</i>
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>

TIMP	Tissue- Inhibitoren der Metalloproteinasen
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNBS	<i>Trinitrobenzene sulfonic acid</i>
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TNFRSF6B	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Superfamilie, Mitglied 6 B
Tpl2	<i>Tumor progression locus 2</i>
TRIS	Tris- (hydroxymethyl) aminomethan
Tyk	Tyrosinkinase
Tyr	Tyrosin
T-Zellen	Thymus-Zellen
u. a.	und andere
V	Volt
v. a.	vor allem
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (= Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor)
vgl.	vergleiche
vs.	versus
Wt.	<i>Weight</i> (Gewicht)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z. T.	zum Teil

## 1. Einleitung

### 1.1. Die Bedeutung und Funktion von Zytokinen

Zytokine, auch Lymphokine genannt, sind eine Gruppe von Molekülen, meist Glykoproteine, die hauptsächlich von immunkompetenten Zellen produziert werden. Daneben können auch Endothelien, Gliazellen und Hepatozyten diese löslichen Botenstoffe herstellen. Sie lassen sich nach Rassow in drei Gruppen einteilen: in Wachstumsfaktoren (z. B. EGF = *Epidermal Growth Factor* oder VEGF = *Vascular endothelial Growth Factor*), hämatopoetische Wachstumsfaktoren oder auch Hämatopoetine genannt (z. B. GCSF = *Granulocyte Colony stimulating factor*, EPO = *Erythropoietin*) und Zytokine des Immunsystems (z. B. Interleukine, Interferone, Chemokine). Zum Teil finden sich Überschneidungen der einzelnen Untergruppen<sup>289</sup>.

Zytokine spielen eine bedeutende Rolle bei der Generierung der Immunreaktion, indem sie als Botenstoffe bei der Signalübertragung zwischen verschiedenen Zellen des Immunsystems interagieren. Als Botenstoffe beeinflussen sie unter anderem die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen, die Aktivierung von Lymphozyten und Phagozyten, die Kontrolle der Zellbeteiligung an der Immunantwort, die Produktion von Antikörpern und die Vermittlung von Entzündungsreaktionen. Zu ihren Hauptwirkungen zählen die Wachstumsaktivierung, die Induktion der Phagozytose, die Zelldifferenzierung, die Chemotaxis, Inflammationsreaktionen und die Apoptose<sup>62, 220, 289</sup>.

Damit verschiedene Zielzellen auf das jeweilige Zytokin reagieren können, müssen spezifische Oberflächenrezeptoren vorhanden sein, über deren Bindung die Signaltransduktion induziert wird. In welcher Weise die Zellen durch die Botenstoffe beeinflusst werden, ist unter anderem von der Zelllinie, der Rezeptordichte und der Zeitspanne der Zytokin-Präsentation abhängig. Es können synergistische oder antagonistische Wirkungen an gemeinsamen Rezeptoren beobachtet werden. Die Einteilung der Rezeptoren in Rezeptorfamilien erfolgt nach Strukturmerkmalen, wie etwa gleichen Kettenstrukturen oder Motiven. Daneben gibt es lösliche Rezeptoren, die durch den fehlenden transmembranen Teil kürzer sind. Die Ausschüttung der Zytokine kann durch unterschiedliche Stimuli erfolgen. So können z. B. durch antigene Peptide T-Zellen zur Freisetzung stimuliert werden oder diese kann durch Aktivierung von Makrophagen im Rahmen von Infektionen erfolgen. Die Zytokine zeigen meist eine parakrine Wirkung, das heißt, sie nehmen Einfluss auf andere Zelltypen, nicht aber auf die Produzentenzelle

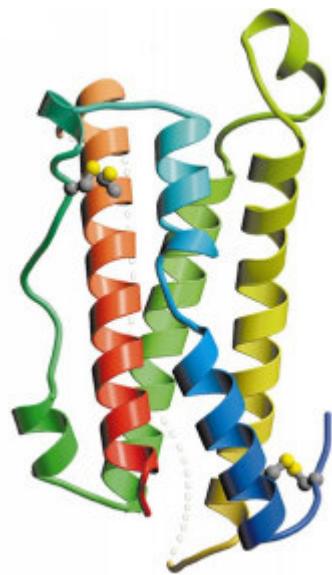
selbst. Autokrin wirkende Zytokine dagegen beeinflussen die Produzentenzelle selbst. Daneben gibt es auch Zytokine mit endokrinen Wirkungen (vgl. EPO) <sup>62, 289</sup>.

## **1.2. Die IL-6-Zytokinfamilie**

Die IL-6-Zytokinfamilie besteht aus funktionell und strukturell ähnlichen Zytokinen, die nach ihrem zuerst entdeckten Botenstoff, dem IL-6, benannt wurden. Die Gemeinsamkeiten liegen in der primären Aminosäuresequenz und ihrer Sekundärstruktur. Alle Mitglieder der IL-6-Zytokinfamilie sind pleiotrop und haben ähnliche biologische Funktionen inne. Sie spielen unter anderem bei der Proliferation und Differenzierung verschiedener immunkompetenter Zielzellen, bei der Embryogenese, der Hämatopoiese und der Tumorgenese, beim Knochenstoffwechsel, bei der Entwicklung und Neuromodulation des zentralen und peripheren Nervensystems, bei Entzündungsreaktionen, der Immunantwort, sowie autoimmunologischen Erkrankungen eine Rolle. So belegen verschiedene Studien eine Beteiligung von IL-6-Zytokinen bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) oder der Rheumatoïden Arthritis <sup>46, 60, 287</sup>.

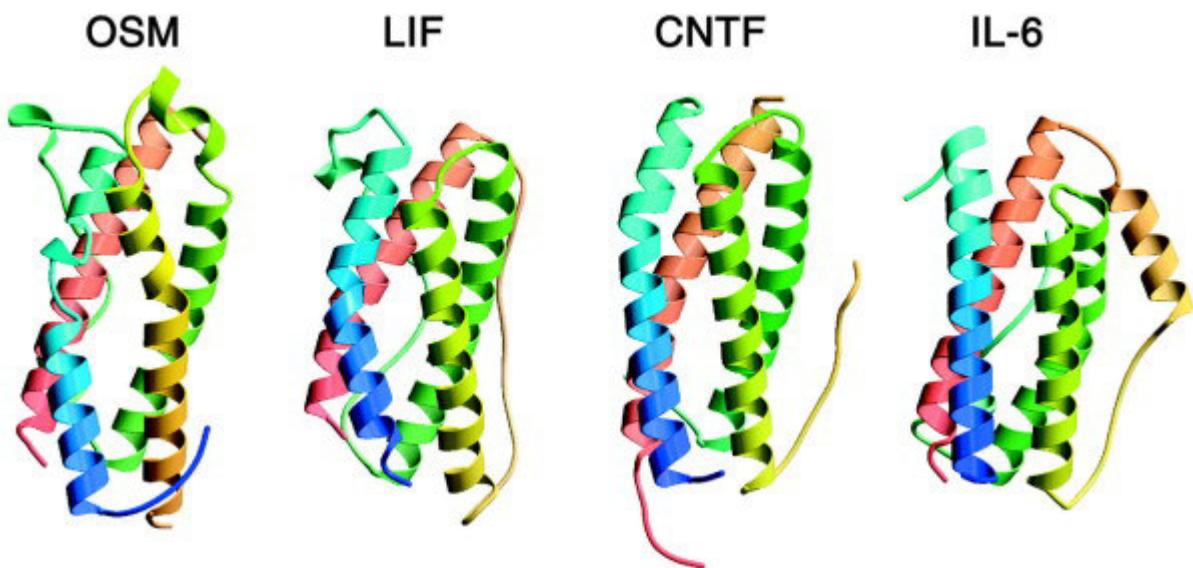
Zu den Mitgliedern der IL-6-Zytokinfamilie zählt man *Cardiotrophin-like Cytokine* (CLC), *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), *Cardiotrophin-1* (CT-1), *Interleukin-6* (IL-6), *Interleukin-11* (IL-11), *Interleukin-27* (IL-27), *Interleukin-31* (IL-31), *Leukaemia-Inhibitory-Factor* (LIF), *Neuropoietin* (NP) und *Oncostatin M* (OSM) (sh. dazu Abb.1) <sup>41, 52, 102, 135, 136, 140, 144, 201, 345</sup>.

Diese Zytokine bestehen strukturell aus vier antiparallelen  $\alpha$ -Helices, die mit A, B, C und D bezeichnet werden, und die durch Polypeptid-Loops miteinander verbunden sind <sup>77, 136</sup>. Während IL-6 und IL-11 gerade A-Helices besitzen, sind diese bei LIF, CNTF und OSM geknickt und scheinen mitursächlich für die Unterschiede der Rezeptorrekrutierung zu sein. So wird die Signaltransduktion bei eben diesen A-Helices mit Knick über gp-130 und LIFR oder gp-130 und OSMR ausgeführt; bei IL-6 und IL-11 dagegen über gp-130-Homodimere <sup>77, 154</sup>. Der Knick führt zur Umpositionierung des C-terminalen Endes der Helix A und bewirkt ebendiese Bindung von LIFR und OSMR, während die Umpositionierung des N-terminalen Teils der Helix A zur gp-130-Bindung führt. Beispielhaft ist in Abbildung 1 die Helixstruktur des in dieser Arbeit untersuchten Zytokines OSM dargestellt (sh. folgende Seite) und vergleichend dazu in Abbildung 2 die Struktur verwandter Mitglieder der IL-6-Zytokin-Familie.



**Abb. 1: Strukturelle Darstellung von hOSM.**

Der N-terminale Teil ist blau dargestellt, der C-terminale Abschnitt rot. Die Schwefelatome sind als gelbe Kugeln eingezeichnet. Der CD-Loop wie in LIF beobachtet ist transparent gepunktet dargestellt. (aus Deller *et al.* (2000)<sup>77</sup>)



**Abb. 2: Vergleich des strukturellen Aufbaus einzelner IL-6-Zytokine mit OSM.**

Die Helix A (blau) ist bei OSM, LIF und CNTF jeweils geknickt, während sie sich bei IL-6 gerade darstellt. Helix C (hellgrün/gelb) ist nur in OSM geknickt. (aus Deller *et al.* (2000)<sup>77</sup>)

Die Rezeptoren der IL-6-Familie zählt man zur Familie der Typ-1-Zytokinrezeptoren, die sich dadurch auszeichnen, dass sie alle mindestens ein extrazelluläres zytokin-bindendes Modul (CBM) besitzen<sup>144, 174, 305</sup>. Charakteristisch für die Mitglieder der IL-6-Zytokinfamilie ist außerdem, dass sie die Fähigkeit besitzen an die ubiquitär vorkommende Rezeptoruntereinheit gp-130 zu binden<sup>136, 139, 145, 174, 210</sup>. Gp-130 ist ein Membran-Glykoprotein bestehend aus 918 Aminosäuren mit einer Transmembrandomäne. Die extrazelluläre Region enthält sechs Einheiten eines Fibronektins vom Typ III<sup>145, 246, 309</sup>. Sie besteht aus einer signaltransduzierenden  $\beta$ -Kette, wie dies auch für den LIFR gezeigt wurde<sup>201</sup>. Bei der Herstellung einer löslichen Form von gp-130 (s-gp-130) und deren direkter Bindung an LIF und OSM konnte gezeigt werden, dass dies die biologischen Funktionen der beiden Zytokine supprimiert und so möglicherweise einen therapeutischen Ansatz für die Prävention von OSM- oder LIF-induzierten Erkrankungen darstellen kann<sup>239</sup>. Für die erfolgreiche Signaltransduktion und die Entwicklung ihrer Wirkungen müssen die IL-6-Zytokine an eben diese gp-130-Untereinheiten und einen für sie spezifischen Rezeptor-Komplex binden. Die Expression von gp-130 allein führt nicht zur Bindung an verschiedene Botenstoffe<sup>174</sup>.

Tabelle 1 (sh. Seite 17) zeigt die verschiedenen IL-6-Zytokine mit Produzenten- und Zielzelle, Wirkung des Zytokins und die Rezeptoren, die an der Signaltransduktion beteiligt sind in der Übersicht.

CLC, das hauptsächlich eine Rolle im Nervensystem spielt, ähnelt dem CNTF, und beeinflusst das Überleben von Motoneuronen. Bei Versuchen mit Knock-out-Mäusen, bei denen das Gen für CLC ausgeschaltet wurde, zeigte sich eine verminderte Gesichtsmobilität, ca. 30% weniger Motoneuronen im Nucleus facialis und im lumbalen Vorderhorn und ein Todeseintritt nach 24 Stunden<sup>413</sup>. Dieses Defizit an Motoneuronen konnte auch für Mäuse mit einem Mangel an CNTFR $\alpha$  gezeigt werden<sup>75</sup>. CLC ist bedeutend für die Differenzierung von Astrozyten und neuroepithelialen Zellen<sup>371</sup>. Es bindet an den CNTF-Rezeptor; die Ausführung seiner Funktion erfolgt dagegen nach Bindung des gp-130 und LIFR-Komplexes<sup>10, 28, 227</sup>. Es wurde ein weiterer Faktor entdeckt, der zusammen mit CLC sezerniert wird, nämlich der lösliche Rezeptor CLF (*cytokine-like factor-1*). Der CLF/CLC-Komplex scheint ein zweiter Ligand des CNTFR $\alpha$  zu sein<sup>91, 305</sup>.

CNTF wurde erstmals in seiner Fähigkeit auf das Überleben von Nervenzellen beschrieben und erhielt so seine Bezeichnung. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass es verschiedene Funktionen in der Entwicklung des Nervensystems inne hat<sup>305</sup>, aber auch

bei Adipositas und diabetischen Erkrankungen eine Rolle spielt<sup>349</sup>. Des Weiteren wurde eine Beteiligung an Wachstum und Remodelling im Knochenstoffwechsel nachgewiesen<sup>227</sup>. Der CNTF-Rezeptor-Komplex, der aus einer nicht-signalübermittelnden  $\alpha$ -Kette besteht, wird im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert und bindet an zwei signaltransduzierende  $\beta$ -Ketten, gp-130 und den LIFR. An diesen können neben CNTF auch die Zytokine CLC und NP binden<sup>28, 74, 91, 161, 227</sup>. Der Rezeptor besitzt als einziger der IL-6-Zytokinfamily keine Transmembrandomäne, sondern ist über eine Glykosyl-Phosphatidylinositol-Verbindung in der Zellmembran verankert<sup>74, 174</sup>.

CT-1 wurde erstmals in den 90er Jahren isoliert und nach seiner Fähigkeit eine Hypertrophie von Kardiomyozyten herbeizuführen benannt<sup>275</sup>. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Differenzierung von Stammzellen und der Hämatopoese. Auch CT-1 bindet für seine Funktionsausübung direkt an den LIFR und die gp-130-Untereinheit<sup>275, 297</sup>. Es ist noch nicht ganz geklärt, ob es einen spezifischen Rezeptor für CT-1 gibt, der einen Komplex mit gp-130 und LIFR bildet, ähnlich dem CNTFR<sup>174, 297</sup>.

IL-6, auch B-Zellen-stimulierender-Faktor-2 (BSF-2) genannt, bewirkt eine Proliferation und Differenzierung von B-Zellen, spielt eine Rolle bei der Synthese der Akute-Phase-Proteine (APP) in der Leber und wirkt als Wachstumsfaktor bei Myelom- und Plasmozytomzellen<sup>174, 244, 246</sup>. Seine Signalübertragung erfolgt über die Bindung von IL-6 an den IL-6-Rezeptor- $\alpha$  (IL-6R $\alpha$ ), was wiederum die Vereinigung des Rezeptors mit dem signaltransduzierenden gp-130 triggert<sup>246</sup>. Den IL-6R findet man auch in löslicher Form als s-IL-6R, in der er die Kapazität IL-6 zu binden behält, und biologische Funktionen des Zytokins fördert<sup>145, 237, 406</sup>.

IL-11 wurde initial als Wachstumsfaktor von Plasmozytomzellen identifiziert. Als pleiotropes Zytokin hat es verschiedene Funktionen inne, wie u. a. die Stimulation der Hämato- und Thrombopoese, die Differenzierung von Makrophagen, die Entstehung von Tumoren und Beteiligung an Inflammationsreaktionen. Für die Signaltransduktion benötigt es einen Rezeptorkomplex, der aus dem Liganden-bindenden IL-11R $\alpha$  und der ubiquitär vorkommenden gp-130-Untereinheit als Homodimer besteht<sup>174, 283</sup>.

IL-27, das 2002 erstmals beschrieben wurde, ist Mitglied der IL-6/IL-12-Familie. Dieses Zytokin nimmt Einfluss auf die Differenzierung von B-/T-Zellen, Makrophagen und hämatopoetischen Stammzellen und kann sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken. Außerdem scheint es die Angio- und Tumorgenese zu hemmen<sup>148, 206, 339</sup>. IL-27 besteht aus zwei Teilen, nämlich einem löslichen Rezeptor, dem Epstein-Barr-Virus-induzierten-Gen3 (EBI-3), und dem Protein IL-27p28<sup>186</sup>. Seine Signaltransduktion erfolgt

über die Bindung des spezifischen Rezeptors WSX-1 (IL27R $\alpha$ ) an die ubiquitäre gp-130-Untereinheit und führt zur Aktivierung von STAT1 und STAT3<sup>80, 277, 278, 309, 334, 377, 378</sup>. Eine kürzlich erschienene Studie konnte zeigen, dass dendritische Zellen den p28/CLF-Komplex unabhängig von EBI-3 exprimieren können und dadurch NK-Zellen aktivieren, die wiederum vermehrt proinflammatorische Zytokine wie z.B. IFN $\gamma$  sezernieren<sup>66</sup>. IL-27-Polymorphismen scheinen auch bei CED eine Rolle zu spielen<sup>195</sup>. Eine Studie von *Diegelmann et al.* (2012) zeigte, dass das Zytokin IL-27 die intestinale Epithelzellbarriere über die Aktivierung von STAT-Signalwegen und die Induktion antibakterieller und antiinflammatorischer Proteine protektiv beeinflusst<sup>80</sup>.

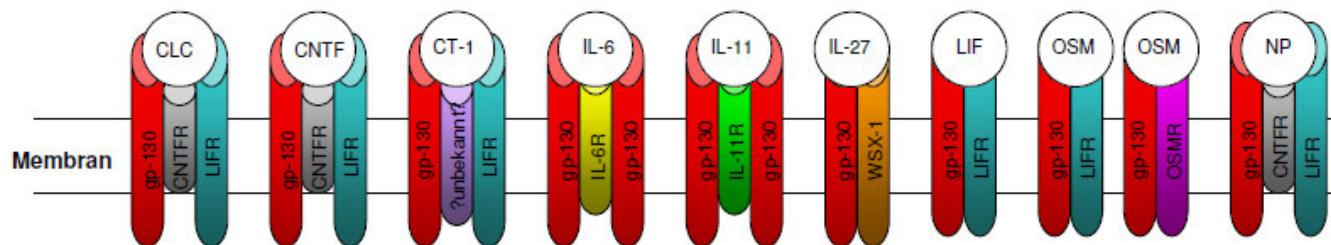
IL-31 wurde erst kürzlich als Mitglied der IL-6-Zytokinfamilie beschrieben. Es wird vor allem von CD4+-T-Zellen produziert<sup>411</sup>. Dieses Zytokin bindet zur Signaltransduktion an einen heterodimeren Rezeptorkomplex bestehend aus OSMR $\beta$  und IL-31R $\alpha$  (ein gp-130-like Rezeptor); im Gegensatz zu den anderen IL-6-Mitgliedern fehlt hier die Beteiligung der gp-130-Untereinheit<sup>14, 64, 411</sup>. Auch IL-31 stimuliert die Ras/ERK-, den PI3K/Akt- und den JAK/STAT-Signalweg und scheint bei inflammatorischen Prozessen in verschiedenen Geweben<sup>49, 64, 411</sup> und in der Regulation der Hämatopoiese<sup>40</sup> eine Rolle zu spielen. Erhöhte Konzentrationen des Zytokins konnten z. B. bei entzündlichen Erkrankungen wie der Atopischen Dermatitis<sup>51, 94, 264</sup>, allergischem Asthma bronchiale<sup>49, 190</sup> und CED<sup>70</sup> beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass auch IL-31 die OSMR $\beta$ -Untereinheit besitzt und einen Komplex mit IL-31R $\alpha$  bildet, nicht jedoch mit gp-130<sup>83, 49</sup>. IL-31R $\alpha$ -Knock-out-Mäuse zeigten eine erhöhte Expression des OSMR und eine gesteigerte Empfindlichkeit für OSM, einhergehend mit einer gesteigerten Produktion von OSM-induzierten Zytokinen wie z. B. IL-6 oder VEGF<sup>24</sup>.

LIF wird von embryonalen Stammzellen exprimiert und ist an verschiedenen biologischen Vorgängen beteiligt, wie der Differenzierung und Wachstumsinduktion unterschiedlicher Zielzellen, an Entzündungsreaktionen<sup>56</sup>, der Embryogenese<sup>2410, 364</sup> sowie der Entwicklung des Nervensystems<sup>50, 242</sup>. Neuere Studien lassen vermuten, dass es bei Entstehung oder Reparaturvorgängen der Alzheimer- und/oder Parkinson-Erkrankung Relevanz besitzt<sup>342</sup>. Es wurde beobachtet, dass der LIFR durch die Assoziation mit gp-130 mit hoher Affinität OSM oder LIF bindet und dadurch zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges führt<sup>50</sup>.

NP scheint ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des Nervensystems zu spielen<sup>305</sup>. Dieses Zytokin ist ebenfalls Ligand des CNTFR-Komplexes<sup>382</sup>. Die Signaltransduktion erfolgt über den LIFR und die gp-130-Untereinheit<sup>227</sup>. Des Weiteren

konnte eine Beteiligung an der Lipogenese gezeigt werden; hier allerdings scheint die Vermittlung inhibitorischer Effekte auf Adipozyten durch NP nicht über den LIFR zu laufen<sup>393</sup>.

Zusammengefasst nutzen bis auf IL-31 alle Zytokine der IL-6-Familie die  $\beta$ -Kette gp-130 in der Funktion der signalübertragenden Untereinheit, wobei dies jedoch auf unterschiedliche Art geschieht. So erfolgt die Bindung des IL-6/IL-6R $\alpha$  und des IL-11/IL-11R $\alpha$ -Komplexes über die Homodimerisierung von gp-130. CLC, CNTF und NP binden zwar an den CNTFR $\alpha$ , die Signaltransduktion erfolgt allerdings über ein Heterodimer aus gp-130 und LIFR. Auch CT-1, LIF und OSM binden an einen heterodimeren Komplex aus LIFR und gp-130. Die Besonderheit des humanen OSM (hOSM) liegt darin, dass es seine Funktion sowohl über die Bindung des Heterodimers LIFR und gp-130 ausführen kann, als auch über OSMR und gp-130, während murines OSM (mOSM) nur über die Verbindung von gp-130 und den OSMR zur Signaltransduktion führt<sup>243, 366</sup>. Einen Überblick dazu bietet Abbildung 3.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Zytokinrezeptor-Komplexe der IL-6-Zytokine:**

Alle Zytokine der IL-6-Familie verwenden gp-130 als signaltransduzierende Untereinheit. Während CLC, CNTF und NP an den CNTFR binden können, ist diese Komponente bei CT-1 noch nicht bekannt. Die Signalübertragung für diese Zytokine erfolgt über eine Verbindung zwischen LIFR und gp-130. IL-6 und IL-11 benötigen ein Homodimer aus gp-130. LIF und humanes OSM können über eine Verbindung von gp-130 und LIFR wirken. Sowohl humanes, als auch murines OSM können an gp-130 und OSMR binden. IL-27 überträgt seine Wirkung über eine Bindung von gp-130 und WSX-1. (nach Heinrich *et al.* (2003)<sup>136</sup>)

Interessant ist die Tatsache, dass OSM dem LIF strukturell am ähnlichsten ist. Die beiden verwandten Zytokine teilen sich ca. 30 % der homologen Aminosäuresequenzen und eine identische Exon-Intron-Struktur, was vermuten lässt, dass diese beiden Gene durch Duplikation entstanden sein könnten<sup>210</sup>. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich OSM und LIF *tandem-linked* auf dem menschlichen Chromosom 22q12 befinden. In einer genomweiten Assoziationsstudie wurde ein SNP (rs2412970) auf Chromosom 22 nahe OSM und LIF als Gen identifiziert, das für Morbus Crohn (MC) prädisponiert<sup>163</sup>. Des Weiteren werden sie in der gleichen Transkriptionsrichtung abgelesen, nämlich vom Telomer zum Zentromer, wobei das OSM-Gen dem LIF-Gen vorgeschaltet ist, was ebenfalls für eine gemeinsame Entwicklungsgeschichte spricht und ihre Entstehung durch Duplikation von Genen vermuten lässt<sup>111, 302</sup>.

Zytokin	Produzentenzelle	Zielzelle	Wirkung	Signaltransduktion über
<b>CLC</b>	Lymphozyten	Osteoblasten, Motoneuronen, B-Zellen	Verminderte Knochenmineralisation, Entwicklung von Motoneuronen, B-Zell-Stimulation	gp-130 LIFR CNTFR
<b>CNTF</b>	Nervenzellen Osteoblasten	Nervenzellen, Osteoblasten, -klasten und -zyten, Chondrozyten	Entwicklung von ZNS und PNS, Überleben von Neuronen, verminderte Knochenmineralisation	gp-130 LIFR CNTFR/ s-CNTFR
<b>CT-1</b>	Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen	Kardiomyozyten, Stammzellen, hämatopoetische Zellen	Induktion der Hypertrophie von Kardiomyozyten, Unterdrückung der Stammzelldifferenzierung, Hämatopoiese	gp-130 LIFR unbekannt
<b>IL-6</b>	B- und T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen	B- und T-Zellen, Makrophagen, Hepatozyten	B-Zell-Differenzierung, Makrophagenstimulation, Akute-Phase-Protein-Synthese, Wachstumsfaktor	gp-130 gp-130 IL-6R
<b>IL-11</b>	Stromazellen Knochenmark	Plasmazellen, B-Zellen, Makrophagen	Hämatopoiese und Thrombopoiese, Differenzierung von Makrophagen, Tumorwachstum, Wachstumsfaktor	gp-130 gp-130 IL-11R
<b>IL-27</b>	Antigen-präsentierende Zellen	Hämatopoetische Zellen, B- und T-Zellen, Makrophagen	Hämatopoiese, Differenzierung von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen	gp-130 WSX-1
<b>IL-31</b>	T-Zellen	Hämatopoetische Zellen, T-Zellen	Hämatopoiese Inflammation	IL-31RA OSMR
<b>LIF</b>	Embryonale Zellen	Hämatopoetische Zellen, Nervenzellen, Stammzellen	Hämatopoiese, Differenzierung von Stamm- und Nervenzellen, Tumorentwicklung, Akute-Phase-Proteine-Synthese	gp-130 LIFR
<b>NP</b>	Neuroepitheliale Zellen	Nervenzellen, Adipozyten	Entwicklung des Nervensystems, Hemmung der Lipogenese	gp-130 LIFR CNTFR
<b>OSM</b>	Makrophagen, T-Lymphozyten	Melanozyten, Hepatozyten, hämatopoetische Zellen, Makrophagen	Wachstumsregulation, Synthese von APP, Hämatopoiese, Makrophagendifferenzierung	gp-130 OSMR/LIFR

Tab. 1: Übersicht über die IL-6-Zytokinfamilie mit Produzenten- und Zielzellen, Funktionen und die an der Signaltransduktion beteiligten Rezeptoren.

### **1.3. Das Zytokin Oncostatin M**

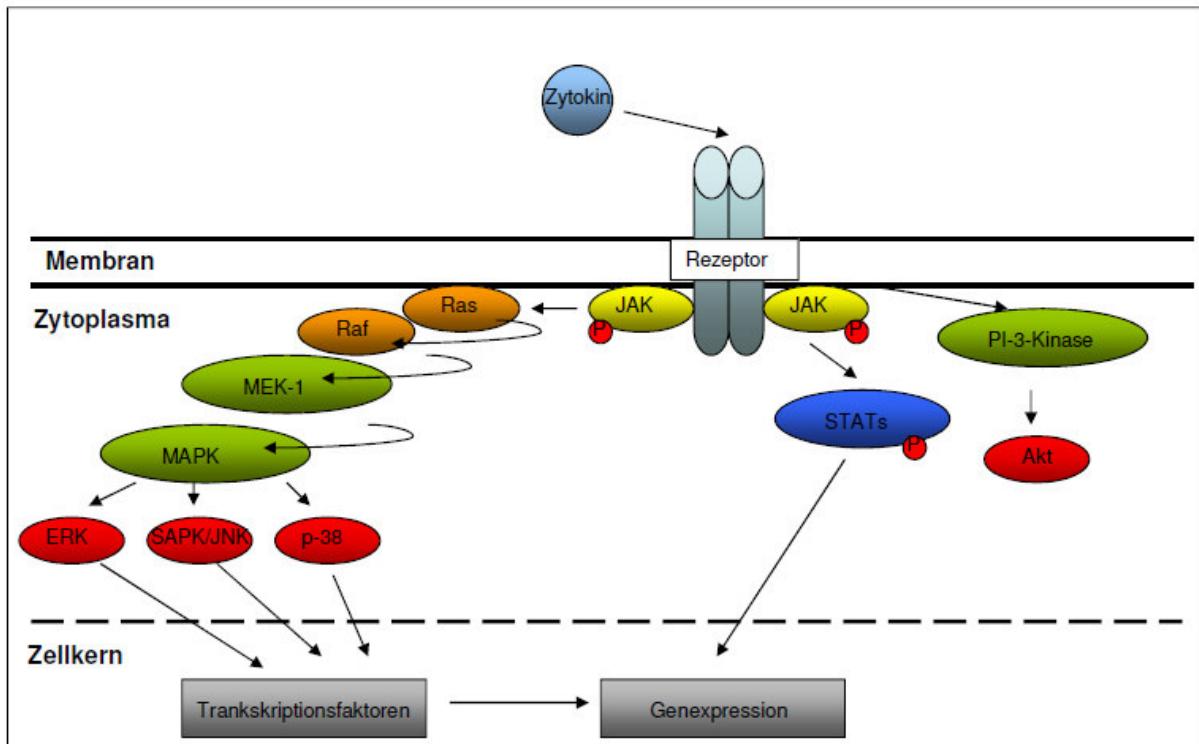
#### **1.3.1. Der OSM/OSMR-Zytokin-Rezeptorkomplex**

Oncostatin M (OSM) ist ein ca. 28 kD schweres Glykoprotein und Mitglied der IL-6-Zytokinfamilie. Seine Synthese erfolgt durch aktivierte Monozyten, T-Lymphozyten und Dendritische Zellen <sup>41, 301</sup>. Die ursprüngliche Isolation erfolgte 1986 aus histiozytären Lymphomzellen <sup>408</sup>. Seine Bezeichnung erhielt es nach seiner im Vordergrund stehenden Eigenschaft, das Wachstum von humanen A375 Melanomzellen zu hemmen <sup>41, 408</sup>. Wie alle Mitglieder der IL-6-Zytokinfamilie bindet OSM an den gemeinsamen gp-130-Rezeptor. Bisher konnten zwei verschiedene OSM-Rezeptoren detektiert werden: OSM Typ I, der aus gp-130 und dem LIFR besteht, und OSM Typ II, der gp-130 und OSMR $\beta$  enthält <sup>243, 366</sup>.

Besonders ist für eine erfolgreiche Signaltransduktion die Fähigkeit des humanen OSM (hOSM) an einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus gp-130 und entweder den LIFR $\beta$  oder den OSMR $\beta$  zu binden; eine monomere Interaktion mit gp-130 ist nicht produktiv <sup>136, 210</sup>. In Versuchen mit murinem OSM (mOSM) hingegen erfolgte die Signaltransduktion lediglich über die Bindung von gp-130 mit dem OSMR $\beta$  und nicht über den LIFR $\beta$  der Maus <sup>157, 201, 361</sup>. Die Bindung von OSM an seinen spezifischen Rezeptor führt über die JAK- und STAT-Signalwege oder die MAPK-Kaskade zur effektiven Signaltransduktion im Kern <sup>210</sup>. Während die gp-130-Untereinheit in allen Geweben exprimiert wird, sind LIFR und OSMR nur in bestimmten Geweben nachzuweisen, wie z.B. Leber, Lunge oder Niere <sup>243</sup>. Es wurde außerdem ein löslicher OSMR (s-OSMR) entdeckt, dessen Sekretion durch Hepatom-, Glioblastom- und Melanomtumorzellen erfolgt. Dieser besitzt die Fähigkeit in Anwesenheit eines löslichen gp-130 oder eines löslichen IL-31-Rezeptors sowohl an OSM als auch an IL-31 zu binden <sup>83</sup>.

#### **1.3.2. Verschiedene Wege der Signaltransduktion für IL-6-Zytokine**

Für die Ausführung verschiedener biologischer Funktionen müssen Zytokine ihre „Information“ von den Rezeptoren auf der Plasmamembran der Zelle zum Zellkern transportieren. Die Signaltransduktion der IL-6-Zytokine erfolgt zum einen über die Aktivierung des JAK/STAT (*Janus Kinase/ Signal transducers and activators of transcription*) -Signalweges und zum anderen über die MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Kaskade <sup>136, 139</sup>, siehe dazu Abbildung 4 ( sh. unten).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Aktivierung der MAPK-Kaskade und des JAK/STAT-Signalweges.**

Die Aktivierung der Signalwege kann nach Bindung des jeweiligen Zytokines an den spezifischen Rezeptor zum einen über die Aktivierung der MAPK-Kaskade über Ras/Raf und MEK oder über den JAK/STAT-Signalweg erfolgen.

### 1.3.2.1. Der JAK/STAT-Signalweg

Die Mitglieder der IL-6-Zytokinfamilie binden zur Signalweiterleitung an die gemeinsame und ubiquitär vorkommende gp-130-Untereinheit und einen spezifischen Rezeptor auf der extrazellulären Seite der Zellmembran. Durch die Ligandenbindung kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors<sup>220, 289</sup>. Da die IL-6-Zytokin-Rezeptoren keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen, interagieren sie mit Tyrosinkinasen im Zytosol, den Januskinasen (JAK). Durch deren Aktivierung kommt es zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste innerhalb der Rezeptorketten, die später als Andockstellen für Proteine dienen, die SH (*Src homology 2*)-Domänen oder andere phosphotyrosin-bindende Motive besitzen. Anschließend binden die STAT-Proteine über ihre SH2-Domäne an die Phosphotyrosinreste, werden dadurch phosphoryliert, diffundieren in den Zellkern und stimulieren dort die Transkription von Zielgenen<sup>135, 140, 289</sup>.

Die Familie der Januskinasen, intrazelluläre Proteine in Säugetieren, umfasst JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2<sup>158, 288</sup>. Benannt wurden sie nach dem römischen Gott Janus, dem Gott des Anfangs und des Endes. Dieser besitzt zwei Köpfe, die als Symbol für seine Zwiespältigkeit stehen, ähnlich den JAK, die zwei Kinase-Domänen besitzen, eine aktive Domäne, das JH1, und eine zweite Pseudokinase-Domäne, das JH2, welches die Aktivität der Kinase-Domäne reguliert<sup>87, 136, 158</sup>. Die gp130-Untereinheit, der LIFR und der OSMR binden an JAK1, JAK2 und Tyk2, wobei JAK1 eine zentrale Rolle zu spielen scheint, da in Zellen, die einen Mangel an JAK1 aufweisen, die Signaltransduktion von IL-6 deutlich beeinträchtigt ist<sup>285, 300</sup>.

Zur Familie der STATs in Säugetieren zählt man die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Für die IL-6-Zytokine ist eine Aktivierung vor allem von STAT3, aber auch von STAT1 über die gp-130-Untereinheit gezeigt worden<sup>136</sup>. Für OSM konnte gezeigt werden, dass es zur Tyrosinphosphorylierung von JAK1, JAK2 und Tyk2 führt und nachfolgend zur Phosphorylierung von STAT1 $\alpha$ , STAT3 und SH2P (*SH2-containing protein tyrosine phosphatase*)<sup>139, 194, 322</sup>. Während die STAT1-Phosphorylierung direkt über die Januskinasen erfolgt, werden zur Aktivierung von STAT3 die C-terminalen Tyrosinmotive Tyr917/Tyr945 des OSMR benötigt<sup>147</sup>. Außerdem konnte für den LIFR und den OSMR neben STAT1 und STAT3 eine Aktivierung von STAT5 nachgewiesen werden<sup>185, 407</sup>. Hintzen *et al.* (2008) konnten zeigen, dass humane und murine OSM-Rezeptoren verschiedene Mechanismen zur Aktivierung von STAT5b nutzen. So besitzt der menschliche OSMR ein STAT5-rekrutierendes Tyrosin-Motiv (Tyr837/Tyr839), das im Maus-Rezeptor nicht anzufinden ist. Der murine Rezeptor dagegen initiiert die Aktivierung von STAT5 direkt über die rezeptorgebundenen Januskinasen, bevorzugt JAK2. Der humane OSMR scheint eine höhere Affinität zu JAK1 zu besitzen, was durch die Aminosäure Phe820 bedingt ist<sup>147</sup>.

### 1.3.2.2. Die Ras/Raf/MAPK- Kaskade

Eine weitere Möglichkeit der Signalübertragung erfolgt über die Ras/Raf/MAPK-Kaskade. Zu der Familie der Mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK) zählen ERK, SAPK/JNK und p38. Hier kommt es durch die Aktivierung von gp-130 und LIFR zur Phosphorylierung von SH2P (*SH2-containing protein tyrosine phosphatase*), das wiederum die Fähigkeit besitzt, das Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor bound*

*protein 2*) zu binden<sup>135, 136, 140, 322</sup>. Dies führt zur Verlinkung des JAK/STAT-Signalweges mit der MAPK-Kaskade. Für den OSMR selbst konnte keine Rekrutierung von SHP2 gezeigt werden. Dennoch besitzt dieser die Fähigkeit die MAPK-Kaskade zu induzieren, was über das Adapterprotein Shc (*SH2-and-collagen-homology-domain-containing protein*) erfolgt. Die Tyrosinphosphorylierung der Shc-Isoformen p52 und p66 scheint dies über ihre Verbindung zu Grb2 zu ermöglichen<sup>135, 136, 140</sup>. Schließlich führt die Rekrutierung von SOS (*Son of sevenless*) zum Rezeptorkomplex Shc-Grb2 zur Aktivierung von Ras und der nachfolgenden Kaskade über Raf und MEK1/2<sup>136, 410</sup>, was die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK-1/2 und anschließend der Transkriptionsfaktoren nach sich zieht<sup>322</sup>. Wie die Aktivierung der Mitglieder SAPK/JNK und p-38 der MAPK-Familie genau erfolgt, ist noch nicht geklärt. Jedoch scheinen verschiedene MAPKKs den SAPK/JNK-Signalweg zu aktivieren, wie z. B. Mitglieder der MEKK, der ASK, TAK1 und Tpl2. Außerdem scheint eine Cross-Aktivierung von SAPK/JNK durch ERK möglich zu sein<sup>410</sup>. Die MAPK p-38 kann bei einwirkendem Stress auf die Zelle durch unterschiedliche MKKs phosphoryliert und aktiviert werden. Es bestehen verschiedene Quer-Verlinkungen zwischen den einzelnen Signalwegen<sup>410</sup>.

### 1.3.2.3. Die PI3K-Kaskade

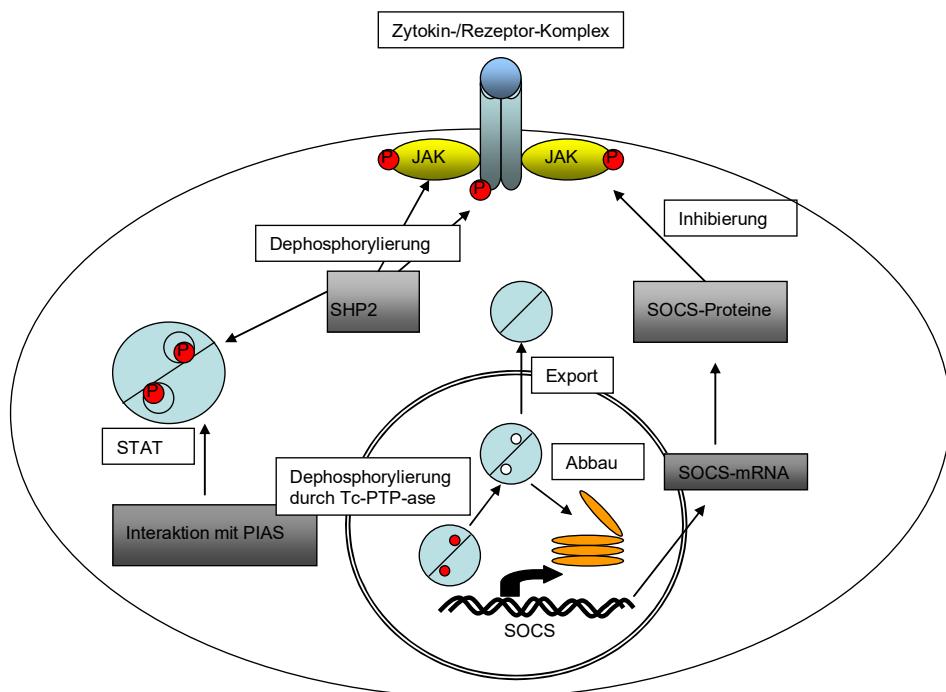
Zytokine der IL-6-Familie können außerdem zur Aktivierung der Phosphoinositolphosphatidyl-3-Kinase-Signalkaskade (PI3K) führen. Dieses Enzym modifiziert Phosphatidylinositide so, dass Akt, eine Serin-/Threonin-Kinase, an die Plasmamembran rekrutiert wird, wo sie durch Phosphorylierung der PDK1 (*phosphoinositide-dependent-kinase-1*) aktiviert wird<sup>136</sup>. Es ist noch nicht genau bekannt, wie gp-130 zur Aktivierung dieses Signalweges führt. Eine Rolle dabei scheint das Adaptermolekül Gab-1 (*Grb2-associated binder 1*) zu spielen, das eine Aktivierung der MAPK ERK über gp-130 ermöglicht<sup>359</sup>. Durch die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren kommt es zur Tyrosin-Phosphorylierung von Gab-1 und nachfolgend einer Interaktion mit SHP2 und der p58-PI3K<sup>254</sup>.

#### 1.3.2.4. Die Regulierung und Modulation der Signalwege

Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, die die IL-6-Zytokin-vermittelte Signaltransduktion inhibieren können, um eine einseitige Stimulation zu verhindern. Eine Zusammenfassung hierzu zeigt Abbildung 5 (sh. Seite 23). Zum einen erfolgt dies über SHP2, eine ubiquitär im Zytosol vorkommende Tyrosin-Phosphatase, die zum einen die Phosphorylierung der Januskinasen und damit die Aktivierung der Signalkaskaden ermöglicht, zum anderen bei Abwesenheit Tyrosin-phosphorylierter Bindungspartner durch Dephosphorylierung den Signalweg inhibieren kann<sup>149</sup>. Dies geschieht über die Rekrutierung an das zytoplasmatische Tyr<sup>759</sup> des aktivierte gp-130<sup>326</sup>.

Zudem wird die negative Regulierung der Signaltransduktion über die Familie der SOCS (*suppressor of cytokine signalling*)-Proteine erreicht, die aus acht Mitgliedern besteht: CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6 und SOCS7<sup>5, 121, 136</sup>. Diese Proteine werden auch SSI (*STAT-induced STAT inhibitor*) oder JAB (*Janus kinase-binding protein*) genannt<sup>256</sup>. Man zählt sie zu den klassischen Feedback-Inhibitoren<sup>347</sup>. Es konnten mehrere Domänen gefunden werden, die die Unterdrückung der IL-6-Signaltransduktion ermöglichen. Dies sind zum einen die zentrale SH2-Domäne, außerdem eine N-terminal von SH2 liegende Prä-SH2-Domäne, die ESS (*extended SH2 subdomain*) genannt wird, eine KIR (*Kinase inhibitory region*)-Domäne und eine C-terminale SOCS-Box, die allen SOCS-Proteinen gemeinsam sind<sup>5, 121, 256, 260</sup>. Über SH2 können SOCS an die Phosphotyrosin-Motive der Januskinasen und somit innerhalb deren Aktivierungsloop ansetzen und deren Tyrosinkinase-Aktivität hemmen. Hierbei unterstützen die ESS und die KIR die SOCS in ihrer Funktion<sup>318, 405</sup>. Die SOCS-Box interagiert über eine Bindung an Elonginproteine mit Ubiquitin-Ligasen, um den Abbau SOCS-assozierter Substrate einzuleiten<sup>5, 121, 256, 352</sup>. Um die JAK-vermittelte Signaltransduktion zu inhibieren, müssen SOCS an das phosphorylierte Tyr<sup>759</sup> des zytosolischen gp-130<sup>219, 326, 365</sup> oder Tyr<sup>974</sup> des LIFR binden<sup>352</sup>. An der Inhibition der IL-6-Zytokin-familie vermittelten JAK/STAT-Signalwege sind hauptsächlich die Proteine SOCS1 und SOCS3 beteiligt. So wurden als Antwort auf IL-6 in vitro und in vivo erhöhte Konzentrationen von CIS-, SOCS1-, SOCS2- und SOCS3-Proteinen gefunden<sup>252, 260, 343, 347</sup>. Die Unterdrückung OSM-induzierter Signalwege erfolgt überwiegend über SOCS3<sup>12, 215, 216, 352</sup>. LIF-induzierte Signalwege werden vor allem durch SOCS1, SOCS2 und SOCS3 gehemmt<sup>234, 252, 259</sup>. Für IL-11 konnte eine Überexpression von SOCS3 gezeigt werden<sup>82, 215</sup>.

Eine weitere Möglichkeit, die einmal ablaufenden IL-6-Zytokin-Signalkaskaden zu beenden, liegt in der Familie der PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*). Innerhalb dieser Familie mit den Mitgliedern PIAS1, PIAS3, PIAS $\alpha$ , PIAS $\beta$  und PIAS $\gamma$  besteht eine 50%ige Homologie in der Aminosäuresequenz. PIAS binden STAT-Dimere und unterdrücken so deren Fähigkeit DNS zu binden<sup>203</sup>. PIAS1 gilt als spezifischer Inhibitor der STAT1-vermittelten Signaltransduktion<sup>203, 372</sup>, während PIAS3 zur Unterbindung der STAT3-vermittelten Signalübertragung führt<sup>59</sup>. Der entsprechende molekulare Mechanismus ist noch nicht ins Detail geklärt, es scheint jedoch eine Konjugation von SUMO (*small ubiquitin-like modifier ligases*) an die STATs eine Rolle zu spielen<sup>372</sup>.



**Abb. 5: Mechanismen der Negativregulierung von Zytokinen der IL-6-Familie.**  
Die Negativregulierung kann über die Tyrosinphosphatase SH2, die Aktivierung der SOCS-Familie, sowie über die PIAS erfolgen. (nach Heinrich *et al.* (2003)<sup>136</sup>)

### 1.3.3. Matrixmetalloproteinasen und TIMPs

Matrixmetalloproteinasen (MMPs), auch *Matrixins*<sup>249</sup> genannt, sind Zink-abhängige Enzyme, die an der Organisation und am Abbau extrazellulärer Matrix beteiligt sind. Sie werden entsprechend ihrer Domänen und ihrer Substratbindungsspezifität in verschiedene Gruppen unterteilt: Kollagenasen (MMP-1,-8,-13 und -18), Gelatinasen (MMP-2 und -9), Stromelysine (MMP-3,-10,-11), Matrilysine (MMP-7,-26), Membran-Typ-(MT-)MMPs

(MMP-14,-15,-16,-17,-24,-25) und andere (MMP-12,-19,-20,-21,-23,-27,-28)<sup>381</sup>. Eine Übersicht dazu gibt Tabelle 2 (sh. Seite 25). MMPs spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von Geweben, bei Apoptose, Entzündungsprozessen, Wachstumsvorgängen, in der Wundheilung und Zellmigration<sup>249</sup>.

Der Mensch besitzt 24 Gene für Metalloproteininasen, wovon das Gen 23 doppelt vorliegt. Alle MMPs, mit Ausnahme von MMP-7, MMP-23 und MMP-26, bestehen typischerweise aus einem Propeptid aus ca. 80 Aminosäuren, einer katalytischen Metalloproteinase-Domäne aus ca. 170 Aminosäuren, einem Verbindungspeptid variabler Länge und einer Hemopexin-Domäne aus ca. 200 Aminosäuren. MMP-7, MMP-23 und MMP-26 fehlt dieses Verbindungspeptid und die Hemopexin-Domäne<sup>249</sup>.

Für gewöhnlich ist die Aktivität der MMPs in unauffälligem gesundem Gewebe sehr gering. Eine gesteigerte Expression wird durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen hervorgerufen. Auch OSM ist in der Lage eine erhöhte Expression von Matrixmetalloproteininasen zu erreichen. Dies konnte für verschiedene TIMPs und MMPs unter anderem in Astrozyten<sup>177</sup>, Chondrozyten<sup>198, 373</sup>, Fibroblasten<sup>177</sup>, glatten Muskelzellen<sup>250</sup> und Kardiomyozyten<sup>391</sup> gezeigt werden.

Ihre physiologische Regulation erfolgt durch endogene Inhibitoren. Zu den bedeutendsten gehören die *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), von denen bisher TIMP-1,-2, -3 und -4 beschrieben sind<sup>36</sup>. TIMPs bestehen aus 184-194 Aminosäuren<sup>249</sup> und besitzen eine N- und eine C-terminale Domäne. Mit allen Vertretern der MMPs bilden sie eine stöchiometrische 1:1 Verbindung, jedoch in unterschiedlicher Intensität. Die Inhibierung erfolgt durch die Bindung der N-terminalen Region der TIMPs an die katalytische Domäne der MMPs, während das C-terminale Ende mit den Pro-Formen von MMP-2 und MMP-9 interagiert, um den Pro-Enzym-Inhibitor-Komplex zu stabilisieren<sup>29</sup>. Weitere Proteine, die zur Deaktivierung der MMPs führen können, sind u.a.  $\alpha_2$ -Makroglobulin<sup>249</sup>, *Tissue factor pathway inhibitor-2* (TFPI-2)<sup>138</sup>, *Transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ )<sup>90</sup> und *Reversion including cysteine rich proteine* (RECK)<sup>358</sup>.

Wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs in der extrazellulären Matrix kommt, kann dies zu Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis<sup>132, 268, 269</sup>, Peridontitis<sup>171</sup> oder chronischen Ulcera<sup>390, 400</sup> führen. Außerdem konnte eine Beteiligung verschiedener MMPs an der Entstehung von artherosklerotischen Plaques<sup>257, 379</sup> und der Pathogenese von Myokardinfarkten<sup>133</sup> und Aortenaneurysmen<sup>208, 337, 379</sup> nachgewiesen

werden. Auch bei entzündlichen Darmerkrankungen scheinen MMPs eine Rolle zu spielen<sup>45, 118, 230</sup>.

Die Studie von *Fearon et al.* (2006) konnte zeigen, dass das Zytokin OSM über die Hochregulation von MMPs zur Knorpeldegeneration führt und somit bei der Rheumatoide Arthritis eine Rolle spielt<sup>98</sup>.

<b><u>Enzym-Klasse</u></b>	<b><u>Membran-Typ</u></b>	<b><u>MMP</u></b>	<b><u>Enzym</u></b>
<b>Kollagenasen</b>		MMP-1	Kollagenase 1, interstitielle Kollagenase
		MMP-8	Kollagenase 2, neutrophile Kollagenase
		MMP-13	Kollagenase 3
		MMP-18	Kollagenase 4
<b>Gelatinasen</b>		MMP-2	Gelatinase A
		MMP-9	Gelatinase B
<b>Stromelysine</b>		MMP-3	Stromelysin 1
		MMP-10	Stromelysin 2
		MMP-11	Stromelysin 3
<b>Matrilysine</b>		MMP-7	Matrilysin 1, Pump-1
		MMP-26	Matrilysin 2
<b>Membrantyp-MMPs</b>	Transmembran	MMP-14	MT1-MMP
		MMP-15	MT2-MMP
		MMP-16	MT3-MMP
		MMP-24	MT5-MMP
	GPI-Anker	MMP-17	MT4-MMP
		MMP-25	MT6-MMP
<b>Andere</b>		MMP-12	Makrophagen-Elastase
		MMP-19	
		MMP-20	Enamelysin
		MMP-21	X MMP (Xenopus)
		MMP-23	CA-MMP
		MMP-27	CMMP
		MMP-28	Epilysin

**Tab. 2:** Übersicht über die Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Diese werden unterteilt in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, MT-MMPs und andere. (nach Visse et al. (2003)<sup>381</sup>)

### **1.3.4. Biologische Funktionen von Oncostatin M**

OSM ist ein pleiotropes Zytokin mit unterschiedlichen Funktionen, die sich teilweise mit den ihm verwandten IL-6-Zytokinen überschneiden.

Die zuerst entdeckte Eigenschaft des OSM, nach der das Zytokin auch benannt wurde, besteht in der Unterdrückung der Replikation von Melanom- und anderen humanen Tumorzellen und zeichnet es als wachstumsregulatorisches Zytokin aus<sup>408</sup>. Dabei kann es sich abhängig vom Gewebe inhibierend oder stimulierend auf das Wachstum auswirken. Zu den Tumorarten, deren Wachstum durch OSM negativ beeinflusst wird, zählen unter anderem Bronchialkarzinome<sup>152, 271</sup>, Chondrosarkome<sup>73</sup>, Glioblastome<sup>105, 129</sup>, Kolorektale Karzinome<sup>78, 143</sup>, Mammakarzinome<sup>85, 120, 204, 205</sup>, Melanome<sup>39, 182, 183, 184, 408</sup> und Osteosarkome<sup>37, 54</sup>. Die Unterdrückung des Tumorwachstums erfolgt durch die Fähigkeit von OSM die Tumorzellen antiproliferativ zu beeinflussen und die Zelldifferenzierung und Apoptose in Tumorzellen zu fördern, wodurch es zytostatisch wirkt<sup>73, 78</sup>.

Im Fall von AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkomen dagegen scheint OSM das Tumorwachstum zu stimulieren<sup>6, 233, 251</sup>. Auch bei Prostata-<sup>117, 392</sup>, Ovarial-<sup>197, 320</sup> und Zervixkarzinomen<sup>395</sup> scheint das Zytokin proangiogenetisch und somit fördernd auf Wachstum und Invasivität zu wirken.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass OSM die Differenzierung mesenchymaler und epithelialer Zelllinien beeinflusst. In Studien mit pluripotenten embryonalen Stammzellen inhibierte das Zytokin die Differenzierung *in vivo*<sup>303</sup>.

Auch an der Hämatopoese ist OSM beteiligt. So wird es in embryonalen und adulten hämatopoetischen Geweben exprimiert, reguliert die Interaktion zwischen hämatopoetischen und Zellen des Knochenmarks und stimuliert Stroma- und hämatopoetische Vorläuferzellen<sup>362, 363, 404</sup>. Außerdem besitzt es pro-koagulatorische Eigenschaften<sup>235, 262</sup>.

Ein weiterer Bereich, in dem OSM Einfluss nimmt, ist der Knochenstoffwechsel. OSM wird von Osteoblasten und -zyten produziert und steuert diese, abhängig vom signaltransduzierenden Rezeptor, auf unterschiedliche Art und Weise<sup>20, 162, 386</sup>. So konnte bei Patienten mit Stüve-Wiedemann Syndrom (SWS), das autosomal-rezessiv vererbt wird und mit einer angeborenen Skelettdysplasie und Verbiegung langer Knochen einhergeht, ähnlich dem Schwartz-Jampel Typ 2 Syndrom (SJS2), das ebenfalls durch Gelenk- und Knochenanomalien charakterisiert ist, in 19 untersuchten Familien eine Nullmutation des

LIFR-Gens auf Chromosom 5p13 nachgewiesen werden. Durch die Mutationen des LIFR-Gens kommt es zur veränderten Stabilität der LIFR-mRNA, was zur Abwesenheit des LIFR-Proteins führt und zu einer Beeinträchtigung des JAK/STAT3-Signalweges in diesen Patienten.<sup>69</sup> In einer Studie von *Walker et al.* (2010) konnte im Mausmodell durch murines OSM über die Aktivierung des LIFR eine gehemmte Sklerosin-Produktion in Bindegewebezellen und murinen Osteoblasten gezeigt werden und eine damit einhergehend verbesserte Knochenbildung. Dagegen wurde durch murines OSM über die Aktivierung des OSMR die Produktion von RANKL (*Receptor activator of NF-KB Ligand*) stimuliert und die Osteoklastendifferenzierung gefördert. OSMR-Knock-out-Mäuse im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen zeigten eine gesteigerte trabekuläre Knochenmasse<sup>386</sup>.

Auch in Skelett- und glatter Muskulatur spielt OSM eine Rolle. Studien von *Bernard et al.* (1999) und *Xiao et al.* (2011) legten dar, dass Proliferation und Differenzierung der Muskelzellen über den JAK/STAT-Signalweg reguliert werden<sup>22, 402</sup>. In Kardiomyozyten führte OSM, wie auch beim Myokardinfarkt und der chronisch dilatativen Kardiomyopathie, zum Umbau und zur Differenzierung von Kardiomyozyten<sup>179</sup>.

*Xia et al.* (2011) konnten zeigen, dass OSM im Rattenmodell protektiv auf die Photorezeptoren der Retina wirkt und die Regeneration dieser fördert<sup>401</sup>.

Bei entzündlichen Prozessen in verschiedenen Organsystemen nimmt das IL-6-Zytokin OSM ebenfalls eine tragende Rolle ein. Bei systemischen Entzündungsreaktionen führen verschiedene chemische, physikalische und biologische Reize auf molekularer Ebene initial zur Hochregulation proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  oder IL1 $\alpha/\beta$ , die wiederum als Botenstoffe v. a. Endothelzellen, Makrophagen sowie Leukozyten zur Ausschüttung weiterer entzündlicher Stoffe wie Chemokine, Matrixmetalloproteininasen und Wachstumsfaktoren stimulieren, wodurch über Signalkaskaden eine entzündliche Reaktion im Gewebe hervorgerufen wird, die bis zu dessen Destruktion führen kann. In der nachfolgenden Phase ermöglichen weitere Faktoren (z. B. IL-6, Proteaseinhibitoren, TIMPs) einen Rückgang der Entzündung und die Förderung der Wundheilung. Wenn dieses Gleichgewicht gestört wird, können chronisch entzündliche Erkrankungen in verschiedenen Organsystemen auftreten<sup>385</sup>. OSM wirkt über die Regulierung von Zytokinantworten und greift an verschiedenen Punkten in diese Homöostase ein. Es hemmt u. a. die Produktion von TNF $\alpha$ , einem stark proinflammatorisch wirkenden Zytokin, dessen Hochregulation auch bei autoimmunologischen Erkrankungen wie Psoriasis, Rheumatoider Arthritis und CED bedeutsam ist<sup>387</sup>. Außerdem wird in

verschiedenen Geweben OSM-vermittelt eine gesteigerte Expression von IL-6 erreicht<sup>39, 109, 294, 387</sup>. Dieses Zytokin beeinflusst TNF $\alpha$  negativ und ist in die Wundheilung involviert, was für die protektive, anti-entzündliche Komponente spricht.

Die akute Entzündung wird außerdem oft von einer gesteigerten Produktion von Akute-Phase-Proteinen (APP) in der Leber begleitet, die für die Infektabwehr und die Restitutio ad integrum wichtig scheinen. Diese APP-Synthese konnte in Hepatozyten durch humanes OSM dosisabhängig stimuliert werden<sup>295</sup>.

Andererseits scheint OSM proinflammatorische Fähigkeiten inne zu haben. *Modur et al.* (1997) konnten OSM-vermittelt das Einsetzen einer akuten Entzündungsreaktion erzielen, indem es Mäusen subkutan injiziert wurde. Daraufhin konnte die Migration polymorpher Leukozyten, deren Adhäsion und die Ausschüttung der Aktivatoren IL-6, der *Wachstums-verwandten Zytokine  $\alpha/\beta$*  und dem *Neutrophilen-aktivierenden Peptid 78* beobachtet werden<sup>240</sup>. Einige Beispiele für die Beteiligung von OSM bei entzündlichen Erkrankungen sind die atopische Dermatitis<sup>26</sup>, chronische Peridontitis<sup>200, 282</sup>, Psoriasis vulgaris<sup>26</sup>, allergische Lungenerkrankungen und Lungenfibrose<sup>106</sup> und die Rheumatoide Arthritis<sup>88, 98, 232</sup>.

OSM besitzt außerdem antivirale Eigenschaften. *Ikeda et al.* (2009) konnten zeigen, dass OSM synergistisch mit Interferon  $\alpha$  (INF $\alpha$ ), das bereits in Kombination mit Ribavirin bei der Therapie der chronischen Hepatitis-C eingesetzt wird, die Replikation der HCV-RNA in Hepatomzellen hemmt<sup>159</sup>. OSM in Verbindung mit Interferon  $\alpha$  führt in Hepatomzellen, die mit Hepatitis-A- oder Hepatitis-C-Virus infiziert sind, zu einer gesteigerten Induktion antiviraler Gene, die u. a. an der Antigenpräsentation beteiligt sind, und somit zu einer gesteigerten Immunabwehr in Hepatozyten führen<sup>187</sup>.

Die Rolle von OSM im Gastrointestinaltrakt wurde bisher wenig erforscht. *Sanchez et al.* (2003) konnten in einem Mausmodell zeigen, dass ein Transfer von Adenoviralen Vektoren mit murinem OSM, bei dem die Colitis mit 4% Dextran Sodium Sulfat (DSS) induziert wurde, die intestinale Entzündung verglichen mit IL-6 verbesserte, was für die protektive Rolle von OSM spricht, während in einem Colitismodell, in dem die Entzündung mit Oxazolone induziert wurde, OSM zu einer weiteren Aggravierung der Entzündung führte<sup>310</sup>.

## **1.4. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

### **1.4.1. Einteilung und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zählen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Diese sind heterogene chronische Erkrankungen mit variierenden Krankheitsverläufen, die sich schubförmig, chronisch-progradient oder mit langjährigen Remissionen darstellen können. In 10% der Fälle ist eine genaue Differenzierung zwischen den beiden Krankheitsbildern nicht möglich, was als „indeterminierte Kolitis“ bezeichnet wird<sup>62, 141</sup>.

Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt in der 3. Lebensdekade. Nordeuropäer und Nordamerikaner sind bevorzugt betroffen. Die genaue Ätiopathogenese ist noch unklar. Es werden genetische Ursachen, Umweltfaktoren (wie z. B. Infektionen des Intestinums, das Rauchverhalten, psychischer Stress), immunologische Mechanismen (T-Zell-Aktivierung, überschießende Produktion proinflammatorischer Zytokine) u. a. für die Entstehung der CED verantwortlich gemacht<sup>167</sup>.

Als erste Phase der Pathogenese wird die Aktivierung lymphatischer Zellen der Darmwand durch unbekannte Auslöser angesehen. Daraufhin erfolgt eine zytokinvermittelte Bildung von Entzündungsmediatoren, die zu einer lokalen Schädigung des intestinalen Gewebes führen. Bei MC konnte eine erhöhte Beteiligung der Th<sub>1</sub>-Helperzellen nachgewiesen werden, während bei CU vor allem die Th<sub>2</sub>-Helperzellen verstärkt an der Immunreaktion beteiligt sind<sup>62, 141, 167</sup>.

MC zeichnet sich makroskopisch dadurch aus, dass sich die Entzündung diskontinuierlich im gesamten Bereich des Gastrointestinaltraktes manifestiert und alle Abschnitte der Wand betreffen kann, während CU als eine kontinuierliche Entzündung vor allem des Kolons, ausgehend vom Rektum von distal nach proximal, meist die oberflächlichen Schleimhautschichten befällt. Für beide Erkrankungen sind bei bis zu 20% der Patienten extraintestinale Symptome an der Haut (z. B. Erythema nodosum, nekrotisierende Vaskulitis, Psoriasis und Pyoderma gangraenosum), den Gelenken (z. B. Spondylitis, Sakroiliitis), den Augen (z. B. Skleritis, Uveitis), der Leber (z. B. Leberwerterhöhung) und den Gallenwegen (z. B. Primär sklerosierende Cholangitis) beschrieben. Außerdem stellen die CED in unterschiedlichem Maße ein erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome (CRC) dar<sup>62, 141</sup>.

Während bei MC Abdominalschmerzen im rechten Unterbauch und vermehrt schleimige Diarrhöen im Vordergrund stehen, zeigen Patienten mit Colitis ulcerosa vor allem blutige

Diarrhöen, Tenesmen und linksbetonte Unterbauchschmerzen. Endoskopisch sind für MC Stenosen, Fisteln und ein Pflastersteinrelief charakteristisch, bei CU findet man aufgrund der erhöhten Vulnerabilität der Mukosa typischerweise Kontaktblutungen und Pseudopolypen<sup>141</sup>.

Histologisch sind bei MC in 40% der Fälle Epitheloidzellgranulome zu finden, bei CU Kryptenabszesse<sup>62, 141</sup>.

Nicht nur die pathogenetischen und klinischen Charakteristika lassen eine gemeinsame Basis der CED vermuten, sondern auch der Nachweis überlappender Genloci zwischen MC und CU, wie sie in verschiedenen Studien von *Franke et al.* (2008), *Jostins et al.* (2012) oder *Waterman et al.* (2011) innerhalb unterschiedlicher Kohorten erbracht wurden. Hierzu wurden Patienten mit CED bezüglich übereinstimmender SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) verglichen.<sup>104, 163, 389</sup> 2001 wurde NOD2/CARD15 (*nucleotide binding oligomerization domain-containing protein 2/ caspase recruitment domaining protein 15*) als erstes Suszeptibilitäts-Gen, das mit MC assoziiert ist, beschrieben<sup>155, 267</sup>. Es gehört unter den inzwischen über 30 bekannten Loci/Genen zu den klinisch am bedeutendsten, die mit MC assoziiert sind. NOD2 scheint einen intrazellulären Rezeptor für bakterielle Polysaccharide zu kodieren und zu einer NF-κB-Aktivierung zu führen<sup>266</sup>, das als Transkriptionsfaktor verschiedene inflammatorische Botenstoffe stimuliert. Studien von *Heliö et al.* (2003) und *Seiderer et al.* (2006) wiesen nach, dass die NOD2/CARD15-Genvariante 1007fs mit MC assoziiert war. Bei Patienten mit MC, die eine homozygote Frameshift-Mutation von 1007fs aufwiesen, setzte die Krankheit früh ein, ging mit langen segmentalen Stenosen des Ileums und entero-enteralen Fisteln einher, machte häufige chirurgische Interventionen notwendig und stellte ein hohes Risiko für Re-Stenosen dar<sup>137, 332</sup>. Diese Erkenntnisse zeigen die Notwendigkeit der Genotypisierung, um schwer betroffene Patienten früh zu erkennen und einer individualisierten Therapie zuzuführen. Weitere Untersuchungen wiesen nach, dass unter anderem die Autophagie-Gene ATG16L1 (*autophagy related 16-like 1*)<sup>63, 68, 113, 130, 189, 409</sup> und IRGM (*Immunity related GTPase family M protein*)<sup>63, 189, 409</sup>, DLG5 (*discs large homolog 5*)<sup>351</sup>, IL-23R (*Interleukin-23-receptor*)<sup>86</sup> und TLR4 (*Toll-like receptor 4*)<sup>34, 103, 296</sup> eine Prädisposition für die Entstehung von CED darstellen. Mehrere Studien wie die von *Glas et al.* (2008) und *Hampe et al.* (2007) untersuchten Gen-Varianten von ATG16L1 wie u. a. rs2241879<sup>113</sup> und rs2241880<sup>113, 130</sup> und konnten diese als Prädisposition-Gene für Morbus Crohn identifizieren<sup>113</sup>, während für CU nur eine schwache Assoziation mit der Variante rs6431660 nachgewiesen werden konnte<sup>113</sup>.

ATG16L1 kodiert ein Protein des Autophagie-Prozesses, das intrazelluläre Bakterien abbaut. IRGM, als weiteres Autophagie-Gen, das auf Chromosom 5q33.1 liegt, wurde von *Glas et al.* (2013) ebenfalls als Suszeptibilitäts-Gen für MC in der deutschen Bevölkerung beschrieben, während für CU wiederum nur eine schwache Assoziation zu IRGM vorlag<sup>114</sup>. Während *Duerr et al.* (2006) die starke Assoziation von IL23R, das eine Untereinheit des Rezeptors für IL-23 kodiert und auf Chromosom 1p31 liegt, in der nordamerikanischen Bevölkerung nachwies<sup>86</sup>, konnten *Glas et al.* (2007) rs1004819 als bedeutendste Variante des IL-23R-Gens mit MC in der deutschen Bevölkerung identifizieren<sup>112</sup>. *Brand et al.* (2006) postulierten, dass der TLR4 Asp299Gly Polymorphismus für die Entstehung von MC prädisponiert. Dabei scheinen Mutationen von TLR4 und NOD2 individuelle Phenotypen hervorzurufen, abhängig vom Vorliegen oder der Abwesenheit einzelner Mutationen<sup>34</sup>. Das XBP1-Gen konnte in Studien mit CU und MC assoziiert werden<sup>165</sup>. Als Transkriptionsfaktor scheint es eine Schlüsselrolle bei der Stressantwort im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu spielen. So konnten *Kaser et al.* (2008) mit Hilfe einer XPB1-*Knock-out*-Maus speziell im intestinalen Epithel zeigen, dass dadurch ER-Stress entsteht und sich die Schleimhaut mit typischen histologischen Eigenschaften von CED präsentierte, wie z. B. Kryptenabszessen und Ulzerationen<sup>165</sup>. Als weitere Genloci die mit CED assoziiert werden, sind u. a. STAT-1, STAT-3 IL-10, MUC19, SOCS1, IL-27, LIF und OSM zu nennen<sup>163</sup>.

Diese Studien zeigen unter zahlreichen anderen die Beteiligung genetischer Faktoren am Auftreten der CED. Als harte Kriterien gelten dabei NOD2, IL23R und 1007fs.

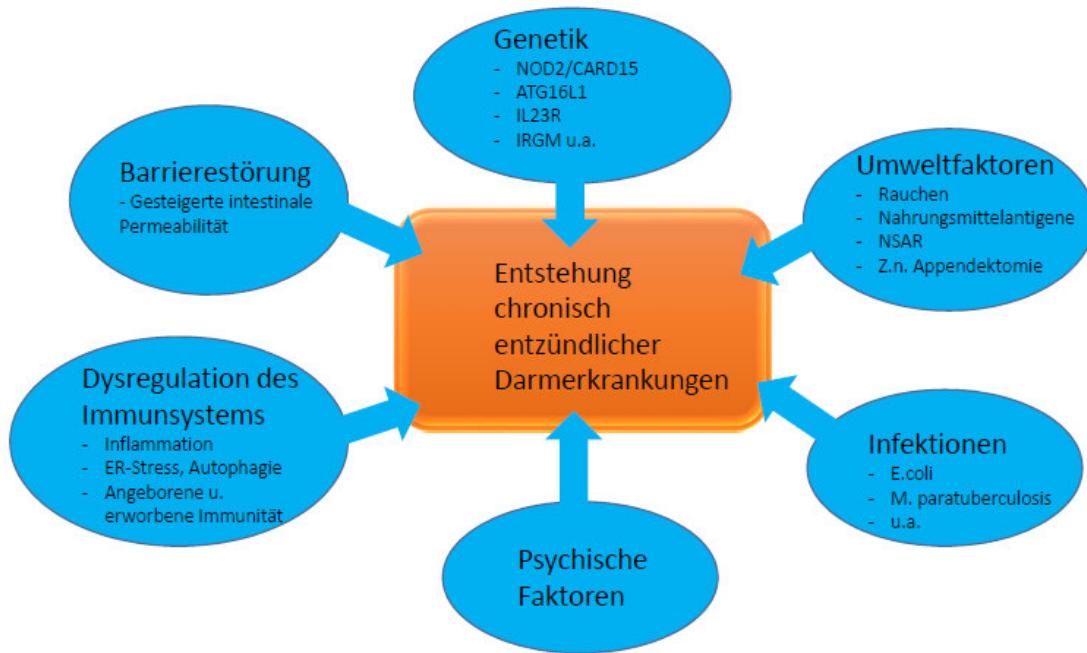
Neben diesen spielt auch das Gleichgewicht der bakteriellen Darmflora eine Rolle bei der Entstehung entzündlicher Darmerkrankungen. So konnte in Tierversuchen mit IL-10-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass sich eine Kolitis nicht provozieren lässt, wenn die Tiere in einer keimfreien Umgebung aufwachsen<sup>180, 336</sup>. Als weiterer Hinweis für den Einfluss von Bakterien auf CED stellt sich dar, dass sich die Erkrankung bevorzugt an Stellen des Darms manifestiert, an denen durch Stase eine längere Kontaktzeit mit den Stoffen im Darmlumen besteht und an denen die höchsten Bakterienkonzentrationen nachgewiesen werden können, nämlich v. a. im terminalen Ileum, Coecum und Rektum<sup>202</sup>. Es wurden bereits zahlreiche Versuche unternommen, um Mikroorganismen zu identifizieren, die in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese stehen. Ein spezifisches infektiöses Agens konnte jedoch bisher nicht gefunden werden<sup>95</sup>. Allerdings wurden Unterschiede bei der Untersuchung der Darmflora gesunder Kontrollen im Vergleich mit CED-Patienten festgestellt. So ließen Studien in den 1980er Jahren

vermuten, dass Mycobakterien-Spezies, insbesondere *Mycobacterium paratuberculosis*, bei einem Teil der Patienten mitbeteiligt an der Pathogenese von CED sein könnte<sup>53, 226</sup>. Andere Studien widerlegten diese Ergebnisse<sup>335, 360</sup>, sodass die Studienlage darüber, inwieweit Mykobakterien kausal bei der Entstehung der CED mitwirken oder lediglich einen Hinweis auf die veränderte Darmflora des vorgeschädigten Gastrointestinaltraktes darstellen, unklar ist. *Linskens et al.* (2001) beispielsweise wiesen bei MC erhöhte Konzentrationen an *Bacteroides*, *Eubacteria* und *Peptostreptococcus* im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach, während bei CU ein erhöhtes Vorkommen fakultativ anaerober Bakterien auffiel<sup>202</sup>. Weitere Studien ließen vermuten, dass enteropathogene *E.coli* (EPEC) an der Entstehung und Aufrechterhaltung von CED mit eine Rolle spielen. So konnten *Higgins et al.* (1999) nachweisen, dass bei jungen Mäusen, die oral mit *Citrobacter rodentium*, einem nichtinvasivem Pathogen, ähnlich EPEC beim Menschen, infiziert wurden, eine Kolonisation des distalen Colons stattfand und es im Verlauf zur Verdickung der Schleimhaut, vermehrter Epithelzellhyperplasie, T-Zell-Infiltration der Mukosa, Kryptenhyperplasie, vermehrter Leukozyteninfiltration und Nachweis Th1-vermittelter Zytokine wie IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$  kam, wie es in Mausmodellen mit CED zu beobachten ist<sup>146</sup>. *Yagita et al.* (1999) erzeugten ein Colitis-Maus-Modell mittels *E.coli*, die mit dem *Yersinia enterocolica* Hsp60-Gen transformiert wurden, einem Hitzeschockprotein, das bei Patienten mit CED sowohl im Serum als auch in Biopsien des Intestinums nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich ein Anschwellen der Becherzellen, Erosionen, Ulzerationen, Kryptenhyperplasie und eine Invasion inflammatorischer Zellen vergleichbar mit Biopsien bei Patienten mit CU<sup>403</sup>. Eine Studie von *Nuding et al.* (2007) an Kolonbiopsien von CED-Patienten und einer Kontrollgruppe untersuchte mittels Durchflusszytometrie die quantitative Rate an bakteriellem Untergang und testete die antibakterielle Aktivität des Darms mithilfe von Peptiden, wie Defensinen und Cathelicidinen, die in intestinalen Epithelzellen synthetisiert werden, um die Mukosabarriere gegenüber Bakterien aufrechtzuerhalten. Sie zeigte, dass bei MC eine verminderte Aktivität der Darmmukosa gegen Mikroorganismen besteht, die sich gut mit einer niedrigen antibakteriellen Peptidexpression vereinbaren lässt<sup>265</sup>. Die therapeutische Anwendung von Antibiotika oder Probiotika und die ausschließliche parenterale Ernährung in besonders fulminanten Verlaufsstadien der Erkrankung weisen ebenfalls auf die Möglichkeit einer Beteiligung von bakteriellen Faktoren bei der Pathogenese hin und so könnte eine wichtige Erkenntnis für die Therapie von CED darin bestehen, ein intaktes Gleichgewicht der Darmflora wiederherzustellen<sup>62, 317</sup>.

Als weiterer Umweltfaktor scheint das Rauchverhalten der Patienten Einfluss auf CED zu nehmen. So wiesen *Rubin et al.* (2000) nach, dass Zigarettenrauchen mit MC assoziiert ist, während bei einigen Patienten, die an CU leiden, die Schwere der Erkrankung durch Rauchen positiv beeinflusst wird<sup>306</sup>. Eine Studie von *Kikuchi et al.* (2008) deklarierten, dass eine chronische Nikotinstimulation über den Nikotin-Acetylcholinrezeptor im Intestinum zur Produktion von Th<sub>1</sub>-Helper-Zytokinen führt, die wiederum an der Entstehung und Aufrechterhaltung von MC beteiligt sind<sup>170</sup>, nicht jedoch bei CU, die durch die Beteiligung von Th<sub>2</sub>-Helperzellen charakterisiert ist. Daneben gilt als zusätzlicher protektiver Faktor der CU nach einer Studie von *Andersson et al.* (2001) die Appendektomie, die im Rahmen einer akuten Entzündung des Appendix oder einer Lymphadenopathie durchgeführt wurde und mit einem niedrigen Risiko für die Entwicklung einer späteren CU assoziiert war<sup>8</sup>.

Auch Nahrungsmittelantigene spielen eine Rolle bei Entstehung und Aufrechterhaltung der CED. So konnten *Knoflach et al.* (1987) und *Lerner et al.* (1989) nachweisen, dass bei Patienten mit CED und hier v. a. MC erhöhte Serumantikörper gegen Kuhmilchproteine vorlagen<sup>175, 192</sup>. Und auch für andere Nahrungsmittel wie Zucker oder verschiedene Fette wurde in zahlreichen Studien der Einfluss auf CED untersucht mit jedoch sehr unterschiedlichen Ergebnissen, was an der Art des Studienaufbaus als retrospektive Fall-Kontroll-Studien liegen könnte<sup>48, 131, 276, 290</sup>.

Daneben nimmt bei Patienten mit CED auch die Einnahme von Medikamenten Einfluss auf die Krankheitsaktivität. So wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die darauf hinweisen, dass Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) zu häufigeren und früheren klinischen Rezidiven bei Patienten mit CED führen können, während in mehreren Studien selektive COX-2-Hemmer bei kurzer Einnahmedauer gut toleriert wurden<sup>100, 169, 218</sup>. Eine Zusammenfassung über die multifaktorielle Ätiopathogenese der CED zeigt Abbildung 6 (sh. Seite 34).



**Abb. 6: Ätiopathogenese der CED.**

Die Entstehung der CED ist multifaktoriell bedingt. Es spielen sowohl genetische, als auch Umweltfaktoren, Infektionen, psychische Faktoren, die Dysregulation des Immunsystems und eine Barrierestörung im Darm eine entscheidende Rolle.

#### 1.4.2. Die Bedeutung von Zytokinen bei intestinaler Entzündung

Verschiedenste Zytokine wie Interleukine, Chemokine und Wachstumsfaktoren besitzen eine wichtige Funktion bei entzündlichen Prozessen und bei verschiedenen chronischen inflammatorischen Erkrankungen wie z. B. bei Asthma bronchiale, Psoriasis vulgaris, Rheumatoider Arthritis und CED. An der Entstehung und Aufrechterhaltung von entzündlichen Erkrankungen im Darm sind u.a. IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-22, IL-26, IL-31 und TNF $\alpha$  beteiligt <sup>32, 71, 124, 191, 286, 350</sup>. Die Interaktion zwischen Antigenpräsentierenden Zellen und der mikrobiellen Darmflora kann zu einer Aktivierung von CD4+-T-Lymphozyten mit Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führen <sup>245</sup>. Viele weitere Zytokine werden im Augenblick hinsichtlich der genauen Ätiopathogenese der CED erforscht.

IL-1 ähnelt in vielen Eigenschaften dem TNF $\alpha$  und wird vor allem von Makrophagen, B-Zellen und NK-Zellen produziert. Dieses zentrale Zytokin steht häufig am Beginn von Signalkaskaden und führt zur Ausschüttung sekundärer Zytokine wie IL-6 und IL-8. Es

aktiviert unter anderem die Phagozytose, vermittelt eine Leukozyten-Adhäsion ans Endothel, induziert die Synthese von APP und Prostaglandinen sowie die Entstehung von Fieber<sup>62, 220</sup>. Die Bedeutung von IL-1 in der Pathogenese der CED konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. So fand man in Kolonbiopsien von Patienten mit aktiver MC- oder CU-Erkrankung höhere Konzentrationen an mRNA der proinflammatorischen Zytokine, wie auch für IL-1 $\beta$ , im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Diese Zunahme korrelierte eng mit der Gewebebeteiligung und der mukosalen Entzündung<sup>11, 191, 236, 237, 291, 399</sup>. Auch im peripheren Blut zeigte sich ein signifikanter Anstieg von IL-1 $\beta$ , das bei Patienten mit aktiver CED im Vergleich zu nichtentzündlichen Kontrollen peripher von Monozyten produziert wird<sup>261</sup>.

Als weiteres wichtiges Zytokin bei der Genese der CED ist IL-6 zu nennen, das auch BSF-2, also B-Zellen stimulierender Faktor-2, bzw. Hepatozyten- stimulierender Faktor genannt wird. Dieser Botenstoff wird größtenteils von Makrophagen, Endothelzellen und Th<sub>2</sub>-Zellen produziert und fördert in den Zielzellen das Lymphozytenwachstum, die B-Zell-Differenzierung und in Hepatozyten die Synthese von APP. Außerdem wurde sein Einfluss auf neoplastische Zellen beschrieben<sup>62, 220, 327</sup>. Eine Beteiligung von IL-6 bei intestinaler Entzündung untersuchte u. a. *Wang et al.* (2010) in einer Studie mithilfe von *Real-time-PCR* und Immunhistochemie. Es wurden die IL-6-mRNA-Expression und die IL-6-Proteinlevel in Gehirn und Kolongewebe von Ratten, bei denen mittels TNBS (*trinitrobenzene sulfonic acid*) eine Colitis induziert wurde, bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich eine signifikant erhöhte IL-6-mRNA-Konzentration und erhöhte Proteinlevel, sowohl im Gehirn, als auch im Kolon<sup>388</sup>. Weitere Studien konnten ebenfalls erhöhte IL-6-Konzentrationen in Serumproben oder Kolonbiopsien von Patienten mit CED nachweisen<sup>115, 191, 286, 399</sup>. Dass unterschiedliche Faktoren, wie die mikrobielle Flora und Zytokine, in der Pathogenese zusammenspielen, zeigt die Studie von *Dann et al.* (2008) in einem Mausmodell, in dem eine enterale bakterielle Infektion zu einer erhöhten IL-6-Konzentration in IEC und Makrophagen führte, um die Abwehr zu gewährleisten. IL-6 wirkte hier protektiv auf die Mukosa und schützte vor ulzerösen Läsionen, die von Bakterien als Nischen genutzt werden können<sup>72</sup>. IL-6 spielt neben den CED bei weiteren chronischen Erkrankungen wie Psoriasis, Rheumatoide Arthritis oder Systemischem Lupus erythematoses eine entscheidende Rolle. Hier können auch therapeutische Optionen für entzündliche Erkrankungen, die durch eine Überexpression von IL-6 hervorgerufen werden, angreifen. *Paul-Pletzer et al.* untersuchten 2006 einen monoklonalen Anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper, genannt *Tocilizumab*, der zur Blockade

von IL-6-induzierten Signalwegen in entzündlichen Erkrankungen führte<sup>273</sup>. Zudem ist IL-6 an der Entstehung von Malignomen wie kolorektalen Karzinomen, Leukämien, Lymphomen, Multiplem Myelom, Ovarialkarzinomen oder Plasmozytomen beteiligt<sup>47, 60, 93, 107, 123, 127, 207, 308, 369, 396</sup>.

IL-8, das auch als Chemokin CXCL8 bezeichnet wird, wirkt vor allem auf Makrophagen und Neutrophile Granulozyten und steuert die Chemotaxis<sup>62</sup>. Studien in Bezug auf die Bedeutung von IL-8 bei der Pathogenese der CED in den 1990er Jahren konnten eine erhöhte Konzentration des Zytokins in Kolonbiopsien der Patienten nachweisen, bei denen sich die Erkrankung gerade im aktiven Stadium befand, im Vergleich mit inaktiven Stadien oder gesunden Kontrollen<sup>122, 160, 236</sup>. Außerdem korrelierten die erhöhten IL-8-Level, speziell bei CU, mit dem makroskopischen Befund und mit einer erhöhten Aktivierung und Akkumulation von Neutrophilen in der betroffenen Mukosa<sup>160, 236</sup>.

IL-10 ist ein wichtiges antiinflammatorisches Zytokin, das von Th<sub>2</sub>-Zellen produziert wird und die Produktion von Zytokinen aus Th<sub>1</sub>-Zellen hemmt. Außerdem wirkt es auf die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen<sup>62</sup>. Eine Studie von *Kühn et al.* (1993) zeigte, dass IL-10-defiziente Mäuse eine spontane chronische Enterokolitis mit Mukosahyperplasie und abweichenden epithelialen MHC-II-Komplex-Molekülen ähnlich dem MC entwickelten<sup>180</sup>. Dies lässt auf eine zentrale Rolle des Zytokins bei CED schließen. *Barbara et al.* (2000) untersuchten im Hinblick auf diese Erkenntnis das therapeutische Potenzial einer Überexpression des IL-10-Gens auf CED. Durch das Einbringen des IL-10-Gens mittels eines humanen Adenovirus in IL-10-defiziente Mäuse konnte, wenn dies vor Induktion der Colitis geschah, eine histologische und makroskopische Verbesserung der Krankheitsaktivität beobachtet werden. Der Gentransfer nach bereits bestehender Kolitis erbrachte keinen Vorteil<sup>15</sup>. Doppelblinde Studien in der klinischen Anwendung von rekombinantem humanem IL-10 an Crohn-Patienten von *Schreiber et al.* (2000) oder *Fedorak et al.* (2000) konnten keinen Einfluss einer subkutanen Zytokingabe im Vergleich mit Placebogabe auf die Remission der Erkrankung erzielen<sup>329, 99</sup>. Die intravenöse Gabe von IL-10 in einer doppelblinden placebokontrollierten Studie von *van Deventer et al.* (1997) hingegen lässt einen positiven klinischen Effekt bei Patienten mit MC vermuten<sup>374</sup>.

IL-22 ist ein Zytokin, das von aktivierten T-Zellen exprimiert wird und dessen Signaltransduktion über einen Rezeptorkomplex aus IL-22R1 und IL-10R2 erfolgt. *Brand et al.* (2006) wiesen bei Patienten mit MC in entzündlichen Kolonläsionen eine gesteigerte IL-22 mRNA-Expression nach, die mit der von IL-8 in diesen Läsionen korrelierte. IL-22-

vermittelt konnte eine gesteigerte proinflammatorische Genexpression hervorgerufen werden und eine gesteigerte Migration in IEC beobachtet werden<sup>32</sup>. Des Weiteren konnte in einer Studie von *Schmeichel et al.* (2008) gezeigt werden, dass IL-22 nicht nur als Serum-Marker für die Aktivität einer Erkrankung mit MC gesehen werden kann, sondern auch mit IL-23R Genvarianten assoziiert ist, die eine erhöhte Prädisposition für MC darstellen<sup>324</sup>.

IL-26 ist ein neues IL-10 ähnliches Zytokin, das in Th<sub>1</sub>- und Th<sub>17</sub>-Zellen exprimiert wird. In einer Studie von *Dambacher et al.* (2009) konnte bei Patienten mit aktiver MC-Erkrankung eine vermehrte Expression von IL-26 mRNA nachgewiesen werden, die wiederum mit IL-8 und IL-22 korrelierte. Zudem konnte durch IL-26 eine Regulation der Migration und proinflammatorischer Genexpression in IEC gezeigt werden<sup>71</sup>.

IL-31, das in Lymphozyten exprimiert wird, generiert seine Signaltransduktion über einen Rezeptorkomplex aus IL-31R $\alpha$  und OSMR. In einer Studie von *Dambacher et al.* (2007) wurde eine signifikant erhöhte Expression von IL-31 in Biopsien von Patienten mit MC in entzündlichem Gewebe im Vergleich zu nicht-entzündlichem Gewebe dieser Patienten nachgewiesen und genauso eine erhöhte IL-31-Expression in entzündlich veränderten Biopsaten bei Patienten mit CU. Zudem konnte eine Aktivierung von ERK-1/2, Akt, STAT1 und STAT3 IL-31-vermittelt dargestellt werden, die zu einer gesteigerten Migration von IEC führte<sup>70</sup>.

TNF $\alpha$  wird von immunkompetenten Zellen wie Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen produziert und spielt neben der akuten Entzündungsreaktion auch eine tragende Rolle bei der Ätiologie einiger Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoide Arthritis, Psoriasis vulgaris und dem Systemischen Lupus erythematosus<sup>9, 42, 178, 224, 321</sup>.

Zu den Zielzellen gehören unter anderem Endothelzellen, hämatopoetische Zellen, Tumorzellen, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten. Es fördert die Adhäsion und Migration von Leukozyten dadurch, dass es die Dichte an Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen erhöht. Außerdem induziert TNF $\alpha$  die Phagozytose durch Makrophagen, supprimiert das Wachstum von Tumorzellen durch Induktion der Apoptose und fördert z. B. die Proliferation von B-Zellen. Es steht als Zytokin häufig am Beginn von Signalkaskaden und führt zur Synthese von weiteren an Inflammationsreaktionen beteiligten Zytokinen wie IL-6, IL-8 oder G(M)-CSF<sup>62</sup>.

Die Bedeutung von TNF $\alpha$  bei CED wurde erstmals zu Beginn der 1990er Jahre beschrieben. So zeigten Studien, in denen Serum-Konzentrationen von TNF $\alpha$  mittels ELISA bei Patienten mit aktiver CED im Vergleich zu gesunden Kontrollen gemessen

wurden, signifikant erhöhte Zytokin-Level in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität 213, 247, 261, 291. *Braegger et al.* untersuchte 1992 in einer weiteren Studie die Konzentration von TNF $\alpha$  im Stuhl von Patienten mit CED und konnte zeigen, dass diese im aktiven Krankheitsstadium im Gegensatz zu Proben von gesunden Kontrollen signifikant erhöht war 30. Weitere Untersuchungen in Kolonbiopsien von CED-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen zeigten erhöhte mRNA-Konzentration von TNF $\alpha$  11, 35, 212, 399. Eine Studie von *Ahirwar et al.* (2011) analysierte den Zusammenhang zwischen pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokin-Gen-Polymorphismen und CED in Nordindien. Es konnte gezeigt werden, dass der Genotyp TNF-A(-863AA) mit einem erhöhten Risiko für chronisch entzündliche Darmerkrankungen assoziiert ist, was eine genetische Mitbeteiligung vermuten lässt 2. Wie bedeutend die Rolle von TNF $\alpha$  in chronisch entzündlichen Erkrankungen ist, zeigt auch die Tatsache, dass TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien wie z. B. *Adalimumab*, *Etanercept* und *Infliximab* erfolgreich bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie CED, Psoriasis vulgaris und Rheumatoide Arthritis eingesetzt werden 116, 166, 217. Im November 2010 erschien eine Studie von *Wilson et al.*, die siRNAs, die gegen proinflammatorische Zytokine gerichtet sind, in einem Mausmodell mit Colitis ulcerosa mittels Nanopartikeln, welche oral verabreicht wurden, an den Ort der intestinalen Entzündung transportieren sollten, um dort die Gen-Expression zu unterdrücken. Die Nanopartikel mit gegen TNF $\alpha$  beladene siRNAs reduzierten die mRNA-Konzentrationen im Kolon und schützten die Mäuse vor CU 394. In diesem Zusammenhang laufen verschiedene Studien, um die Funktion proinflammatorischer Zytokine bei CED zu untersuchen, die mögliche neue Therapiestrategien eröffnen.

#### **1.4.3. Therapien chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Um die optimale Therapie für den einzelnen Patienten zu erreichen, ist die individuelle Verlaufsform der Erkrankung, die Lokalisation und die Schwere der Krankheitsaktivität zu beachten. Einen wichtigen Schritt bei der Therapie der CED sollte u. a. auch eine Ernährungsberatung darstellen. Hierbei sollte bei bestehender Malabsorption u. a. eine Substitution fehlender Vitamine und Elektrolyte angestrebt werden und ein Ausschluss von Nahrungsmittelunverträglichkeiten erfolgen 141. Zudem sollte bei nachgewiesener Eisenmangelanämie eine Substitution von Eisen erfolgen 125, 181.

Medikamentös werden topisch (z. B. als Klysmen oder Schaumpräparate) wie auch systemisch Kortikosteroide angewandt, da diese antientzündlich und antiproliferativ wirken. Allerdings besitzen sie eine Reihe von Nebenwirkungen, wie z. B. Osteoporose, Katarakt, metabolisches Syndrom und erhöhte Risiken für das Auftreten von Infektionen oder kardiovaskulären Erkrankungen, die vor allem bei Langzeiteinnahme drohen<sup>101</sup>.

Als antiinflammatorisches Agens hat sich bei CU Mesalazin (5-ASA) bewährt.

Des Weiteren werden zur Induktion einer Remission und deren Erhaltung Immunsuppressiva wie z. B. Azathioprin, sein Metabolit 6-Mercaptopurin, Ciclosporin A oder Methotrexat verabreicht<sup>141</sup>.

Als neuer Ansatzpunkt in der Therapie der CED sind biologische Therapien zu sehen. Zu diesen zählen u. a. T-Zell-Inhibitoren (z. B. CD40-Liganden, Anti-CD4-AK), Inhibitoren proinflammatorischer Zytokine (z. B. TNF $\alpha$ -Blocker), antiinflammatorische Zytokine (z. B. IL-10, IL-11), Inhibitoren proinflammatorischer Zytokin-Rezeptoren (z. B. Anti-IL-6-R), Inhibitoren der Th<sub>1</sub>-Polarisierung und -Proliferation (z. B. Anti-IL12, Anti-IFN $\gamma$ ), Inhibitoren von Adhäsionsmolekülen (z. B. *Natalizumab*, *Vedolizumab*) und Wachstumshormone und -faktoren (z. B. TGF, EGF)<sup>27</sup>. Besonders Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien werden als Therapieregime bei schweren und therapieresistenten Fällen als vielversprechend angesehen. TNF $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, das eine bedeutende Rolle bei verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie z. B. Rheumatoide Arthritis, Psoriasis oder CED spielt. Mit diesem Wissen konnten neutralisierende Antikörper für TNF $\alpha$  entwickelt werden, die bereits in Therapien des rheumatischen Formenkreises eingesetzt werden, weiterhin in der Dermatologie und bei CED und deren extraintestinalen Manifestationen. *Infliximab* (*Remicade* $^{\text{®}}$ ) ist ein chimärer monoklonaler IgG1-Antikörper gegen TNF $\alpha$ , der intravenös alle acht Wochen appliziert wird und für die Indikationen MC und CU bei Kindern und Erwachsenen seit vielen Jahren zugelassen ist. Es konnten in Studien sowohl positive Effekte auf die klinische Remission, wie auch bei der mukosalen Heilung gezeigt werden<sup>217, 307</sup>. *Adalimumab* (*Humira* $^{\text{®}}$ ) ist ein humaner IgG1-Antikörper gegen TNF $\alpha$ , der vom Patienten selbst subkutan appliziert werden kann. Dieser ist für die Anwendung bei MC und CU bei Erwachsenen und seit Mai 2016 auch für die Behandlung von Kindern ab 6 Jahren zugelassen und wurde hier bereits erfolgreich eingesetzt<sup>166, 292, 333</sup>. In den USA und der Schweiz ist außerdem ein weiterer humanisierter Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, *Certolizumab* (*Cimzia* $^{\text{®}}$ ), zugelassen. Dieser wurde bereits erfolgreich für die Indikation MC eingesetzt<sup>331</sup>. Ein weiterer monoklonaler Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, der für die

Indikation mittelschwere/schwere CU zugelassen ist, ist *Golimumab (Simponi®)*<sup>81</sup>. *Sandborn et al.* (2014) zeigten in der PURSUIT-SC Studie bei Patienten, die naiv gegenüber Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien waren, und an einer moderaten bis schweren aktiven CU erkrankt waren, dass innerhalb von 6 Wochen mit *Golimumab* Remissionen erreicht und eine mukosale Wundheilung erzielt werden konnte<sup>313</sup>. *Ustekinumab (Stelara®)*, ein humaner monoklonaler Antikörper gegen Interleukin-12 und -23, wurde erfolgreich bei Patienten mit moderatem bis schwerem MC, die sich resistent gegenüber TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien zeigten, eingesetzt<sup>311</sup> und wurde im September 2016 für eine Marktzulassung von der EMA für diese Indikation empfohlen. *Tocilizumab (Ro Actemra®)* ist ein neuer humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor, der bereits bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis<sup>255</sup> in Studien erfolgreich eingesetzt wurde.

Daneben werden zu den biologischen Therapien auch selektive Antagonisten für Adhäsionsmoleküle gezählt. *Natalizumab (Tysabri®)*, ein chimerischer rekombinanter humanisierter IgG4-Antikörper, inhibiert die  $\alpha$ 4-Untereinheit der Leukozytenadhäsionsmoleküle  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin und  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrin, die bei der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen eine Rolle spielen<sup>272</sup>. Als schwere Nebenwirkung ist hier die progressive multifokale Enzephalopathie zu nennen, weshalb die Zulassung zurückgezogen wurde. Daneben ist *Vedolizumab (Entyvio®)* als weiterer Antagonist für Adhäsionsmoleküle zu nennen. *Vedolizumab* ist ein  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin-bindender IgG1 humanisierter monoklonaler Antikörper, der die Leukozytenadhäsion durch Blockieren der Interaktion mit MAdCAM-1 und  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin unterdrückt. Während *Natalizumab* die Leukozytenadhäsion in verschiedenen Organen unterdrückt, wirkt *Vedolizumab* speziell im Gastrointestinaltrakt und zeigt hier positive Effekte bei Patienten mit MC und CU<sup>97, 128, 272</sup>. Die Zulassung für *Vedolizumab* erfolgte im Mai 2014<sup>92</sup>.

Daneben werden JAK-Inhibitoren eingesetzt, wie *Tofacitinib (Xeljanz®)*, der JAK1, JAK2 und JAK3 inhibiert und so die Signaltransduktion und Funktion proinflammatorischer Zytokine unterdrückt. Dieser kann oral eingenommen werden und ist bereits bei Rheumatoider Arthritis, Psoriasis und der Prävention von Allograft-Abstoßungen in Nutzung und für diese Indikationen in den USA zugelassen<sup>272</sup>. Studien bei Patienten mit CED lassen bisher eine Wirkung auf das Eintreten der Remission bei CU, weniger bei MC, im Vergleich zu Placebo vermuten. Jedoch werden weitere Studien das Potenzial der JAK-Inhibitoren untersuchen müssen<sup>312, 314</sup>.

Zudem wird aktiv an der Entwicklung neuer Antikörper-Strategien gearbeitet.

Aufgrund der möglichen Nebenwirkungen von Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien wie Infusionsreaktionen und schweren opportunistischen Infektionen oder der Reaktivierung einer latenten Tuberkulose<sup>338</sup> durch die Immunsuppression ist eine genaue Indikationsstellung notwendig und ein Ausschluss einer bestehenden Tbc-Infektion mittels Anamnese, Mendel-Mantoux-Test und Erstellung eines Röntgen-Thorax obligat<sup>166, 217, 338</sup>.

In verschiedenen Studien wurde zudem untersucht, ob die Anwendung von TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien mit einem erhöhten Risiko iatrogener Lymphome und anderer Tumoren einhergeht. Die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) untersuchte das Auftreten von pädiatrischen Malignomen unter Therapie mit *Adalimumab*, *Etanercept* und *Infliximab*. Es konnten bei Kindern und Adoleszenten in 48 Fällen Malignome unter Therapie nachgewiesen werden, davon über die Hälfte Lymphome, zudem Leukämien, Melanome und solide Tumoren. Davon standen 31 Patienten des gesamten Kollektives unter Therapie mit *Infliximab*, 15 unter Therapie mit *Etanercept* und zwei der Patienten wurden mit *Adalimumab* therapiert. Die Hälfte der Patienten erhielt die Therapie aufgrund einer CED, ein Drittel bei Juveniler idiopathischer Arthritis. Für Patienten unter Therapie mit *Infliximab* und *Etanercept* lag das Risiko für Malignomerkrankungen höher als das generelle Auftreten von Malignomen in diesen Altersgruppen<sup>96</sup>. Für *Adalimumab* konnte dieses Risiko aufgrund der nur sehr geringen Anzahl der therapierten Patienten nicht kalkuliert werden. Jedoch wurden 88% dieser Patienten zusätzlich mit Azathioprin oder Methotrexat therapiert, sodass eine genaue Abschätzung des alleinigen Einflusses von Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien nicht getroffen werden kann<sup>96</sup>. Eine Studie von *Kandiel et al.* (2005) für Patienten mit CED, die mit Azathioprin und 6-Mercaptopurin therapiert wurden, zeigte ein vierfach erhöhtes Risiko für eine Lymphomerkrankung<sup>164</sup>. *Wong et al.* (2012) wies in einer Meta-Analyse randomisierter kontrollierter Studien bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis unter Therapie mit *Adalimumab*, *Etanercept* oder *Infliximab* im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapie eine erhöhte Anzahl an Lymphomen, v. a. B-Zell-Lymphomen, nach, was eine iatrogene Ursache für das gesteigerte Risiko an Lymphomen zu erkranken vermuten ließ. Es konnte jedoch bei dem geringen Auftreten der Lymphome keine statistische Signifikanz errechnet werden<sup>397</sup>. *Beigel et al.* (2014) untersuchten das Auftreten von Malignomen in einer großen deutschen Kohorte mit CED, die entweder mit Thiopurinen und/oder mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien behandelt wurden. Es zeigte sich ein erhöhtes Risiko für Malignome nach Therapie mit Thiopurinen, nicht jedoch nach Einsatz von Anti-TNF $\alpha$ -

Antikörpern mit oder ohne Thiopurin-Therapie<sup>19</sup>. Weitere Studien werden notwendig sein, um abschließend zu klären, ob Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien als Monotherapie oder aufgrund der Kombination mit Thiopurinen ein mögliches Risiko für die Entstehung von Lymphomen darstellen. Des Weiteren scheint eine Primärinfektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV) bei bisher EBV-naiven Patienten eine Rolle bei der Entstehung von Lymphomen und der Hämophagozytischen Lymphohistiozytose (HLK) zu spielen. Verschiedene Fallberichte beschrieben das Auftreten der HLH unter 6-Mercaptopurin und Azathioprin bei jungen Patienten mit primärer EBV-Infektion<sup>258, 380</sup>. Ein Fallbericht schildert ein primäres ZNS-Lymphom unter Therapie mit Azathioprin, bei dem im Liquor EBV-DNA mittels PCR nachgewiesen werden konnte<sup>115</sup>. Daneben werden Nebenwirkungen wie Leberschäden, einhergehend mit erhöhten Transaminasen, Cholestase oder Hepatitis unter Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien oder *Natalizumab* beschrieben<sup>23, 304</sup>. Zudem wurden bei Patienten mit CED psoriasisiforme Hautläsionen unter Therapie mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien beobachtet<sup>126</sup>. Eine Studie von *Tillak et al.* (2014) wies nach, dass psoriasisiforme Hautläsionen bei Patienten mit CED durch Infiltration mit Th<sub>1</sub>-Zellen, die IFN $\gamma$  sezernieren, und Th<sub>17</sub>-Zellen, die IL-17A/IL-22 sezernieren, charakterisiert sind und konnten bei Patienten mit diesen Hautläsionen erfolgreich den Anti-IL-12/IL-23-Antikörper *Ustekinumab* anwenden<sup>368</sup>.

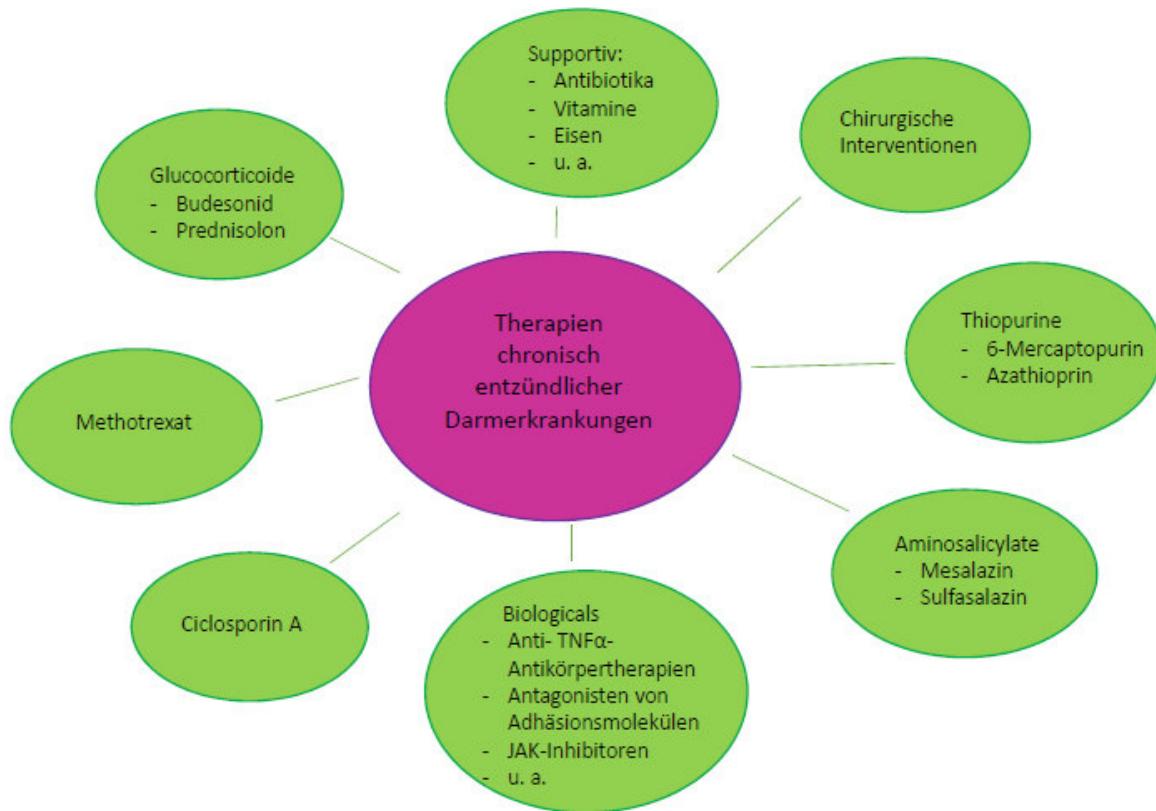
Bei Nonrespondern unter Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapie kann entweder durch Eskalation der bestehenden Therapie mit Steigerung der verabreichten Medikamentendosis oder Verkürzung des Verabreichungsintervall versucht werden eine suffiziente Wirkung zu erzielen; ggf. muss die Erweiterung der Therapie um Azathioprin oder ein *Switching* auf andere Präparate der Klasse der Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien oder andere Antikörpertherapien erfolgen<sup>293</sup>.

Daneben können auch chirurgische Interventionen, z. B. bei Auftreten von Komplikationen wie Perforationen, Fisteln, Blutungen oder einem Ileus, notwendig werden<sup>141</sup>.

Antibiotikatherapien spielen eine essentielle Rolle bei der Behandlung septischer Komplikationen wie z. B. perianaler Abszesse, Fisteln, Superinfektionen und postoperativer Wundinfektionen. Eine primäre oder adjuvante Anwendung bei aktivem MC oder CU wird kontrovers diskutiert<sup>316</sup>.

Individuell sollte außerdem beurteilt werden, ob eine psychologische Mitbetreuung der Patienten sinnvoll sein kann<sup>62, 141</sup>.

Eine Übersicht über die Therapien bei CED zeigt Abbildung 7 (sh. Seite 43).



**Abb. 7: Therapien der CED.**

Zu den Therapien chronisch entzündlicher Darmerkrankungen werden u. a. Glucocorticoide, Thiopurine, Aminosalizylate, Methotrexat und Ciclosporin gezählt. Supportiv können Vitamine, Spurenelemente, Eisen bei Mangelanämie und ggf. Antibiotika bei Infektionen gegeben werden. Neue Therapiestrategien, die biotechnologisch hergestellt wurden und körpereigenen Proteinen ähneln, werden unter dem Begriff *Biologicals* zusammengefasst. Hierunter gehören u. a. Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien wie *Infliximab* oder *Adalimumab*, Antagonisten von Adhäsionsmolekülen wie *Natalizumab* oder JAK-Inhibitoren wie *Tofacitinib*. Ggf. sind auch chirurgische Interventionen notwendig.

## **1.5. Zielsetzung dieser Arbeit**

Das Hauptziel der vorgelegten Arbeit liegt in der Untersuchung des OSM/OSMR-Zytokin-Ligand-Rezeptor-Systems und dessen Signaltransduktion, insbesondere in intestinalen Epithelzellen. Dies wurde bereits in verschiedenen Geweben und Organsystemen wie Knochen<sup>11, 129, 248</sup>, Leber<sup>200</sup>, Lunge<sup>198</sup>, Muskulatur<sup>12, 158, 264</sup>, Nervensystem<sup>166, 225</sup> sowie Tumoren<sup>2, 119, 254, 271</sup> untersucht. Über die Rolle von OSM im Gastrointestinaltrakt und im Besonderen bei intestinaler Entzündung liegen zum Zeitpunkt der Erarbeitung des Themas nur wenige Erkenntnisse vor. *Sanchez et al.* (2003) konnten in einem Colitis-Mausmodell durch den Transfer von Adenoviren, die mit OSM versetzt waren mit 4% DSS eine intestinale Entzündung induzieren, während das im Modell mit Oxazolone nicht möglich war<sup>310</sup>. Dies spricht sowohl für eine pro- als auch antiinflammatorische Bedeutung des Zytokins im Intestinum.

### Folgende Punkte werden in dieser Arbeit untersucht:

- 1.) Darstellung der Expression des OSM-Rezeptorkomplexes in verschiedenen intestinalen Epithelzelllinien als Grundvoraussetzung für nachfolgende Untersuchungen
- 2.) Analyse der OSM-vermittelten Signaltransduktion in intestinalen Epithelzellen
- 3.) Untersuchung der Wirkung von OSM auf proinflammatorische Zytokine und Matrixmetalloproteininasen
- 4.) Prüfung OSM-vermittelter biologischer Funktionen wie Zellproliferation, -migration, und -apoptose
- 5.) Untersuchung OSM-vermittelter Genregulation in intestinalen Epithelzellen

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien und Lösungen

- $\beta$ -Mercaptoethanol Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Bradford-Reagenz Bio-Rad, München
- BSA (*Bovine Serum Albumine*) Merck, Darmstadt
- EDTA Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- EGTA Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Eisessig Merck, Darmstadt
- Entwicklungspuffer Invitrogen, Carlsbad, USA
- Essigsäure Merck, Darmstadt
- Ethanol Merck, Darmstadt
- Ethidiumbromid Sigma, Taufkirchen
- FITC Sigma, Taufkirchen
- Flüssigstickstoff Linde, München
- Formaldehyd (37%) Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- HEPES Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Isopropanol Merck, Darmstadt
- Magermilchpulver Bio-Rad, München
- Methanol Merck, Darmstadt
- Natriumfluorid Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Natriumorthovanodat Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- NP-40 Roche, Mannheim
- NuPage LDS- Probenpuffer (4x) Invitrogen, Carlsbad, USA
- NuPage MOPS- Laufpuffer (20x) Invitrogen, Carlsbad, USA
- NuPage Reduzierungsagens (10x) Invitrogen, Carlsbad, USA
- PD98059 Tocris Cookson, Bristol, UK
- PMSF Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Salzsäure Merck, Darmstadt
- SDS-Lösung (20%) Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- TRIS Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Triton X-100 Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Trizol Invitrogen, Karlsruhe

- Tween-20 (10%) Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Trypanblau Merck, Darmstadt
- Wortmannin Tocris Cookson, Bristol, UK

## 2.2. Kits und Reaktionssysteme

- Caspase 3/7 Chemiluminescent Assay Promega, Madison, USA
- CellTiterGlo assay Promega, Madison, USA
- DAPI Life Technologies, Darmstadt
- DNA-free TM-Kit Ambion, Huntington, UK
- Human IL-6 ELISA R&D Systems, UK
- Human MMP-3 (total) ELISA R&D Systems, UK
- Human TIMP-1 ELISA R&D Systems, UK
- Human TNF- $\alpha$  ELISA R&D Systems, UK
- Oris Cell Migration Assembly Kit Platypus Technologies
- Quiagen RNeasy Kit Quiagen, Hilden
- RNeasy Mini Kit Quiagen, Austin, USA
- Roche Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit Roche, Mannheim
- Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Pierce, Rockford, USA
- SYBR Green PCR Master Mix Roche, Mannheim
- WST1 (Water-soluble tetrazolium) Assay Roche, Mannheim

## 2.3. Verbrauchsmaterialien

- Deckgläser Nunc, Wiesbaden
- Einfrierröhrchen Nunc (2,5ml) Roskilde, Dänemark
- Einmalglaspipetten BD- Biosciences, San Jose, USA
- Einmalküvetten Sarstedt, Nümbrecht
- Falcon- Röhrchen (5, 10, 25, 50 ml) Becton Dickinson, Heidelberg
- Kanülen (Gr. 18, 20) Braun, Melsungen
- Objektträger Menzel, Braunschweig
- Pipettenspitzen Eppendorf, Hamburg
- Reaktionsgefäße (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0) Sarstedt, Nümbrecht
- Reaktionsgefäße RNase-frei Ambion, Austin, USA
- Spritzen Discardit II (5, 10ml) Becton, Dickinson, Heidelberg
- Zellkulturschalen, Falcon (3,6,10 cm) BD- Biosciences, San Jose, USA
- Zellkultur-Wellplatten (6,24 well) BD- Biosciences, San Jose, USA
- Zellschaber BD- Biosciences, San Jose, USA

## 2.4. Material für zellbiologische Experimente

### 2.4.1. Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Organismus</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Medium</u>	<u>Bezugsquelle</u>
<b>Caco-2</b>	Homo sapiens	Kolorektales Adenokarzinom	DMEM mit Zusatz von 10% FCS + 1% P/S	ATTC, Rockville, MD, USA
<b>DLD1</b>	Homo sapiens	Kolorektales Adenokarzinom	DMEM mit Zusatz von 10% FCS + 1% P/S	ATTC, Rockville, MD, USA
<b>HCT116</b>	Homo sapiens	Kolorektales Adenokarzinom	DMEM mit Zusatz von 10% FCS + 1% P/S	ATTC, Rockville, MD, USA
<b>HT-29</b>	Homo sapiens	Kolorektales Karzinom	DMEM mit Zusatz von 10% FCS + 1% P/S	ATTC, Rockville, MD, USA
<b>SW480</b>	Homo sapiens	Kolorektales Adenokarzinom	DMEM mit Zusatz von 10% FCS + 1% P/S	ATTC, Rockville, MD, USA

<b>T-84</b>	Homo sapiens	Lungenmetastase kolorektales Karzinom	DMEM mit Zusatz von 10% FCS + 1% P/S	ATTC, Rockville, MD, USA
-------------	--------------	---	--	--------------------------------

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Zelllinien (ATCC= American Type Culture Collection).

Alle Zelllinien wachsen adhärent.

#### **2.4.2. Zellkulturmedien und -zusätze**

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 1000 mg/l Glucose, L-Glutamin und Pyruvat) GIBCO, Karlsruhe
- DMSO Merck, Darmstadt
- FCS „Gold“ PAA, Pasching, Österreich
- Dulbecco's PBS + CaCl<sub>2</sub> + MgCl<sub>2</sub> GIBCO, Karlsruhe
- 100-faches P/S (10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin) GIBCO, Karlsruhe
- Trypanblau Merck, Darmstadt
- Trypsin-EDTA GIBCO, Karlsruhe

#### **2.5. Material für molekularbiologische Experimente**

##### **2.5.1. PCR-Material und PCR-Kits**

- 100 bp Ladder Invitrogen, Karlsruhe
- DNA-free TM-Kit Ambion, Huntington, UK
- Ladepuffer Invitrogen, Karlsruhe
- Nuklease-freies Wasser Promega, Madison, U.S.A.
- Quiagen RNeasy Kit Quiagen, Hilden
- Roche Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit Roche, Mannheim
- SYBR Green PCR Master Mix Roche, Mannheim
- Lipofectamine 2000 Ambion/Life Technologies, Darmstadt
- siRNA-Kontrolle Ambion/Life Technologies, Darmstadt
- STAT3-siRNA Ambion/Life Technologies, Darmstadt

### 2.5.2. PCR-Primer

gp130 forward	5'-TCAACTTGGAGCCAGATTCC-3'	MWG, Ebersberg
gp130 reverse	5'-CCCACTTGCTTCTTCACTCC-3'	MWG, Ebersberg
LIFR forward	5'-ATGGGAAGACATTCTGTGG-3'	MWG, Ebersberg
LIFR reverse	5'-CGCAAGACCAAGGTGGTAAC-3'	MWG, Ebersberg
OSMR-beta forward	5'-GGAATGTGCCACACACTTG-3'	MWG, Ebersberg
OSMR-beta reverse	5'-ACATTGGTGCCTTCTTCCAC-3'	MWG, Ebersberg
GAPDH forward	5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3'	MWG, Ebersberg
GAPDH reverse	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'	MWG, Ebersberg
β-aktin forward	5'-CCTCGCCTTGCCGATCCGC-3'	MWG, Ebersberg
β-aktin reverse	5'-CCACCATCACGCCCTGGTGC-3'	MWG, Ebersberg

## 2.6 Material für proteinbiochemische Experimente

### 2.6.1. Herstellung von Lysispuffer für die Proteinisolierung

- 1% NP-40
- 20 mM Tris HCl mit pH= 7,4
- 150 mM NaCl
- 2 mM EDTA
- 2 mM EGTA
- 2 mM PMSF
- 40 mM Na<sub>3</sub>V0
- 4 mM NaF
- *Complete Proteinase Inhibitor Cocktail* -Tablette

### 2.6.2. Durchführung der Gel-Elektrophorese

- BioMax MR Film Kodak, Rochester, USA
- Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk BioRad, München
- Größenmarker Multi Mark oder High Mark Invitrogen, Karlsruhe
- Kodak BioMax Filmkassette Kodak, Rochester, USA
- Ladepuffer NuPage LDS Sample Buffer 4X Invitrogen, Karlsruhe
- 20X Laufpuffer MOPS Invitrogen, Karlsruhe

- NuPage Novex Bis-Tris-Gel 4-12% Invitrogen, Karlsruhe
  - PVDF-Membran Immobilon-P Millipore, Eschborn
  - Sponge PAD Invitrogen, Karlsruhe
  - Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Pierce, Rockford, USA
  - 20X Transferpuffer Invitrogen, Karlsruhe
  - Western-Blot-Kammer Novex Invitrogen, Karlsruhe
- 
- 1x TBS-Puffer mit pH= 7,5:  
50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
  - TBS-T-Waschpuffer:  
0,1% Tween-20 in 1x TBS-Puffer
  - Blocking-Puffer:  
5% Magermilchpulver in TBS-T
  - Stripping-Puffer:  
83 mM Tris-HCl mit pH = 7,5; 2% SDS, 0,7% Beta- Mercaptoethanol in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

## 2.7. Material für Microarray-Untersuchungen

- Acetonitril Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
- Gene Expression Hybridization Kit Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
- Gene Expression Wash Buffers Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
- One-Color RNA Spike-In Mix Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
- Quick-Amp Labeling Kit One-Color Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
- RNA 6000 Nano Lab Chip Kits Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

## 2.8. Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Organismus</u>	<u>Gewicht (kD)</u>	<u>Bezugsort</u>
<i>p-ERK-1/2</i>	Kaninchen	44	Cell Signalling Technology®, Beverly, MA, USA
<i>ERK-1/2</i>	Kaninchen	42	Cell Signalling Technology®, Beverly, MA, USA
<i>p-Akt</i>	Kaninchen	60	Cell Signalling Technology®, Beverly, MA, USA
<i>Akt</i>	Kaninchen	60	Cell Signalling Technology®, Beverly, MA, USA
<i>p-p38</i>	Kaninchen	43	Cell Signalling Technology®, Beverly, MA, USA
<i>p38</i>	Kaninchen	43	Cell Signalling Technology®, Beverly, MA, USA
<i>p-SAPK/JNK</i>	Kaninchen	46, 54	Cell Signalling Technology®, Beverly, MA, USA
<i>SAPK/JNK</i>	Kaninchen	46, 54	Cell Signalling Technology®, Beverly, MA, USA
<i>p-STAT1</i>	Maus	84, 91	BD Biosciences®, Franklin Lakes, NY, USA
<i>STAT1</i>	Kaninchen	84, 91	Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, USA
<i>p-STAT3</i>	Kaninchen	79, 86	Upstate Biotechnology®, Lake Placid, NY, USA
<i>STAT3</i>	Kaninchen	92	Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, USA

<u>Antikörper</u>	<u>Organismus</u>	<u>Gewicht (kD)</u>	<u>Bezugsquelle</u>
<b><i>OSM</i></b>	Mensch	22	Santa Cruz Biochtechnology®, Santa Cruz, CA, USA
<b><i>OSMR-β</i></b>	Ziege	185	Santa Cruz Biochtechnology®, Santa Cruz, CA, USA
<b><i>LIFR</i></b>	Maus	190	Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, USA
<b><i>gp- 130</i></b>	Maus	130	Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, USA
<b><i>HRP-konjugiert Rabbit-IgG</i></b>	Kaninchen		Rockford®, IL, USA
<b><i>HRP-konjugiert Mouse-IgG</i></b>	Maus		Rockford®, IL, USA
<b><i>HRP-linked anti-rabbit</i></b>	Kaninchen		Amersham®, Arlington Height, IL, USA
<b><i>Alexa-Flour488-konjugiert</i></b>			Ambion/Life®, Darmstadt
<b><i>Alexa-Flour546-konjugiert</i></b>			Ambion/Life®, Darmstadt

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper.

## **2.9. Geräte und Software**

### **2.9.1. Geräte**

- Agfa Curix 60 Entwicklermaschine Agfa, Köln
- Agilent DNA Microarray Scanner Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA
- Autoklav Hirayama, Tokyo, Japan
- 2100 Bioanalyzer Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
- DNA-Sequenzierungs-System ABI Prism 3100 Perkin-Elmer, Boston USA

• Elektrophoresegeräte Power Pac	Bio-Rad, München
• ELISA- Lesegerät	Tecan, Crailsheim
• Feinwaage PL 200	Mettler-Toledo, Gießen
• Flüssigstickstoffbehälter	Kryoson, Schöllkrippen
• Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München
• Glashomogenisator	Sarstedt, Nümbrecht
• Light Cycler480	Roche, Mannheim
• Mikroskop	Olympus, IX 50, Hamburg
• NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab, Erlangen
• Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
• Pipetten (Gr. 10, 20, 100, 200, 1000)	Eppendorf, Hamburg
• PH-Metergerät pH 530	WTW, Weilheim
• Photometergerät Ultrospec III	Pharmacia, Uppsala, Schweden
• Schüttelinkubator	Precision Scientific, USA
• Sterilbank	Heraeus, München
• Sterilkult-Inkubator	Heraeus, München
• Tischzentrifuge Rotanta 63 R	Hettich, Tuttlingen
• Ultrazentrifuge	Hettich, Tuttlingen
• Vortex Schüttler	Scientific Industries, USA
• Wasserbad GFL 1083	Bachhofer, Reutlingen
• Zeiss LSM 510 confocal Mikroskop	Zeiss, Jena

### 2.9.2. Software

• Axio Vision 4.6	Zeiss, Jena
• Feature Extraction 10.5.1 Software	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
• Gene Expression Data analysis tool der Panther database ( <a href="http://www.pantherdb.org">www.pantherdb.org</a> )	
• GeneSpring GX 11.0.1 analysis software	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
• Magellan Version 3.11	Tecan, Crailsheim
• Scan Control 8.4.1 Software	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
• Spotfire Decision Site 9.1.1	TIBCO, Goeteborg, Schweden

### **3. Methoden**

#### **3.1. Zellbiologische Methoden**

##### **3.1.1 Kultivierung der Zellen**

Die bei -80° C im Gefrierschrank gelagerten Zellen wurden zügig im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in jeweils 10 ml vorgewärmtes Medium (DMSO mit 10% FCS und 1% P/S) aufgenommen. Anschließend fand bei Raumtemperatur eine fünfminütige Zentrifugation der Zellmediumssuspension bei 1200 rpm statt. Während der Mediumsüberstand mit einer Glaspipette abgesaugt und verworfen wurde, wurde das Zellsediment in 1,0 ml vorgewärmtes Medium aufgenommen. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren erfolgte ein Lösen des Zellsedimentes, und die Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in der gewünschten Dichte auf sterile Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden dann im 37°C temperierten Brutschrank, der mit Wasserdampf gesättigter Raumluft und 5% CO<sub>2</sub> angereichert war, verwahrt. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde ein Wechsel des Mediums vorgenommen. Bei 70%-bis 80%iger Konfluenz der Zellen erfolgte ein Splitting, indem das Medium mittels Einmalpipette von der Agarplatte entfernt, und im Anschluss daran mit 10 ml PBS die im Medium vorhandenen Trypsinhibitoren entfernt wurden, um daraufhin 1,5 bis 2,0 ml Trypsin als Lösemittel zuzugeben. Nach Inkubation im Brutschrank für zwei bis fünf Minuten konnten die Zellen durch Beklopfen der Zellkulturplatte gelöst werden. Dann wurden sie in 10 ml frischem Medium aufgenommen und zehnmal auf- und abpipettiert, um ein einzelnes Vorliegen zu erreichen. Daraufhin erfolgte in den gewünschten Dichten die Aussaat auf neue sterile Zellkulturplatten und die Überprüfung der gleichmäßigen Verteilung der Zellen unter dem Mikroskop.

##### **3.1.2. Bestimmung der Zellzahl**

Um die Anzahl der Zellen in einer Zellmediumssuspension zu bestimmen, wurden 50 µl der Suspension und 50 µl Trypanblau in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Anschließend wurden die vitalen Zellen, die sich dadurch auszeichneten, dass eine Blaufärbung ausblieb, in den vier Großquadranten der Kammer unter dem Mikroskop gezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml wurde der Mittelwert der gezählten Zellen pro Quadrant erhoben und mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Zählkammerfaktor 10<sup>4</sup> multipliziert.

### **3.1.3. Stimulation der Zellen**

Wenn die Zellen eine 70%- bis 80%ige Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und durch serumfreies Medium bzw. Medium mit 1% FCS ersetzt. Die Petrischalen wurden dann über Nacht im Brutschrank bei 37°C verwahrt. Die Stimulation der Zellen erfolgte nach 12 bis 16 Stunden mit dem gewünschten Zytokin in verschiedenen Konzentrationen, Zeitintervallen und zusätzlich mittels einer Positivkontrolle. Zum Zeitpunkt 0 wurde jeweils eine Negativkontrolle gewonnen.

### **3.1.4. Einfrieren von Zellen**

Um die Zellen einzufrieren, wurde das Medium mit einer Einmalglaspipette abgesaugt und die Zellkulturplatte dreimalig mit je 10 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1-2 ml Trypsin abgelöst und in frisches Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation für fünf Minuten bei 1200 rpm und 15°C wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in kaltem Einfriermedium (20% DMSO, 80% FCS) resuspendiert. Anschließend wurde diese Suspension auf Gefrierröhrchen zu je 1 ml aufgeteilt und bei -80°C schockgefroren.

### **3.1.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Um die Freisetzung von IL-6, TNF $\alpha$ , TIMP-1 und MMP-3 zu quantifizieren, wurden die Zellen auf großen Zellkulturplatten mit je 6 cm Durchmesser bis zu einer Konfluenz von 70%- 80% bebrütet. Nach 12 Stunden Inkubation mit serumfreiem Medium wurden dann je 100  $\mu$ l entnommen, die als Nullwert dienten. Anschließend erfolgte die Stimulation mit dem gewünschten Zytokin wie oben beschrieben. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden je 100  $\mu$ l Medium entnommen und bei -20°C im Gefrierschrank bis zur Messung verwahrt. Für die Messung wurden Verdünnungsreihen von IL-6, TNF $\alpha$ , TIMP-1 und MMP-3 hergestellt, um diese mit den Proben zu vergleichen. Dann brachte man alle Reagenzien auf Raumtemperatur. Für die Experimente wurde erst je 50 bzw. 100  $\mu$ l ELISA-Verdünnungslösung auf vorher mit immobilisierten Antikörpern beschichtete 96-Loch-Platten gegeben, die den in den Kits enthaltenen Protokollen entsprachen. Nach dem Zufügen von je 50 bis 200  $\mu$ l der Proben pro Loch wurden diese zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem horizontalen Schüttler inkubiert, damit das im Medium

befindliche IL-6, TNF $\alpha$ , MMP-3 bzw. TIMP-1 von den Antikörpern gebunden werden konnte. Im Anschluss daran wurden die Wells viermal mit je 400  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen, danach je 200  $\mu$ l fertig gemischte Detektierlösung zugegeben und hiermit bis zu zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Wiederholung des Waschschrifftes wurden je 200  $\mu$ l Substratlösung zugefügt und nach 20 Minuten Inkubation im abgedunkelten Raum je 50  $\mu$ l Stopplösung pro Loch zugegeben, was zu einem Farbumschlag führte. Anschließend konnten die Proben mit dem ELISA-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen werden. Die Experimente wurden mit den Reaktionskits *Human IL-6 ELISA*, *Human MMP3 (total) ELISA*, *Human TIMP-1 ELISA* und *Human TNF- $\alpha$  ELISA* von R&D-Systems durchgeführt.

### **3.2. Molekularbiologische Experimente**

#### **3.2.1. Isolation der RNA**

Die RNA-Isolation erfolgte mittels *Quiagen RNeasy Kit* (Hilden, Germany). Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit 4°C kaltem PBS gereinigt und anschließend 1-2 ml Trizol auf die Petrischalen gegeben, sodass diese mittels eines Zellschabers vom Boden gelöst werden konnten. Nach Umpipettieren in ein steriles Eppendorfgefäß wurde die Zellsuspension mit einer 21 G Nadel sechsfach auf- und abgesaugt. Nach fünf Minuten Inkubation bei RT wurden 200  $\mu$ l Chloroform pro 1 ml Trizol zugegeben und für 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 g bei 4°C für 15 Minuten. Der dabei entstandene wässrige Überstand, der der RNA entsprach, wurde in ein neues steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l Isopropanol pro 1 ml Trizol wurde die Lösung gemischt und für zehn Minuten bei RT inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 12000 g für eine Minute bei 4°C, um die RNA zu fällen, wurde das Pellet zweimal mit je 1 ml 75%iger EtOH pro 1 ml Trizol gewaschen. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 4°C für fünf Minuten bei 7500 g, dann wurde die RNA kurz luftgetrocknet und in 30-50  $\mu$ l nuklease-freies Wasser aufgenommen. Anschließend wurde sie bei 55-60°C für zehn Minuten inkubiert. Danach konnte die photometrische Messung erfolgen. Eine Lagerung der RNA wurde bei -80°C durchgeführt.

### **3.2.2. Photometrische Messung der RNA**

Die Messungen erfolgten mittels NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer durch Messung der Absorption bei 260 nm.

### **3.2.3. Behandlung des RNA-Isolates mit DNase**

Um DNA-Kontaminationen zu entfernen wurde die RNA-Lösung mit 0,1 Volumenanteilen eines 10X DNase-Puffers und 1-2 µl (2U/µl) Turbo-DNase versetzt. Nachdem eine 30-minütige Inkubation bei 37°C erfolgt war, wurden erneut 1-2 µl Turbo-DNase zugegeben und bei 37°C für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 0,1 Volumenanteile an DNase-Inaktivierungsreagenz zugesetzt und per Hand gemischt. Nach kurzer Inkubationszeit bei RT erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 10000 g für eineinhalb Minuten und der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

### **3.2.4. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)**

Zur Herstellung von cDNA wurde das Roche *Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit* (Roche, Mannheim) verwendet. Nach folgendem Reaktionsansatz wurde ein Gesamtvolumen von initial 13 µl hergestellt:

1-3 µl	RNA	(Endkonzentration 1 µg)
1 µl	Oligo-p(dT) <sub>18</sub> Primer	(Endkonzentration 2,5 µM)
	Oder 2 µl Sequenz-Spez. Primer	(Endkonzentration 0,5-2,5 µM)
	Oder 2 µl Random Hexamer Primer	(Endkonzentration 60 µM)

Ad 13 µl Gesamtvolumen mit sterilem Wasser.

Daraufhin erfolgte eine Denaturierung bei 65°C für zehn Minuten und eine anschließende Kühlung der Reagenz auf Eis. Im Anschluss wurden folgende Komponenten nach Protokoll zugefügt:

4 µl	Transcriptor Reverse Transkriptase	(Endkonzentration 1x, 8 mM)
	Reaktionspuffer 5X	MgCl <sub>2</sub> )
0,5 µl	Protector RNase-Inhibitor	(Endkonzentration 20 U)
2 µl	Deoxynucleotide Mix	(Endkonzentration 1 mM)
0,5 µl	Transcriptor Reverse Transkriptase	(Endkonzentration 10 U)

Das Gemisch wurde kurz zentrifugiert, sodass sich die Probe am Grund des Reaktionsgefäßes absetzte. Abhängig vom verwendeten Primer folgte ein weiterer Inkubationsschritt. Zur Inaktivierung der Transcriptor-Reversen-Transkriptase wurde anschließend eine Erhitzung auf 85°C für eine Dauer von fünf Minuten durchgeführt, dann die Reaktion auf Eis gestoppt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

### **3.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem sterilen Reaktionsgefäß folgender Reaktionsansatz genommen:

2 µl cDNA

4 µl Reaktionspuffer 5x (Endkonzentration 1x)

6,25 µl 8 mM MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 2,5mM)

2 µl dNTP 10mM (Endkonzentration 1mM)

0,2 µl Taq/Polymerase

Je 0,4 µM Primer

Ad 20 µl Gesamtvolumen incl. sterilem Wasser.

Anschließend erfolgten nach kurzer Zentrifugation nachfolgende Reaktionsschritte:

1.) für 1 min Denaturierung bei 95°C

2.) für 45 sec Denaturierung bei 95°C

3.) für 45 sec Primeranlagerung bei variabler Temperatur je nach Primer

4.) für 45 sec Elongation bei 72°C

5.) für 5 min Elongation bei 72°C

6.) für beliebige Zeit Kühlung bei 15°C

Die Schritte 2-4 wurden über 35-40 Zyklen hinweg wiederholt.

### **3.2.6. Quantitative PCR (qPCR) oder Real-Time-PCR**

Die Quantitative PCR erfolgte mittels *Quanti Tect SYBR Green PCR Master Mix* (Roche, Mannheim). Dazu wurde auf Eis mit folgendem Reaktionsansatz gearbeitet:

8 µl cDNA (in 1:20-Verdünnung)

10 µl 2 x Quanti Tect Mix

Je 0,3 µl 20 µM Primer (Endkonzentration 0,3 µM)

und Nuklease-freies Wasser, um ein Endvolumen von 20 µl zu erreichen.

Die Vermehrung der cDNA erfolgte je nach Primer nach beispielhaftem Programm:

- 1.) für 15 min Denaturierung bei 95°C
- 2.) für 30 sec Denaturierung bei 95°C
- 3.) für 30 sec Anlagerung der Primer bei unterschiedlicher Temperatur je nach Primer
- 4.) für 30 sec Elongation bei 72°C

Die Schritte 2-4 wurden bis zu 40-Zyklen lang wiederholt. Die Expression von  $\beta$ -Aktin wurde zur Normalisierung der Genexpression verwendet. Die Durchführung erfolgte an einem LightCycler480 (Roche, Mannheim).

Gen	Primer-Kombination
gp-130 forward	5'-TCAACTTGGAGCCAGATTCC-3'
gp-130 reverse	5'-CCCACTTGCTTCTTCACTCC-3'
LIFR forward	5'-ATGGGAAGACATTCTGTGG-3'
LIFR reverse	5'-CGCAAGACCAGGTGGTAACT-3'
OSMR $\beta$ forward	5'-GGAATGTGCCACACACTTG-3'
OSMR $\beta$ reverse	5'-ACATTGGTGCCTTCTTCCAC-3'
GAPDH forward	5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3'
GAPDH reverse	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'
$\beta$ -Aktin forward	5'-CCTCGCCTTGCCGATCCGC-3'
$\beta$ -Aktin reverse	5'-CCACCATCACGCCCTGGTGC-3'

Tab. 5: Darstellung der für die Durchführung der RT-PCR und q-PCR verwendeten Primer.

### 3.2.7. Agarose-Gelelektrophorese und Densitometrie

Die Analyse der PCR-Produktgröße und PCR-Quantität erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden 10  $\mu$ l Proben mit 1  $\mu$ l 10X Ladepuffer in 2% Agarosegel gegeben und bei einer Spannung von 10 V pro cm Gellänge in der Elektrophoresekammer aufgetrennt. Zur Größenkontrolle lief ein Marker mit. Bei der Auswertung wurde jeweils eine Normalisierung auf die GAPDH- oder  $\beta$ -Aktin-Expression durchgeführt.

### **3.2.8. Sequenzierung**

Nach Reinigung der Fragmente erfolgte die Sequenzierungsreaktion durch Zugabe eines Stopnukleotides, das mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes markiert war, wodurch fluoreszenzmarkierte Sequenzfragmente entstanden, die anschließend der Größe nach in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Die Darstellung erfolgte nach Anregung der Fluoreszenz durch einen Laser, die Auslesung erfolgte mit der Software *ABI Prism version 3.4.5*.

### **3.2.9. siRNA-Transfektion**

Die Transfektion der HCT116-Zellen mit siRNA erfolgte mittels Lipofectamine 2000 (Ambion) und spezifischen siRNA gegen STAT3 oder unspezifischen Kontroll siRNA (Ambion) nach Anweisungen des Herstellers.

## **3.3. Proteinbiochemische Methoden**

### **3.3.1. Isolation der Proteine**

Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen geerntet, indem das Medium entfernt und die Petrischalen jeweils dreimalig mit 4°C kaltem PBS gewaschen wurden. Anschließend erfolgte das Schockgefrieren der Zellen auf den Agarplatten mit flüssigem Stickstoff, danach die Lagerung auf Eis. Nachdem mittig jeweils 2 µl PMSF-Lösung sowie 200 bis 400 µl NP-40-Lysispuffer zugegeben wurden, konnten die Zellen mithilfe des Zellschabers vom Boden abgelöst und in sterile Eppendorfgefäß überführt werden. Nach sechsmaligem Auf- und Absaugen durch eine 21 G Nadel wurden die Zellsuspensionen für 20 Minuten auf Eis gelagert. Als nächstes erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm bei 4°C und der die Proteine enthaltende Überstand wurde in sterile Reaktionsgefäß pipettiert. Die Lagerung bis zur Proteinmessung erfolgte bei -20°C.

### **3.3.2. Messung der Proteinkonzentrationen**

Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte mittels Bradford-Reagenz. Dazu wurden Standardkurven mithilfe von *Bovine Serum Albumine* in verschiedenen Konzentrationen (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 µl) und bekannter Proteinkonzentrationen erstellt. Zur Messung der

unbekannten Proben wurden je 2  $\mu$ l der Proteinprobe mit 1 ml Bradford-Lösung (1:5 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>bidest) versetzt, kurz bei Raumtemperatur inkubiert und mittels Photometer die Konzentration der jeweiligen Probe bestimmt. Das Prinzip des Bradford-Assays besteht darin, dass der enthaltene Farbstoff *Commassie Brilliant Blue G-250* verschiedene Absorptionsmaxima zeigt, abhängig davon, ob er an Protein gebunden ist oder nicht. Proteingebunden liegt dies bei 595 nm, nicht-proteingebunden bei 470 nm. Die Messung erfolgte für jede Probe zweifach, um mit dem Mittelwert die für die Gelelektrophorese notwendige Proteinmenge zu berechnen.

### **3.3.3. Durchführung des Western-Blots**

#### **3.3.3.1. Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der Proteine wurden diese in definierten Konzentrationen mit 4X LDS-Lade-Puffer versetzt und für zehn Minuten bei 72°C denaturiert. Die Proben wurden dann in die vertikalen Taschen von 4%-12% Bis-Tris-Gelen (Invitrogen) in die Western-Blot-Kammern pipettiert und diese mit 1X MOPS-Running-Puffer aufgefüllt. An die Gelkammern wurde für eine Stunde eine konstante Ladung von 200 V angelegt. Zur Kontrolle der Bandenwanderung ließ man einen Größenmarker (Multi-Mark oder High-Mark) mitlaufen.

#### **3.3.3.2. Transfer der Proteine**

Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran, indem diese für eine Minute in Methanol getränkt und als Sandwich mit dem proteinbeladenen Polyacrylamidgel und Filterpapier in eine mit Transferpuffer gefüllte Westernblot-Kammer gegeben wurde. Durch das Anlegen einer konstanten Spannung von 30 V über zwei Stunden wanderten die Proteine aus dem Gel auf die Membran. Nach einem Waschschritt mit 1X TBS-T wurde die PVDF-Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Orbital-Shaker mit 10 ml Blockierpuffer behandelt, um freie unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

### **3.3.3.3. Detektionsschritt**

Nach drei weiteren jeweils fünfminütigen Waschschritten mit TBS-T konnte die Membran bei 4°C über Nacht unter gleichmäßigem Rotieren mit dem primären Antikörper (1:1000 in 5% BSA) inkubiert werden. Am darauffolgenden Tag wurde der Antikörper entfernt und die Membran erneut dreimal für fünf Minuten mit TBS-T-Waschpuffer behandelt. Anschließend erfolgte die Detektion mithilfe des sekundären Antikörpers (Anti-rabbit-Ig, Verdünnung 1:5000 in Blockierpuffer), an den das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war. Hiermit wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem horizontalen Schwenken inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurde für fünf Minuten Super Signal West Pico (1:1) auf die Membran gegeben. Danach erfolgte in der Dunkelkammer die Belichtung eines Kodak-Filmes, indem er in einer speziellen Filmkassette in Kontakt mit der Membran gebracht wurde. Dies erfolgte für unterschiedliche Belichtungszeiten. Im Anschluss wurden die Kodak-Filme in der Agfa Curix 60 Entwicklermaschine entwickelt. Die Membran wurde nach Abschluss des Experiments bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### **3.3.3.4. Strippen von Membranen**

Um die PVDF-Membran nach dem Belichten erneut verwenden zu können, wurde sie einmalig mit TBS-T-Waschpuffer gewaschen und anschließend für 30 Minuten im Wasserbad bei 60°C mit ca. 10 ml Strippuffer behandelt. Es folgten drei Waschschritte á fünf Minuten. Danach wurde sie für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierpuffer behandelt und nach drei weiteren Waschschritten konnte eine erneute Inkubation mit einem primären Antikörper bei 4° über Nacht erfolgen.

### **3.3.4. Rezeptornachweis auf Membranproteinebene**

Als Erstes wurden die Zelllinien Caco-2, DLD1, HCT116, HT-29 und SW480 wie oben beschrieben kultiviert. Bei 70%- bis 80%iger Konfluenz wurden die Zellen dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde je 1 ml Triton-X-Puffer auf die Zellkulturplatten gegeben und die Zellen mit dem Zellschaber abgelöst. Mit einer 21 G Nadel wurde das Lysat in ein Eppendorfgefäß gegeben und sechsmal durch die Nadel auf- und abgesaugt. Danach wurden die Zelllysate bei 15000 x g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand entsprach den löslichen Proteinen und wurde separat

aufbewahrt. Das Pellet wurde in 200 µl Triton-X-Puffer (Zusammensetzung sh. unten) mit 1% SDS gelöst und anschließend für fünf Minuten bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand entsprach den Membranproteinen und wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt bzw. im Anschluss weiterverarbeitet.

Um die isolierten Membranproteine visuell nachzuweisen, wurden Gelelektrophorese und Geltransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wie oben beschrieben durchgeführt. Nach dem Blocken der Membran mit 5%iger Magermilch bei Raumtemperatur wurde diese dreimal für je fünf Minuten mit TBS-T-Waschpuffer gewaschen und mit den Antikörpern OSMR-β, LIFR oder gp-130 bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Detektionsschritt erfolgte wie oben beschrieben mittels sekundärem Antikörper und Super Signal West Pico in der Dunkelkammer.

#### Zusammensetzung Triton-X-Puffer:

1% Triton X 100  
100 mM NaCl  
10 mM Hepes pH 7,6  
2 mM EDTA  
1 mM PMSF  
4 mM NaVO<sub>3</sub>  
40 mM NaF  
+ ½ Proteinaseinhibitorcocktail- Tablette

### **3.4. Funktionelle Experimente**

#### **3.4.1. Experimente zur Zellproliferation**

Für dieses Experiment wurde der *WST-1-Assay* (Roche, Mannheim) und der *CellTiterGlo Assay* (Promega, Madison, USA) nach Protokoll verwendet. 5000 bis 10000 Zellen wurden in 100 µl Medium in 96-Loch-Platten ausgesät und kultiviert. 12 bis 16 Stunden vor Beginn der Stimulation wurde das 10%ige FCS-Medium gegen 1%iges ausgetauscht. Dann wurden je 100 µl Medium, das mit 100 ng/ml OSM versetzt war, oder zytokinfreies Medium als Negativkontrolle zugefügt. Die Stimulation fand bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über 48 Stunden statt. Mittels *WST-1-Assay* (Roche) und *CellTiterGlo Assay* (Promega) wurde die Zellproliferationsrate ermittelt, indem pro Well zu den 100 µl Zellkulturmedium 10 µl WST-Reagenz oder 100 µl CellTiterGlo-Reagenz zugegeben wurden. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 420-480 nm mittels ELISA-Platten-Lesegerät. Als Backround-Kontrolle wurden 10 µl WST-1-

Reagenz und 100 µl Zellkulturmedium ohne Zellen vermischt. Für jedes Experiment wurden 16 Wells analysiert. In allen Experimenten wurde die Proliferation in unstimulierten Zellen gleich 1,0 gesetzt. Zur weiteren Untersuchung wurde zudem eine Vorbehandlung mit dem Akt-Inhibitor Wortmannin und dem MEK-1 Inhibitor PD98059 durchgeführt.

### **3.4.2. Wundheilungsexperimente**

Für die Wundheilungsexperimente wurden HCT116-Zellen in 6-Well- oder 96-Well-Platten bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden standardisierte zirkuläre Wunden in jedes Well gesetzt. Abgelöste Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Nachdem das 10% FCS-haltige Medium gegen 1% FCS-haltiges ersetzt wurde konnte die Stimulation mit OSM 100 ng/ml vs. unstimulierte Kontrollen erfolgen. Am Folgetag wurde nach einem Waschschritt mit PBS das überwachsene Gebiet mittels des *Confocal Laser Scanning Mikroscope 510* (Zeiss, Jena) und der *Axio Vision 4.6* Software (Zeiss, Jena) bestimmt. Für die Gruppe der OSM-stimulierten Zellen, als auch für die unstimulierten Zellen wurden jeweils 16 Wells analysiert.

### **3.4.3. Experimente zur Apoptose**

Das Experiment wurde mithilfe des „*Caspase 3/7 Chemoluminescence Assay*“ von Promega durchgeführt. Die enthaltenen Reagenzien wurden nach Protokoll vorbereitet. Es wurden  $10^5$  HCT116-Zellen pro Well in je 100 µl Medium in eine 96-Loch-Platte ausgesät und 16 Stunden mit 10% FCS-haltigem Medium bis zur Zelladhäsion inkubiert. Nach 12 Stunden Inkubation mit serumfreiem Medium erfolgte die Stimulation mit OSM in den Konzentrationen 10 und 100 ng/ml oder zytokinfreiem Medium (1%FCS) für jeweils 6 Stunden. Nach Herstellerprotokoll wurden 100 µl Reagenz/Well zugegeben und für 30 Minuten bis drei Stunden inkubiert. TNF $\alpha$  wurde als Positivkontrolle verwendet (25 ng/ml).

### **3.5. Immunfluoreszenzexperimente**

Dazu wurden HCT116-Zellen für eine Minute in einer Lösung aus Methanol und Eisessig 1:1 fixiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschritte und eine Rehydrierung mittels 4°C kaltem PBS für insgesamt 30 Minuten. Dann erfolgte das Blocking für eine Stunde bei Raumtemperatur mittels 5%igem Serum. Die Inkubation mit dem primären Antikörper oder der Isotypen-Kontrolle (Kaninchen für LIFR, Ziege für gp-130 und OSMR-β) wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurde für 30 Minuten bei RT eine Inkubation mit den FITC (Fluorescein Isothiocyanat)-markierten sekundären Antikörpern (AlexaFluor488- oder AlexaFluor546-konjugiert) durchgeführt. Die Nuklei wurden mit Hoechst 33342 blau angefärbt. Die Zählung und Abbildung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

### **3.6. Microarray-Untersuchungen**

#### **3.6.1. Vorbereitung der Proben**

Die Vorbereitung der Proben für die Microarrays erfolgte mit dem „*RNeasy® Mini Kit*“ von Quiagen. Zu Beginn wurde eine Anzahl von  $10^6$  HCT116-Zellen auf 35 mm Zellkulturplatten ausgesät und bis zu einer 70- bis 80%igen Konfluenz kultiviert. Zwölf Stunden vor der Stimulation wurde das Zellkultur-Medium durch 1%iges FCS ersetzt, um die Zellen auszuhungern. Anschließend wurden die Zellen mit OSM in einer Konzentration von 100 ng/ml über sechs Stunden stimuliert, parallel dazu wurden Nullpunkte genommen. Die Untersuchungen erfolgten jeweils in vierfacher Ausführung. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen abgesaugt und die Zellkulturplatten dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde 0,1- 0,25% Trypsin in PBS zugefügt, um die Zellen zu lösen. Nach dem Zufügen von Medium, das durch das enthaltene Serum das Trypsin inaktiviert, wurden die Zellen in RNase-freie Zentrifugationsröhren gegeben und bei  $300 \times g$  für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und die Zellen durch die Zugabe von je 350 µl Lysispuffer getrennt. Nach dem Homogenisieren des Lysates wurde ein Volumen von 70%igem Ethanol zugefügt und das Ganze durch Pipettieren gut durchmischt. Dann wurde die Probe, einschließlich des Präzipitates, in ein „*RNeasy spin column*“ gegeben, ein spezielles Zentrifugationsröhren mit einer für die Puffersubstanz durchlässigen Membran, das in einem 2 ml großen Sammelröhren enthalten war, und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde

verworfen, der Rest mit 700 µl RW1 (mit Ethanol) versetzt und erneut für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert, um die Membran zu waschen. Der Überstand wurde erneut verworfen. Danach wurde die Membran zweimal mit je 500 µl RPE Buffer gewaschen, indem das Reaktionsröhren für zwei Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen wurde. Nach vorsichtigem Umsetzen des Zentrifugationsröhrens in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß wurde dies bei voller Geschwindigkeit eine Minute zentrifugiert. Nach erneutem Umsetzen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 30-50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben, auf der die Total-RNA gebunden war, und bei 10000 rpm für eine Minute zentrifugiert, um die RNA zu lösen. Die Proben mit Total-RNA wurden auf Trockeneis zu den IMGM Laboratories (Martinsried, Deutschland) versandt, wo die weiteren Analysen stattfanden.

### **3.6.2. Prüfung von Konzentration und Reinheit der Proben**

Die nun folgenden Untersuchungen der Proben wurden in den IMGM Laboratories (Martinsried, Deutschland) durchgeführt.

Die Analyse der mRNA-Expression der mit OSM in der Konzentration 100 ng/ml stimulierten HCT116- Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen, wurde mit „*Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays*“ (4x 44K Format) durchgeführt und die Signale mit dem „*Agilent DNS Microarray Scanner*“ detektiert. Um die RNA-Konzentration und den Reinheitsgrad der Proben zu bestimmen, erfolgte die Messung mit dem „*NanoDrop ND-1000 spectral photometer*“. Der „*2001 Bioanalyzer*“ (Agilent Technologies) erlaubte die Analyse der Unversehrtheit der Total-RNA-Proben durch Kapillarelektrophorese. Der Index für die RNA-Qualität, der RIN (RNA integrity number), bewegt sich zwischen 1 und 10, wobei ein Wert von 1 massiven Abbau beschrieb, während ein RIN-Wert von 10 für eine ausgezeichnete Qualität der RNA-Proben sprach. Die Analyse erfolgte mit „*RNA 6000 Nano LabChips Kits*“ (Agilent Technologies).

### **3.6.3. Herstellung von Cyanin-3-markierter cRNA**

Bevor je 500 ng der Total-RNA in eine RT-IVT Reaktion eingebracht wurden, wurden die Proben mit in-vitro synthetisierten, polyadenylierten Transkripten (*One-Color RNA Spike-In Mix*, Agilent Technologies) versehen, die eine interne Kontrolle für die Linearität,

Sensitivität und Präzision versprachen. Die Total-RNA wurde reverse in c-DNA transkribiert und anschließend durch in-vitro Transkription (*Quick-Amp Labeling Kit One-Color*, Agilent Technologies) in cRNA umgewandelt, die Cyanine-3-CTP enthielt.

### **3.6.4. Quantifizierung und Qualitätskontrolle der cRNA- Proben**

Die Konzentration der cRNA (ng/µl), die RNA Absorptionsrate (260 nm/280nm) und die Cyanine-3-Farbstoffkonzentration (pmol/µl) wurden für alle cRNA-Proben mittels „*NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spektralphotometer*“ erhoben. Es wurden der Ertrag und die spezifische Aktivität jeder Reaktion bestimmt:

$$\rightarrow \text{cRNA- Ertrag [\mu g]} = \text{cRNA- Konzentration [ng/µl]} * \text{Volumen des Eluats [\mu l]} / 1000$$
$$\rightarrow \text{spezifische Aktivität [pmol/µg]} = \text{Cyanine-3- Konzentration [pmol/µl]} / \text{cRNA- Konzentration [ng/µl]} * 1000$$

Bei einem Ertrag unter 1,65 µg und einer spezifischen Aktivität unter 9,0 pmol Cyanine-3 µg pro µg cRNA wurde nicht zum Hybridisierungsschritt übergegangen. Zur Qualitätsanalyse der nicht-fragmentierten cRNA wurde das „*RNA 6000 Nano LabChip Kit*“ (Agilent Technologies) auf dem „*2100 Bioanalyzer*“ (Agilent Technologies) verwendet. Ein kleiner initialer Anstieg bei einer runden Kurve mit einigen kleinen Peaks zeigt eine erfolgreiche Amplifikation und Markierung der Total-RNA Proben.

### **3.6.5. Hybridisierung der Microarrays**

Jede einzelne cRNA-Probe wurde bei 65°C für 17 Stunden auf separaten „*Whole Human Genome Oligo Microarrays*“ (4x44K Format) hybridisiert. Jeder Microarray besteht aus 41.000 Zielgen-spezifischen Proben (60-mers) und zahlreichen Kontrollproben. Diese wurden mit „*Gene Expression Wash Buffers*“ (Agilent Technologies) gewaschen und mit Azetonitril (= Methylzyanid) (Sigma-Aldrich) getrocknet. Fluoreszenzsignalintensitäten wurden mit „*Scan Control 8.4.1*“-Software (Agilent Technologies) auf dem *Agilent DNS Microarray Scanner* detektiert.

### **3.6.6. Biomathematische Datenauswertung und Normalisierung**

Die Software „*Feature Extraction 10.5.1*“, „*GeneSpring GX 11.0.1*“ und „*Spotfire Decision Site 9.1.1*“ wurden für die Qualitätskontrolle, statistische Datenanalyse, Erläuterung der Gene und Visualisierung der Daten verwendet. Um die Analyse zu

erweitern wurde der Genexpressions-Datenanalysetool der „*Panther database*“ ([www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)) herangezogen. Um eine Vereinheitlichung der Microarray-Signale zu erreichen, wurde eine Quantilen-Normalisierung durchgeführt, indem man den Median und die Intensitätsstreuung für alle Arrays gleichsetzte. Anschließend wurden die Daten  $\log_2$  transformiert. Der *Pearson's Korrelations-Koeffizient (r)* wurde für alle biologischen Vervielfältigungen innerhalb einer Gruppe und für alle paarweisen Vergleiche der Proben errechnet. Proben, die denselben experimentellen Bedingungen unterlagen, sollten sich ähnlicher sein als unter verschiedenen Bedingungen und die Werte des Korrelations-Koeffizienten dementsprechend höher. Zur Mittelwert-Berechnung wurden die unbehandelten Zellen (Group 1) als Referenz-Gruppe verwendet und die Gen-Expression der mit OSM-behandelten Zellen (Group 2) mit der Baseline verglichen. Zum Vergleich der unterschiedlichen Gruppen wurde der *Welch's T-test* herangezogen, der einen p-Wert ergibt. Das Ausmaß und die Richtung der unterschiedlichen Expressionen zwischen den Gruppen wurden durch Berechnung der Verhältnisse zwischen den Mittelwerten ermittelt, nämlich im FC-Wert (Fold Change):

$$FC = (FC_{group\ x\ vs\ group\ y})i = (Avg_{group\ x})i / (Avg_{group\ y})I \text{ Bsp. für Gen } i$$

Für hochregulierte Gene variieren die FC-Werte zwischen  $>1$  und  $+\infty$ , für runterregulierte Gene zwischen 0 und  $<1$ . Um FC-Werte mit gleicher Folge von Stärke für Hoch- und Runterregulierung zu erreichen, wurden diese einer weiteren Transformation unterzogen, und als linearisierte Fold Changes bezeichnet. So bedeutet ein FC-Wert von 2 z. B. eine zweifache Hochregulierung in Gruppe x im Vergleich zu Gruppe y, ein Wert von 3 eine dreifache und ein Wert von 0,5 oder -2 eine zweifache Hemmung. Zur Identifizierung von Unterschieden bezüglich der Genexpression zwischen den Vergleichsgruppen wurden folgende Parameter berücksichtigt: die verlässliche Detektion der Proben, die statistische Signifikanz, die Induktion (bei einem FDR-bereinigten p-Wert  $\leq 0,05$  und einem Fold-Change-Wert von  $\geq 1,5$ ) und die Repression (bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  und dem linearisierten Fold-Change-Wert  $\leq -1,5$ ). Zur Identifizierung unterschiedlich regulierter biologischer Prozesse, molekularer Funktionen und Signalwege wurde die *Panther-Website* herangezogen (Stand März 2010)<sup>367</sup>.

### **3.7. Statistische Analyse**

Die statistische Analyse wurde mittels des zweiseitigen Student's t-Test durchgeführt. P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Der Standardfehler wurde durch die Quadratwurzel des Dividenden aus Standardabweichung und der Anzahl der einzelnen Daten der jeweiligen Datengruppe bestimmt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Expression von OSMR- $\beta$ , LIFR und gp-130 in intestinalen Epithelzellen

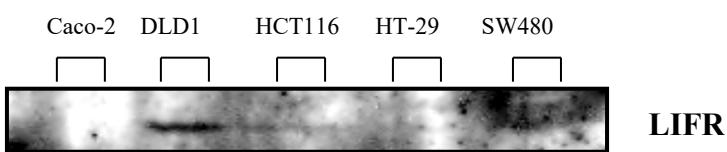
Um die Expression der Membranproteine des OSM-Rezeptorkomplexes in intestinalen Epithelzellen zu untersuchen, wurden die intestinalen Epithelzelllinien Caco-2, DLD1, HCT116, HT-29 und SW480 kultiviert und mittels Antikörpern die Rezeptoruntereinheiten OSMR- $\beta$ , LIFR und gp-130 in Western-Blot-Experimenten untersucht.

Es zeigte sich, dass die OSMR- $\beta$ -Untereinheit sowohl in Zellen der Zelllinien HCT116, HT-29 als auch SW480 vorhanden war (sh. Abb. 8A). Der LIF-Rezeptor konnte in HCT116-, DLD1- und SW480-Zelllinien nachgewiesen werden (sh. Abb. 8B). Die Untereinheit gp-130 wurde in allen untersuchten Zelllinien detektiert (sh. Abb. 8C).

8 A.)



8 B.)



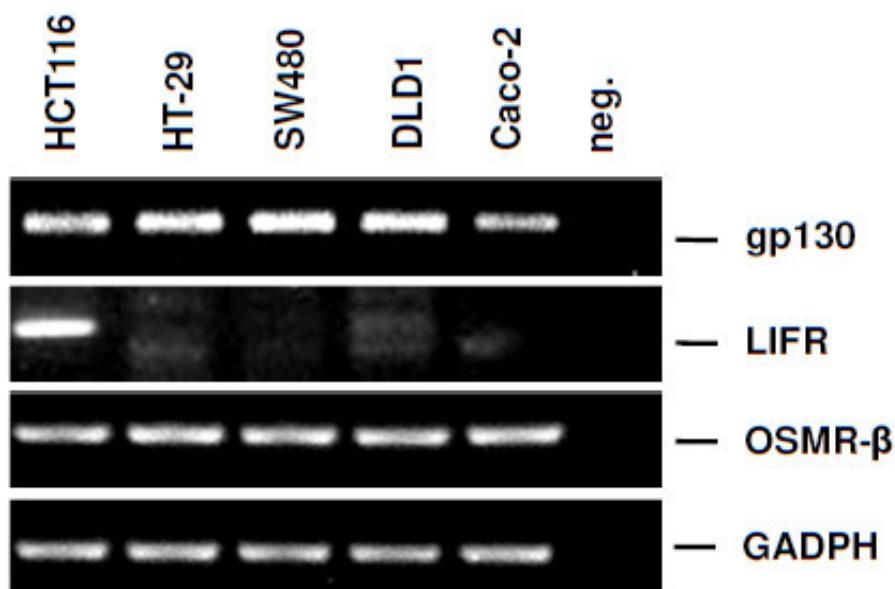
8 C.)



**Abb. 8: Nachweis der OSM-Rezeptoruntereinheiten in verschiedenen IEC.**

- A.) Nachweis von OSMR- $\beta$  in HCT116-, HT-29- und SW480-Zellen.
- B.) Der LIFR befand sich in DLD1, HCT116- und SW480-Zellen.
- C.) Die gp-130-Untereinheit konnte in allen untersuchten Zelllinien detektiert werden.

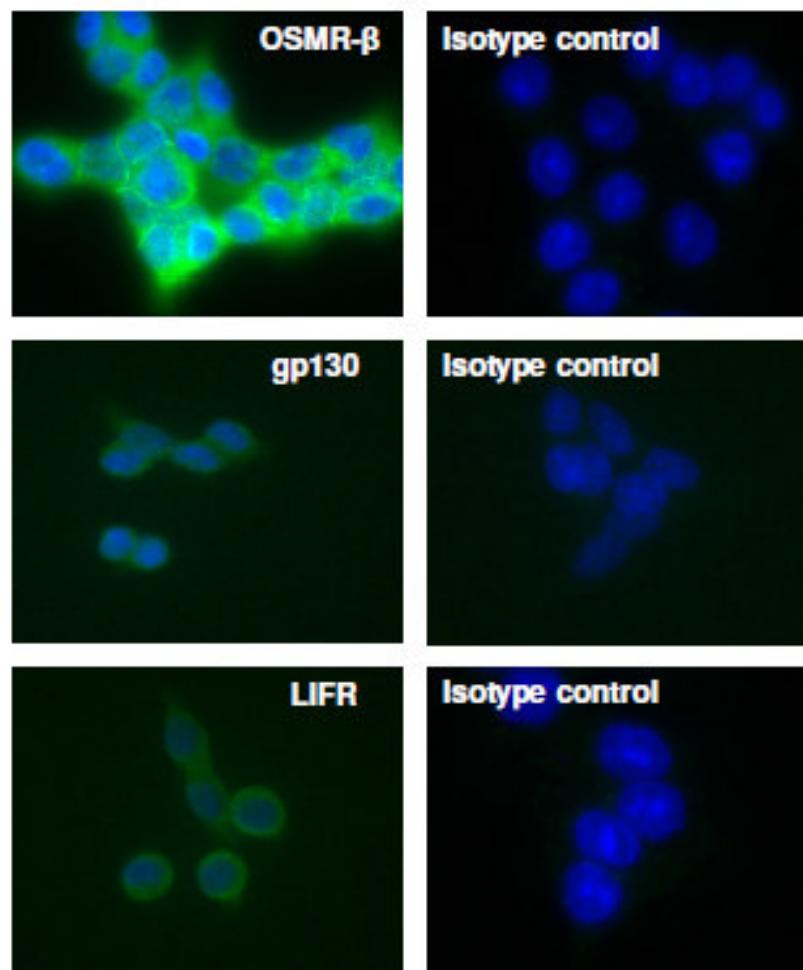
Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurde die mRNA-Expression der OSM-Rezeptoruntereinheiten in semiquantitativen RT-PCR-Analysen in den intestinalen Epithelzelllinien HCT116, HT-29, SW480, DLD1 und Caco-2 bestimmt. Hier zeigte sich, dass die mRNA von OSMR- $\beta$  in allen Zelllinien exprimiert wird, genauso wie gp-130. Für LIFR konnte lediglich eine Expression in HCT116-Zellen und schwächer in HT-29- und DLD1-Zellen gezeigt werden (sh. Abb. 9). Als Positivkontrolle wurde GADPH verwendet, als Negativkontrolle steriles Wasser.



**Abb. 9: mRNA-Expression von OSM-Rezeptoruntereinheiten in IEC.**

Gp-130 und OSMR- $\beta$  konnten in allen untersuchten Zelllinien (HCT116, HT-29, SW40, DLD1 und Caco-2) nachgewiesen werden, während LIFR lediglich in HCT116-Zellen eine starke mRNA-Expression zeigte, schwächer in DLD1- und HT-29-Zellen.

Immunfluoreszenzexperimente konnten die Expression von gp-130, OSMR- $\beta$  und LIFR in HCT116-Zellen bestätigen (sh. Abb. 10), weshalb diese in den nachfolgenden Experimenten als intestinale Epithelzelllinie verwendet wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt.



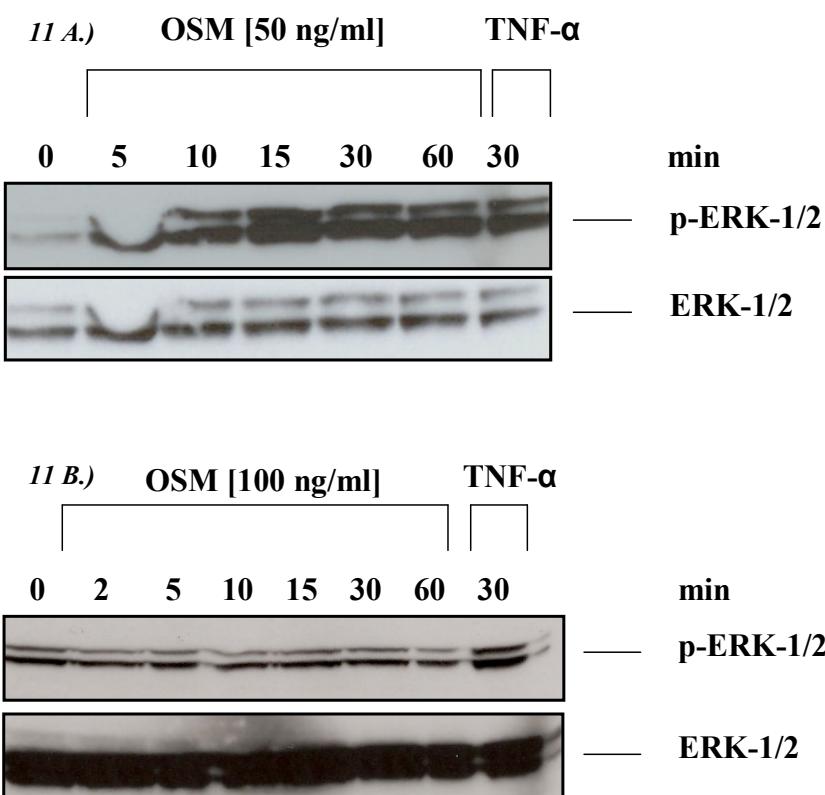
**Abb. 10: Nachweis von OSMR- $\beta$ , gp-130 und LIFR in HCT116-Zellen:**

Mittels Immunfluoreszenzanalyse konnten in HCT116-Zellen alle Rezeptoruntereinheiten von OSM nachgewiesen werden. In den Isotypenkontrollen konnten keine spezifischen Färbungen erreicht werden.

## 4.2. Oncostatin M-vermittelte Signaltransduktionswege in intestinalen Epithelzellen

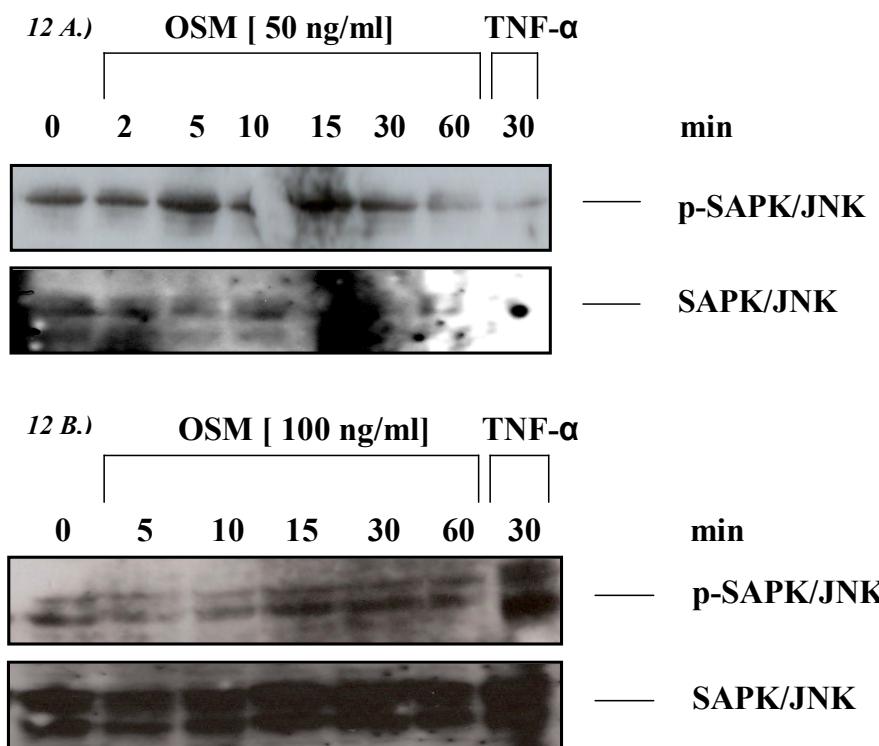
### 4.2.1. Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, p-38, SAPK/JNK

Zur Analyse wichtiger Signaltransduktionswege in intestinalen Epithelzellen wurden HCT116- und HT-29-Zellen mit OSM in den Konzentrationen 50 ng/ml und 100 ng/ml stimuliert. Es konnte in Western-Blot-Experimenten gezeigt werden, dass OSM in HCT116-Zellen zeitabhängig zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK-1/2 (sh. Abb. 11A), SAPK/JNK (sh. Abb. 12A) und p-38 (sh. Abb. 13A) führt. Die Stimulation von HT-29-Zellen mit OSM hingegen führte zu keiner Aktivierung von ERK1/2 (sh. Abb. 11B) und p-38 (sh. Abb. 13B) und lediglich zu einer schwachen Aktivierung von SAPK/JNK (sh. Abb. 12B).



**Abb. 11: Aktivierung der MAP-Kinase ERK-1/2 in HCT116- Zellen durch OSM.**

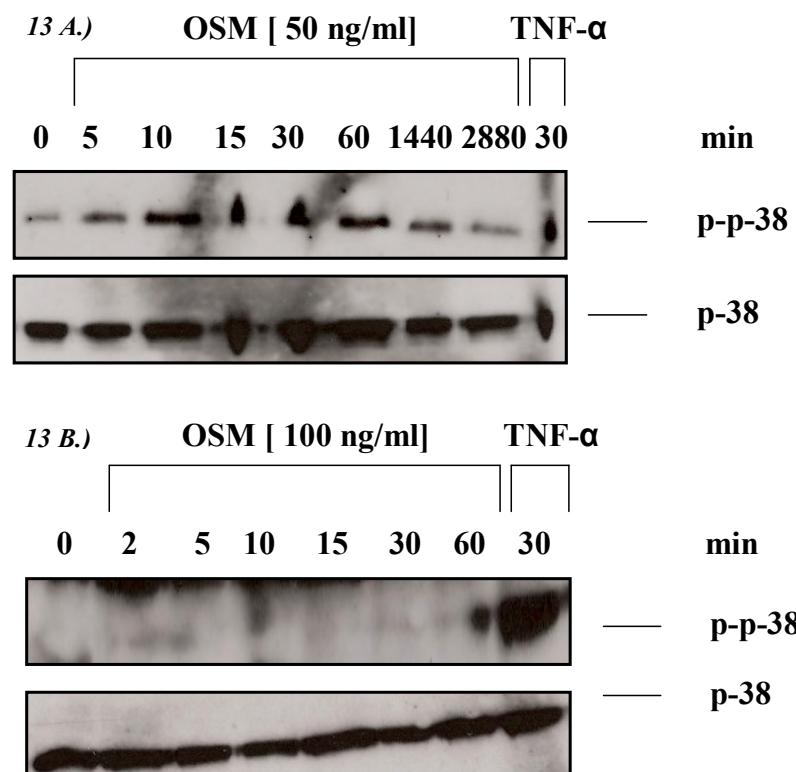
- A.) Es konnte eine Phospho-ERK-1/2-Aktivierung durch OSM nach Stimulation von HCT116-Zellen gezeigt werden.
- B.) Es konnte keine Aktivierung von Phospho-ERK-1/2 nach Stimulation von HT-29-Zellen mit OSM nachgewiesen werden.



**Abb. 12: Phosphorylierung der MAP-Kinase SAPK/JNK nach Stimulation der HCT116- und HT-29-Zellen mit OSM.**

A.) Durch OSM erfolgte eine Aktivierung von Phospho-SAPK/JNK in HCT116-Zellen.

B.) Nach Stimulation von HT-29-Zellen zeigte sich ebenfalls eine Aktivierung von Phospho-SAPK/JNK.



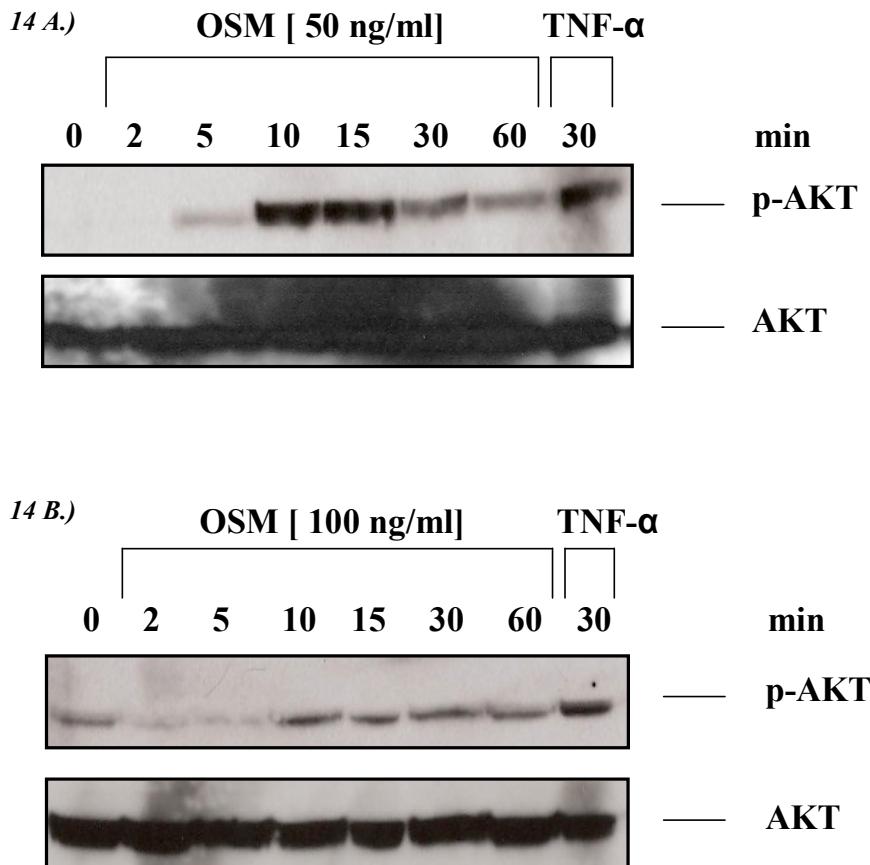
**Abb. 13: Phosphorylierung von p-38 nach Stimulation von HCT116-Zellen mit OSM.**

A.) Nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM konnte eine Aktivierung von p-38 nachgewiesen werden.

B.) Es konnte keine Phosphorylierung von p-38 in HT-29-Zellen nach Stimulation mit OSM gezeigt werden.

#### 4.2.2. Aktivierung der PI3-Kinase Akt

Nach Stimulation der HCT116-Zellen und der HT-29-Zellen mit OSM in den Konzentrationen 50 ng/ml und 100 ng/ml erfolgte die Aktivierung der Akt-Kinase durch eine zeitabhängige Phosphorylierung (sh. Abb. 14A und 14B).

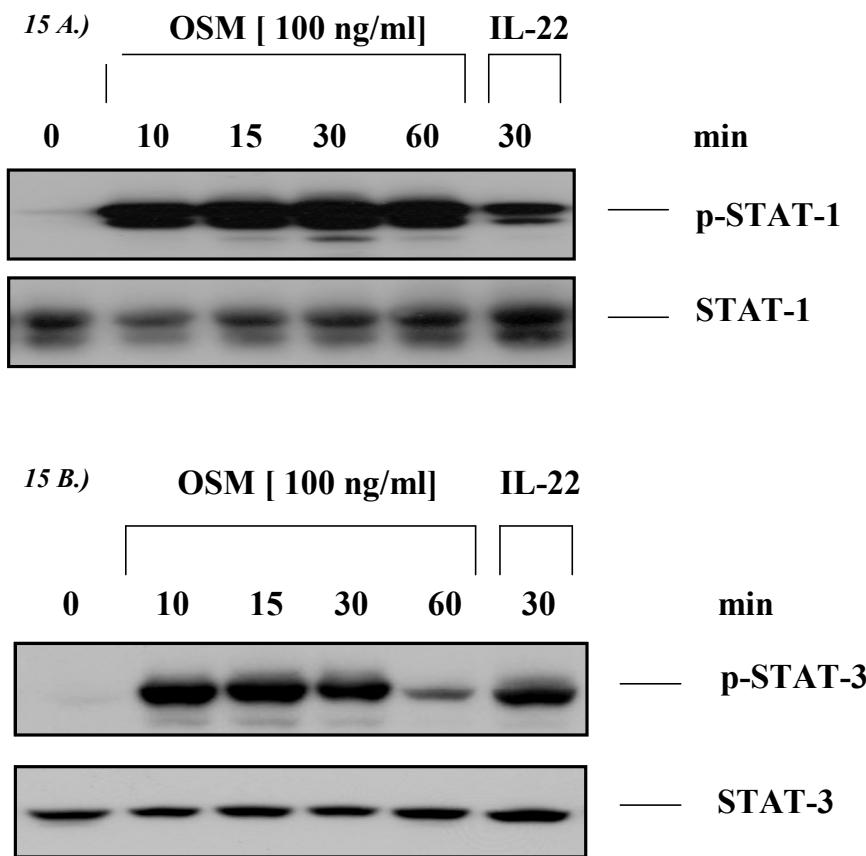


**Abb. 14: Aktivierung der PI3-Kinase Akt nach Stimulation von HCT116- und HT-29-Zellen mit OSM.**

- A.) Nach Stimulation der HCT116-Zellen wurde eine Phosphorylierung der Akt-Kinase nachgewiesen.
- B.) Ebenso zeigt sich durch die OSM-Stimulation eine Aktivierung von Akt in HT-29-Zellen.

#### 4.2.3. Aktivierung von STAT1 und STAT3

Bei der Untersuchung der STAT1- und STAT3-Signalwege mittels Western-Blot-Analyse zeigte sich nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM in der Konzentration 100 ng/ml eine zeitabhängige Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 (sh. Abb. 15A und 15B).



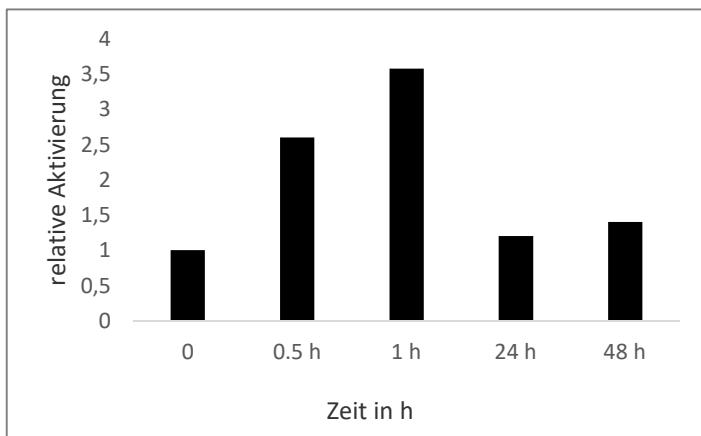
**Abb. 15: Aktivierung von STAT-1 und STAT-3 nach Stimulation mit OSM.**

- A.) Die Stimulation der HCT116-Zelllinie mit OSM führt zur Phosphorylierung von STAT-1.  
 B.) Mittels Immunoblot zeigte sich bei der Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM eine Aktivierung von STAT-3.

### 4.3. Transkriptionsaktivierung durch Oncostatin M in intestinalen Epithelzellen

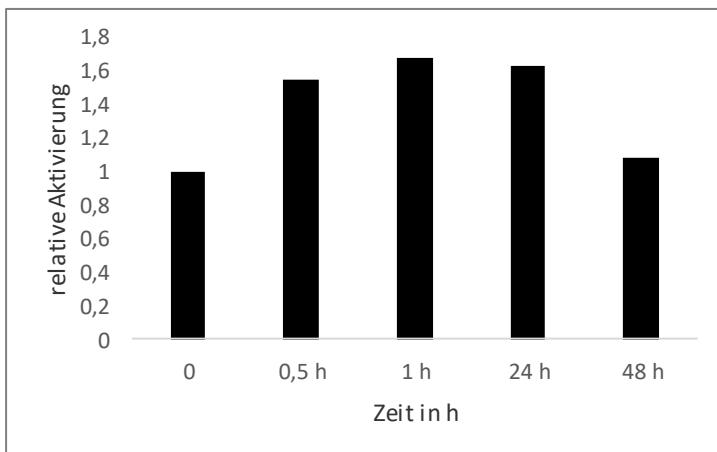
#### 4.3.1. Hochregulation von IL-6 und TNF $\alpha$

Nach Untersuchung der Rezeptorexpression und der Signaltransduktionswege in intestinalen Epithelzellen konnte durch Stimulation von HCT116-Zellen mit OSM [100 ng/ml] zeitabhängig mittels ELISA-Experimenten eine erhöhte Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 (sh. Abb. 16) im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen nachgewiesen werden, für TNF $\alpha$  zeigte sich ebenfalls eine gesteigerte Expression in HCT116-Zellen mit einem Maximum nach einer Stunde (sh. Abb. 17). Das Experiment wurde wiederholt durchgeführt und zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die Anzahl der Wells pro durchgeföhrtem Experiment zeigte sich jedoch zu gering, um eine statistische Signifikanz zu bestimmen.



**Abb. 16: Hochregulation der IL-6-Expression in HCT116-Zellen durch OSM.**

Durch die Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM [100ng/ml] konnte eine gesteigerte Expression von IL-6 erreicht werden.

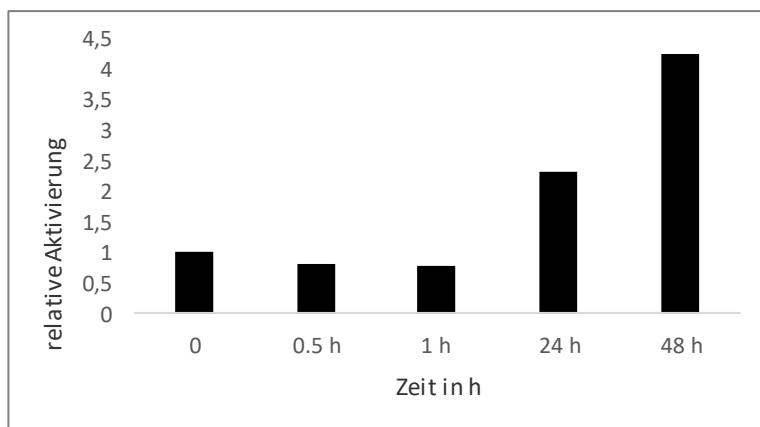


**Abb. 17: Hochregulation der TNF $\alpha$ -Expression in HCT116-Zellen durch OSM.**

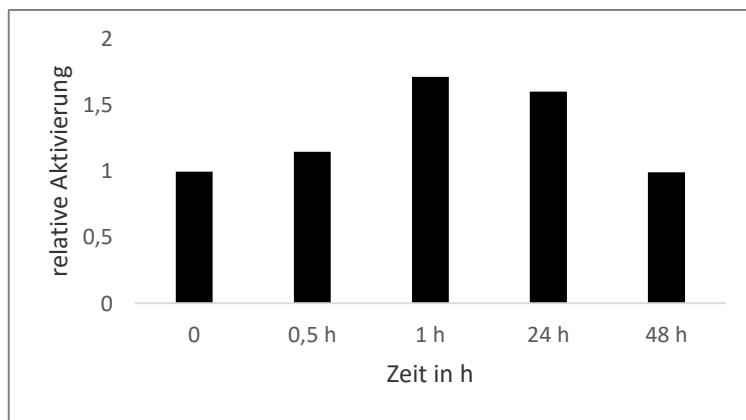
Durch die Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM [100 ng/ml] konnte zudem eine gesteigerte Expression von TNF $\alpha$  gezeigt werden.

#### 4.3.2. Hochregulation von MMP-3 und TIMP-1

Als nächstes wurde die Hochregulation von MMP-3 und TIMP-1 in ELISA-Experimenten untersucht. Nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM in einer Konzentration von 100 ng/ml zeigte sich nach 48 Stunden eine erhöhte Expression von TIMP-1 im Vergleich zu den Kontrollen (sh. Abb. 18). Für MMP-3 konnte mit einem Maximum nach ca. 60 Minuten eine Hochregulation nachgewiesen werden (sh. Abb. 19). Auch dieses Experiment wurde mehrfach durchgeführt. Aufgrund der niedrigen Anzahl der Wells pro Experiment konnte jedoch ebenfalls keine statistische Signifikanz bestimmt werden.



**Abb. 18: Hochregulation von TIMP-1 nach OSM-Stimulation der HCT116-Zellen.**  
Mittels ELISA-Assay konnte eine erhöhte Expression von TIMP-1 nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM gezeigt werden.

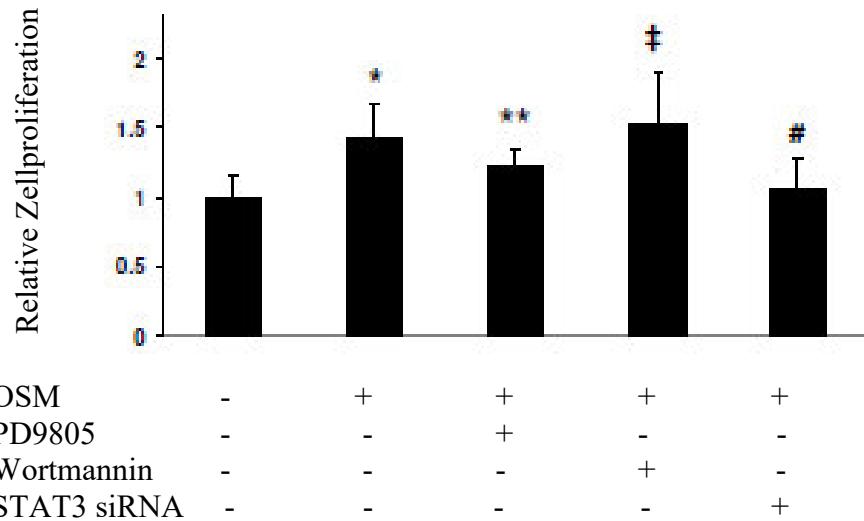


**Abb. 19: Hochregulation von MMP-3 nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM.**  
Nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM konnte eine gesteigerte Expression von MMP-3 gezeigt werden.

#### **4.4. Stimulation der intestinalen Epithelzellproliferation durch Oncostatin M**

Der Einfluss von OSM auf die intestinale Epithelzellproliferation wurde mittels ELISA-Experimenten untersucht. Dazu wurden HCT116-Zellen mit OSM in der Konzentration 100 ng/ml stimuliert und im Hinblick auf die Proliferation mit unstimulierten Kontrollen nach 48 Stunden verglichen. Es konnte ein signifikanter Anstieg der Proliferation der mit OSM stimulierten Epithelzellen im Vergleich mit den Kontrollen nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). Die Zellproliferation wurde durch Vorbehandlung mittels Akt-Inhibitor Wortmannin nicht beeinflusst ( $p = 0,57$  verglichen mit OSM-stimulierten Zellen), jedoch konnte durch Experimente mit dem MEK-1-Inhibitor PD98059, der den ERK-Signalweg

hemmt, OSM-vermittelt eine abgeschwächte Epithelzellproliferation detektiert werden. Durch Transfektion mit STAT3 siRNA zeigte sich eine ebenfalls verminderte Zellproliferation in OSM-stimulierten Zellen ( $p\# = 0,006$ ) (sh. Abb. 20). In allen durchgeführten Experimenten wurde die Epithelzellproliferation in den unstimulierten Zellen 1,0 gesetzt.



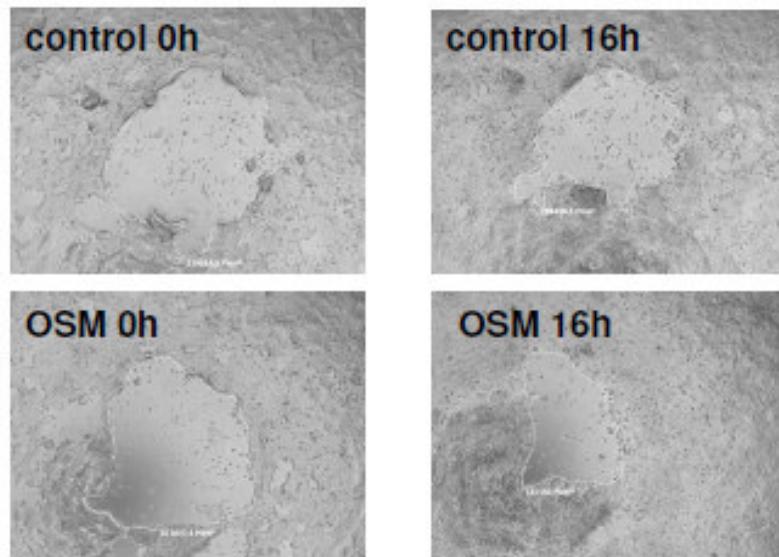
**Abb. 20: Verstärkte intestinale Epithelzellproliferation durch OSM.**

Nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM 100 ng/ml für 48 Stunden zeigte sich eine signifikant gesteigerte Proliferation der Epithelzellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ( $* p < 0,05$ ). Die Vorbehandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor PD98059 ergab eine verminderte Zellproliferation ( $** p = 0,06$ ), ebenso wie die Transfektion mit STAT3 siRNA ( $p\# = 0,006$ ), während die Vorbehandlung mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin keinen signifikanten Effekt zeigte ( $\ddagger p = 0,57$ ).

#### **4.5. Einfluss von Oncostatin M auf die intestinale Epithelzellmigration**

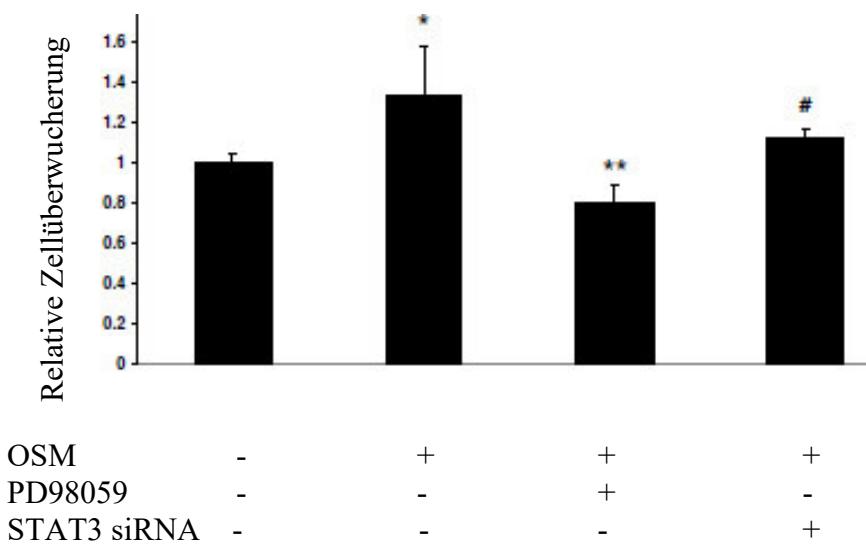
Mithilfe von Wundheilungsexperimenten wurde die Migration der intestinalen Epithelzellen unter Einwirkung von OSM untersucht. Es zeigte sich nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM in der Konzentration 100 ng/ml 16 Stunden nach Beibringung zirkulärer steriler Wundflächen eine signifikant verstärkte Epithelzellmigration ( $p^* = 3,9 \times 10^{-5}$ ) an den Wundrändern im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (sh. Abb. 21). Nach Vorbehandlung mit dem MEK-1-Inhibitor PD98059 (10  $\mu$ M) zeigte sich eine signifikant verminderte Migration ( $p^{**} = 1,7 \times 10^{-5}$ ) der stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen; ebenso zeigte sich nach Vorbehandlung mit STAT3 siRNA (5  $\mu$ M) eine verminderte Zellmigration in den Wundheilungsassays ( $p\# = 0,01$ ) im

Vergleich zu den unstimulierten Zellen (sh. Abb. 22). In allen Experimenten wurde das relative Überwachsen der Zellen in den unstimulierten Zellen 1,0 gesetzt.



**Abb. 21: Repräsentative Abbildung der Zellmigration in Wundheilungsexperimenten**

Nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM in der Konzentration 100 ng/ml zeigte sich eine verstärkte Epithelzellmigration nach 16 h im Wundbereich im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.



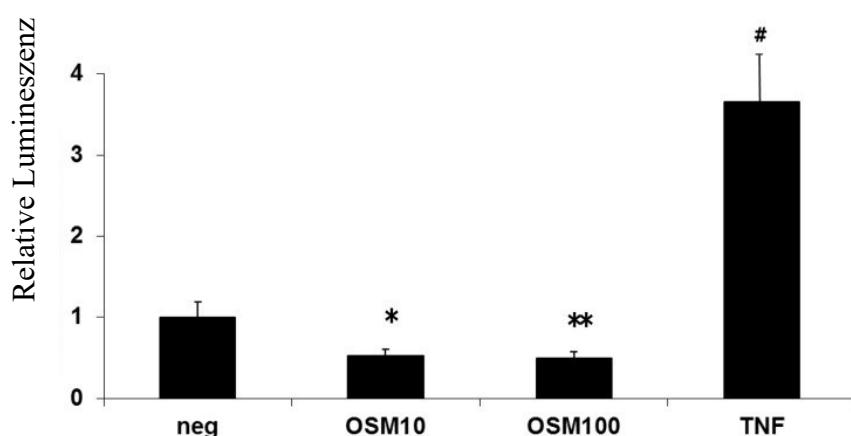
**Abb. 22: Verstärkte Migration der HCT116-Zellen nach Stimulation mit OSM.**

Während die Stimulation mit OSM 100 ng/ml zu einem signifikanten Anstieg ( $* p = 3,9 \times 10^{-5}$  im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen) der Zellmigration führte, zeigte sich nach Vorbehandlung mit dem MEK-1-Inhibitor PD 98059 eine signifikant reduzierte OSM-induzierte Epithelzellmigration in HCT116-Zellen in den Wundheilungsexperimenten ( $** p = 1,7 \times 10^{-5}$  im Vergleich zu den OSM-stimulierten Zellen) und für die Vorbehandlung mit STAT3 siRNA ebenfalls eine signifikant reduzierte Epithelzellmigration ( $p\# = 0,01$  im Vergleich zu den OSM-stimulierten Zellen).

#### **4.6. Verminderte Induktion der Apoptose von intestinalen Epithelzellen durch Oncostatin M**

Der Einfluss von OSM auf die Apoptose wurde mithilfe des „*Caspase 3/7 chemiluminescence Assay*“ (Promega) untersucht. Dazu wurden die HCT116-Zellen mit OSM in den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml versetzt und nach 6 Stunden mittels ELISA-Experimenten die Apoptose der stimulierten im Vergleich zu den unstimulierten Proben analysiert. Es zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Apoptose in HCT116-Zellen, die mit OSM stimuliert wurden, im Vergleich zu den unstimulierten Proben (sh.

Abb. 23).



**Abb. 23: Verminderte Apoptose der mit OSM behandelten HCT116-Zellen.**

Nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM 10 ng/ml (\* p = 0,03) und 100 ng/ml (\*\* p = 0,02) konnte nach 6 Stunden ein signifikanter Rückgang der Apoptose gezeigt werden. TNF $\alpha$  wurde als Positivkontrolle verwendet (# p = 0,007).

#### **4.7. Untersuchung der Oncostatin M-vermittelten Genregulation in Microarray-Versuchen in intestinalen Epithelzellen**

Nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM in der Konzentration 100 ng/ml und Vorbereitung der Proben, die die Total-RNA von stimulierten vs. unstimulierten Kontrollen enthielten, wurden diese auf Trockeneis zu den IMGM Laboratories (Martinsried, Deutschland) versandt, wo die weitere Analyse stattfand. Zur Prüfung der Konzentration und Reinheit mittels Spektralphotometrie wurde eine A260/280-Ratio bestimmt, die zwischen 2,02 bis 2,07 lag, und einen hohen Reinheitsgrad anzeigte. Der RIN-Wert für die Qualität aller Proben lag bei 10,0, was für eine ausgezeichnete RNA-Qualität sprach, weshalb alle gewonnenen Proben verwendet werden konnten. Die

Rohdaten der Microarrays wurden nach Quantilen normalisiert. Der Pearson's Korrelationskoeffizient (r) bewegte sich zwischen 0,992-0,999 innerhalb der beiden Gruppen, was für Homogenität in sich sprach. Zwischen den unterschiedlichen Gruppen besitzt r einen Wert zwischen 0,990 und 0,997, was wiederum die Gleichartigkeit aller Proben und ihrer Genexpressionsprofile belegte.

#### **4.7.1. Analyse der biologischen Prozesse, der molekularen Funktionen und der Signalwege**

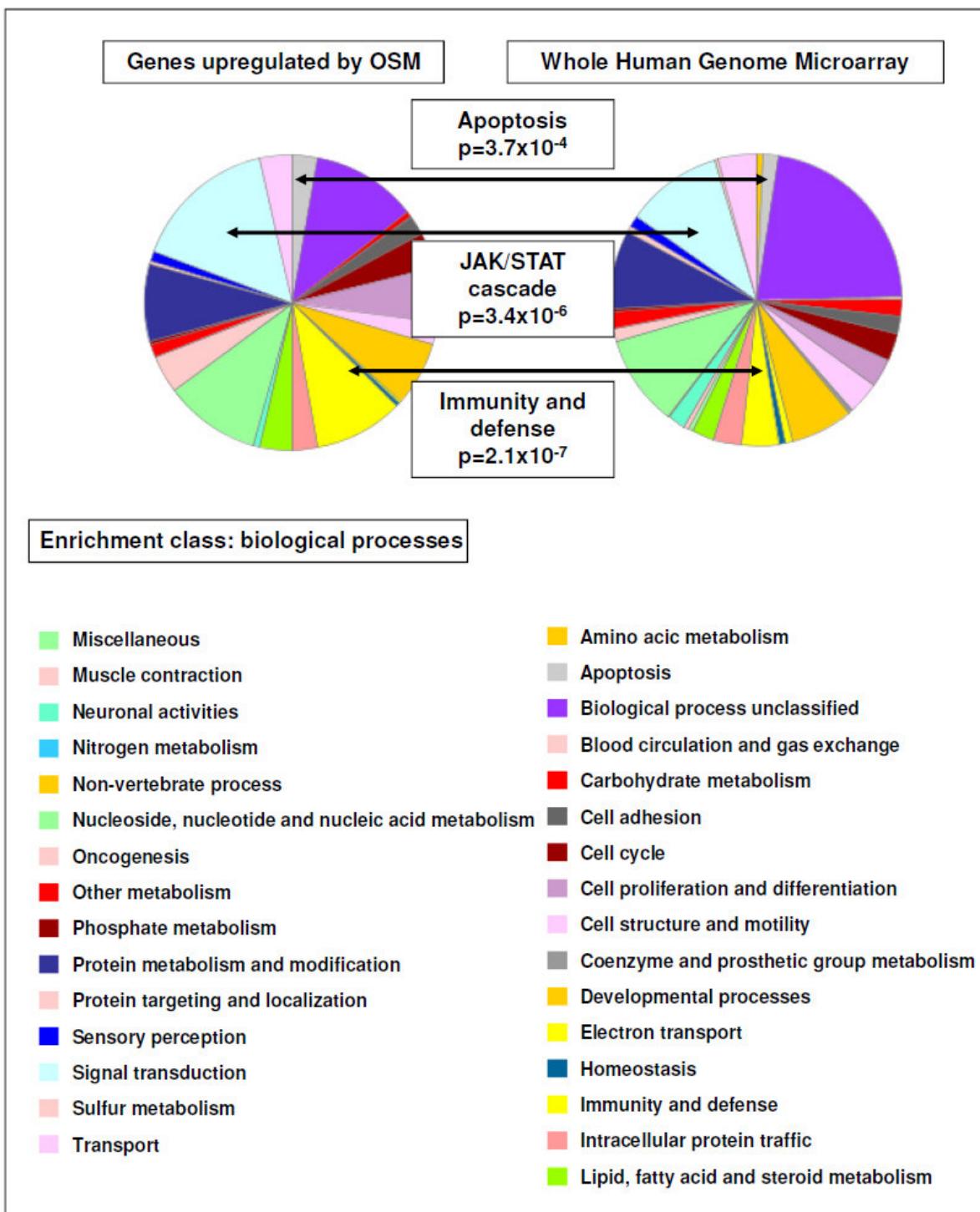
Mithilfe der Gen-Chips und dem Panther-Klassifikationssystem<sup>367</sup> konnten biologische Prozesse, molekulare Funktionen und ihre Rolle im Ablauf von Signalkaskaden und metabolischen Wegen analysiert werden. Ein p-Wert von ca.  $p \leq 10^{-5}$  wurde als Zeichen für eine manifeste Verstärkung biologischer Prozesse und molekularer Funktionen angesehen. Für die Analyse der Pfade wurde ein p-Wert von ca.  $p \leq 10^{-4}$  gefunden.

Beim Vergleich der Gensets zwischen stimulierten und unstimulierten Proben zeigte sich durch OSM eine signifikante Hoch- (79 Gene) bzw. Herunterregulation (15 Gene) von insgesamt 94 Genen. In Tabelle 6 und 7 sind die jeweils 20 am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene aufgeführt.

Innerhalb der biologischen Prozesse zeigte sich eine signifikante Hochregulierung von Genen für die Bereiche *Immunität und Abwehr* ( $p = 2,1 \times 10^{-7}$ ) und deren Unterklasse der *Interferon-induzierten Immunität*. Auch der Bereich *Apoptose* ( $p = 3,7 \times 10^{-4}$ ) zählte zu den am meisten signifikant hochregulierten Gensets im Bereich der biologischen Prozesse. Außerdem war die Expression der Gene für die *JAK/STAT-Kaskade*, eine Sub-Subklasse der *Signaltransduktion* und der *intrazellulären Signalkaskade*, signifikant erhöht. (sh. Abb. 24)

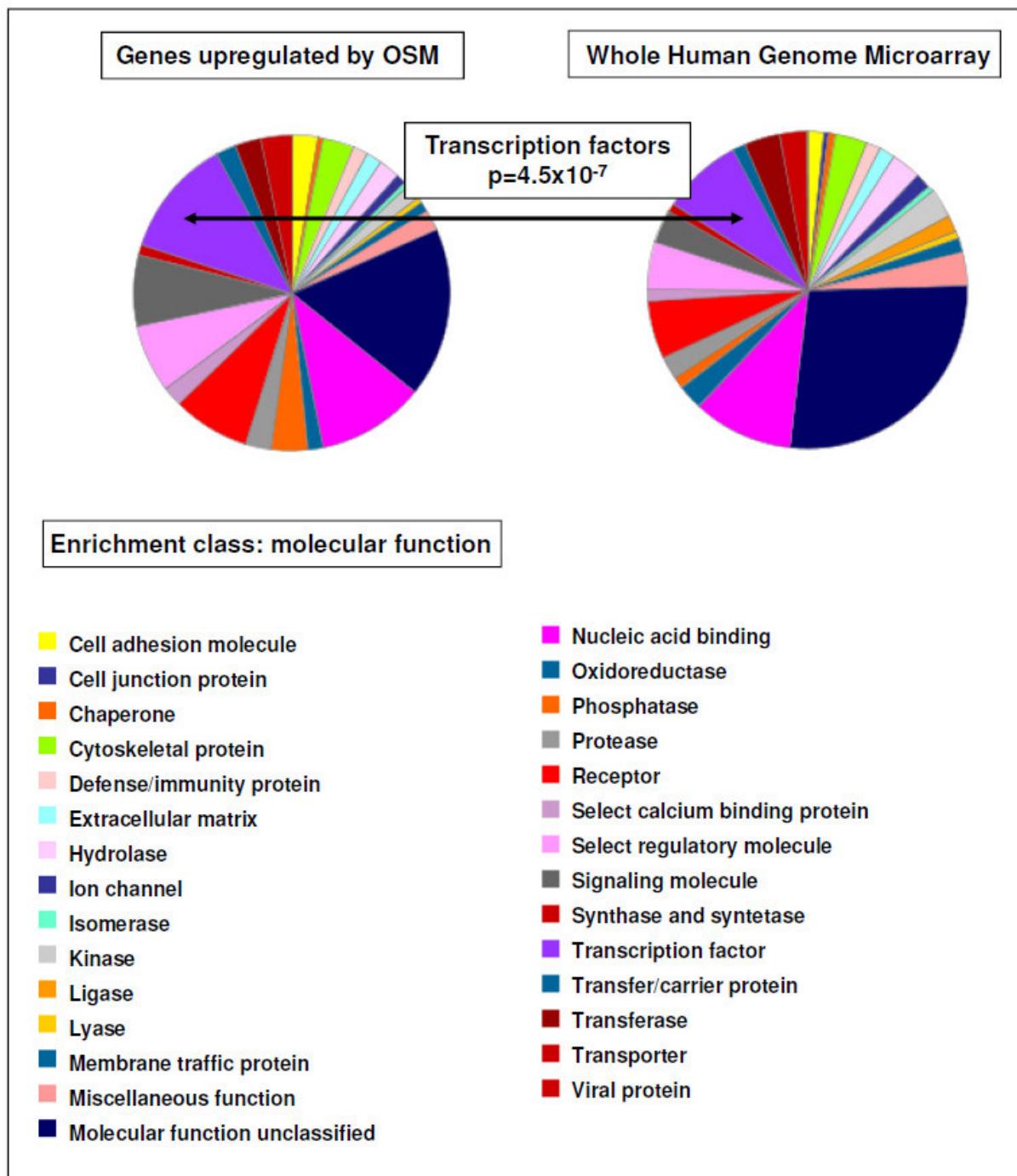
Bei der Analyse der Molekularfunktionen zeigte sich, dass bei den OSM-stimulierten Proben die Genexpression für die Unterklasse der *Transkriptionsfaktoren* ( $p = 4,5 \times 10^{-7}$ ) signifikant erhöht war. (sh. Abb. 25)

Schließlich wurden die Gene noch im Hinblick auf die Signalwege untersucht. Bezuglich der in den stimulierten Proben hochregulierten Gene war der *Interleukin-Signalweg* signifikant erhöht.



**Abb. 24: Hochregulation der Gene für Immunität und Abwehr, Apoptose und die JAK/STAT-Kaskade.**

Mittels Microarray konnte eine signifikante Zunahme der Gene für Immunität und Abwehr, für Apoptose, hier besonders Interferon-induzierte Abwehr, und für die intrazelluläre Signalkaskade JAK/STAT in OSM-stimulierten Proben gezeigt werden.



**Abb. 25: Hochregulation der Gene für Transkriptionsfaktoren in der Klasse der Molekularfunktion.**  
Bei der Analyse der Molekularfunktionen zeigte sich eine signifikante Hochregulation für die Unterklasse der Transkriptionsfaktoren.

#### **4.7.2. Untersuchung einzelner Gene**

Unter den durch OSM-induziert hochregulierten Genen fielen besonders die Mitglieder der Familie der Serin-Protease Inhibitoren SERPINB4 (39,4-fach), SERPINB3 (36,3-fach), SERPINA3 (9,15-fach) und SERPINB1 (1,8-fach) auf. Daneben waren auch die Gene für ERP27 (10,4-fach) und die Apolipoproteine APOL6 und APOL3 signifikant (6,6-fach) erhöht nachzuweisen. Die SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) waren im Vergleich zwischen stimulierten Proben und unstimulierten Kontrollen noch um das Fünffache erhöht. Bereits untersuchte Gene wie STAT3 (2,7-fach) und OSMR (2,46-fach) zählten ebenfalls zu den hochregulierten Genen. Weitere hochregulierte Gene waren u. a. CIITA (4-fach), CEACAM (3,6-fach), NLRC5 (3,1-fach) und MUC-1(2,3-fach).

Daneben wurde auch die Herunterregulation verschiedener Gene nach OSM-Stimulation vs. den unstimulierten Kontrollen untersucht. Hier zeigten sich weniger große Unterschiede. So waren etwa CYP1A1 (2,09-fach) und CXCR4 (1,95-fach) nach Stimulation mit OSM ca. zweifach herunterreguliert.

Gen-Symbol	Beschreibung	Hochregulation der Gene
SERPINB4	Homo sapiens, Serin Protease Inhibitor, Stamm B, Mitglied 4, m-RNA	39,43-fach
SERPINB3	Homo sapiens, Serin Protease Inhibitor, Stamm B, Mitglied 3, m-RNA	36,31-fach
ERP27	Homo sapiens, <i>Endoplasmatic Reticulum Protein (27 kDa)</i> , m-RNA	10,42-fach
SERPINA3	Homo sapiens, Serin Protease Inhibitor, Stamm A (Antitrypsin), Mitglied 3, m-RNA	9,16-fach
APOL6	Homo sapiens, Apolipoprotein 6, m-RNA	6,65-fach
APOL3	Homo sapiens, Apolipoprotein 3, Transkript Variante beta/a, m-RNA	5,63-fach
KCJN10	Homo sapiens, Kalium-Kanal-Einwärtsrichter, Subfamilie J, Mitglied 10, m-RNA	5,25-fach
SOCS3	Homo sapiens, <i>Supressor of Cytokine Signaling 3</i> , m-RNA	5,09-fach
SOCS3	Homo sapiens, <i>Supressor of Cytokine Signaling 3</i> , m-RNA	5,02-fach
BCL3	Homo sapiens, <i>B-cell lymphoma 3-encoded protein</i> , m-RNA	4,54-fach
THC2664989	Q40J89_EHRC Cation efflux protein	4,07-fach
PARP9	Homo sapiens, Poly (ADP-Ribose) Polymerase Familie, Mitglied 9, m-RNA	4,05-fach
CIITA	Homo sapiens, <i>Class II histocompatibility complex transactivator</i> , m-RNA	3,92-fach
CFI	Homo sapiens, <i>Complement factor I</i> , m-RNA	3,64-fach
CEACAM1	Homo sapiens, <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i> , m-RNA	3,58-fach
APOL6	Homo sapiens, Apolipoprotein 6, m-RNA	3,38-fach
TNFRSF6B	Homo sapiens, Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie, Mitglied 6 B, Transkript Variante M68C, m-RNA	3,37-fach
LYPD1	Homo sapiens, <i>LY6/PLAUR domain containing 1</i> , Transkript Variante 1, m-RNA	3,13-fach
NLRC5	Homo sapiens, <i>NOD like receptor family CARD domain containing 5</i> , m-RNA	3,13-fach
DTX3L	Homo sapiens, <i>deltex3-like (Drosophila)</i> , m-RNA	3,04-fach

Tab. 6: Darstellung der 20 am meisten hochregulierten Gene nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM vs. unstimulierte Zellen ( $p < 0,01$ ) nach 6 Stunden.

Gen- Symbol	Beschreibung	Herunterregulation der Gene
AF086547	Homo sapiens, <i>full length insert cDNA clone ZE12B03</i>	2,99-fach
ENST00000315707	<i>Uncharacterized protein C17orf44</i>	2,79-fach
AK092638	Homo sapiens, <i>cDNA FLJ35319 fis clone PROST2011577</i>	2,37-fach
A_23_P90470		2,18-fach
ATAD4	Homo sapiens, <i>ATPase family AAA domain containing 4</i> , m-RNA	2,17-fach
SLC2A12	Homo sapiens, <i>Solute carrier family 2, member 12</i> , m-RNA	2,16-fach
ABCA1	Homo sapiens, <i>ATP-binding cassette, subfamily A, member 1</i> , m-RNA	2,15-fach
CCNG2	Homo sapiens, <i>Cyclin G 2</i> , m-RNA	2,14-fach
CYP1A1	Homo sapiens, <i>Cytochrome P 450 family 1, subfamily A, polypeptide 1</i> , m-RNA	2,09-fach
CCDC17	Homo sapiens, <i>Coiled-coil domain containing 17</i> , m-RNA	2,08-fach
BBC3	Homo sapiens, <i>BCL2 binding component 3</i> , m-RNA	2,07-fach
FLJ43987	Homo sapiens, <i>similar to RIKEN cDNA 4930433I11 gene</i> , m-RNA	2,05-fach
BBC3	Homo sapiens, <i>BCL2 binding component 3</i> , m-RNA	2,03-fach
AK091132	<i>Homo sapiens, cDNA FLJ33813 fis, clone CTONG2002744</i>	2,01-fach
PNRC1	Homo sapiens, <i>proline-rich nuclear receptor coactivator 1</i> , m-RNA	2,01-fach
CXCR4	Homo sapiens, <i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4, transcript variant</i> , m-RNA	1,95-fach
LOC400604	Homo sapiens, <i>hypothetical gene supported by BC039664</i> , m-RNA (cDNA clone)	1,94-fach
THC2648781	<i>Q7SCZ7_NEUCR predicted protein</i>	1,94-fach
AL834280		1,89-fach
IFNE1	Homo sapiens, <i>interferon epsilon 1</i> , m-RNA	1,86-fach

Tab. 7: Darstellung der 20 am meisten herunterregulierten Gene in OSM-stimulierten HCT116-Zellen vs. unstimulierte Zellen (p< 0.01) nach 6 Stunden.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Der OSM/OSMR-Zytokin-Rezeptorkomplex in intestinalen Epithelzellen**

Das Zytokin OSM bindet an die Rezeptorkomplexe gp-130, LIFR und OSMR- $\beta$ <sup>135, 136, 210</sup>. Bereits frühere Studien zeigten, dass intestinale Epithelzellen und Kolonkarzinomzellen einzelne dieser Rezeptorkomplexe exprimieren<sup>64, 70, 78, 143, 298</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun bestätigt werden, dass der OSM/OSMR-Zytokin-Rezeptorkomplex in verschiedenen intestinalen Epithelzelllinien exprimiert wird. Die OSMR- $\beta$ -Untereinheit ließ sich in Western-Blot-Experimenten in HCT116-, HT-29- und SW480-Zellen nachweisen, während der LIFR in HCT116-, DLD1- und SW480-Zellen dargestellt werden konnte. Die Expression der gp-130-Untereinheit konnte in Western-Blot-Experimenten in allen untersuchten Zelllinien (Caco-2, DLD1, HCT116, HT-29, SW480) belegt werden.

In den RT-PCR-Analysen ließ sich die Expression der mRNA von gp-130 ebenfalls in allen Zelllinien nachweisen, ebenso wie die mRNA von OSMR- $\beta$ , während die mRNA des LIFR lediglich in HCT116-Zellen stark exprimiert wurde, schwächer in HT-29- und DLD1-Zellen.

Immunfluoreszenz-Experimente dokumentierten die Expression aller Rezeptoruntereinheiten in HCT116-Zellen, weshalb diese Zelllinie für die weiteren Experimente genutzt wurde.

In den Microarray-Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte außerdem für die mit OSM stimulierten Proben eine 2,46-fache Hochregulation der Gene für den OSMR in HCT116-Zellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Gastrointestinaltrakt neben anderen ein Wirk- und/oder Zielorgan für Oncostatin M darstellt.

### **5.2. Der Einfluss von Oncostatin M auf die Signaltransduktion in intestinalen Epithelzellen**

Für die Ausführung verschiedener biologischer Funktionen einer Zelle ist es notwendig, dass Signale von außerhalb der Zellmembran über die Bindung extrazellulärer Proteine an einen für sie spezifischen Rezeptor in den Zellkern gelangen und dort zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und schließlich zur Genexpression führen, über die wiederum

verschiedene Prozesse wie z. B. Apoptose, Differenzierung, Inflammation, Migration oder Proliferation der Zelle gesteuert werden. Die Signaltransduktion der Mitglieder der IL-6-Zytokinfamily kann über die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges, über die Phosphoinositolphosphatidyl-3-Kinase-Signalkaskade oder über die Ras/Raf/MAPK-Kaskade erfolgen<sup>136, 139</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnte in Western-Blot-Experimenten gezeigt werden, dass die Stimulation der intestinalen HCT116-Zellen mit OSM zeitabhängig zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 und SAPK/JNK, p-38, der PI3-Kinase Akt und von STAT1 und STAT3 führt und somit zur Aktivierung der Signalwege beiträgt; in HT-29-Zellen konnte die Phosphorylierung für SAPK/JNK und Akt gezeigt werden.

Verschiedene Studien wiesen nach, dass sowohl die MAP-Kinase ERK, als auch SAPK/JNK und die PI3-Kinase Akt abhängig vom Differenzierungsstadium und dem Zelltyp das Zellüberleben beeinflussen, indem sie Funktionen wie Apoptose, Migration und Proliferation steuern<sup>7, 31, 32, 33, 108</sup>. Die MAP-Kinasen ERK und SAPK/JNK scheinen über Wechselwirkungen zwischen den Signalwegen Einfluss darauf zu nehmen, ob eine Zellteilung oder eine terminale Differenzierung stattfindet<sup>410</sup>. *Dieckgraefe et al.* (1997) zeigten, dass die MAP-Kinasen ERK und p-38 über die Aktivierung ihrer Signalwege zur Wundheilung intestinaler Epithelzellen beitragen<sup>79</sup>. Eine Studie von *Kinugasa et al.* (2000) hat die Wirkung der MAP-Kinase ERK auf die intestinale Barrierefunktion untersucht und belegte eine Regulation dieser über die Anordnung der Tight Junctions<sup>172</sup>. Für p-38, SAPK/JNK und ERK-1/2 konnte in Biopsien entzündlicher Kolonmukosa bei CED eine erhöhte Aktivität nachgewiesen werden<sup>384</sup>. Die Inhibierung der MAP-Kinasen p-38 und SAPK/JNK dagegen führt zu einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine und verbesserter Wundheilung der Ulcera bei CED<sup>84, 151</sup>.

So kann auch für OSM als Stimulans der Aktivierung der Signaltransduktionswege im Intestinum über die MAP-Kinasen eine Mitwirkung bei der Wundheilung im Gastrointestinaltrakt diskutiert werden.

Desweiteren konnte in Wundheilungsexperimenten nach Stimulation mit OSM in HCT116-Zellen eine signifikant gesteigerte Migration im Vergleich zu unstimulierten Zellen detektiert werden. Nach Vorbehandlung mit dem MEK-1-Inhibitor PD98053, der den ERK-1/2-Signalweg hemmt, wurde diese jedoch signifikant gehemmt, weshalb ERK bei Migration und Wundheilung eine Bedeutung zuzukommen scheint.

In den ELISA-Experimenten zur Proliferation konnte durch OSM eine signifikante Steigerung dieser erreicht werden, während nach Vorbehandlung mit dem Akt-Inhibitor

kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation gemessen werden konnte. Bei der Versuchsdurchführung mit Vorbehandlung der Zellen durch den MEK-1-Inhibitor zeigte sich jedoch eine signifikant verminderte Epithelzellproliferation in den HCT116-Zellen, was wiederum die Bedeutung des ERK-1/2-Signalweges bezüglich der Epithelzellproliferation unterstreicht.

*Abreu et al.* (2001) publizierten, dass die Aktivierung des Akt-Signalweges einen Schutz vor Fas-induzierter Apoptose in gastrointestinalen Epithelzellen des Menschen bietet<sup>1</sup>. Somit lässt sich vermuten, dass Akt in der Epithelzellbarriere des GIT eine bedeutsame Rolle spielt und lässt an eine Beteiligung des Signalweges bei intestinaler Entzündung denken. Mehrere Studien wie z. B. von *Peng et al.* (2012) oder *Huang et al.* (2011) legten dar, dass der Phosphoinositol-3-Kinase-Signalweg bei der Entstehung der Colitis ulcerosa mit involviert ist. So konnte über eine Inhibierung der Akt-Kinase im Mausmodell mit DSS induzierter Colitis eine verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  oder IFN $\gamma$  und eine damit einhergehende verminderte Entzündungsaktivität des Darms nachgewiesen werden<sup>153, 274</sup>. Dies kann möglicherweise als neuer Therapieansatz gesehen werden<sup>153, 274</sup>. Dass Oncostatin M zur Aktivierung dieses Signalweges in intestinalen Epithelzellen führt, der an der intestinalen Entzündung beteiligt zu sein scheint, bestärkt dessen Bedeutung. Zudem konnte in Microarray-Untersuchungen OSM-induziert eine Hochregulation des Gens MUC-1 detektiert werden, das in einer Studie von *Woo et al.* (2012) nachgewiesenermaßen über den Akt-Signalweg zur gesteigerten Synthese und Sekretion von VEGF bei Mammakarzinomen führt<sup>398</sup>.

Mehrere Studien belegten, dass der JAK/STAT-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der CED spielt<sup>245, 248, 330</sup>. So wurde bei Colitis ulcerosa eine gesteigerte Expression und auch Aktivierung von STAT1 dokumentiert<sup>188, 330</sup>. *Musso et al.* (2005) stellten eine STAT3-Aktivierung sowohl bei Patienten mit CU als auch MC fest, die sich streng auf Bereiche intestinaler Entzündung beschränkte<sup>248</sup>. Die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 konnte in der vorliegenden Arbeit nach Stimulation intestinaler Epithelzellen mit OSM zeitabhängig gezeigt werden, was wiederum einen Hinweis auf die mögliche Beteiligung des Zytokins bei CED darstellt.

CIITA, ein Klasse-II-MHC-Transaktivator, der in den Microarray-Experimenten OSM-induziert vierfach hochreguliert wurde, konnte in einer Studie von *Diegelmann et al.* (2012) als Ziel-Gen des Zytokines IL-27, das ebenfalls zur STAT3-Aktivierung führt, bestimmt werden<sup>80</sup>.

Neben der erhöhten Expression von Genen für Immunität und Abwehr und Interferon-vermittelter Immunität wurden in den Microarray-Versuchen dieser Arbeit v. a. auch Gene, die bei Ablauf der JAK/STAT-Kaskade involviert sind, hochreguliert. Ein weiterer Aspekt, der dafür spricht, dass OSM im Gastrointestinaltrakt und auch bei der Pathogenese der CED mit eine Rolle spielt, ist die Tatsache, dass STAT3 ein wichtiges Gen darstellt, das mit Colitis ulcerosa assoziiert ist<sup>196, 199</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte in Microarray-Versuchen eine 2,7-fache Hochregulation des STAT3-Gens in HCT116-Zellen nach Stimulation mit OSM nachgewiesen werden. Auch SOCS3, ein Feedback-Inhibitor der Signaltransduktion und hier v. a. des JAK/STAT-Signalweges, der bei der Entstehung intestinaler Entzündung bedeutsam ist<sup>354</sup>, wurde durch Stimulation mit Oncostatin M in HCT116-Zellen in dieser Arbeit fünffach hochreguliert detektiert.

### **5.3. Die Rolle von Oncostatin M bei intestinaler Entzündung und Tumorgenese**

Zytokine sind Botenstoffe, die in unterschiedlichen Geweben verschiedene Funktionen wie Apoptose, Inflammation, Immunabwehr, Migration, Proliferation, Tumorgenese und Zelldifferenzierung vermitteln<sup>220</sup>. Dies gilt auch für den Gastrointestinaltrakt, wo z. B. durch die Penetration pathogener Bakterien eine inflammatorische Antwort in der intestinalen Mukosa generiert werden kann. Dies kann zur Expression und Hochregulation spezifischer Zytokine wie z. B. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-31 und TNF $\alpha$ <sup>124, 191, 286, 350</sup> führen, die wiederum an der Aktivierung und Chemotaxis inflammatorisch wirkender Zellen und Zellen der Immunabwehr beteiligt sind. Insbesondere auch bei CED konnte gezeigt werden, dass Zytokine bei der Generierung einer Entzündungsreaktion eine zentrale Rolle zukommt. Bedeutend ist hier unter anderem das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$ . Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit TNF $\alpha$  in Zusammenhang mit CED und legten dar, dass dieses Zytokin als Marker für die Krankheitsaktivität bei betroffenen Patienten gelten kann<sup>30, 213, 247, 261, 291</sup>. Antikörper gegen TNF $\alpha$  werden bereits seit mehreren Jahren als therapeutische Option bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie CED, Rheumatoide Arthritis und Psoriasis vulgaris genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des proinflammatorischen TNF $\alpha$  nach Stimulation intestinaler HCT116-Zellen mit OSM in der Konzentration 100 ng/ml mittels ELISA-Experimenten gemessen. OSM-vermittelt konnte eine Zunahme der Expression

von TNF $\alpha$  detektiert werden, was auf eine Mitbeteiligung von OSM bei entzündlichen Prozessen in IEC im Sinne einer proinflammatorischen Eigenschaft hindeuten kann.

Als weiteres Zytokin scheint IL-6 bei CED eine große Rolle zu spielen. So zeigten zahlreiche Studien eine Hochregulation des Zytokins in Serumproben<sup>150, 356</sup> und intestinalen Biopsaten<sup>11, 119, 191, 291</sup> von CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Des Weiteren kann IL-6 als Prädiktor für die Krankheitsaktivität und Prognose bezüglich eines Rezidivs der Erkrankung gesehen werden<sup>150, 209</sup>. IL-6 wird von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen produziert und führt zur Synthese von APP in der Leber, die wiederum zur Induktion einer Immunantwort führen, durch welche die Inflammation reguliert wird. *Dann et al.* (2008) wiesen im Mausmodell mit Darminfektion erhöhte Konzentrationen von IL-6 nach, die mit einer Protektion der Mukosa einhergingen und vor enteralen Läsionen durch bakterielle Pathogene schützten<sup>72</sup>. Diese Ergebnisse sehen IL-6 bei intestinaler Entzündung als regeneratorisches Zytokin. Andere Studien wie z. B. *Suzuki et al.* (2011) konnten zeigen, dass IL-6 die Permeabilität von Tight-Junctions durch Induktion von Claudin-2 erhöht und die Integrität der Epithelzellbarriere stört und somit auch die Abwehrfunktion beeinträchtigt, was wiederum die Entstehung von CED begünstigt, sodass IL-6 hier als proinflammatorisches Zytokin fungiert<sup>355</sup>. *Chalaris et al.* (2012) postulierten hierzu, dass die Wirkung von IL-6 über die Art des Signalweges bestimmt wird<sup>47</sup>. So scheint sich die proinflammatorische Aktivität des Zytokins nach Bindung des löslichen IL-6R (s-IL-6R) mit IL-6 und gp-130 zu manifestieren, was auch in Zellen ohne membranständige IL-6-Rezeptoren möglich ist, und als „*Trans-signalling*“<sup>319</sup> bezeichnet wird<sup>46</sup>. Als natürlicher Inhibitor des *Trans-signalling* wird das lösliche gp-130 (s-gp130) genannt<sup>238</sup>. Eine anti-inflammatorische oder regenerative Komponente des IL-6-Zytokins scheint über die klassische Aktivierung von IL-6 mit dem membrangebundenen IL-6R und einem Homodimer aus gp-130 Untereinheiten zu erfolgen<sup>46</sup>. Bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen, wie auch CED, scheint v. a. das „*Trans-signalling*“ eine Schlüsselrolle zu spielen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine erhöhte Expression für IL-6 in OSM-stimulierten HCT116-Zellen gegenüber den unstimulierten Zellen. Auch diese Ergebnisse lassen eine Mitbeteiligung von OSM an entzündlichen Prozessen in intestinalen Epithelzellen vermuten. In der Therapie der Rheumatoide Arthritis, ebenfalls einer chronisch entzündlichen Erkrankung, wird bereits *Tocilizumab*, ein humanisierter monoklonaler IL-6-Rezeptor-Antikörper eingesetzt<sup>255</sup>, der klinische Remissionen zeigte.

In zahlreichen Studien wird postuliert, dass Matrixmetalloproteininasen auf die Entstehung intestinaler Entzündungen und auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen Einfluss nehmen. Unter anderem partizipieren hier MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MMP-12<sup>17, 118, 134, 221, 230, 346, 383</sup>. So wiesen *Meijer et al.* (2007) in Resektionspräparaten von entzündlich verändertem Ileum/Colon bei Patienten mit CU und MC im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Aktivität von MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 nach<sup>230</sup>. *Manfredi et al.* (2008) konnten zeigen, dass erhöhte Level an Matrix-Metalloproteininasen in Urinproben als Biomarker für die Evaluation der Krankheitsaktivität bei CED-Patienten genutzt werden können<sup>221</sup>. Dass auch in intestinalen Fisteln bei Patienten mit MC eine erhöhte Expression von MMPs, vor allem MMP-3 und MMP-9, vorliegt, belegte eine Studie von *Kirkegaard et al.* (2004)<sup>173</sup>. Des Weiteren scheint das Verhältnis zwischen MMPs und TIMPs einen bedeutenden Faktor darzustellen. So erbrachten *Heuschkel et al.* (2000) den Nachweis, dass ein Ungleichgewicht zwischen dem stark exprimierten MMP-3 und einem unveränderten TIMP-1 in Mukosaläsionen bei CED besteht<sup>142</sup>. *Meijer et al.* (2009) stellten dar, dass erhöhte Proteinlevel von TIMP-1, TIMP-2 und MMP-9 in nicht-entzündlichem Gewebe das Risiko für ein Wiederauftreten der Erkrankung verringern. Für entzündlich verändertes Gewebe scheint dies nicht zu gelten<sup>231</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde in ELISA-Experimenten eine Hochregulation der Matrixmetalloproteininasen nach Stimulation intestinaler Epithelzellen mit Oncostatin M gezeigt, was erneut auf die Mitbeteiligung des Zytokins bei intestinaler Entzündung hindeutet. Insbesondere die starke Hochregulation von TIMP-1, das in mehreren Studien als protektiv gesehen wird, und schwächer von MMP-3, das für Inflammation steht, lässt an eine protektive Komponente in Bezug auf CED denken.

Hierzu wurde erst kürzlich in einer kombinierten Phase II/III-Multicenter-Studie bei erwachsenen Patienten mit moderater und schwerer CED-Erkrankung doppelblind, randomisiert und placebokontrolliert ein MMP-9-Inhibitor (GS-5745) auf Sicherheit und Effektivität getestet. Für Colitis ulcerosa wurde diese Studie im September 2016 bei fehlender Effektivität im Hinblick auf endoskopische Daten abgebrochen. Bei Morbus Crohn wurde die Studie nach Analyse des klinischen und endoskopischen Ansprechens bei inadäquater Effektivität des MMP-9-Inhibitors im Vergleich zu Placebo im November 2016 ebenfalls eingestellt. Eine weitere Entwicklung von GS-5475 für CED ist nicht geplant<sup>92</sup>.

Eine interessante Arbeit zur Bedeutung von Oncostatin M bei entzündlichen Darmerkrankungen wurde 2003 von *Sanchez et al.* publiziert. Hier konnte in einem Colitis-Mausmodell, bei dem durch 4% Dextran-Sodium-Sulfat (DSS) versetztes Wasser eine intestinale Entzündung hervorgerufen wurde, gezeigt werden, dass durch einen Transfer von Adenoviren, die mit murinem OSM versetzt waren, die Entzündung im Intestinum supprimiert werden konnte. In einem weiteren Colitis-Maus-Modell, in dem die intestinale Entzündung durch Oxazolone chemisch induziert wurde, führte der virale Vektortransfer mit OSM dagegen zur verstärkten Entzündung<sup>310</sup>.

Das in den Microarray-Versuchen nachgewiesen hochregulierte Gen NLRC5, Mitglied der Familie der NOD-like Rezeptoren, reguliert NF-κB und die Typ-I-Interferon-Signaltransduktion<sup>412</sup> und scheint ein Negativregulator in Entzündungsreaktionen zu sein<sup>21</sup>. Die vermehrte Expression dieses Genes nach Stimulation mit OSM in den vorliegenden Microarray-Experimenten lässt in diesem Zusammenhang auf die anti-entzündliche Funktion des untersuchten Zytokines schließen.

CEACAM 1, ein Mitglied der CEACAM (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*)-Familie das in IEC exprimiert wird, zeigte sich als weiteres Gen durch OSM 3,6-fach hochreguliert. Für Patienten mit MC konnte im Gegensatz zu CU in einer Studie von *Roda et al.* (2009) eine Reduktion der mRNA- und Protein-Expression von CEACAM 1 und CEACAM 5 belegt werden<sup>299</sup>, was wiederum die Mitbeteiligung von OSM bei intestinaler Entzündung und hier die protektive Komponente vermuten lässt.

CED gelten als Risikofaktor für die Entstehung kolorektaler Tumoren<sup>57, 110, 193, 375</sup>. In einer Meta-Analyse von *Eaden et al.* (2001), basierend auf 116 Einzelstudien, wurde die Prävalenz von kolorektalen Karzinomen (CRC) bei allen Patienten mit CU mit 3,7% angegeben. Das kumulative Risiko für CRC bei Patienten mit CU beträgt über eine Periode von 10 Jahren ca. 2%, über eine Zeitspanne von 20 Jahren 8% und 18% über einen Zeitraum von 30 Jahren<sup>89</sup>. *Canavan et al.* untersuchte in einer Meta-Analyse 2006 das Auftreten von CRC bei Patienten mit MC. Hier zeigte sich ein kumulatives Risiko für Kolorektale Karzinome über eine Zeitperiode von 10 Jahren mit 2,9%, über 20 Jahre mit 5,6% und über 30 Jahre mit 8,3%<sup>44</sup>.

Zahlreiche Studien bestätigten, dass die intestinale IL-6-Produktion nicht nur mit entzündlichen Veränderungen im Darm einhergeht, sondern auch zur Förderung des Tumorwachstums in IEC führen kann, indem es normale und prämaligine Zellen vor Apoptose schützt und deren Proliferation fördert<sup>25, 46, 123</sup>. *Becker et al.* (2004) konnten

nachweisen, dass durch die TGF $\beta$ -Produktion in tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten das Tumorwachstum im Colon über eine gehemmte IL-6-Produktion supprimiert wird. Dies geschieht v. a. über das IL-6-*Transsignalling*, also über die Bindung an den löslichen IL-6-Rezeptor (s-IL-6-R)<sup>18</sup>. Die Tatsache, dass durch die Stimulation mit OSM die Ausschüttung von IL-6 in intestinalen Epithelzellen gefördert wird, wie es in dieser Arbeit gezeigt wurde, lässt an eine besondere Funktion des Zytokins nicht nur bei Inflammationsreaktionen, sondern auch der Tumorgenese im Gastrointestinaltrakt denken. Bereits bei seiner Entdeckung wurde Oncostatin M als Wachstumsinhibitor im Tumorzellwachstum insbesondere menschlichen Melanomzellen beschrieben<sup>41, 351</sup>. Dies scheint auch für andere Gewebe wie z. B. Bronchial-<sup>152, 271</sup> oder Mammakarzinome<sup>85, 120, 204, 205</sup> zuzutreffen, während bei AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkomen die das Tumorwachstum fördernde Eigenschaft von OSM im Vordergrund steht.<sup>6, 233, 251</sup> Eine Methylierung von LIFR in menschlichem Gewebe primärer Kolonkarzinome und eine signifikante Herunterregulierung der mRNA-Expression des LIFR im Vergleich zu gesunden Kontrollen, die keine Methylierung aufwiesen, wurde in einer Studie von *Cho et al.* (2011) nachgewiesen<sup>55</sup>. LIFR als Bestandteil des OSM/OSMR-Komplexes scheint folglich an der Tumorgenese von Kolonkarzinomen mitbeteiligt zu sein, was bereits einen möglichen Ausblick auf die Beteiligung des Zytokins OSM bei der Tumorgenese im Gastrointestinaltrakt gibt. Daneben wurde von *Deng et al.* (2009) eine gesteigerte Methylierung des OSMR in Mukosa von Patienten mit kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu gesunden Probanden, die diese nicht oder nur gelegentlich aufwiesen, dokumentiert, was ebenso für eine Beteiligung von OSM bei der Karzinogenese im Gastrointestinaltrakt spricht. Diese Methylierung war auch in weiteren maligne veränderten Geweben des Verdauungstraktes wie Pankreas- und Magenkarzinomen im Gegensatz zu Bronchial- oder Mammakarzinomen detektierbar<sup>78</sup>.

Auch die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der Matrixmetalloproteininasen und die nachgewiesene Hochregulation dieser in intestinalen Epithelzellen nach Stimulation mit OSM deutet auf eine potentielle Rolle des untersuchten Zytokins in der Tumorgenese hin. Matrixmetalloproteininasen dienen als Organisatoren der extrazellulären Matrix und sind an der Differenzierung von Geweben, an Wachstumsvorgängen und der Apoptose beteiligt. In dieser Arbeit konnte mittels ELISA-Experimenten eine Hochregulation von MMP-3 und TIMP-1 nach Stimulation mit OSM in HCT116-Zellen gezeigt werden. *Baker et al.* (2000) wiesen in ihrer Studie, in der MMPs und TIMPs aus Proben von kolorektalen Tumoren und normalem Gewebe entnommen wurden, signifikant höhere

Level von aktivem MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, und TIMP-1 für kolorektales Tumorgewebe nach, während TIMP-2 in unauffälligem Gewebe hochreguliert war <sup>13</sup>. Auch MMP-7 scheint sowohl in Magen- als auch in Kolonkarzinomen exprimiert zu werden <sup>225</sup>.

Weitere Studien werden darlegen müssen welche Rolle Oncostatin M in der Tumorgenese genau spielt und ob hier mögliche therapeutische Ansätze liegen könnten.

#### **5.4. Die Wirkung von Oncostatin M auf Zellproliferation, Zellmigration und Apoptose in intestinalen Epithelzellen**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von OSM auf Zellproliferation, Zellmigration und Apoptose in intestinalen Epithelzelllinien in ELISA-Experimenten und Wundheilungsexperimenten untersucht. Diese sind wichtige zelluläre Mechanismen, die für ein Gleichgewicht der Zellintegrität und des Zellüberlebens in verschiedensten Geweben notwendig sind. Sie sind zugleich für Entstehung und den Verlauf von CED von Belang, da sie einerseits die Intaktheit der intestinalen Epithelzellbarriere und damit die physiologische Abwehrfunktion, genauso wie im Falle von Gewebedefekten die Wundheilung, beeinflussen. Andererseits spielen sie eine wesentliche Rolle bei der Entstehung maligner Tumore.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine gesteigerte Migration und Proliferation intestinaler Epithelzellen nach Stimulation mit OSM im Vergleich mit den unstimulierten Kontrollen in HCT116-Zellen gezeigt werden. Dies spricht für OSM als anaboles Zytokin und im Hinblick auf CED als mögliches barriere-protektives Zytokin, das Zellproliferation und -migration im Intestinum steigert und die Wundheilung fördert. Nach Vorbehandlung mit dem MEK-1-Inhibitor, der die ERK-1/2-Signalwege inhibiert, wurden sowohl Proliferation als auch Migration in IEC signifikant geschwächt, was erneut die Vermutung der Bedeutung von ERK bei der Wundheilung bestärkt. Daneben konnte durch Transfektion mit STAT3-siRNA eine verminderte OSM-vermittelte Proliferation wie auch verminderte Epithelzellmigration nachgewiesen werden, was auf die besondere Funktion von STAT3 im Hinblick auf die Wundheilung und Protektion der intestinalen Epithelzellbarriere hinweist. Dies konnte für verschiedene Zytokine wie z. B. IL-27 <sup>80</sup>, ebenfalls Mitglied der IL-6-Familie, oder IL-22 <sup>279</sup> in vivo im Mausmodell über die Aktivierung der STAT-Signalwege gezeigt werden. In dieser Arbeit konnte durch die Stimulation intestinaler Epithelzellen mit OSM ebenfalls eine Aktivierung der STAT-

Signalwege erreicht werden, was neben anderen Zytokinen auch für die Beteiligung von OSM bei der mukosalen Wundheilung spricht. Eine aktuelle Studie von *Shin et al.* (2014) beschreibt den positiven Einfluss von OSM durch gesteigerte Proliferation auf die chronische Wundheilung im Mausmodell *in vivo* bei Diabetes mellitus<sup>340</sup>. Ein OSMR-Knock-out-Mausmodell von *Nakamura et al.* (2004) belegte eine verminderte Regeneration von Leberzellen mit persistierenden Nekrosen nach Behandlung mit Carbon-Tetrachlorid (CCl), während im Vergleich dazu bei den Wildtyp-Mäusen durch OSM eine Unterdrückung der Apoptose der Hepatozyten und somit eine verminderte Gewebedestruktion stattfand<sup>253</sup>. Eine Studie von *Wahl et al.* (2001) zur Funktion von OSM im Mausmodell bei Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose wies eine Unterdrückung der Entzündungsreaktionen und Gewebedestruktion über ein Negativ-Feedback proinflammatorischer Zytokine nach<sup>385</sup>. Dies alles lässt auf die migrations- und proliferationsfördernde und zugleich protektive Eigenschaft von OSM in verschiedenen Geweben schließen.

Daneben ist die Apoptose, die auch als programmierte Zelltod bezeichnet wird, wichtiger Bestandteil der Homöostase unterschiedlicher Gewebe. Dieses Gleichgewicht kann sowohl durch pro- als auch anti-apoptotische Faktoren wie Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren oder extrazelluläre Stressmechanismen beeinflusst werden. Gezielter Zelltod führt zu Zellerneuerung, eine verminderte Apoptose hingegen kann die Entstehung von Malignomen begünstigen. ELISA-Experimente zur OSM-induzierten Apoptose in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass nach Stimulation mit OSM eine verminderte Apoptoserate im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen zu beobachten war. Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang auch die MAP-Kinasen ERK, SAPK/JNK und die PI3-Kinase Akt, für die in der vorliegenden Arbeit eine Phosphorylierung nach Stimulation mit OSM in intestinalen Epithelzelllinien gezeigt werden konnte, und deren Einfluss auf Zellprozesse wie Migration, Proliferation und Apoptose in mehreren Studien beschrieben wurde<sup>7, 67, 108, 341</sup>. Auch STAT ist in der Regulation der Apoptose von Bedeutung, indem es die Inhibierung des anti-apoptotischen Proteins NF-κB bewirkt<sup>16</sup>. In dieser Arbeit konnte in Microarray-Versuchen gezeigt werden, dass Gene für die Apoptose nach Stimulation mit OSM signifikant hochreguliert waren. Des Weiteren konnte eine signifikante Hochregulation von Serpinen, v. a. von SERPINB4 (39,4-fach), SERPINB3 (36,3-fach) und SERPINA3 (9,15-fach), beobachtet werden. Serpines sind Serin-Protease-Inhibitoren, von denen bisher über 1000 identifiziert werden konnten. Diese spielen eine Rolle bei der Immunantwort und beeinflussen über

Apoptosevorgänge den Umbau und die Restitution von Geweben. SERPINB3 und -B4 wurden erstmals in den 1990er Jahren in Plattenepithelkarzinomen beschrieben und als SCCA1 und SCCA2 (*Squamous cell carcinoma antigen 1 und -2*) bezeichnet<sup>168, 328</sup>. Sie ließen sich u. a. in Karzinomen der Cervix uteri<sup>229</sup>, des Ösophagus<sup>284</sup>, der Lunge<sup>43</sup> und hepatzellulären Karzinomen<sup>281</sup> nachweisen. Sowohl SERPINB3, als auch SERPINB4 entfalten über STAT-Aktivierung ihre anti-apoptotische Wirkung<sup>3, 4, 344</sup>. Für SERPINB4 konnte gezeigt werden, dass durch eine Überexpression in Tumorzellen sowohl ein rekombinant Granzyme M-induzierter, als auch ein NK-Zellen-induzierter Zelltod, abhängig von reaktiven Loops im Zentrum des Serins, verhindert wird<sup>76</sup>. SERPINB3 wirkt durch die Verhinderung der Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien und die Negativregulierung der Chemotaxis von NK-Zellen ebenfalls anti-apoptotisch<sup>353, 376</sup>. SERPINB3 spielt über die Fähigkeit zur Modulation des Zelltodes eine Rolle in der Proliferation von Epithelien. So konnte in einer Studie von *Lunardi et al.* (2011) für eine Überexpression von SERPINB3 im Mausmodell im Hinblick auf eine Lungenfibrose eine gesteigerte epitheliale Proliferation und erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Fibrogenese nachgewiesen werden<sup>211</sup>. Bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose wurde in Studien eine Überexpression von SERPINB4 detektiert<sup>43</sup>. In dieser Arbeit konnte durch OSM die Hochregulation von SERPINB3 und SERPINB4 erreicht werden, sodass die bisherigen Erkenntnisse auf eine anti-apoptotische und proliferationssteigernde Wirkung des OSM schließen lassen. SERPINA3, auch alpha-1-Antichymotrypsin genannt, ist ein APP, das bei zahlreichen entzündlichen Erkrankungen produziert wird. Eine Inaktivierung durch MMPs, v. a. MMP-3, in entzündlichem Gewebe weist auf seine Bedeutung bei Gewebedestruktion und -restitution hin<sup>223</sup>. Die Produktion von SERPINA3 konnte sowohl in Hepatozyten, als auch in Epithelzellen der Lunge belegt werden. In bronchialen Epithelzellen sowie Adenokarzinomzellen der Lunge konnte gezeigt werden, dass die Produktion unter Einfluss von inflammatorischen Zytokinen erfolgt, hier besonders unter Mitwirkung von OSM<sup>61</sup>. Eine Studie von *Santamaria et al.* (2013) dokumentierte durch OSM eine Ausschüttung von SERPINA3 in Hepatozyten und eine gehemmte Proliferation von HCC-Zellen, die deren Differenzierung förderte<sup>315</sup>. SERPINB1, ein Monozyten Neutrophile Elastase Inhibitor, der in den Microarray-Experimenten dieser Arbeit 1,8-fach hochreguliert wurde, konnte vermehrt in Kolonmukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen werden, was für eine potentielle Bedeutung als Marker bei CED spricht und wiederum die Rolle von OSM in intestinaler Entzündung unterstreicht<sup>370</sup>.

Zusammengefasst lässt sich durch Beachtung aller Ergebnisse dieser Arbeit annehmen, dass das Zytokin OSM bei Entstehung und Aufrechterhaltung intestinaler Entzündung, insbesondere auch bei CED und Tumorgenese in intestinalen Epithelzellen eine Rolle spielt. Inwieweit es pro- oder antiinflammatorisch, apoptotisch- oder antiapoptotisch wirkt bleibt hier weiter unklar, sodass weitere in-vivo und in vitro-Studien angezeigt sind. Eine Möglichkeit hierzu wären u. a. weiterführende Versuche mittels OSM-*Knock-out*-Mäusen.

## **6. Klinische Bedeutung und Ausblick**

### **6.1. Oncostatin M bei der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Die Ätiologie von CED ist bislang nicht ins Detail geklärt. Konventionelle Therapieansätze bestehen in der Therapie mit antiinflammatorischen Stoffen wie z. B. Kortikosteroiden oder Mesalazin und/oder immunsuppressiven Stoffen wie z. B. Azathioprin, Methotrexat (MTX) oder Ciclosporin A.

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung der CED spielt neben genetischen Faktoren, mikrobieller Flora und Umweltfaktoren das Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen. Hier greifen Studien für neue Therapieansätze in der Behandlung der CED an, die insbesondere Patienten bei denen konventionelle Medikamente sich als nicht genügend wirksam erweisen, eine neue Perspektive bieten. So werden bei schweren oder therapieresistenten Verläufen *Biologicals* anwendet, biotechnologisch hergestellte Arzneistoffe wie Proteine oder Nukleinsäuren, die körpereigenen Substanzen gleichen. Hierzu zählen u. a. spezifisch hergestellte Antikörper/Fusionsproteine gegen proinflammatorische Zytokine wie z. B. TNF $\alpha$ , die bereits viele Jahre u. a. in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis, Psoriasis vulgaris und bei CED erfolgreich eingesetzt werden. So ist z. B. *Infliximab*, ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen TNF $\alpha$ , in Europa durch die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) für die Indikationen MC, CU, Psoriasis, Psoriasis-Arthritis, Spondylosis ankylosans und Rheumatoide Arthritis seit vielen Jahren zugelassen<sup>92</sup>. *Adalimumab*, ein humaner monoklonaler Antikörper gegen TNF $\alpha$ , ist für die Indikationen MC, CU, Psoriasis, Psoriasis-Arthritis, Spondylosis ankylosans, Rheumatoide Arthritis und Juvenile Rheumatoide Arthritis ebenfalls seit langem zugelassen<sup>92</sup>. *Golimumab*, ein weiterer humaner monoklonaler Antikörper gegen TNF $\alpha$ , ist bei CU, Spondylosis ankylosans, Rheumatoide Arthritis und Psoriasis-Arthritis in Europa zugelassen<sup>92</sup>. *Certolizumab*, ebenfalls zu den TNF $\alpha$ -Antikörpern zählend, ist in der Schweiz und Amerika für die Indikationen MC und RA zugelassen; in Europa wurde die Zulassung für *Certolizumab* aufgrund einer Nichtüberlegenheit gegenüber *Infliximab* und *Adalimumab* abgelehnt<sup>92, 96</sup>.

Des Weiteren wurden Studien zu Antikörpern gegen proinflammatorische Zytokine wie z. B. IL-6 als Therapieoption bei chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen veröffentlicht. Ein monoklonaler Anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper, MRA oder *Tocilizumab*

genannt, wurde in Studien bereits erfolgreich u. a. für die Behandlung der Rheumatoiden Arthritis oder MC eingesetzt. Dosisabhängig konnte unter dieser Therapie eine Reduktion der Krankheitsaktivität gezeigt werden<sup>58, 255, 263, 273</sup>. *Tocilizumab* blockt sowohl den klassischen Signalweg, als auch den „*Transsignalling*“-Weg; das s-gp-130-Protein blockt selektiv lediglich den „*Transsignalling*-Weg“<sup>238</sup>. Dieser Antikörper ist bisher für die Indikationen Juvenile Rheumatoide Arthritis und Rheumatoide Arthritis sowohl in den USA als auch in Europa zugelassen<sup>92, 96</sup>.

Daneben setzten Autoren verschiedener Studien auf die Verwendung antiinflammatorischer Zytokine wie z. B. IL-10. *Kühn et al.* (1993) zeigten, dass IL-10 defizierte Mäuse eine spontane chronische Enterokolitis, ähnlich dem MC, entwickelten<sup>180</sup>. *Olszak et al.* (2014) beschrieben im Mausmodell, dass epitheliale CD1d-Signale über die Aktivierung von STAT3 und STAT3-abhängiger Transkription von IL-10, Hitzeschockprotein 110 (HSP110) und CD1d selbst zur Protektion der intestinalen Mukosa führen und somit eine Rolle bei der intestinalen Inflammation spielen<sup>270</sup>. *Barbara et al.* (2000) konnten nachweisen, dass durch das Einbringen eines IL-10 Gens in Mäuse die Krankheitsaktivität verbessert wurde, was als Ansatz für neue Therapieoptionen in der Behandlung der CED gesehen werden kann<sup>15</sup>. Weitere klinische Studien bei MC-Patienten zeigten im Vergleich zur Placebogruppe durch subkutane Gabe von IL-10 keinen Einfluss auf die Remission der Erkrankung<sup>99, 329</sup>.

*Ustekinumab*, ein monoklonaler Antikörper gegen IL-12 und IL-23 wurde in Europa initial für die Indikationen Psooriasis und Psoriasis-Arthritis zugelassen<sup>92</sup>. Im September 2016 empfahl der Ausschuss der Humanarzneimittel der EMA die Marktzulassung für die Indikation des mittelschweren/schweren aktiven Morbus Crohn<sup>92</sup>.

Ebenfalls zu den *Biologicals* zählend wurde der JAK-Inhibitor *Tofacitinib* entwickelt, der in den USA 2012 für die Indikation der Rheumatoiden Arthritis zugelassen, in Europa jedoch für diese Indikation abgelehnt wurde<sup>92, 96</sup>.

Daneben wurden  $\alpha$ 4-Integrin-Inhibitoren wie *Natalizumab* 2006 in Europa und den USA für die Indikation Multiple Sklerose zugelassen, die Zulassung für MC 2008 in Europa wurde dagegen augrund schwerer ZNS-Nebenwirkungen abgelehnt; dafür wurde der darmspezifische  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin-Inhibitor *Vedolizumab* im Mai 2014 sowohl für die Indikationen CU als auch MC in Europa zugelassen<sup>92, 96</sup>.

Zudem konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass MMPs und TIMPs eine bedeutende Rolle bei Patienten mit CED spielen, was daran denken lässt über die Inhibierung der MMPs eine Regression der Erkrankung zu bewirken. In mehreren Studien

wurde vor diesem Hintergrund untersucht, ob die Inhibierung von MMPs als therapeutischer Ansatz genutzt werden kann<sup>176, 228, 357</sup>. So zeigten *Medina et al.* (2001) in einem Rattenmodell, in dem eine Kolitis mittels Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) oder Dextranodiumsulfat (DSS) induziert wurde, einen Rückgang der intestinalen Gewebeschädigung durch Phenantrolin, einen Zink-Chelator, der zur Inhibierung der MMPs führte<sup>228</sup>. Für die Verwendung von Immunsuppressiva wie Azathioprin, Kortikosteroiden, Methothrexat und Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Therapien bei Patienten mit MC konnte ein Rückgang der Expression von MMP-9 und MMP-26 belegt und die Krankheitsaktivität beeinflusst werden<sup>214</sup>. Erst kürzlich wurde hierzu in einer Multicenter-Phase II/III-Studie *GS-5745*, ein monoklonaler Antikörper gegen Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9), der an MMP-9 bindet und dessen Enzymaktivität inhibiert, bei Patienten mit moderater bis schwerer Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich zu Placebo gestestet; die Studien wurden aufgrund von fehlender oder inadäquater Effektivität von *GS-5745* Ende des Jahres 2016 jedoch eingestellt.

Gegebenenfalls kann hier an die Verwendung des Zytokins Oncostatin M, das zur Hochregulation von TIMP-1 und weniger von MMP-3 führt, als Ansatz für Studien bzgl. weiterer Therapieoptionen der CED gedacht werden.

In Studien zur Rheumatoiden Arthritis wurde durch OSM eine vermehrte Zerstörung von Knorpel dokumentiert<sup>98, 156, 222</sup>. Mit diesem Hintergrundwissen untersuchten *Plater-Zyberk et al.* (2001) die Wirkung von Antikörpern gegen OSM im Mausmodell bei Kollagen-induzierter Arthritis. Es konnte gezeigt werden, dass die Mäuse, die mit OSM-Antikörpern behandelt wurden eine signifikante Reduktion der Zellinfiltration des Synoviums und eine verminderte Knorpeldestruktion aufwiesen<sup>280</sup>, sodass hier OSM-Antikörper erstmals als potentieller neuer Therapieansatz bei chronisch entzündlichen Erkrankungen gelten können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass OSM als Mitglied der IL-6-Familie bei Entstehung, Aufrechterhaltung und Beendigung intestinaler Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Ob es nun als vorwiegend anti-inflammatoryisches oder pro-inflammatoryisches Zytokin im Gastrointestinaltrakt gesehen werden kann, werden weitere Studien zeigen müssen. Hier kann jedoch ein möglicher Ansatzpunkt für neue Therapieoptionen ähnlich der Anwendung der TNF $\alpha$ -Inhibitoren liegen.

## **7. Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war es die Bedeutung des OSM/OSMR-Zytokin-Rezeptorkomplexes in intestinalen Epithelzellen und im Besonderen bei Entzündungsreaktionen im Intestinaltrakt zu analysieren. Hierzu lag uns eine Studie von *Sanchez et al.* vor, die 2003 durch einen Transfer von Adenoviren, die mit einem murinen OSM-Gen versetzt waren, bei Mäusen mit DSS-induzierter Colitis eine Suppression der intestinalen Entzündung nachwies, während es bei Oxazolone-induzierter Colitis zu einem weiteren Aufflammen der Entzündung im Colon kam<sup>310</sup>.

In Western-Blot-Experimenten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Rezeptoruntereinheiten OSMR- $\beta$ , LIFR und gp-130 in unterschiedlichen intestinalen Epithelzelllinien exprimiert werden. Dies konnte durch Untersuchungen mittels RT-PCR und Fluoreszenzexperimenten bestätigt werden.

In ELISA-Experimenten konnte nach Stimulation mit OSM in IEC eine Hochregulation der an Inflammationreaktionen beteiligten Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  festgestellt werden. Zudem führte die Stimulation von OSM zur gesteigerten Expression der Matrixmetalloproteininasen MMP-3 und TIMP-1 in IEC.

Im Hinblick auf die biologischen Funktionen des Zytokins konnte belegt werden, dass durch OSM die Zellmigration und -proliferation in IEC gesteigert wird, was in der Barrierefunktion und bei entzündlichen Prozessen im Intestinum eine Rolle spielt. Dies konnte durch Verwendung des ERK1/2-Inhibitor und STAT3 siRNA negativ beeinflusst werden.

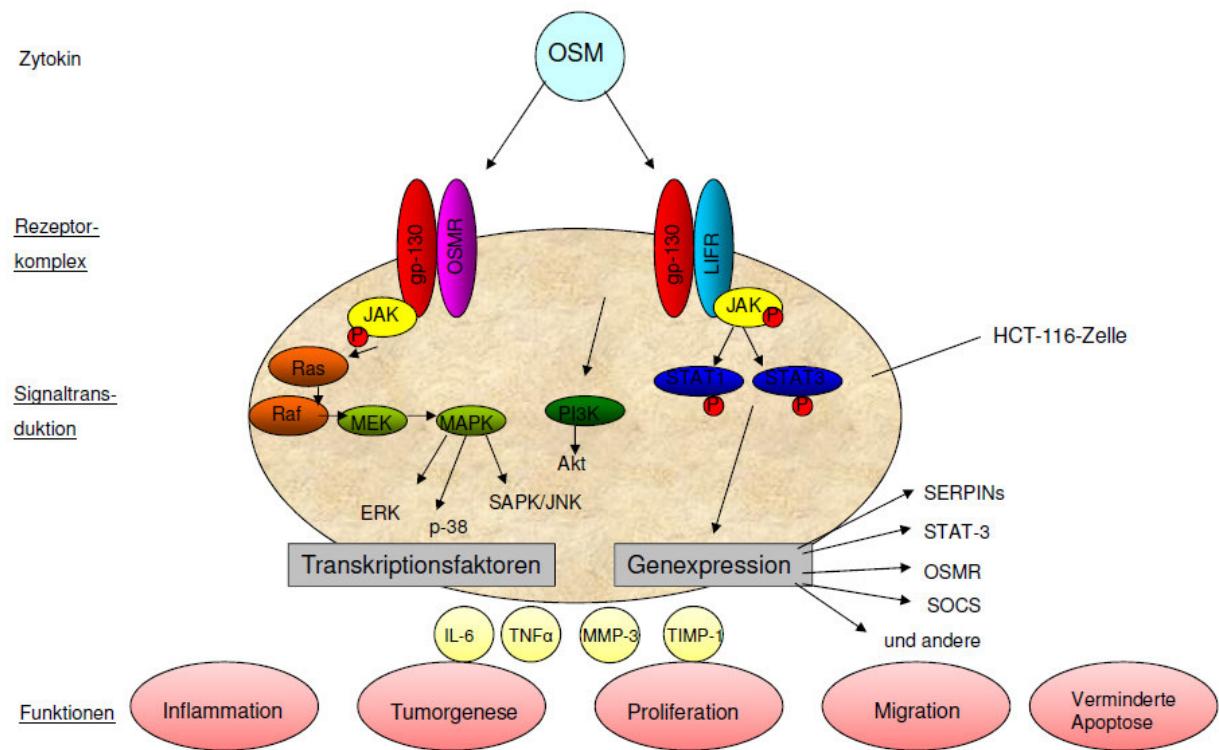
Zudem konnte in ELISA-Experimenten eine verminderte Apotoseinduktion nachgewiesen werden, was u. a. für die Karzinogenese bedeutend ist.

In Western-Blot-Experimenten wurde durch die Stimulation der intestinalen HCT116-Epithelzellen mit OSM zeitabhängig eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 und SAPK/JNK, der PI3-Kinase Akt und von STAT1 und STAT3 erreicht, die zur Aktivierung der Signalwege führt; in HT-29-Zellen erfolgte nach OSM-Stimulation die Phosphorylierung von SAPK/JNK und Akt.

In Microarray-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von IEC mit OSM zur Hochregulation verschiedener Gene wie z. B. Serpine, STAT3, SOCS und OSMR führt, die bei CED mitbeteiligt sind. Bezüglich der molekularen Funktionen wurde eine Hochexpression für Gene in der Unterkategorie der Transkriptionsfaktoren nachgewiesen. Im

Bereich der biologischen Prozesse konnte eine signifikante Hochregulation der Gene für Immunität und Abwehr, Apoptose und die JAK/STAT-Kaskade detektiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Abbildung 26 zusammengefasst.



**Abb. 26: Zusammenfassung der Experimente dieser Arbeit.**

Die HCT116-Zellen exprimieren die Rezeptoruntereinheiten gp-130, OSMR und LIFR. Durch die Stimulation mit dem Zytokin Oncostatin M kommt es zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK und SAPK/JNK, der Phosphoinositol-3-Kinase Akt und von STAT-1 und STAT-3. Durch die Stimulation mit OSM in HCT116-Zellen kommt es zu einer gesteigerten Expression von TNF- $\alpha$ , IL-6, TIMP-1 und MMP-3. Zudem führt OSM zu einer gesteigerten Proliferation, Migration und zu verminderter Apoptose, was im Rahmen von Entzündungsreaktionen und der Tumogenese im Intestinaltrakt eine Rolle spielt.

## 8. Literaturverzeichnis

- 1) Abreu MT, Arnold ET, Chow JY, Barrett KE. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways oppose Fas-induced apoptosis and limit chloride secretion in human intestinal epithelial cells. Implications for inflammatory diarrheal states. *J Biol Chem* 2001. 276(50): 47563-74
- 2) Ahirwar DK, Kesarwani P, Singh R, Ghoshal UC, Mittal RD. Role of Tumor Necrosis Factor- Alpha (C863A) Polymorphism in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease in Northern India. *J Gastrointest Cancer* 2011. 43(2): 196-204
- 3) Ahmed ST, Darnell JE Jr. Serpin B3/B4, Activated by STAT3, Promote Survival of Squamous Carcinoma Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009. 378(4):821-5
- 4) Ahn HJ, Kim JY, Ryu KJ, Nam HW. STAT6 activation by *Toxoplasma gondii* infection induces the expression of Th1 C-C chemokine ligands and B clade serine protease inhibitors in macrophages. *Parasitol Res* 2009. 105(5): 1445-53
- 5) Alexander WS, Starr R, Metcalf D, Nicholson SE, Farley A, Elefanti AG, Brysha M, Kile BT, Richardson R, Baca M, Zhang JG, Willson TA, Viney EM, Sprigg NS, Rakar S, Corbin J, Mifsud S, DiRago L, Cary D, Nicola NA, Hilton DJ. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 1999. 66(10): 588-592
- 6) Amaral MC, Miles S, Kumar G, Nel AE. Oncostatin-M stimulates tyrosine protein phosphorylation in parallel with the activation of p42MAPK/ERK-2 in Kaposi's cells. Evidence that this pathway is important in Kaposi cell growth. *J Clin Invest* 1993. 92(2): 848-57
- 7) Anderson P. Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997. 61(1): 33-46
- 8) Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001. 344(11): 808-14.
- 9) Arenzana-Seisdedos F, Teyton L, Virelizier JL. Immunoregulatory mediators in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1987. 66:13-7
- 10) Auernhammer CJ, Isele NB, Kopp FB, Spoettl G, Cengic N, Weber MM, Senaldi G, Engelhardt D. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (Cardiotrophin-like cytokine) stimulates corticotroph function via a signal transducer and activator of transcription- dependent mechanism negatively regulated by suppressor of cytokine signalling-3. *Endocrinology* 2003. 144(4): 1202-10
- 11) Autschbach F, Schürmann G, Quiao L, Merz H, Wallich R, Meuer SC. Cytokine messenger RNA expression and proliferation status of intestinal mononuclear cells in noninflamed gut and Crohn's disease. *Virchows Arch* 1995. 426(1): 51-60
- 12) Baker BJ, Quin H, Benvenist EN. Molecular basis of Oncostatin M- induced SOCS-3 expression in astrocytes. *Glia* 2008. 56(11): 1250-62
- 13) Baker EA, Bergin FG; Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 2000. 87(9):1215-21
- 14) Bando T, Morikawa Y, Komori T, Senba E. Complete overlap of interleukin-31 receptor A and oncostatin M receptor beta in the adult dorsal root ganglia with distinct developmental expression patterns. *Neuroscience* 2006. 142(4): 1263-71

- 15) Barbara G, Xing Z, Hogaboam CM, Gauldie J, Collins SM. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* 2000. 46: 344- 349
- 16) Battle TE, Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2002. 2(4): 381-92
- 17) Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ, Evans GS. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999. 117(4): 814-22
- 18) Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004. 21: 491-501
- 19) Beigel F, Steinborn A, Schnitzler F, Tillack C, Breiteneicher S, John JM, Van Steen K, Laubender RP, Göke B, Seiderer J, Brand S, Ochsenkühn T. Risk of malignancies in patients with inflammatory bowel disease treated with thiopurines or anti-TNF alpha antibodies. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2014. 23(7): 735-44
- 20) Bellido T, Stahl N, Farruggella TJ, Borba V, Yancopoulos GD, Manolagas SC. Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukaemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1996. 97(2): 431-7
- 21) Benko S, Magalhaes JG, Philpott DJ, Girardin SE. NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways. *J Immunol* 2012. 185(3): 1681-91
- 22) Bernard C, Merval R, Lebret M, Delerive P, Dusanter-Fourt I, Lehoux S, Crémillon C, Staels B, Maclouf J, Tedgui A. Oncostatin M induces interleukin-6 and cyclooxygenase-2 expression in human vascular smooth muscle cells: synergy with interleukin-1 beta. *Circ Res* 1999. 85(12): 1124-31
- 23) Bezabeh S, Flowers Cm, Kortepeter C, Avigan M. Clinically significant liver injury in patients treated with natalizumab. *Aliment Pharmacol Ther* 2010. 31(9): 1028-35
- 24) Bilsborough J, Mudri S, Chadwick E, Harder B, Dillon SR et al. IL-31 receptor (IL-31RA) knockout mice exhibit elevated responsiveness to oncostatin M. *J Immunol* 2010. 185(10): 6023-30
- 25) Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, Nebelsiek T, Lundgren-May T, Canli O, Schwitalla S, Matthews V, Schmid RM, Kirchner T, Arkan MC, Ernst M, Greten FR. Gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009. 15(2): 91-102
- 26) Boniface K, Diveu C, Morel F, Pedretti N, Froger J, Ravon E, Garcia M, Venereau E, Preisser L, Guignouard E, Guillet G, D'agregorio G, Pène J, Moles JP, Yssel H, Chevalier S, Bernard FX, Gascan H, Lecron JC. Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J Immunol* 2007. 178(7): 4615-22
- 27) Bosani M, Ardizzone S, Porro GB. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Biologics* 2009. 3: 77-97
- 28) Boulton TG, Stahl N, Yancopoulos GD. Ciliary Neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin-6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem* 1994. 269(15): 11648-55
- 29) Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010. 20(3): 161-8

- 30) Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992. 339(8785): 89-91
- 31) Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, et al. CXCR4 und CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 2005. 310: 117-130
- 32) Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006. 290: G827-838
- 33) Brand S, Olszak T, Beigel F, Diebold J, Otte JM, et al. Cell differentiation dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2, SAPK/JNK, and Akt signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells. *J Cell Biochem* 2006. 97: 709-723
- 34) Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Dambacher J, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Crispin A, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T. The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005. 11(7): 645-52
- 35) Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1994. 106(6):1455-66
- 36) Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000. 1477(1-2): 267-83
- 37) Brounais B, David E, Chipoy C, Trichet V, Ferré V, Charrier C, Duplomb L, Berreur M, Rédini F, Heymann D, Blanchard F. Long term Oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells. *Bone* 2009. 44(5): 830-9
- 38) Brown TJ, Lioubin MN, Marquardt H. Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells. *J Immunol* 1987. 139(9): 2977-83
- 39) Brown TJ, Rowe JM, Liu JW, Shoyab M. Regulation of IL-6 expression by oncostatin M. *J Immunol* 1991. 147(7): 2175-80
- 40) Broxmeyer HE, Li J, Hangoc G, Cooper S, Tao W, Mantel C, Graham-Evans B, Ghilardi N, de Sauvage FJ. Regulation of myeloid progenitor cell proliferation/survival by IL-31 receptor and IL-31. *Exp Hematol* 2007. 35(4 Suppl 1): 78-86
- 41) Bruce AG, Linsley PS, Rose TM. Oncostatin M. *Prog Growth Factor Res* 1992; 4(2):157-70
- 42) Buchan G, Barrett K, Turner M, Chantry D, Maini RN, Feldmann M. Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1  $\alpha$ . *Clin exp Immunol* 1988. 73: 449-455
- 43) Calabrese F, Lunardi F, Balestro E, Marulli G, Perissinotto E, Loy M, Nannini N, Valente M, Saetta M, Agostini C, Rea F. Serpin B4 isoform overexpression is associated with aberrant epithelial proliferation and lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pathology* 2012. 44(3): 192-8

- 44) Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1097-104
- 45) Castenada FE, Walia B, Vijay-Kumar M, Patel NR, Roser S, Kolachala VL, Rojas M, Wang L, Oprea G, Garg P, Gewirtz AT, Roman J, Merlin D, Sitaraman SV. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology* 2005; 129(6): 1991-2008
- 46) Chalaris A, Garbers C, Rabe B, Rose-John S, Scheller J. The soluble Interleukin-6 receptor: Generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol* 2011; 90(6-7): 484-94
- 47) Chalaris A, Schmidt-Arras D, Yamamoto K, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2012; 30(5): 492-9
- 48) Chan SS, Luben R, van Schaik F, Oldenburg B, Bueno-de-Mesquita HB, Hallmans G, Karling P, Lindgren S, Grip O, Key T, Crowe FL, Bergmann MM, Overvad K, Palli D, Malsala G, Khaw KT, Racine A, Carbonnel F, Boutron-Ruault MC, Olsen A, Tjonneland A, Kaaks R, Tumino R, Trichopoulou A, Hart AR. Carbohydrate intake in the etiology of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20(11): 2013-21
- 49) Chattopadhyay S, Tracy E, Liang P, Robledo O, Rose-John S, Baumann H. Interleukin-31 and Oncostatin-M mediate distinct signalling reactions and response patterns in lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2007; 282(5): 3014-26
- 50) Chen HC, Ma HI, Sytwu HK, Wang HW, Chen CC, Liu SC, Chen CH, Chen HK, Wang CH. Neural stem cells secrete factors that promote auditory cell proliferation via a leukaemia inhibitory factor signaling pathway. *J Neurosci Res* 2010; 88(15): 3308-18
- 51) Cheung PF, Wong CK, Ho AW, Hu S, Chen DP, Lam CW. Activation of human eosinophils and epidermal keratinocytes by Th2 cytokine IL-31: implication for the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Int Immunol* 2012; 22(6): 453-67
- 52) Chevalier S, Fourcin M, Robledo O, Wijdenes J, Pouplard-Barthelaix A, Gascan H. Interleukin-6 family of cytokines induced activation of different functional sites expressed by gp130 transducing protein. *J Biol Chem* 1996; 271(25): 14764-72
- 53) Chioldini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer WR Jr, Couto JA. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 1984; 20(5): 966-71
- 54) Chipoy C, Brounais B, Trichet V, Battaglia S, Berreut M, Oliver L, Juin P, Rémini F, Heymann D, Blanchard F. Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by Oncostatin M depends on STAT5 and p53. *Oncogene* 2007; 26(46): 6653-64
- 55) Cho YG, Chang X, Park IS, Yamashita K, Shao C, Ha PK, Pai SI, Sidransky D, Kim MS. Promoter methylation of leukaemia inhibitory factor receptor gene in colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2011; 39(2): 337-44
- 56) Chodorowska G, Glowacka A, Tomczyk M. Leukemia inhibitory factor (LIF) and its biological activity. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med* 2004; 59(2): 189-93
- 57) Choi PM, Zelig MP. Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention. *Gut* 1994; 35(7): 950-4

- 58) Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Hazleman B, Price R, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T, Panayi GS. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum* 2002. 46(12): 3143-50
- 59) Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 1997. 278(5344): 1803-5
- 60) Chung SJ, Kwon YJ, Park MC, Park YB, Lee SK. The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Yonsei Med J* 2011. 52(1): 113-20
- 61) Cichy J, Potempa J, Chawla RK, Travis J. Stimulatory effect of inflammatory cytokines on alpha 1-antichymotrypsin expression in human lung-derived epithelial cells. *J Clin Invest* 1995. 95(6): 2729-33
- 62) Classen M., Diehl V., Kochsiek K., Innere Medizin, 6. Auflage, Urban und Fischer Verlag 2009, ISBN: 9-783437428319
- 63) Cooney R, Jewell D. The genetic basis of inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2009. 27(4): 428-42
- 64) Cornelissen C, Lüscher-Firzlaff J, Baron JM, Lüscher B. Signaling by IL-31 and functional consequences. *Eur J Cell Biol* 2011. 91(6-7): 552-66
- 65) Cox JH, Kljavin NM, Ramamoothri N, Diehl L, Batten M, Ghilardi N. IL-27 promotes T cell-dependent colitis through multiple mechanisms. *J Exp Med* 2011. 208(1): 115-23
- 66) Crabé S, Guay-Giroux A, Tormo AJ, Culuc D, Lissila R, Guilhot F, Mavoungou-Bigouagou U, Lefouili F, Cognet I, Ferlin W, Elson G, Jeannin P, Gauchat JF. The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling. *J Immunol* 2009. 183: 7692-7702
- 67) Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 2000. 256(1): 34-41
- 68) Cummings, JR, Cooney R, Pathan S, Anderson CA, Barret JC, Beckly J, Geremia A, Hancock L, Guo C, Ahmad T, Cardon LR, Jewell DP. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007. 13(8): 941-6
- 69) Dagoneau N, Scheffer D, Huber C, Al-Gazali LI, Di Rocco M, Godard A, Martinovic J, Raas-Rothschild A, Sigaudy S, Unger S, Nicole S, Fontaine B, Taupin JL, Moreau JF, Superti-Furga A, Le Merrer M, Bonaventure J, Munnoch A, Legeai-Mallet L, Cormier-Daire V. Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome. *Am J Hum Genet* 2004. 74(2): 298-305
- 70) Dambacher J, Beigel F, Seiderer J, Haller D, Göke B, Auernhammer CJ, Brand S. Interleukin 31 mediates MAP kinase and STAT1/3 activation in intestinal epithelial cells and its expression is upregulated in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007. 56(9): 1257-65
- 71) Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, De Toni EN, Göke B, Diepolder HM, Auernhammer CJ, Brand S. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 2009. 58(9): 1207-17
- 72) Dann SM, Spehlmann ME, Hammond DC, Iimura M, Hase K, Choi LJ,

- Hanson E, Eckmann L. IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. *J Immunol* 2008. 180(10): 6816-26
- 73) David E, Guihard P, Brounais B, Riet A, Charrier C, Battaglia S, Gouin F, Ponsolle S, Bot RL, Richards CD, Heymann D, Rédini F, Blanchard F. Direct anti-cancer effect of oncostatin M on chondrosarcoma. *Int J Cancer* 2011. 128(8): 1822-35.
- 74) Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 1991. 253(5015): 59-63
- 75) DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, Friedman B, McClain J, Pan L, Stahl N, Ip NY, Yancopoulos GD. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 1995. 83(2): 313-322
- 76) DeKoning PJ, Kummer JA, de Poot SA, Quadir R, Broekhuizen R, McGettrick AF, Higgins WJ, Devreese B, Worrall DM, Bovenschen N. Intracellular serine protease inhibitor SERPINB4 inhibits granzyme M-induced cell death. *PLoS One* 2011. 6(8): e22645
- 77) Deller MC, Hudson KR, Ikemizu S, Bravo J, Jones EY, Heath JK. Crystal Structure and functional dissection of the cytostatic cytokine Oncostatin M. *Structure* 2000. 8(8): 863-874
- 78) Deng G, Kakar S, Okudiara K, Choi E, Sleisenger MH, Kim YS. Unique methylation pattern of oncostatin M receptor gene in cancers of colorectum and other digestive organs. *Clin Cancer Res* 2009. 15(5): 1519-26
- 79) Dieckgraefe BK, Weems DM, Santoro SA, Alpers DH. ERK and p38 MAP kinase pathways are mediators in intestinal wound-induced signal-transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 1997. 233 (2): 389-94
- 80) Diegelmann J, Olszak T, Goke B, Blumberg RS, Brand S. A novel role for IL-27 as mediator of intestinal epithelial barrier protection mediated via differential STAT signaling and induction of antibacterial and anti-inflammatory proteins. *J Biol Chem* 2012. 2: 286-298
- 81) Digestive Disease Week 2012: A SPECIAL MEETING REVIEW EDITION: Highlights in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: Digestive Disease Week 2012 May 19-22, 2012 • San Diego, California Special Reporting on:• Safety and Efficacy of Subcutaneous Golimumab Induction Therapy in Patients with Moderately to Severely Active UC: PURSUIT-SC• The Future of IBD Therapy: Individualized and Optimized Therapy and Novel Mechanisms• Infliximab Concentration and Clinical Outcome in Patients with UC• Vedolizumab Induction Therapy for UC: Results of GEMINI I, A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind, Multicenter, Phase III Trial• Novel Infliximab and Antibody-to-Infliximab Assays Are Predictive of Disease Activity in Patients with CD• Accelerated Step-Care Therapy with Early Azathioprine Versus Conventional Step-Care Therapy in CD• PIANO: A 1,000-Patient Prospective Registry of Pregnancy Outcomes in Women with IBD Exposed to Immunomodulators and Biologic TherapyPLUS Meeting Abstract Summaries With Expert Commentary by: William J. Sandborn, MDChief of the Division of Gastroenterology Director of the UCSD IBD Center UC San Diego Health System La Jolla, California. *Gastroenterol Hepatol (NY)* 2012. 8:1-24
- 82) Dimitriadis E, Stoikos C, Tan YL, Salamonsen LA. Interleukin 11 signaling components signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and

- suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) regulate human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* 2006. 147(8): 3809-17
- 83) Diveu C, Venereau E, Froger J, Ravon E, Grimaud L, Rousseau F, Chevalier S, Gascan H. Molecular and functional characterization of a soluble form of Oncostatin M/interleukin-31 shared receptor. *J Biol Chem* 2006. 281(48): 36673-82
- 84) Docena G, Rovedatti L, Kruidenier L, Fanning A, Leakey NA, Knowles CH, Lee K, Shanahan F, Nally K, McLean PG, Di Sabatino A, MacDonald TT et al. Down-regulation of p38-mitogen activated protein kinase activation and proinflammatory cytokine production by mitogen-activated protein kinase inhibitors in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2010. 162(1): 108-15
- 85) Douglas AM, Grant SL, Goss GA, Clouston DR, Sutherland RL, Begley CG. Oncostatin M induces the differentiation of breast cancer cells. *Int J Cancer* 1998. 75(1): 64-73
- 86) Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006. 314(5804): 1461-3
- 87) Duhé RJ, Farrar WL. Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword. *J Interferon Cytokine Res* 1998. 18(1): 1-15
- 88) Dumas A, Lagarde S, Laflamme C, Pouliot M. Oncostatin M decreases interleukin-1 beta secretion by human synovial fibroblasts and attenuates an acute inflammatory reaction in vivo. *J Cell Mol Med* 2011. 16: 1274-1285
- 89) Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001. 48: 526-35
- 90) Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987. 6(7): 1899-904
- 91) Elson GC, Lelièvre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, Suard I, de Coignac AB, Delneste Y, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Gascan H. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 2000. 3(9): 867-72
- 92) EMA; Europäische Arzneimittelagentur: [www.ema.europa.eu/ema](http://www.ema.europa.eu/ema)
- 93) Ennas MG, Moore PS, Zucca M, Angelucci E, Cabras MG, Melis M, Gabbas A, Serpe R, Madeddu C, Scarpa A, Cocco P. Interleukin-1B (IL1B) and interleukin-6 (IL6) gene polymorphisms are associated with risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol Oncol* 2008. 26(2): 98-103
- 94) Ezzat MH, Hasan ZE, Shaheen KY. Serum measurement of interleukin-31 (IL-31) in paediatric atopic dermatitis: elevated levels correlate with severity scoring. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011. 25(3): 334-9
- 95) Farrell RJ, LaMont JT. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007. 56(9): 1240-7
- 96) FDA: Food and Drug Administration Information for Healthcare Professionals: Tumor Necrosis Factor (TNF) Blockers (marketed as Remicade, Enbrel, Humira, Cimzia, and Simponi) URL:  
<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPa>

- [tientsandProviders/DrugSafetyInformationforHealthcareProfessionals/ucm174474.htm](http://www.fda.gov/Drugs/ForPatients/InformationForHealthcareProviders/ucm174474.htm)
- 97) Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel JF, Sandborn WJ, Van Assche G, Axler J, Kim HJ, Danese S, Fox I, Milsch C, Sankoh S, Wyant T, Xu J, Parikh A; GEMINI 1 Study Group. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2013. 369(8):669-710
- 98) Fearon U, Mullan R, Markham T, Connolly M, Sullivan S, Poole AR, FitzGerald O, Bresnihan B, Veale DJ. Oncostatin M induces angiogenesis and cartilage degradation in rheumatoid arthritis synovial tissue and human cartilage cocultures. *Arthritis Rheum* 2006. 54(10): 3152-62
- 99) Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, Hanauer SB, Kilian A, Cohard M, LeBeaut A, Feagan B. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000. 119(6): 1473-82
- 100) Felder JB, Korelitz BI, Rajapakse R, Schwarz S, Horatagis AP, Gleim G. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2000. 95(8): 1949-54
- 101) Ford AC, Bernstein CN, Khan KJ, Abreu MT, Marshall JK, Talley NJ, Moayyedi P. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011. 106(4): 590-9
- 102) Fourcin M, Chevalier S, Lebrun JJ, Kelly P, Pouplard A, Wijdenes J, Gascan H. Involvement of gp130/interleukin-6 receptor transducing component in interleukin-11 receptor. *Eur J Immunol* 1994. 24(1): 277-80
- 103) Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Devière J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative Colitis. *Gut* 2004. 53(7):987-92
- 104) Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma Rk, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawzak M, Vatn MH, IBSEN study group, Mathew CG, Schreiber S. Sequence variants in IL-10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 2008. 40(11):1319-23
- 105) Friedrich M, Hoss N, Stögbauer F, Senner V, Paulus W, Ringelstein EB, Halfter H. Complete inhibition of in vivo glioma growth by oncostatin M. *J Neurochem* 2001. 76(5): 1589-92
- 106) Fritz DK, Kerr C, Fattouh R, Llop-Guevara A, Khan WI, Jordana M, Richards CD. A mouse model of airway disease: Oncostatin M-induced pulmonary eosinophilia, goblet cell hyperplasia, and airway hyperresponsiveness are STAT6 dependent, and interstitial pulmonary fibrosis is STAT6 independent. *J Immunol* 2011. 186(2):1107-18
- 107) Fulciniti M, Hideshima T, Vermot-Desroches C, Pozzi S, Nanjappa P, Shen Z, Patel N, Smith ES, Prabhala R, Tai Y, Tassone P, Anderson KC, Munshi NC. A high-affinity fully human anti-IL-6 mAB(OP-R003-1, 1339) for the treatment of Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2009. 15(23): 7144-7152
- 108) Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vezina A, Vachon PH. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001. 280(6): C1540-54

- 109) Geisterfer M, Richards CD, Gauldie J. Cytokines Oncostatin M and interleukin 1 regulate the expression of the IL-6 receptor (gp80, gp130). *Cytokine* 1995. 7(6): 503-9
- 110) Gillen CD, Andrews HA, Prior P, Allan RN. Crohn's disease and colorectal cancer. *Gut* 1994. 35(5): 651-5
- 111) Giovannini M, Djabali M, McElligott D, Selleri L, Evans GA. Tandem linkage of genes coding for leukaemia inhibitory factor (LIF) and oncostatin M (OSM) on human chromosome 22. *Cytogenet Cell Genet* 1993. 64(3-4): 240-4
- 112) Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Török HP, Schmechel S, Tonenchi L, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S, Maier K, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Folwaczny M, Mussak T, Brand S. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS One* 2007. 2(9):e819
- 113) Glas J, Konrad A, Schmechel S, Dambacher J, Seiderer J, Schroff F, Wetzke M, Roeske D, Török HP, Tonenchi L, Pfennig S, Haller D, Griga T, Klein W, Epplen JT, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Mussack T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol* 2008. 103(3): 682-91
- 114) Glas J, Seiderer J, Bues S, Stallhofer J, Fries C, Olszak T, Tsekeri E, Wetzke M, Beigel F, Steib C, Friedrich M, Göke B, Diegelmann J, Czamara D, Brand S. IRGM variants and susceptibility to inflammatory bowel disease in German population. *PLoS One* 2013. 8(1): e54338
- 115) Glesner MK, Ociás LF, Larsen TS, Pedersen C. Primary CNS lymphoma in a patient treated with azathioprine. *BMJ Case Rep* 2014
- 116) Gniadecki R, Kragballe K, Dam TN, Skov L. Comparison of drug survival rates for adalimumab, etanercept and infliximab in patients with psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol* 2011. 164(5): 1091-6
- 117) Godoy-Tundidor S, Cavarretta IT, Fuchs D, Fiechtner H, Friedbichler K, Bartsch G, Hobisch A, Culig Z. Interleukin-6 and Oncostatin m stimulation of proliferation of prostate cancer 22Rv1 cells through the signaling pathways of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Prostate* 2005. 64(2): 209-16
- 118) Gordon JN, Pickard KM, Di Sabatino A, Prothero JD, Pender SL, Goggin PM, MacDonald TT. Matrix metalloproteinase-3 production by gut IgG plasma cells in chronic inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008. 14(2): 195-203
- 119) Gottrup-Wolfers E, Moeller J, Karbach U, Müller-Lissner S, Endres S. Elevated cell-associated levels of interleukin 1beta and interleukin 6 in inflamed mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 1996. 26(2): 115-22
- 120) Grant SL, Hammacher A, Douglas AM, Goss GA, Mansfield RK, Heath JK, Begley CG. An unexpected biochemical and functional interaction between gp130 and the EGF receptor family in breast cancer cells. *Oncogene* 2002. 21(3): 460-74
- 121) Greenhalgh CJ, Hilton DJ. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leucoc Biol* 2001. 70(9): 348-356
- 122) Grimm MC, Elsbury SKO, Pavli P, Doe WF. Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996. 38: 90-98

- 123) Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009. 15(2): 103-13
- 124) Gross V, Andus T, Leser HG, Roth M, Schölmerich J. Inflammatory mediators in chronic inflammatory bowel diseases. *Klin Wochenschr* 1991. 69 (21-23): 981-7
- 125) Guagnazzi D, Lucendo AJ. Anemia in inflammatory bowel disease: a neglected issue with relevant effects. *World J Gastroenterol* 2014. 20(13): 3542-51
- 126) Guerra I, Algaba A, Pérez-Calle JL, Chaparro M, Marín-Jiménez I, García-Castellanos R, González-Lama Y, López-Sanromán A, Manceñido N, Martínez-Montiel P, Quintanilla E, Taxonera C, Villafruela M, Romero-Maté A, López-Serrano P, Gisbert JP, Bermejo F. Induction of psoriasis with anti-TNF agents in patients with inflammatory bowel disease: a report of 21 cases. *J Crohns Colitis* 2012. 6(5): 518-23
- 127) Guo Y, Nemeth J, O'Brien C, Susa M, Liu X, Zhang Z, Choy E, Mankin H, Hor nicek F, Duan Z. Effects of siltuximab on the IL-6-induced signaling pathway in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2010. 16(23): 5759-69
- 128) Haddley K. Vedolizumab for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drugs Today (Barc)* 2014. 50(4): 309-19
- 129) Halfter H, Stögbauer F, Friedrich M, Serve S, Serve H, Ringelstein EB. Oncostatin M-mediated growth inhibition of human glioblastoma cells does not depend on stat3 or on mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 2000. 75(3): 973-81
- 130) Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsl er R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genom-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007. 39(2): 207-11
- 131) Hart AR, Luben R, Olsen A, Tjonneland A, Linseisen J, Nagel G, Berglund G, Lindgren S, Grip O, Key T, Appleby P, Bermann MM, Boeing H, Hallmans G, Danielsson A, Palmqvist R, Sjödin H, Hagglund G, Overvad K, Palli D, Masala G, Riboli E, Kennedy H, Welch A, Khaw KT, Day N, Bingham S. Diet in the aetiology of ulcerative colitis: a European prospective cohort study. *Digestion* 2008. 77(1):57-64
- 132) Hasty KA, Reife RA, Kang AH, Stuart JM. The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 1990. 33(3): 388-97
- 133) Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, Shiomi T, Matsusaka H, Kubota T, Imanaka-Yoshida K, Itoh T, Takeshita A. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodelling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003. 285(3): H1229-35
- 134) Hayden DM, Forsyth C, Keshavarzian A et al. The role of Matrix Metalloproteinases in intestinal Epithelial Wound Healing During Normal and Inflammatory States. *J Surg Res* 2011. 168(2): 315-24
- 135) Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve I. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998. 334(2): 297-314

- 136) Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of Interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003. 374(1): 1-20
- 137) Heliö T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, Färkkilä M, Krusius T, Kontula K. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003. 52(4): 558-62
- 138) Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, Schönbeck U. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001. 107(9): 1117-26
- 139) Hermanns HM, Radtke S, Haan C, Schmitz-Van de Leur H, Tavernier J, Heinrich PC, Behrmann I. Contributions of leukaemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with glycoprotein 130. *J Immunol* 1999. 163(12): 6651-8
- 140) Hermanns HM, Radtke S, Schaper F, Heinrich PC, Behrmann I. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J Biol Chem* 2000. 275(52): 40742-8
- 141) Herold G., Innere Medizin, 6. ergänzte Auflage, Verlag Arzt + Information, ISBN:3-9807384-3-4
- 142) Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SL. Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000. 47(1):57-62
- 143) Hibi K, Goto T, Sakuraba K, Shirahata A, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y. Methylation of OSMR gene is frequently observed in non-invasive colorectal cancer. *Anticancer Res* 2011. 31(4): 1293-5
- 144) Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 1996. 74(1): 1-12
- 145) Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp-130. *Cell* 1990. 63(6): 1149-57
- 146) Higgins LM, Frankel G, Douce G, Dougan G, MacDonald TT. Citrobacter rodentium infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 1999. 67(6): 3031-9
- 147) Hintzen C, Evers C, Lippok BE, Volkmer R, Heinrich PC, Radtke S, Hermanns HM. Box 2 region of the oncostatin M receptor determines specificity for recruitment of Janus kinases and STAT 5 activation. *J Biol Chem* 2008. 283(28):19465-77
- 148) Hisada M, Kamiya S, Fujita K, Belladonna ML, Aoki T, Koyanagi Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res* 2004. 64(3): 1152-6
- 149) Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 1998. 92(4): 441-50
- 150) Holtkamp W, Stollber T, Reis HE. Serum interleukin-6 is related to disease activity but not disease specificity in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1995. 20(2): 123-6
- 151) Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, et al. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002. 122: 7-14

- 152) Horn D, Fitzpatrick WC, Gompper PT, Ochs V, Bolton-Hansen M, Zarling J, Malik N, Todaro GJ, Linsley PS. Regulation of cell growth by recombinant Oncostatin M. *Growth Factors* 1990. 2(2-3): 157-65
- 153) Huang XL, Xu J, Zhang XH, Qiu BY, Peng L, Zhang M, Gan HT. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2011. 60(8):727-34
- 154) Hudson KR, Vernallis AB, Heath JK. Characterization of the Receptor Binding Sites of Human Leukemia Inhibitory Factor and Creation of Antagonists. *J Biol Chem* 1996. 271(20): 11971-11978
- 155) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001. 411(6837): 599-603
- 156) Hui W, Rowan AD, Richards CD, Cawston TE. Oncostatin M in combination with tumor necrosis factor alpha induces cartilage damage and matrix metalloproteinase expression in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 2003. 48(12): 3404-18
- 157) Ichihara M, Hara T, Kim H, Murate T, Miyajima A. Oncostatin M and Leukemia Inhibitory Factor do not use the same functional receptor in mice. *Blood* 1997. 90(1): 165-173
- 158) Ihle JN. The Janus kinase family and signaling through members of the cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994. 91(3): 268-72
- 159) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- $\alpha$ . *FEBS Lett* 2009. 583(9): 1434-8
- 160) Ina K, Kusugami K, Yamaguchi T, Imada A, Hosokawa T, Ohsuga M, Shinoda M, Ando T, Ito K, Yokoyama Y. Mucosal interleukin-8 is involved in neutrophil migration and binding to extracellular matrix in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997. 92(8): 1342-6
- 161) Ip NY, Nye SH, Boulton TG, Davis S, Taga T, Li Y, Birren SJ, Yasukawa K, Kishimoto T, Anderson DJ, et al. CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell* 1992. 69(7): 1121-32
- 162) Jay PR, Centrella M, Lorenzo J, Bruce AG, Horowitz MC. Oncostatin M: a new bone active cytokine that activates osteoblasts and inhibits bone resorption. *Endocrinology* 1996. 137(4): 1151-8
- 163) Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, Mc Govern DP, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012. 491: 119-124
- 164) Kandiel A, Fraser AG, Korelitz BI, Brensinger C, Lewis JD. Increased risk of lymphoma among inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut* 2005. 54(8): 1121-5
- 165) Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, Nieuwenhuis EE, Higgins DE, Schreiber S, Glimcher LH, Blumberg RS. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008. 134(5):743-56
- 166) Kaser, A., Zytokine und chronisch- entzündliche Darmerkrankungen – Pathogenese und Therapie, 1. Auflage, UNI-MED 2009, ISBN: 978-3-8374-1146-1
- 167) Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Genes and environment: how will our

- concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future? *Dig Dis* 2010. 28(3): 395-405
- 168) Kato H. Squamous cell carcinoma, Serological Cancer Markers. Sell, S. editor. Humana Press; Totowa, NJ: 1992 p. 437.451
- 169) Kefalakes H, Stylianides TJ, Amanakis G, Kolios G. Exazerbation of inflammatory bowel diseases associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: myth or reality? *Eur J Clin Pharmacol* 2009. 65(10): 963-70
- 170) Kikuchi H, Itoh J, Fukuda S. Chronic nicotine stimulation modulates the immune response of mucosal T cells to Th1-dominant pattern via nAChR by upregulation of Th1-specific transcriptional factor. *Neurosci Lett* 2008. 432(3): 217-21
- 171) Kinane DF. Metalloproteinases in the pathogenesis of periodontal diseases. *Curr Opin Dent* 1992. 2: 25-32
- 172) Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 2000. 118(6): 1001-11
- 173) Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 2004. 53(5): 701-9
- 174) Kishimoto T, Akira S, Narasaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995. 86(4): 1243-1254
- 175) Knoflach P, Park BH, Cunningham R, Weiser MM, Albini B. Serum antibodies to cow's milk proteins in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* 1987. 92(2): 479-85
- 176) Kobayashi K, Arimura Y, Goto A, Okahara S, Endo T, Shinomura Y, Imai K. Therapeutic implications of the specific inhibition of causative matrix metalloproteinases in experimental colitis induced by dextran sulphate sodium. *J Pathol* 2006. 209(3): 376-83
- 177) Korzus E, Nagase H, Rydell R, Travis J. The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression. *J Biol Chem* 1997. 272(2): 1188-96
- 178) Kristensen M, Chu CQ, Eedy DJ, Feldmann M, Brennan FM, Breathnach SM. Localization of tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and its receptors in normal and psoriatic skin: epidermal cells express the 55-kD but not the 75-kD TNF receptor. *Clin Exp Immunol* 1993. 94: 354-362
- 179) Kubin T, Pöling J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, Wietelmann A, Tanaka M, Lörchner H, Schimanski S, Szibor M, Warnecke H, Braun T. Oncostatin m is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. *Cell Stem Cell* 2011. 9(5): 420-32
- 180) Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993. 75(2): 263-74
- 181) Kulnigg S, Stoinov S, Simanenkov V, Dudar LV, Karnafel W, Garcia LC, Sambuelli AM, D'Haens G, Gasche C. A novel intravenous iron formulation for treatment of anemia in inflammatory bowel disease: the ferric carboxymaltose (FERINJECT) randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2008. 103(5): 1182-92
- 182) Lacreusette A, Barbieux I, Nguyen JM, Pandolfino MC, Dréno B, Jacques Y, Godard A, Blanchard F. Defective actions of STAT3 Ser727 and PKC

- isoforms lead to Oncostatin M resistance in metastatic melanoma cells. *J Pathol* 2009. 217(5): 665-76
- 183) Lacreusette A, Nguyen JM, Pandolfino MC, Khammari A, Dréno B, Jacques Y, Godard A, Blanchard F. Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells. *Oncogene* 2007. 26(6): 881-92
- 184) Lacreusette A, Lartigue A, Nguyen JM, Barbieu I, Pandolfino MC, Paris F, Khammari A, Dréno B, Jacques Y, Blanchard F, Godard A. Relationship between responsiveness of cancer cells to Oncostatin M and/or IL-6 and survival of stage III melanoma patients treated with tumour-infiltrating lymphocytes. *J Pathol* 2008. 216(4): 451-9
- 185) Lai CF, Ripperger J, Morella KK, Wang Y, Gearing DP, Horseman ND, Campos SP, Fey GH, Baumann H. STAT3 and STAT5B are targets of two different signal pathways activated by hematopoietin receptors and control transcription via separate cytokine response elements. *J Biol Chem* 1995. 270(40): 23254-7
- 186) Larousserie F, Bardel E, Pflanz S, Arnulf B, Lome-Maldonado C, Hermine O, Brégeaud L, Perennec M, Brousse N, Kastelein R, Devergne O. Analysis of interleukin-27 (EBI3/p28) expression in Epstein-Barr virus- and human T-cell leukaemia virus type 1- associated lymphomas: heterogeneous expression of EBI3 subunit by tumoral cells. *Am J Pathol* 2005. 166(4): 1217-28
- 187) Larrea E, Aldabe R, Gonzalez I, Segura V, Sarobe P, Echeverria I, Prieto J. Oncostatin M enhances the antiviral effects of type I interferon and activates immunostimulatory functions in liver epithelial cells. *J Virol* 2009. 83(7):3298-311
- 188) Leal RF, Ayrizono ML, Milanski M, Coope A, Fagundes JJ, Velloso LA, Coy CS. Activation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT-1) and differential expression of interferon-gamma and anti-inflammatory proteins in pelvic ileal pouches for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis. *Clin Exp Immunol* 2012. 160(3): 380-5
- 189) Lees CW, Satsangi J. Genetics of inflammatory bowel disease: implications for disease pathogenesis and natural history. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009. 3(5): 513-34
- 190) Lei Z, Liu G, Huang Q, Lv M, Zu R, Zhang GM, Feng ZH, Huang B. SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy* 2008. 63(3): 327-32
- 191) León AJ, Gómez E, Garrote JA, Bernardo D, Barrera A, Marcos JL, Fernández-Salazar, Velayos B, Blanco-Quirós A, Arranz E. High levels of Proinflammatory Cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators Inflamm* 2009. 2009:580450
- 192) Lerner A, Rossi TM, Park B, Albini B, Lebenthal E. Serum antibodies to cow's milk proteins in pediatric inflammatory bowel disease. Crohn's disease versus ulcerative colitis. *Acta Paediatr Scand* 1989. 78(3): 384-9
- 193) Levin B, Lennard-Jones J, Riddell RH, Sachar D, Winawer SJ. Surveillance of patients with chronic ulcerative colitis. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull World Health Organ* 1991. 69(1): 121-6
- 194) Levy JB, Schindler C, Raz R, Levy DE, Baron R, Horowitz MC. Activation of the JAK-STAT signal transduction pathway by oncostatin-M cultured human and mouse osteoblastic cells. *Endocrinology* 1996. 137(4): 1159-65
- 195) Li CS, Zhang Q, Lee KJ, Cho SW, Lee KM, Hahm KB, Choi SC, Yun KJ, Chung HT, Chae SC. Interleukin-27 polymorphisms are associated with

- inflammatory bowel disease in a Korean population. *J Gastroenterol Hepatol* 2009. 24(10): 1692-6
- 196) Li F, Zou Y, Li X. Up-regulation of singal transducer and activator of transcription-3 is associated with aggravation of ulcerative colitis. *Surgeon* 2010. 8(5): 262-6
- 197) Li Q, Zhu J, Sun F, Liu L, Liu X, Yue Y. Oncostatin M promotes proliferation of ovarian cancer cells through signal transducer and activator of transcription 3. *Int J Mol Med* 2011. 28(1): 101-8
- 198) Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling Pathway. *J Immunol* 2001. 166(5): 3491-8
- 199) Li Y, de Haar C, Peppelenbosch MP, van der Woude CJ. New insights into the role of STAT3 in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2012. 18(6): 1177-83
- 200) Lin SJ, Chen YL, Kuo MY, Li CL, Lu HK. Measurement of gp130 cytokines Oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. *Cytokine* 2005. 30(4): 160-7
- 201) Lindberg RA, Juan TS, Welcher AA, Sun Y, Cupples R, Guthrie B, Fletcher FA. Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1998. 18(6): 3357-3367
- 202) Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001. (234): 29 -40
- 203) Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998. 95(18): 10626-31
- 204) Liu J, Spence MJ, Wallace PM, Forcier K, Hellström I, Vestal RE. Oncostatin M-specific receptor mediates inhibition of breast cancer cell growth and down-regulation of the c-myc proto-oncogene. *Cell Growth Differ* 1997. 8(6): 667-76
- 205) Liu J, Li C, Ahlborn TE, Spence MJ, Meng L, Boxer LM. The expression of p53 tumor suppressor gene in breast cancer cells is down-regulated by cytokine oncostatin M. *Cell Growth Differ* 1999. 10(10): 667-83
- 206) Liu L, Wang S, Shan B, Shao L, Sato A, Kawamura K, Li Q, Ma G, Tagawa M. IL-27-mediated activation of natural killer cells and inflammation produced antitumour effects for human oesophageal carcinoma cells. *Scand J Immunol* 2008. 68(1): 22-9
- 207) Lo CW, Chen MW, Hsiao M, Wang S, Chen CA, Hsiao SM, Chang JS, Lai TC, Rose-John S, Kuo ML, Wei LH. IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer. *Cancer Res* 2011. 71(2): 424-34
- 208) Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002. 110(5): 625-32
- 209) Louis E, Belaiche J, van Kemseke C, Franchimont D, de Groote D, Gueenen V, Mary JY. A high serum concentration of interleukin-6 is predictive of relapse in quiescent Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997. 9(10): 939-44
- 210) Loy JK, Davidson TJ, Berry KK, Macmaster JF, Danle B, Durham SK. Oncostatin M: Development of a pleiotropic cytokine. *Toxicol Pathol* 1999. 27(2): 151-155

- 211) Lunardi F, Villano G, Perissinotto E, Agostini C, Rea F, Gnoato M, Bradaschia A, Valente M, Pontisso P, Calabrese F. Overexpression of SERPIN B3 promotes epithelial proliferation and lung fibrosis in mice. *Lab Invest* 2011. 91(6): 945-54
- 212) Macdonald TT, Hutchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin exp Immunol* 1990. 81: 301-305
- 213) Maeda M, Watanabe N, Neda H, Yamauchi N, Okamoto T, Sasaki H, Tsuji Y, Akiyama S, Tsuji N, Niitsu Y. Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992. 14(3):451-61
- 214) Mäkitalo L, Sipponen T, Kärkkäinen P, Kolho KL, Saarialho-Kere U. Changes in matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) expression profile in Crohn's disease after immunosuppressive treatment correlate with histological score and calprotectin values. *Int J Colorectal Dis* 2009. 24(10): 1157-67
- 215) Magrangeas F, Boistieu O, Denis S, Jacques Y, Minvielle S. Negative cross-talk between interleukin-3 and interleukin-11 is mediated by suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3). *Biochem J* 2001. 353(2): 223-30
- 216) Magrangeas F, Boistieu O, Denis S, Jacques Y, Minvielle S. Negative regulation of Oncostatin M signaling by suppressor of cytokine signalling (SOCS-3). *Eur Cytokine Netw* 2001. 12(2): 309-15
- 217) Magro F, Portela F. Management of inflammatory bowel disease with Infliximab and other anti-tumor necrosis factor alpha therapies. *BioDrugs* 2010. 24(1):3-14
- 218) Mahadevan U, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002. 97(4): 910-4
- 219) Mahboubi K, Kirkiles-Smith NC, Karras J, Pober JS. Desensitization of signaling by oncostatin M in human vascular cells involves cytoplasmic Tyr residue 759 in gp130 but is not mediated either Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 or suppressor of cytokine signalling 3. *J Biol Chem* 2003. 278(27): 25014-23
- 220) Male David K., Immunologie, 1. Auflage, Urban und Fischer Verlag 2005; ISBN: 9-783437413124
- 221) Manfredi MA, Zurkowski D, Rufo PA, Walker TR, Fox VL, Moses MA. Increased incidence of urinary matrix metalloproteinases as predictors of disease in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008. 14(8): 1091-6
- 222) Manicourt DH, Poilvache P, Van Egeren A, Devogelaer JP, Lenz ME, Thonar EJ. Synovial fluid levels of tumor necrosis factor alpha and Oncostatin M correlate with levels of markers of the degradation of crosslinked collagen and cartilage aggrecan in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000. 43(2): 281-8
- 223) Mast AE, Enghild JJ, Nagase H, Suzuki K, Pizzo SV, Salvesen G. Kinetics and physiologic relevance of the inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and antrithrombin III by matrix metalloproteinases-1 (tissue collagenase), -2 (72-kDa gelatinase/type IV collagenase), and 3 (stromelysin). *J Biol Chem* 1991. 266(24): 15810-6
- 224) Maury CP, Teppo AM. Cachectin/tumour necrosis factor-alpha in the

- circulation of patients with rheumatic disease. *Int J Tissue React* 1989. 11(4):189-93
- 225) McDonnell S, Navre M, Coffey RJ jr, Matrisian LM. Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas. *Mol Carcinog* 1991. 4(6): 527-33
- 226) McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1987. 25(5): 796-801
- 227) McGregor NF, Poulton IJ, Walker EC, Pompolo S, Quinn JM, Martin TJ, Sims NA. Ciliary Neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex-specific role in bone growth and remodeling. *Calcif Tissue Int* 2010. 86(3): 261-70
- 228) Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski M, Antolin M, Guarner F, Vilaseca J, Salas A, Malagelada JR. Therapeutic effect of phenantroline in two rat models of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001. 36(12): 1314-9
- 229) Meier W, Eiermann W, Stieber P, Schneider A, Fateh-Moghadam A, Hepp H. Experiences with SCC antigen, a new tumor marker for cervical carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989. 25(11): 1555-9
- 230) Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van der Zon AM, van Duijn W, van Hogezand RA, Sier CF, Hommes DW, Lamers CB, Verspaget HW. Increased mucosal matrix metalloproteinase-1, -2,-3 and -9 activity in patients with inflammatory bowel disease and relation with Crohn's disease phenotype. *Dig Liver Dis* 2007. 39(8): 733-9
- 231) Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, Sier CF, van Hogezand RA, Lamers CB, Hommes DW, Verspaget HW. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as prognostic indicators for diagnostic and surgical recurrence in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009. 15(1):84-92
- 232) Migita K, Komori A, Torigoshi T, Maeda Y, Izumi Y, Jiuchi Y, Miyashita T, Nakamura M, Motokawa S, Ishibashi H. CP690,550 inhibits Oncostatin M-induced JAK/STAT signaling pathway in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2011. 13(3): R72
- 233) Miles SA, Martinez-Maza O, Rezai A, Magpantay L, Kishimoto T, Nakamura S, Radka SF, Linsley PS. Oncostatin M as a potent mitogen for AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells. *Science* 1992. 255(5050): 1432-4
- 234) Minamoto S, Ikegami K, Ueno K, Narasaki M, Naka T, Yamamoto H, Matsumoto T, Saito H, Hosoe S, Kishimoto T. Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3. *Biochem Biophys Res Commun* 1997. 237(1): 79-83
- 235) Mirshahi F, Vasse M, Tedgui A, Li H, Merval R, Legrand E, Vannier JP, Soria J, Soria C. Oncostatin M induces procoagulant activity in human vascular smooth muscle cells by modulating the balance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002. 13(5): 449-55
- 236) Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Tanikawa K. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1994. 96:432-436
- 237) Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, Harada K,

- Tateishi H, Nishiyama T, Tanikawa K. Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* 1995. 36(1): 45-9
- 238) Mitsuyama K, Matsumoto S, Masuda J, Yamasaki H, Kuwaki K, Takedatsu H, Sata M. Therapeutic strategies for targeting the IL-6/STAT3 cytokine signaling pathway in inflammatory bowel disease. *Anticancer Res* 2007. 27(6A): 3749-56
- 239) Modrell B, Liu J, Miller H, Shoyab M. LIF and OM directly interact with a soluble form of gp130, the IL-6 receptor signal transducing subunit. *Growth Factors* 1994. 11(2): 81-91
- 240) Modur V, Feldhaus MJ, Weyrich AS, Jicha DL, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. *J Clin Invest* 1997. 100(1): 158-68
- 241) Mohamet L, Heath JK, Kimber SJ. Determining the LIF-sensitive period for implantation using a LIF-receptor antagonist. *Reproduction* 2009. 138(5): 827-36
- 242) Moidunny S, Dias RB, Wesseling E, Sekino Y, Boddeke HW, Sebastião AM, Biber K. Interleukin-6-type cytokines in neuroprotection and neuromodulation: oncostatin M, but not leukaemia inhibitory factor, requires neuronal adenosine A1 receptor function. *J Neurochem* 2010. 114(6): 1667-77
- 243) Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, et al. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signalling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* 1996. 271: 32635-32643
- 244) Mudter J, Neurath MF. IL-6 Signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 2007. 13: 1016-1023
- 245) Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, Lehr HA, Schmidt J, Neurath MF. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *AM J Gastroenterol* 2005. 100(1): 64-72
- 246) Murakami M, Narasaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T, Kishimoto T. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991. 88(24): 11349-53
- 247) Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor  $\alpha$  in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991. 32: 913-917
- 248) Musso A, Dentelli P, Carlino A, Chiusa L, Repici A, Sturm A, Fiocchi C, Rizzetto M, Pegoraro L, Sategna-Guidetti C, Brizzi MF. Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: an essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2005. 11(2): 91-8
- 249) Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovas Res* 2006. 69(3): 562-73
- 250) Nagata T, Kai H, Shibata R, Koga M, Yoshimura A, Imaizumi T. Oncostatin M, an interleukin-6 family cytokine, upregulates matrix metalloproteinase-9 through the mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway in cultured smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003. 23(4): 588-93.

- 251) Nair BC, DeVico AL, Nakamura S, Copeland TD, Chen Y, Patel A, O'Neil T, Oroszian S, Gallo RC, Sarngadharan MG. Identification of a major growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma cells as oncostatin M. *Science* 1992. 255(5050): 1430-2
- 252) Naka T, Narasaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997. 387(6636): 924-9
- 253) Nakamura K, Nonaka H, Saito H, Tanaka M, Miyajima A. Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 2004. 39(3): 635-644
- 254) Nakaoka Y, Nishida K, Fujio Y, Izumi M, Terai K, Oshima Y, Sugiyama S, Matsuda S, Koyasu S, Yamauchi-Takahara K, Hirano T, Kawase I, Hirota H. Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of scaffolding/docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes. *Circ Res* 2003. 93(3): 221-9
- 255) Nakashima Y, Kondo M, Fukuda T, Harada H, Horiuchi T, Ishinishi T, Jojima H, Kuroda K, Miyahara H, Maekawa M, Nishizaka H, Nagamine R, Nakashima H, Otsuka T, Shono E, Suematsu E, Shimauchi T, Tsuru T, Wada K, Yoshizawa S, Yoshizawa S, Iwamoto Y. Remission in patients with active rheumatoid arthritis by tocilizumab treatment in routine clinical practice: results from 3 years of prospectively registered data. *Mod Rheumatol* 2014. 24(2): 258-64
- 256) Narasaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, Mority Y, Saito H, Kajita T, Yoshizaki K, Naka T, Kishimoto T. Three distinct domains of SSI-1/SOCS1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998. 95(22): 13130-4
- 257) Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005. 85(1): 1-31
- 258) N'guyen Y, Andreoletti L, Patey M, Lecoq-Lafon C, Cornillet P, Léon A, Jaussaud R, Fieschi C, Strady C. Fatal Epstein-Barr virus primo infection in a 25-year-old man treated with azathioprine for Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 2009. 47(4): 1252-4
- 259) Nicholson SE, Willson TA, Farley A, Starr R, Zhang JG, Baca M, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J* 1999. 18(2): 375-85
- 260) Nicholson SE, Hilton DJ. The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 1998. 63(6): 665-8
- 261) Nikolopoulou V, Katsakoulis E, Tsiotos P, Thomopoulos K, Salsaa B, Zoumbos N. Production of interleukin-1b and tumor necrosis factor-a by peripheral blood human mononuclear cells in active and inactive stages of ulcerative colitis. *Z Gastroenterol* 1995. 33(1): 9-12
- 262) Nishibe T, Parry G, Ishida A, Aziz S, Murray J, Patel Y, Rahman S, Strand K, Saito K, Saito Y, Hammond WP, Savidge GF, Mackman N, Wijelath ES. Oncostatin M promotes biphasic tissue factor expression in smooth muscle cells: evidence for Erk-1/2 activation. *Blood* 2001. 97(3): 692-9
- 263) Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Suemura M, Kakehi T, Takagi N, Kishimoto T. Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-

- interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis. Phase I/II clinical study. *J Rheumatol* 2003. 30(7): 1426-35
- 264) Nobbe S, Dziunycz P, Mühleisen B, Bilsborough J, Dillon SR, French LE, Hofbauer GF. IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 2012. 92(1): 24-8
- 265) Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, Stange EF. Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* 2007. 56(9): 1240-7
- 266) Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biochem* 2001. 276(7):4812-8
- 267) Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001. 411(6837): 603-6
- 268) Okada Y, Nagase H, Harris ED Jr. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1986. 261(30): 14245-55
- 269) Okada Y, Takeuchi N, Tomita K, Nakanishi I, Nagase H. Immunolocalization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B cells): correlation with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989. 48(8):645-53
- 270) Olszak T, Neves JF, Dowds Cm, Baker K, Glickman J, Davidson NO, Lin CS, Jobin C, Brand S, Sotlar K, Wada K, Katayama K, Nakajima A, Mizuguchi H, Kawasaki K, Nagata K, Müller W, Snapper SB, Schreiber S, Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* 2014. 509(7501): 497-502
- 271) Ouyang L, Shen LY, Li T, Liu J. Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo. *Biomed Res* 2006. 27(4): 197-202
- 272) Park SC, Jeen YT. Current and emerging biologics for ulcerative colitis. *Gut Liver* 2015. 9(1):18-27
- 273) Paul-Pletzer K. Tocilizumab: blockade of interleukin-6 signaling pathway as a therapeutic strategy for inflammatory disorders. *Drugs Today (Barc)* 2006. 42 (9): 559-576
- 274) Peng XD, Wu XH, Chen LJ, Wang ZL, Hu XH, Song LF, He CM, Luo YF, Chen ZZ, Jin K, Lin HG, Li XL, Wang YS, Wei YQ. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase ameliorates dextran sodium sulphate-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2012. 332(1): 46-56
- 275) Pennica D, Shaw KJ, Swanson TA, Moore MW, Shelton DL, Zioncheck KA, Rosenthal A, Taga T, Paoni NF, Wood WI. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem* 1995. 270(18): 10915-22
- 276) Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992. 3(1): 47-52
- 277) Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefydt R, Rennick D, Kastelein RA. IL-27, a heterodimeric cytokine

- composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naïve CD4(+) T cells. *Immunity* 2002. 16(6): 779-90
- 278) Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 2004. 172(4): 2225-31
- 279) Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 2009. 206: 1465-1472
- 280) Plater-Zyberk C, Buckton J, Thompson S, Spaull J, Zanders E, Papworth J, Lieve PF. Amelioration of arthritis in two murine models using antibodies to oncostatin m. *Arthritis Rheum* 2001. 44(11): 2697-702
- 281) Pontisso P, Calabrese F, Benvegnù L, Lise M, Belluco C, Ruvoletto MG, Falco SD, Marino M, Valente M, Nitti D, Gatta A, Fassina G. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *Brit J of Cancer* 2004. 90(4): 833-7
- 282) Pradeep AR, S TM, Garima G, Raju A. Serum levels of oncostatin M (a gp 130 cytokine): an inflammatory biomarker in periodontal disease. *Biomarkers* 2010. 15(3): 277-82
- 283) Putoczki T, Ernst M. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *J Leukoc Biol* 2010. 88(6): 1109-17
- 284) Quillien V, Raoul JL, Laurent JF, Meunier B, Le Prise E. Comparison of Cyfra 21-1, TPA and SCC tumor markers in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 1998. 5(6): 1561-5
- 285) Radtke S, Hermanns HM, Haan C, Schmitz-Van De Lier H, Gascan H, Heinrich PC, Behrmann I. Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *J Biol Chem* 2002. 277(13): 11297-305
- 286) Radwan P, Radwan-Kwiatek J, Tabarkiewicz J, Radej S, Rolinski J. Enhanced Phenotypic and functional maturation of monocyte-derived dendritic cells from patients with active crohn's disease and ulcerative colitis. *J Physiol Pharmacol* 2010. 61(6): 695-703
- 287) Rajaiah R, Puttabyatappa M, Polumuri SK, Moudgil KD. Interleukin-27 and Interferon- $\{\gamma\}$  are involved in Regulation of Autoimmune Arthritis. *J Biol Chem* 2011. 286(4): 2817-25
- 288) Rane SG, Reddy EP. JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene* 1994. 9(8): 2415-23
- 289) Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R., Biochemie, 1. Auflage, Thieme Verlag 2006, ISBN: 9-783131253514
- 290) Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997. 40(6): 754-60
- 291) Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 $\beta$  by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993. 94:174-181
- 292) Reinisch W, Sandborn WJ, Hommes DW, D'Haens G, Hanauer S, Schreiber S, Ünaccone R, Fedorak RN, Tighe MB, Huang B, Kampman W, Lazar A, Thakkar R. Adalimumab for induction of clinical remission in moderately to severely active ulcerative colitis: results of a randomised controlled trial. *Gut* 2001. 60(6): 780-7

- 293) Renna S, Cottone M, Orlando A. Optimization of the treatment with immunosuppressants and biologics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014. 20(29): 9675-90
- 294) Richards CD, Langdon C, Botelho F, Brown TJ, Agro A. Oncostatin M inhibits IL-1-induced expression of IL-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by synovial and lung fibroblasts. *J Immunol* 1996. 156(1): 343-9
- 295) Richards CD, Brown TJ, Shoyab M, Baumann H, Gauldie J. Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J Immunol* 1992. 148(6): 1731-6
- 296) Rigoli L, Romano C, Caruso RA, Lo Presti MA, Di Bella C, Procopio V, Lo Giudice G, Amorini M, Costantino G, Sergi MD, Cuppari C, Calabro GE, Gallizzi R, Salpietro CD, Fries W. Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008. 14(28): 4454-61.
- 297) Robledo O, Fourcin M, Chevalier S, Guillet C, Auguste P, Pouplard-Barthelaix A, Pennica D, Gascan H. Signaling of the Cardiotrophin-1 Receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem* 1997. 272: 4855-4863
- 298) Rockman SP, Demmler K, Roczo N, Cosgriff A, Phillips WA, Thomas RJ, Whitehead RH. Expression of interleukin-6, leukaemia inhibitory factor and their receptors by colonic epithelium and pericryptal fibroblasts. *J Gastroenterol Hepatol* 2001. 16(9): 991-1000
- 299) Roda G, Dahan S, Mezzanotte L, Caponi A, Roth-Walter F, et al. Defect in CEACAM family member expression in Crohn's disease IECs is regulated by the transcription factor SOX9. *Inflamm Bowel Dis* 2009. 15(12): 1775-83
- 300) Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KC, Yin L, Pennica D, Johnson EM Jr, Schreiber RD. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 1998. 93(3): 373-83
- 301) Rose TM, Bruce AG. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukaemia-inhibitory factor; granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991. 88(19): 8641-5
- 302) Rose TM, Lagrou MJ, Fransson I, Werelius B, Delattre O, Thomas G, de Jong PJ, Todaro GJ, Dumanski JP. The genes for oncostatin M (OSM) and leukemia inhibitory factor (LIF) are tightly linked on human chromosome 22. *Genomics* 1993. 17(1): 136-40
- 303) Rose TM, Weiford DM, Gunderson NL, Bruce AG. Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro. *Cytokine* 1994. 6(1): 48-54
- 304) Rossi RE, Parisi I, Despott EJ, Burroughs AK, O'Beirne J, Conte D, Hamilton MI, Murray CD. Anti-tumour necrosis factor agent and liver injury: Literature review, recommendations for management. *World J Gastroenterol* 2014. 20(46): 17352-17359
- 305) Rousseau F, Chevalier S, Guillet C, Ravon E, Diveu C, Froger J, Barbier F, Grimaud L, Gascan H. Ciliary Neurotrophic Factor, Cardiotrophin-like Cytokine, and Neuropeiotin share a conserved binding site on the Ciliary Neurotrophic Factor Receptor  $\alpha$  Chain. *J Biol Chem* 2008. 283(44): 30341-30350
- 306) Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000. 12(8): 855-62
- 307) Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J,

- 308) Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005. 353(23):2462-76
- 308) Rutsch S, Neppalli VT, Shin DM, DuBois W, Morse HC 3rd, Goldschmidt H, Janz S. IL-6 and MYC collaborate in plasma cell tumor formation in mice. *Blood* 2010. 115(9): 1746-54
- 309) Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol* 1995. 148(12): 4066-71
- 310) Sanchez AL, Langdon CM, Akhtar M, Lu J, Richards CD, Bercik P, McKay DM. Adenoviral transfer of the murine oncostatin M gene suppresses dextran-sodium sulfate-induced colitis. *J Interferon Cytokine Res* 2003. 23(4): 193-201
- 311) Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johanns J, Guzzo C, Sands BE, Hanauer SB, Targan S, Rutgeerts P, Ghosh S, de Villiers WJ, Panaccione R, Greenberg G, Schreiber S, Lichtiger S, Feagan BG; CERTIFI Study Group. *N Engl J Med* 2012. 367(16): 1519-28
- 312) Sandborn WJ, Gosh S, Panes J, Vranic I, Su C, Rousell S, Niezychowski W; Study A3921063 Investigators. Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2012. 367(7): 616-24
- 313) Sandborn, Feagan B, Marano C, et al. A phase 2/3 randomized, placebo-controlled, double-blind study to evaluate the safety and efficacy of subcutaneous golimumab induction therapy in patients with moderately to severely active ulcerative colitis: PURSUIT-SC. Presented at: Digestive Disease Week; May 19-22, 2012; San Diego, California. Abstract L6100.
- 314) Sandborn WJ, Gosh S, Panes J, Vranic I, Wang W, Niezychowski W; Study A3921043 Investigators. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014. 12(9): 1485-93
- 315) Santamaria M, Pardo-Saganta A, Alvarez-Asiain L, Di Scala M, Qian C, Prieto J, Avila MA. Nuclear  $\alpha$ 1-antichymotrypsin promotes chromatin condensation and inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology* 2013. 144(4): 818-828
- 316) Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004. 126(6): 1620-33
- 317) Sartor RB, Muehlbauer M. Microbial host interactions in IBD: implications for pathogenesis and therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2007. 9(6):497-507
- 318) Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, Sasaki M, Johnston Ja, Yoshimura A. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 1999. 4(6): 339-51
- 319) Sasaoka T, Ito M, Yamashita J, Nakajima K, Tanaka I, Narita M, Hara Y, Hada K, Takahashi M, Ohno Y, Matsuo T, Kaneshiro Y, Tanaka H, Kaneko K. Treatment with IL-27 attenuates experimental colitis through the suppression of the development of IL-17-producing T helper cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011. 300(4): G568-76.
- 320) Savarese TM, Campbell CL, McQuain C, Mitchell K, Guardiani R, Quesenberry PJ, Nelson BE. Coexpression of Oncostatin M and its receptors and evidence for STAT3 activation in human ovarian carcinomas. *Cytokine* 2002. 17(6): 324-34
- 321) Saxne T, Palladino MA Jr, Heinegård D, Talal N, Wollheim FA. Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 1988. 31(8): 1041-5

- 322) Schaper F, Gendo C, Eck M, Schmitz J, Grimm C, Anhuf D, Kerr IM, Heinrich PC. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 1998. 335(3): 557-65
- 323) Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol* 2006. 63(5): 321-9
- 324) Schmeichel S, Konrad A, Diegelmann J, Glas J, Wetzke M, Paschos E, Lohse P, Göke B, Brand S. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm Bowel Dis* 2008. 14(2): 204-12
- 325) Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, Meuer SC, Stallmach A. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005. 11(1): 16-23
- 326) Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 2000. 275(17): 12848-56
- 327) Schneider M, Hoeflich A, Fischer JR, Wolf E, Sordat B, Lahm H. Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2000. 151(1): 31-8
- 328) Schneider SS, Schick C, Fish KE, Miller E, Pena JC, Treter SD, Hui SM, Silverman GA et al. A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995. 92:3147-3151
- 329) Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, Isaacs K, van Deventer SJ, Koningsberger JC, Cohard M, LeBeaut A, Hanauer SB. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000. 119(6): 1461-72
- 330) Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, Kühbacher T, Hämling J, Fölsch UR, Seegert D. Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 2002. 51(3): 379-85
- 331) Schreiber S, Rutgeerts P, Fedorak RN, Khalig-Kareemi M, Kamm MA, Boivin M, Bernstein CN, Staun M, Thomsen OO, Innes A, CDP870 Crohn's Disease Study Group. A randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol (CDP870) for treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005. 129(3):807-18
- 332) Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Hermann K, Hofbauer K, Dambacher J, Tillack C, Sackmann M, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* 2006. 41(12): 1421-32
- 333) Seiderer J, Brand S, Dambacher J, Pfennig S, Jürgens M, Göke B,

- Ochsenkühn T. Adalimumab in patients with Crohn's disease-safety and efficacy in an open-label single centre study. *Aliment Pharmacol Ther* 2007. 25(7):787-96
- 334) Seita J, Asakawa M, Ooehara J, Takayanagi SI, Morita Y, Watanabe N, Fujita K, Kudo M, Mizuguchi J, Ema H, Nakauchi H, Yoshimoto T. Interleukin-27 directly induces differentiation in hematopoietic stem cells. *Blood* 2008. 111(4): 1903-12
- 335) Seldenhuijzen CA, Drexhage HA, Meuwissen SG, Meijer CJ. T-cellular immune reactions (in macrophage inhibition factor assay) against *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1990. 31(5): 529-35
- 336) Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998. 66(11): 5224-31
- 337) Shah PK. Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis- an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm. *Circulation* 1997. 96:2115-7
- 338) Shim TS. Diagnosis and Treatment of Latent Tuberculosis Infection in Patients with inflammatory Bowel Diseases due to Initiation of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy. *Intest Res* 2014. 12(1): 12-9
- 339) Shimizu M, Shimamura M, Owaki T, Asakawa M, Fujita K, Kudo M, Iwakura Y, Takeda Y, Luster AD, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Antiangiogenic and Antitumor Activities of IL-27. *J Immunol* 2006. 176: 7317-7324
- 340) Shin SH, Han SK, Jeong SH, Kim WK, et al. Potential of oncostatin M to accelerate diabetic wound healing. *Int Wound J* 2014. 11(4): 398-403
- 341) Smith WE, Kane AV, Campbell ST, Acheson DW, Cochran BH, Thorpe CM. Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2003. 71(3): 1497-504
- 342) Soili-Hänninen M, Broberg E, Röyttä M, Mattila P, Rinne J, Hukkanen V. Expression of LIF and LIF receptor beta in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Acta Neurol Scand* 2010. 121(1): 44-50
- 343) Sommer U, Schmid C, Sobota RM, Lehmann U, Stevenson NJ, Johnston JA, Schaper F, Heinrich PC, Haan S. Mechanisms of SOCS3 phosphorylation upon interleukin-6 stimulation. Contributions of Src- and receptor-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2005. 280(36): 31478-88
- 344) Song KJ, Ahn HJ, Nam HW. Anti-apoptotic effects of SERPIN B3 and B\$ via STAT6 activation in macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* 2012. 50(1): 1-6
- 345) Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 1994. 263(5143): 92-5
- 346) Stallmach A, Chan CC, Ecker KW, Feifel G, Herbst H, Schuppan D, Zeitz M. Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis. *Gut* 2000. 47(3): 415-22
- 347) Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997. 387(6636): 917-21

- 348) Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* 1999. 21(1): 47-52
- 349) Steinberg GR, Watt MJ, Ernst M, Birnbaum MJ, Kemp BE, Jorgensen SB. Ciliary neurotrophic factor stimulates muscle glucose uptake by a PI3-kinase-dependent pathway that is impaired with obesity. *Diabetes* 2009. 58(4): 829-39
- 350) Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, Antonioli D, Peppercorn MA, Strom TB. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992. 37(6):818-26
- 351) Stoll M, Corneliusen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG Lagerstrom-Ferner M, Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004. 36(5): 476-80
- 352) Stross C, Radtke S, Clahsen T, Gerlach C, Volkmer-Engert R, Schaper F, Heinrich PC, Hermanns HM. Oncostatin M receptor-mediated signal transduction is negatively regulated by SOCS3 through a receptor tyrosine-independent mechanism. *J Biol Chem* 2006. 281(13):8458-68
- 353) Suminami Y, Nagashima S, Vujanovic NL, Hirabayashi K, Kato H, Whiteside TL. Inhibition of apoptosis in human tumor cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Br J Cancer* 2000. 82(4): 981-9
- 354) Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med* 2001. 193(4):471-81
- 355) Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates Claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem* 2011. 286(36): 31263-71
- 356) Suzuki Y, Saito H, Kasanuki J, Kishimoto T, Tamura Y, Yoshida S. Significant increase of interleukin 6 production in blood mononuclear leukocytes obtained from patients with active inflammatory bowel disease. *Life Sci* 1990. 47(24): 2193-7
- 357) Sykes AP, Bhogal R, Brampton C, Chander C, Whelan C, Parsons ME, Bird J. The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1999. 13(11): 1535-42
- 358) Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998. 95(22):13221-6
- 359) Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K, Nakajima K, Hibi M, Hirano T. Gab-1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp-130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 1998. 18(7): 4109-17
- 360) Tanaka K, Wilks M, Coates PJ, Farthing MJ, Walker-Smith JA, Tabaqchali S. Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease. *Gut* 1991. 32(1): 43-5
- 361) Tanaka M, Hara T, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Miyajima A. Reconstitution of the functional mouse oncostatin M (OSM) receptor: molecular cloning of the mouse OSM receptor beta subunit. *Blood* 1999. 93(3): 804-15

- 362) Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, Miyajima A. Targeted disruption of Oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 2003. 102(9): 3154-62
- 363) Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003. 149: 39-52
- 364) Terakawa J, Hondo E, Sugiyama M, Wakitani S, Stewart CL, Kiso Y. Agrin pathway is controlled by leukaemia inhibitory factor (LIF) in murine implantation. *J Reprod Dev* 2009. 55(3): 293-8
- 365) Terstegen L, Gatsios P, Bode JG, Schaper F, Heinrich PC, Graeve L. The inhibition of interleukin-6-dependent STAT activation by mitogen-activated protein kinases depends on tyrosine 759 in the cytoplasmic tail of glycoprotein 130. *J Biol Chem* 2000. 275(25): 18810-7
- 366) Thoma B, Bird TA, Friend DJ, Gearing DP, Dower SK. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor trigger overlapping and different signals through partially shared receptor complexes. *J Biol Chem* 1994. 269: 6215-6222
- 367) Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 2003. 13:2129-2141
- 368) Tillack C, Ehmann LM, Friedrich M, Laubender RP, Papay P, Vogelsang H, Stallhofer J, Beigel F, Bedynek A, Wetzke M, Maier H, Koburger M, Wagner J, Glas J, Diegelmann J, Koglin S, Dombrowski Y, Schaubert J, Wollenberg A, Brand S. Anti-TNF antibody-induced psoriasiform skin lesions in patients with inflammatory bowel disease are characterised by interferon- $\gamma$ -expressing Th1 cells and IL-17A/IL-22-expressing Th17 cells and respond to anti-IL-12/IL-23 antibody treatment. *Gut* 2014. 63(4): 567-77
- 369) Tsuyama N, Danjoh I, Otsuyama K, Obata M, Tahara H, Ohta T, Ishikawa H. IL-6-induced Bcl6 variant 2 supports IL-6-dependent myeloma cell proliferation and survival through STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* 2005. 337(1): 201-8
- 370) Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Hirai Y, Hayashi N, Harusato A, Inoue K, Fukumoto K, Yamada S, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Yoshikawa T. Serpin B1 protects colonic epithelial cell via blockage of neutrophil elastase activity and its expression is enhanced in patients with ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012. 302(10): G1163-70
- 371) Uemura A, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Nakashima K, Taga T. Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 2002. 18(1): 1-7
- 372) Ungureanu D, Vanhatupa S, Kotaja N, Yang J, Aittomaki S, Jänne OA, Palvimo JJ, Silvennoinen O. PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood* 2003. 102(9): 3311-3
- 373) Upadhyay A, Sharma G, Kivivuori S, Raye WS, Zabihi E, Carroll GJ, Jazayeri JA. Role of LIF antagonist in LIF and OSM induced MMP-1, MMP-3, and TIMP-1 expression by primary articular chondrocytes. *Cytokine* 2009. 46(3): 332-8
- 374) Van Deventer SJ, Elson CO, Fedorak RN. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's disease Study Group. *Gastroenterology* 1997. 113(2): 383-9
- 375) Van Heerden JA, Beart RW Jr. Carcinoma of the colon and rectum complicating ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 1980. 23(3): 155-9

- 376) Vidalino L, Doria A, Quarta S, Zen M, Gatta A, Pontisso P. SERPINB3, apoptosis and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2009. 9(2): 108-12
- 377) Villarino AV, Huang E, Hunter CA. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol* 2004. 173: 715-720
- 378) Villarino AV, Hunter CA. Biology of recently discovered cytokines: Discerning the pro- and anti-inflammatory properties of interleukin-27. *Arthritis Res Ther* 2004. 6: 225-233
- 379) Vine N, Powell JT. Metalloproteinases in degenerative aortic disease. *Clin Sci (Lond)* 1991. 81(2):233-9
- 380) Virdis F, Tacci S, Messina F, Varcada M. Hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by primary Epstein-Barr virus in patient with Crohn's disease. *World J Gastrointest Surg* 2013. 5(11): 306-8
- 381) Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003. 92(8): 827-39
- 382) Vlotides G, Zitzmann K, Stalla GK, Auernhammer CJ. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine (CLC)-a novel gp130 cytokine with pleiotropic functions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004. 15(5): 325-36
- 383) Von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000. 47(1):63-73
- 384) Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signalling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2002. 168: 5342-5351
- 385) Wahl AF, Wallace PM. Oncostatin M in the anti-inflammatory response. *Ann Rheum Dis* 2001. 60: 75-80
- 386) Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, Constable MJ, Nicholson GC, Zhang JG, Nicola NA, Gillespie MT, Martin TJ, Sims NA. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest* 2010. 120(2): 582-92
- 387) Wallace PM, MacMaster JF, Rouleau KA, Brown TJ, Loy JK, Donaldson KL, Wahl AF. Regulation of inflammatory responses by Oncostatin M. *J Immunol* 1999. 162(9): 5547-55
- 388) Wang K, Yuan CP, Wang W, Yang ZQ, Cui W, Mu LZ, Yue ZP, Yin XL, Hu ZM, Liu JX. Expression of interleukin 6 in brain and colon of rats with TNBS-induced colitis. *World J Gastroenterol* 2010. 16(18):2252-2259
- 389) Waterman M, Xu W, Stempak JM, Milgrom R, Bernstein CN, Griffiths AM, Greenberg GR, Steinhart AH, Silverberg MS. Distinct and overlapping genetic loci in crohn's disease and ulcerative colitis: Correlations with pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 2011. 17(9):1936-42
- 390) Weckroth M, Vaheri A, Lauharanta J, Sorsa T, Konttinen YT. Matrix metalloproteinases, gelatinase and collagenase, in chronic leg ulcers. *J Invest Dermatol* 1996. 106(5): 1119-24
- 391) Weiss TW, Kvakan H, Kaun C, Zorn G, Speidl WS, Pfaffenberger S, Maurer G, Huber K, Wojita J. The gp130 ligand oncostatin M regulates tissue inhibitor of metalloproteinases-1 through ERK1/2 and p38 in human adult cardiac myocytes and in human adult cardiac fibroblasts: a possible role for the gp130/gp130 ligand system in modulation of extracellular matrix degradation in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 2005. 39(3): 545-51

- 392) Weiss TW, Simak R, Kaun C, Rega G, Pflüger H, Maurer G, Huber K, Wojta J. Oncostatin M and IL-6 induce u-PA and VEGF in prostate cancer cells and correlate in vivo. *Anticancer Res* 2011. 31(10): 3273-8
- 393) White UA, Stephens JM. Neuropeptin activates STAT3 independent of LIFR activation in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2010. 395(1): 48-50
- 394) Wilson DS, Dalmasso G, Wang L, Sitaraman SV, Merlin D, Murthy N. Orally delivered thioketal nanoparticles loaded with TNF- $\alpha$ -siRNA target inflammation and inhibit gene expression in the intestines. *Nat Mater* 2010. 9(11): 923-8
- 395) Winder DM, Chattopadhyay A, Muralidhar B, Bauer J, English WR, Zhang X, Karagavriilidou K, Roberts I, Pett MR, Murphy G, Coleman N. Overexpression of the oncostatin M receptor in cervical squamous cell carcinoma cells is associated with a pro-angiogenic phenotype and increased cell motility and invasiveness. *J Pathol* 2011. 225(3): 448/62
- 396) Wolvekamp MC, Marquet RL. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett* 1990. 24(1):1-9
- 397) Wong AK, Kerkoutian S, Said J, Rashidi H, Pullarkat ST. Risk of lymphoma in patients receiving antitumor necrosis factor therapy: a meta-analysis of published randomized controlled studies. *Clin Rheumatol* 2012. 31(4): 631-6
- 398) Woo JK, Choi Y, Oh SH, Jeong JH, Choi DH, et al. Mucin 1 enhances the tumor angiogenic response by activation of the AKT signalling pathway. *Oncogene* 2012. 31(17): 2187-98
- 399) Woywodt A, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Ludwig D, Stange EF, Kirchner H. Cytokine expression in intestinal mucosal biopsies. In situ hybridisation of the mRNA for interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw* 1994. 5(4): 387-95
- 400) Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993. 101(1): 64-8
- 401) Xia X, Li Y, Huang D, Wang Z, Luo L, Song Y, Zhao L, Wen R. Oncostatin M protects rod and cone photoreceptors and promotes regeneration of cone outer segment in a rat model of retinal degeneration. *PLoS One* 2011. 6(3): e18282
- 402) Xiao F, Wang H, Fu X, Li Y, Ma K, Sun L, Gao X, Wu Z. Oncostatin M inhibits myoblast differentiation and regulates muscle regeneration. *Cell Res* 2011. 21(2): 350-64
- 403) Yagita A, Sukegawa Y, Maruyama S, Sato N, Atomi Y, Yamaguchi H, Kamiya S, Ihara T, Sugamata M. Mouse colitis induced bei Escherichia coli producing Yersinia enterocolitica 60-kilodalton heat-shock protein: light and electron microscope study. *Dig Dis Sci* 1999. 44(2): 445-51
- 404) Yanai N, Obinata M. Oncostatin m regulates mesenchymal cell differentiation and enhances hematopoietic supportive activity of bone marrow stromal cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2001. 37(10): 698-704
- 405) Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999. 18(5): 1309-20
- 406) Yawata H, Yasukawa K, Natsuka S, Murakami M, Yamasaki K, Hibi M, Taga

- T, Kishimoto T. Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J* 1993. 12(4): 1705-12
- 407) Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, Moriyama M, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Hara T, Miyajima A. Mouse Oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT 5 pathway. *EMBO J* 1996. 15(5): 1055-63
- 408) Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H., Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. Oncostatin M: A growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986. 83: 9739-9743
- 409) Zhang H, Massey D, Tremelling M, Parkes M. Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *Br med Bull* 2008. 87: 17-30
- 410) Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002. 12(1): 9-18
- 411) Zhang Q, Putheti P, Zhou Q, Liu Q, Gao W. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor Res* 2008. 19(5-6): 347-56
- 412) Zhao Y, Shao F. NLRC5: a NOD-like receptor protein with many faces in immune regulation. *Cell Res* 2012. 22(7): 1099-101
- 413) Zou X, Bolon B, Pretorius JK, Kurahara C, McCabe J, Christiansen KA, Sun N, Duryea D, Foreman O, Senaldi G, Itano AA, Siu G. Neonatal death in mice lacking cardiotrophin-like cytokine is associated with multifocal neuronal hypoplasia. *Vet Pathol* 2009. 46(3): 514-91

## **9. Abbildungsverzeichnis**

<u>Abb. 1:</u> Strukturelle Darstellung von hOSM	S. 11
<u>Abb. 2:</u> Vergleich des strukturellen Aufbaus einzelner IL-6-Zytokine mit OSM	S. 11
<u>Abb. 3:</u> Schematische Darstellung der Zytokinrezeptor-Komplexe der IL-6-Zytokine	S. 15
<u>Abb. 4:</u> Schematische Darstellung der Aktivierung der MAPK-Kaskade und des JAK/STAT-Signalweges	S. 19
<u>Abb. 5:</u> Mechanismen der Negativregulierung von Zytokinen der IL-6-Familie	S. 23
<u>Abb. 6:</u> Ätiopathogenese der CED	S. 34
<u>Abb. 7:</u> Therapien der CED	S. 43
<u>Abb. 8:</u> Nachweis der OSM-Rezeptoruntereinheiten in verschiedenen IEC	S. 70
<u>Abb. 9:</u> mRNA-Expression von OSM-Rezeptoruntereinheiten in IEC	S. 71
<u>Abb. 10:</u> Nachweis von OSMR- $\beta$ , gp-130 und LIFR in HCT116-Zellen	S. 72
<u>Abb. 11:</u> Aktivierung der MAP-Kinase ERK-1/2 in HCT116-Zellen durch OSM	S. 73
<u>Abb. 12:</u> Phosphorylierung der MAP-Kinase SAPK/JNK nach Stimulation der HCT116- und HT-29-Zellen mit OSM	S. 74
<u>Abb. 13:</u> Phosphorylierung von p-38 nach Stimulation von HCT116-Zellen mit OSM	S. 74
<u>Abb. 14:</u> Aktivierung der PI3-Kinase Akt nach Stimulation von HCT116- und HT-29-Zellen mit OSM	S. 75
<u>Abb. 15:</u> Aktivierung von STAT-1 und STAT-3 nach Stimulation mit OSM	S. 76
<u>Abb. 16:</u> Hochregulation der IL-6-Expression in HCT116-Zellen durch OSM	S. 77
<u>Abb. 17:</u> Hochregulation der TNF $\alpha$ -Expression in HCT116-Zellen durch OSM	S. 77
<u>Abb. 18:</u> Hochregulation von TIMP-1 nach OSM-Stimulation der HCT116-Zellen	S. 78
<u>Abb. 19:</u> Hochregulation von MMP-3 nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM	S. 78
<u>Abb. 20:</u> Verstärkte intestinale Epithelzellproliferation durch OSM	S. 79
<u>Abb. 21:</u> Repräsentative Abbildung der Zellmigration in Wundheilungs-experimenten	S. 80
<u>Abb. 22:</u> Verstärkte Migration der HCT116-Zellen nach Stimulation mit OSM	S. 80

<u>Abb. 23:</u> Verminderte Apoptose der mit OSM behandelten HCT116-Zellen	S. 81
<u>Abb. 24:</u> Hochregulation der Gene für Immunität und Abwehr, Apoptose und die JAK/STAT-Kaskade	S. 83
<u>Abb. 25:</u> Hochregulation der Gene für Transkriptionsfaktoren in der Klasse der Molekularfunktionen	S. 84
<u>Abb. 26:</u> Zusammenfassung der Experimente dieser Arbeit	S.104

## **10. Tabellenverzeichnis**

<u>Tab. 1:</u>	Übersicht über die IL-6-Zytokinfamilie mit Produzenten- und Zielzellen, Funktionen und die an der Signaltransduktion beteiligten Rezeptoren.	S. 17
<u>Tab. 2:</u>	Übersicht über die Matrixmetalloproteininasen (MMPs).	S. 25
<u>Tab. 3:</u>	Übersicht über die verwendeten Zelllinien.	S. 47/48
<u>Tab. 4:</u>	Übersicht über die verwendeten Antikörper.	S. 51/52
<u>Tab. 5:</u>	Darstellung der für die Durchführung der RT-PCR und q-PCR verwendeten Primer.	S. 59
<u>Tab. 6:</u>	Darstellung der 20 am meisten hochregulierten Gene nach Stimulation der HCT116-Zellen mit OSM vs. unstimulierte Zellen ( $p < 0.01$ ) nach 6 Stunden.	S. 86
<u>Tab. 7:</u>	Darstellung der 20 am meisten herunterregulierten Gene in OSM-stimulierten HCT116-Zellen vs. unstimulierte Zellen ( $p < 0.01$ ) nach 6 Stunden.	S. 87

## **11. Anhang**

### **11.1. Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

#### **Die Bedeutung des OSM/OSMR-Zytokin-Ligand-Rezeptor-Systems in intestinalen Epithelzellen und bei intestinaler Entzündung**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und aller Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

München, 14.03.2018

---

Corina Landgraf

---

Ort, Datum

---

Corina Landgraf

## **Danksagung**

### **Mein Dank gilt:**

Herrn PD Dr. med. Florian Beigel danke ich sehr für seine Unterstützung und fachliche Betreuung während des gesamten Zeitraumes der Durchführung der Dissertation, für seine fortwährende Gesprächsbereitschaft, seine konstruktiven Anregungen, für sein Interesse an meiner Arbeit und letztlich der Übernahme der Betreuung dieser als Doktorvater nach dem Klinikwechsel von Herrn PD Dr. med. Stephan Brand.

Herrn PD Dr. med. Stephan Brand danke ich für die initiale Übernahme der Betreuung der Dissertation, sowie für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in seinem Labor durchführen zu können.

Frau Dr. rer. nat. Julia Diegelmann danke ich für ihre fachliche Kompetenz und Hilfe bei der Durchführung der einzelnen Experimente.

Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Torsten Olszak für die gute Anleitung bei der Anwendung der einzelnen Methoden.

Herrn Gerald Spöttl danke ich für seine Hilfe bei den STAT-Western-Blot-Experimenten.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Christoph Auernhammer danke ich für die Möglichkeit die ELISA-Experimente auf ihren Geräten auszulesen.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Ehemann Stefan, meiner Schwester Katrin und meinen Eltern für die seelische und moralische Unterstützung.