

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

Regulation von Hepatoma-derived Growth Factor durch Zytokine

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Verena Riehle

aus Königheim

Würzburg, Februar 2011

Referent: Professor Dr. med. Michael Scheurlen

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Steger

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2012

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.2	HDGF	2
1.3	Interleukine.....	9
1.3.1	Interleukin 1beta	9
1.3.2	Interleukin 4	12
1.3.3	Interleukin 5	15
1.3.4	Interleukin 8	18
1.3.5	Interleukin 13	21
1.4	Zielsetzung.....	25
2.	Material und Methoden.....	26
2.1	Material	26
2.1.1	Geräte.....	26
2.1.2	Zubehör	26
2.1.3	Chemikalien	27
2.1.4	Reaktions-Kits/ Chemikalien-Kits.....	28
2.1.5	Sonden und Primer.....	29
2.1.6	Interleukine	30
2.1.7	Zellkulturen	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Zellkultur, Inkubation mit Interleukinen	31
2.2.2	RNA-Isolierung	33
2.2.3	Aufreinigung und DNase-Behandlung	33
2.2.4	Messung der RNA-Menge	34
2.2.5	cDNA-Synthese	35
2.2.6	REAL TIME-RT-PCR.....	35
2.3	Auswertung	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1	Interleukin 1beta.....	40
3.1.1	Geki-2	40
3.1.2	HT29.....	42
3.1.3	SW480.....	44
3.1.4	SW620.....	46

3.2	Interleukin 4.....	48
3.2.1	Geki-2.....	48
3.2.2	HT29.....	50
3.2.3	SW480.....	52
3.2.4	SW620.....	54
3.3	Interleukin 5.....	57
3.3.1	Geki-2.....	57
3.3.2	HT29.....	59
3.3.3	SW480.....	61
3.3.4	SW620.....	63
3.4	Interleukin 8.....	65
3.4.1	Geki-2.....	65
3.4.2	HT29.....	67
3.4.3	SW480.....	69
3.4.4	SW620.....	71
3.5	Interleukin 13.....	73
3.5.1	Geki-2.....	73
3.5.2	HT29.....	75
3.5.3	SW480.....	77
3.5.4	SW620.....	79
4.	Diskussion	81
5.	Zusammenfassung	90
6.	Abbildungsverzeichnis.....	93
7.	Literaturverzeichnis	95

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (CRC) gehört zu den am häufigsten auftretenden bösartigen Tumoren beim Menschen und hat neben dem Mammakarzinom der Frau und dem Bronchialkarzinom die höchste Mortalitätsrate. In Europa lag die rohe Mortalitätsrate 2007 für Dickdarm- und Mastdarmkrebs für Männer bei 33,2/100000 sowie für Frauen bei 31,1/100000 Einwohner. Die Zahl der Neuerkrankungen liegt in Deutschland pro Jahr ungefähr bei 70000 [1]. Dies entspricht einer Inzidenz von etwa 87/100000 Einwohner in Deutschland.

Bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms spielen sowohl exogene als auch endogene Faktoren eine Rolle. Einer der wichtigsten exogenen Risikofaktoren stellt der westliche Lebensstil dar. Es besteht ein Zusammenhang zwischen ballaststoffarmer, fett- sowie kalorienreicher Ernährung, erhöhtem Alkoholkonsum, Nikotinabusus sowie mangelnder Bewegung und einem erhöhten Karzinomrisiko [2,3].

In Bezug auf die Karzinogenese sind vier Wege bekannt, die mit der Entstehung des CRCs in Verbindung gebracht werden. Dies sind Entstehung von CRCs aus Adenomen, de novo Entwicklung, Vorliegen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn) und die Entstehung auf Grund hereditärer Faktoren wie der familiären adenomatösen Polypose (FAP) und dem hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC). Beim HNPCC spielt vor allem eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI), resultierend aus Mutationen von DNA-mismatch-repair Genen, eine Rolle.

Die weitaus häufigsten malignen Tumoren des Darms sind jedoch sporadische Karzinome, die aus adenomatösen Polypen entstehen [4]. Die Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt ein multigenetisches Modell, das mehrere genetische Alterationen einschließt [5]. Über Jahre kann es von anfänglich unkontrollierter Zellproliferation in den Krypten über Adenombildung sowie Dysplasien zur Entwicklung maligner Zellen kommen. Am Anfang steht meist die Adenomatosis polyposis coli- (APC) Genmutation, im Weiteren kommt es häufig zur Aktivierung von Onkogenen, wie dem K-ras Gen und zur Deletion des DCC (dele-

ted in colorectal carcinoma) Gens. Die Mutation von p53, einem Tumorsuppressoren, scheint mit der wichtigste Schritt bei der Progression von Adenomen in Adenokarzinome zu sein. Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen können präkanzeröse Läsionen in den entzündlich befallenen Darmabschnitten aufweisen [4].

1.2 HDGF

Hepatoma-derived Growth Factor (HDGF) ist ein Wachstumsfaktor, der erstmals 1994 aus konditioniertem Medium der humanen Hepatom Zelllinie HuH-7 isoliert wurde. HDGF-mRNA konnte in vielen untersuchten Zelllinien und normalen Geweben ubiquitär nachgewiesen werden [6]. Des Weiteren, vor allem für diese Arbeit von Bedeutung, konnte eine erhöhte HDGF-Expression in einigen Malignomen als eigenständiger prognostischer Faktor gezeigt werden [7]. Dies lässt vermuten, dass dieser Wachstumsfaktor eine Bedeutung in der Karzinogenese verschiedener Gewebe hat, was auch die Tatsache der Erstisolierung aus einer humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie nahelegt.

Physiologisch spielt HDGF in der Entwicklung von Niere [8], Leber [9,10], Darm [11], Endothelzellen der Lunge [12], glatten Muskelzellen der Aorta [13] sowie des fetalen Herzens [14] und der kardiovaskulären Entwicklung eine Rolle [13-15], wie in einigen Tiermodellen nachgewiesen werden konnte. Im ZNS zeigt HDGF neurotrophe Effekte [16]. Auch im adulten ZNS kann es in vielen Arealen gefunden werden [17]. Seine Wirkung im Rückenmark steht in Zusammenhang mit einem Einfluss von p53 an der Regulation [18].

Im Folgenden soll nochmals die Datenlage zur Rolle von HDGF im Darmgewebe reflektiert werden. Wie einige andere Gene ist HDGF in der embryonalen Entwicklung des Darms anfangs sehr stark exprimiert. Die Expression nimmt mit Fortschreiten der epithelialen Differenzierung ab, bis sie im adulten Darm sehr gering ist. Zu Beginn der Organentwicklung von endodermalem zu villösem epithelalem Gewebe sind HDGF-mRNA sowie Protein, letzteres nur in den Kernen der sich entwickelnden Zellen, zu finden. Im adulten Darm lässt sich eine geringe Menge an HDGF im Kern von Epithelzellen, die sich zeitweise in undifferenziertem Zustand befinden, nachweisen. Die Expression von HDGF assoziiert invers mit dem Grad der zellulären Differenzierung, koinzident ist eine

Limitation anderer Marker der zellulären Differenzierung der kolorektalen Mucosa. Es liegt also eine negative Korrelation zwischen der Höhe der HDGF-Expression und dem Differenzierungsgrad des Darmepithelgewebes vor; ob es sich hier lediglich um eine Koinzidenz oder einen ursächlichen Zusammenhang handelt, ist aktuell noch Gegenstand der Forschung.

Es werden Gemeinsamkeiten im Mechanismus der Gene und eventuell stattfindendem Gensilencing angenommen. Darüber hinaus wird ein Zusammenhang mit der fetalen Entwicklung, Gewebedifferenzierung und geringer Expression im adulten Gewebe vermutet. Dies kann auch hinweisend und entscheidend für die Reexpression einiger dieser Gene in Tumorgewebe sein. Im Weiteren wurde in einer kleinen Serie eine erhöhte HDGF-Expression in Geweben von kolorektalen Karzinomen, vor allem bei Kolontumoren mit intaktem DNA-mismatch-repair gefunden. Die größten Mengen an HDGF zeigten sich in Zellen mit invasivem Charakter sowie stark undifferenzierten Zellen. Da HDGF sowohl in der Embryonalentwicklung als auch in der Entstehung von Karzinomen eine Rolle spielt, stellt er ein onkofetales Protein dar [11]. Darüber hinaus steht eine erhöhte HDGF-Expression in Zusammenhang mit einer gewissen Chemotherapie-Resistenz bei CRCs [19].

HDGF spielt jedoch nicht nur bei der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen eine Rolle, sondern kann auch in einigen weiteren Malignomen gefunden werden. Wie die Zellen der Erstisolation zeigen, weisen hepatozelluläre Karzinomgewebe (HCC) eine erhöhte HDGF-Expression auf, sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch [20]. Die stärkste Expression ist in Zellen mit geringem Differenzierungsgrad, bei Patienten mit hohen α -Fetoprotein-Werten sowie Tumoren ohne Kapsel zu finden. Im Weiteren korreliert die Höhe der HDGF-Expression sowohl mit einer schlechteren Überlebensrate als auch mit einem kürzeren krankheitsfreien Intervall nach Resektion. HDGF stellt hier einen unabhängigen prognostischen Marker dar [21]. Auch lässt sich eine schlechtere time-to-progress- und Gesamtüberlebensrate bei starker HDGF-Expression beobachten [22]. Eine neuere Studie zeigt zusätzlich zu den bisher beschriebenen Fakten, dass die HDGF-Expression positiv mit der T- und N-Klassifikation sowie dem klinischen Stadium des HCC korreliert [23]. Eine vor Karzinomnachweis

feststellbare erhöhte HDGF-Expression zeigte sich bei Mäusen mit Steatohepatitis [20].

Nukleäres HDGF zeigt sich im Weiteren auch beim Pankreasgangkarzinom als unabhängiger prognostischer Marker, eine geringe Expression geht mit einer verbesserten 5-Jahresüberlebensrate und Gesamtüberlebensrate einher. Schlechte Prognosen für das Pankreaskarzinom liegen vor allem an den lokalen Rezidiven, dessen Auftreten möglicherweise mit den verschiedenen zellulären Zusammenhängen von HDGF mit essentiellen biologischen Ereignissen der Karzinogenese, wie Antiapoptose, Angiogenese, Invasivität und Proliferation, zu erklären ist [7]. Auch bei malignen Magentumoren wurde HDGF als prognostischer Faktor für Tumorrezidiv, krankheitsfreies Intervall und Gesamtüberleben nachgewiesen [24]. Außerdem zeigt sich HDGF als wertvoller prognostischer Marker beim extrahepatischen cholangiozellulären Karzinom (Klatskin-Tumor) nach kurativer Therapie [25].

Darüber hinaus spielt HDGF auch bei gastrointestinalen Stromatumoren eine Rolle. Hier findet man sowohl eine erhöhte nukleäre wie auch zytoplasmatische Expression, beide stellen prognostische Marker für früher auftretende Rezidive sowie ein kürzeres Gesamtüberleben dar. Außerdem zeigt sich ein Zusammenhang in der Expressionshöhe nukleären HDGFs mit einer gesteigerten Proliferationsaktivität des Tumors. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und Ki-67 sind in ihrer Expression gesteigert. Eventuell erhöht HDGF, wie auch PCNA und Ki-67, die mitogenetische Aktivität im Kern und steht so mit dem Proliferationsgrad in Beziehung. Es bestehen weitere Korrelationen zu Tumorgröße, Tumormitose und Risikokategorien. Bei zytoplasmatischem HDGF lassen sich nicht alle Korrelationen so wieder finden [26]. In einer weiteren Studie wurde speziell auf die kolorektal lokalisierten gastrointestinalen Stromatumoren eingegangen, die im Vergleich zu Stromatumoren des Magens und Dünndarms mit noch höheren HDGF-Expressionen einhergehen. Auch hier weisen erhöhte nukleäre und zytoplasmatische HDGF-Mengen auf eine schlechtere Prognose mit verkürztem krankheitsfreiem Überleben hin. Vor allem für nukleäres HDGF bestehen Korrelationen mit Tumormitoserate, Tumorgröße, Risikokategorien sowie Zellpleomorphologie, außerdem der PCNA- und Ki-67-Expression [27].

Eine weitere Neoplasie in der erhöhte HDGF-Mengen im Vergleich zu normalem Gewebe festgestellt werden, sind die Melanome [28]. Auch für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) konnte HDGF als unabhängiger prognostischer Parameter für das Krankheitsstadium 1 [29] und den Zustand nach R0-Resektion [30] in zwei Studien ermittelt werden. Jedoch sind die genauen Wirkmechanismen und Funktionsweisen über den Einfluss auf verschiedene Karzinomarten immer noch weitgehend unklar. In einer Studie zum NSCLC konnte durch eine reduzierte Expression von HDGF eine Abnahme der Invasionsfähigkeit sowie ein reduziertes mediumunabhängiges Wachstum, einem Merkmal maligner Transformation, festgestellt werden [31]. Zudem wurde ein Einfluss auf die Expression einiger in Neoplasien vorkommenden Genen beobachtet.

Im Tierversuch wurde eine verminderte Zahl an Gefäßen und vermehrte Tumornekrosen festgestellt, was vermuten lässt, dass HDGF an der Angiogenese beteiligt ist und somit für Tumorentwicklung und Progression wichtig zu sein scheint. Die Nekrosen entstehen eventuell auf Grund fehlender oder schlechter Blutversorgung [31]. In einer Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass HDGF sowohl direkte angiogenetische Effekte hat als auch die Stimulation der Angiogenese über Induktion der Expression des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Tumorzellen mit erhöhter HDGF-Expression bewirkt [32]. Einen weiteren Wirkmechanismus, mit dem HDGF Einfluss auf die Karzinogenese hat, stellt die Aktivierung der Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1) sowie ERK2 und damit die Steigerung des mediumunabhängigen Wachstums in bestimmten Zellen des Magenkarzinoms dar. ERK1/2 unterstützt das Zellüberleben und die Proliferation. Auch ein Einfluss auf die Karzinogenese wird angenommen [33].

Als erster therapeutischer Ansatz konnte im NSCLC eine antitumoröse Aktivität durch anti-HDGF-Antikörper, verstärkt durch Kombination mit Chemotherapeutika, beobachtet werden [34].

Das monomere Peptid HDGF zeigt eindeutige Homologien zur High Mobility Group-1 (HMG-1), einem ubiquitär vorkommenden Protein, jedoch fehlen die für HMG-1 typischen DNA-bindenden Bereiche, die sogenannte HMG-Box [6]. Um seine wachstumsstimulierende Wirkung zu erreichen, müssen die HDGF-Monomere über Disulfidbrücken in Verbindung treten [6,35].

HDGF stellt ein Protein mit zwei Domänen dar, die N-terminal gelegene Homologue to Amino Terminus of HDGF-Region (HATH-Region) (AS 1-100), die geordnet vorliegt, und die ungeordnete C-terminale Domäne (AS 101-240). Sie spielen verschiedene Rollen in der Ausübung der Funktionen von HDGF [36,37].

Der untersuchte Wachstumsfaktor bildet mit fünf anderen Faktoren, HDGF related proteins 1-4 und Lens Epithelium-derived Growth Factor (LEDGF) eine Proteinfamilie [38]. HDGF zeigt mit allen Mitgliedern Ähnlichkeiten im N-terminal gelegenen Aminosäurebereich, der HATH-Region [39]; diese Region ist für die Translokation in den Kern mitverantwortlich [37]. Die HATH-Sequenz beinhaltet eine der beiden nukleären Lokalisierungssequenzen (NLS1, ⁷⁵KPNK⁸⁰) von HDGF [37]. Die zweite NLS findet sich in der genspezifischen C-terminalen Region von HDGF (NLS2, ¹⁵⁵KRRAGLLEDSPK¹⁷⁰). Diese zweite NLS ist vor allem für die nukleären Funktionen wichtig [37]; ihr basisches Cluster ist entscheidend für das nukleäre Targeting und sie spielt auch eine Rolle bei der HDGF-induzierten Mitogenese [15,37].

Nach Translokation von HDGF in den Kern kommt es zur DNA-Synthesesteigerung sowie zur Proliferationssteigerung durch Mitogenese. Ob HDGF als Induktor der DNA-Synthese wirkt oder die Regulation der Gentranskription beeinflusst, erscheint noch unklar. Sicher ist, dass kein direkter antiapoptotischer Effekt vorliegt [13]. Sowohl endogene Überexpression als auch exogen zugeführtes HDGF zeigen proliferationssteigernde Wirkung. HDGF konnte jedoch nur in Zellen mit aktiver DNA-Synthese nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die HATH-Region alleine nicht zur Stimulierung der DNA-Synthese ausreicht. Jedoch erfolgte durch den genspezifischen Proteinteil, in dem die NLS2 lokalisiert ist, eine identische Stimulation wie durch

das gesamte Protein. Außerdem kann intrazelluläres HDGF auch ohne HATH-Region die DNA-Synthese steigern, externes HDGF kann ohne HATH-Region jedoch nicht in die Zelle aufgenommen werden. Dies lässt vermuten, dass HDGF exogen mit Hilfe der HATH-Region eventuell über einen noch unbekannt Rezeptor in die Zelle internalisiert wird und dann in den Kern aufgenommen wird [37], nach Aufnahme in den Kern mit dem Chromatin in nicht spezifischer Art [40] interagiert und seine speziellen Funktionen wohl über die genspezifischen C-terminalen Regionen vermittelt werden [41].

Es konnte gezeigt werden, dass für eine direkte DNA-Bindung von HDGF tatsächlich die HATH-Region verantwortlich und die vollständige Region notwendig ist [42]. Nachdem jedoch die HATH-Region nicht zwingend für die DNA-Synthese benötigt wird [21,37], scheint die Wirkung von HDGF nicht nur über DNA-Bindung der HATH-Region vermittelt zu werden. Die Interaktion zwischen HDGF und DNA erfolgt über ein mindestens 37bp langes DNA-Motiv [42]. Dieses Element ist interessanterweise Teil des Alu DNA repeats [42-44], welcher in allen bislang gefundenen Promotoren von HDGF-getriggerten Genen vorkommt. So stellt HDGF ein Protein mit direkter DNA-Bindung dar, wodurch es repressiv auf die Expression bestimmter beeinflusster Gene wirkt [42].

Es wird angenommen, dass HDGF in para- und autokriner Form als Sekretionsprotein wirkt [13,35], sowie als nukleärer Faktor Einfluss auf die Gentranskription oder DNA-Synthese nimmt [13]. Auch zeigte sich, dass HDGF nukleär [6,13] und zytosolisch [6,8,13] vorliegt, vermutlich abhängig von Zelltypus, spezieller Funktionsweise und Zellzyklusphase, wobei die Hauptlokalisation im Kern liegt [13]. Ein anderer Teil der HATH-Region, HATH81-100, zeigt, dass HDGF nicht nur endogen im Kern über das Carboxyl-Ende proliferationssteigernd wirkt, sondern auch noch ein anderer Wirkmechanismus existiert. Externe Stimulation durch Bindung des HATH81-100-Teils an die Zellen resultiert in einer Proliferationsantwort. Dies unterstützt die Vermutung des Vorliegens eines speziellen HDGF-Rezeptors an der Zelloberfläche [45].

Im Bezug auf apoptotische Funktionen von HDGF ist bisher wenig bekannt mit teils inkonkruenten Ergebnissen. HDGF wurde als Phospho-Protein in Endo-

thelzellen identifiziert, das nach Apoptoseinduktion von Tumor Nekrose Faktor (TNF)+Cyclophosphamid, dephosphoryliert wird. Diese posttranslationale Modifikation findet in der Anfangsphase der Apoptose statt [46]. Es wird vermutet, dass ein knock-down von HDGF in Karzinomzellen nicht nur in einer Suppression des Wachstums resultiert, sondern auch in einer Stimulation der Apoptose. Dies geschieht über eine Induktion der Expression und Änderung des Phosphorylierungsstatus von Bad mit konsekutiver Induktion des intrinsischen Apoptosewegs. Des Weiteren kommt es zu einer Inaktivierung von ERK und Akt [47]. Aber nicht nur der intrinsische sondern auch der über Fas-vermittelte extrinsische Apoptoseweg, und deren beider Interaktion vermitteln vermutlich die Wirkung von HDGF als Überlebensfaktor für Karzinomzellen [48]. Auch konnte speziell für CRCs ein Zusammenhang zwischen Apoptoseinduktion bei gehemmter HDGF-Expression beobachtet werden [49]. In einer früheren Studie wurde jedoch im Gegensatz dazu gezeigt, dass Gensilencing von HDGF in HeLa-Zellen zu einer Inhibition der TNF α /Cycloheximid induzierten Apoptose führt. HDGF wird in dieser Arbeit mit der TNF α -induzierten Freisetzung von proapoptischen Faktoren wie Cytochrom C und Smac/Diablo (Second mitochondria-derived-activator of caspase/direkt inhibitor of apoptosis binding protein with low pI) aus Mitochondrien in Zusammenhang gesetzt [50].

1.3 Interleukine

Besonderes Interesse liegt in der Erforschung der Rolle, die HDGF in der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms (CRC) spielt, und die Mechanismen über welche HDGF reguliert wird. Dass HDGF von externen Stimuli beeinflusst wird, konnte bereits gezeigt werden [51]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Einfluss nochmals genauer bezüglich der Wirkung bestimmter Interleukine auf die HDGF-Expression untersucht.

Interleukine (ILs) gehören zu den Zytokinen, welche regulatorische, körpereigene Proteine darstellen. Diese werden von vielen verschiedenen Zellen transient ausgeschüttet und wirken vor allem autokrin sowie parakrin. Sie haben pleiotrope Funktionen, von Bedeutung sind sie unter anderem bei inflammatorischen Prozessen, Reparatur- sowie Schädigungsvorgängen, bei der Entstehung bzw. Bekämpfung bestimmter Erkrankungen, immunologischen Prozessen und vielem anderen. Die Interleukine lassen sich je nach sezernierender Zelle und spezifischen Aufgaben in zwei Gruppen teilen. Die Monokine, welche hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet werden und ferner die unspezifische Abwehr mit steuern. Hierzu gehört auch das in dieser Arbeit angewendete Interleukin 1beta.

Zum Anderen die Lymphokine, die von T-Lymphozyten sezerniert werden und vor allem bei antigenspezifischen Reaktionen eine Rolle spielen. Hierunter fallen die Interleukine 4, 5, 8 und 13 [52,53].

In Bezug auf maligne Prozesse können Zytokine sowohl fördernde als auch hemmende Funktionen zeigen. Sie nehmen unter anderem Einfluss bei der Modulation der Expression von Tumorantigenen und Adhäsionsmolekülen. Außerdem können sie sowohl die Zusammensetzung von infiltrierenden Zellen als auch die Aktivität von tumorinfiltrierenden Lymphozyten verändern, sowie die Produktion von immunsuppressiven Faktoren durch Tumorzellen beeinflussen [54].

1.3.1 Interleukin 1beta

Interleukin 1beta gehört zur Interleukin 1 Familie [55]. Von March wurden 1985 sowohl IL 1alpha als auch IL 1beta isoliert [56]. Für die IL 1 Genfamilie sind zwei Rezeptoren (IL1RI [57], IL1RII [58]) und ein akzessorisches Bindungspro-

tein, IL-1-RAcP [59], bekannt. Der IL1RII stellt ein Decoy-Molekül, vor allem für IL 1beta, dar. Dies bedeutet, es wird keine Signaltransduktion induziert; er bindet IL 1beta und verhindert so die Bindung an den IL1RI und somit das Auslösen eines Signalwegs [60]. IL 1beta bindet zunächst an IL1RI, durch Bildung eines Komplexes des Rezeptors mit dem IL-1-RAcP erhöht sich die Bindungsaffinität und nur durch diesen Komplex kann die Signaltransduktion erfolgen [61]. Unter Umständen besteht der Rezeptorkomplex auch schon zuvor und IL 1beta kann direkt mit starker Affinität binden [62].

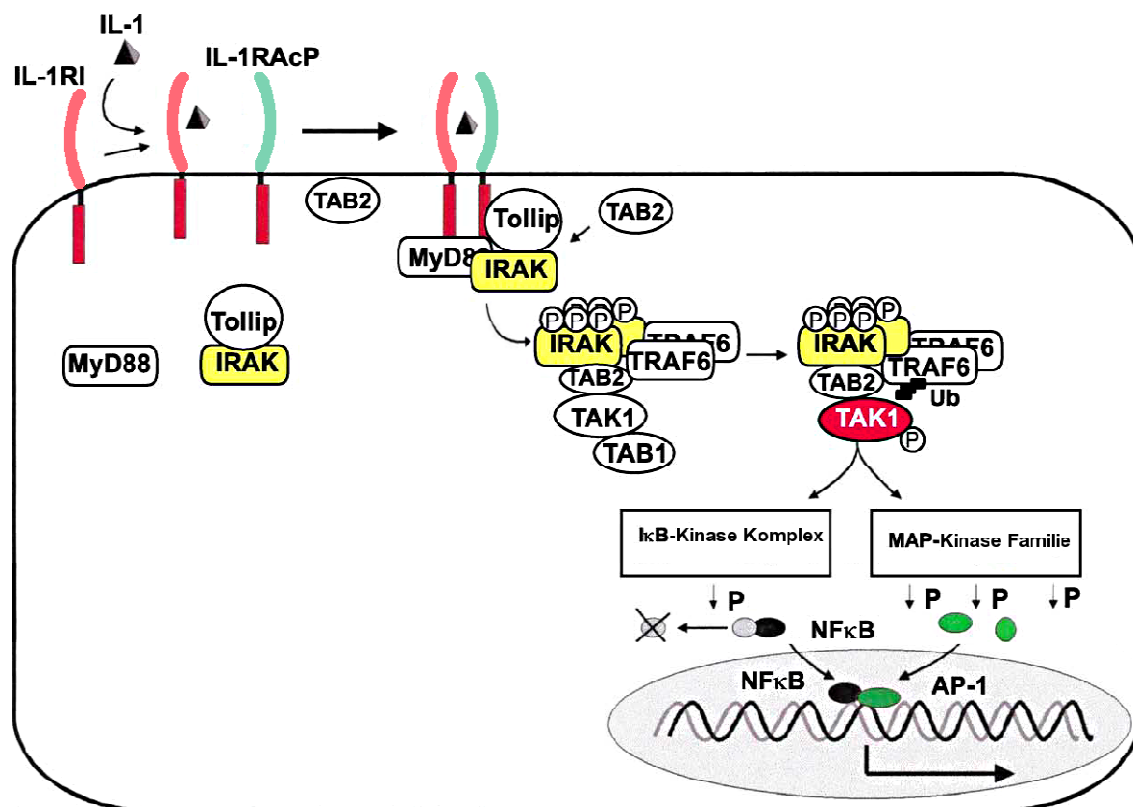


Abbildung 1: Darstellung der Signalwege von IL 1beta
Modifiziert nach [63], Erläuterung siehe Text

Für inflammatorische und immunologische Reaktionen wichtige Signalwege sind die Aktivierung des Nukleären Faktors κ B (NF κ B), von p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), ERK1, ERK2 und der c-Jun N-terminal Kinase (JNK) [64]. Darüber hinaus kommt es zur Translation von NF κ B in den Kern und zur Transkription von IL 1beta getriggerten Genen [65,66]. Auch ERK1 und ERK2 scheinen Einfluss auf die Transkription zu nehmen. P38 und JNK sind für die Stabilisierung induzierter mRNA zuständig [67]. JNK führt zur Phosphorylie-

rung des Activating Protein 1 (AP 1), einem weiteren wichtigen nukleären Faktor [63]. In den Signaltransduktionsketten spielen verschiedene Adaptoren sowie Kinasen eine Rolle [67] (siehe Abbildung 1).

Produziert wird IL 1beta unter anderem von aktivierten Makrophagen, Keratinozyten, B-Lymphozyten und Fibroblasten [68]. IL 1beta ist ein hoch entzündlich wirkendes Interleukin, daher ist es vor allem für die Pathogenese inflammatorischer Prozesse von Bedeutung. Außerdem bei der Induktion von Immunantworten sowie bei der Mediation autoimmunologischer Erkrankungen, die mit chronischen Entzündungsreaktionen einhergehen. Dies steht in Verbindung mit der Induktion von Cyclooxygenase-2 (COX-2), der vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, der Produktion von Akut-Phase-Proteinen sowie der Synthese weiterer proinflammatorischer Faktoren durch IL 1beta [55,67].

IL 1beta ist bei Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa wie auch bei Morbus Crohn höher exprimiert. Auch zeigt sich, wie für IL 5, dass IL 1beta in Kolonkarzinomzellen (Caco-2-Zelllinie) den durch IGF-II induzierten Wachstumseffekt verstärkt [69]. Der vermutete Mechanismus liegt in der Inhibition des Insulin-like Growth Factorbinding Protein (IGFBP-2) und der IGFBP-4 Produktion und dadurch ansteigender Insulin-like Growth Factor (IGF) Verfügbarkeit [69,70]. Außerdem ist IL 1beta ein starker Induktor der COX-2. Die erhöhte Produktion der COX-2 steht in Verbindung mit Entzündungsreaktionen. Es kommt zur gesteigerten Prostaglandinsynthese und zu einer Schmerzhypersensibilität [71]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl IL 1beta als auch COX-2 wichtige Mediatoren bei entzündlichen Darmerkrankungen sowie der Pathogenese des Kolonkarzinoms darstellen [72].

Ein induzierender Einfluss von IL 1beta auf die Angiogenese sowie Invasivität lässt sich für verschiedene Tumorzellen zeigen [73]. IL 1beta zeigt stimulierenden Einfluss auf die VEGF- sowie die IL 8 Synthese in Zellen des Kolonkarzinoms (Zelllinien SW620 und HT29). Beide stellen Faktoren mit angiogenetischer Potenz dar [74].

Außerdem wird IL 1beta bei Patienten mit *Helicobacter pylori* (H. p.) Besiedlung vermehrt exprimiert und scheint eine Rolle bei der Entwicklung des H. p.- assoziierten Magenkarzinoms zu spielen [75].

1.3.2 Interleukin 4

IL 4 wurde von Yokota erstmalig isoliert [76]. Der Rezeptor für IL 4 (IL4R) [77] besteht aus zwei Untereinheiten, der IL4R α -Kette und der γ c-Kette, und findet sich auf einer Vielzahl von Zellen. Die α -Kette bindet IL 4 und vermittelt seine wachstumsfördernden und transkriptionsaktivierenden Funktionen [78]. Die γ c-Kette, die eine Komponente vieler Zytokinrezeptoren darstellt [79], ist für die Amplifizierung der Signale zuständig [78]. IL 4 kann seinen Rezeptor selbst hochregulieren [80]. Ferner lässt sich ein zweiter Rezeptor finden, bei dem die α -Kette mit einer Untereinheit des IL 13-Rezeptors, dem IL13RA1, in Verbindung tritt [81].

Nach der Bindung kommt es zur Dimerisierung der beiden Rezeptorketten. Die zytoplasmatischen Anteile beider Rezeptoruntereinheiten sind für die Signaltransduktion von Bedeutung [82-84]. Entweder tritt der membranproximale Anteil der α -Kette in Wechselwirkung mit Janus tyrosine kinase (JAK1) oder der membranproximale Anteil der γ c-Kette assoziiert mit JAK3 [85], die daraufhin aktiviert wird. Die aktivierte JAK phosphoryliert und aktiviert den Signal Transducer and Activator of Transkription (STAT6). Der Tyrosinphosphorylierung von STAT6 folgt die Dimerisierung der STAT6-Moleküle mit anschließender Translokation in den Kern. STAT6 bindet an eine bestimmte Stelle der DNA in der Promotorregion von IL 4 getriggerten Genen [86]. Ein weiterer Signalweg stellt die Aktivierung von Insulin receptor substrate 2 (IRS-2) dar. IRS-2 bindet an IL4R α [87] und wird von JAK1 und JAK3 phosphoryliert. Es kommt zur Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) mit folgender Aktivierung der Akt [88]. Dieser Signalweg vermittelt vermutlich Wachstums- sowie Überlebenssignale in einigen Zelltypen [88,89] (siehe Abbildung 2).

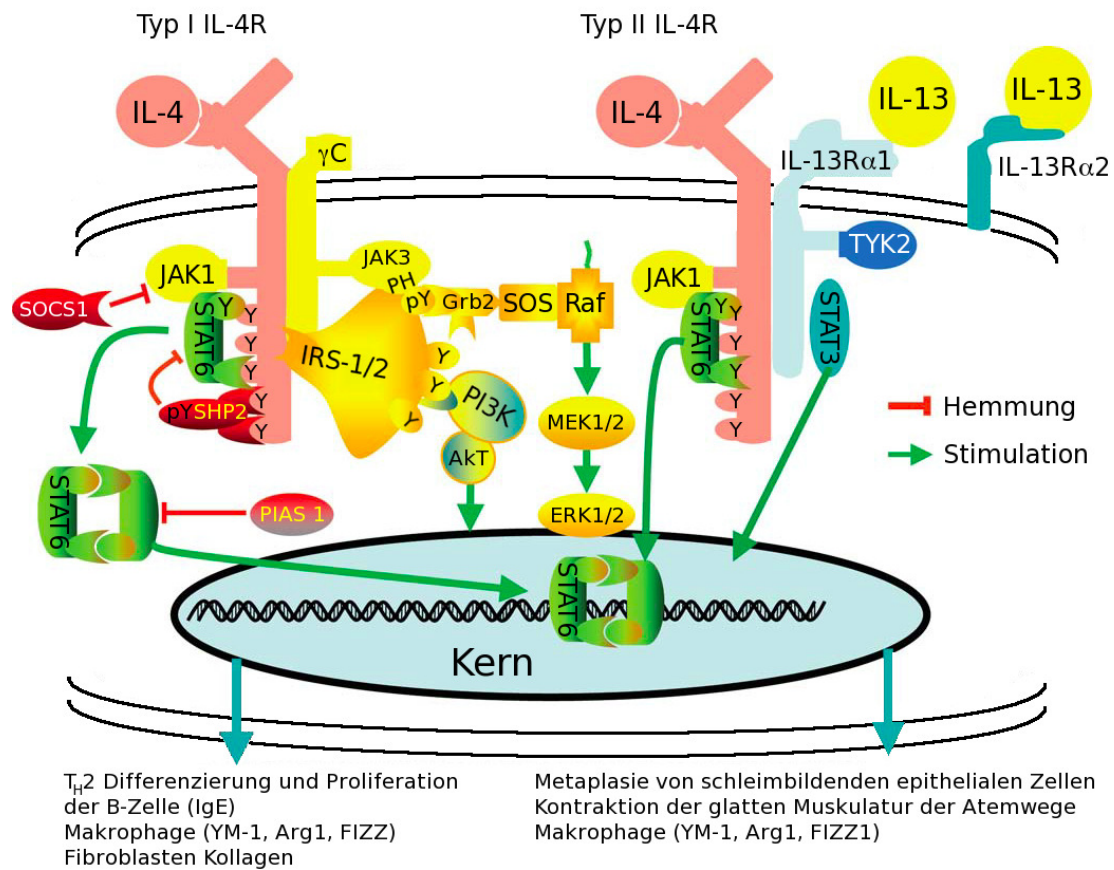


Abbildung 2: Darstellung der Signalwege von IL 4 und IL 13
 Modifiziert nach [86], Erläuterung siehe Text

In Zellen einer Kolonkarzinomzelllinie phosphoryliert IL 4 nur JAK1, JAK2 sowie Tyrosinkinase-2, jedoch nicht JAK3. Die Phosphorylierung findet ohne Einbeziehung der γ c-Kette statt [90]. Die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 durch IL 4 Bindung wird in Zusammenhang mit einem wachstumshemmenden Signal in kolorektalen Karzinomzellen gebracht [91].

Interleukin 4 wird vor allem von CD4⁺-TH₂-Zellen produziert [92], zudem von Basophilen [93] und Mastzellen [94].

Es zeigt stimulierende Effekte auf die B-Zell-Proliferation und Differenzierung, hat aber auch auf viele andere Zellen wachstumsfördernden Einfluss [95]. IL 4 ist das wichtigste Zytokin im Bezug auf die Induktion von TH₂-Zellen [96]. Neben diesen Funktionen spielt es bei der Produktion von Immunglobulin (Ig) E eine wichtige Rolle [97]. Eine weitere Aufgabe von IL 4 stellt die Expression bestimmter Zelloberflächenmoleküle, die für immunologische Prozesse wichtig

sind, dar [98]. Außerdem von Bedeutung ist seine Rolle bei der Immunregulation mit starker Gewichtung der TH₂-Zelltyp-Antworten [99].

IL 4 zeigt starke antiinflammatorische Effekte, welche über unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden [100,101]. Auf Mastzellen wirkt IL 4 proliferationsfördernd und stimuliert die Histaminfreisetzung [102]. IL 4 hat einen induzierenden Effekt auf die Endothelzellproliferation der Kapillaren [103]. In experimentellen Modellen zu bestimmten Krankheiten konnte eine protektive und antiinflammatorische Rolle von IL 4 bei Autoimmunerkrankungen gezeigt werden [53].

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass IL 4 eine gewisse antitumoröse Aktivität aufweist, wie in Mausmodellen beobachtet wurde [104]. Ein direkter antitumoröser Effekt durch IL 4 wird unter anderem auch für Karzinome des Darms angenommen [105,106]. Des Weiteren verändert IL 4 eventuell die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung von kolorektalen Karzinomen [107].

In neueren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass IL 4 protektiv auf bestimmte Zellen des Kolonkarzinoms in Bezug auf die Apoptose wirkt [108]. Es wird vermutet, dass es sich um sogenannte Cancer Stem Cells (CSC) handelt, die das Tumorwachstum aufrechterhalten [109,110]. IL 4 wird in Kolonkarzinomzellen sehr stark exprimiert und trägt vermutlich zur Resistenz gegen Chemotherapeutika-induzierten Zelltod der CSC bei. Das Überleben dieser Zellen wird wahrscheinlich durch erhöhte Expression antiapoptotischer Proteine vermittelt [108]. Die bekannte Korrelation zwischen chronischer Entzündung und dem Kolonkarzinom lässt einen Einfluss inflammatorisch wirkender Zytokine auf die Tumorentwicklung vermuten. Bei erkrankten Patienten konnten höhere TH₂-Zellzahlen gefunden werden. Diese sind für die Produktion von IL 4 und IL 6 verantwortlich. Die hohe Konzentration von IL 4 in der Tumorumgebung hat wahrscheinlich einen immunsuppressiven Effekt und erleichtert so das Tumorwachstum. Auch die Epithelzellen des Kolonkarzinoms selbst sowie CSCs können Interleukine autokrin produzieren. Es zeigte sich, dass IL 4 nicht nur CSCs sondern auch Mature Cancer Cell (MCCs) vor Apoptose schützen kann [111].

Das aktivierte STAT6-Molekül induziert die Expression verschiedener Gene, die mit Änderung der Zelldifferenzierung, des Wachstums sowie der Entwicklung von Apoptoseresistenz in Zusammenhang stehen. Kolonkarzinomzellen (HT29-Zelllinie) mit aktiver STAT6 gehen mit einer Resistenz gegen Apoptose und mit einem höheren Grad an Invasivität und Metastasierungshäufigkeit einher. Hier konnte eine erhöhte Expression antiapoptotischer und prometastatischer Gene nachgewiesen werden. Die Vergleichszellen (Caco-2) mit defekter STAT6 waren anfällig für vermehrten Zelltod und zeigten geringere Invasivität sowie Metastasierungsfähigkeit. Es ließen sich vermehrt auftretende proapoptotische, proinflammatorische sowie antimetastatische Gene nachweisen. Somit scheint ein aktiver STAT6-Signalweg nicht nur mit Zellwachstum und Apoptoseresistenz in Zusammenhang zu stehen, sondern auch Einfluss auf die Karzinogenese durch Unterstützung der Invasions- bzw. Metastasierungsfähigkeit zu haben [112]. Sowohl für IL 4 als auch für IL 13, zwei TH₂-Typ Zytokine, ließen sich inhibierende Wirkungen auf die Zelladhäsion zwischen Kolonkarzinomzellen zeigen. Da veränderte Zell-Zellkontakte vermutlich die Invasions- und Metastasierungsfähigkeit mitbestimmen, könnte hier ein Zusammenhang bestehen [113].

1.3.3 Interleukin 5

Interleukin 5, das 1987 isoliert wurde [114], befindet sich wie IL 4 und IL 13 [115] auf dem Chromosom 5 [116]. Der Rezeptor für dieses Interleukin besteht aus zwei Komponenten, der α -Kette und der β -Kette, welche mit der β -Kette des Rezeptors für den Granulocyte-Makrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) identisch ist [117]. IL 5 wird über die α -Kette gebunden. Diese Bindung wird durch die Interaktion mit der β -Kette verstärkt. Für die Signaltransduktion sind die proximalen Anteile der zytoplasmatischen Domäne beider Ketten entscheidend [118]. Es kommt zur Dimerisierung mit Verbindung der beiden Ketten über Disulfidbrücken [119]. Anschließend folgt eine Aktivierung von JAK2 oder anderen Tyrosinkinase sowie eine Tyrosin [120] - und Serinphosphorylierung [121] des zytosolischen Anteils der β -Kette [122]. Über IL 5 können verschiedene Signalwege aktiviert werden. Hier soll genauer auf den Ras/ERK- sowie den JAK2/STAT-Weg eingegangen werden. Nach einigen Zwischenschritten, an denen verschiedene Adaptoren, unter anderem GTPasen, beteiligt

sind, kommt es über den Ras/ERK-Signalweg zur Aktivierung von Ras, einem p21 G-Protein. Im Weiteren findet die Aktivierung von Raf-1 durch Tyrosinkinasen statt. Raf-1 reguliert ERK, das der MAPK-Familie angehört, mit Hilfe der MAK oder der ERK Kinase. Dieser Signalweg ist unter anderem wichtig zur Überlebenssicherung bestimmter Zelltypen. Im zweiten Signalweg wird durch JAK2 im Falle von IL 5 hauptsächlich STAT5 phosphoryliert. Dieses translatiert in den Kern und bindet über das γ -Activating Sequence Motiv (GAS-Motiv) in der Promoterregion bestimmter Gene. IL 5 kann mit diesen Signalwegen unterschiedliche Effekte auf Eosinophile ausüben [123] (siehe Abbildung 3).

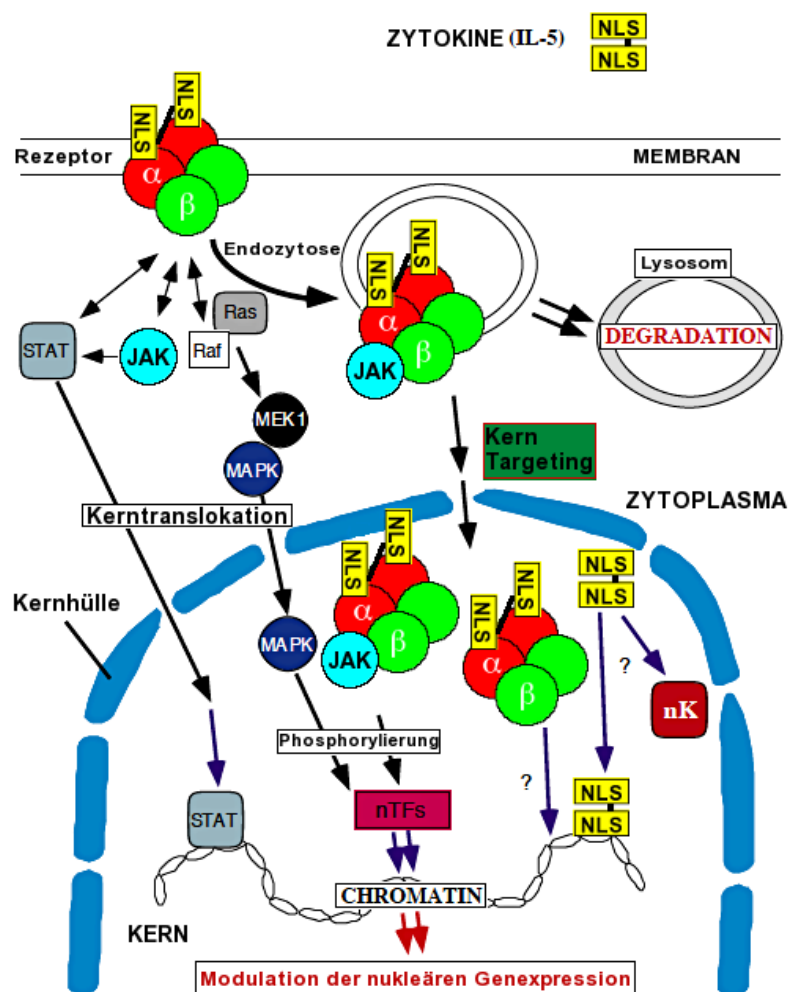


Abbildung 3: Darstellung der Signalwege IL 5
Modifiziert nach [124], Erläuterung siehe Text

IL 5 dient als Hauptregulator der Reifung [125] und Differenzierung [126] von Eosinophilen und der Entwicklung einer Eosinophilie [127]. Es verstärkt die

Chemoattraktion von Eosinophilen [128] und sorgt für deren Aktivierung [129]. Außerdem unterstützt IL 5 das Überleben der Eosinophilen durch Verzögerung der Apoptose [127]. All dies trägt in bestimmten Situationen zur Immunabwehr gegen einige Pathogene bei. Jedoch spielen die Effekte von IL 5 auch in der Pathogenese von Erkrankungen wie Asthma und dem Syndrom der Hypereosinophilie [130] sowie bei bestimmten inflammatorischen Krankheiten, die durch Eosinophile getriggert sind, eine wichtige Rolle [131]. Für die erhöhte Ig E Produktion, die oft bei Erkrankungen mit Eosinophilie vorliegt, ist jedoch IL 4 verantwortlich [132,133].

Des Weiteren nimmt IL 5 Einfluss auf die Ig A Produktion. Mit der Fähigkeit, die Ig A Sekretion [134] anzuregen, trägt IL 5 eventuell zur Bekämpfung bakterieller Infektionen des Gastrointestinaltrakts sowie der Mucosa bei [135]. Außerdem ist IL 5 bei der Reifung von B-Zellen sowie deren Wachstum und Differenzierung bedeutsam [127,136]. Interleukin 5 wird hauptsächlich von TH₂-Lymphozyten produziert [127], darüber hinaus von Mastzellen [137] und Eosinophilen [138].

Eine Eosinophilie lässt sich des Weiteren bei vielen verschiedenen Tumoren finden. In einigen Fällen geht diese Erhöhung mit einer besseren Prognose einher [139], auch für maligne Kolontumoren konnte dies gezeigt werden [140]. Die zuvor erwähnten antitumorösen Effekte von IL 4 scheinen mit der Zytotoxizität durch Eosinophile in Zusammenhang zu stehen [141]. Andererseits spricht eine tumorassoziierte Erhöhung der Eosinophilenzahlen im peripheren Blut für Disseminierung, späte Manifestation und schlechte Prognose [142]. In einer Studie mit disseminiertem Kolonkarzinom bestätigte sich dies [143]. Hier wurde die periphere Eosinophilie mit der Produktion bestimmter Zytokine (IL 3, IL 5, GM-CSF) durch das Tumorgewebe selbst in Verbindung gebracht. Bei Tumorresektion ging die Eosinophilie zurück und konnte bei Tumorrezidiv wieder vermehrt beobachtet werden.

Einen inhibierenden und suppressiven Effekt auf das Tumorstadium durch IL 5 ließ sich in Mausmodellen, in die Kolonkarzinomzellen C26 eingebracht wurden, feststellen. Die C26-Zellen wurden zuvor mit mIL 5 transfiziert und produzierten selbst IL 5 [144].

IL 5 kann als proinflammatorisches Interleukin bei Patienten mit Colitis ulcerosa gefunden werden. Auf Grund dessen wurde der Einfluss von IL 5 auf kolorektale Karzinomzellen untersucht. Es zeigte sich, dass IL 5 und in geringerem Maße auch IL 1beta den durch IGF-II induzierten Wachstumseffekt auf Kolonkarzinomzellen (Caco-2-Zelllinie) verstärken. Da sich keine IL 5 Rezeptoren auf diesen Zellen nachweisen ließen, sich jedoch eine Expression des IGF-Rezeptors zeigte, wird die Existenz eines bisher unbekanntes Rezeptors vermutet. Andererseits ist es vorstellbar, dass IL 5 die Signaltransduktion des IGF-1R verstärkt bzw. durch Konformationsänderung des Rezeptors die Bindung von IGF-II erhöht wird. Diese Wirkung von IGF-II sowie die synergistische Wirkung von IL 5 stellen einen möglichen Mechanismus dar, der das erhöhte Risiko für die Entstehung von Kolonkarzinomen bei Colitis ulcerosa Patienten mit beeinflusst [69].

1.3.4 Interleukin 8

Interleukin 8 gehört zu den Chemokinen und ist ein Mitglied der CXC-Familie [145]. Es existieren zwei Rezeptoren für IL 8 [146]. Der Interleukin 8 Rezeptor Typ 1 (IL8RA) [147], der selektiv IL 8 und Granulocyte-Chemotactic Protein-2 (GCP-2) bindet [148], sowie der Interleukin 8 Rezeptor Typ 2 (IL8RB) [146], der auch andere Mitglieder der Chemokinfamilie binden kann.

Beide Rezeptoren gehören den G-Protein gekoppelten Rezeptoren an. Nach Bindung des Chemokins kommt es zur Aktivierung verschiedenster heterotrimeren G-Proteine ($G\alpha\beta\gamma$). Diese wiederum setzen unterschiedliche Signalwege in Gang. Es kommt zur Aktivierung von PI3-Kinase mit Phosphorylierung von Akt [148], oder der Phospholipase C (PLC) [148,149] mit konsekutiver Phosphorylierung von Proteinkinase C (PKC). Ein dritter Weg ist die Aktivierung des RasGTPs mit der darauf folgenden Signalkaskade über Raf, Mek, Erk1. Diese Signalwege führen zur Translation bestimmter Proteine und zur Regulation der Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren haben Einfluss auf Zellproliferation, Metabolismus und Überleben von Zellen, Angiogenese sowie Invasionsfähigkeit bestimmter Zellen. Abgesehen davon können durch IL 8 auch monomere G-Proteine (RhoGTPase, RacGTPase) sowie non-receptor Tyrosinkinasen aktiviert werden. Diese Signalwege haben un-

ter anderem Einfluss auf die Beschaffenheit des Zytoskeletts [148]. Außerdem kann es zur Phosphorylierung des Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2) in Endothelzellen mit Einfluss auf die Regulation der Endothelbarriere kommen [148,150] (siehe Abbildung 4).

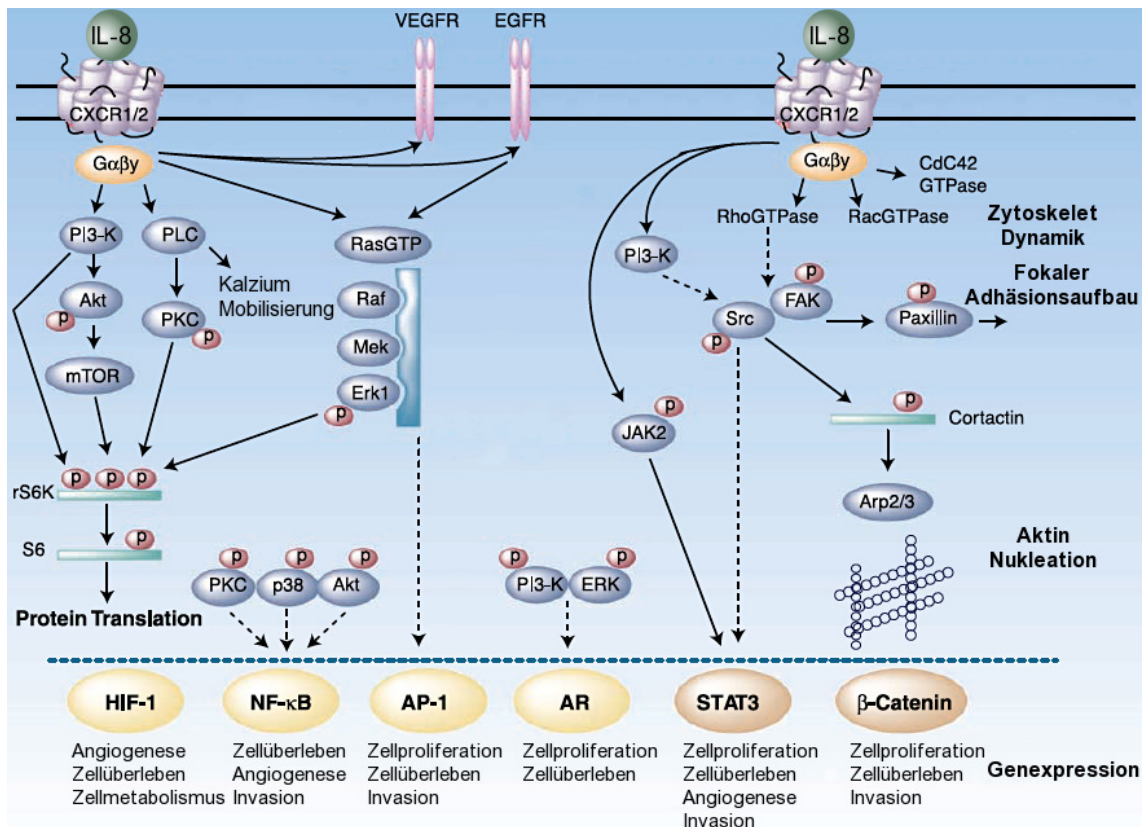


Abbildung 4: Darstellung der Signalwege von IL 8
Modifiziert nach [148], Erläuterung siehe Text

Die Produktion von IL 8 erfolgt vor allem durch Neutrophile, Monozyten und Makrophagen sowie T-Zellen. Aber auch Zellen wie Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Hepatozyten, Chondrozyten und Mesothelzellen synthetisieren dieses Chemokin [151]. Stimuli für die IL 8 Produktion und Regulation der Expression sind unter anderem inflammatorische Faktoren, z.B. andere Zytokine, Hormone und chemischer Stress, wie Chemotherapie [148]. IL 4 kann auf die IL 8-Produktion als Inhibitor wirken [152].

Interleukin 8 zeigt chemotaktische und aktivierende Wirkung vor allem auf Neutrophile [153], aber stellt auch für Basophile und T-Lymphozyten einen chemo-

taktischen Faktor dar [154]. Interleukin 8 ist ein proinflammatorisch wirkendes Interleukin. Daher hat es große Bedeutung in Hinblick auf inflammatorische, infektiöse sowie autoimmunologische Erkrankungen [154-156]. Des Weiteren verfügt IL 8 über proangiogenetische Aktivität und spielt eine Rolle bei der Entwicklung zahlreicher maligner Prozesse [157]. Die proangiogenetischen Effekte von IL 8 werden alle an Endothelzellen vermittelt. Dies sind Steigerung der Proliferation, chemotaktische Effekte, längeres Überleben der Zellen sowie Aktivierung von Proteasen [158]. Einiges spricht dafür, dass verschiedenste Chemokine mitverantwortlich für die Chronifizierung von Entzündungen, die daraus entstehenden Karzinomzellen und die Infiltration von Tumorgewebe mit inflammatorischen Zellen, sind. Als Beispiel hierfür sei die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms aus einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung genannt [159,160].

Erhöhte Expressionen von IL 8 und/oder seiner Rezeptoren lassen sich in malignen Zellen, infiltrierenden Neutrophilen, Endothelzellen und tumorassoziierten Makrophagen nachweisen. Dies lässt vermuten, dass IL 8 als regulierender Faktor in der Tumorregion wirkt [148]. Im Bezug auf Kolonkarzinomzellen wird IL 8 ein Einfluss bei der Proliferation und Angiogenese zugesprochen [161,162]. Auch für die beiden IL 8 Rezeptoren zeigt sich eine wichtige Funktion in der Angiogenese und Tumorprogression [146,147,163-165]. Kolonkarzinomzelllinien produzieren konstitutiv IL 8 [166,167] und auch in kolorektalen Zellen konnten sowohl mRNA von IL 8 als auch das IL 8 Protein gefunden werden [161]. Im Weiteren korreliert die Expression von IL 8 und seiner Rezeptoren in Kolonkarzinomzellen mit unterschiedlicher Metastasierungsfähigkeit. In nicht metastatischen Kolonkarzinomzellen war die IL 8 Expression signifikant geringer als in Zellen mit starker Metastasierung. Ähnliches gilt für die IL 8 Rezeptoren. Somit kann eine Assoziation zwischen IL 8 Expression und Metastasierung des Kolonkarzinoms sowie der Aggressivität des Tumors in Betracht gezogen werden. In dieser Studie wurde außerdem beobachtet, dass IL 8 wahrscheinlich als autokriner und/oder parakriner Wachstumsfaktor auf Kolonkarzinomzellen wirkt und die Bindungsfähigkeit der Tumorzellen an Endothelzellen erhöht [168].

1.3.5 Interleukin 13

IL 13 [169,170] ist ein Interleukin dessen Eigenschaften teilweise denen des IL 4 sehr ähnlich sind [171]. Der Rezeptor für Interleukin 13 besteht aus einem heterodimeren Komplex aus der IL4R α -Kette und dem IL13R α 1-Protein [172]. Dieser Rezeptor ist identisch mit dem IL4RII, folglich findet auch eine Bindung von IL 4 statt. Die Bindung von IL 13 findet über den IL13R α 1-Teil statt, jedoch wird die Affinität durch den Komplex mit der IL4R α -Kette verstärkt. Somit kann IL 13 nicht an den IL4RI binden [81,86]. Das IL13R α 1-Protein kann aber auch in monomerer Form als Rezeptor für IL 13 fungieren [173], jedoch kann dann IL 4 nicht gebunden werden [81]. Darüber hinaus existiert mit IL13R α 2 noch ein zweites IL 13 Bindungsprotein [174]. Seine biologische Funktion ist jedoch noch unklar, möglicherweise stellt es einen Decoy-Rezeptor dar. Es bindet IL 13 mit hoher Affinität, es findet aber keine Signaltransduktion statt [175-177].

Die Signaltransduktion erfolgt hauptsächlich über den JAK/STAT6-Signalweg [178,179] und wird über die IL4R α vermittelt [177]. IL 13 aktiviert die JAK1, JAK2 und Tyrosinkinase 2 (Tyk2) [86]. Nach Aktivierung der verschiedenen JAKs, die mit dem zytoplasmatischen Teil des Rezeptors assoziieren, kommt es zur Tyrosinphosphorylierung der IL4R α -Kette. Dadurch kann wiederum STAT6 phosphoryliert werden. Phosphorylierte STAT6-Moleküle dimerisieren, translatieren in den Kern und binden an die Promotorregion bestimmter Gene, die von IL 13 und/oder IL 4 reguliert werden [86,177] (siehe Abbildung 5).

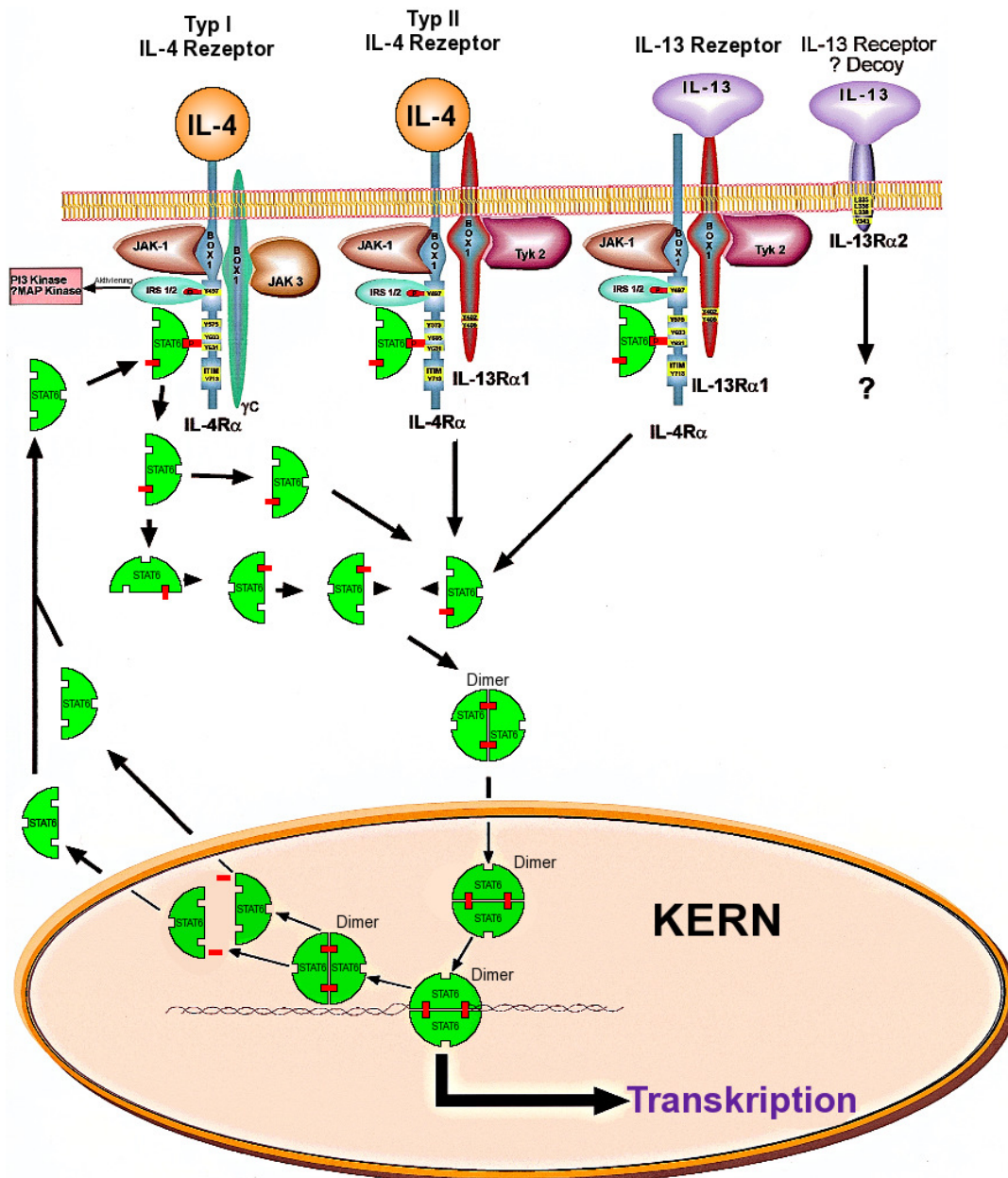


Abbildung 5: Darstellung der Signalwege von IL 4 und IL 13
 Modifiziert nach [177], Erläuterung siehe Text

Der IRS-2-Signalweg wird durch IL 13 nur schwach angeregt, da hierfür vermutlich hauptsächlich der IL4R I, an den IL 13 nicht binden kann, entscheidend ist. Dafür spricht auch, dass JAK3 von der γ c-Kette gebunden wird und dieses unter anderem für die Phosphorylierung von IRS-2 verantwortlich ist [86]. Interleukin 13 wird hauptsächlich von aktivierten TH₂-Zellen synthetisiert [177]. Weitere Zellen die IL 13 sezernieren können sind B-Zellen [180], Mastzellen [94], Basophile [93,181], natürliche Killerzellen [182,183] sowie dendritische Zellen [184].

Dieses Interleukin zeigt in einigen Bereichen ähnliche Eigenschaften wie IL 4, was mit der gemeinsamen Rezeptorkette IL4R α in Zusammenhang steht. Es hat immunmodulatorische Eigenschaften und ist von großer Bedeutung in der Pathogenese allergischer Entzündungsreaktionen, vor allem im Bereich der Atemwege. Hier scheint IL 13 für die Hyperreagibilität und die vermehrte Sekretion von Mucus hauptverantwortlich zu sein [177]. Auf B-Zellen zeigt IL 13 die gleichen Effekte wie IL 4 mit Förderung der Proliferation, der IgE Produktion [185] und der Expression bestimmter Zelloberflächenmarker [186]. Außerdem kann IL 13 die Aktivierung und das Überleben von Eosinophilen induzieren [187-189]. Es hat Einfluss auf die Chemotaxis [187] und Rekrutierung von Eosinophilen [187-189]. Wichtig für die Eosinophilenrekrutierung ist die Wirkung von IL 13 auf Endothelzellen mit Induktion von Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) [190].

In Bezug auf allergische Reaktionen zeigt IL 13 entzündungsfördernde Eigenschaften, in einigen anderen Situationen wirkt IL 13 jedoch als Suppressor der inflammatorischen Reaktion [177]. IL 13 inhibiert die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren in Monozyten und Makrophagen, wie e.g. Prostaglandine [191] und einige Zytokine (IL 1, IL 8) [192], und zeigt somit antiinflammatorische Wirkung [177]. Dies könnte im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis [193,194] oder chronisch entzündlicher Darmerkrankungen von Nutzen sein [53].

IL 13 wird eine Schlüsselrolle in der Genese der Colitis ulcerosa zugeschrieben. Viele Defekte der Mucosa scheinen durch Effekte des IL 13 auf Epithelzellen ausgelöst zu werden. Es zeigen sich Veränderungen der tight junctions, Anregung der Apoptose und Inhibition der Zellmigration nach Verletzung des Epithels [195]. In dieser Studie wurde festgestellt, dass sich sowohl das IL13R α 1-Protein als auch die IL4R α -Kette in den verwendeten Kolonzellen finden lassen. Zuvor zeigte sich, dass die Rezeptorkomplexe aus diesen beiden Ketten bestehen und die γ -Kette in Kolonepithelzellen nicht involviert zu sein scheint [90]. Von großem Interesse ist die Tatsache, dass IL 13 einen positiven Effekt in Modellen gegen Tumorentwicklung zeigt [196]. Ein Rattenmodell des Kolonkarzinoms lässt ferner beobachten, dass IL 13 eine tumorinduzierte Immunsuppres-

sion umkehren kann [197]. In einer anderen Studie jedoch konnte IL 13 im Gegensatz zu IL 4 weder in normalen Kolonepithelzellen noch in Epithelzellen des Kolonkarzinoms oder CSC gefunden werden [108]. In glatten Muskelzellen und die Lamina propria infiltrierenden Zellen der normalen Darmmucosa lässt sich IL 13 nachweisen [198]. Der IL13R α 2 konnte jedoch in Darmepithelzellen nachgewiesen werden, mit einer höheren Expression im gesunden Gewebe [108]. Es ist bekannt, dass die Induktion einer TH₁-Immunantwort und Induktion von zytotoxischen T-Zellen in Zusammenhang mit einer Tumorregression stehen [180]. IL 13 als TH₂-Typ Zytokin stellt einen negativen Regulator dieser Reaktion dar und wurde als ein wichtiges Zytokin in der Inhibition der Reaktion von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) gegen den Tumor identifiziert. IL 13, von natürlichen Killerzellen (NKZ) sezerniert, zeigt einerseits suppressive Effekte auf eine Immunantwort gegen maligne Zellen [199]. Andererseits konnte jedoch auch beobachtet werden, dass IL 13 tumorregressive Eigenschaften, vermittelt durch Granulozyten und Makrophagen, hat [196,200]. Wie für IL 4 beschrieben steht die Aktivierung des STAT6-Signalwegs in Zusammenhang mit Apoptoresistenz sowie erhöhter Metastasierungs- bzw. Invasionsfähigkeit des Kolonkarzinoms [112]. Sowohl für IL 4 als auch für IL 13, zwei TH₂-Typ Zytokine, ließen sich inhibierende Wirkungen auf die Zelladhäsion zwischen Kolonkarzinomzellen zeigen. Da veränderte Zell-Zellkontakte vermutlich die Invasions- und Metastasierungsfähigkeit mitbestimmen, könnte hier ein Zusammenhang bestehen [113].

1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen Interleukinen (1beta, 4, 5, 8 sowie 13) in Bezug auf die HDGF-Expression in vier Zelllinien von Kolonepithelzellen (Geki-2, HT29, SW480, SW620) untersucht.

Wie im vorstehenden Kapitel aufgeführt, zeigen die ausgewählten Zytokine sehr differente Effekte auf essentielle Prozesse der Karzinogenese wie die Angiogenese, die Proliferation der Tumorzellen sowie deren Invasions- und Metastasierungspotential. Alle verwendeten Interleukine sind zudem essentielle Regulatoren in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und in der Genese von Kolonkarzinomen vor diesem Hintergrund. Zwar konnte für das onkofetale Protein HDGF für verschiedene Tumorentitäten eine prognostische Bedeutung gezeigt werden, jedoch liegen für diese im kolorektalen Karzinom noch keine eindeutigen Daten vor. Ebenso besteht momentan nur eine unzureichende Datenlage über Funktion und Regulation von HDGF. Auch scheint HDGF eine Rolle in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen zu haben, die molekularen Zusammenhänge sind hier ebenfalls bislang noch nicht komplett aufgeklärt. Daher soll am Model kolorektaler Karzinomzelllinien der Einfluss der genannten Zytokine auf die HDGF-Regulation dargestellt werden.

Die Zelllinien wurden mit den jeweiligen Interleukinen inkubiert und die relative HDGF-Expression im Verhältnis zur ubiquitär identisch exprimierten GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) mittels semiquantitativer REAL TIME-RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) untersucht. Dies soll einen besseren Einblick in die noch unklare Regulation von HDGF und dessen Rolle in der kolorektalen Karzinogenese eröffnen; zudem könnten sich mögliche Wege der gezielten Beeinflussung der HDGF-Expression aufzeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Gefrierschrank -80 °C: Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
- Gefrierschrank -20 °C: Premium NoFrost, Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
- Abzug: Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland
- Vortex: A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
- Pipetten: Eppendorf, Größen: 0,1-2,5µl; 0,5-10µl; 2-20µl; 10-100µl; 20-200µl; 200-1000µl; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipetten: Finnpiquette®, Größen: 0,5-10µl; 10-100µl, Thermo Lab-systems Oy, Helsinki, Finnland
- Zentrifuge: Biofuge fresco, Heraeus; Thermo Scientific, Hanau, Deutschland
- Spectrophotometer: Ultraspec 2100 pro, UV/Visible, Biosciences, Amersham; Freiburg, Deutschland
- Quarzglasküvette: Suprasil®, Hellma®, Mühlheim, Deutschland
- PCR-Maschine: Gene Amp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
- Realtime-PCR-Maschine: iCycler™iQ, BioRad, München, Deutschland

2.1.2 Zubehör

- Pipettenspitzen: ep TIPS, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen: Finntip®, Thermo Fisher scientific Oy, Vantaa, Finnland
- Safe-lock Tubes 1,5ml: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Collection Tube 2ml: Qiagen®, Hilden, Deutschland
- Collection Tube 1,5ml: Qiagen®, Hilden, Deutschland
- RNeasy Mini spin Column: Qiagen®, Hilden, Deutschland
- Reaction Tube with Cap 0,2ml: Micro Amp®, Applied Biosystems, Singapur
- PCR- Platte: 0,2ml ultra rigid semi-skirted 96-well PCR plate natural, Thermo-Fast®, Thermo Scientific, ABgene®, Epsom, Großbritannien
- Caps: optically clear flat 8 cap strips natural, Ultra clear cap strips, Thermo Scientific, ABgene®, Epsom, Großbritannien

2.1.3 Chemikalien

- Minimum Essential Medium (MEM): Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- RPMI 1640 Medium: Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- Fetal Bovin Serum (FBS): Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- HEPES Buffer: Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- L-Glutamin: Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin-Lösung: Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- No Essential Amino Acid (NEAA): Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- MEM-Vitamine: Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- Gentamycin: Collaborative Biomedicals, Bedford, Massachusetts, USA

- Fungizone: Collaborative Biomedicals, Bedford, Massachusetts, USA
- recombinant, human Epidermal Growth Factor (rhEGF): Collaborative Biomedicals, Bedford, Massachusetts, USA
- Transforming Growth Factor α (TGF α): Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
- Mitomycin-C plus Serumextender: Collaborative Biomedicals, Bedford, Massachusetts, USA
- peqGold TriFast™: Peqlab, Erlangen, Deutschland
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 0,1% Bovine Serum Albumin (BSA): Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- Ethanol: J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- 2-Propanol: formolecular biology, minimum 99%, Sigma®-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Chloroform: minimum 99%, Sigma®-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Diethylpyrocarbonat (DEPC): Sigma®-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2-Mercaptoethanol: 98+%, Sigma®-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Reaktions-Kits/ Chemikalien-Kits

- RNeasy® Mini Kit: Qiagen®, Hilden, Deutschland
 - Buffer RLT–lysis buffer – contains guanidine thiocyanate
 - Buffer RPE–wash buffer
 - RNase-free water
 - Collection Tubes 2ml
 - Collection Tubes 1,5ml
 - RNeasy Mini spin Column

- RNase – Free DNase Set: Qiagen®, Hilden, Deutschland
 - Buffer RDD–DNA digest buffer
 - DNase 1: Sensitizer – contains desoxyribonuclease
 - RNase-free water
- iScript™ cDNA Synthesis Kit: BioRad, München, Deutschland
 - 5x iScript Reaction Mix
 - iScript Reverse Transcriptase
 - Nuclease-free water
- Absolute™ QPCR Mix: Thermo Scientific, ABgene®, Epsom, Großbritannien

2.1.5 Sonden und Primer

- probe HDGF: 5` - TTT CCC ACT CCA AGC CCA GCC CAT – 3`,
MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
- antisense HDGF: 5` - GGA GAA GAC ATG GCT CTG ACT C – 3`,
MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
- sense HDGF: 5` - AAC CTG CTC TCC TCT TCT ACT CA – 3`,
MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
- human GAPDH (20): pre-developed TaqMan® Assay Reagents,
Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA

2.1.6 Interleukine

- Interleukin 1 beta: human, recombinant, expressed in E. coli, Sigma®-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
- Interleukin 4: human, recombinant, expressed in E. coli, Sigma®-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
- Interleukin 5: human, recombinant, expressed in Sf 21 insect cells, Sigma®-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
- Interleukin 8: human, recombinant, expressed in E. coli, Sigma®-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
- Interleukin 13: human, recombinant, expressed in E. coli, Sigma®-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.1.7 Zellkulturen

- HT29 Zelllinie: Zellen eines humanen Kolonadenokarzinoms Grad 1, aus dem Primärtumor isoliert von J. Fogh 1964, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

Medium: MEM, 10 % FBS, 0,4% HEPES Buffer, 1% NEAA, 2mM L-Glutamin , 2% Penicillin-Streptomycin-Lösung
- SW480 Zelllinie: Zellen eines humanen Kolonadenokarzinoms Grad 4, aus dem Tumor eines 50-jährigen Kaukasiers, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

Medium: RPMI 1640 Medium, 10% FBS, 2% Penicillin-Streptomycin

- SW620 Zelllinie: Zellen einer Lymphknotenmetastase eines kolorektalen Adenokarzinoms, gleicher Primärtumor wie SW480, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

Medium: DMEM, 10% FBS, 5% Penicillin-Streptomycin

- Geki-2 Zelllinie: Zellen eines Kolonadenoms, isoliert aus dem Rektum einer 57-jährigen Frau, gastroenterologisches Labor, Medizinische Klinik, Würzburg, Deutschland [201].

Medium: DMEM, 1% MEM-Vitamine, 10% FBS, 20% rhEGF, 10% TGF α , 0,2% Fungizone, 0,1% Mitomycin-C plus Serumextender, 1,25% Gentamycin, 1% Penicillin-Streptomycin

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur, Inkubation mit Interleukinen

Pro Zelllinie werden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät und mit 4ml Medium, welches für die Zelllinien spezifisch ist, bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Kultivierung aller Zelllinien findet über 72h prae incubationem statt, lediglich bei Geki-2 über 96h. Anschließend werden die Zellen in serumfreiem Medium unter Zusatz der jeweiligen Interleukine in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Inkubation erfolgt für 1h, 8h sowie 24h bei 37°C und 5% CO_2 (siehe Inkubationstabelle). Zellen die nur im Medium ohne Zusatz inkubiert werden, dienen als Kontrolle. Alle Zellkulturansätze werden mindestens dreimal wiederholt.

Die Inkubationstabelle zeigt sich wie folgt:

Inkubationszeit	Interleukinkonzentration
0h	Medium, Kontrolle
1h	Interleukin 1ng/ml
8h	Interleukin 1ng/ml
24h	Interleukin 1ng/ml
1h	Interleukin 5ng/ml
8h	Interleukin 5ng/ml
24h	Interleukin 5ng/ml
1h	Interleukin 10ng/ml
8h	Interleukin 10ng/ml
24h	Interleukin 10ng/ml
1h	Interleukin 50ng/ml
8h	Interleukin 50ng/ml
24h	Interleukin 50ng/ml
24h	Medium (bei IL 1beta, IL 4, IL 8) PBS/ 0,1% BSA (bei IL 5, IL 13)

Die Interleukine 1beta, 4 und 8 werden zuvor in destilliertem Wasser gelöst. Für die anderen beiden Interleukine wird PSB/ 0,1% BSA zum Lösen verwendet. Zur Verdünnung auf die vier verschiedenen Konzentrationen dient das Kulturmedium. Alle Zellen werden nach dem gleichen Schema inkubiert. Für IL 8 gibt es bei den Geki-2-Zellen eine Ausnahme: Auf Grund der ersten Versuchsergebnisse der übrigen Zelllinien wird hier auf eine Konzentration von 5ng/ml verzichtet.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit werden die Zellen mit 1ml Trifast pro 25cm² Kulturflasche gelöst und die entstehende Zellsuspension in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Aus diesen gelösten Zellen kann im Folgenden

die RNA isoliert werden. Zur Aufbewahrung kann die Zellsuspension bei -80°C eingefroren werden.

2.2.2 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA wird den Zellen, die in Trifast gelöst wurden, pro Milliliter Trifast 0,2ml Chloroform zugegeben. Die Proben werden nun 15 Sekunden gevortext, anschließend 3-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei maximaler Drehzahl für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Im Eppendorf Reaktionsgefäß bilden sich drei Phasen, unten setzt sich eine rote Phase mit Trifast und Chloroform ab, dazwischen die Interphase mit DNA und Proteinen sowie eine oben schwimmende wässrige Phase, in der die RNA enthalten ist. Es werden nun je Probe mindestens $500\mu\text{l}$ der wässrigen Phase in neue Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und 0,5ml Isopropanol pro eingesetztem ml Trifast zugegeben. Nach dem Vortexen werden die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur 5-10 Minuten gefällt und die Ansätze anschließend für 10 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Im sich bildenden Pellet am Boden des Eppendorf Reaktionsgefäßes befindet sich unter anderem die RNA. Nach Abgießen des Isopropanols wird das Pellet durch Zugabe von 1ml 75%igem Ethanol (aus drei Teilen 100%igem Ethanol und einem Teil DEPC Wasser hergestellt) und 5-minütiger Zentrifugation bei maximaler Drehzahl gewaschen. Der Ethanol wird verworfen und der Waschvorgang wird wiederholt. Nach Abgießen und Abziehen des restlichen Ethanols mittels Pipette, wird das Pellet für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in $100\mu\text{l}$ DEPC- H_2O gelöst. Die Proben können bis zur Weiterbehandlung bei -80°C eingefroren werden.

2.2.3 Aufreinigung und DNase-Behandlung

Für diesen Arbeitsschritt werden der RNeasy Mini Kit und das RNase-Free DNase Set verwendet. Zunächst werden dem RLT-Puffer pro gebrauchten ml $10\mu\text{l}$ 2-Mercaptoethanol zugesetzt und kurz gevortext. Zusätzlich wird der RPE-Puffer vor Erstgebrauch im Verhältnis 1:5 mit absolutem Ethanol versetzt. Außerdem wird der DNA-Mix aus $10\mu\text{l}$ DNase-Stammlösung und $70\mu\text{l}$ RDD-Puffer je Probe hergestellt und bis zum Gebrauch gekühlt.

Die $100\mu\text{l}$ RNA-Proben werden nach dem Auftauen mit je $350\mu\text{l}$ RLT-Pufferlösung sowie $250\mu\text{l}$ absolutem Ethanol versetzt und durch Pipettieren

gemischt. Die Ansätze werden nun auf die im Kit enthaltenen RNeasy-Columns pipettiert und für 30 Sekunden bei 10000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Das abzentrifugierte Eluat wird verworfen. Auf die Säule werden 350µl RW 1 Puffer gegeben und erneut 30 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen. Es werden nun 80µl des zuvor hergestellten DNA-Mix auf die Fritte der Säule getropft und die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 350µl RW 1 Puffer zugegeben und wieder 30 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen. Die Säule wird in ein neues 2ml Gefäß (Collection Tube) gesetzt und mit 500µl RPE-Puffer versetzt. Wiederum erfolgt 30 sekündiges Zentrifugieren bei 10000rpm und Verwerfen des Eluats. Dieser Waschschrift wird wiederholt. Die Säulen werden anschließend durch zweimal zweiminütiges Zentrifugieren bei 13000rpm getrocknet. Das Collection Tube wird mit Eluat verworfen und die Säule wird in ein 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß gesetzt. Auf die Fritte werden 30µl RNase freies Wasser getropft. Es folgen wiederum zweimal zweiminütiges Zentrifugieren bei 13000rpm. Die Säule wird verworfen und die gereinigte, gelöste RNA, die sich im Eppendorf Reaktionsgefäß befindet, kann bei -80 °C eingefroren werden.

2.2.4 Messung der RNA-Menge

Die Messung der in den aufbereiteten Proben vorhandene RNA-Menge erfolgt mittels eines Spektrophotometers. In diesem kann über die Wellenlänge von 320nm die RNA-Menge in µg/µl eingesetzter Probe berechnet werden. Zunächst wird das Gerät auf Nukleinsäuren, RNA, die Schichtdicke der Küvette (10mm), die Umrechnung in µg/µl sowie einen Verdünnungsfaktor von 100 eingestellt. Als Referenz dient H₂O, dass vor Beginn der Messung und in regelmäßigen Abständen dazwischen zur Kontrolle gemessen wird. Die Proben werden aufgefroren und kühl gelagert. Für die Verdünnung werden 99µl RNase H₂O und 1µl der zu messenden RNA-Probe in die Küvette pipettiert und gemischt. Es erfolgt die Messung, danach gründliches Ausspülen der Küvette mittels Wasser und gegebenenfalls eine Kontrollmessung mit 100µl Wasser.

Durch automatisierte Umrechnung liefert das Spektrometer die enthaltene RNA-Konzentration, aus welcher das äquivalente Volumen zu einer absoluten RNA-

Menge von 1µg für die cDNA-Synthese berechnet werden kann. Ein Rechenbeispiel: gemessen 2,6µg/µl RNA; 1µg RNA = $1/2,6 = 0,4\mu\text{l}$.

2.2.5 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese dient das iScript™ cDNA Synthesis Kit. Je Probe werden 4µl Reaction Mix, 1µl Reverse Transcriptase und, je nach RNA-Konzentration der jeweiligen Probe, RNase freies H₂O auf ein Endvolumen aus diesem Mix und der jeweiligen RNA von 20µl in 0,2ml Reaction Tubes mit Cap gemischt. Zuletzt wird die aufgetaute, kurz gevortexte RNA zugefügt.

Zur Synthese werden die Reaction Tubes in die PCR-Maschine gesetzt und das iScript-Programm, bestehend aus einem Hold 25°C für 5 Minuten, gefolgt von einem Hold bei 42°C für 30 Minuten sowie zwei Holds bei 85°C für 5 Minuten, gestartet. Danach wird auf 4°C heruntergekühlt und die fertige cDNA kann bei -20°C eingefroren werden.

2.2.6 REAL TIME-RT-PCR

Die Methode der REAL TIME-RT-PCR funktioniert nach folgendem Prinzip. An die bei der Denaturierung frei werdenden Einzelstränge bindet frequenzspezifisch die Probe des jeweils untersuchten Genes. Die Probe ist am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff markiert, dessen Emission durch einen am 3'-Ende befindlichen Quencher abgefangen wird. Während der PCR-Amplifizierung spaltet die Taq-Polymerase mit ihrer 5'-nukleolytischen Aktivität die Sonden für HDGF und GAPDH, dabei kommt es zu einer Abspaltung des Reporterfarbstoffes. Der frei werdende Reporterfarbstoff am 5'-Ende sowie der Kontroll- oder Quencherfarbstoff am 3'-Ende [202] fluoreszieren. Die entsprechende Emission des jeweiligen Reporterfarbstoffes kann über eine frequenzspezifische Detektion des Fluoreszenzsignals gemessen werden, dies erfolgt am Ende eines jeden PCR-Zyklus. Die Intensität an fluoreszierendem Farbstoff ist proportional zur Menge an entstandener DNA.

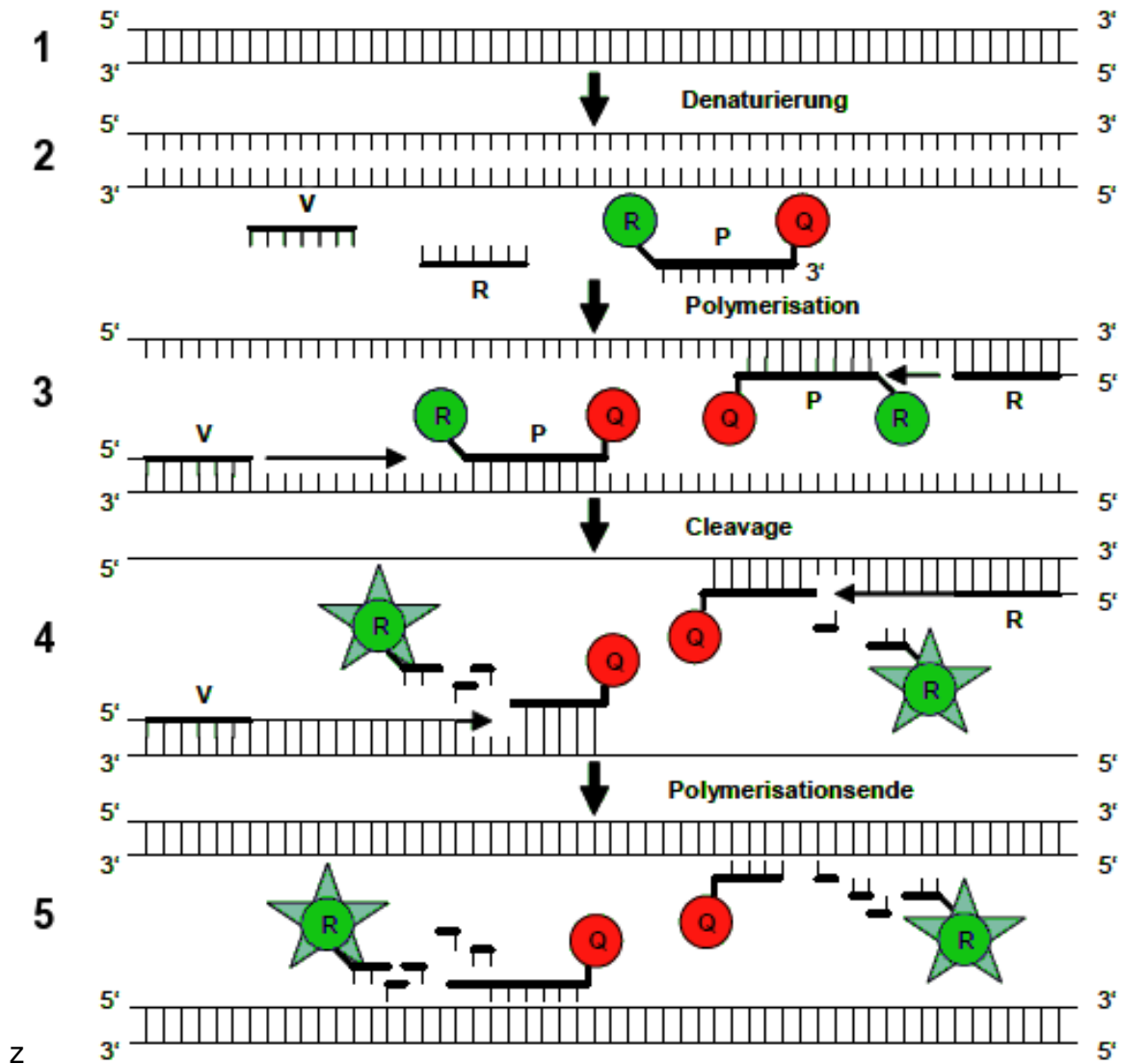


Abbildung 6: Schema der Real Time-RT-PCR:

Während eines Zyklus [A] kommt es zuerst zur Denaturierung der Proben [B], die zusammen mit einer fluoreszierenden Sonde (P) und den Vorwärts- (V) und Rückwärtsprimern (R) in der Lösung sind. Am 3'- beziehungsweise am 5'-Terminus der TaqMan Sonde sitzen zwei Fluoreszenzfarbstoffe, der Reporter (R, blau) und der Quencher (Q, rot). Solange beide Farbstoffe an der Sonde in räumlicher Nähe zueinander sind, ist die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes unterdrückt. Anschließend [C] kommt es zur Polymerisation und durch weitere Synthese des DNA-Stranges während der Amplifikation zu einer Abspaltung des Reporterfarbstoffes [D]. Sobald die beiden Farbstoffe voneinander getrennt sind, emittiert der Reporter sein charakteristisches Fluoreszenzspektrum. Auch der Rest der Sonde mit dem verbliebenen Quencher wird durch die Taq-Polymerase degradiert und die Komplementation des DNA-Stranges wird vollendet [E]. Weil das Verhältnis Strangverdopplung zur Sonde im Optimalfall eins zu eins ist, kann durch die Messung der Wellenlängen auch eine quantitative Aussage über die tatsächliche Produktmenge gemacht werden. Modifiziert nach [203]

Für die Durchführung der REAL TIME-RT-PCR wird zunächst eine Standard-Verdünnungsreihe mit standardisierter cDNA der humanen Monozyten-Zelllinie U937 (in der gastroenterologischen Arbeitsgruppe Würzburg etablierte Standard-cDNA) vorbereitet. Es werden 6 Reaction Tubes 0,2ml durchnummeriert.

In das erste Tube werden 1,9µl RNase-freie Wasser pipettiert, in die folgenden Tubes 2-6 kommen je 5µl Wasser. Anschließend werden 9µl Standard-cDNA in das erste Tube pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren (mindestens 20 x) gut gemischt. Ausgehend vom ersten Tube werden jeweils immer 5µl in das nächste pipettiert und gut gemischt.

Im Folgenden werden die Eppendorf Reaktionsgefäße vorbereitet und beschriftet. Das erste Eppendorf Reaktionsgefäß, in dem später keine cDNA sondern nur Wasser enthalten ist, dient als Kontrolle zur Detektion möglicher Verunreinigungen und wird mit No-Template Control (NTC) bezeichnet. Die folgenden 6 Eppendorf Reaktionsgefäße sind für die oben beschriebene Verdünnungsreihe. Diese dient zum Vergleich der Realtime-PCR-Platten untereinander.

Es wird ein Setup vorbereitet, mit Hilfe dessen in einem Durchlauf sowohl HDGF als auch GAPDH gemessen werden können. Das Setup enthält pro Probe 12,5µl QPCR-Mix, je 0,2µl HDGF probe (20mM), forward sowie reverse primer (10mM). Des Weiteren 1,25µl GAPDH und 10,65µl Wasser. Dies ergibt 25µl pro Eppendorf Reaktionsgefäß. Da die Bestimmung in Triplets, also dreifach, erfolgt, werden für jedes Eppendorf Reaktionsgefäß 3x 25µl und zur Reserve nochmals 25µl berechnet. Der Mastermix wird nun mit jeweils 96µl auf die Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt. Im Anschluss werden 4µl der jeweiligen cDNA hinzu pipettiert. Die NTC-Probe wird mit 4µl Wasser versetzt, die Eppendorf Reaktionsgefäße der Standardreihe mit der cDNA aus der Verdünnungsreihe. Alle Eppendorf Reaktionsgefäße werden kurz gevortext und dann für 2 Minuten bei 8000U/min zentrifugiert.

Es folgt die Befüllung der 96-well-PCR-Platten mit je 25µl pro Well und im Triplet-Schema. Dies dient der Minimierung und Verringerung statistischer Ergebnisschwankungen. Zunächst 3x NTC, dann die Standards 1-6 jeweils 3x und im Anschluss werden von jeder Probe drei Wells befüllt unter Verwendung der Finnpipetten. Die Platte wird mit Cap Strips verschlossen, in Alufolie gewickelt und kann gegebenenfalls über Nacht bei 4°C gelagert werden.

Die Platte wird in den iCycler gestellt und das Programm, nach Eingabe der etablierten Standardwerte und des Protokolls, über den Computer gestartet. Das Protokoll für HDGF, mit dem auch GAPDH gemessen werden kann, lautet:

- 1. Denaturierung 9min bei 95 °C
- 2. 50 PCR-Zyklen: Denaturierung 15sec bei 95 °C,
Annealing 1min bei 60 °C
- 3. Abkühlen auf 15 °C

Die Messung für HDGF erfolgt bei einer Wellenlänge von 490nm mit FAM, die für GAPDH bei einer Wellenlänge von 530nm mit VIC.

Zur Bestimmung der Expression der unbekanntenen Proben werden die Starttranskriptwerte der Standardkurven von GAPDH und HDGF sowie der sogenannte Schwellenwert (Treshhold) festgelegt. Der C_T -Wert stellt den PCR-Zyklus dar, an dem die Reporterfluoreszenz diesen Schwellenwert (Treshhold) überschreitet und alles was diesen Wert überschreitet wird gemessen. Der C_T -Wert korreliert indirekt proportional mit der Ausgangsmenge an mRNA und wird zur Quantifizierung der unbekanntenen Proben relativ zur Standardkurve benutzt. Es wird der Quotient aus HDGF und GAPDH-Transkripten gebildet. GAPDH dient als Referenzgen. Zur Verdeutlichung von Expressionsunterschieden wird das Expressionsniveau von HDGF in der Mediumkontrolle auf eins festgelegt. Die relative HDGF-Expression wird errechnet indem die HDGF-Expression in den behandelten Zellen in Beziehung zum Expressionsniveau in Kontrollzellen gesetzt wird.

2.3 Auswertung

Die Daten wurden direkt über das iCycler-Programm normiert auf die Standardkurve berechnet. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von MS-Excel 2003. Zur Darstellung von signifikanten Expressionsänderungen wurde ein Students-t-Test durchgeführt und die Werte auf Signifikanzen von $p < 0,05$ und $p < 0,01$ überprüft. Die Ergebnisdarstellung erfolgt in Blockdiagrammen. Es werden die Mittelwerte der relativen HDGF-Expression mit Standardabweichungen in Abhängigkeit von der Konzentration und im zeitlichen Verlauf gezeigt. Die Darstellung ist semiquantitativ, normiert auf die Konzentration in der Mediumkontrolle. Die relative HDGF-Expression der Kontrolle wird bei 1 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Interleukin 1beta

3.1.1 Geki-2

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich lediglich für eine Konzentration von 5ng/ml IL 1beta eine geringe, jedoch signifikante Reduktion der HDGF-Expression zwischen 1h und 8h, die jeweiligen Differenzen zum 24h-Wert sind nicht signifikant.

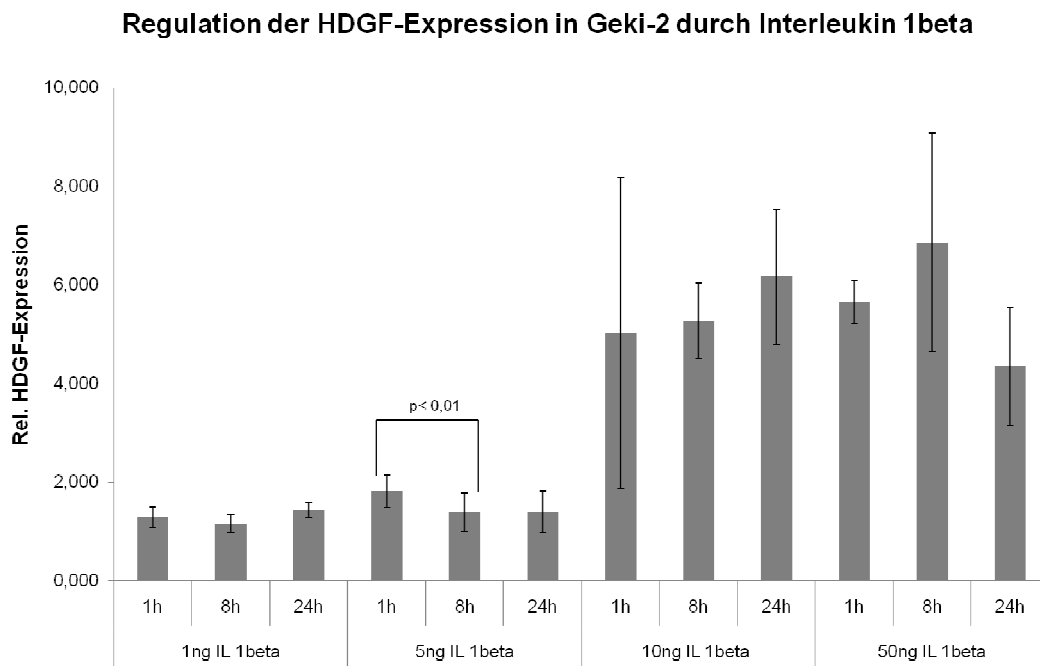


Abbildung 7: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Zeit
Die HDGF-Expression zeigt einen signifikanten Abfall ($p < 0,01$) von 1h auf 8h Inkubationszeit bei Behandlung mit 5ng/ml IL 1beta.

In Abhängigkeit der Konzentration von IL 1beta zeigen sich zu allen Zeitpunkten signifikante Änderungen der HDGF-Expression zwischen den einzelnen Konzentrationen, lediglich nach 1h Inkubationszeit verfehlt die Konzentrationssteigerung von 5ng/ml IL 1beta auf 10ng/ml IL 1beta das Signifikanzniveau.

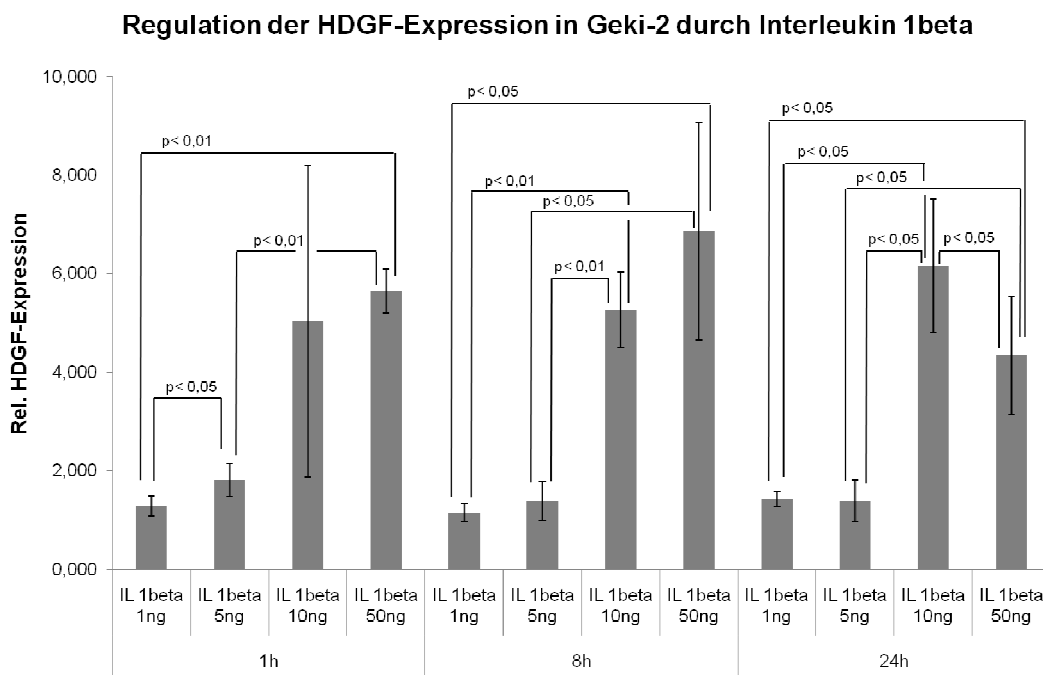


Abbildung 8: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Konzentration

Bei 1h Inkubationszeit konnten signifikante Expressionsanstiege zwischen 1ng/ml IL 1beta und 5ng/ml IL 1beta ($p < 0,05$), 1ng/ml IL 1beta und 50ng/ml IL 1beta ($p < 0,01$) sowie für 5ng/ml IL 1beta und 50ng/ml IL 1beta ($p < 0,01$) festgestellt werden. Bei 8h Inkubationszeit zeigt sich ein signifikanter Anstieg von 1ng/ml IL 1beta bzw. 5ng/ml IL 1beta auf 10ng/ml IL 1beta (jeweils $p < 0,01$). Die Signifikanz für den Anstieg bei 50ng/ml IL 1beta gegenüber 1ng/ml IL 1beta bzw. 5ng/ml IL 1beta liegt bei $p < 0,05$. Bei 24h Inkubationsdauer kommt es für 10ng/ml IL 1beta und 50ng/ml IL 1beta zu signifikanten Anstiegen der Expression gegenüber 1ng/ml IL 1beta sowie 5ng/ml IL 1beta (jeweils $p < 0,05$). Einen signifikanten Expressionsabfall kann man zwischen 10ng/ml IL 1beta und 50ng/ml IL 1beta bei 24h ($p < 0,05$) beobachten.

3.1.2 HT29

Im zeitlichen Verlauf kann man keine signifikanten Änderungen beobachten. In Abhängigkeit der Konzentration zeigen sich auch in der Zelllinie HT29 zu allen drei Inkubationszeitpunkten teilweise signifikante Änderungen der HDGF-Expression.

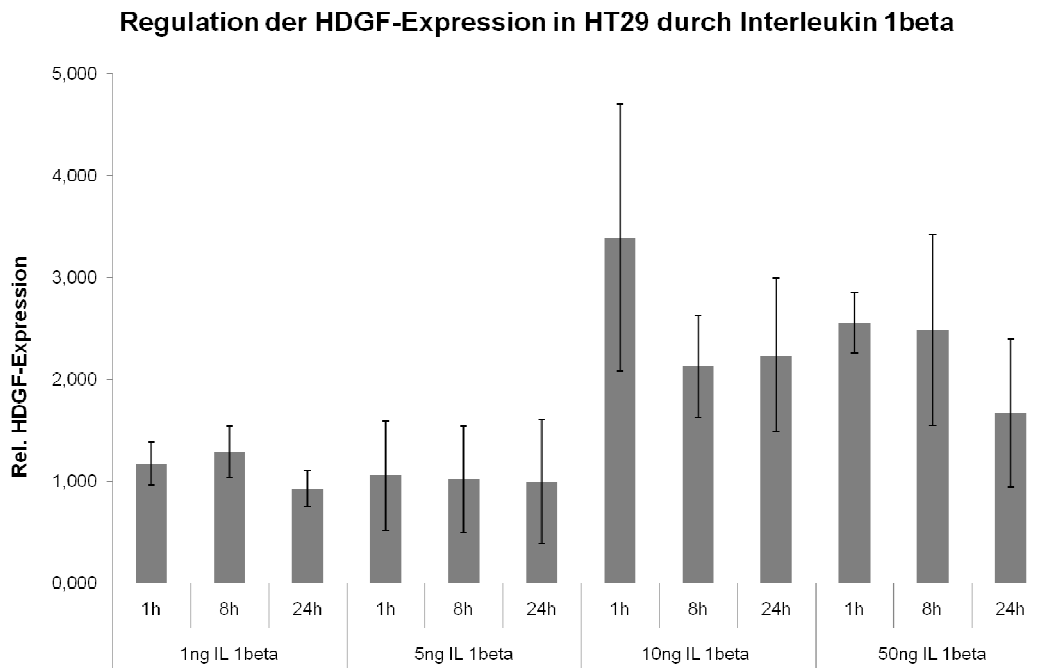


Abbildung 9: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Zeit
Es stellen sich keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression dar.

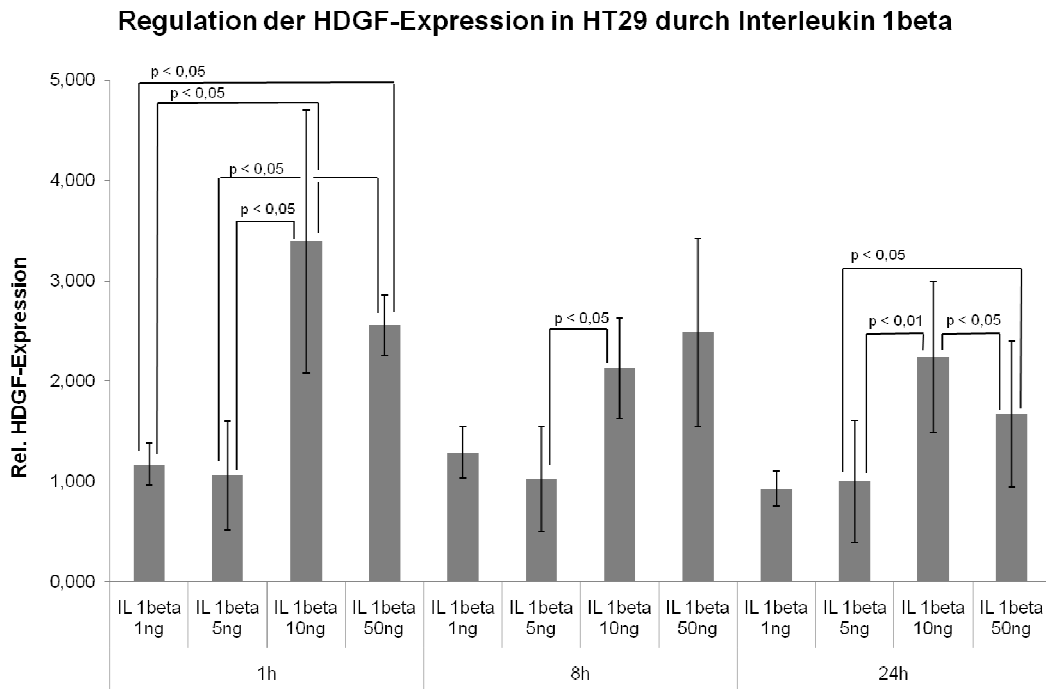


Abbildung 10: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Konzentration

Bei 1h Inkubationszeit liegen signifikante Anstiege der Expression von 1ng/ml IL 1beta sowie 5ng/ml IL 1beta jeweils auf 10ng/ml IL 1beta sowie 50ng/ml IL 1beta vor (jeweils $p < 0,05$). Zum Zeitpunkt 8h zeigt sich ein signifikanter Expressionsanstieg zwischen 5ng/ml IL 1beta und 10ng/ml IL 1beta ($p < 0,05$). Bei Inkubation über 24h kommt es zunächst zu einem signifikanten Anstieg zwischen 5ng/ml IL 1beta und 10ng/ml IL 1beta ($p < 0,01$) mit einem darauf folgenden Abfall der Expression gegenüber 50ng/ml IL 1beta ($p < 0,05$). Insgesamt liegt bei Vergleich von 5ng/ml IL 1beta und 50ng/ml IL 1beta ein signifikanter Anstieg mit $p < 0,05$ vor.

3.1.3 SW480

Signifikante Expressionsabfälle in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zeigen sich für 10ng/ml IL 1beta zwischen 8h und 24h mit $p < 0,01$ sowie für 50ng/ml IL 1beta zwischen 1h und 24h mit $p < 0,05$. Die jeweiligen Expressionsanstiege zwischen 1h und 8h Inkubationszeit sind nicht signifikant. Zu signifikanten Anstiegen der HDGF-Expression kommt es in Abhängigkeit der Konzentration von IL 1beta zu allen drei Inkubationszeitpunkten.

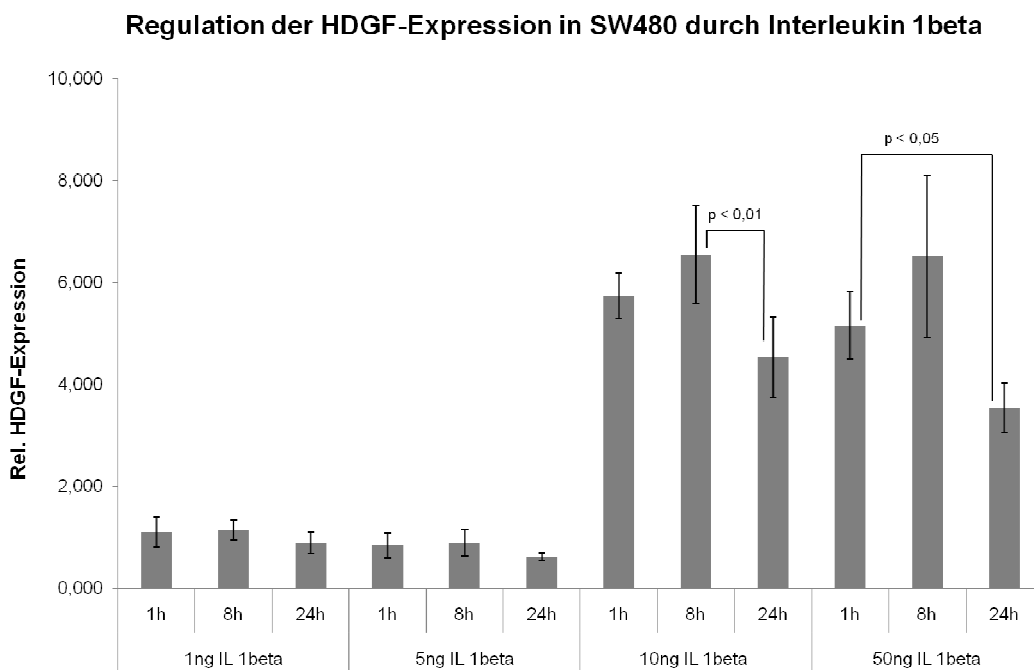


Abbildung 11: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Zeit

Signifikante Expressionsabfälle in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zeigen sich für 10ng/ml IL 1beta zwischen 8h und 24h mit $p < 0,01$ sowie für 50ng/ml IL 1beta zwischen 1h und 24h mit $p < 0,05$. Die jeweiligen Expressionsanstiege zwischen 1h und 8h Inkubationszeit sind nicht signifikant.

Regulation der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 1beta

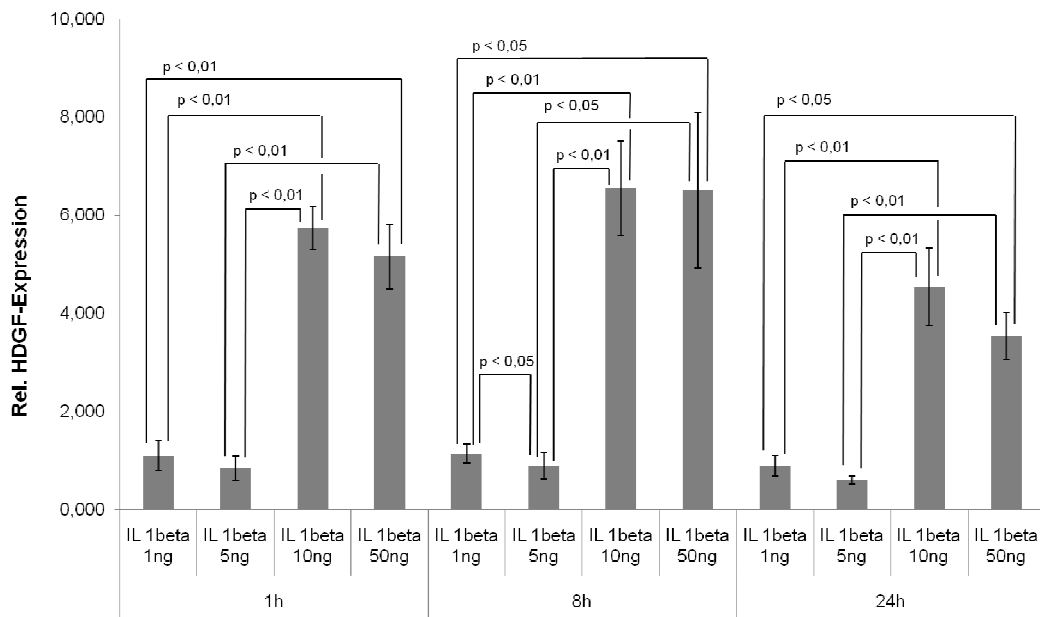


Abbildung 12: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Konzentration

Es zeigen sich für 10ng/ml IL 1beta sowie 50ng/ml IL 1beta signifikante Anstiege der Expression jeweils gegenüber 1ng/ml IL 1beta sowie 5ng/ml IL 1beta. Für 1h Inkubationszeit stellen sich diese jeweils mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ dar. Bei 8h zeigt sich ein $p < 0,01$ nur für den Expressionsanstieg von 1ng/ml IL 1beta bzw. 5ng/ml IL 1beta auf 10ng/ml IL 1beta. Der Expressionsanstieg auf 50ng/ml IL 1beta erreicht nur ein geringeres Signifikanzniveau ($p < 0,05$). Inkubation über 24h zeigt zwischen 1ng/ml IL 1beta und 10ng/ml IL 1beta ebenfalls einen signifikanten Anstieg ($p < 0,01$). Für den Expressionsanstieg auf 50ng/ml IL 1beta gegenüber 1ng/ml IL 1beta ergibt sich eine signifikante Zunahme der Expression ($p < 0,05$). Die von 5ng/ml IL 1beta ausgehenden Anstiege der Expression zeigen sich ebenfalls signifikant ($p < 0,01$). Zwischen den Konzentrationen 1ng/ml IL 1beta und 5ng/ml IL 1beta sowie 10ng/ml IL 1beta und 50ng/ml IL 1beta liegen zu jedem Zeitpunkt wiederum Abfälle in der Expression vor. Dieser Abfall wird nur bei 8h von 1ng/ml IL 1beta auf 5ng/ml IL 1beta signifikant ($p < 0,05$).

3.1.4 SW620

Hier lassen sich signifikante Änderungen der HDGF-Expression sowohl in Abhängigkeit von der Zeit als auch der Konzentration finden. Für alle vier Konzentrationen kommt es im zeitlichen Verlauf von 1h über 8h bis 24h zu einem unterschiedlich signifikanten Abfall der HDGF-Expression. Signifikante HDGF-Expressionsanstiege in Abhängigkeit von der Konzentration lassen sich zu allen drei Inkubationszeitpunkten feststellen. Diese finden sich sowohl für 10ng/ml IL 1beta als auch für 50ng/ml IL 1beta gegenüber 1ng/ml IL 1beta und 5ng/ml IL 1beta. Insgesamt ist das konzentrationsabhängige Verhalten dem für die Zelllinie SW 480 sehr ähnlich.

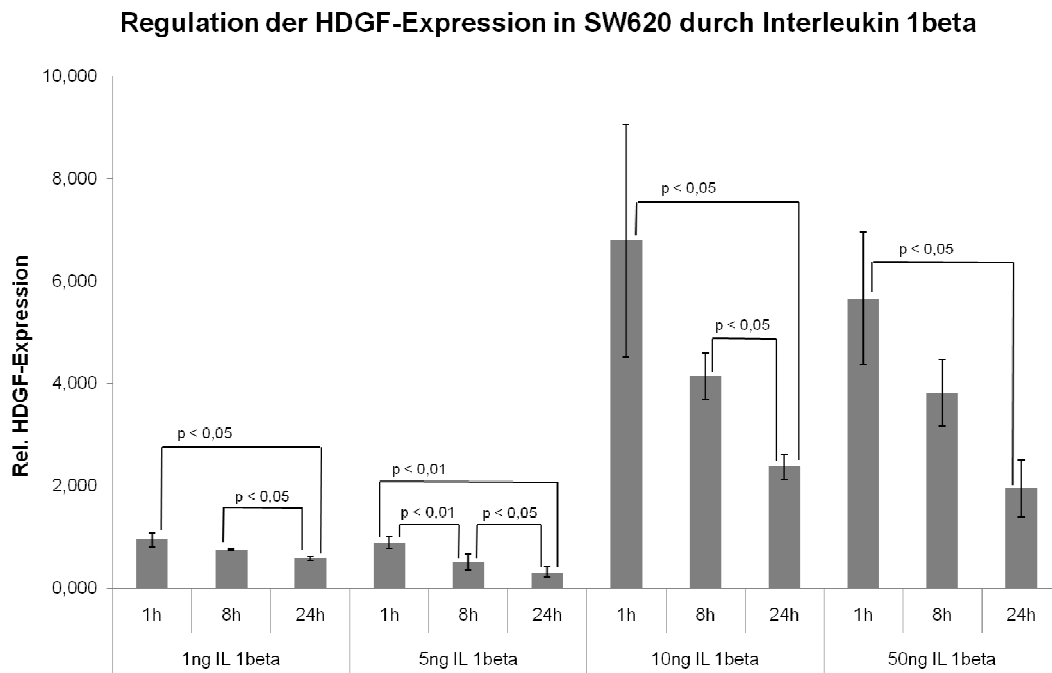


Abbildung 13: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Zeit

Bei Inkubation mit 1ng/ml IL 1beta zeigen sich signifikante Expressionsminderungen (jeweils $p < 0,05$) bei Vergleich von 1h gegenüber 24h sowie zwischen 8h und 24h. Für 5ng/ml IL 1beta beobachtet man schon zwischen 1h und 8h einen signifikanten Abfall von $p < 0,01$ der sich auf 24h mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ fortsetzt. Insgesamt liegt zwischen 1h und 24h ein signifikanter Abfall der HDGF-Expression von $p < 0,01$ vor. Für 10ng/ml IL 1beta zeigen sich dieselben Verhältnisse wie für 1ng/ml IL 1beta jedoch insgesamt auf einem höheren Expressionsniveau. Ein signifikanter Abfall der HDGF-Expression mit $p < 0,05$ zwischen 1h und 24h wird bei 50ng/ml IL 1beta beobachtet.

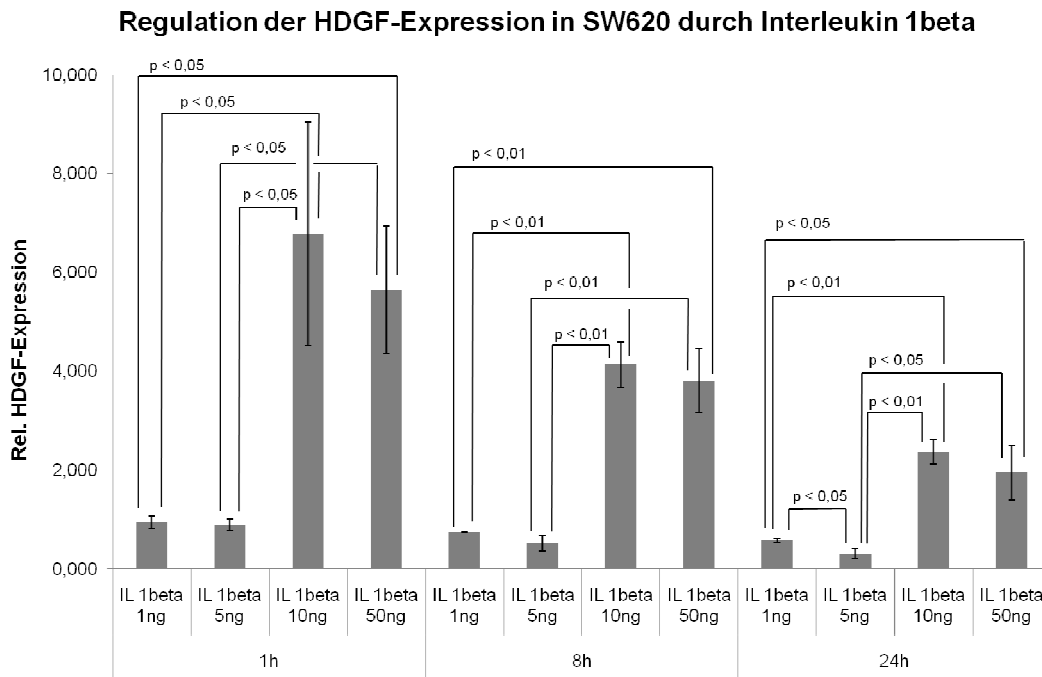


Abbildung 14: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Konzentration

Anstiege der HDGF-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration finden sich bei 10ng/ml IL 1beta sowie 50ng/ml IL 1beta mit 1ng/ml IL 1beta als auch mit 5ng/ml IL 1beta. Dies zeigt sich bei 1h Inkubationsdauer mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ und bei Inkubation über 8h mit einer Signifikanz von $p < 0,01$. Auch bei 24h Inkubationszeit kommt es zwischen 1ng/ml IL 1beta und 10ng/ml IL 1beta sowie 5ng/ml IL 1beta und 10ng/ml IL 1beta zu einem signifikanten Anstieg der HDGF-Expression (jeweils $p < 0,01$). Bei Vergleich von 1ng/ml IL 1beta mit 50ng/ml IL 1beta sowie 5ng/ml IL 1beta mit 50ng/ml IL 1beta zeigt sich jeweils eine Signifikanz von $p < 0,05$. Zu allen drei Zeitpunkten stellt man einen Abfall der HDGF-Expression von 1ng/ml IL 1beta auf 5ng/ml IL 1beta bzw. von 10ng/ml IL 1beta auf 50ng/ml IL 1beta fest. Signifikant ist dieser jedoch nur bei Inkubation über 24h ($p < 0,05$) zwischen 1ng/ml IL 1beta und 5ng/ml IL 1beta.

Zusammenfassend lässt sich für die Inkubation mit Interleukin 1beta sagen, dass man in allen Zelllinien signifikante Anstiege der HDGF-Expression für die beiden höheren Konzentrationen gegenüber den niederen Konzentrationen, meist zu allen Zeitpunkten, feststellen kann. Die Expressionswerte für 1ng/ml IL 1beta und 5ng/ml IL 1beta schwanken zwischen 0,3 und 1,8, bei einer Erhöhung der Konzentration von IL 1beta zeigt sich ein maximaler Anstieg etwa um Faktor 8. Die Anstiege liegen ungefähr zwischen dem 1,5- und Achtfachen. Unter höheren Konzentrationen kommt es in allen drei Karzinomzelllinien zu einem Rückgang der Expression nach initialem Anstieg. In der Adenomzelllinie Geki-2 stellt sich dieser Effekt nur bei einer Konzentration von 50ng/ml IL 1beta ein.

3.2 Interleukin 4

3.2.1 Geki-2

Im zeitlichen Verlauf lassen sich bei der Inkubation mit IL 4 in der Zelllinie Geki-2 keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression finden. Zu allen Zeitpunkten zeigt sich jedoch ein klarer, dosisabhängiger signifikanter Rückgang der Expression auf bis zu 8% der Ausgangsexpression von 1ng/ml IL 4 über 5ng/ml IL 4 auf 10ng/ml IL 4. Die darauf folgenden geringen Wiederanstiege der Expression für 50ng/ml IL 4 gegenüber 10ng/ml IL 4 sind nicht signifikant.

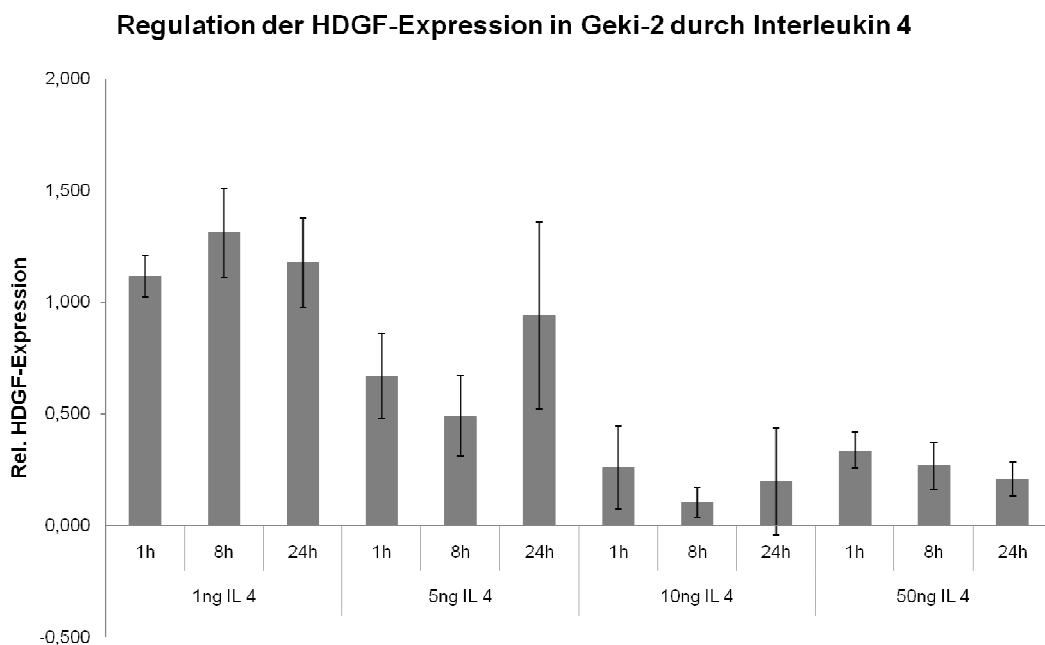


Abbildung 15: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Zeit

Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression.

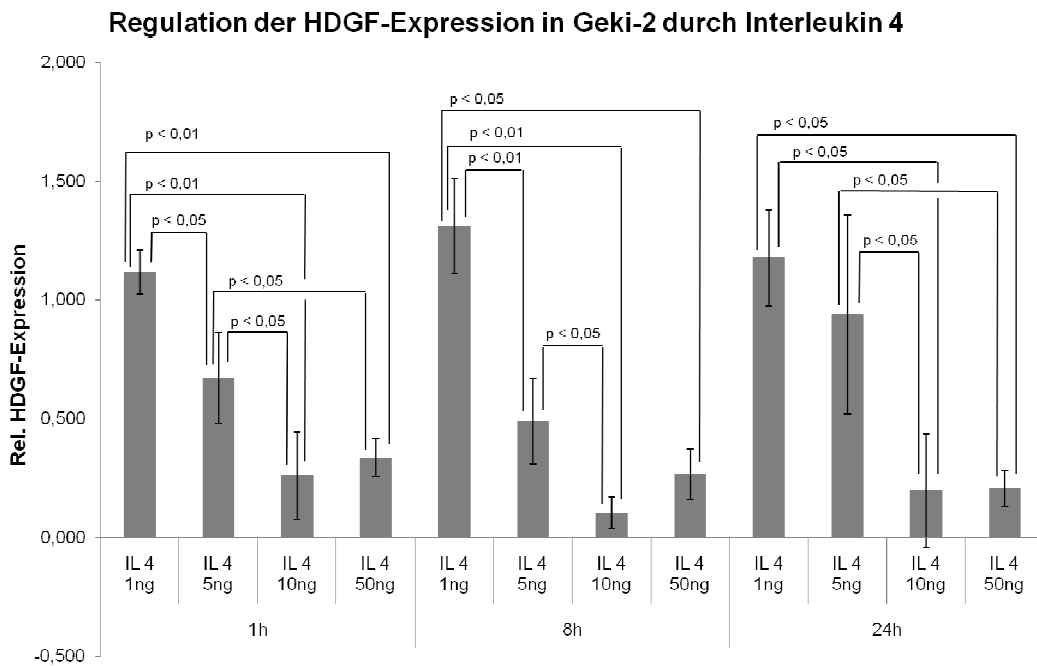


Abbildung 16: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Konzentration

Bei 1h Inkubationsdauer zeigt sich die verminderte HDGF-Expression sowohl zwischen 1ng/ml IL 4 und 5ng/ml IL 4 ($p < 0,05$), 1ng/ml IL 4 und 10ng/ml IL 4 ($p < 0,01$), 1ng/ml IL 4 und 50ng/ml IL 4 ($p < 0,01$), 5ng/ml IL 4 und 10ng/ml IL 4 ($p < 0,05$) als auch zwischen 5ng/ml IL 4 und 50ng/ml IL 4 ($p < 0,05$) als signifikant. Für die Inkubationsdauer von 8h ist der Abfall der HDGF-Expression zwischen 1ng/ml IL 4 und 5ng/ml IL 4 sowie 1ng/ml IL 4 und 10ng/ml IL 4 signifikant, mit $p < 0,01$ und für 50ng/ml IL 4 gegenüber 1ng/ml IL 4 signifikant, mit $p < 0,05$. Auch zwischen 5ng/ml IL 4 und 10ng/ml IL 4 liegt ein signifikanter Abfall vor ($p < 0,05$). Die Inkubation über 24h ergibt signifikante HDGF-Expressionsminderungen (jeweils $p < 0,05$) für 10ng/ml IL 4 bzw. 50ng/ml IL 4 jeweils gegenüber 1ng/ml IL 4 und 5ng/ml IL 4.

3.2.2 HT29

Signifikante Änderungen der HDGF-Expression lassen sich nur in Abhängigkeit der Konzentration finden. Man kann zu allen drei Zeitpunkten Abfälle von 1ng/ml IL 4 auf 5ng/ml IL 4, einen darauf folgenden Anstieg zu 10ng/ml IL 4 und einen abschließenden Abfall zu 50ng/ml IL 4 beobachten. Signifikant sind diese Änderungen jedoch nur bei 8h für den Anstieg der HDGF-Expression von 5ng/ml IL 4 auf 10ng/ml IL 4 ($p < 0,01$), bei 24h für denselben Anstieg mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ sowie den darauf folgenden Abfall auf 50ng/ml IL 4 gegenüber 10ng/ml IL 4 mit einer Signifikanz von $p < 0,05$.

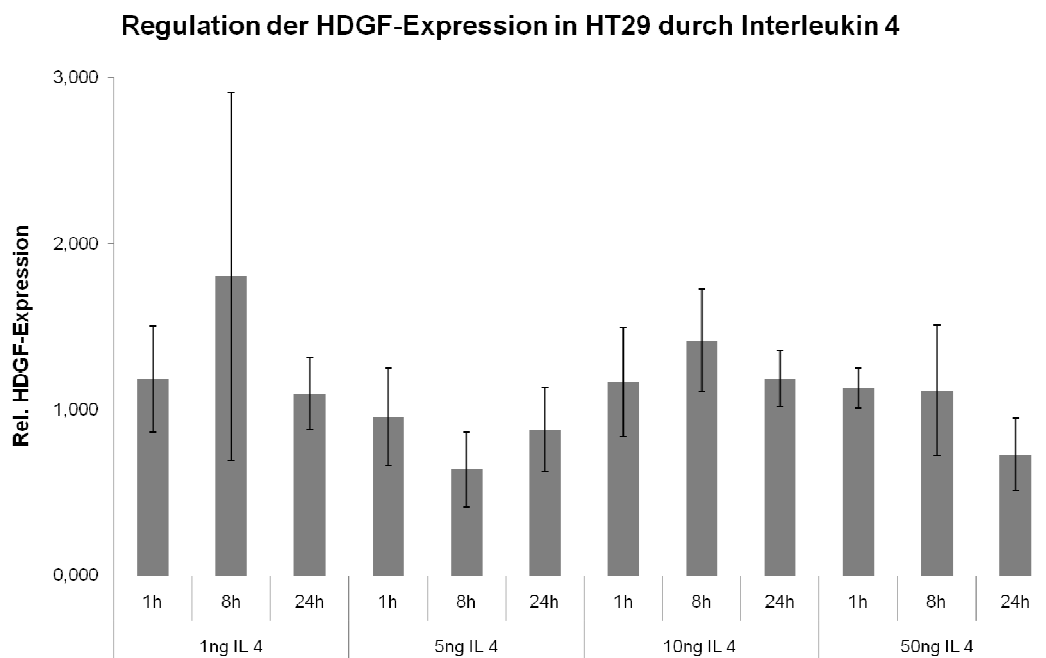


Abbildung 17: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Zeit

Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression.

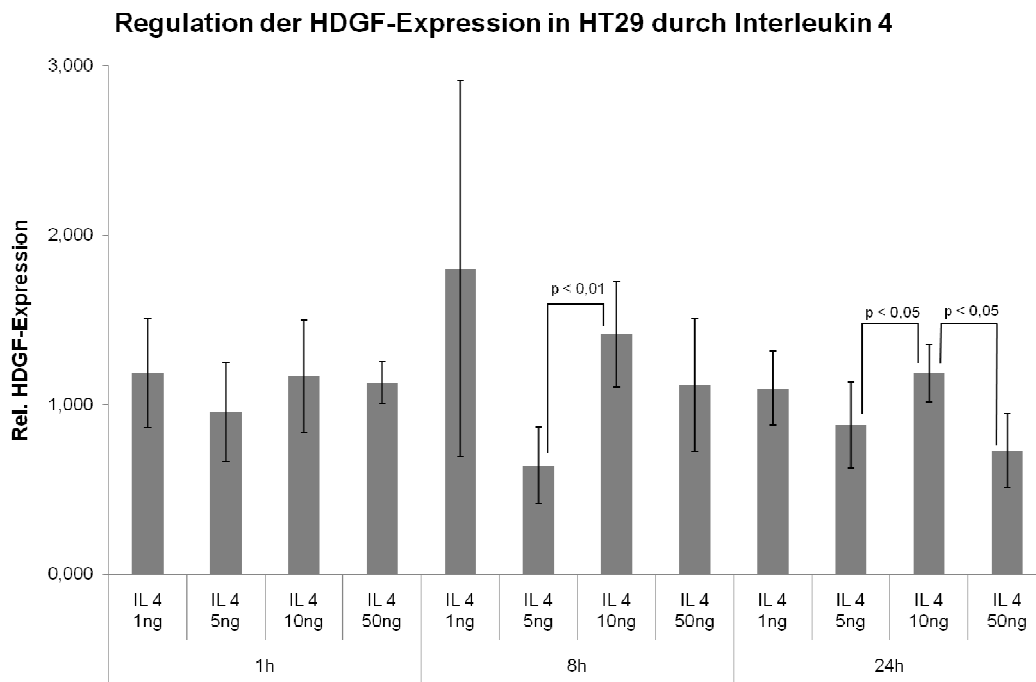


Abbildung 18: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Konzentration

Signifikante Änderungen der HDGF-Expression finden sich bei 8h für den Anstieg der HDGF-Expression von 5ng/ml IL 4 auf 10ng/ml IL 4 ($p < 0,01$), bei 24h für denselben Anstieg jedoch mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ sowie den darauf folgenden Abfall auf 50ng/ml IL 4 gegenüber 10ng/ml IL 4 mit einer Signifikanz von $p < 0,05$.

3.2.3 SW480

In dieser Zelllinie kann man einen Abfall der HDGF-Expression im zeitlichen Verlauf für die Konzentrationen 5ng/ml IL 4, 10ng/ml IL 4 sowie bei 50ng/ml IL 4 beobachten. Diese Minderungen sind jedoch alle nicht signifikant. Bei Inkubation über 24h lassen sich zwei signifikante Anstiege (jeweils $p < 0,05$) der HDGF-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration finden. Diese zeigen sich für 10ng/ml IL 4 bzw. 50ng/ml IL 4 gegenüber von 5ng/ml IL 4.



Abbildung 19: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Zeit
Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression.

Regulation der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 4

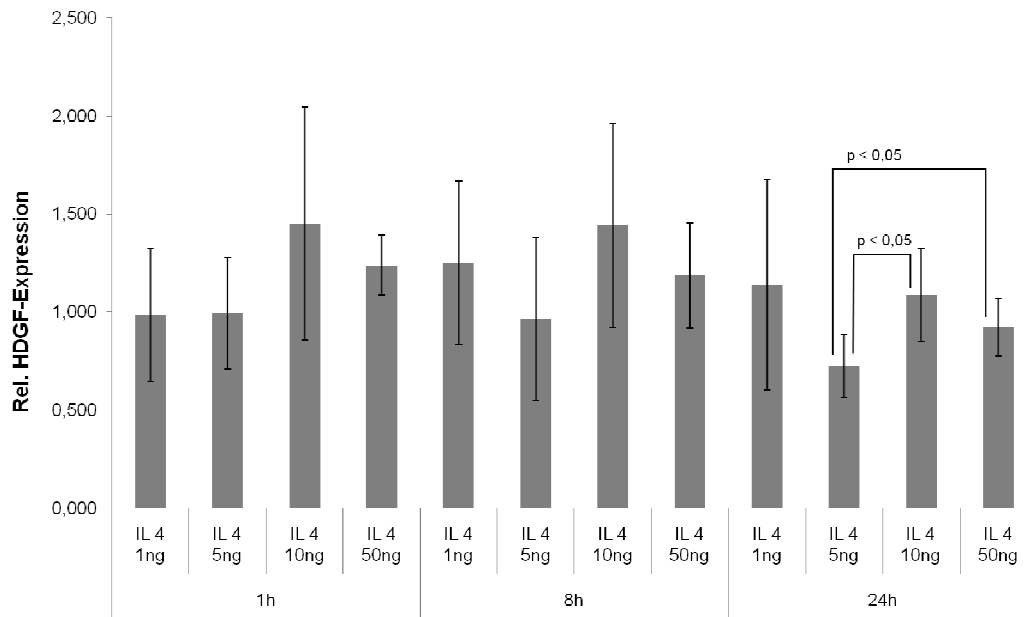


Abbildung 20: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Konzentration

Bei Inkubation über 24h lassen sich zwei signifikante Anstiege der HDGF-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration finden. Diese zeigen sich für 10ng/ml IL 4 bzw. 50ng/ml IL 4 gegenüber von 5ng/ml IL 4 jeweils mit einer Signifikanz von $p < 0,05$.

3.2.4 SW620

Bei dieser Zelllinie kann eine zeitabhängige Änderung der HDGF-Expression auf allen vier Konzentrationsniveaus festgestellt werden. Ein signifikanter Abfall der HDGF-Expression zeigt sich für 1ng/ml IL 4 zwischen 1h und 24h Inkubationszeit ($p < 0,05$). Bei 5ng/ml IL 4 beobachtet man einen Expressionsabfall mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ bei Änderung der Inkubationszeit von 8h auf 24h. Für die Konzentration von 50ng/ml IL 4 zeigen sich sowohl zwischen 1h und 24h als auch zwischen 8h und 24h signifikante Expressionsminderungen (jeweils $p < 0,05$). Auch bei 10ng/ml IL 4 kommt es zu Expressionsabfällen über die Zeit, diese sind jedoch, wie auch die verbleibenden Minderungen der Expression bei 1ng/ml IL 4, 5ng/ml IL 4 und 50ng/ml IL 4 nicht signifikant. Signifikante Anstiege der HDGF-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration finden sich zu allen drei Inkubationszeitpunkten. Der Expressionsabfall für 5ng/ml IL 4 gegenüber 1ng/ml IL 4 zeigt sich nur bei 24h Inkubationszeit signifikant.

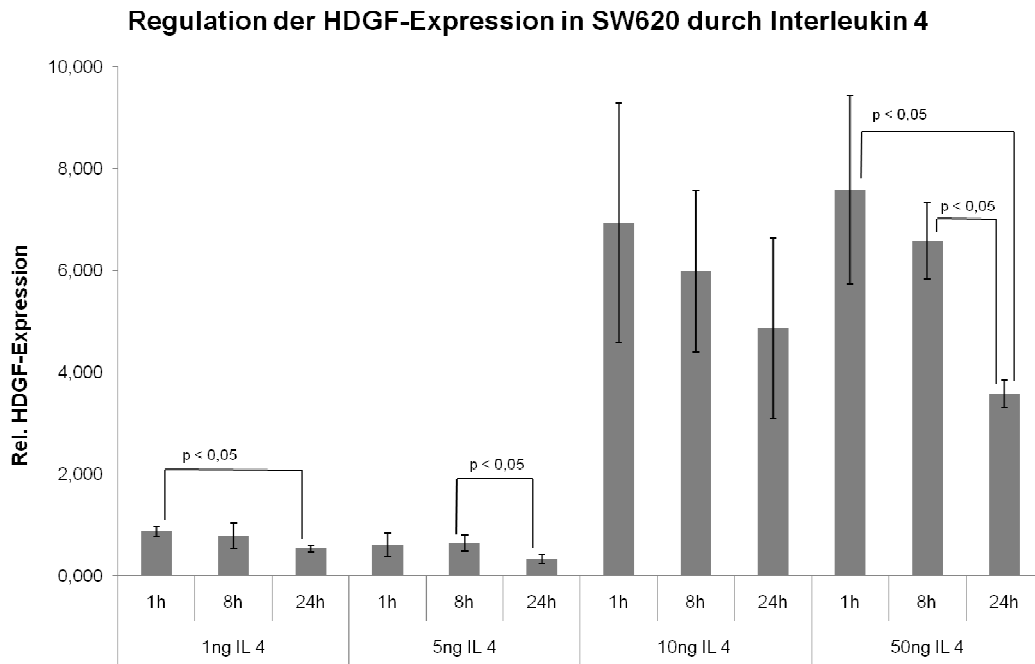


Abbildung 21: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Zeit

Ein signifikanter Abfall der HDGF-Expression zeigt sich für 1ng/ml IL 4 zwischen 1h und 24h Inkubationszeit ($p < 0,05$). Bei 5ng/ml IL 4 beobachtet man einen Expressionsabfall mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ bei Änderung der Inkubationszeit von 8h auf 24h. Für die Konzentration von 50ng/ml IL 4 zeigen sich sowohl zwischen 1h und 24h als auch zwischen 8h und 24h signifikante Expressionsminderungen (jeweils $p < 0,05$). Auch bei 10ng/ml IL 4 kommt es zu Expressionsabfällen über die Zeit, diese sind jedoch, wie auch die verbleibenden Minderungen der Expression bei 1ng/ml IL 4, 5ng/ml IL 4 und 50ng/ml IL 4 nicht signifikant.

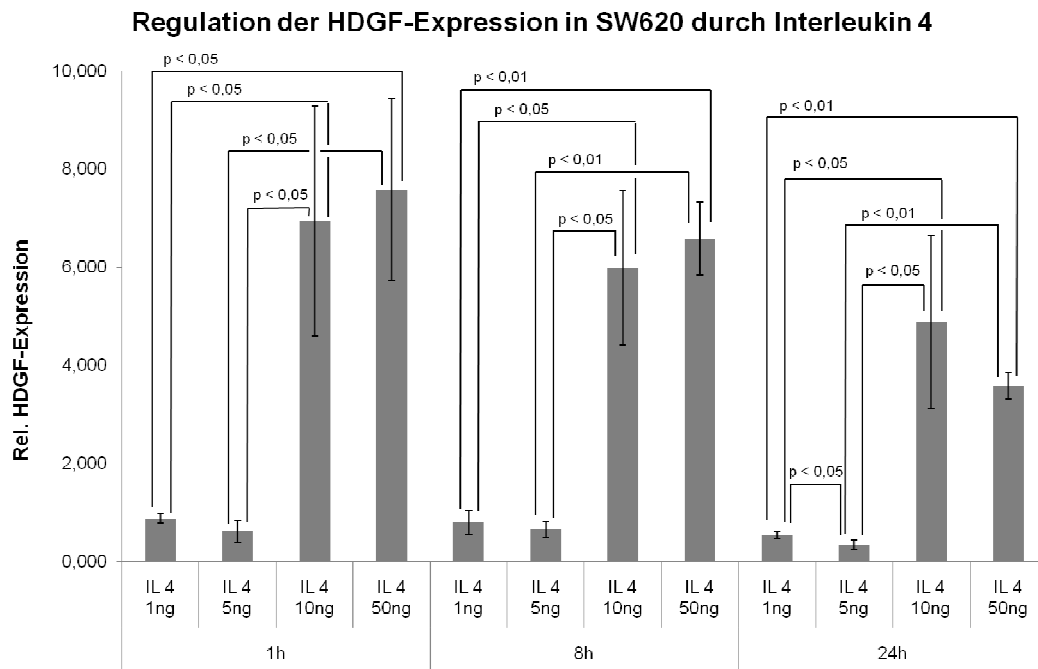


Abbildung 22: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Konzentration

Anstiege der HDGF-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ finden sich zwischen 1ng/ml IL 4 und 10ng/ml IL 4 bzw. 50ng/ml IL 4 sowie für 10ng/ml IL 4 bzw. 50ng/ml IL 4 gegenüber 5ng/ml IL 4 zum Inkubationszeitpunkt 1h. Bei 8h und 24h beobachtet man die gleichen Signifikanzen, es zeigt sich für den jeweiligen Anstieg zu 50ng/ml IL 4 eine Signifikanz von $p < 0,01$. Der Expressionsabfall für 5ng/ml IL 4 gegenüber 1ng/ml IL 4 zeigt sich nur bei 24h Inkubationszeit als signifikant ($p < 0,05$).

Für die Inkubation mit Interleukin 4 zeigen sich in Abhängigkeit von der Konzentration keine einheitlichen, in allen Zelllinien wiederkehrenden Expressionsänderungen. Während in HT29 und SW480 keine relevanten Veränderungen auftreten, zeigt sich in der Adenomzelllinie Geki-2 ein konzentrationsabhängiger Abfall der HDGF-Expression bis auf 8% des Ausgangswerts, während es in der Metastasenzelllinie SW620 zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg um Faktor 6-14 kommt.

3.3 Interleukin 5

3.3.1 Geki-2

Im zeitlichen Verlauf ist nur der Abfall der HDGF-Expression bei 50ng/ml IL 5 zwischen 1h und 8h Inkubationszeit mit $p < 0,05$ signifikant. In Abhängigkeit von der Konzentration lassen sich zu allen drei Zeitpunkten der Inkubation signifikante Abfälle der HDGF-Expression beobachten.

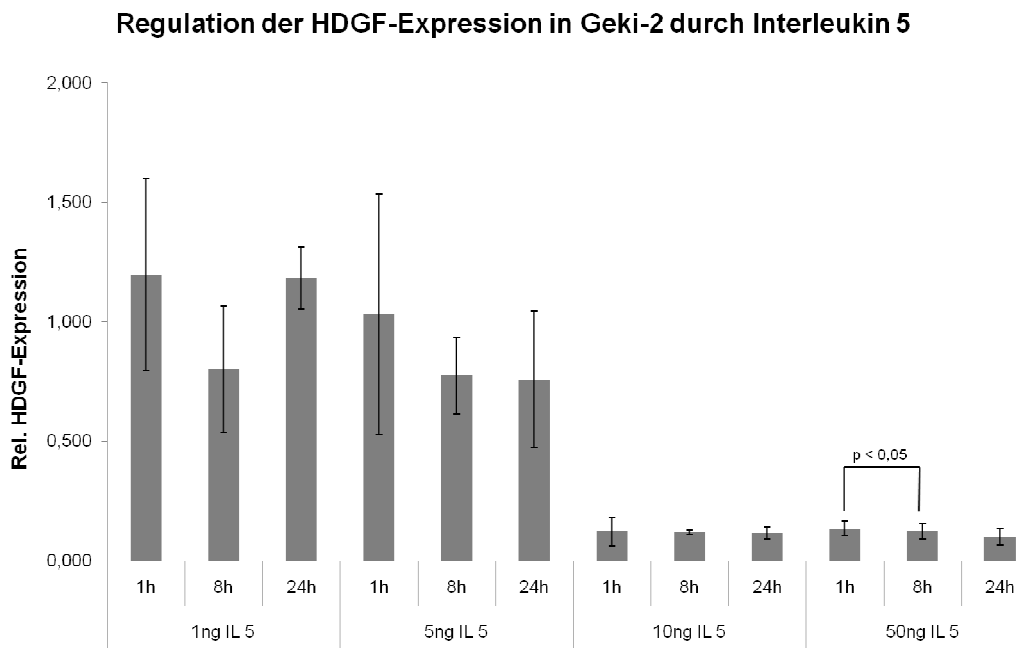


Abbildung 23: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Zeit
 Im zeitlichen Verlauf ist der Abfall der HDGF-Expression bei 50ng/ml IL 5 zwischen 1h und 8h Inkubationszeit mit $p < 0,05$ signifikant.

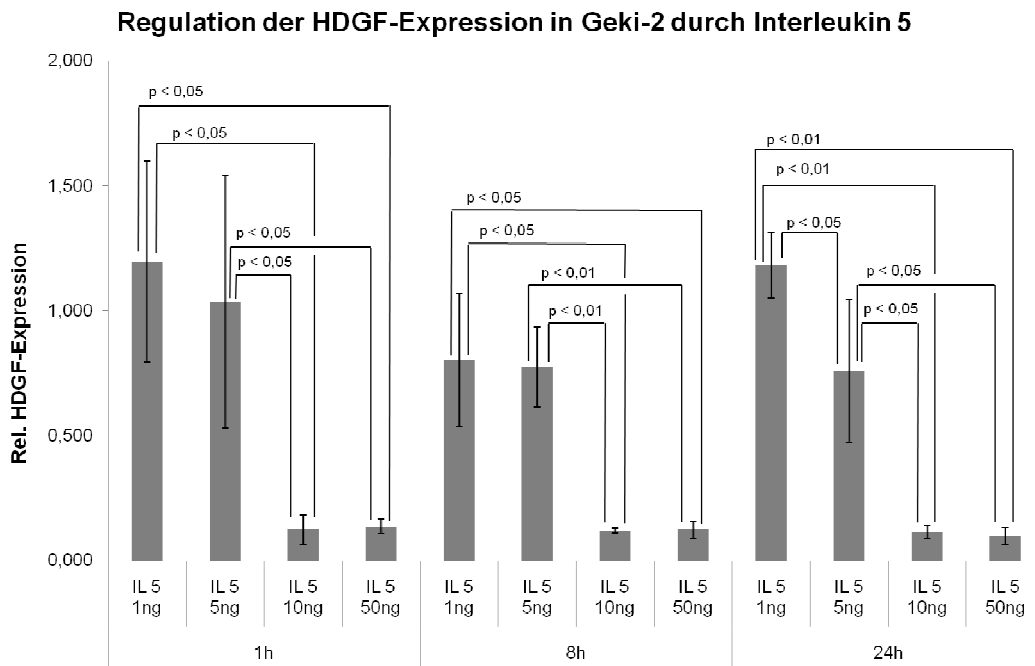


Abbildung 24: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Konzentration

Es zeigen sich signifikante Abfälle der HDGF-Expression für 10ng/ml IL 5 sowie für 50ng/ml IL 5 jeweils gegenüber 1ng/ml IL 5 und 5ng/ml IL 5. Für 1h Inkubationszeit liegen die Signifikanzen jeweils bei $p < 0,05$. Bei 8h Inkubationsdauer zeigen sich für die Änderungen von 1ng/ml IL 5 ausgehend Signifikanzen von $p < 0,05$ und für die Abfälle von 5ng/ml IL 5 auf 10ng/ml IL 5 bzw. 50ng/ml IL 5 Signifikanzen von $p < 0,01$. Inkubation über 24h ergibt jeweils eine Signifikanz von $p < 0,01$ für die verminderte HDGF-Expression zwischen 10ng/ml IL 5 bzw. 50ng/ml IL 5 und 1ng/ml IL 5. Von 5ng/ml IL 5 ausgehend zeigt sich der Abfall mit $p < 0,05$ zu 10ng/ml IL 5 sowie zu 50ng /ml IL 5 als signifikant. Zusätzlich findet man bei 24h eine signifikante Expressionsminderung von 1ng/ml IL 5 auf 5ng/ml IL 5 ($p < 0,05$). Bei 1h sowie 8h Inkubationszeit ist diese Expressionsminderung nicht signifikant.

3.3.2 HT29

Im zeitlichen Verlauf finden sich zwei signifikante Änderungen der HDGF-Expression, ein signifikanter Anstieg bei 1ng/ml IL 5 von 8h auf 24h ($p < 0,05$) und eine signifikante Minderung der Expression bei 50ng/ml IL 5 von 1h auf 8h Inkubationszeit. Signifikante Expressionsminderungen in Abhängigkeit von der Konzentration lassen sich zu allen drei Zeitpunkten ab 10ng/ml IL 5 beobachten.

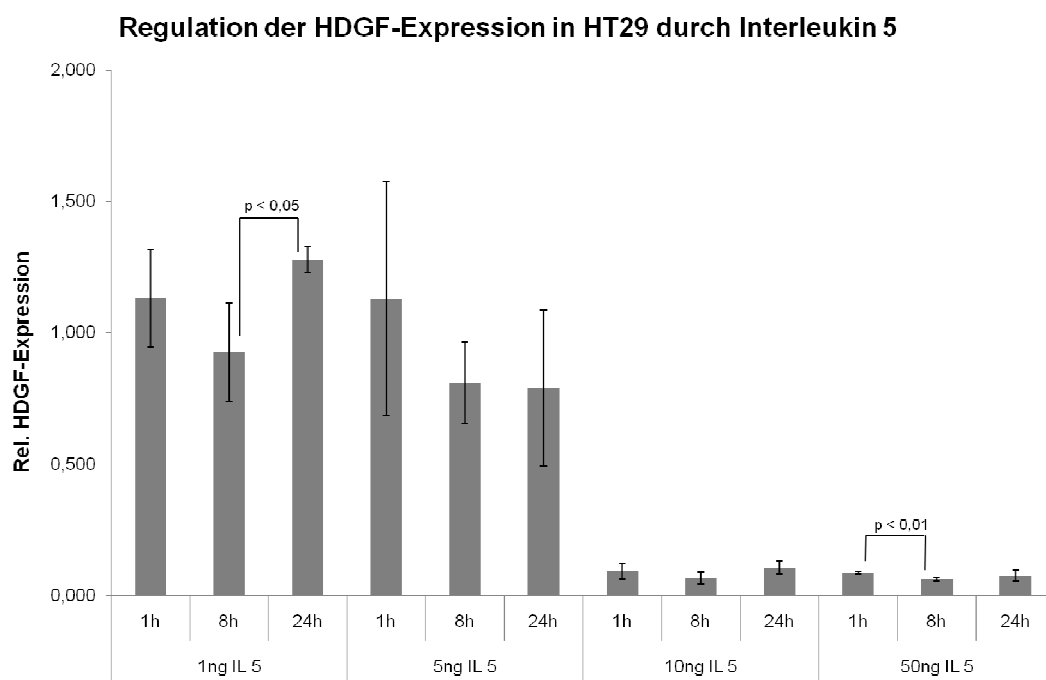


Abbildung 25: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Zeit

Im zeitlichen Verlauf findet sich bei 1ng/ml IL 5 ein signifikanter Anstieg der HDGF-Expression von 8h auf 24h ($p < 0,05$). Bei einer Konzentration von 50ng/ml IL 5 zeigt sich zwischen 1h und 8h eine signifikante Minderung der HDGF-Expression ($p < 0,01$).

Regulation der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 5

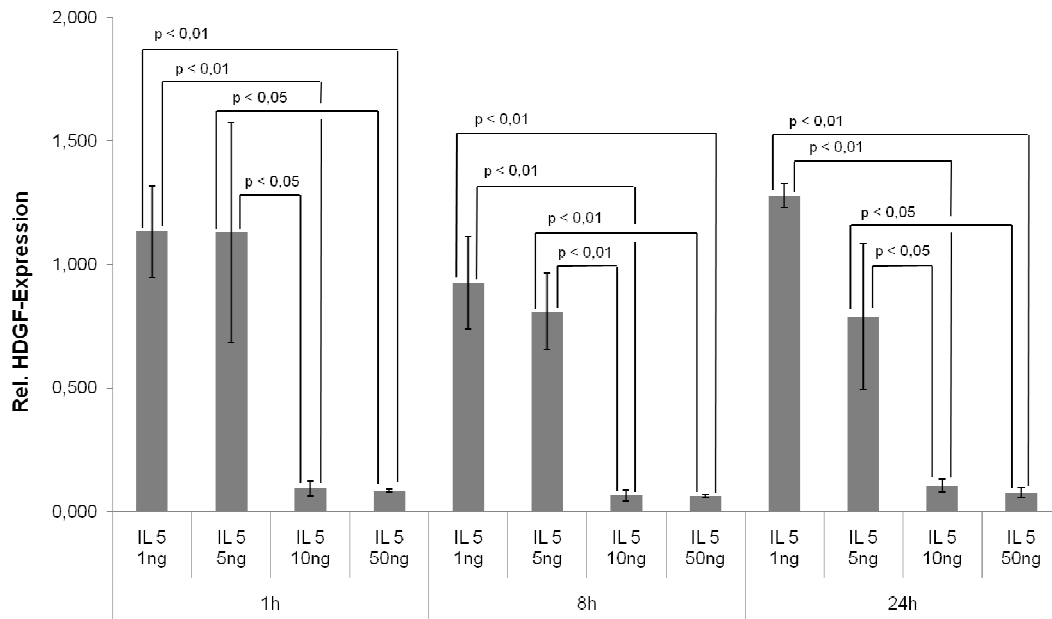


Abbildung 26: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Konzentration

Signifikante Minderungen der HDGF-Expression finden sich bei 1h Inkubationszeit für 10ng/ml IL 5 sowie 50ng/ml IL 5 gegenüber 1ng/ml IL 5 (jeweils $p < 0,01$), des Weiteren mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ für 10ng/ml IL 5 sowie 50ng/ml IL 5 gegenüber 5ng/ml IL 5. Zum 8h Wert zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den zuvor beschriebenen Konzentrationsniveaus. Diese stellen sich alle mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ dar. Bei Inkubation über 24h sind die Expressionsabfälle für 10ng/ml IL 5 bzw. 50ng/ml IL 5 gegenüber 1ng/ml IL 5 mit $p < 0,01$ signifikant. Weitere signifikante Minderungen der HDGF-Expression zeigen sich zwischen 5ng/ml IL 5 und 10ng/ml IL 5 bzw. 50ng/ml IL 5 (jeweils $p < 0,05$). Die Expressionsabfälle von 1ng/ml IL 5 auf 5ng/ml IL 5 sowie zwischen 10ng/ml IL 5 und 50ng/ml IL 5 sind nicht signifikant.

3.3.3 SW480

Für diese Zelllinie findet sich im zeitlichen Verlauf lediglich eine signifikante Änderung der HDGF-Expression, diese ist bei einer Konzentration von 5ng/ml IL 5 mit einem Abfall der Expression von 1h auf 24h Inkubationszeit ($p < 0,05$) zu beobachten. In Abhängigkeit von der IL 5 Konzentration zeigen sich zu allen Zeitpunkten Minderungen der HDGF-Expression fast zwischen allen Konzentrationsniveaus, jedoch sind diese nur teilweise signifikant.

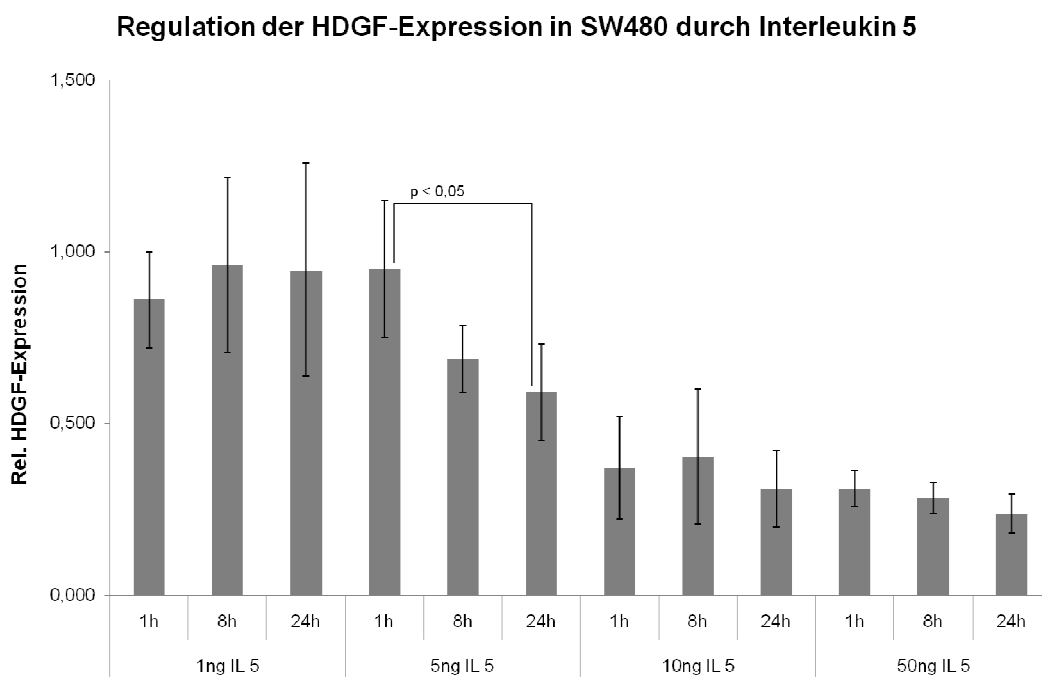


Abbildung 27: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Zeit

Ein signifikanter Abfall der HDGF-Expression findet sich bei einer Konzentration von 5ng/ml IL 5 von 1h auf 24h Inkubationszeit ($p < 0,05$).

Regulation der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 5

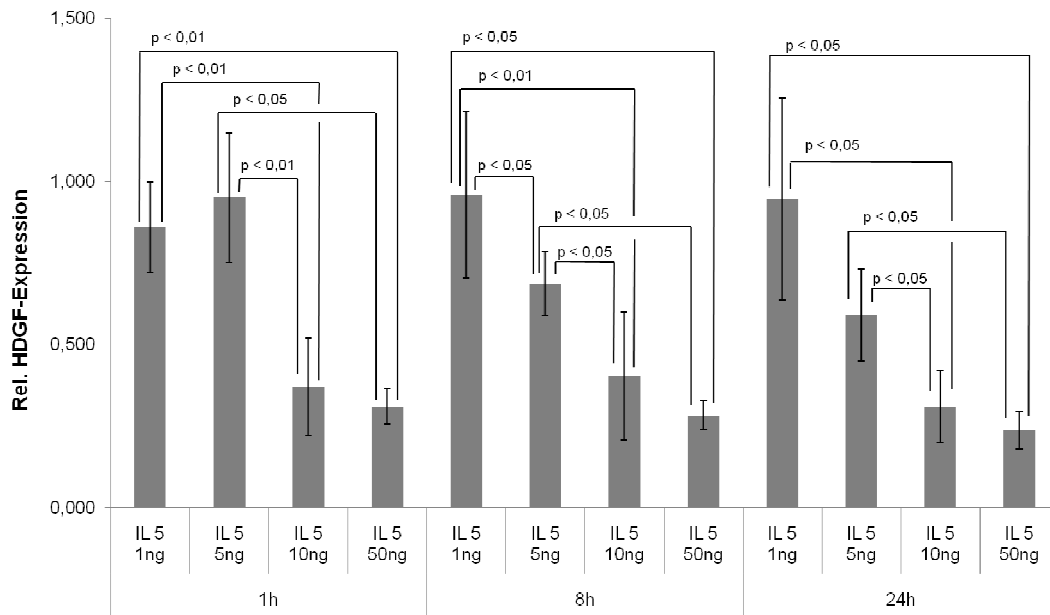


Abbildung 28: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Konzentration

Signifikante Abfälle der Expression zeigen sich bei 1h Inkubationszeit für 10ng/ml IL 5 bzw. 50ng/ml IL 5 gegenüber 1ng/ml IL 5 mit $p < 0,01$, des Weiteren für 10ng/ml IL 5 gegenüber 5ng/ml IL 5 mit $p < 0,01$ und für 50ng/ml IL 5 gegenüber 5ng/ml IL 5 mit $p < 0,05$. Zum 8h Wert beobachtet man für 10ng/ml IL 5 gegenüber 1ng/ml IL 5 einen signifikanten Abfall der HDGF-Expression mit $p < 0,01$, für 50ng/ml IL 5 gegenüber 1ng/ml IL 5 eine Expressionsminderung mit einer Signifikanz von $p < 0,05$. Darüber hinaus finden sich signifikante Abfälle der HDGF-Expression für 10ng/ml IL 5 bzw. 50ng/ml IL 5 gegenüber 5ng/ml IL 5 mit $p < 0,05$. Zusätzlich zeigt sich der Expressionsabfall von 1ng/ml IL 5 auf 5ng/ml IL 5 signifikant ($p < 0,05$). Für die Inkubation über 24h lassen sich alle signifikanten Expressionsabfälle mit $p < 0,05$ feststellen. Diese finden sich für 10ng/ml IL 5 bzw. 50ng/ml IL 5 jeweils gegenüber 1ng/ml IL 5 und 5ng/ml IL 5. Die Minderungen der HDGF-Expression von 10ng/ml IL 5 auf 50ng/ml IL 5 sind nicht signifikant.

3.3.4 SW620

Zwei signifikante Expressionsminderungen sind im zeitlichen Verlauf von 8h auf 24h für die Konzentrationen 5ng/ml IL 5 und 10ng/ml IL 5 (jeweils $p < 0,05$) beobachtbar. Bei den Konzentrationen von 1ng/ml IL 5 und 50ng/ml IL 5 zeigen sich diese Abfälle der HDGF-Expression als nicht signifikant. In Abhängigkeit von der Konzentration von IL 5 finden sich zu allen drei Inkubationszeitpunkten signifikante Anstiege der HDGF-Expression.

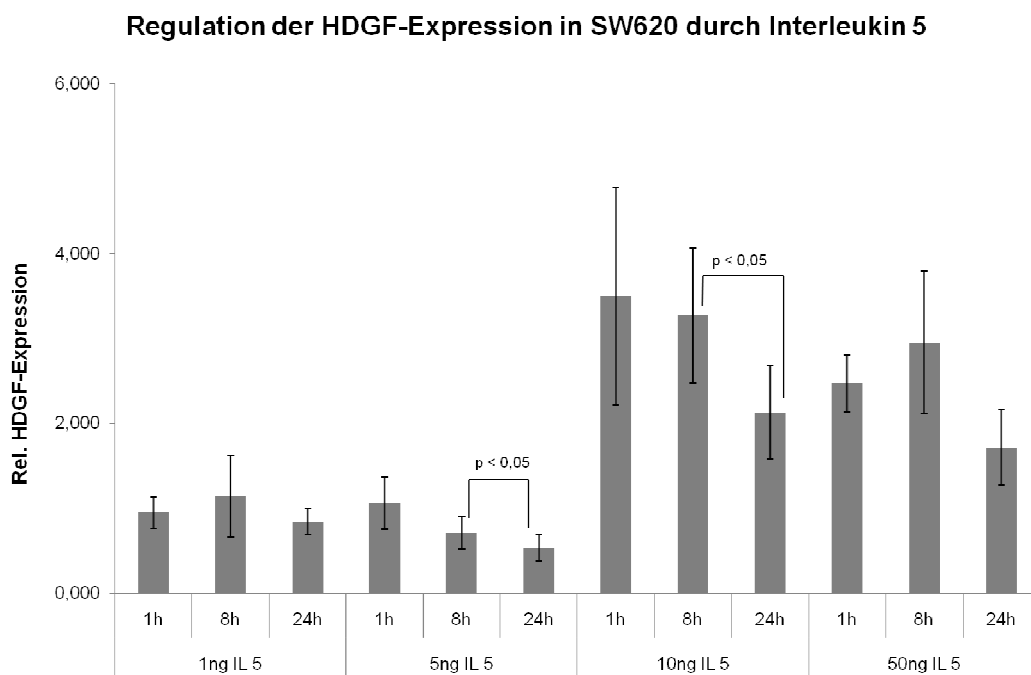


Abbildung 29: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Zeit

Zwei signifikante Expressionsminderungen sind im zeitlichen Verlauf von 8h auf 24h für die Konzentrationen 5ng/ml IL 5 und 10ng/ml IL 5 (jeweils $p < 0,05$) erkennbar. Bei den Konzentrationen von 1ng/ml IL 5 und 50ng/ml IL 5 zeigen sich diese Abfälle der HDGF-Expression als nicht signifikant.

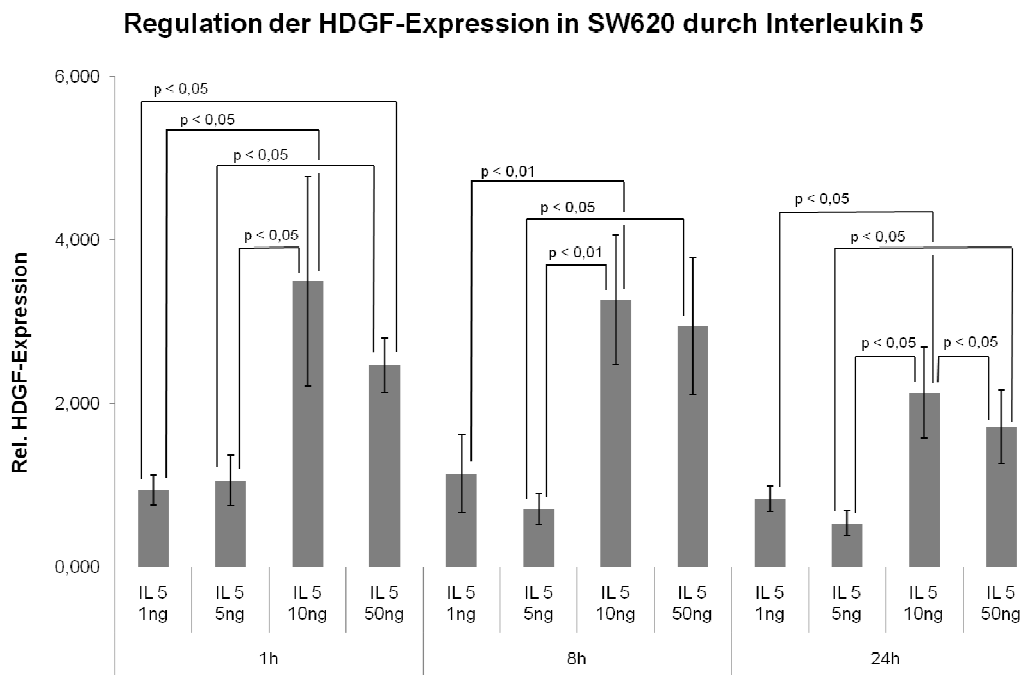


Abbildung 30: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Konzentration

Für den Zeitpunkt von 1h finden sich von 1ng/ml IL 5 auf 10ng/ml IL 5 bzw. 50ng/ml IL 5 signifikante Anstiege der HDGF-Expression ($p < 0,05$) als auch für die Konzentration von 5ng/ml IL 5 zu 10ng/ml IL 5 bzw. 50ng/ml IL 5 ($p < 0,05$). Bei Inkubationsdauer von 8h findet sich keine Signifikanz zwischen 1ng/ml IL 5 und 50ng/ml IL 5. Für 10ng/ml IL 5 gegenüber 1ng/ml IL 5 bzw. 5ng/ml IL 5 liegen die Expressionserhöhungen mit Signifikanzen von $p < 0,01$ vor. Auch der Anstieg zwischen 5ng/ml IL 5 und 50ng/ml IL 5 ist mit $p < 0,05$ signifikant. Für die Inkubation über 24h liegen signifikante Erhöhungen der HDGF-Expression zwischen 1ng/ml IL 5 und 10ng/ml IL 5 ($p < 0,05$), des Weiteren von 5ng/ml IL 5 auf 10ng/ml IL 5 bzw. 50ng/ml IL 5 ($p < 0,05$) vor. Zusätzlich findet ein signifikanter Abfall der HDGF-Expression von 10ng/ml IL 5 auf 50ng/ml IL 5 ($p < 0,05$) statt.

Bei Behandlung mit Interleukin 5 zeigt sich mit Ausnahme der Zelllinie SW620 durchgängig ein Abfall der HDGF-Expression für die beiden hohen Konzentrationen gegenüber den beiden niedrigeren Konzentrationen zu allen Inkubationszeitpunkten. Die Ausgangswerte für 1ng/ml IL 5 bzw. 5ng/ml IL 5 liegen bei einer maximalen Expression von circa 1,3 und fallen zwischen dem Zweifachen (SW480) und Siebzehnfachen (HT29) ab. Die Zelllinie der SW620 zeigt dagegen, wie auch bei Interleukin 4, einen Expressionsanstieg für höhere Konzentrationen. Im zeitlichen Verlauf lassen sich keine einheitlichen Veränderungen feststellen.

3.4 Interleukin 8

3.4.1 Geki-2

Für die Inkubation mit Interleukin 8 zeigen sich in den Geki-2-Zellen Anstiege der HDGF-Expression im zeitlichen Verlauf bei allen drei Konzentrationen, jedoch ist lediglich die Erhöhung der Expression bei 1ng/ml IL 8 von 1h auf 24h signifikant ($p < 0,05$). In Abhängigkeit von der Konzentration von IL 8 kommt es für 50ng/ml IL 8 gegenüber 1ng/ml IL 8 sowie 10ng/ml IL 8 zu allen Inkubationszeitpunkten zu signifikanten Minderungen der HDGF-Expression. Der Expressionsabfall für 10ng/ml IL 8 gegenüber 1ng/ml IL 8 ist zu keinem Zeitpunkt signifikant.

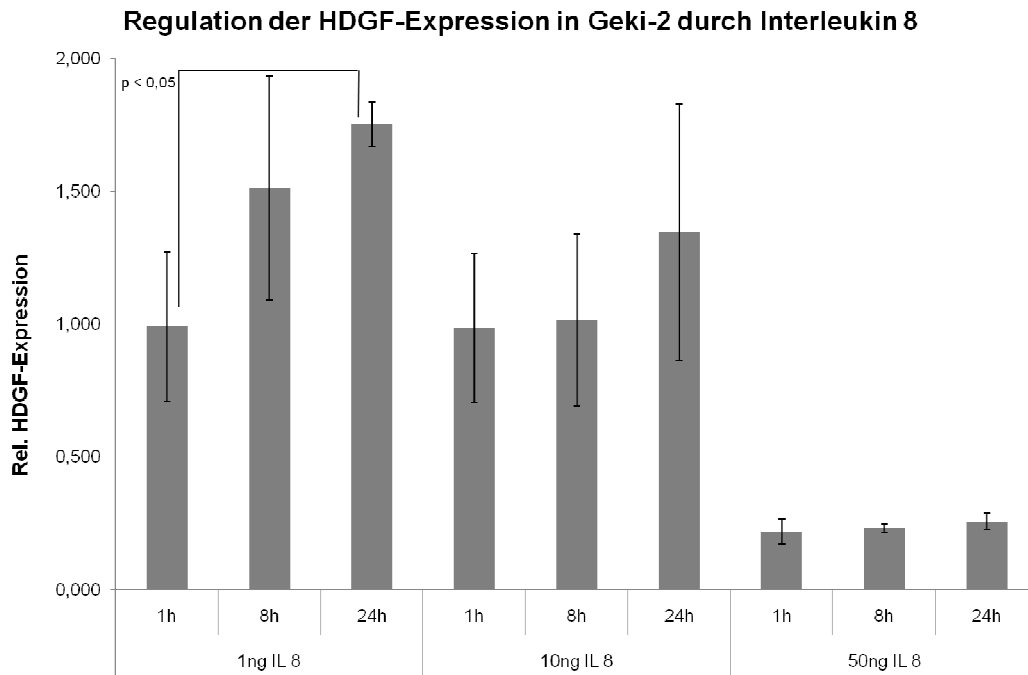


Abbildung 31: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Zeit

Es zeigen sich Anstiege der HDGF-Expression im zeitlichen Verlauf, von 1h über 8h zu 24h bei allen Konzentrationen von IL 8, jedoch ist lediglich die Erhöhung der Expression bei 1ng/ml IL 8 von 1h auf 24h signifikant ($p < 0,05$).

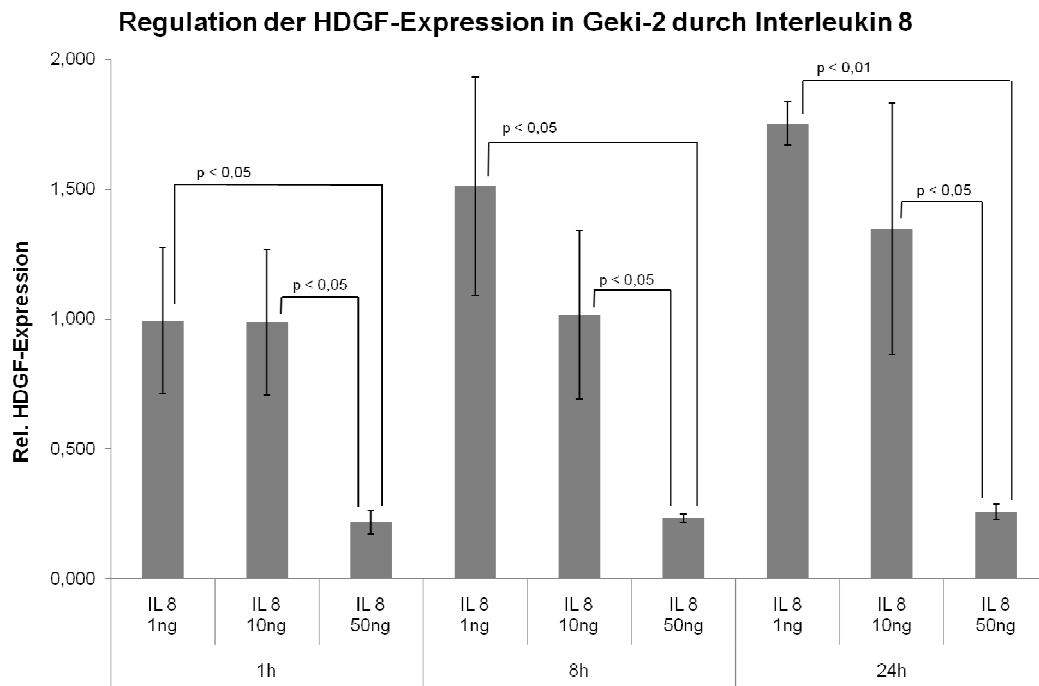


Abbildung 32: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Konzentration

Zu den Inkubationszeitpunkten 1h und 8h finden sich Abfälle der HDGF-Expression zwischen 1ng/ml IL 8 und 50ng/ml IL 8 sowie zwischen 10ng/ml IL 8 und 50ng/ml IL 8, jeweils mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Bei Inkubation über 24h beobachtet man eine Signifikanz von $p < 0,01$ für den Expressionsabfall für 50ng/ml IL 8 gegenüber 1ng/ml IL 8. Die signifikante Expressionsminderung von 10ng/ml IL 8 auf 50ng/ml IL 8 liegt wiederum bei $p < 0,05$. Der Expressionsabfall für 10ng/ml IL 8 gegenüber 1ng/ml IL 8 ist zu keinem Zeitpunkt signifikant.

3.4.2 HT29

Änderungen der HDGF-Expression im zeitlichen Verlauf sind nicht signifikant, stellen sich aber mit einem Abfall der Expression von 1h über 8h hin zu 24h im Falle aller Konzentrationen dar. In Abhängigkeit von der Konzentration von IL 8 kann man signifikante Anstiege der HDGF-Expression zu allen drei Zeitpunkten beobachten. Die Minderung der Expression von 1ng/ml IL 8 auf 5ng/ml IL 8 sowie zwischen 10ng/ml IL 8 und 50ng/ml IL 8 stellt sich nur in einem Fall als signifikant dar.

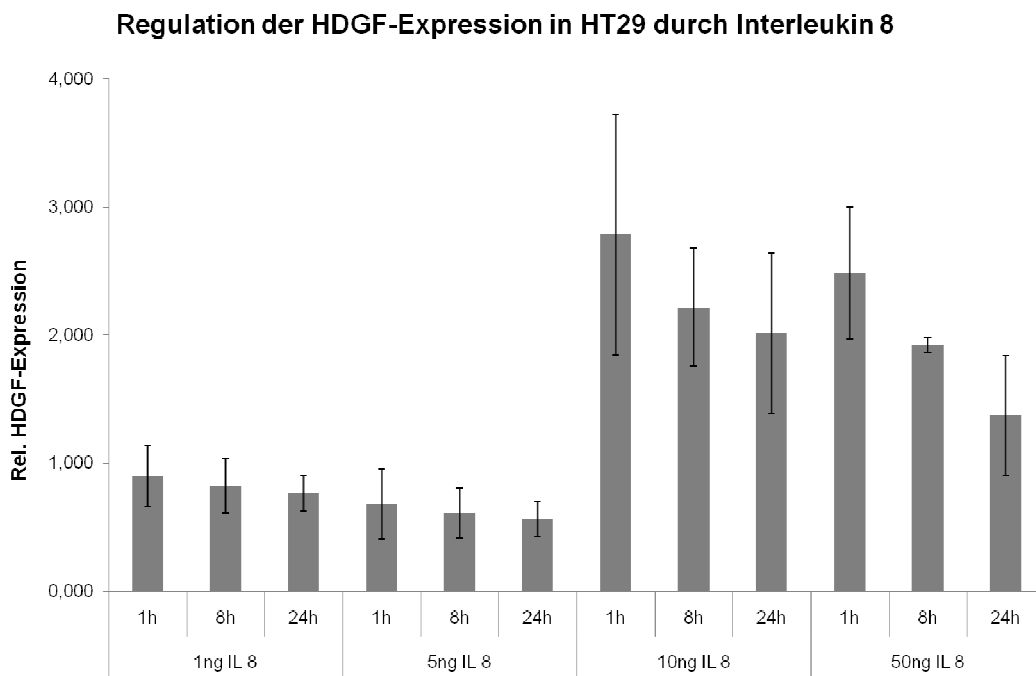


Abbildung 33: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Zeit

Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression.

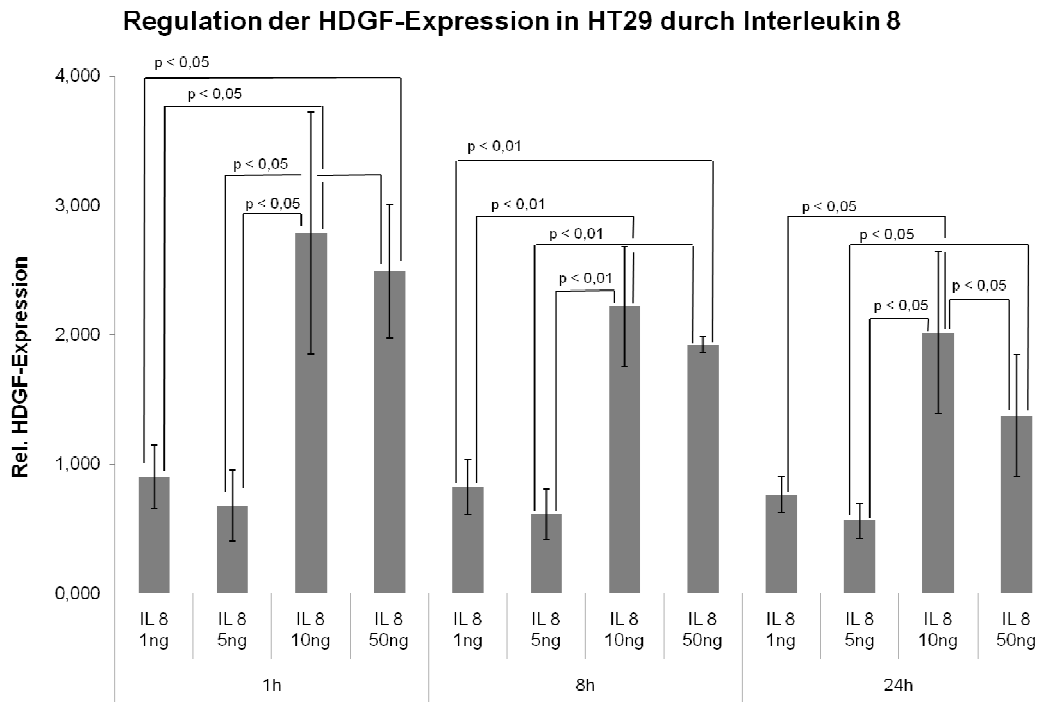


Abbildung 34: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Konzentration

Signifikante Erhöhungen der HDGF-Expression zeigen sich für 10ng/ml IL 8 bzw. 50ng/ml IL 8 jeweils gegenüber 1ng/ml IL 8 und 5ng/ml IL 8. Für die Inkubationszeit von 1h liegt das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$, bei Inkubation über 8h bei $p < 0,01$. Zum Zeitpunkt 24h beobachtet man signifikante Anstiege der HDGF-Expression zwischen 1ng/ml IL 8 und 10ng/ml IL 8 ($p < 0,05$), jedoch nicht zu 50ng/ml IL 8. Des Weiteren zeigen sich Expressionsanstiege von 5ng/ml IL 8 zu 10ng/ml IL 8 sowie von 5ng/ml IL 8 zu 50ng/ml IL 8 mit Signifikanzen von $p < 0,05$. Auch stellt man einen Abfall der HDGF-Expression zwischen 10ng/ml IL 8 und 50ng/ml IL 8 fest, dieser ist jedoch nur bei 24h signifikant ($p < 0,05$).

3.4.3 SW480

Im zeitlichen Verlauf zeigen sich keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression. Im Bezug auf die Konzentration von IL 8 kann man ein der Zelllinie HT29 sehr ähnliches Verhalten beobachten. Signifikante Anstiege der HDGF-Expression sind zu allen drei Inkubationszeitpunkten in Abhängigkeit von der IL 8 Konzentration erkennbar. Die beobachtete Expressionsminderung für 5ng/ml IL 8 gegenüber 1ng/ml IL 8 sowie für 50ng/ml IL 8 gegenüber 10ng/ml IL 8 zeigt sich nur in einem Fall als signifikant.

Regulation der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 8

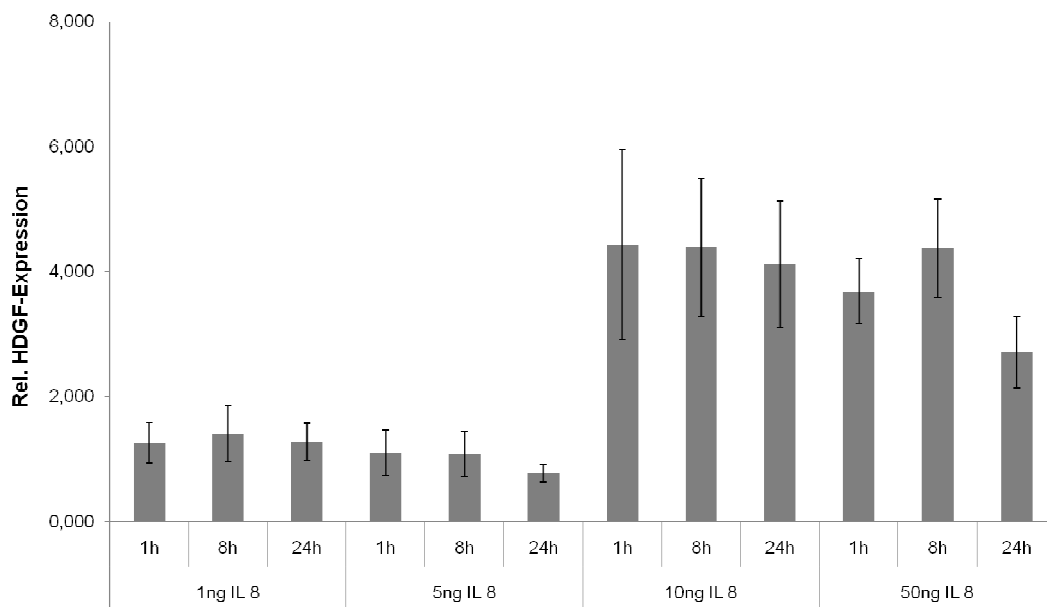


Abbildung 35: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Zeit

Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression.

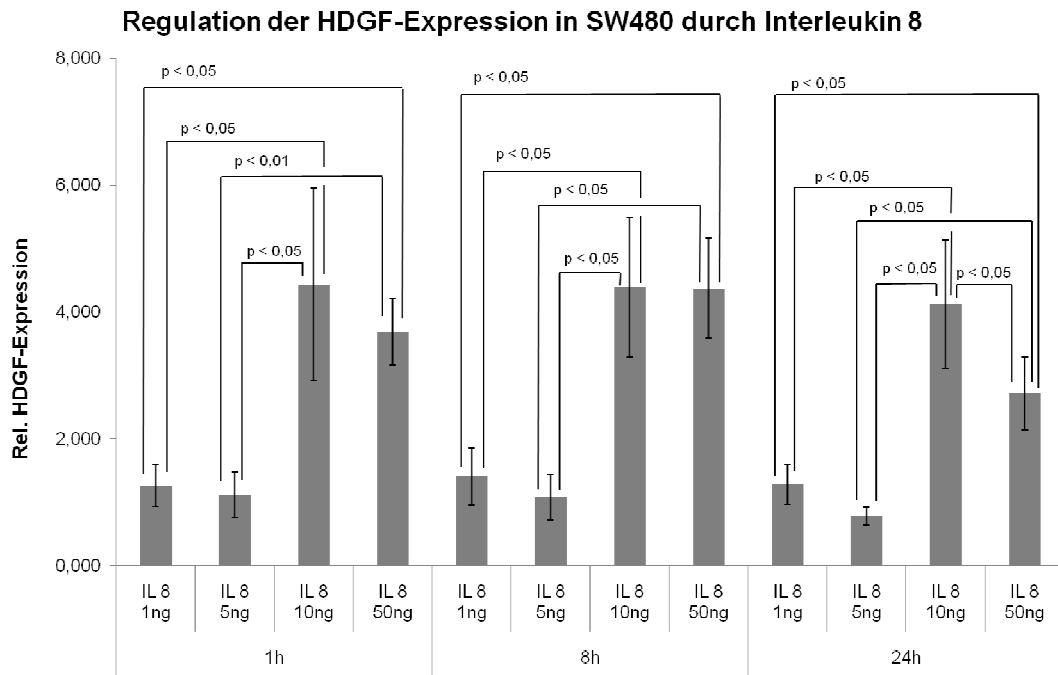


Abbildung 36: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Konzentration

Signifikante Anstiege der HDGF-Expression ergeben sich zu allen drei Inkubationszeitpunkten für 10ng/ml IL 8 jeweils gegenüber 1ng/ml IL 8 und 5ng/ml IL 8, sowie für 50ng/ml IL 8 jeweils gegenüber 1ng/ml IL 8 und 5ng/ml IL 8. Die Signifikanzen zeigen sich mit einer Ausnahme, dem Anstieg zwischen 5ng/ml IL 8 und 50ng/ml IL 8 bei 1h ($p < 0,01$), jeweils mit $p < 0,05$. Die feststellbare Expressionsminderung zwischen 10ng/ml IL 8 und 50ng/ml IL 8 ist bei 24h signifikant ($p < 0,05$).

3.4.4 SW620

Hier lassen sich nur wenige signifikante Änderungen der HDGF-Expression feststellen. Diese stellen sich in Abhängigkeit der Konzentration von IL 8 dar. Ein signifikanter Anstieg der HDGF-Expression zeigt sich von 5ng/ml IL 8 auf 10ng/ml IL 8 sowohl bei 8h als auch bei 24h Inkubationszeit ($p < 0,01$). Bei Inkubation über 24h lässt sich des Weiteren eine signifikante Erhöhung der HDGF-Expression von 5ng/ml IL 8 auf 50ng/ml IL 8 beobachten ($p < 0,05$).



Abbildung 37: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Zeit
Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression.



Abbildung 38: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Konzentration

Ein signifikanter Anstieg der HDGF-Expression zeigt sich von 5ng/ml IL 8 auf 10ng/ml IL 8 sowohl bei 8h als auch bei 24h Inkubationszeit ($p < 0,01$). Bei Inkubation über 24h lässt sich darüber hinaus eine signifikante Erhöhung der HDGF-Expression von 5ng/ml IL 8 auf 50ng/ml IL 8 beobachten ($p < 0,05$).

Es lässt sich für die Zelllinien HT29 und SW480 gleiches Verhalten der Expressionsänderung in Abhängigkeit von der Konzentration feststellen. Es finden, ausgehend von 1ng/ml IL 8 und 5ng/ml IL 8 mit Expressionswerten zwischen 0,6 und 1,4, zu allen Zeitpunkten Anstiege der Expression für 10ng/ml IL 8 und 50ng/ml IL 8 auf das etwa Zwei- bis Fünffache statt. Für Zellen der Linie SW620 ergibt sich keine wesentliche Änderung unter Interleukin 8. Die Geki-2 zeigen dagegen Abfälle der Expression mit höheren Konzentrationen. Im zeitlichen Verlauf ist, mit Ausnahme der Geki-2 Zellen, für fast alle Konzentrationen ein Abfall der HDGF-Expression mit längerer Inkubationszeit beobachtbar.

3.5 Interleukin 13

3.5.1 Geki-2

Es lassen sich im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression bei Inkubation mit IL 13 feststellen. In Abhängigkeit der Konzentration von IL 13 zeigen sich zu allen drei Inkubationszeitpunkten signifikante Reduktionen der HDGF-Expression zwischen den verschiedenen Konzentrationsniveaus.

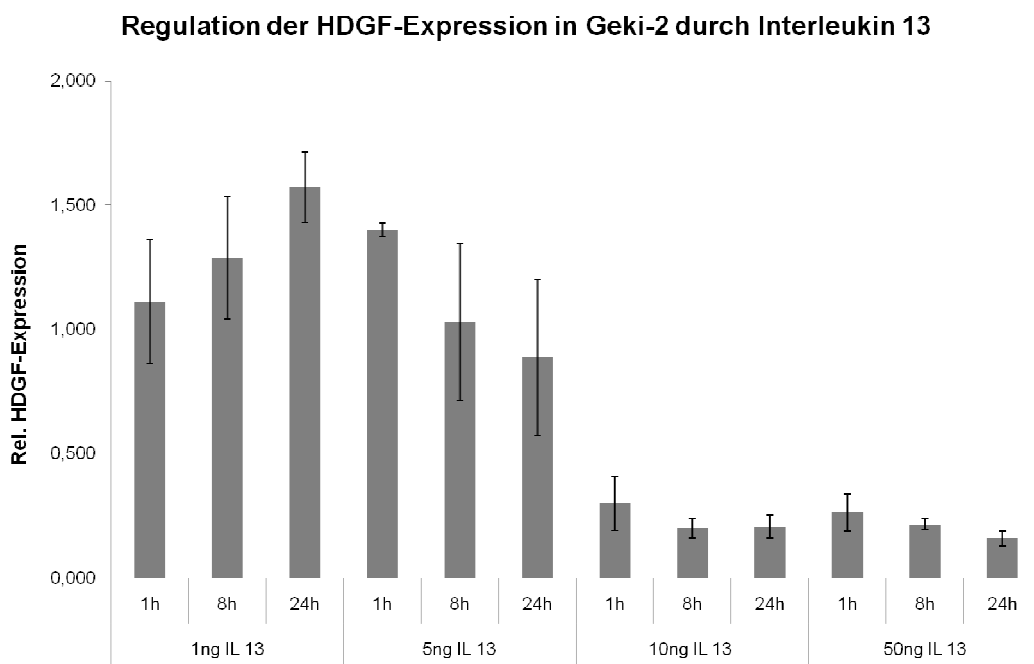


Abbildung 39: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Zeit

Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen der HDGF-Expression.

Regulation der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 13

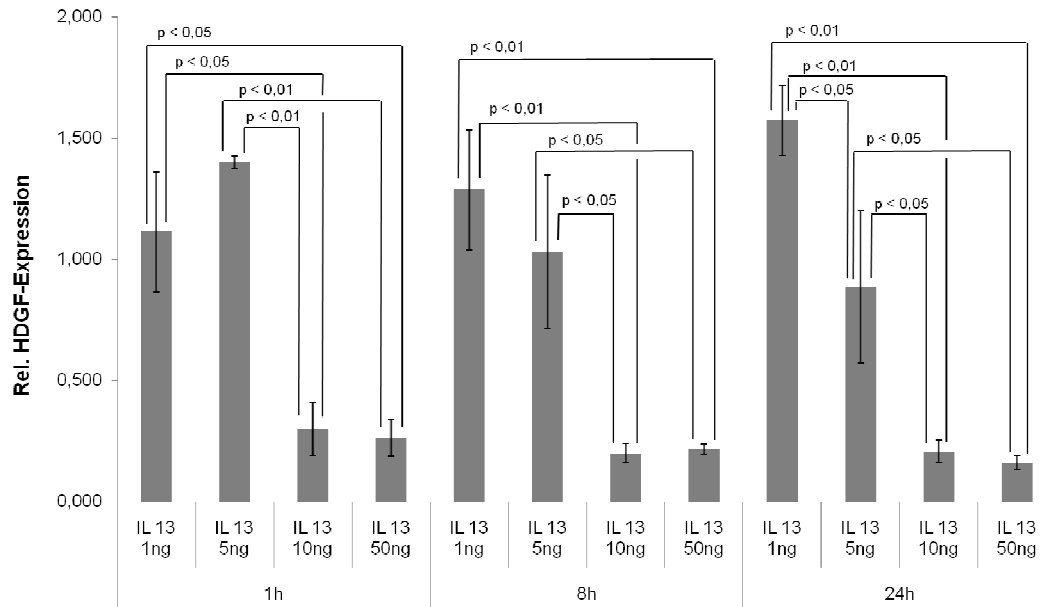


Abbildung 40: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Konzentration

Bei 1h Inkubationszeit lässt sich für die Abfälle der HDGF-Expression zwischen 10ng/ml IL 8 bzw. 50ng/ml IL 8 und 1ng/ml IL 8 eine Signifikanz von $p < 0,05$ feststellen. Für die Expressionsminderungen von 10ng/ml IL 8 bzw. 50ng/ml IL 8 gegenüber 5ng/ml IL 8 zeigt sich jeweils eine Signifikanz von $p < 0,01$. Inkubation über 8h sowie 24h zeigen identische Signifikanzen. Diese wiederum zwischen 1ng/ml IL 8 und 10ng/ml IL 8 bzw. 50ng/ml IL 8 ($p < 0,01$) sowie von 5ng/ml IL 8 zu 10ng/ml IL bzw. 50ng/ml IL 8 ($p < 0,05$). Des Weiteren zeigt sich bei 24h Inkubationsdauer ein Abfall der HDGF-Expression von 1ng/ml IL 8 auf 5ng/ml IL 8 als signifikant ($p < 0,05$).

3.5.2 HT29

Hier finden sich signifikante Änderungen der HDGF-Expression sowohl im zeitlichen Verlauf als auch in Abhängigkeit der Konzentration von IL 13. Für die Konzentration 1ng/ml IL 13 lässt sich ein Anstieg der HDGF-Expression von 8h auf 24h beobachten ($p < 0,05$). Bei 5ng/ml IL 13 zeigt sich ein signifikanter Expressionsabfall zwischen 1h und 8h Inkubation ($p < 0,05$). Einen signifikanten Abfall der Expression kann man auch bei 50ng/ml IL 13 zwischen 8h und 24h erkennen ($p < 0,05$). In Abhängigkeit der IL 13 Konzentration finden sich zu allen drei Inkubationszeitpunkten sowohl Erhöhungen als auch Minderungen zwischen den einzelnen Konzentrationen mit unterschiedlicher Signifikanz.

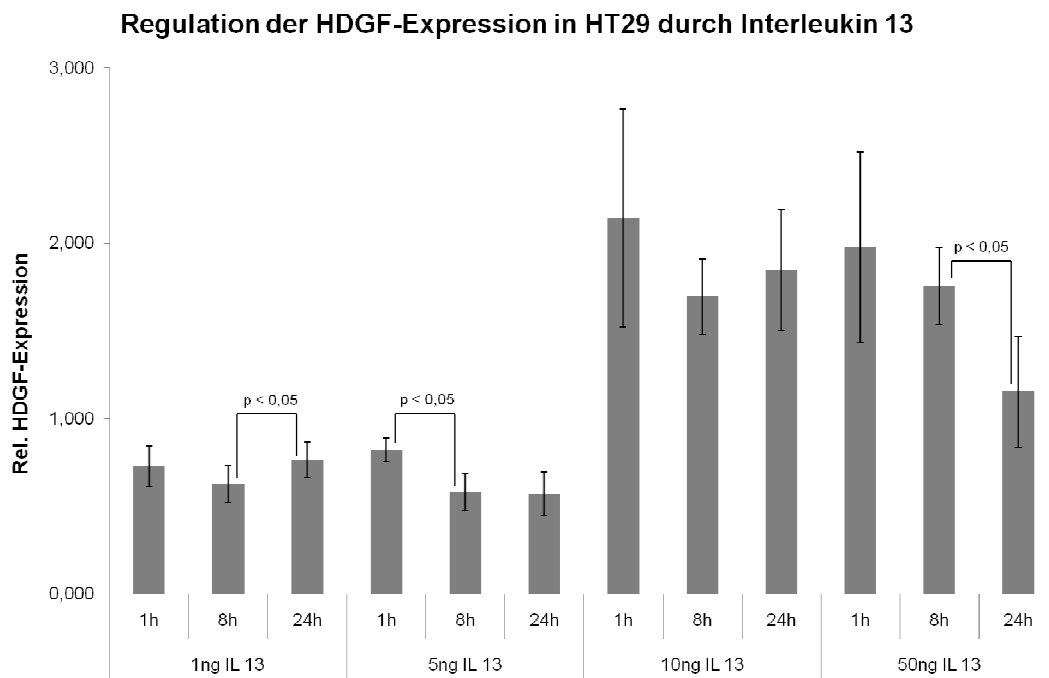


Abbildung 41: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Zeit

Für die Konzentration 1ng/ml IL 13 lässt sich ein signifikanter Anstieg der HDGF-Expression von 8h auf 24h beobachten ($p < 0,05$). Bei 5ng/ml IL 13 zeigt sich ein signifikanter Expressionsabfall zwischen 1h und 8h Inkubation ($p < 0,05$). Einen signifikanten Abfall der Expression kann man auch bei 50ng/ml IL 13 zwischen 8h und 24h erkennen ($p < 0,05$).

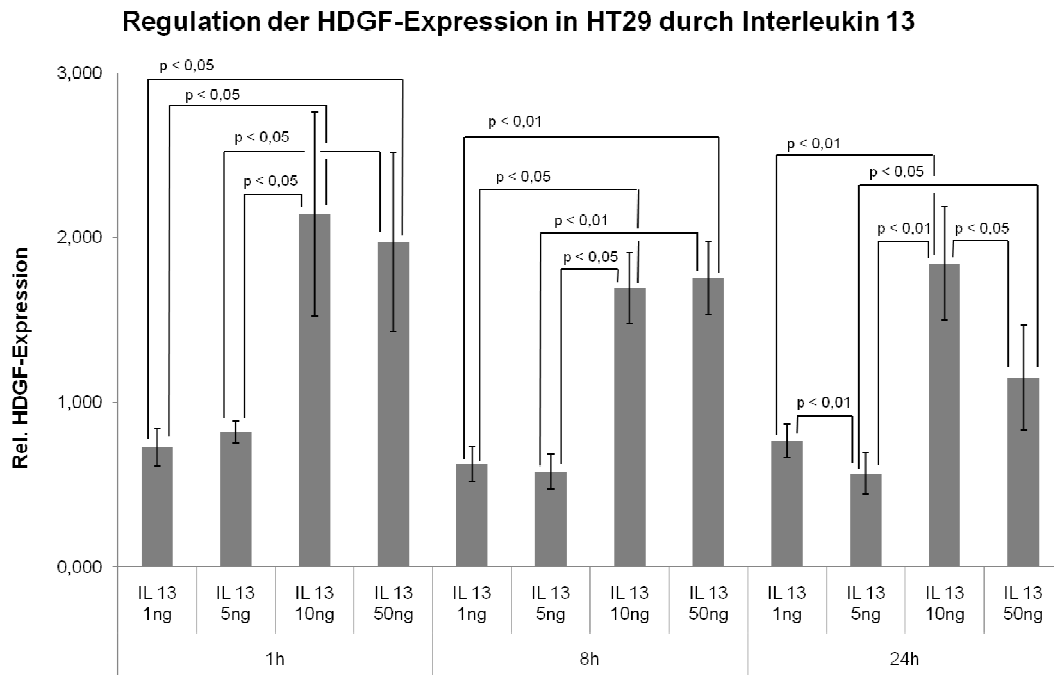


Abbildung 42: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Konzentration

Zum ersten Inkubationszeitpunkt finden sich signifikante Anstiege der HDGF-Expression für 10ng/ml IL 13 sowie 50ng/ml IL 13 jeweils gegenüber 1ng/ml IL 13 und 5ng/ml IL 13 ($p < 0,05$). Bei 8h Inkubationszeit stellen sich die signifikanten Expressionserhöhungen für 10ng/ml IL 13 gegenüber 1ng/ml IL 13 bzw. 5ng/ml IL 13 mit einer Signifikanz von jeweils $p < 0,05$, für 50ng/ml IL 13 gegenüber 1ng/ml IL 13 bzw. 5ng/ml IL 13 mit $p < 0,01$ dar. Die Inkubation über 24h weist sowohl signifikante Anstiege als auch Abfälle der HDGF-Expression auf. Signifikante Erhöhungen der Expression zeigen sich zwischen 1ng/ml IL 13 und 10ng/ml IL 13 ($p < 0,01$), von 5ng/ml IL 13 zu 10ng/ml IL 13 ($p < 0,01$) sowie von 5ng/ml IL 13 zu 50ng/ml IL 13 ($p < 0,05$). Signifikante Expressionsminderungen beobachtet man für 5ng/ml IL 13 gegenüber 1ng/ml IL 13 ($p < 0,01$) sowie für 50ng/ml IL 13 gegenüber 10ng/ml IL 13 ($p < 0,05$).

3.5.3 SW480

Zunächst lassen sich drei signifikante Änderungen der HDGF-Expression im zeitlichen Verlauf beobachten. Ein signifikanter Expressionsanstieg von 1h auf 8h Inkubationszeit bei 1ng/ml IL 13 ($p < 0,05$), sowie eine signifikante Minderung der Expression für 10ng/ml IL 13 von 1h auf 24h Inkubationsdauer und ein signifikanter Abfall der HDGF-Expression bei 50ng/ml IL 13 des 8h Werts auf den 24h Wert ($p < 0,05$). In Abhängigkeit von der Konzentration lassen sich für die Inkubationszeit von 8h sowie 24h signifikante Expressionsabfälle verzeichnen. Die bei 1h Inkubationsdauer stattfindende kontinuierliche Expressionsminderung mit höherer Konzentration von IL 13 ist nicht signifikant.

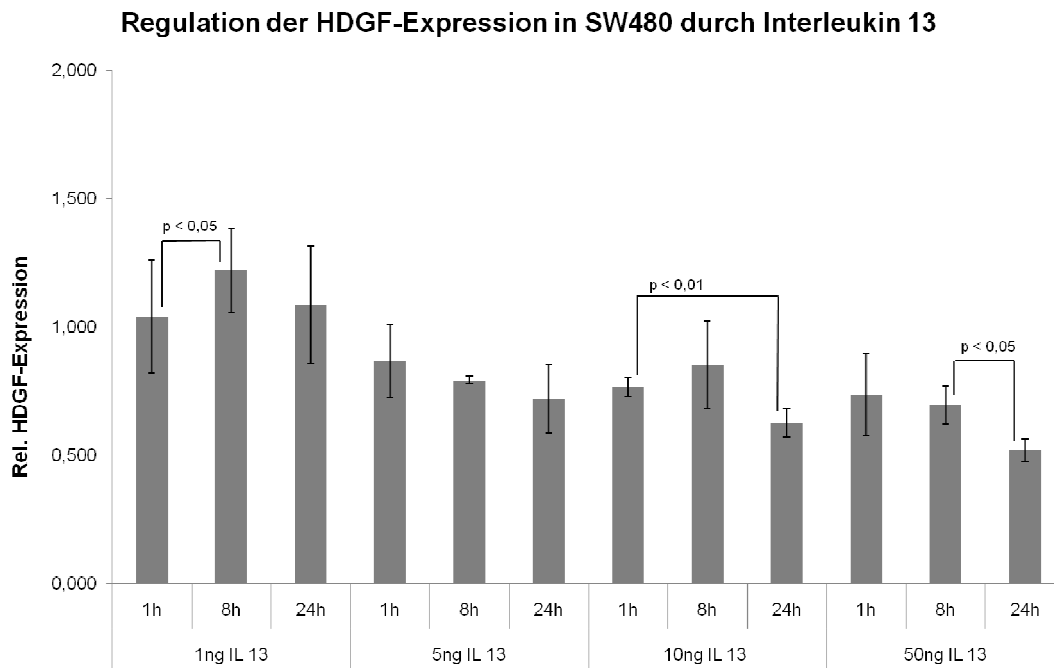


Abbildung 43: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Zeit

Ein signifikanter Expressionsanstieg zeigt sich von 1h auf 8h Inkubationszeit bei 1ng/ml IL 13 ($p < 0,05$), sowie eine signifikante Minderung der Expression für 10ng/ml IL 13 von 1h auf 24h Inkubationsdauer und ein signifikanter Abfall der HDGF-Expression bei 50ng/ml IL 13 des 8h Werts auf den 24h Wert ($p < 0,05$).

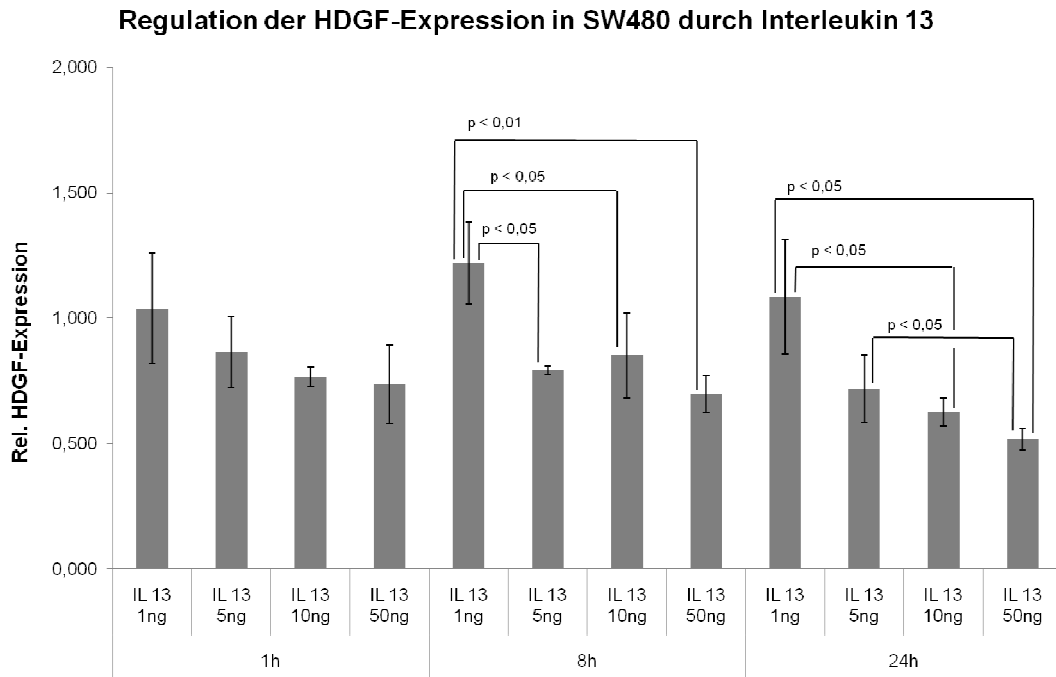


Abbildung 44: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Konzentration

Zum Zeitpunkt 8h stellen sich alle signifikanten Abfälle der HDGF-Expression gegenüber 1ng/ml IL 13 dar. Für 5ng/ml IL 13 mit einer Signifikanz von $p < 0,05$, für 10ng/ml IL 13 mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ und für 50ng/ml IL 13 mit einer Signifikanz von $p < 0,01$. Für die Inkubation über 24h zeigen sich signifikante Expressionsminderungen zwischen 1ng/ml IL 13 und 10ng/ml IL bzw. 50ng/ml IL 13 (jeweils $p < 0,05$) sowie von 5ng/ml IL 13 zu 50ng/ml IL 13 ($p < 0,05$).

3.5.4 SW620

Es zeigen sich zwei signifikante Expressionsminderungen im zeitlichen Verlauf. Diese sind bei 1ng/ml IL 13 von 1h auf 24h ($p < 0,01$) sowie bei 5ng/ml IL 13 von 8h auf 24h ($p < 0,05$) zu finden. Die übrigen Abfälle der Expression stellen sich als nicht signifikant dar. Des Weiteren zeigt sich mit Erhöhung der Konzentration von IL 13 ein kontinuierlicher Expressionsabfall zu allen drei Inkubationszeitpunkten mit mehr oder weniger signifikanten Minderungen zwischen den einzelnen Konzentrationen.

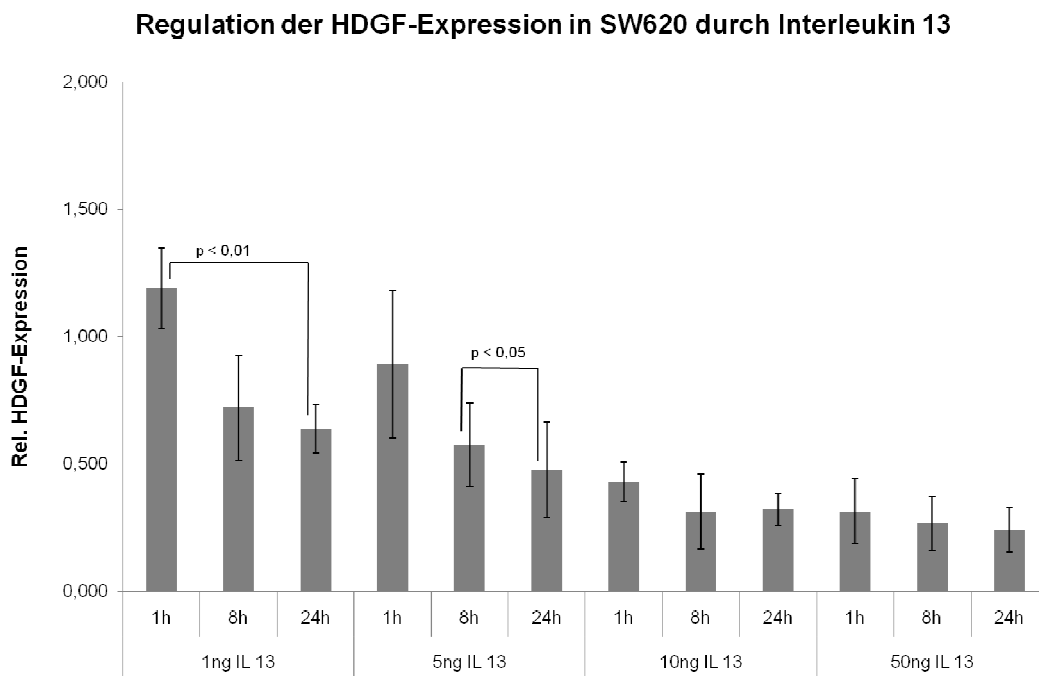


Abbildung 45: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Zeit

Signifikante Expressionsminderungen sind bei 1ng/ml IL 13 von 1h auf 24h ($p < 0,01$) sowie bei 5ng/ml IL 13 von 8h auf 24h ($p < 0,05$) zu finden. Die übrigen Abfälle der Expression stellen sich als nicht signifikant dar.

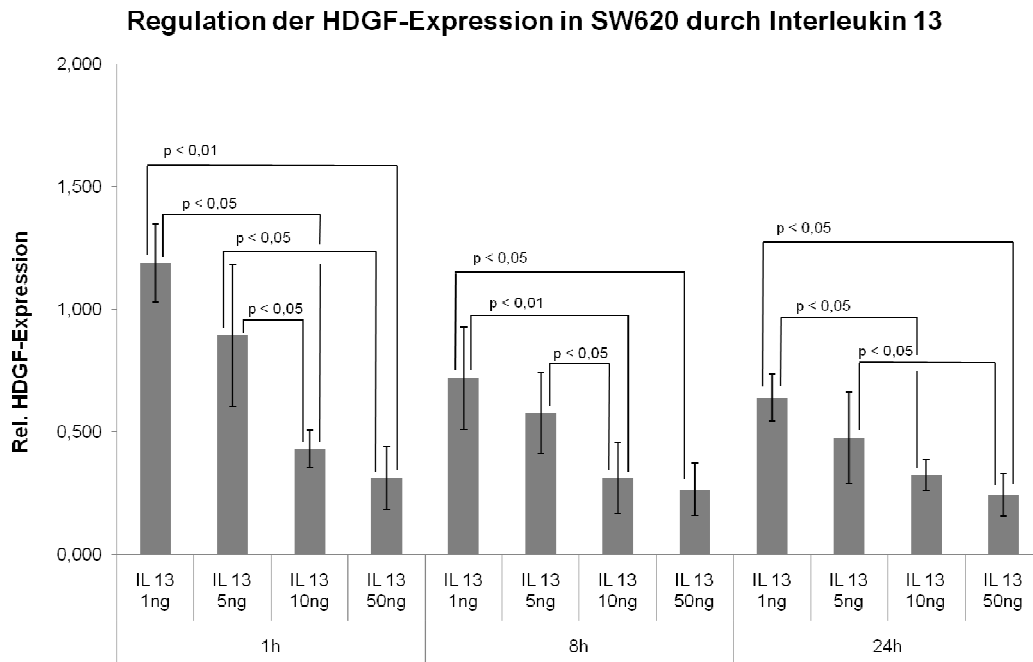


Abbildung 46: Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Konzentration

Man beobachtet zum ersten Inkubationszeitpunkt für 10ng/ml IL 13 gegenüber 1ng/ml IL 13 bzw. 5ng/ml IL 13 einen signifikanten Abfall der Expression ($p < 0,05$) sowie für 50ng/ml IL 13 gegenüber 1ng/ml IL 13 ($p < 0,01$) bzw. 5ng/ml IL 13 ($p < 0,05$). Für den 8h Wert zeigen sich signifikante Minderungen der HDGF-Expression zwischen 1ng/ml IL 13 und 10ng/ml IL 13 ($p < 0,01$), zwischen 1ng/ml IL 13 und 50ng/ml IL 13 ($p < 0,05$) sowie von 5ng/ml IL 13 auf 10ng/ml IL 13 ($p < 0,05$). Bei Inkubation über 24h finden signifikante Abfälle der Expression für 10ng/ml IL 13 bzw. 50ng/ml IL 13 gegenüber 1ng/ml IL 13 statt ($p < 0,05$). Außerdem ist eine signifikante Minderung zwischen 5ng/ml IL 13 und 50ng/ml IL 13 zu finden ($p < 0,05$). Die übrigen stattfindenden Expressionsabfälle sind zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Bei Inkubation mit IL 13 zeigt sich mit Ausnahme der Zelllinie HT29 ähnliches konzentrationsabhängiges Verhalten der HDGF-Expression in allen Zelllinien. Es kommt, ausgehend von maximalen Expressionswerten um 1,6, bei hohen Konzentrationen zu einem Abfall der Expression gegenüber den geringeren Konzentrationen mit einem maximalen Abfall um Faktor 10. Für die HT29 zeigt sich dagegen ein Expressionsanstieg für höhere Konzentrationen. Im zeitlichen Verlauf kommt es für die höheren Konzentrationen insgesamt bei längerer Inkubationszeit zur Abnahme der HDGF-Expression.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses bestimmter Interleukine auf die HDGF-Expression in verschiedenen Kolonepithelzellen, und in wie weit sie dadurch an der Regulation von HDGF beteiligt sind. Hierzu fanden Interleukine mit unterschiedlichen Eigenschaften, vor allem auch im Bezug auf ihre Effekte in der Karzinogenese, Verwendung. Nach Inkubation der verschiedenen Zellen mit den einzelnen Interleukinen wurde eine REAL TIME-RT-PCR durchgeführt. Dadurch können relative Veränderungen der HDGF-Expression semiquantitativ dargestellt werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Interleukin-vermittelten Modulation der HDGF-Expression sind dadurch allerdings nicht definitiv zu klären und werden Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

Erhöhte Expressionen an HDGF lassen sich in Koloadenokarzinomzellen, vor allem in Zellen mit invasivem Charakter und in undifferenzierten Zellen, finden [11]. Eine allgemeine Überlegung wäre, dass durch Interleukine ausgelöste Expressionssteigerungen dafür sprechen könnten, dass diese Interleukine tumorunterstützende Effekte ausüben können. Im anderen Fall, der Expressionsminderung, liegt die Vermutung nahe, dass durch das Interleukin auf den Tumor negative Einflüsse vermittelt werden. In welcher Art und Weise diese positiven bzw. negativen Effekte auf den Tumor stattfinden, kann nur mit Hilfe bereits vorliegender Studien und aufgezeigter Eigenschaften der Interleukine spekulativ diskutiert werden.

HDGF ist ein Wachstumsfaktor, der nicht nur in physiologischen Prozessen eine Rolle spielt. Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass seine Expression in einigen malignen Prozessen erhöht ist und HDGF als prognostischer Marker bestimmter Tumorerkrankungen identifiziert wurde. HDGF kann das Wachstum verschiedenster Zellen, wie Fibroblasten, Hepatomzellen, Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen stimulieren [6,8,13]. Außerdem scheint HDGF eine Rolle bei der Entwicklung der Niere [8], der kardiovaskulären Differenzierung [14] sowie bei Prozessen der Gefäßverletzung [13] zu spielen. Eine erhöhte Expression von HDGF ist unter anderem beim hepatozellulären Karzinom

[20,21] [204], beim NSCLC [29,30] sowie beim Melanom [28] mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert.

Die Arbeit von Lepourcelet zeigt in einer kleinen Serie, dass sich eine erhöhte HDGF-Expression in Geweben von kolorektalen Karzinomen, vor allem bei Kolontumoren mit intaktem DNA-mismatch repair, finden lässt. Die größten Mengen an HDGF zeigten sich in Zellen mit invasivem Charakter sowie stark undifferenzierten Zellen [11]. Die pathogenetischen Faktoren sind hier jedoch noch nicht genauer geklärt. In diesem Kontext zielt die vorliegende Arbeit darauf ab, die Rolle von Interleukinen in der Expression von HDGF in kolorektalen Adenom- und Karzinomzelllinien genauer zu beleuchten. Wie in der Literatur beschrieben, zeigen viele Interleukine sowohl fördernde als auch inhibierende Wirkungen in Bezug auf die Karzinogenese, speziell auch beim CRC. Auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Interleukinen ist die Rolle des jeweiligen Interleukins in diesem Zusammenhang noch nicht eindeutig definiert und belegt.

Betrachten wir im Folgenden die einzelnen Interleukine mit ihren jeweiligen Eigenschaften in puncto kolorektaler Karzinogenese und ihren Effekt auf die Expressionsregulation von HDGF.

Für Interleukin 1beta zeigt sich in allen vier Zelllinien dosisabhängig eine Steigerung der HDGF-Expression für die beiden hohen Konzentrationen (10ng/ml IL 1beta und 50ng/ml IL 1beta) gegenüber den niedrigeren Konzentrationen von 1ng/ml IL 1beta und 5ng/ml IL 1beta, diese Veränderungen finden sich zu allen Zeitpunkten (cf 3.1). Die Expressionswerte schwanken bei niedrigen Konzentrationen von IL 1beta um den Mediumwert von 1. Dies zeigt, dass geringe Konzentrationen von IL 1beta nur wenig Effekt auf die HDGF-Expression ausüben. Unter höheren Konzentrationen von IL 1beta lässt sich dann hingegen in allen verwendeten Zelllinien ein signifikanter Anstieg der HDGF-Expression feststellen. Für die zeitliche Abhängigkeit zeigt sich insgesamt von der Anfangs- zur Endinkubationszeit allenfalls ein geringer Abfall der Expression. Wenige signifikante Werte zeigen sich hierfür in der Geki-2-Zelllinie für 5ng/ml IL 1beta sowie

in der Zelllinie SW480 für die beiden höheren Konzentrationen. Die SW620-Zellen hingegen zeigen für alle Konzentrationen signifikante Abfälle der Expression in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Diese Änderung der Expression passt sehr gut zu den Eigenschaften von IL 1beta im Bezug auf die Karzinogenese kolorektaler Malignome. IL 1beta konnte als Mediator in der Pathogenese des Kolonkarzinoms identifiziert werden [72]. Es verstärkt die wachstumsfördernden Einflüsse auf Tumorzellen des Darms bestimmter Mediatoren [69,70]. Über die Induktion von VEGF und IL 8, zwei proangiogenetischer Faktoren, liegt eine gewisse Bedeutung in der Angiogenese sehr nahe [74,205]. Stimulierende Effekte in Bezug auf die Angiogenese sowie die Invasivität konnten für verschiedene Tumorzellen gezeigt werden [73]. Die dargestellten Effekte von IL 1beta auf die HDGF-Expression lassen sich mit den bisher erwähnten Funktionen von IL 1beta sehr gut in Einklang bringen und legen hier einen Zusammenhang nahe, über die zugrunde liegenden Mechanismen kann aktuell jedoch allenfalls spekuliert werden.

Der Einfluss von Interleukin 4 auf die HDGF-Expression stellt sich in den vier Zelllinien sehr unterschiedlich dar. In den Zellen der HT29 sowie SW480 Zelllinien ließen sich in Abhängigkeit von der Konzentration keine einheitlich verwertbaren Änderungen der Expression nachweisen. Für die Geki-2-Zellen lässt sich ein Abfall der Expression mit Erhöhung der Konzentration beobachten. Ausgehend von 1ng/ml IL 4 mit Werten um 1,2 zeigen sich alle folgenden Expressionen unter dem Mediumwert von 1. Dies ist zu allen Inkubationszeitpunkten zu sehen. Ein starker Anstieg der HDGF-Expression lässt sich in den Zellen der SW620 für die beiden hohen Konzentrationen gegenüber 1ng/ml IL 4 und 5ng/ml IL 4 feststellen. Hier liegen die Expressionswerte der niedrigen Konzentrationen durchweg unter dem Mediumwert und steigen im Folgenden bis zum Vierzehnfachen an (cf 3.2).

Die Heterogenität der dargestellten Ergebnisse spiegelt sich gewissermaßen auch in der Literatur wider. Denn für IL 4 zeigen sich sowohl fördernde als auch hemmende Einflüsse im Bezug auf die Karzinogenese. Einige ältere Studien

schreiben IL 4 eine antitumoröse Wirkung, auch im Bezug auf Kolonkarzinome, zu [105,106]. IL 4 scheint außerdem hemmenden Einfluss auf die Metastasierungs- und Invasionsfähigkeit kolorektaler Tumoren zu haben [107]. Ein wachstumshemmender Effekt durch IL 4 in kolorektalen Karzinomzellen steht vermutlich mit dem durch IL 4 ausgelösten Signalweg über IRS in Zusammenhang [91]. Neuere Studien stellten jedoch fest, dass IL 4 auf bestimmte Kolonkarzinomzellen einen protektiven Effekt ausübt, wahrscheinlich durch Expressionssteigerung antiapoptotischer Proteine [108]. Darüber hinaus zeigte sich, dass hohe IL 4 Konzentrationen in der Tumorumgebung das Tumorstadium erleichtern [206,207]. Auch die inhibierenden Wirkungen von IL 4 auf die Zelladhäsion der Kolonkarzinomzellen könnten im Zusammenhang mit Metastasierungs- und Invasionsfähigkeit stehen [113], möglicherweise im Sinne einer erleichterten Loslösung aus dem bestehenden Tumorverband mit konsekutiver Ausbildung einer zirkulierenden Tumorzellpopulation.

Die Reaktion der HDGF-Expression der Zelllinie SW620, bei der es sich um Zellen kolorektaler Lymphknotenmetastasen handelt, wäre mit den letztgenannten Fakten gut vereinbar. Die Zelllinie SW480 sind Zellen eines kolorektalen Adenokarzinoms. Es handelt sich um Zellen des Primärtumors, dessen Metastasenzellen die Zelllinie SW620 darstellt. Im Gegensatz zu diesen Metastasenzellen findet in den SW480 Zellen unter Einfluss von IL 4 kaum eine Änderung der HDGF-Expression statt. Der differente Effekt von Interleukin 4 zwischen den Zellen des Primarius und der zugehörigen Lymphknotenmetastase könnte seine Ursache in einer geänderten Reagibilität eines Klon des primären Malignoms auf IL 4 haben, die mit Akquisition der Metastasierungsfähigkeit assoziiert ist, eventuell ist hier die gesteigerte Expression von HDGF von Bedeutung.

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich insgesamt gesehen ein Abfall der HDGF-Expression bei längerer Inkubationszeit und tendenziell für hohe Konzentrationen. Signifikant ist dieser aber nur bei der SW620 Zelllinie.

Die Regulation der HDGF-Expression in den Geki-2-Zellen durch IL 4, die sich in einer Expressionsminderung äußert, kann eventuell mit den erstgenannten Effekten von IL 4, sprich seinen tumorhemmenden Funktionen, in Verbindung

gebracht werden; möglicherweise ist auch die Tatsache, dass es sich hierbei um Adenomzellen, also noch nicht maligne Karzinomzellen, handelt von Bedeutung. Der tumorprotektive Effekt von IL 4 scheint hier im Rahmen der malignen Transformation vom Adenom zum Karzinom verloren gegangen zu sein. Mit dem genannten Modell gut zu vereinbaren ist auch, dass IL 4 in den Zelllinien HT29 und SW480, also den Adenokarzinomzellen, so gut wie keine Effekte zeigt, die Metastasenzellen jedoch mit einer gesteigerten HDGF-Expression reagieren, sprich der Tumor im Rahmen der Invasivität seine Reaktion auf IL 4 von einer initialen antiproliferativen Antwort auf eine erhöhte Aggressivität und Proliferation hin verändert.

Für den Einfluss von Interleukin 5 auf die HDGF-Expression lässt sich zeigen, dass es mit Ausnahme der Zelllinie SW620 durch IL 5 zu einer Minderung der HDGF-Expression für die beiden hohen Konzentrationen (10ng/ml IL 5 und 50ng/ml IL 5) gegenüber den geringeren Konzentrationen (1ng/ml IL 5 und 5ng/ml IL 5) kommt. Diese dosisabhängige Änderung der Expression ist zu allen Zeitpunkten signifikant. Im Gegensatz dazu kommt es in den Zellen der SW620 Zelllinie, also den Metastasenzellen, genau zum gegenteiligen Effekt. Es findet ein Anstieg der HDGF-Expression für die beiden hohen Konzentrationen gegenüber den beiden geringeren Konzentrationen zu allen drei Zeitpunkten statt (cf 3.3)

Aus diesen Ergebnissen lässt sich, wie auch für IL 4, schließen, dass IL 5 auf unterschiedliche Art und Weise Einfluss auf Kolonkarzinomzellen nehmen kann, und sich der biologische Effekt im Rahmen der protrahierten malignen Transformation – möglicherweise ebenfalls über klonales Wachstum – umkehren kann.

Diese Vermutung ist kongruent zu den Daten in der Literatur. Einige Studien zeigten, dass eine Erhöhung der Eosinophilen, für die IL 5 hauptverantwortlich ist [125,126], bei Kolonkarzinomen mit einer besseren Prognose einhergehen [140,208]. Im Gegensatz dazu belegt eine andere Studie, dass vermehrte Eosinophilenzahlen für Disseminierung, späte Manifestation und schlechte Prognose

se sprechen [142,143]. Auch im Bezug auf das Tumorwachstum stellen sich die Effekte von IL 5 nicht einheitlich dar. IL 5 zeigt in einem Mausmodell einen suppressiven, wachstumshemmenden Effekt auf Kolonkarzinomzellen der C26 Zelllinie [144]. Dagegen kann IL 5 in einer anderen Kolonkarzinomzelllinie den durch IGF-II ausgelösten Wachstumseffekt verstärken [69]. Somit besteht die Möglichkeit, dass auch IL 5 – abhängig vom jeweiligen Status der genetischen Veränderung – sowohl einen adjuvanten als auch einen inhibierende Effekt auf das Tumorwachstum vermittelt.

Diese gegensätzlichen Effekte lassen sich, wie schon erwähnt, auch in den hier genannten Ergebnissen in Bezug auf die Regulation der HDGF-Expression durch IL 5 erkennen. In drei der vier Zelllinien kommt es in Abhängigkeit von der Konzentration zur Minderung der Expression von HDGF. Die Ausgangswerte liegen für die niedrigen Konzentrationen bei maximal 1,3 und fallen im Folgenden zwischen dem Zwei- und Siebzehnfachen ab. Dieses Verhalten zeigt, dass bei ausreichend hoher Konzentration, IL 5 die HDGF-Expression supprimieren kann. Aussagen, über welchen Mechanismus IL 5 die HDGF-Expression vermindert und somit eventuell auch Einfluss auf die Karzinogenese nehmen kann, sind anhand des vorliegenden Datenmaterials allerdings nicht möglich und werden Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

In der Zelllinie SW620 kommt es zum gegenteiligen Effekt. Die Werte für 1 ng/ml IL 5 und 5 ng/ml IL 5 sind ähnlich wie für die anderen Zelllinien, mit einem Maximum von ungefähr 1,1. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu einer Erhöhung der HDGF-Expression bis zum circa Vierfachen. Auch dies könnte sich mit den zuvor erwähnten Eigenschaften von IL 5 erklären lassen. Wie bereits oben erwähnt, reagieren gerade die Zellen der Metastasenzelllinie gegensätzlich zu den Adenomzellen und den Zellen der beiden Adenokarzinomzelllinien. Eventuell kann diese Tatsache als Erklärung für die unterschiedlichen Effekte, die IL 5 auf die HDGF-Expression ausübt, dienen.

Auch bei der Inkubation mit Interleukin 8 lassen sich je nach Zelllinie unterschiedliche Effekte feststellen. Die beiden Adenokarzinomzelllinien HT29 und

SW480 zeigen sehr ähnliche dosisabhängige Änderungen der HDGF-Expression durch den Einfluss von IL 8. Es kommt für 10ng/ml IL 8 bzw. 50ng/ml IL 8 zur Steigerung der Expression gegenüber den beiden niedrigeren Konzentrationen zu allen gemessenen Zeitpunkten. Die Ausgangswerte schwanken zwischen 0,6 und 1,4 für die niedrigen Konzentrationen und erhöhen sich in Abhängigkeit von der Konzentration um das Zwei- bis Fünffache. Die Zellen der Metastasenzelllinie zeigen nur wenige signifikante Änderungen der Expression. Im Gegensatz dazu, kann man in den Geki-2-Zellen für die höchste Konzentration (50ng/ml IL 8) einen Abfall der HDGF-Expression gegenüber 1ng/ml IL 8 sowie gegenüber 10ng/ml IL 8 beobachten, und diesen zu allen drei Inkubationszeitpunkten. Die Minderung stellt sich mit dem Vier- bis Siebenfachen dar. Im zeitlichen Verlauf lässt sich in dieser Zelllinie ein Anstieg der Expression von HDGF verzeichnen. In den drei anderen Zelllinien zeigt sich tendenziell eher das Gegenteil. Jedoch sind diese zeitlichen Änderungen kaum signifikant (cf 3.4). Die Tatsache, dass IL 8 in Adenomzellen gegensätzliche Effekte wie in den Adenokarzinomzellen auslöst, und in den Metastasenzellen kaum noch Effekte zu verzeichnen sind, ist prinzipiell durchaus kongruent zu den Effekten von IL 4 und IL 5. Allerdings besteht für IL 8 aktuell keine Datenlage bezüglich einer protektiven Wirkung gegenüber einer malignen Transformation, so dass über einen kausalen Zusammenhang zwischen IL 8-Exposition und HDGF-Expression nur spekuliert werden kann. Eine mögliche Erklärung wäre hier eine noch protektive Wirkung einer Aktivierung von NF κ B durch IL 8. Möglicherweise besteht aber auch, im Rahmen der Tumorpromotion kolorektaler Neoplasien, eine sich verändernde Sensibilität gegenüber IL 8, eventuell im Zuge einer zunehmenden autokrinen Sekretion.

Die in der Einleitung erwähnten Eigenschaften von IL 8 in Bezug auf die Karzinogenese sprechen alle für ein tumorunterstützendes Verhalten. IL 8 zeigt proangiogenetische Funktionen und spielt eine Rolle in der Pathogenese verschiedener maligner Prozesse [157]. Erhöhte IL 8 Expressionen können in malignen Zellen sowie den umgebenden Zellen gefunden werden [148]. Speziell bei Kolonkarzinomen hat IL 8 Einfluss auf Proliferation, Angiogenese sowie Zellmigration [161,162]. In einer weiteren Studie wurde außerdem ein Zusam-

menhang zwischen der Expressionshöhe von IL 8 und der Metastasierungsfähigkeit sowie der Aggressivität von Kolonkarzinomen gezeigt [168]. Darüber hinaus zeigt sich bei CRCs mit erhöhter Expression von IL 8 eine gewisse Chemotherapieresistenz [209].

Wie IL 4 und IL 5 zeigt auch IL 13 in der Literatur unterschiedliche, teilweise sogar gegensätzliche Effekte in Bezug auf die Karzinogenese. Außer in HT29 kommt es in den drei anderen Zelllinien zu einer – teilweise signifikanten – Reduktion der HDGF-Expression unter den höheren Konzentrationen (10ng/ml IL 13 und 50ng/ml IL 13) gegenüber 1ng/ml IL 13 bzw. 5ng/ml IL 13. Für die SW620-Zellen sowie die Geki-2-Zellen stellen sich diese Änderungen zu allen drei Zeitpunkten signifikant dar. Die HT29-Zellen reagieren hier grundsätzlich gegensätzlich. Hier kommt es für die hohen Konzentrationen zu einem Anstieg der Expression bis maximal zum 3,2-fachen mit dem höchsten Expressionwert von 2,1 gegenüber den beiden niedrigen Konzentrationen (cf 3.5).

Wie anfangs erwähnt, lassen sich in einigen Studien unterschiedliche Effekte des IL 13 auf die Pathogenese maligner Prozesse feststellen. Ältere Studien zeigten in Tiermodellen, dass IL 13 einen protektiven Einfluss gegenüber einer Tumorentwicklung hat [196] und eine tumorinduzierte Schwächung des Immunsystems lindern kann [197]. Außerdem konnte festgestellt werden, dass IL 13, wenn es von Granulocysten und Makrophagen ausgeschüttet wird, tumorregressive Aktivität aufweist [196,200]. Im Gegensatz dazu vermittelt IL 13, welches durch natürliche Killerzellen produziert wurde, supprimierende Effekte auf eine Immunantwort gegen maligne Zellen. Hier spielt auch die Inhibition der zytotoxischen T-Zellen, die sich gegen den Tumor richten, eine Rolle [199]. Im Weiteren wurde für IL 13 eine Schwächung der Zelladhäsion zwischen den Kolonkarzinomzellen beobachtet, welche vermutlich Einfluss auf die Metastasierungsfähigkeit hat [113]. IL 13, wie auch IL 4, aktivieren den STAT6-Signalweg. Dieser wird in Zusammenhang mit Apoptoseresistenz und erhöhter Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von Kolonkarzinomen gebracht [112].

Der Anstieg der HDGF-Expression durch den Einfluss von IL 13 in der HT29 Zelllinie steht im Einklang zu diesen letztgenannten Fakten. Den Expressionsabfall in den anderen drei Zelllinien kann man in Bezug zu den in den älteren Studien beschriebenen tumorinhibierenden Eigenschaften von IL 13 setzen. Die Tatsache, dass die Adenomzellen (Geki-2) eine Expressionsminderung zeigen, in den HT29-Zellen, einer der beiden Adenokarzinomzelllinien, ein Anstieg der Expression stattfindet und die andere Adenokarzinomzelllinie (SW480) wieder mit einem leichten Abfall der Expression reagiert, ist sicherlich ein gutes Beispiel für die mannigfaltigen Effekte verschiedener Zytokine auf unterschiedliche Tumore und ein fehlendes Generalitätsprinzip in der Reaktivität der Tumore auf äußere Einflüsse. Vielmehr muss hier sicherlich vom Einfluss der im Rahmen der Karzinogenese akquirierten genetischen Alterationen ausgegangen werden.

Der genaue Stellenwert von HDGF in der kolorektalen Karzinogenese ist bislang noch nicht definiert, eine Rolle als key factor in seiner Eigenschaft als onkofetales Protein ist anhand der vorliegenden Daten zwar nicht zwingend, jedoch auch nicht komplett unwahrscheinlich. Vermutlich ist HDGF als nukleärer Wachstumsfaktor eher mittelbar durch seinen Einfluss auf DNA-Synthese und Mitogenese beteiligt. Die teilweise differente Regulation ist wohl eher eine Folge der im Rahmen der Entdifferenzierung akquirierten Alterationen und Defekte der die Wirkung der einzelnen Zytokine vermittelnden Signalkaskaden und derer negativen loop back-Mechanismen.

Die verschiedenen Auswirkungen der einzelnen Zytokine auf die HDGF-Expression in den untersuchten Zelllinien sind ätiologisch anhand der vorliegenden Daten letztlich noch nicht komplett erklärbar und müssen mit weiteren Studien näher differenziert werden; allerdings sind die unterschiedlichen Auswirkungen auf die HDGF-Expression sicherlich exemplarisch für differente Wege der malignen Transformation mit unterschiedlichen Alterationen in der Genexpression und Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Zytokinen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Darstellung der Einflüsse verschiedener Interleukine auf die HDGF-Expression in verschiedenen Kolonzelllinien.

HDGF stellt einen Wachstumsfaktor dar, der nicht nur physiologisch bei der Entwicklung einiger Gewebe wie der Niere, der Leber und des Darms von Bedeutung ist, sondern auch eine wichtige Rolle in der Karzinogenese verschiedener Tumoren spielt. Hierzu zählen unter anderem das hepatozelluläre Karzinom, das NSCLC und das Melanom. Von besonderer Relevanz ist seine Rolle in der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms.

Die verwendeten Interleukine (1beta, 4, 5, 8 und 13) zeigen sowohl inhibierende als auch fördernde Eigenschaften in Bezug auf die Karzinogenese von kolorektalen Tumoren. Dies steht im Einklang mit früheren Resultaten der Literatur.

Die vier verschiedenen Zelllinien, eine Adenomzelllinie, zwei Adenokarzinomzelllinien sowie eine Zelllinie aus Lymphknotenmetastasenzellen wurden mit den verschiedenen Interleukinen inkubiert und mittels REAL TIME-RT-PCR analysiert. Die Ergebnisdarstellung in Blockdiagrammen zeigt semiquantitativ die relative HDGF-Expression. So lassen sich Aussagen über Anstieg oder Abfall der Expression durch den Einfluss der verschiedenen Interleukine machen.

Die hier gezeigten Ergebnisse lassen, wie auch schon teilweise in der Literatur beschrieben, für alle Interleukine außer für IL 1beta, sowohl hemmende als auch tumorunterstützende Effekte beobachten. Interleukin 1beta zeigt in Kongruenz der vorbeschriebenen Studien, im Gegensatz zu den anderen Zytokinen, in allen Zelllinien tumorfördernde Eigenschaften. Für IL 4 ist zunächst in den Adenomzellen ein antitumoröser Effekt zu erkennen, dieser kehrt sich in der Metastasenzelllinie in eine fördernde Wirkung um. In den Adenokarzinomzelllinien sind weder eindeutige suppressive noch unterstützende Wirkungen zu verzeichnen. Über einen Zusammenhang zwischen dem Grad der malignen Transformation und unterschiedlichem Ansprechen auf IL 4 lässt sich jedoch bisher nur spekulieren. Für IL 5 ist ein ähnliches Verhalten zu beobachten. Eine anfängliche inhibitorische Wirkung auf die HDGF-Expression in den Adenomzellen sowie Adenokarzinomzellen kehrt sich in der Metastasenzelllinie

in den gegenteiligen Effekt um. Auch hier lässt sich eine Umkehr der ausgelösten Effekte mit fortschreitender maligner Transformation vermuten. IL 8 zeigt kongruente Effekte zu IL 4 und IL 5, jedoch lassen sich für IL 8 in der Literatur bisher nur tumorunterstützende Wirkungen finden. Hier lässt sich in den Adenomzellen eine suppressive Wirkung verzeichnen, wohingegen in den beiden Adenokarzinomzelllinien fördernde Effekte beobachtet werden. In der Metastazenzelllinie lassen sich jedoch weder positive noch negative Auswirkungen feststellen. Des Weiteren spiegeln auch die Ergebnisse des Einflusses von IL 13 die Vielgestaltigkeit der Wirkweisen dieses Interleukins dar, mit tumorhemmenden Effekten in den Adenom- sowie Metastasenzellen und fördernder Wirkung in den HT29-Zellen.

Über die genauen Mechanismen, inwiefern ein Interleukin die Expression von HDGF hochreguliert oder supprimiert, kann zum momentanen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Es kann jedoch vermutet werden, dass ein gewisser Zusammenhang zwischen dem Grad der malignen Transformation und der Wirkweise der Interleukine existiert. Entscheidend sind hier sicherlich klonal erworbene Alterationen einzelner Signalkaskaden.

Festzuhalten ist zum einen, dass bis auf IL 1beta für alle Zytokine der Einfluss auf HDGF vom jeweiligen Zellsystem abhängt. Diese Ergebnisse machen eine Schlüsselrolle von HDGF eher unwahrscheinlich, vielmehr scheint seine Regulation hier in teilweise komplexe Regulationsmechanismen mit eingebunden zu sein. Dass diese Alterationen möglicherweise auch im Rahmen der Karzinogenese bzw. der Akquise der Metastasierungsfähigkeit entstehen könnten, zeigen die teilweise bestehenden Unterschiede zwischen der verwendeten Adenomzelllinie und den Karzinomzelllinien respektive zwischen Karzinom- und Metastazenzelllinie.

Die beschriebenen Ergebnisse geben einen Anhaltspunkt, in welche Richtung die einzelnen Interleukine wirken, zumindest in wie weit hier ein Einfluß auf die Transkription von HDGF als Surrogatmarker der Mitogenese erfolgt. Um die Komplexität und Vielfalt der Effekte von Interleukinen in Bezug zu Tumorsta-

dium, Invasivität sowie Metastasierungsfähigkeit in Einklang zu bringen, bedarf es jedoch weiterführender Studien.

Es lies sich zeigen, dass die angewendeten Interleukine generell Einfluss auf die Expressionshöhe von HDGF in verschiedenen Kolonzelllinien haben und als exogene Faktoren in die Regulation eingreifen können. Dies könnte ein weiterer Ansatz zur Etablierung immunmodulatorischer Therapieoptionen in soliden Neoplasien in der Zukunft sein.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung der Signalwege von IL 1beta	10
Abbildung 2:	Darstellung der Signalwege von IL 4 und IL 13	13
Abbildung 3:	Darstellung der Signalwege IL 5.....	16
Abbildung 4:	Darstellung der Signalwege von IL 8.....	19
Abbildung 5:	Darstellung der Signalwege von IL 4 und IL 13	22
Abbildung 6:	Schema der Real Time-RT-PCR:.....	36
Abbildung 7:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Zeit.....	40
Abbildung 8:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Konzentration	41
Abbildung 9:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Zeit.....	42
Abbildung 10:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Konzentration	43
Abbildung 11:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Zeit.....	44
Abbildung 12:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Konzentration	45
Abbildung 13:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Zeit.....	46
Abbildung 14:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 1beta in Abhängigkeit von der Konzentration	47
Abbildung 15:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Zeit.....	48
Abbildung 16:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	49
Abbildung 17:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Zeit.....	50
Abbildung 18:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	51
Abbildung 19:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Zeit.....	52
Abbildung 20:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	53
Abbildung 21:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Zeit.....	55
Abbildung 22:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 4 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	56
Abbildung 23:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Zeit.....	57
Abbildung 24:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	58
Abbildung 25:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Zeit.....	59
Abbildung 26:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	60

Abbildung 27:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Zeit.....	61
Abbildung 28:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	62
Abbildung 29:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Zeit.....	63
Abbildung 30:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 5 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	64
Abbildung 31:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Zeit.....	65
Abbildung 32:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	66
Abbildung 33:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Zeit.....	67
Abbildung 34:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	68
Abbildung 35:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Zeit.....	69
Abbildung 36:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	70
Abbildung 37:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Zeit.....	71
Abbildung 38:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 8 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	72
Abbildung 39:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Zeit.....	73
Abbildung 40:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in Geki-2 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	74
Abbildung 41:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Zeit.....	75
Abbildung 42:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in HT29 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	76
Abbildung 43:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Zeit.....	77
Abbildung 44:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW480 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	78
Abbildung 45:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Zeit.....	79
Abbildung 46:	Darstellung der Änderung der HDGF-Expression in SW620 durch Interleukin 13 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	80

7. Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut. In, http://www.rki.de/Content/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/KID/Lokalisationen_Tabellen/kid_lokalisationen_tabellehtml?nnn=true; Robert-Koch-Institut
2. Ahmed FE. Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2004;22:91-147
3. Campos FG, Logullo Waitzberg AG, Kiss DR, et al. Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention. *Nutr Hosp* 2005;20:18-25
4. Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog* 2009;8:5
5. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767
6. Nakamura H, Izumoto Y, Kambe H, et al. Molecular cloning of complementary DNA for a novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. *J Biol Chem* 1994;269:25143-25149
7. Uyama H, Tomita Y, Nakamura H, et al. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:6043-6048
8. Oliver JA, Al-Awqati Q. An endothelial growth factor involved in rat renal development. *J Clin Invest* 1998;102:1208-1219
9. Enomoto H, Yoshida K, Kishima Y, et al. Hepatoma-derived growth factor is highly expressed in developing liver and promotes fetal hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2002;36:1519-1527
10. Enomoto H, Yoshida K, Kishima Y, Okuda Y, Nakamura H. Participation of hepatoma-derived growth factor in the regulation of fetal hepatocyte proliferation. *J Gastroenterol* 2002;37 Suppl 14:158-161
11. Lepourcelet M, Tou L, Cai L, et al. Insights into developmental mechanisms and cancers in the mammalian intestine derived from serial analysis of gene expression and study of the hepatoma-derived growth factor (HDGF). *Development* 2005;132:415-427
12. Everett AD, Narron JV, Stoops T, Nakamura H, Tucker A. Hepatoma-derived growth factor is a pulmonary endothelial cell-expressed angiogenic factor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L1194-1201
13. Everett AD, Lobe DR, Matsumura ME, Nakamura H, McNamara CA. Hepatoma-derived growth factor stimulates smooth muscle cell growth and is expressed in vascular development. *J Clin Invest* 2000;105:567-575
14. Everett AD. Identification, cloning, and developmental expression of hepatoma-derived growth factor in the developing rat heart. *Dev Dyn* 2001;222:450-458
15. Everett AD, Stoops T, McNamara CA. Nuclear targeting is required for hepatoma-derived growth factor-stimulated mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001;276:37564-37568
16. Zhou Z, Yamamoto Y, Sugai F, et al. Hepatoma-derived growth factor is a neurotrophic factor harbored in the nucleus. *J Biol Chem* 2004;279:27320-27326
17. El-Tahir HM, Dietz F, Dringen R, et al. Expression of hepatoma-derived growth factor family members in the adult central nervous system. *BMC Neurosci* 2006;7:6
18. Marubuchi S, Okuda T, Tagawa K, et al. Hepatoma-derived growth factor, a new trophic factor for motor neurons, is up-regulated in the spinal cord of

- PQBP-1 transgenic mice before onset of degeneration. *J Neurochem* 2006;99:70-83
19. Liao F, Liu M, Lv L, Dong W. Hepatoma-derived growth factor promotes the resistance to anti-tumor effects of nordihydroguaiaretic acid in colorectal cancer cells. *Eur J Pharmacol*;645:55-62
 20. Yoshida K, Nakamura H, Okuda Y, et al. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1293-1301
 21. Hu TH, Huang CC, Liu LF, et al. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003;98:1444-1456
 22. Yoshida K, Tomita Y, Okuda Y, et al. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2006;13:159-167
 23. Zhou Y, Zhou N, Fang W, Huo J. Overexpressed HDGF as an independent prognostic factor is involved in poor prognosis in Chinese patients with liver cancer. *Diagn Pathol*;5:58
 24. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Expression of hepatoma-derived growth factor is correlated with lymph node metastasis and prognosis of gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:117-122
 25. Liu YF, Zhao R, Guo S, et al. Expression and Clinical Significance of Hepatoma-Derived Growth Factor as a Prognostic Factor in Human Hilar Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*
 26. Chang KC, Tai MH, Lin JW, et al. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2007;121:1059-1065
 27. Hu TH, Lin JW, Chen HH, et al. The expression and prognostic role of hepatoma-derived growth factor in colorectal stromal tumors. *Dis Colon Rectum* 2009;52:319-326
 28. Bernard K, Litman E, Fitzpatrick JL, et al. Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res* 2003;63:6716-6725
 29. Ren H, Tang X, Lee JJ, et al. Expression of hepatoma-derived growth factor is a strong prognostic predictor for patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:3230-3237
 30. Iwasaki T, Nakagawa K, Nakamura H, et al. Hepatoma-derived growth factor as a prognostic marker in completely resected non-small-cell lung cancer. *Oncol Rep* 2005;13:1075-1080
 31. Zhang J, Ren H, Yuan P, et al. Down-regulation of hepatoma-derived growth factor inhibits anchorage-independent growth and invasion of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:18-23
 32. Okuda Y, Nakamura H, Yoshida K, et al. Hepatoma-derived growth factor induces tumorigenesis in vivo through both direct angiogenic activity and induction of vascular endothelial growth factor. *Cancer Sci* 2003;94:1034-1041
 33. Mao J, Xu Z, Fang Y, et al. Hepatoma-derived growth factor involved in the carcinogenesis of gastric epithelial cells through promotion of cell proliferation by Erk1/2 activation. *Cancer Sci* 2008;99:2120-2127
 34. Ren H, Chu Z, Mao L. Antibodies targeting hepatoma-derived growth factor as a novel strategy in treating lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2009
 35. Nakamura H, Kambe H, Egawa T, et al. Partial purification and characterization of human hepatoma-derived growth factor. *Clin Chim Acta* 1989;183:273-284
 36. Sue SC, Chen JY, Lee SC, Wu WG, Huang TH. Solution structure and heparin interaction of human hepatoma-derived growth factor. *J Mol Biol* 2004;343:1365-1377

37. Kishima Y, Yamamoto H, Izumoto Y, et al. Hepatoma-derived growth factor stimulates cell growth after translocation to the nucleus by nuclear localization signals. *J Biol Chem* 2002;277:10315-10322
38. Dietz F, Franken S, Yoshida K, et al. The family of hepatoma-derived growth factor proteins: characterization of a new member HRP-4 and classification of its subfamilies. *Biochem J* 2002;366:491-500
39. Izumoto Y, Kuroda T, Harada H, Kishimoto T, Nakamura H. Hepatoma-derived growth factor belongs to a gene family in mice showing significant homology in the amino terminus. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:26-32
40. Lukasik SM, Cierpicki T, Borloz M, et al. High resolution structure of the HDGF PWWP domain: a potential DNA binding domain. *Protein Sci* 2006;15:314-323
41. Nameki N, Tochio N, Koshiba S, et al. Solution structure of the PWWP domain of the hepatoma-derived growth factor family. *Protein Sci* 2005;14:756-764
42. Yang J, Everett AD. Hepatoma-derived growth factor binds DNA through the N-terminal PWWP domain. *BMC Mol Biol* 2007;8:101
43. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 2002;3:370-379
44. Rowold DJ, Herrera RJ. Alu elements and the human genome. *Genetica* 2000;108:57-72
45. Abouzied MM, El-Tahir HM, Prenner L, et al. Hepatoma-derived growth factor. Significance of amino acid residues 81-100 in cell surface interaction and proliferative activity. *J Biol Chem* 2005;280:10945-10954
46. Clermont F, Gonzalez NS, Communi D, et al. HDGF is dephosphorylated during the early steps of endothelial cell apoptosis in a caspase-dependent way. *J Cell Biochem* 2008;104:1161-1171
47. Tsang TY, Tang WY, Tsang WP, et al. Downregulation of hepatoma-derived growth factor activates the Bad-mediated apoptotic pathway in human cancer cells. *Apoptosis* 2008;13:1135-1147
48. Tsang TY, Tang WY, Tsang WP, et al. Mechanistic study on growth suppression and apoptosis induction by targeting hepatoma-derived growth factor in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem* 2009;24:253-262
49. Liao F, Dong W, Fan L. Apoptosis of human colorectal carcinoma cells is induced by blocking hepatoma-derived growth factor. *Med Oncol*;27:1219-1226
50. Machuy N, Thiede B, Rajalingam K, et al. A global approach combining proteome analysis and phenotypic screening with RNA interference yields novel apoptosis regulators. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:44-55
51. Kudlich T, Melcher R, Wilk M, Lühns H, Scheppach W. Bedeutung des putativen Oncogens Hepatoma Derived Growth Factor in der kolorektalen Karzinogenese und seine Regulation durch die kurzkettige Fettsäure Butyrat und TNFalpha. *Z Gastroenterol* 2006
52. Oethinger M. *Mikrobiologie und Immunologie*. 11 ed. München: Elsevier; 2004
53. Thomson AW. *The cytokine handbook*. 3 ed. San Diego: Acad. Press; 1998
54. Csiszar A, Szentes T, Haraszti B, et al. The pattern of cytokine gene expression in human colorectal carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2004;10:109-116
55. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519-550
56. March CJ, Mosley B, Larsen A, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985;315:641-647
57. Dower SK, Kronheim SR, Hopp TP, et al. The cell surface receptors for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta are identical. *Nature* 1986;324:266-268

58. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, et al. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J* 1991;10:2821-2832
59. Huang J, Gao X, Li S, Cao Z. Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12829-12832
60. Colotta F, Re F, Muzio M, et al. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 1993;261:472-475
61. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, et al. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* 1995;270:13757-13765
62. Wesche H, Korherr C, Kracht M, et al. The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *J Biol Chem* 1997;272:7727-7731
63. Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:265-280
64. Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ. Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci* 1996;59:61-83
65. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-1071
66. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-260
67. Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003;2003:re3
68. Lord PC, Wilmoth LM, Mizel SB, McCall CE. Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1991;87:1312-1321
69. Makins R, Ballinger A. Interleukin-5 potentiates the growth response of Caco-2 cells to IGF-II: a role in colonic carcinogenesis complicating ulcerative colitis? *Growth Horm IGF Res* 2005;15:215-222
70. Street ME, Miraki-Moud F, Sanderson IR, et al. Interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-6 modulate insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) secretion in colon cancer epithelial (Caco-2) cells. *J Endocrinol* 2003;179:405-415
71. Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, et al. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 2001;410:471-475
72. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785-3789
73. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2645-2650
74. Akagi Y, Liu W, Xie K, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1beta. *Br J Cancer* 1999;80:1506-1511
75. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404:398-402
76. Yokota T, Otsuka T, Mosmann T, et al. Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5894-5898

77. Idzerda RL, March CJ, Mosley B, et al. Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med* 1990;171:861-873
78. Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 1997;337:1720-1725
79. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 1993;262:1877-1880
80. Galizzi JP, Zuber CE, Cabrillat H, Djossou O, Banchereau J. Internalization of human interleukin 4 and transient down-regulation of its receptor in the CD23-inducible Jijoye cells. *J Biol Chem* 1989;264:6984-6989
81. Hilton DJ, Zhang JG, Metcalf D, et al. Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:497-501
82. Harada N, Yang G, Miyajima A, Howard M. Identification of an essential region for growth signal transduction in the cytoplasmic domain of the human interleukin-4 receptor. *J Biol Chem* 1992;267:22752-22758
83. Russell SM, Keegan AD, Harada N, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 1993;262:1880-1883
84. Kawahara A, Minami Y, Taniguchi T. Evidence for a critical role for the cytoplasmic region of the interleukin 2 (IL-2) receptor gamma chain in IL-2, IL-4, and IL-7 signalling. *Mol Cell Biol* 1994;14:5433-5440
85. Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 1995;11:69-74
86. Wills-Karp M, Finkelman FD. Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Sci Signal* 2008;1:pe55
87. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature* 1995;377:173-177
88. Keegan AD, Nelms K, White M, et al. An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. *Cell* 1994;76:811-820
89. Wurster AL, Withers DJ, Uchida T, White MF, Grusby MJ. Stat6 and IRS-2 cooperate in interleukin 4 (IL-4)-induced proliferation and differentiation but are dispensable for IL-4-dependent rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22:117-126
90. Murata T, Noguchi PD, Puri RK. IL-13 induces phosphorylation and activation of JAK2 Janus kinase in human colon carcinoma cell lines: similarities between IL-4 and IL-13 signaling. *J Immunol* 1996;156:2972-2978
91. Schnyder B, Lahm H, Woerly G, et al. Growth inhibition signalled through the interleukin-4/interleukin-13 receptor complex is associated with tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *Biochem J* 1996;315 (Pt 3):767-774
92. Ben-Sasson SZ, Le Gros G, Conrad DH, Finkelman FD, Paul WE. IL-4 production by T cells from naive donors. IL-2 is required for IL-4 production. *J Immunol* 1990;145:1127-1136
93. Gibbs BF, Haas H, Falcone FH, et al. Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur J Immunol* 1996;26:2493-2498
94. Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC. Activated mast cells produce interleukin 13. *J Exp Med* 1995;181:1373-1380
95. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77:1859-1870

96. Fallon PG, Jolin HE, Smith P, et al. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity* 2002;17:7-17
97. Purkerson J, Isakson P. A two-signal model for regulation of immunoglobulin isotype switching. *FASEB J* 1992;6:3245-3252
98. Kotanides H, Reich NC. Interleukin-4-induced STAT6 recognizes and activates a target site in the promoter of the interleukin-4 receptor gene. *J Biol Chem* 1996;271:25555-25561
99. Brown MA, Hural J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol* 1997;17:1-32
100. Gautam SC, Chikkala NF, Hamilton TA. Anti-inflammatory action of IL-4. Negative regulation of contact sensitivity to trinitrochlorobenzene. *J Immunol* 1992;148:1411-1415
101. van Hal PT, Hopstaken-Broos JP, Prins A, et al. Potential indirect anti-inflammatory effects of IL-4. Stimulation of human monocytes, macrophages, and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase-N activity (CD13; EC 3.4.11.2). *J Immunol* 1994;153:2718-2728
102. Toru H, Ra C, Nonoyama S, et al. Induction of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on human mast cells by IL-4. *Int Immunol* 1996;8:1367-1373
103. Toi M, Harris AL, Bicknell R. Interleukin-4 is a potent mitogen for capillary endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:1287-1293
104. Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 1989;57:503-512
105. Toi M, Bicknell R, Harris AL. Inhibition of colon and breast carcinoma cell growth by interleukin-4. *Cancer Res* 1992;52:275-279
106. Lahm H, Schnyder B, Wyniger J, et al. Growth inhibition of human colorectal carcinoma cells by interleukin-4 and expression of functional interleukin-4 receptors. *Int J Cancer* 1994;59:440-447
107. Uchiyama A, Essner R, Doi F, et al. Interleukin 4 inhibits hepatocyte growth factor-induced invasion and migration of colon carcinomas. *J Cell Biochem* 1996;62:443-453
108. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007;1:389-402
109. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-110
110. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-115
111. Francipane MG, Alea MP, Lombardo Y, et al. Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells. *Cancer Res* 2008;68:4022-4025
112. Li BH, Yang XZ, Li PD, et al. IL-4/Stat6 activities correlate with apoptosis and metastasis in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369:554-560
113. Kanai T, Watanabe M, Hayashi A, et al. Regulatory effect of interleukin-4 and interleukin-13 on colon cancer cell adhesion. *Br J Cancer* 2000;82:1717-1723
114. Campbell HD, Tucker WQ, Hort Y, et al. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6629-6633
115. Morgan JG, Dolganov GM, Robbins SE, Hinton LM, Lovett M. The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes. *Nucleic Acids Res* 1992;20:5173-5179
116. Sutherland GR, Baker E, Callen DF, et al. Interleukin-5 is at 5q31 and is deleted in the 5q- syndrome. *Blood* 1988;71:1150-1152

117. Tavernier J, Devos R, Cornelis S, et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell* 1991;66:1175-1184
118. Moon BG, Yoshida T, Shiiba M, et al. Functional dissection of the cytoplasmic subregions of the interleukin-5 receptor alpha chain in growth and immunoglobulin G1 switch recombination of B cells. *Immunology* 2001;102:289-300
119. Stomski FC, Woodcock JM, Zacharakis B, et al. Identification of a Cys motif in the common beta chain of the interleukin 3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin 5 receptors essential for disulfide-linked receptor heterodimerization and activation of all three receptors. *J Biol Chem* 1998;273:1192-1199
120. Quelle FW, Sato N, Witthuhn BA, et al. JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Mol Cell Biol* 1994;14:4335-4341
121. Stomski FC, Dottore M, Winnall W, et al. Identification of a 14-3-3 binding sequence in the common beta chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors that is serine-phosphorylated by GM-CSF. *Blood* 1999;94:1933-1942
122. Woodcock JM, Bagley CJ, Lopez AF. The functional basis of granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-3 and interleukin-5 receptor activation, basic and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1017-1025
123. Adachi T, Alam R. The mechanism of IL-5 signal transduction. *Am J Physiol* 1998;275:C623-633
124. Jans DA, Hassan G. Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling? *Bioessays* 1998;20:400-411
125. Clutterbuck EJ, Sanderson CJ. Human eosinophil hematopoiesis studied in vitro by means of murine eosinophil differentiation factor (IL5): production of functionally active eosinophils from normal human bone marrow. *Blood* 1988;71:646-651
126. Sanderson CJ, Warren DJ, Strath M. Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation in vitro. Its relationship to interleukin 3, and functional properties of eosinophils produced in cultures. *J Exp Med* 1985;162:60-74
127. Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Curr Opin Immunol* 2008;20:288-294
128. Wang JM, Rambaldi A, Biondi A, et al. Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur J Immunol* 1989;19:701-705
129. Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, et al. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 1988;167:219-224
130. Rodrigues V, Jr., Abel L, Piper K, Dessein AJ. Segregation analysis indicates a major gene in the control of interleukine-5 production in humans infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Hum Genet* 1996;59:453-461
131. Takatsu K, Kouro T, Nagai Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv Immunol* 2009;101:191-236
132. Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989;245:308-310
133. Cogan E, Schandene L, Crusiaux A, et al. Brief report: clonal proliferation of type 2 helper T cells in a man with the hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 1994;330:535-538

134. Harriman GR, Kunimoto DY, Elliott JF, Paetkau V, Strober W. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J Immunol* 1988;140:3033-3039
135. Iscaki S, Bouvet JP. Human secretory immunoglobulin A and its role in mucosal defence. *Bull Inst Pasteur* 1993;91:203-224
136. Takatsu K. Interleukin 5 and B cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:25-35
137. Ying S, Humbert M, Barkans J, et al. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 1997;158:3539-3544
138. Broide DH, Paine MM, Firestein GS. Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest* 1992;90:1414-1424
139. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992;79:3101-3109
140. Fernandez-Acenero MJ, Galindo-Gallego M, Sanz J, Aljama A. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer* 2000;88:1544-1548
141. Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 1992;257:548-551
142. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998;338:1592-1600
143. Anagnostopoulos GK, Sakorafas GH, Kostopoulos P, et al. Disseminated colon cancer with severe peripheral blood eosinophilia and elevated serum levels of interleukine-2, interleukine-3, interleukine-5, and GM-CSF. *J Surg Oncol* 2005;89:273-275
144. Masuda Y, Mita S, Sakamoto K, Ishiko T, Ogawa M. Suppression of in vivo tumor growth by the transfection of the interleukin-5 gene into colon tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1995;41:325-330
145. Hull J, Ackerman H, Isles K, et al. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet* 2001;69:413-419
146. Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 1991;253:1280-1283
147. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991;253:1278-1280
148. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6735-6741
149. Richardson RM, Ali H, Pridgen BC, Haribabu B, Snyderman R. Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 1998;273:10690-10695
150. Petreaca ML, Yao M, Liu Y, Defea K, Martins-Green M. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Mol Biol Cell* 2007;18:5014-5023
151. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991;9:617-648
152. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, et al. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 1994;269:13289-13295
153. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989;84:1045-1049

154. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994;56:559-564
155. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992;258:1798-1801
156. Smyth MJ, Zachariae CO, Norihisa Y, et al. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *J Immunol* 1991;146:3815-3823
157. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:375-391
158. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* 2005;7:122-133
159. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-867
160. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-545
161. Brew R, Southern SA, Flanagan BF, McDicken IW, Christmas SE. Detection of interleukin-8 mRNA and protein in human colorectal carcinoma cells. *Eur J Cancer* 1996;32A:2142-2147
162. Brew R, Erikson JS, West DC, et al. Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 2000;12:78-85
163. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-242
164. Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, et al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993;261:1182-1184
165. Kulke R, Bornscheuer E, Schluter C, et al. The CXC receptor 2 is overexpressed in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 1998;110:90-94
166. Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, et al. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 1993;105:1689-1697
167. Kelly CP, Keates S, Siegenberg D, et al. IL-8 secretion and neutrophil activation by HT-29 colonic epithelial cells. *Am J Physiol* 1994;267:G991-997
168. Li A, Varney ML, Singh RK. Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* 2001;7:3298-3304
169. McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3735-3739
170. Minty A, Chalon P, Derocq JM, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 1993;362:248-250
171. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13 elicits a subset of the activities of its close relative interleukin 4. *Stem Cells* 1994;12:169-174
172. Aman MJ, Tayebi N, Obiri NI, et al. cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. *J Biol Chem* 1996;271:29265-29270
173. Zurawski SM, Vega F, Jr., Huyghe B, Zurawski G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J* 1993;12:2663-2670
174. Caput D, Laurent P, Kaghad M, et al. Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor alpha chain. *J Biol Chem* 1996;271:16921-16926
175. Donaldson DD, Whitters MJ, Fitz LJ, et al. The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol* 1998;161:2317-2324

176. Kawakami K, Taguchi J, Murata T, Puri RK. The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood* 2001;97:2673-2679
177. Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:677-690; quiz 691
178. Takeda K, Kamanaka M, Tanaka T, Kishimoto T, Akira S. Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. *J Immunol* 1996;157:3220-3222
179. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 1996;4:313-319
180. Terabe M, Park JM, Berzofsky JA. Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:79-85
181. Li H, Sim TC, Alam R. IL-13 released by and localized in human basophils. *J Immunol* 1996;156:4833-4838
182. Peritt D, Robertson S, Gri G, et al. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 1998;161:5821-5824
183. Hoshino T, Winkler-Pickett RT, Mason AT, Ortaldo JR, Young HA. IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN-gamma. *J Immunol* 1999;162:51-59
184. de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, et al. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 1998;160:1666-1676
185. Oettgen HC, Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:429-440
186. Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 1998;17:1-52
187. Horie S, Okubo Y, Hossain M, et al. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Intern Med* 1997;36:179-185
188. Luttmann W, Knoechel B, Foerster M, et al. Activation of human eosinophils by IL-13. Induction of CD69 surface antigen, its relationship to messenger RNA expression, and promotion of cellular viability. *J Immunol* 1996;157:1678-1683
189. Pope SM, Brandt EB, Mishra A, et al. IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:594-601
190. Bchner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA, Coffman RL, Schleimer RP. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J Immunol* 1995;154:799-803
191. Endo T, Ogushi F, Sone S. LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down-regulated by IL-13, but not by IFN-gamma. *J Immunol* 1996;156:2240-2246
192. de Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:165-169
193. Hart PH, Ahern MJ, Smith MD, Finlay-Jones JJ. Regulatory effects of IL-13 on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis. *Clin Exp Immunol* 1995;99:331-337
194. Isomaki P, Luukkainen R, Toivanen P, Punnonen J. The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:1693-1702

195. Heller F, Florian P, Bojarski C, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005;129:550-564
196. Lebel-Binay S, Laguette B, Quintin-Colonna F, et al. Experimental gene therapy of cancer using tumor cells engineered to secrete interleukin-13. *Eur J Immunol* 1995;25:2340-2348
197. Reisser D, Pinard D, Jeannin JF. IL-13 restores an in vitro specific cytolytic response of spleen cells from tumor-bearing rats. *J Leukoc Biol* 1996;59:728-732
198. Morimoto M, Zhao A, Madden KB, et al. Functional importance of regional differences in localized gene expression of receptors for IL-13 in murine gut. *J Immunol* 2006;176:491-495
199. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 2000;1:515-520
200. Kawakami K, Kawakami M, Snoy PJ, Husain SR, Puri RK. In vivo overexpression of IL-13 receptor alpha2 chain inhibits tumorigenicity of human breast and pancreatic tumors in immunodeficient mice. *J Exp Med* 2001;194:1743-1754
201. Menzel T, Melcher R, Koehler S, et al. Establishment of a colonic adenoma cell line (GEKI-2): spectral karyotype analysis and functional characterization. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:12-17
202. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001
203. Iffland K. Expression und Regulation des antimikrobiellen Cathelicidin-Peptids LL-37 in humanen Kolonepithelzellen, Monozyten und PBMC. 2005
204. Huang JS, Chao CC, Su TL, et al. Diverse cellular transformation capability of overexpressed genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:950-958
205. Jung YD, Fan F, McConkey DJ, et al. Role of P38 MAPK, AP-1, and NF-kappaB in interleukin-1beta-induced IL-8 expression in human vascular smooth muscle cells. *Cytokine* 2002;18:206-213
206. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960-1964
207. Prokopchuk O, Liu Y, Henne-Bruns D, Kornmann M. Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions. *Br J Cancer* 2005;92:921-928
208. Iwasaki K, Torisu M, Fujimura T. Malignant tumor and eosinophils. I. Prognostic significance in gastric cancer. *Cancer* 1986;58:1321-1327
209. Ning Y, Manegold PC, Hong YK, et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Betreuer Dr. med. Theo Kudlich einen besonderen Dank für seine Geduld und Unterstützung während der gesamten Zeit des praktischen und theoretischen Teils meiner Arbeit aussprechen.

Herzlichen Dank an Herrn Professor Dr. med. Michael Scheurlen für die Übernahme des Referats.

Für die Übernahme des Koreferats gilt mein herzlicher Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Steger.

Ein herzliches Dankeschön an das gesamte Team des gastroenterologischen Labors für die technische und moralische Unterstützung sowie an Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ralph Melcher für die Möglichkeit, im gastroenterologischen Labor meine Untersuchungen und diese Arbeit durchführen zu können.

Vielen Dank auch an meine Familie und Freunde für Ihre Geduld.