

Aus der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und
Viszerale Transplantation des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Björn Nashan

**Phänotypische Charakterisierung Tumorstroma-
assoziierter Fibroblasten aus humanen kolorektalen
Lebermetastasen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Marianne Affeldt
aus Hamburg

Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 12.06.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. L. Fischer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. J. Petersen

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Schäfer

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	3
2. Einleitung	4
2.1 Fibroblasten des Tumorstromas	4
2.2 Fibroblasten bei kolorektalen Lebermetastasen	5
2.3 Fibroblastische Zellen in der Leber	5
2.4 Potentielle Marker fibroblastischer Zellen der Leber	6
2.5 Das Plasminogen Aktivator Inhibitor-System	8
3. Material und Methoden	9
3.1 Material	9
3.2 Patienten.....	9
3.3 Gewebeaufbereitung.....	9
3.4 Zellkultur	10
3.4.1 Reinheit der Primärkulturen.....	10
3.4.2 Passagieren der TAF und LF	10
3.4.3 Stimulationsversuche	11
3.5 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	11
3.5.1 Gewebeaufbereitung und Zellbehandlung.....	11
3.5.2 Immunhistochemische Färbung	12
3.5.3 Immunfluoreszenz	13
3.6 Molekularbiologische Untersuchungen	13
3.6.1 Nachweis spezifischer m-RNA	13
3.6.2 RNA-Isolation	13
3.6.3 Northern Blot	15
3.6.4 Herstellung der Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonden.....	16
3.6.5 Hybridisierung	18
3.6.6 Detektion der DIG-markierten Nukleinsäuren.....	19
3.7 ELISA.....	20
3.8 Statistik	20

4. Ergebnisse	21
4.1 Proliferation der TAF und LF in vitro	21
4.2 Morphologische Analyse der TAF und LF in situ	21
4.3 Histologische Charakterisierung der TAF und LF in vitro.....	25
4.4 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die TAF α -SMA-Expression.....	27
4.5 Expression von PAI-1	29
4.6 Sekretion von PAI-1	32
5. Diskussion	33
5.1 Funktionelle Morphologie der TAF im Vergleich zu residenten fibroblastischen Zellpopulationen der Leber	33
5.2 TAF exprimieren den Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ-1	37
6. Zusammenfassung.....	40
7. Literaturverzeichnis	41
8. Bezugsquellenverzeichnis.....	53
8.1 Chemikalien und Reagenzien	53
8.2 Primer	54
8.3 Lösungen und Puffer.....	54
9. Abkürzungsverzeichnis	56
10. Abbildungsverzeichnis	58
11. Danksagung.....	60
12. Lebenslauf	61
13. Eidesstattliche Versicherung	62

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die biologische Rolle von Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten (TAF), dem Hauptbestandteil des desmoplastischen Tumorstromas in kolorektalen Lebermetastasen, ist noch nicht systematisch erforscht. Darüber hinaus ist der zelluläre Ursprung dieser Zellen noch nicht genau charakterisiert. Zahlreiche experimentelle Untersuchungen haben zu der allgemein akzeptierten Erkenntnis geführt, dass residente hepatische Sternzellen (HSC) als zellulärer Ursprung der Fibroblasten im Rahmen der Fibrogenese bei chronischen Lebererkrankungen anzusehen sind, wobei diese universelle Rolle aktuell zunehmend in Frage gestellt wird. Analog werden HSC aber noch immer als zellulärer Ursprung der TAF in Lebertumoren angenommen. Ziel der Arbeit ist darum die immunhistochemische Charakterisierung von humanen Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten aus kolorektalen Lebermetastasen, welche im Rahmen von Leberresektionen gewonnen wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, dass sich durch Vergleich von Markerexpression ein möglicher Ursprung von TAF aus HSC verifizieren oder ausschließen lässt. Dazu erfolgte die morphologische Charakterisierung der TAF in situ am Gewebeschnitt und in vitro anhand aus dem Tumor generierter TAF-Kulturen. Zusätzlich sollte die Möglichkeit einer funktionellen Charakterisierung der TAF in vitro evaluiert werden, mit dem Ziel, potenzielle tumorfördernde Eigenschaften dieser Zellen zu erforschen. Zu diesem Zweck wurde der Effekt von Wachstumsfaktoren auf kultivierte TAF untersucht. Dabei wurden TGF- β 1 (engl.: *transforming growth factor- β 1*) und PDGF (engl.: *platelet-derived growth factor*), welche in Zusammenhang mit der Progression von Lebermetastasen beschrieben wurden, eingesetzt. Außerdem wurden die Wirkungen von TNF- α (engl.: *tumor necrosis factor- α*) und EGF (engl.: *epidermal-derived growth factor*) geprüft. Untersuchungsgegenstand war dabei die myofibroblastische Differenzierung, gemessen an der Genexpression von α -SMA (engl.: *alpha-smooth muscle actin*) sowie die Expression von PAI-1 (engl.: *plasminogen activator inhibitor type-1*), eine pro-invasive und pro-angiogenetische Endopeptidase.

2. Einleitung

2.1 Fibroblasten des Tumorstromas

Bereits im Jahre 1889 wurde von Paget die Hypothese aufgestellt, dass für das Wachstum und die Verbreitung von Karzinomen eine besondere Affinität der Tumorzellen für das Umgebungsmilieu notwendig ist (Welch et al. 2000). Zugrunde gelegt wurden Untersuchungen, die eine ungleichmäßige Verteilung von Metastasen des Mammakarzinoms in unterschiedliche Organe und Gewebe dokumentierten. Seine Erklärung war, dass die Tumorzellen als „Saat“ (engl.: *seed*) nur wachsen würden, wenn sie in dem dazu passenden Gewebe, gewissermaßen dem „Acker“ (engl.: *soil*), ausgebracht werden (Fidler 2000). Eine heutige Definition dieser „*seed and soil*“-Hypothese basiert auf zwei Prinzipien. Erstens seien Neoplasmen heterogen und bestünden aus Zellen mit biologisch unterschiedlichen Eigenschaften, zweitens hänge Karzinomwachstum und -verbreitung von multiplen Interaktionen zwischen Tumorzellen und Wirtsfaktoren ab (Welch et al. 2000).

Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten (TAF) repräsentieren den überwiegenden Anteil des Tumorstromas von soliden Tumoren und ihrer Metastasen. Diese Zellen stellen eine heterogene Gruppe von Fibroblasten dar. Viele von ihnen weisen eine aktivierte oder myofibroblastische Differenzierung auf (Bhowmick et al. 2004, Desmouliere et al. 2004, Tsujino et al. 2007). In vitro- und in vivo-Untersuchungen legen nahe, dass TAF eine wesentliche pathophysiologische Rolle für die Tumorprogression und die Angiogenese spielen, wodurch sie von großem Interesse für die Entwicklung zielgerichteter Behandlungsstrategien sind (Bhowmick et al. 2004, Desmouliere et al. 2004, Fujita et al. 2005, Gulubova 2004, Ishikawa et al. 2004, Orimo et al. 2005, Orimo u. Weinberg 2006).

Es wird angenommen, dass TAF aus organspezifischen ortsständigen Fibroblasten durch Mediatoren wie TGF- β 1 (engl.: *transforming growth factor- β 1*) oder PDGF (engl.: *platelet derived growth factor*) rekrutiert werden (Bhowmick et al. 2004, Desmouliere et al. 2004, Rudnik u. Magliocco 2005). Als weitere potentielle Ursprünge wurden die Transdifferenzierung aus Blut- oder Knochenmarkstammzellen, sowie die mesenchymale Transdifferenzierung aus Epithelzellen experimentell belegt und beschrieben (La Rue et al. 2006, Liu et al. 2006). In Pankreastumorgewebe von Mäusen wurde ein Anteil von 25% Myofibroblasten mit einem Ursprung im Knochenmark nachgewiesen (Direkze et al. 2004). Der zelluläre

Ursprung der TAF-Populationen ist möglicherweise auch tumor- und gewebespezifisch unterschiedlich und wird derzeit zunehmend erforscht.

2.2 Fibroblasten bei kolorektalen Lebermetastasen

Kolorektale Karzinome sind eine der häufigsten krebisbedingten Todesursachen in der westlichen Welt (Fernandez et al. 2000, Kohne-Womper et al. 1994, Rougier u. Mitry 2003). Die Prognose der Erkrankung wird durch das Vorkommen von Metastasen, meistens in der Leber, determiniert (Jemal et al. 2004). Es wurde postuliert, dass die Mikroarchitektur und die zellulären Komponenten der Leber ein günstiges Milieu für die Adhäsion von Tumorzellen und die Ausbildung von Metastasen darstellen (Fidler 2002).

Analog zu der oben genannten, teilweise modifizierten Vorstellung, dass residente, aktivierte HSC der Ursprung der Fibroblasten bei der Leberfibrogenese sind, wurden diese Zellen auch als Ursprung der Fibroblasten im Stroma von Lebertumoren angesehen (Faouzi et al. 1999, Lunevicius et al. 2001, Rosenbaum 1998). Eine eingehende phänotypische Charakterisierung der TAF im Vergleich zu den mesenchymalen residenten Zellen im normalen Lebergewebe steht derzeit allerdings noch aus. In einer komparativen Transkriptomanalyse von Nakagawa et al. 2004 bestand eine deutlich größere Homologie zwischen TAF und residenten, aus Lebergewebe isolierten Fibroblasten als zwischen TAF und kutanen Fibroblasten derselben Patienten (Nakagawa et al. 2004). Diese Arbeiten verdeutlichen zweierlei: erstens, dass Fibroblastenspezies eine organspezifische Differenzierung aufweisen und zweitens, dass die TAF aus Lebermetastasen am ehesten tatsächlich dem Lebergewebe entstammen. Die Frage, aus welchen leberspezifischen mesenchymalen Zellen die TAF-Population hervorgeht, bleibt jedoch unbeantwortet.

2.3 Fibroblastische Zellen in der Leber

Die gesunde Leber besitzt als parenchymatöses Organ vergleichsweise wenig Fibroblasten. Aufgrund ihrer Fähigkeit, eine myofibroblastische Transaktivierung zu unterlaufen, wurden hepatische Sternzellen (HSC) als prinzipielle Effektorzelle der Fibrogenese der Leber angesehen (Gressner 1996, Knittel¹ et al. 1999, Oben et al. 2004, Sancho-Bru et al. 2005).

In der gesunden Leber erscheinen HSC als perizytenartige, fett- und retinoidhaltige Zellen (Uchio et al. 2002). Unter Kulturbedingungen können HSC zu kontraktile, myofibroblastenartigen Zellen transdifferenzieren, welche Glattmuskel-Filamente (α -SMA; *alpha-smooth muscle actin*) exprimieren und extrazelluläre Matrixproteine sezernieren (Friedmann 1993, Rockey 2001, Tahashi et al. 2002).

In den letzten Jahren wurden weitere fibroblastische Zelltypen der Leber identifiziert, die je nach Schädigungsmuster eine wichtige Rolle für die Fibrogenese spielen. So wurden die im Portalfeld lokalisierten perivaskulären oder periduktalen Fibroblasten beschrieben, die bei cholestatischer Leberschädigung einen signifikanten Anteil an der Septenbildung haben (Guyot et al. 2006, Ramadori u. Saile 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich die Fibroblasten bei Fibrose und Zirrhose zum Teil aus Blut- oder Knochenmarkzellen generieren. Letzteres gelang durch immunhistochemische, gegen Geschlechtschromosomen gerichtete Untersuchungen bei Patienten, die nach einer Lebertransplantation eine erneute Fibrose entwickelten und bei denen gleichsam ein Geschlechts-*Missmatch* zwischen Spender und Empfänger vorlag (Forbes et al. 2004).

2.4 Potentielle Marker fibroblastischer Zellen der Leber

Zur Charakterisierung fibroblastischer Zellen der Leber existiert eine große Menge von Original- und Übersichtsarbeiten (Bataller u. Brenner 2005, Guyot et al. 2006, Hinz 2006, Hinz et al. 2007, Ikegami et al. 2006, Shigeki et al. 2006). Das insgesamt große Interesse an diesem Feld liegt darin begründet, dass der embryogene Ursprung sowie die genaue Funktion und Beteiligung der HSC bei der Leberfibrogenese noch immer nicht hinreichend aufgeklärt wurden. Im Folgenden werden die Charakteristika der in der vorliegenden Arbeit untersuchten und teilweise als Marker verwendeten Proteine genannt:

Laminin ist als basalmembranspezifisches Glykoprotein bei der Verankerung der Zellen beteiligt. Es bindet einerseits an Lamininrezeptoren der Plasmamembran (Integrine) andererseits an Typ IV Kollagen in der Lamina densa. Laminin spielt eine entscheidende Rolle in der vaskulären Gewebeorganisation und der Wundheilung, zudem unterstützt es die mechanische Grundlage der Gefäße. Im Rahmen maligner Prozesse ist Laminin an der Vermittlung von Adhäsion, Tumorzellmigration und Angiogenese beteiligt (Marincovich et al. 2007, Mercurio u. Rabinovitz et al. 2001, Mercurio et al. 2001, Patarroyo et al. 2002).

Vimentin stellt ein Intermediärfilament (IF) dar. IF liegen fadenförmig in Zellen mit mechanischer Beanspruchung vor und bilden die stabilste und am wenigsten lösliche Komponente des Zytoskeletts. Vimentin ist für Zellen mesenchymalen Ursprungs, embryonale bzw. undifferenzierte Zellen charakteristisch und scheint maßgeblich an Zellanhaftung, -migration und -kommunikation beteiligt zu sein (Ivaska et al. 2007).

α -SMA (engl.: *alpha-smooth muscle actin*) präsentiert das Vorhandensein von Myofilamenten und damit die Fähigkeit der Migration und Kontraktilität; es kommt auch in glatten Muskelzellen und Myofibroblasten vor. Im Gegensatz zu „ruhenden“ HSC, welche α -SMA-negativ sind, wird letzteres von kultur-aktivierten HSC exprimiert (Kharbanda et al. 2004, Kisseleva et al. 2006).

GFAP (engl.: *glial fibrillary acidic protein*) ist für Gliazellarten und Astrozyten charakteristisch und bildet dort die Gliafilamente. GFAP wird von HSC der Ratte exprimiert (Johnson et al. 1998, Knittel² et al. 1999, Maubach et al. 2006).

Desmin ist ein IF, das in den Z-Scheiben der Skelett- und Herzmuskulatur gefunden wird. Es kommt aber auch in glatten Muskelzellen vor (Costa et al. 2004).

ICAM-1 (engl.: *intercellular adhaesion molecule-1*) zeigt eine inflammatorische Reaktion an (Kumagai et al. 2003) und gehört zu den interzellulären Adhäsionsmolekülen.

NCAM (engl.: *neuronal cell adhaesions molecule*) gehört zu den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen und wird von aktivierten HSC der Ratte exprimiert (Knittel² et al. 1999).

CK7 und CK19 (engl.: *Cytokeratin*) sind Zytokeratine, die in Epithelzellen vorkommen.

Thy-1 (engl.: *thymus cell antigen-1*) ist ein Stammzellmarker, der zur immunologischen Familie der Adhäsionsmoleküle gehört. Dieses Protein, dessen Funktion noch weitgehend unerforscht ist, wird in Fibroblasten heterogen exprimiert. Möglicherweise spielt es bei der myofibroblastischen Transdifferenzierung oder fibroblastischen Proliferation eine Rolle (Hudon-David et al. 2007, Sanders et al. 2007, Pei et al. 2004). So konnte gezeigt werden, dass nur Thy-1 positive Fibroblasten des Myometriums und der Orbita nach Stimulation durch TGF- β in Myofibroblasten differenzierten. Thy-1 negative Fibroblasten hingegen transdifferenzierten in Lipofibroblasten (Koumas et al. 2003).

2.5 Das Plasminogen Aktivator Inhibitor-System

Das Plasminogen Aktivator Inhibitor-System ist entscheidend für extrazelluläre Umbauvorgänge, aber auch für Invasion und Neo-Angiogenese im Rahmen der Tumorprogression (Dano et al. 1985, Ramont et al. 2003). Plasmin ist eine Endopeptidase, die Fibrinogen und Fibrin zu Spaltprodukten abbaut. Sie wird durch Plasmin Aktivatoren (PA), die Serinproteasen vom Urokinase-Typ (u-PA) und vom Gewebe-Typ (t-PA), von der Vorstufe Plasminogen in die aktive Form überführt (Blasi u. Verde 1990, Dano et al. 1985; Saksela u. Rifkin 1988). Plasmin ist mittels der Aktivierung von Kollagenasen in der Lage, die meisten extrazellulären Matrixproteine zu degradieren (Librach et al. 1991). Der Zelloberflächenrezeptor *Urokinase Plasminogen Activator Receptor* (uPAR) steuert die Extrazellulärmatrix (EZM)-Degradierung. Die proteolytische Aktivität dieser Kaskade kann an der Zellmembran durch die Expression von uPAR gemessen werden (Behrendt et al. 1995, Blasi 1993, Estreicher et al. 1990; Roldan et al. 1990). Der Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ-1 (PAI-1), ein etwa 50 kDa großes Glykoprotein, inhibiert t-PA im Blut (Andreasen et al. 1990; Kruithof 1988). Es wird in der Gefäßwand durch Endothelzellen und glatte Muskelzellen produziert. Die Wachstumsfaktoren TNF- α und TGF- β 1 sind als Mediatoren beschrieben, die die Genexpression von PAI-1 in bestimmten Situationen stimulieren (Chen et al. 2001, Chi-Li Chung et al. 2005, Nordt et al. 2003, Pandey et al. 2005).

3. Material und Methoden

3.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Lösungen, Puffer, Antikörper und Primer sind in der alphabetischen Bezugsliste im Anhang (**Kapitel 8**) aufgeführt.

3.2 Patienten

Es wurde das Gewebe von 20 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen untersucht. Als Grundlage für die Versuche dienten dabei zum einen Gewebeproben (Tumorgewebe sowie anhängendes gesundes Lebergewebe), zum anderen die aus dem Tumorgewebe generierten Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten (TAF) und die aus dem Lebergewebe generierten Leberfibroblasten (LF). Das Gewebe wurde im Rahmen von Leberteilresektionen nach schriftlicher Einwilligung der Patienten gewonnen.

3.3 Gewebeaufbereitung

Für die Immunhistochemie wurden die Gewebeproben in Tissue Tek[®] (Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL) eingebettet, mit flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die mRNA-Analysen wurden Gewebeproben mit einem Volumen von ca. 0,7 cm³ vom Metastasengewebe, vom angrenzenden Lebergewebe, und von entferntem Lebergewebe entnommen, mit flüssigem N₂ eingefroren und bei -80 °C in sterilen 1,8 ml NUNC-Röhrchen (NuncloTM, Nunc, Roskilde, Dänemark) gelagert.

Für die Isolierung von TAF und LF wurden Gewebestücke der Metastase (ohne angrenzendes Lebergewebe) und des entfernten, normalen Lebergewebes in sterile 50 ml-Zellkulturröhrchen (Falcon[®], Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.Y., USA) mit Medium 199 (Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA) überführt.

3.4 Zellkultur

Für die Zellkultur wurden die Gewebestücke mechanisch mit sterilen Pinzetten zerkleinert und für 60 Minuten bei 37°C in 30 ml Medium 199 (Invitrogen) und 1 mg/ml Kollagenase Type IV (Sigma, Steinheim, Deutschland) inkubiert. Hiernach wurden die angedauten Gewebestücke in 30 ml *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS; Invitrogen) und 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung (Invitrogen), bestehend aus Penicillin, Streptomycin sowie Amphotericin B, auf 145 cm²-Kulturplatten aufgebracht (NuncloTM) und in 5% CO₂-haltiger feuchter Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgte, sobald die Zellen adhärten, nach ca. 48 bis 72 Stunden. Nach etwa 20 bis 25 Tagen war in der Regel ein kompletter Monolayer mit fibroblastischen Zellen gewachsen, der dann weiter subkultiviert werden konnte. Für die weitere Expansion der Kulturen wurden nach Passagieren (s.u.) 1x10⁶ Zellen pro Platte in 30 ml Kulturmedium ausplattiert. Alle 48 Stunden wurden die Zellen mit GBSS (Sigma) gewaschen und das Kulturmedium ausgewechselt. Die Charakterisierungen und funktionellen Analysen wurden zwischen der dritten und zehnten Passage, ohne erkennbare Ergebnisdifferenzen, durchgeführt.

3.4.1 Reinheit der Primärkulturen

Zur Bestimmung von Reinheit und Entwicklung der Zellkulturen wurden diese einerseits im inversen Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) im Verlauf des Kulturwachstums beobachtet (Abb. 1). Andererseits wurden die Zellen immunzytotechnisch untersucht. Auf Kulturplatten (NuncloTM) kultivierte Zellen wurden hierzu fixiert und mittels Immunfluoreszenz auf ihre Markerproteine hin untersucht. Zur Identifizierung von TAF und LF kamen Färbungen gegen Vimentin, Thy-1, α-SMA, Desmin, CD45, ICAM-1, NCAM, GFAP, CK 7, CK 19 und Laminin zur Anwendung.

3.4.2 Passagieren der TAF und LF

Alle Arbeitsschritte wurden an einer Zellkulturbank (Heraeus Instruments) durchgeführt, um eine Kontamination der Zellkulturen zu verhindern. Mit einer sterilen Glaspipette wurde das Medium abgesaugt und die Kulturplatten zweimal mit 10 ml GBSS (Sigma) gewaschen, um sie von abgestorbenen Zellen und Verunreinigungen zu befreien. Die Platten wurden dann mit 5 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen) für 10

Minuten inkubiert. Die so gelösten Zellen wurden in 25 ml Medium in ein 50 ml-Röhrchen (Greiner bio-one, Cellstar) eingebracht. Durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1500 rpm bildete sich ein Pellet. Nach Verwerfen des Überstandes löste man das Pellet in 1 ml Kulturmedium erneut. Die Zellen wurden mit Trypanblau angefärbt, um die Vitalität und Zellkonzentration in der Neubauer-Zählkammer und im Standardmikroskop (Zeiss) zu bestimmen.

3.4.3 Stimulationsversuche

Um das Verhalten der Zellen in Kultur unter Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu untersuchen, wurden die TAF und LF je nach Fragestellung mit folgenden Faktoren versetzt: humanem PDGF-BB (10 ng/ml; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) humanem TGF- β 1 (5 ng/ml; Roche Diagnostics GmbH), humanem TNF- α (50 ng/ml; Sigma) und humanem EGF (10 ng/ml; Sigma). Für die RNA-Isolation und das Untersuchen des Mediums von TAF und LF wurden 1×10^6 Zellen für 48 Stunden in DMEM mit 10% FCS auf 145 cm²-Kulturplatten kultiviert. Anschließend wurden die Platten zweimal mit GBSS gewaschen. Die Zellen wurden mit 30 ml DMEM und 0,5% FCS zum einen mit den genannten Wachstumsfaktoren und Zytokinen, zum anderen zur Kontrolle ohne diese für 24 Stunden inkubiert. Das Medium wurde danach für Proteinanalysen (PAI-1-ELISA) bei -20°C asserviert, und die Zellen wurden abtrypsiniert für die RNA-Isolation und Northern Blot Analysen.

3.5. Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

3.5.1 Gewebeaufbereitung und Zellbehandlung

Für die histologische Untersuchung am Gewebe wurden Gewebestücke in Tissue Tec® (Sakura Finetek) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und bei -80°C asserviert. 5 μ m dünne Schnitte wurden mit einem Kryostaten (MIKROTOM HM 505E, Richard Allen Scientific, Kalamazoo, USA) unter Verwendung von Glasobjektträgern (HistoBondR, Marienfeld Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland) angefertigt.

Die generierten Zellen wurden für die phänotypische Charakterisierung mit einer Dichte von 25.000 Zellen pro Kammer in 8-er *chamber slides* (BD Falcon™, BD Biosciences) ausgesät und nach 48 Stunden in +4°C kaltem Aceton fixiert.

3.5.2 Immunhistochemische Färbung

Um die TAF in humanem Metastasengewebe und Leberfibroblasten in tumorfreiem Lebergewebe phänotypisch zu charakterisieren, wurden die 5 µm dünnen Kryoschnitte mit den folgenden Primärantikörpern (monoklonale mouse-anti-human Antikörper) in PBS gefärbt: α-SMA (1/50, clone 1A4, Dako, Glostrup, Dänemark); Vimentin (1/50, clone V9, Dako); Thy-1 (1/25, clone 5E10, BD Biosciences, Bedford, MA, USA); Desmin (1/50, clone D33, Dako); CD45 (1/50, clone T29/33, Dako); cytokeratin 7 (1/50, clone OV-TL 12/30, Dako); cytokeratin 19 (1/100, clone RCK108, Dako); neural cell adhesion molecule (NCAM; 1/25, clone T199, Dako); intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1; 1/50, clone 6.5B5, Dako); Laminin (1/25, clone 4C7, Dako) und glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1/25, clone 6F2, Dako).

Vor den Färbevorgängen, entsprechend dem Protokoll des Vectastain®ABC-AP Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), trockneten die Gefrierschnitte 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden 10 Minuten in einer Aceton/PBS Lösung (3:1) von +4°C fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Schnitte mit dem DAKO® Biotin Blocking System (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) nach Herstelleranleitung behandelt um unspezifische Färbungen gegen das endogene Biotin und Avidin zu vermeiden. Die Proben wurden für 10 Minuten mit Normalserum (Normal Goat Serum, Vector; 1 ml:10 ml PBS) inkubiert um die Hintergrundfärbung möglichst gering zu halten. Das Serum wurde von den Schnitten abgeklopft und diese mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe oben) über Nacht bei +4°C beschichtet. Die Schnitte wurden zunächst mit dem Sekundärantikörper und danach mit dem VECTASTAIN®ABC-AG Reagenz (Vector) jeweils für 30 Minuten inkubiert. Dann wurden sie für 20 bis 30 Minuten in Alkaliner Phosphatase Substratlösung belassen. Es folgte eine Spülung in Aqua dest. Mit HE (Hämatoxylin-Eosin) wurde zur besseren morphologischen Beurteilung gefärbt. Zum Bläuen der Kerne wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Wasser gewässert und anschließend eingedeckt (Aquatex, Merck, Darmstadt: Marienfeld Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland). Durch Ersetzen des Primärantikörpers mit jeweils irrelevanten isotyp-spezifischen Maus IgG wurden Negativkontrollen erstellt. Zwischen allen Arbeitsgängen, bis auf vor der Primärantikörperauftragung, erfolgte ein dreimal 5-minütiger Waschgang in PBS.

Analog wurden die kultivierten, auf *chamber slides* (BD Falcon™) fixierten Zellen untersucht.

Die Färbung gegen CD45 wurde entsprechend dem Protokoll nach DakoCytomation EnVision[®]+System-HRP (Dako) durchgeführt.

3.5.3 Immunfluoreszenz

Die histologischen Schnitte wurden ebenso wie die *chamber slides* im ersten Schritt bei Raumtemperatur für 30 Minuten getrocknet. Die zu färbenden Gewebe bzw. Zellen wurden in +4 °C kaltem Aceton für 1 Minute 30 Sekunden fixiert und mit einem Fettstift umrandet. Unspezifische Proteinbindungen wurden durch eine 20-minütige Blockierung mit dem DAKO Protein Block verhindert. Die Proben inkubierten für 60 Minuten mit dem Primärantikörper (1:200 in DAKO Diluent). Im Dunklen erfolgte dann eine 60-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Rhodamine Red[™]-X-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)).

Die Objektträger wurden aus dem Feuchten heraus eingedeckt und mit Vectashield (Vector) versiegelt. Über Nacht trockneten die Schnitte bei +4 °C und wurden am nächsten Tag ausgewertet. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zwischen allen Schritten wurden die Schnitte dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen.

3.6 Molekularbiologische Untersuchungen

3.6.1 Nachweis spezifischer mRNA

In dieser Arbeit wurde die Northern Blot Hybridisierung mit der Digoxigenin-Methode durchgeführt (Peterhaensel et al. 1998, Schwable et al. 1998, Yamaguchi et al. 1994). Um spezifische mRNA nachzuweisen stand zunächst die Isolation von Gesamt-RNA aus den Gewebeproben im Vordergrund. Die spezifische mRNA wurde detektiert, indem die Gesamt-RNA elektrophoretisch getrennt und auf die Nylonmembran transferiert wurde. Als komplementäre Sonde benötigte man eine DNA-Probe (cDNA). Diese wurde mit Digoxigenin markiert und zum Nachweis der zu untersuchenden mRNA in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt.

3.6.2 RNA-Isolation

Um die Gesamt-RNA aus den Gewebeproben zu extrahieren, wurde der RNeasy[®] Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) genutzt. Alle Materialien wurden autoklaviert, die Lösungen und Puffer unter strengsten sterilen Bedingungen angesetzt, sowie alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Entsprechend der Probenmenge wurde als

Vorbereitung dem RLT-Puffer β -Mercaptoethanol in einem Verhältnis von 1:100 hinzugegeben. Je Isolation wurden 200 bis 250 mg gefrorenes Lebergewebe verwendet. Die Probe wurde mit einem Mikro-Dismembrator (Braun-Melsungen, Göttingen, Deutschland) zerkleinert, in 3,8 ml RLT Puffer lysiert und in ein 15 ml-Röhrchen (Falcon®) überführt. Dieses lysierte Gewebe wurde 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert (Rotana/RP-Zentrifuge, Firma Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Dem Überstand wurden 3,8 ml 70%-iges Ethanol hinzugefügt, das Ganze wurde geschwenkt und für eine Minute durchmischt (Mini Shaker, IKA-Werke GmbH und Co KG, Staufen, Deutschland). Zum Fixieren der RNA in den Säulenmembranen des Kits folgten mehrere Waschschrte in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Um die RNA aus der Membran zu lösen, wurde der Filter in ein neues 15 ml-Sammelröhrchen überführt und zweimal mit 250 μ l RNase-freiem Wasser (Sigma) eluiert. Zur Bestimmung der erreichten Konzentration fertigte man ein Aliquot mit der Verdünnung 1/50 in RNase-freiem Wasser aus dem Kit an und maß die Extinktion bei 260 und 280 nm im Photometer (Uvette®, Eppendorf, Deutschland).

Um die mRNA aus der Zellkultur zu isolieren wurde der RNeasy^R Mini Kit (QIAGEN) genutzt. Dazu wurden die Zellen auf der 145 cm²-Kulturplatte zunächst zweimal mit 15 ml GBSS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Trypsin /EDTA für 10 Minuten im Brutschrank um die adhärenierten Zellen von der Kulturplatte zu lösen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in ein 50 ml-Falconröhrchen gegeben und mit weiteren 10 ml GBSS (Sigma) aufgefüllt. Danach erfolgte die Zentrifugation des Röhrchens bei 1300 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem der Überstand abgenommen und verworfen wurde, das Pellet in frischem GBSS gut resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde, konnte das nun entstandene Pellet in frischem GBSS gelöst und die Zellen gezählt werden. Bis zu 5×10^6 Zellen wurden in ein RNase-freies 1,5 ml-Röhrchen gegeben und zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Dem Zellpellet wurde in einem Verhältnis von 1:100 RLT-Puffer und Mercaptoethanol hinzugefügt. Die Suspension wurde geschüttelt und für 15 bis 30 Minuten bei Zimmertemperatur lysiert. In diesem Zustand konnte das Zelllysate bis zur weiteren Nutzung bei -80° C gelagert werden. Nach dem Auftauen und Schütteln wurden die Zellen auf eine Shreddersäule gegeben (QIAshredderTM Qiagen). Diese wurde auf ein 2 ml-Röhrchen gesetzt und für 2 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 70%-igem Ethanol in Sigma Wasser (Verhältnis 1:1) (Sigma) durchmischt und auf die Säulen des RNeasy^R Mini

Kit gegeben. Nach 20 Sekunden Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde der Durchfluss verworfen. 700 µl RW1-Puffer wurde nun auf die Säulen gegeben und es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 20 Sekunden bei 10.000 rpm. Dieser Durchfluss wurde verworfen und die letzten beiden Schritte nochmals durchgeführt. Anschließend wurde die Säule auf ein neues 2 ml-Röhrchen gegeben. Diese Röhrchen wurden für eine Minute bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Nun konnte die Säule auf ein 1,5 ml-„Biopur Röhrchen“ gegeben und mit 30 bis 50 µl RNase-freiem Wasser (Sigma) aufgefüllt werden. Nach einer Minute erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm für eine Minute. Der Ausbeuteerfolg wurde anhand der gemessenen Extinktion im Photometer bestimmt.

3.6.3 Northern Blot

Zum Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran wurde zunächst ein Agarosegel mit einer Konzentration von 1% hergestellt. Zur Inaktivierung der RNasen wurden die Gelelektrophoresekammer, der Schlitten und die Kämme für 20 Minuten mit 0,1%-igem Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Das 1%-ige Gel wurde zusätzlich vor der Polymerisation mit 20 ml Formaldehyd, 24 ml 10 x RB und 5 µl 1%-igem Ethidiumbromid versetzt. Pro Spur verwendete man 10 µg Gesamt-RNA, die mit 7,5 µl Probenpuffer durchmischt, für 10 Minuten bei 65°C im Thermoblock erhitzt und anschließend für 2 bis 3 Minuten auf Eis gekühlt wurde. Jede Probe wurde mit 3 µl Ladungspuffer vermischt und kurz abzentrifugiert (eine Minute bei 10000 rpm). Die Elektrophorese erfolgte im Horizontallaufträger (Sub-Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Das Gel lief bedeckt mit 1 x RB unter einer Spannung von 80V 1,5 bis 2 Stunden. Im Anschluß wurde unter UV-Licht eine Fotografie angefertigt (Gelprinter MWG-Biotech GmbH, Ebersberg, Deutschland). Daraufhin wurde das Gel einmal 15 Minuten in Aqua dest. und zweimal 15 Minuten in 20 x SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Eine flache Plastikwanne wurde mit 20 x SSC gefüllt und eine Glasplatte quer darübergerlegt. 2 Streifen Whatmanpapier (Whatman Chromatography Paper, Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland) wurden so zurechtgeschnitten, dass sie eine doppelte Filterpapierbrücke über der Glasplatte mit Kontakt zum Boden der Wanne bildeten. Es wurde sichergestellt, dass das Whatmanpapier in den Puffer auf beiden Seiten eintaucht. Luftblasen wurden beseitigt. Das Gel wurde mit den Taschen nach unten mittig auf die Filterpapiere gelegt und mit Parafilm abgeklebt. Die Nylonmembran

(Filter Hybond-N+, Amersham Pharmacia Little Chalfont, GB) wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und luftblasenfrei auf dem Gel platziert. Eine doppelte Lage Filterpapier in der Größe des Gels wurden in 2 x SSC getränkt, auf die Nylonmembran gelegt und mit einem Stapel Zellstoff und einer weiteren Glasplatte bedeckt. Das Ganze wurde mit einem Gewicht von 750 g auf der Glasplatte beschwert. Durch das Konzentrationsgefälle der SSC Lösungen erfolgte der Transport der RNA durch das Gel auf die Membran. Nach 20 Stunden wurde der Transfer abgebrochen und mit Hilfe eines UV-Crosslinkers (Hoefer TM, UVC 500 UV-Crosslinker, Amersham Biosciences Europe GmbH, Little Chalfont, GB) konnte die RNA mit der Nylonmembran vernetzt werden. Damit eine spätere Größenzuordnung der Banden möglich war, markierte man die Signale der 18S und 28S rRNA-Untereinheiten unter UV-Licht. Die Membran wurde entweder sofort verwendet oder in 20 x SSC luftdicht verschlossen bei +4 °C gelagert.

3.6.4 Herstellung der Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonden

Die gesamte mRNA wurde in einer reversen Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das dabei gebildete Produkt, ein cDNA/mRNA-Doppelstrang, diente in der folgenden Standard-PCR als Matrize. Dabei wurde mit spezifischen Primern ein ca. 200 bis 400 bp langer Abschnitt innerhalb der Zielsequenz amplifiziert. In einem dritten Schritt wurden die Sonden markiert, indem 1 µl des spezifischen PCR-Produkts in eine DIG-labeling-PCR-Reaktion eingesetzt wurde. Bei dieser wurde DIG-(Digoxigenin-markiertes) dUTP anstatt des dTTP direkt in die Sonden eingebaut. Da lediglich ein Rückwärts-Primer verwendet wurde, konnte eine konzentrierte Einzelstrang-cDNA hergestellt werden. Sie war komplementär zu den m-RNA-Transkripten auf der Membran und dadurch hochspezifisch.

Polymerase-Kettenreaktion revers transkribierter Gesamt-RNA (RT-PCR)

Um den cDNA-Strang für die spätere Hybridisierung zu erhalten, wurde Gesamt-RNA aus den Lebergewebeproben zunächst mit Hilfe des 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV, Roche Diagnostics GmbH) revers transkribiert und diese dann in der PCR eingesetzt. Folgende Komponenten wurden in einem sterilen, verschließbaren 0,5 ml-Reaktionsgefäß (*safe-lock tubes*, eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gemischt:

7,2 µl Sigma-H₂O (Sigma),
2 µl 10 x Reaktionspuffer,
4 µl 25 mM MgCl₂,
2 µl Desoxynukleotidmischung,
2 µl Oligo-p(dT)₁₅ Primer; 0,8 µg/µl,
1 µl RNase Inhibitor; 50 U/µl,
0,8 µl AMV Reverse Transkriptase; 25 U/µl und 1 µg Gesamt-RNA.

Dann wurde die Probe kurz durchmischt und im Thermocycler (Biometra, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) bei folgender Einstellung inkubiert: 10 Minuten bei +25°C, 60 Minuten bei +42°C, 5 Minuten bei +99°C und abschließend 5 Minuten bei +4°C.

Standard-PCR

Die in der RT gewonnene cDNA wurde in dem folgenden Reaktionsansatz genutzt, um das gewünschte PCR-Produkt zu amplifizieren. In einem sterilen 0,5 ml-Reaktionsgefäß (*safe-lock tubes*, eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurden in der folgenden Reihenfolge gemischt:

40,75 µl Aqua dest.,
5 µl 10 x Reaktionspuffer,
1 µl NTP,
1 µl Template DNA,
1 µl Vorwärts-Primer,
1 µl Rückwärts-Primer,
0,25 µl Taq-Polymerase und 1 µl RT Produkt.

Die Probe wurde abzentrifugiert und im Thermocycler amplifiziert: Zu Beginn erfolgte für 3 Minuten eine Denaturierung bei +95°C, dann 40 Zyklen bestehend aus jeweils einer Minute bei +95°C, einer Minute 30 Sekunden bei +57°C Annealing, 2 Minuten bei +72°C Elongation und abschließend 10 Minuten bei +72°C.

Antisense DIG-PCR

Aus den entstandenen DNA-Doppelsträngen konnten in einem nächsten Schritt unter Verwendung eines humanen *antisense*-Primers DNA-Einzelstränge synthetisiert werden. Diese waren komplementär zu der RNA und wurden durch den Einbau von DIG-dUTP in das PCR-Produkt als Sonde markiert. Durch Zusammenpipettieren der

folgenden Komponenten in ein steriles 0,5 ml-Röhrchen auf Eis (*safe-lock tubes*, eppendorf AG) wurde der nötige Reaktionsansatz geschaffen:

37 µl Aqua dest.,

5 µl 10 x Puffer,

5 µl DIG-PCR-Nukleotide,

1 µl Rückwärts-Primer,

1 µl Template DNA und

1 µl Enzymmischung.

Nachdem die Reagenzien gemischt und abzentrifugiert waren, inkubierte man sie im Thermocycler mit folgendem Programm: Zunächst 3 Minuten bei +95°C, dann 40 Zyklen mit jeweils eine Minute bei +95°C Denaturierung, eine Minute bei +57°C Annealing und 2 Minuten Elongation bei +72°C. Dabei wurde der letzte Elongationsschritt 10 Minuten bei +72°C durchgeführt. Wegen des mehrfachen Einbaus von DIG-dUTP während des PCR-Prozesses war das Molekulargewicht im Vergleich zum unmarkierten Produkt bei der Analyse mit 5 µl des PCR-Ansatzes durch Elektrophorese in 2%-igem Agarosegel erhöht. In ein 15 ml-Röhrchen (Falcon®) gefüllt mit 10 ml DIG-Easy-HYB^R-Hybridisierungspuffer (Roche Diagnostics GmbH) wurde die hergestellte Hybridisierungssonde pipettiert und bei -20°C verwahrt. Die Kontrolle der PCR und DIG-PCR erfolgte im 2% Agarosegel mit Ethidiumbromid.

3.6.5 Hybridisierung

Zum Nachweis spezifischer Transkripte aus der Gesamt-RNA der Leberproben wurde die Nylonmembran, mit der RNA-Seite nach innen, in ein mit 10 ml DIG-Easy-Hyb^R-Hybridisierungspuffer (Roche Diagnostics GmbH) gefüllten Hybridisierungsröhrchen überführt. Um die nicht mit RNA bedeckten Membranstellen zu blockieren wurde eine Stunde bei +50°C im Hybridisierungssofen (Amersham Pharmacia, Biotech Europe GmbH, Chalfont, GB) prähybridisiert. Dabei verhinderte ein Blockierungsreagenz das unspezifische Binden des DIG-Antikörpers an die Membran. In der Zwischenzeit wurde die bei -20°C gelagerte Hybridisierungssonde für 10 Minuten bei +68°C im Wasserbad erhitzt. Nach Ablauf der Prähybridisierungszeit wurde der Prähybridisierungspuffer verworfen, die aufgetaute Sonde zu der Membran gegeben und die Membran bei +50°C unter ständiger Rotation über Nacht hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde erneut bei

-20°C eingefroren. Danach wurde, um unspezifisch gebundene DNA zu beseitigen, die Membran zweimal für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x Waschpuffer (2 x SSC + 0,1% SDS) und zweimal 15 Minuten bei +68°C in 0,5 x Waschpuffer (0,5 x SSC + 0,1% SDS) gewaschen.

3.6.6 Detektion der DIG-markierten Nukleinsäuren

Die Detektion wurde mit dem DIG Wasch und Block Puffer Set (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. Bei dem DIG-System wird das Steroid Digoxigenin verwendet, welches über einen Brückenarm an die Sonde gekoppelt ist. An die markierte Sonde bindet ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Digoxigenin Antikörper. Das Signal wird durch Chemolumineszenz erzeugt. Die zur Chemolumineszenz-Detektion erforderlichen Schritte wurden bei Raumtemperatur in einer sauberen Schale durchgeführt.

Zunächst wurde die Membran bei Zimmertemperatur eine Stunde in Blockierungslösung leicht geschüttelt (Wippschüttler, neoLab Migge Laborbedarfsbetriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland), um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Der mit alkalischer Phosphatase konjugierte Anti-DIG-Antikörper (Anti digoxigenin-AP conjugate, Fab fragmente, Roche Diagnostics GmbH) wurde 1:20.000 in 50 ml Blockierlösung verdünnt, und die Membran weitere 30 Minuten in der Antikörperlösung inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte nach einer 2-minütigen Äquilibrierung der Membran in Detektionspuffer die Zugabe des Substrates CDP (CDP-Star ready to use, Roche Diagnostics GmbH) zur Signalerzeugung. Das Chemilumineszenzsignal konnte mit dem Phospho-Imager (Fluor-STM Multimager, Bio Rad, München, Deutschland) gemessen werden.

Rehybridisierung

Die Membran wurde 2 x 15 Minuten in +90°C heißem 1 x TE (Tris-EDTA-Puffer, Sigma) ausgewaschen und anschließend in einer neuen Hybridisierungsreaktion eingesetzt.

3.7 ELISA

Zur Messung der PAI-1-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde der humane PAI ELISA Kit angewendet.

Das Haemochrom Diagnostica GmbH PAI Kit ist ein Sandwich ELISA, der einen Peroxidase (HRP-) gekoppelten, monoklonalen Anti-PAI-1-Antikörper nutzt. Zunächst wurden 100 µl HRP-konjugierter-monoklonaler Anti-(h)-PAI-1 Antikörper in jede Vertiefung gebracht. Die genutzte Mikroplatte war mit einem weiteren monoklonalen Anti-PAI-1 Antikörper beschichtet. 100 µl des Standards oder der Probe wurden unmittelbar in die entsprechenden Vertiefungen eingebracht, worauf die Immunreaktion startete. Das PAI-1-Ag bindet über ein definiertes Epitop an die Festphasen gebundenen, monoklonalen Anti-PAI-1-Antikörper und bindet den zweiten monoklonalen HRP gekoppelten Anti-PAI-1-Antikörper über ein weiteres definiertes Epitop. Die Platte wurde dafür nach vorsichtigem Mischen bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert und danach mit 300 µl Wash Solution (20-fach in A. dest. verdünnt) 5-fach gewaschen. Nachdem die ungebundenen Proteine abgewaschen waren, wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur 200 µl des Peroxidasesubstrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)/H₂O₂ hinzugegeben und mit 50 µl 0,45 M Schwefelsäure die Reaktion gestoppt. Damit wurde die Bildung eines Farbstoffs induziert, dessen Intensität direkt proportional zur Konzentration des humanen PAI-1-Ag in der Probe ist.

Die Farbstabilisierung dauerte 10 Minuten. Die Absorption wurde bei 450 nm abgelesen und der Blank-Wert subtrahiert. Für die Messung und Auswertung wurde der Microplate Reader Dynatech MR 5000 (Thermo Bioscience GmbH, Egelsbach) mit der Software Microwin 2000 (Microtek Laborsysteme) verwandt.

3.8 Statistik

Alle Parameter wurden durch Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung dargestellt (SEM). Außerdem wurde die Signifikanz mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni-Adjustierung geprüft. Als signifikant wurden p-Werte <0,05 festgesetzt.

N stellt die Anzahl der jeweiligen unterschiedlichen Zell- oder Gewebeisolationen von unterschiedlichen Patienten dar.

4. Ergebnisse

4.1 Proliferation der TAF und LF in vitro

Es zeigten sich zunächst vereinzelte ausgewanderte Zellen auf den Kulturplatten. Diese nahmen an Größe zu und waren nach 10 bis 20 Tagen durch ihre spindel- oder sternförmige Morphologie eindeutig als TAF und LF identifizierbar. Sie formten zunächst Zellhaufen. Nach 30 bis 40 Tagen bildeten die Zellen eine konfluierende Schicht mit einer gitterartigen Struktur (Abb. 1). Obwohl sie konfluiert waren, proliferierten sie weiterhin und formten dichte lamelläre Zellpakete. Mehrmaliges Passagieren war durch die hohe Proliferationsrate und Migrationsaktivität möglich, dabei wurde das erneute Adhärenz innerhalb weniger Stunden erreicht.

Bis zur zehnten Passage fanden sich reine hoch-proliferative TAF in der Kultur. In den höheren Passagen wurde die Konfluenz der Zellen geringer und bei abnehmender Proliferationsaktivität lockerte sich die Stabilität der Zellstruktur.

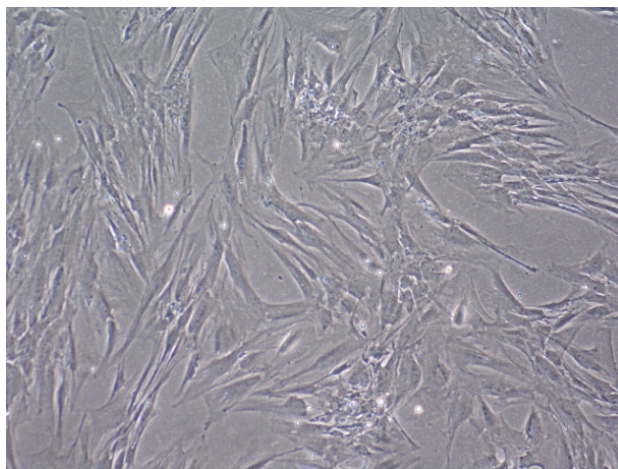


Abb. 1: Phasenkontrastmikroskopie isolierter kultivierter TAF der zweiten Passage mit typischer fibroblastischer Gestalt. (100-fache Vergrößerung)

4.2 Morphologische Analyse der TAF und LF in situ

Fibroblastische Zellpopulationen wurden nach ihrem immunhistochemischen Markerprofil klassifiziert. Dabei wurden die Populationen in histologischen Schnitten kolorektaler Lebermetastasen und in Schnitten von entfernt von der Metastase (mind. 3 cm) gelegenen Lebergewebe (n=20) untersucht. Innerhalb der kolorektalen

Metastasen waren die meisten Zellen der bindegewebigen Septen fibroblastischer Gestalt und färbten sich positiv gegen Vimentin, α -SMA und Thy-1 (Abb. 2 A-C). Überdies war das Metastasenbindegewebe eindeutig positiv für ICAM-1 (Abb. 2 D).

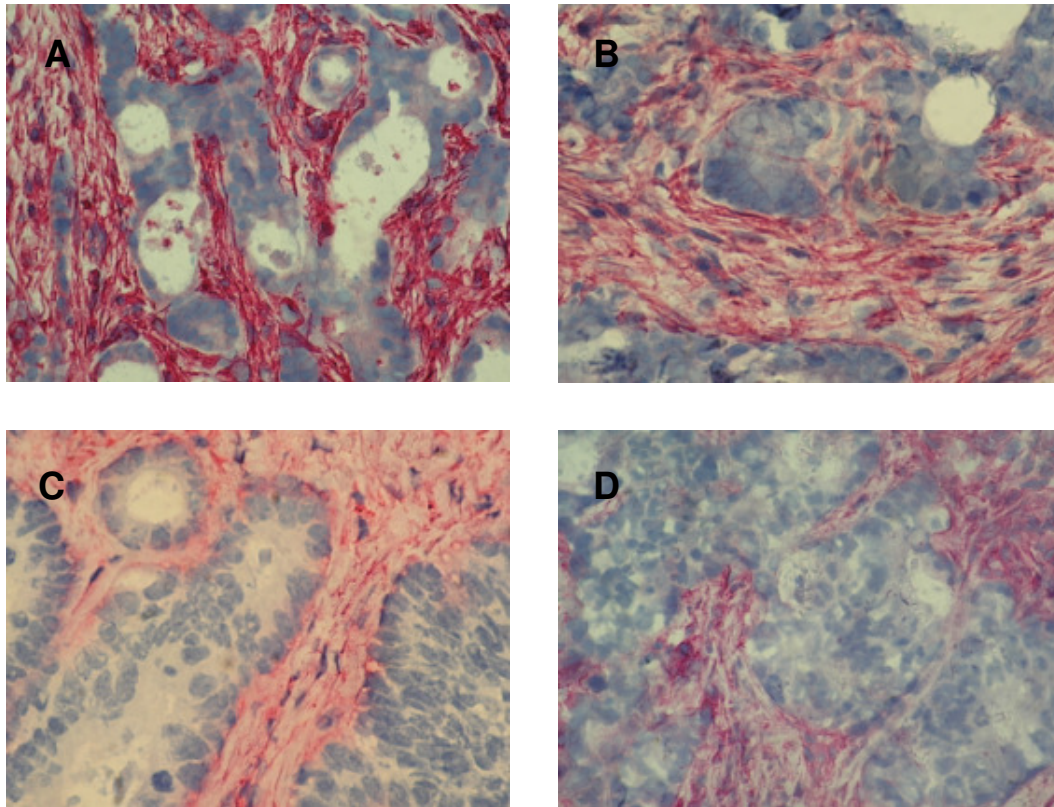


Abb. 2: Phänotyp der TAF in situ. Immunhistochemische Analysen von Vimentin (A), α -SMA (B), Thy-1(C) sowie ICAM-1 (D) an Gewebeschnitten von kolorektalen Lebermetastasen. (400-fache Vergrößerung)

In dem entfernt von der Metastase liegenden Lebergewebe färbte Vimentin perivaskuläre und peribiliäre, im Portalfeld sowie um die Zentralvene lokalisierte Zellen (Abb. 3 A). Zusätzlich waren hepatische Sternzellen, welche regelmäßig verteilt in dem perisinusoidalen Disse Raum lagen (3 A), positiv gefärbt für Vimentin aber negativ für α -SMA und Thy-1. α -SMA färbte nur in den Portalfeldern und in den Gefäßwänden Bindegewebszellen (Abb. 3 B). Thy-1 wurde von Fibroblasten innerhalb der Portalfelder der gesunden Leber und durch Subpopulationen von Gallengangszellen und periportal lokalisierten Hepatozyten exprimiert (Abb. 3 C).

Die Immunreaktivität für α -SMA und Thy-1 war damit auf das Portalfeld und die perizentrale Region (Abb. 3 B, C) beschränkt, während die ICAM-1-Immunreaktivität entlang der Sinusoide und dem Portalfeld breit verteilt war (Abb. 3 D).

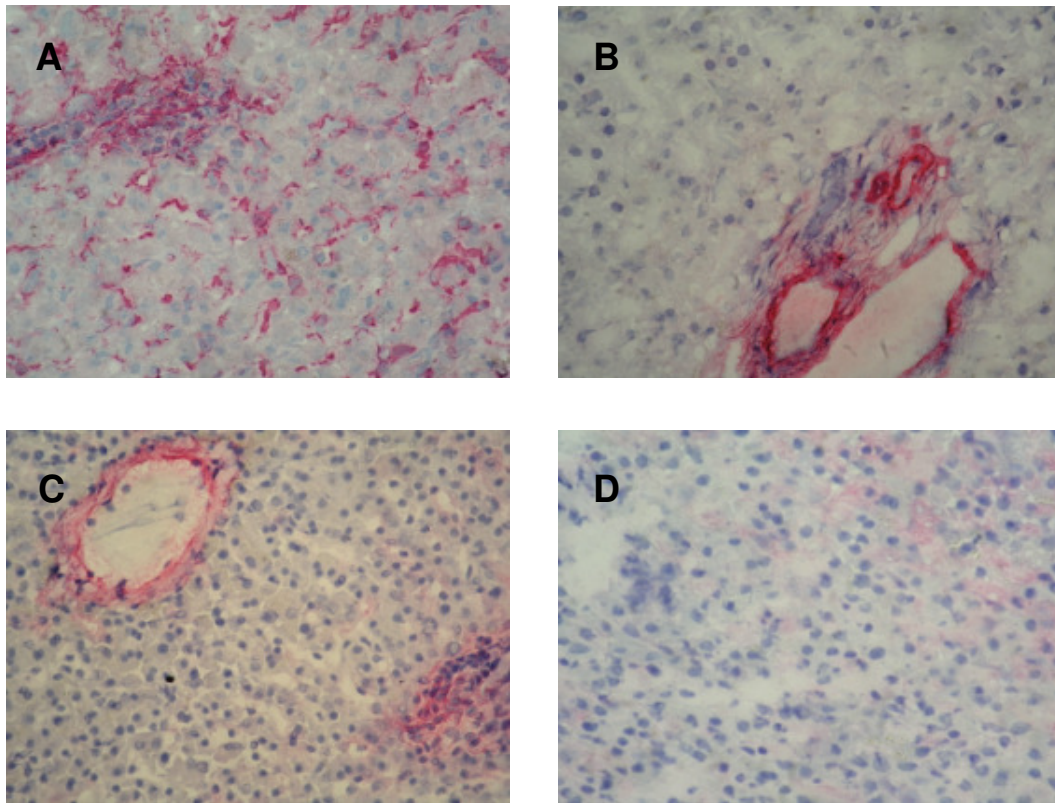


Abb. 3: Die Abbildung zeigt Lebergewebe gefärbt gegen Vimentin (A), α -SMA (B), Thy-1 (C) und ICAM-1 (D). (400-fache Vergrößerung)

Das Vorkommen der Zellen innerhalb des Metastasenstromas zeigte eine Differenzierung, wie sie auch in ortsständigen Fibroblasten in Portalgefäßen des Lebergewebes vorkommt. Fibroblasten konnten demnach durch eine Ko-Expression von Vimentin, Thy-1 und α -SMA identifiziert werden, während perisinusoidal lokalisierte HSC der normalen Leber zwar Vimentin positiv, jedoch negativ für α -SMA und Thy-1 zu sein schienen.

Mit den Färbungen aus dem Übergangsbereich zwischen Lebergewebe und Metastase konnte das Phänomen der Rekrutierung fibroblastischer Zellen durch den Lebertumor sichtbar gemacht werden (Abb. 4). Es zeigt sich eine Kumulation α -SMA, Thy-1 und Vimentin-positiver Zellen unmittelbar am Übergang vom Tumor zum

gesunden Lebergewebe neben der intensiven Anfärbung fibröser Septen innerhalb des Tumors.

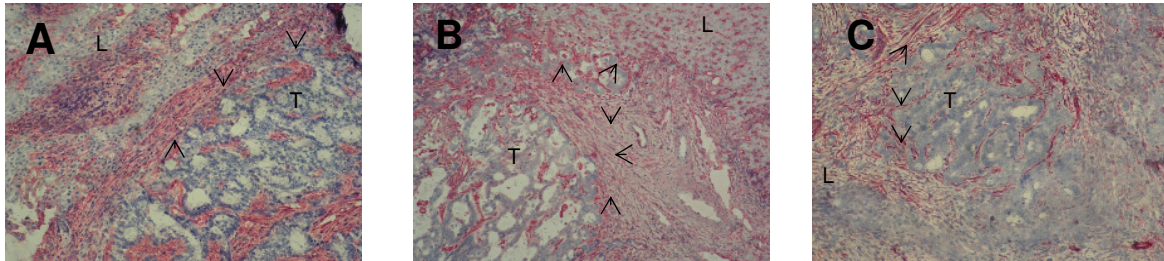


Abb. 4: Immunhistochemische Markierung von Thy-1 (A), Vimentin (B) und α -SMA (C) + TAF in der Grenzregion (Pfeile) zwischen Tumorgewebe (T) der kolorektalen Lebermetastase, angrenzendem Lebergewebe (L), und innerhalb der Septen der Metastase. (100-fache Vergrößerung)

Eindeutige Ergebnisse zeigte der Marker Thy-1. Das Gewebe der Schnitte zeigte eine klare starke Anfärbung im Bereich der Septen. Thy-1 positive Fibroblasten verteilten sich im ganzen Stroma und fanden sich verstärkt in der Grenzregion zwischen Tumor- und Lebergewebe (Abb. 5 B). Im gesunden Gewebe färbte sich vorwiegend das hepatische Portalfeld und dort vorwiegend die Gefäß- und Gallengangswandstrukturen an (Abb. 5 A).

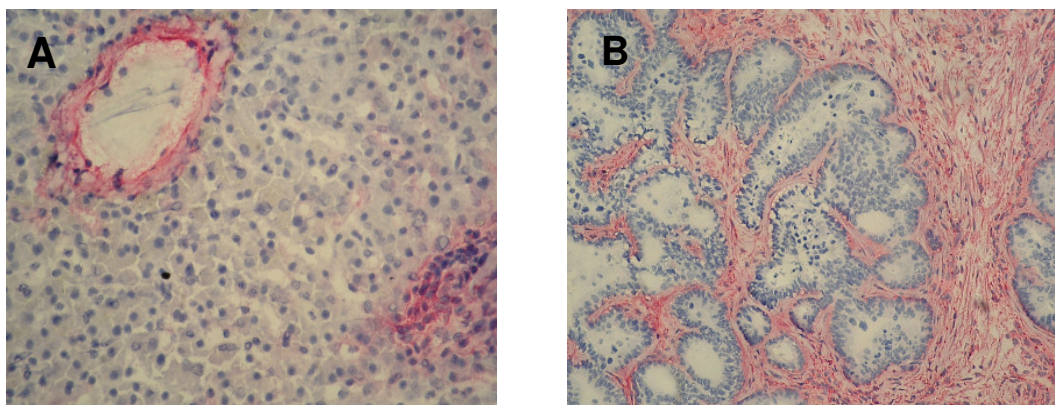


Abb. 5: Immunhistologische Färbung gegen Thy-1. Lebergewebe (A); kolorektale Lebermetastase (B). Der Thy-1 Antikörper färbt Fibroblasten und Myofibroblasten in portalen Gefäßen und perivaskulärem Raum in Lebergewebe. In dem Stroma der kolorektalen Lebermetastase zeigt sich eine Immunreaktivität für Thy-1. (400-fache Vergrößerung)

4.3 Histologische Charakterisierung der TAF und LF in vitro

Zur immunhistochemischen Charakterisierung wurden primäre TAF aus kolorektalen Lebermetastasen und LF aus entferntem Lebergewebe nach ihrem immunzytochemischen Markerprofil in vitro charakterisiert. Dabei wurde zunächst die Expression der fibroblastischen Oberflächenmarker Thy-1, das Intermediärfilament Vimentin, das Myofilament α -SMA, die Zelladhäsionsproteine ICAM-1 und *neural cell adhesion molecule* (NCAM) untersucht. Zusätzlich wurde Laminin sowie die Cytokeratine 7 und 19 gefärbt. 100% der primär kultivierten TAF und LF waren Vimentin-positiv, und über 95% waren Thy-1-positiv. Im Gegensatz dazu variierte die Expression von α -SMA in beiden Zelltypen mit einer Positivität zwischen 50 und 90%. TAF und LF präsentierten in mehr als 50% eine Immunreaktivität für ICAM-1 sowie eine geringe Expression an Cytokeratin (CK)-7. Laminin war sowohl in TAF als auch in LF positiv.

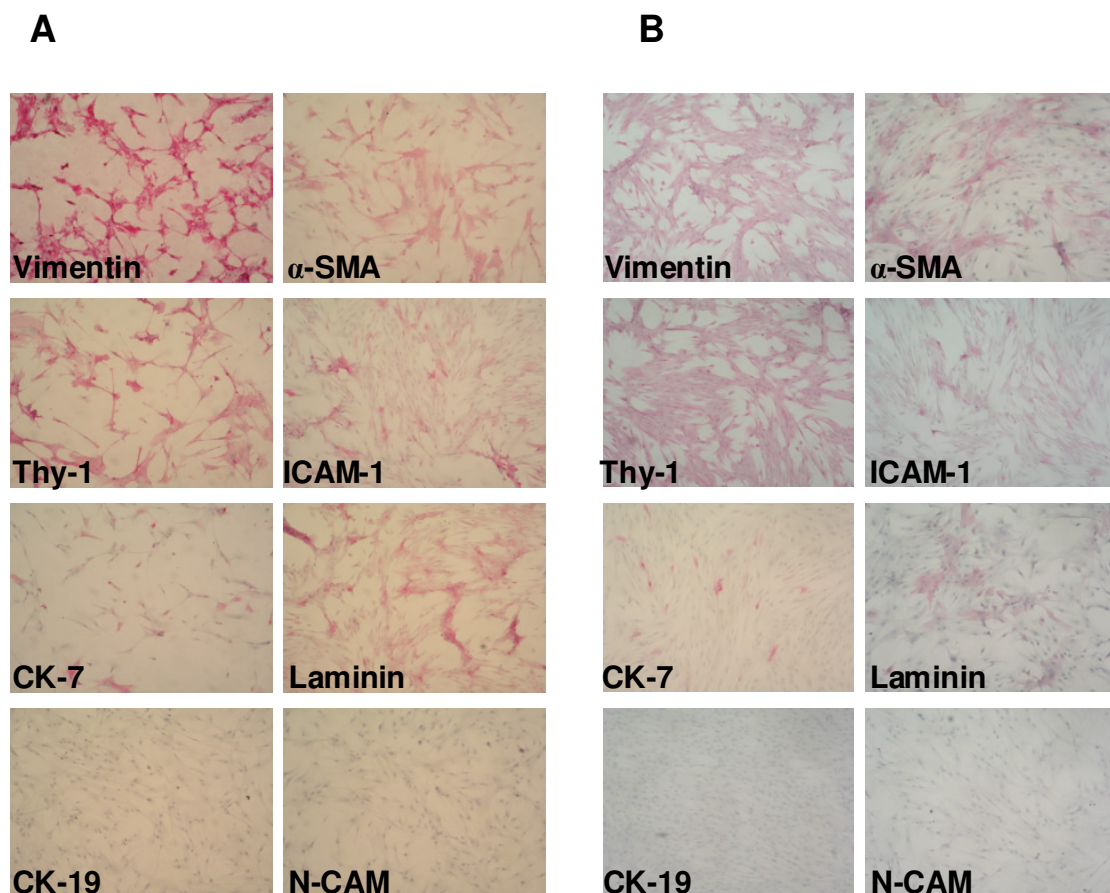


Abb. 6: Färbeserie von kultivierten TAF (A) und LF (B) in vitro. Es wird der myofibroblastische Phänotyp mit vergleichbarem Markerprofil der TAF und LF deutlich. (400-fache Vergrößerung)

Beide Zelltypen waren negativ für CK-19. Die Marker aktivierter hepatischer Sternzellen wie z.B. GFAP, NCAM und Desmin, ergaben ebenfalls in LF und TAF negative Färbeergebnisse (Cassiman u. Roskams 2002, Knittel² et al.1999) (Abb. 6). Zusammenfassend ergaben TAF aus kolorektalen Lebermetastasen und LF aus entferntem Lebergewebe in Hinblick auf Phänotyp und Markerexpression keinerlei Unterschiede (Tabelle).

	TAF	LF	Antikörper (Verdünnung; Klon; Hersteller)
Vimentin	+++	+++	1/50; V9; Dako, Glostrup, Denmark
Thy-1	+++	+++	1/25; 5E10; BD Biosciences, Bedford, MA, USA
α-SMA	++	++	1/50; 1A4; Dako
Desmin	-	-	1/50; D33; Dako
CD45	-	-	1/50; T29/33; Dako
ICAM-1	++	++	1/50; 6.5B5; Dako
NCAM	-	-	1/25; T199; Dako
GFAP	-	-	1/25; 6F2; Dako
Cytokeratin 7	+	+	1/50; OV-TL 12/30; Dako
Cytokeratin 19	-	-	1/100; RCK108; Dako
Laminin	+++	+++	1/25; 4C7; Dako

Tabellarische Darstellung der immunzytochemischen Profile von primären Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten (TAF) und Leberfibroblasten (LF) in vitro; den gleichen Phänotyp zeigend. (+++: 90-100% positive Zellen; ++: 50-90% positive Zellen; +: 5-50% positive Zellen; -: keine Expression nachgewiesen; eingeschätzte Verhältnisse der immunreaktiven Zellen.

Insgesamt zeigte sich in der Zellkultur eine positive Anfärbung bei Vimentin, Thy-1, α -SMA, ICAM-1 und Laminin. Eine schwache Anfärbung fand sich bei CK 7. Bei den Markern Desmin, CD45, NCAM, GFAP und CK 19 fand sich keine Anfärbung.

Mittels einer Doppel-Immunfluoreszenz gegen α -SMA und Vimentin konnte der Anteil der α -SMA positiven Zellen quantitativ ermittelt werden. Während alle TAF positiv für Vimentin waren, variierte der Anteil der α -SMA positiven Zellen zwischen 50 und 90% (Abb. 7).

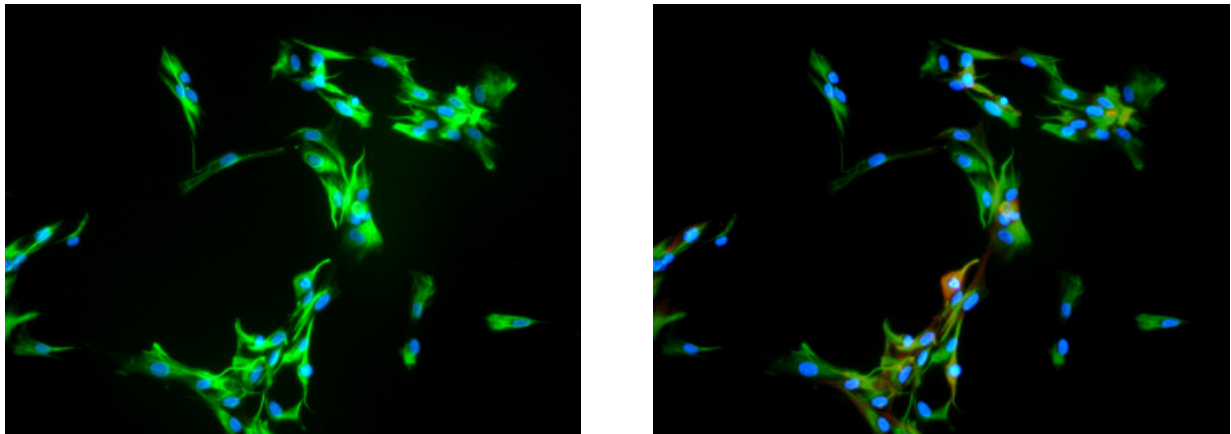


Abb. 7: Doppel-Immunfluoreszenz Färbung der TAF gegen α -SMA und Vimentin. Die Kerne sind mit DAPI blau angefärbt. (100-fache Vergrößerung)

Der Hauptteil der kultivierten TAF zeigte somit einen Vimentin+/ α -SMA+/Thy-1+-fibroblastischen Phänotyp. Dieses Expressionsprofil entspricht dem der TAF in situ. Somit kann gefolgert werden, dass der Hauptteil der kultivierten TAF repräsentativ für die fibroblastische Population des Tumorseptums in situ ist.

4.4 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die TAF α -SMA-Expression

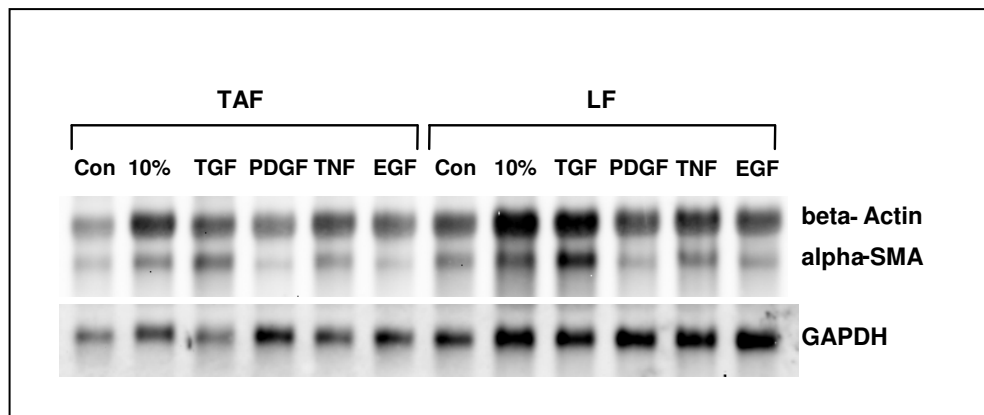
Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten sind sowohl zelluläres Target für Wachstumsfaktoren als auch Bildungsstätte für pro-angiogenetische Faktoren. Sie spielen hiermit wahrscheinlich neben Endothelzellen eine Schlüsselrolle für hepatische Invasion und Metastasierung beim kolorektalen Karzinom.

Um den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Eigenschaften der TAF zu ermitteln, wurden die etablierten Zelllinien mit ansteigenden Konzentrationen von TGF- β 1, PDGF, TNF- α und EGF inkubiert. Darauf folgend wurde aus den Zellen die mRNA isoliert und auf Northern Blot Basis untersucht. Dabei wurde die DIG markierte DNA-

Sonde α -SMA als Myofibroblastenmarker genutzt und die mRNA der stimulierten Zellen mit der mRNA unstimulierter Zellen verglichen. Wie sich aus den Abbildungen 8 A und B erkennen lässt, steigt durch Inkubation mit dem Wachstumsfaktor TGF- β 1 die Expression von α -SMA signifikant an. EGF und TNF- α führten zu keinem Expressionsanstieg. PDGF bewirkte eine signifikante Suppression der α -SMA Expression.

α -SMA

A



B

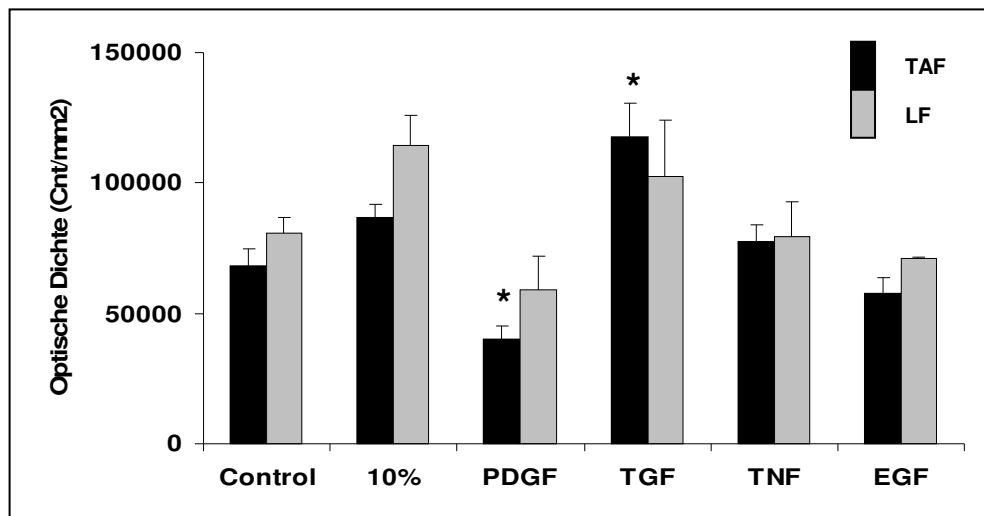


Abb. 8: (A): α -SMA mRNA-Expression unter Wachstumsfaktoreinfluss im Vergleich zur Kontrolle (CON=0,5% FCS) und zu 10% FCS. Bandendarstellung des Northern Blots, links TAF, rechts LF. Es zeigt sich eine verstärkte Bandenintensität bei 10% FCS, sowie durch TGF- β 1. Die unteren Banden zeigen die GAPDH mRNA-Expression zur Normalisierung nach Rehybridisierung. (B): Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Analyse der α -SMA mRNA-Expression durch TAF (schwarz) und LF (grau) unter Stimulation mit den Wachstumsfaktoren im Vergleich zur Kontrolle (CON, 0,5% FCS) und 10% FCS. (*: $p < 0,05$ vs. control; ANOVA-Test und Bonferroni-Adjustierung).

4.5 Expression von PAI-1

PAI-1-Expression im Gewebe

Der in der Arbeit untersuchte Serin-Proteinaseinhibitor PAI-1 wird von verschiedenen Leberzellpopulationen gebildet. Dieser nimmt eine wichtige Rolle bei extrazellulären Umbauvorgängen ein. PAI-1 gilt als Marker für Tumoraggressivität und kann als Hinweis für erhöhte Invasions- und Metastasierungsfähigkeiten gewertet werden, da das Vorkommen von Urokinase Plasminogen Aktivatoren und PAI-1 in malignen Tumoren erhöht ist (Gershtein u. Kushlinskii 2001).

Um das Expressionsmuster von PAI-1 festzustellen, wurde die Leber-mRNA mit Hilfe von DIG-markierten DNA-Sonden in Northern Blot Technik untersucht. Der Vergleich von PAI-1 mRNA-Expression zwischen Metastasengewebe, angrenzendem Lebergewebe und entfernt gelegenen normalen Lebergewebe zeigte in dem angrenzenden Lebergewebe das höchste PAI-1 mRNA-Expressionslevel. Jedoch ergab die statistische Analyse von 13 Gewebepreparationen der jeweiligen Patienten keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 9).

Tumor/angrenzendes/entferntes-Lebergewebe

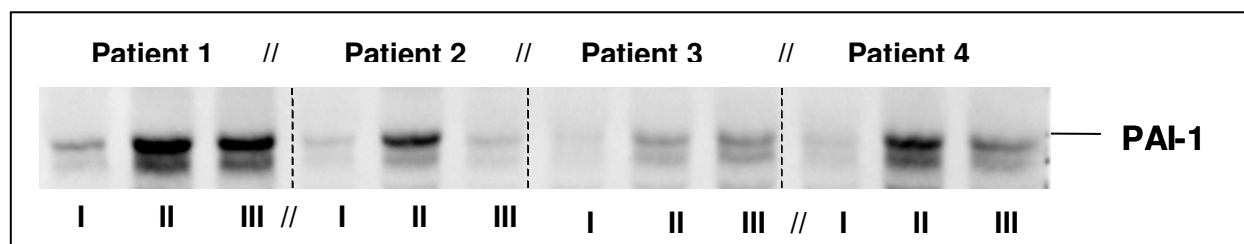


Abb. 9: Repräsentative Northern Blot Analysen von vier verschiedenen Patienten zeigen die PAI-1 mRNA-Expression des jeweiligen Tumorgewebes (I), angrenzendem Lebergewebe (II) und entferntem Lebergewebe (III).

PAI-1-Expression des Tumorgewebes im Vergleich zu der PAI-1-Expression der aus dem Tumor isolierten Zellen.

Beim Vergleich der PAI-1-Expression von kolorektalem Metastasengewebe und primär kultivierter konfluierender TAF in der Northern Blot Analyse, waren weitaus höhere PAI-1-Level in den kultivierten TAF vorhanden, wie in Abb. 10 zu erkennen. Das kann durch die verstärkte Konzentration PAI-1 exprimierender Zellen in Kultur bedingt sein, da Gesamttumorgewebe immer ein Mischgewebe aus unterschiedlichen Zellarten darstellt. Es kann damit gezeigt werden, dass es sich wahrscheinlich bei den TAF um die PAI-1 exprimierende Zellart in kolorektalen Lebermetastasen handelt.

Lebermetastasengewebe/TAF

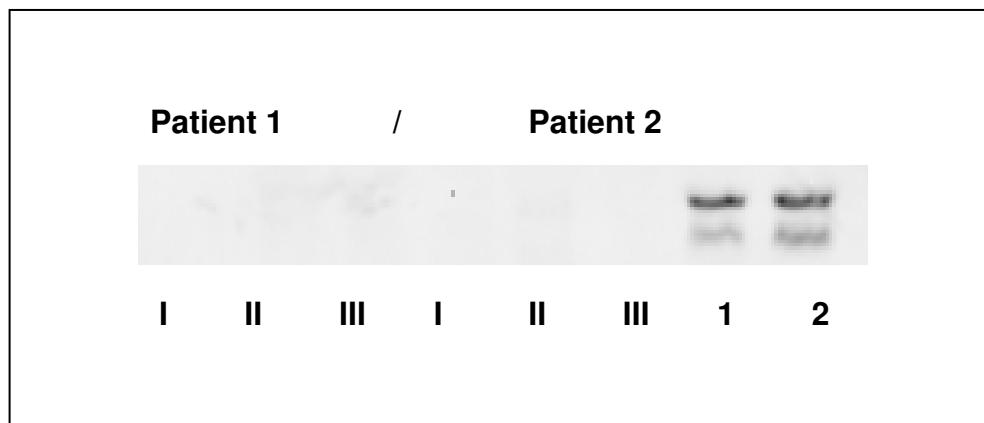


Abb. 10: Vergleich der PAI-1 mRNA Expression aus Leber-Tumorgewebe und aus primärkultivierten TAF; Tumorgewebe (I), angrenzendes Lebergewebe (II) und entferntes Lebergewebe (III (Pat.1) und (Pat. 2). (1) und (2) primärkultivierte TAF (3. Passage) aus demselben Tumor (Pat. 2).

PAI-1-Expressionslevel der TAF nach bzw. ohne Stimulation durch TGF- β 1

Durch Vergleich der mRNA-Expression der TAF ohne und nach Stimulation durch den Wachstumsfaktor TGF- β 1 ließ sich eine signifikante Expressionssteigerung nach Stimulation durch TGF- β 1 (5 ng/ml) feststellen (Abb. 10). Die PAI-1-Expression fiel zusammenfassend in nicht stimulierten Zellen deutlich geringer aus.

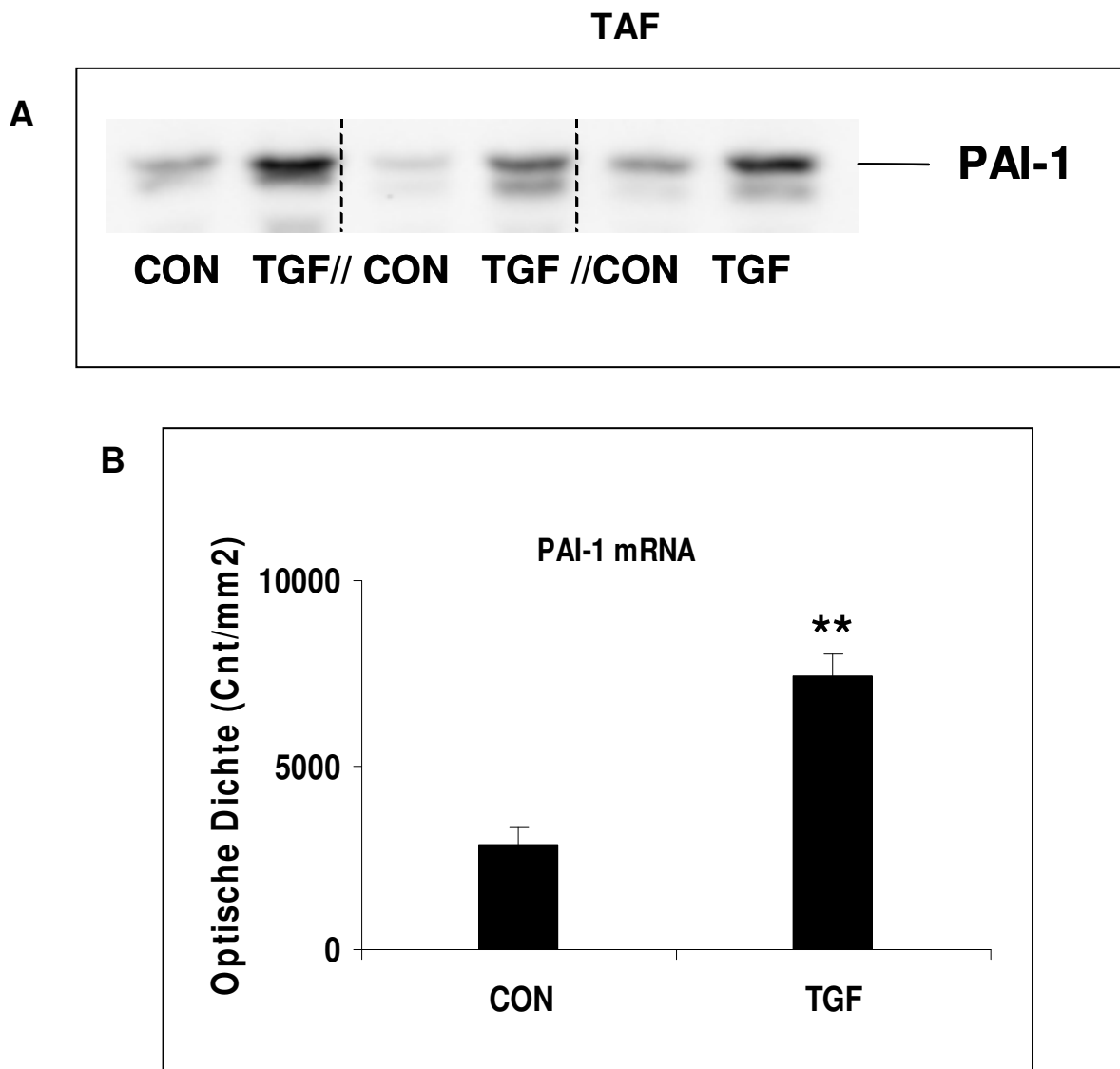


Abb. 11: (A): Repräsentative Northern Blot Analysen zeigen den Einfluss von TGF- β 1 auf die PAI-1 mRNA-Expression primärer TAF in drei unterschiedlichen Isolationen vs. TAF in 0,5% FCS (CON).

(B): Dieses Balkendiagramm zeigt die densitometrische Analyse der PAI-1 mRNA-Expression durch TAF unter Stimulation mit TGF- β 1 im Vergleich zur Kontrolle (0,5% FCS). Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SEM (**: $p < 0,01$; $N = 5$; ANOVA-Test und Bonferroni-Adjustierung).

4.6 Sekretion von PAI-1

Die ELISA-Expressionsanalyse von PAI-1 bei TAF aus kolorektalen Lebermetastasen und LF aus gesundem Lebergewebe zeigt, wie in Abb. 12 zu erkennen, bei den Fibroblasten aus gesundem Lebergewebe die stärkste Expression bei 79,26 ng/ml unter Zugabe von 10%-igem FCS zum Nährmedium im Gegensatz zu 0,5%-igem FCS Medium (Kontrolle, 14,497ng/ml). Auch bei den TAF aus der Metastase ist die Konzentration mit 93,77 ng/ml mit 10%-igem FCS höher als bei 0,5%-iger FCS-Zugabe (Kontrolle, 53,9 ng/ml). Auffällig ist außerdem die unterschiedliche Einflussnahme der Wachstumsfaktoren auf die Zellen. Die Fibroblasten aus dem gesunden Lebergewebe reagieren in ihrer Expressionsaktivität bei TGF- β 1-Zugabe zum Medium mit einer Expression von 43,445 ng/ml stärker als bei PDGF-Zusatz mit 39.006 ng/ml. Insgesamt ist der PAI-1-Produktionszuwachs geringer als bei TAF aus der Metastase, die bei TGF- β 1-Zugabe zum Medium 95,36 ng/ml und bei PDGF-Einfluss 95,04 ng/ml PAI-1 produzieren. Man kann also eine insgesamt stärkere Reaktion der Fibroblasten auf TGF- β 1 als auf PDGF feststellen und eine stärkere Reaktion der PAI-1-Produktion auf Wachstumsfaktoren bei TAF aus der Metastase als bei LF aus gesundem Gewebe.

PAI-1-Sekretion

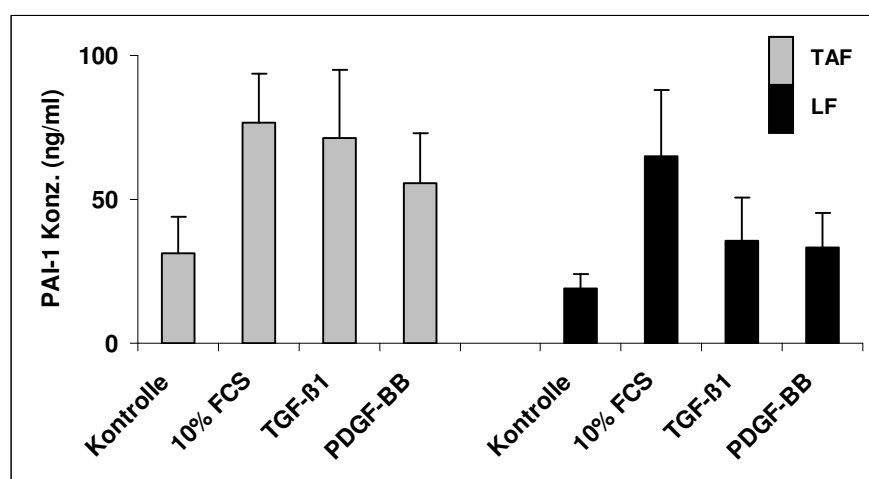


Abb. 12: Immunzytochemische Messung mittels ELISA Technik der PAI-1-Expression durch Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten der kolorektalen Lebermetastase (TAF; grau) und Leberfibroblasten aus entferntem Lebergewebe (LF; schwarz).

5. Diskussion

5.1 Funktionelle Morphologie der TAF im Vergleich zu residenten fibroblastischen Zellpopulationen der Leber

Invasion und Metastasierung sind die beiden entscheidenden Eigenschaften maligner Tumore. Jedes Größenwachstum solider Tumore setzt die Sauerstoffversorgung über einsprossende Neo-Gefäße und Kapillaren voraus, die selbst dem umliegenden gesunden Gewebe entstammen (Zetter 1998, Duffy 1996). Diesem als Neo-Angiogenese bezeichneten Prozess liegt eine komplexe Interaktion der beteiligten Zellen und Signalmechanismen zugrunde, die von großem wissenschaftlichem und klinischem Interesse ist. Die bisherige Erforschung der Neo-Angiogenese eröffnet neue pharmakologische Angriffspunkte in der Tumorthherapie, die im Rahmen klinischer Studien evaluiert werden und als sehr vielversprechend einzustufen sind (Li et al. 2002, Bajou¹ et al. 2001).

Fibroblastenartige Zellen sind an der Gewebsinvasion und Neo-Angiogenese von Tumoren in vielerlei Hinsicht involviert. Sie beeinflussen in erster Linie die Reorganisation der Gewebsarchitektur und die Produktion des Tumorstromas (Olaso et al. 2003, Gregoire u. Lieubeau 1995). Zum anderen haben sie über die Produktion von pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren einen großen Einfluss auf die Endothelzellrekrutierung und vaskuläre Infiltration von Tumorgewebe (Claffey et al. 2001). Zusätzlich bilden sie die strukturelle Basis für Neogefäße in Tumoren (Olaso et al. 2003). Überdies können von Fibroblasten gebildete Faktoren direkt das Wachstum von Tumorzellen beeinflussen (Neaud et al. 1997, Wang et al. 2002).

Im Falle von kolorektalen Lebermetastasen sind der zelluläre Ursprung und die funktionelle Rolle der Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten (TAF) bisher noch unklar. Daher wurden in dieser Arbeit TAF aus kolorektalen Lebermetastasen gewonnen und ihre Morphologie in situ und in vitro in Bezug auf ihre Funktionen als Produzent von pro-invasiven Proteinen und Mechanismen der Rekrutierung durch vom Tumor produzierte Wachstumsfaktoren untersucht.

Mit der in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analyse der Zellen in den bindegewebigen Septen der kolorektalen Metastase konnte durch eine Positivität gegen Vimentin, α -SMA und Thy-1 eine myofibroblastische Differenzierung der TAF

nachgewiesen und das Phänomen der Rekrutierung zwischen Lebertumor, gesundem Lebergewebe und den fibrösen Septen sichtbar gemacht werden (Abb. 4).

Die weiteren Untersuchungen zielten auf die Verifizierung des Ursprungs dieser Zellen ab. Bisher wurden drei unterschiedliche fibroblastenartige Zelltypen der Leber in Ratten und Menschen anhand der Lokalisation und des Markerprofils unterschieden (Cassiman et al. 2002, Guyot et al. 2006, Knittel² et al. 1999). Diese bestehen zum einen aus portalen oder septalen Myofibroblasten des Portalfeldes oder der neu entstandenen Septen, zum anderen aus Zwischenraumfibroblasten, gegenwärtig zwischen Parenchym und Stroma des Portalfeldes oder neu entstandenen fibrösen Septen und desweiteren aus perisinusoidalen hepatischen Sternzellen (HSC). Studien über den Ursprung der portalen und der Zwischenraumfibroblasten lassen einen gemeinsamen Ursprung in dem anfänglichen Mesenchym des embryonalen Septum Transversums vermuten. Welche Umstände dann zu den unterschiedlichen Phänotypen führen, bleibt zu erforschen (Ramadori u. Saile 2004, Roskams et al. 2004).

In früheren Studien wurde davon ausgegangen, dass TAF aus HSC transdifferenziert sind (Faouzi et al. 1999, Gulubova 2000, Lunevicius et al. 2001, Rosenbaum 1998). Für die vorliegende Arbeit waren die Untersuchungen von Markerspektrum sowie Passageverhalten nützliche Grundlagen zur Verifizierung des Ursprungs der TAF aus HSC. Leberfibroblasten konnten in dieser Arbeit durch eine Ko-Expression von Vimentin, Thy-1 und α -SMA identifiziert werden, während perisinusoidal lokalisierte HSC der normalen Leber zwar Vimentin positiv, jedoch negativ für α -SMA und Thy-1 waren. Das Markerspektrum der in vitro analysierten TAF und LF entsprach dabei genau den in den Metastasen vorhandenen TAF sowie portal lokalisierten LF. Dieses legt nahe, dass die kultivierten TAF und LF für die jeweiligen in situ beschriebenen Zelltypen repräsentativ sind.

Auch das Kulturverhalten zeigte deutliche Unterschiede zu dem der HSC der Leber, da HSC nach Stand der wissenschaftlichen Diskussion nicht über die zweite Passage hinaus kultivierbar sind (Knittel³ et al. 1999), wohingegen die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Zellen problemlos über die zehnte Passage hinaus kultiviert werden konnten. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend war auch die Forschungsgruppe Saile et al. 2002, die die Rolle der Myofibroblasten bei

Reparaturumbauvorgängen wie z.B. bei Leberschäden neu klassifizierten. Sie unterstützten die These, dass neben den aktivierten HSC in ähnlicher Weise auch aktivierte Myofibroblasten aus dem Portalfeld und dem perizentralen Bereich an den Reparaturvorgängen von Leberschäden beteiligt sind. Sie konnten feststellen, dass sich LF nahezu unbegrenzt subkultivieren lassen, bei den aktivierten HSC jedoch eine Spontanapoptose auftritt, die eine weitere Subkultivierung unmöglich macht (Saile et al. 2002).

Das Wissen über die biologische Aktivität von humanen TAF verglichen mit den jeweiligen ortsständigen Fibroblasten ist immer noch begrenzt. Aus den bisherigen Ergebnissen wurde deutlich, dass das Verhalten der TAF von kolorektalen Lebermetastasen dem der Fibroblasten des Lebergewebes gleicht. Tatsächlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die funktionellen Analogien der TAF und LF ein Ergebnis von künstlichen Bedingungen in Zellkultur sind und der Tatsache, dass Unterschiede zwischen beiden Zelltypen während der Kultivierung kontinuierlich abnehmen. Zurzeit existieren keine brauchbaren Daten über das Verhalten von TAF aus humanen kolorektalen Lebermetastasen im Vergleich zu portalen Leberfibroblasten. Bestehende Daten resultieren bisher aus Kokulturen oder heterotopen Tumormodellen fibroblastischer Zelllinien sowie primären Isolierungen auf einer einzelnen Tumorprobe basierend, sodass interindividuelle Heterogenität und Organspezifität nicht berücksichtigt wurden.

Auch das gleichsinnige Verhalten in der funktionellen Analyse der α -SMA-Expression nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren unterstützt die Theorie, dass TAF und LF identisch sind (Abb. 7).

Zusammenfassend ist dies der erste Beleg dafür, dass primäre TAF humaner kolorektaler Lebermetastasen phänotypische und funktionelle Charakteristika wie pro-invasive und pro-inflammatorische Verhaltensweisen mit portalen Leberfibroblasten teilen. Dieses Konzept könnte einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung neuer pharmakologischer Strategien haben.

Mehr als 95% der TAF sowie der Leberfibroblasten waren in situ und in vitro positiv für den Marker Thy-1, ein Glykophosphatidol-Inositol-gebundenes Zelloberflächen Glykoprotein, welches heterogen in fibroblastischen Zellisolierungen von unterschiedlichen Geweben gebildet wird. In der Literatur wird ihm die Bedeutung der Transdifferenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten nach TGF- β 1-Einfluss

zugeschrieben (Koumas et al. 2003, Barker et al. 2004). Das Gewebe der Schnitte zeigte eine klare starke Anfärbung im Bereich der Septen, im ganzen Stroma und verstärkt in der Grenzregion zwischen Tumor- und Lebergewebe. Im gesunden Gewebe färbten sich vorwiegend die Gefäß- und Gallengangswandstrukturen des hepatischen Portalfeldes an. Damit stellt Thy-1 einen weiteren potentiellen Zellmarker zur Charakterisierung der TAF dar. Thy-1 kann als möglicher Differenzierungsmarker zwischen HSC und portalen Fibroblasten angesehen werden. Letztlich ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass auch aktivierte/transdifferenzierte HSC Thy-1 exprimieren. Dieser Punkt würde umgesetzt auf die vorliegende Analyse bedeuten, dass letztlich doch nicht komplett ausgeschlossen werden kann, dass TAF aus HSC hervorgehen. Allerdings spricht das o. g. Kulturverhalten von HSC dagegen (Saile et al. 2002).

Um die Frage eines potentiellen Ursprungs der TAF aus HSC weiter zu klären und die isolierten Zellen zuzuordnen, wurden weitere immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Es konnte für TAF und LF ein jeweils identisches, negatives Färbespektrum für GFAP und N-CAM festgestellt werden. GFAP wird von „ruhenden“, nicht aktivierten HSC der Ratte exprimiert und N-CAM von aktivierten HSC (Cassiman u. Roskams 2002, Knittel² et al. 1999). Interessanterweise waren TAF und LF in vitro leicht positiv für CK-7. Um eine potentielle Verunreinigung durch epitheliale Tumorzellen auszuschließen, wurden weitere Cytokeratinfärbungen durchgeführt. Der CK-19-Antikörper (Abb. 6) sowie ein Panzytokeratin-Antikörper brachten dabei negative Resultate, sodass von einer Verunreinigung nicht ausgegangen werden kann. Außerdem war die CK-7 Positivität gleichsam in TAF und LF, wobei bei Letzteren keine Tumorzellen erwartet werden dürften. Eine CK-7 Expression wurde ferner in anderen Arbeiten beobachtet (Cassiman u. Roskams 2002).

Die Daten verdeutlichen, dass die phänotypischen Eigenschaften von TAF denen von ortsständigen portalen und perizentralen Leberfibroblasten ähneln und sich hinsichtlich der Markerexpression keinerlei Unterschiede ergeben. Es wurde bereits die Homogenität von LF und TAF mit der zwischen dermalen Fibroblasten und TAF in Bezug auf das Genexpressionprofil verglichen (Nakagawa et al. 2004). Die Übereinstimmungen zwischen TAF und LF waren dabei größer. Das unterstützt die

These, dass TAF hauptsächlich den ortsständigen LF entstammen. Der Anteil von nicht-ortsständigen Vorläuferzellen der TAF in soliden Organumoren wurde zu einer alternativen Möglichkeit, welche bisher beim Menschen nicht bestätigt werden konnte. Es gibt auch experimentelle Nachweise eines hämatopoetischen Ursprungs der Stromafibroblasten in soliden Tumoren, dieser scheint aber von untergeordneter Bedeutung zu sein. So überführte LaRue et al. grün fluoreszenz protein (EGFP)-positive hämatopoetische Stammzellen in unbestrahlte Mäuse, welchen dann Melanomzellen injiziert wurden. Der Hauptteil der Granulozyten, Makrophagen und B-Zellen waren (EGFP)-positiv, als Zeichen des kompletten hämatopoetischen Ersatzes durch die transplantierte klonierte Stammzellpopulation. Der mittlere Anteil an (EGFP)-positiven Fibroblasten von denen innerhalb des Tumorstromas lag bei 8,3% (LaRue et al. 2006). Somit konnte die Möglichkeit des Ursprungs aus hämatopoetischen Stammzellen gezeigt werden. Der Anteil an Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten war jedoch so gering, dass andere Ausgangszellen vorhanden gewesen sein müssen. Dies unterstützt die These des Ursprungs der TAF aus LF, die in dieser Arbeit formuliert wurde. Da mit der dargestellten Technik die gewünschten Leberfibroblasten isoliert worden sind, ergibt sich die Möglichkeit diese Zellen aus humanem Gewebe isoliert zu untersuchen.

5.2 TAF exprimieren den Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ-1

Inwiefern die untersuchten Fibroblasten an der PAI-1-Produktion beteiligt sind, wurde mittels der Northern Blot Technik und ELISA gezeigt. Im Northern Blot wurde Gewebe-RNA mit der RNA der isolierten TAF verglichen. Anhand der Ergebnisse ist erkennbar, dass die isolierten Zellen stark an der Produktion von PAI-1 beteiligt sind. Im Gegensatz zur RNA-Bandenintensität in Proben aus der Gewebe-RNA, war bei der Zell-RNA eine deutlich höhere Intensität festzustellen (Abb. 10). Das lässt den Schluss zu, dass die RNA der anderen Zellen, die bei der Gewebe-RNA mitisoliert wird, teilweise von Zellen stammt, die kein PAI-1 exprimieren und in der reinen Zell-RNA eine stärkere Bande zu verzeichnen ist, da hier alle Zellen PAI-1 produzieren. Die Isolation von m-RNA direkt aus dem Gewebe ergab die höchsten PAI-1-Werte in dem Grenzgebiet zwischen kolorektaler Lebermetastase und angrenzendem Lebergewebe (Abb. 9), wo auch in den Färbungen die meisten TAF dargestellt werden konnten (Abb. 4).

Die ELISA-Ergebnisse wiesen PAI-1 spezifische Transkripte in hohen Konzentrationen in TAF auf, wohingegen das gesunde Lebergewebe niedrigere Level zeigte (Abb. 12). Die Anstiege im metastatischen Gewebe waren nur leicht, was auf die gemischte Zellzusammensetzung zurückzuführen sein könnte. Die TAF produzieren demnach einen erheblichen Teil an PAI-1.

Mithilfe der kultivierten TAF wurde die potentielle Rolle dieser Zellen für die Invasion von Tumorzellen weiter untersucht, was speziell bei Lebermetastasen und Lebertumoren in dieser Form noch nicht geschehen ist. Hierbei interessierte die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Expression des matrix-degradierenden und regulierenden Enzyms Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ-1 (PAI-1).

Nach Stimulation durch die Wachstumsfaktoren PDGF, EGF, TNF- α und TGF- β 1 konnten die Zellen zur verstärkten PAI-1-Expression stimuliert werden, signifikant war dabei die Expressionsverstärkung durch den Wachstumsfaktor TGF- β 1.

Ähnliche Ergebnisse zeigte die Untersuchung durch das ELISA-Verfahren, bei dem die PAI-1-Expression auf Proteinebene untersucht werden konnte. Es wurden deutlich höhere PAI-1-Konzentrationen im Nährmedium der Zellen nach Stimulation als ohne Stimulation gemessen. Dabei bewirkte TGF- β 1 einen deutlich größeren Anstieg der PAI-1-Konzentration, wobei PDGF einen geringeren Einfluss zeigte (Ramont et al. 2003).

Da die PAI-1-Expression in nicht stimulierten Zellen deutlich geringer ausfiel, liegt die Überlegung nahe, dass diese Zellen auch im menschlichen Organismus im Wechselspiel des Tumorwachstums durch Wachstumsfaktoren stimulierbar sind (Wakahara et al. 2004). Ob diese Wachstumsfaktoren eventuell von den Tumorzellen selbst ausgeschüttet werden oder von anderen am Tumorwachstum beteiligten Zellen, wird derzeit in anderen Arbeiten untersucht und sollte der weiteren Forschung als Untersuchungsfeld dienen, um pharmakologische Ansätze zu entdecken (Hirashima et al. 2003, Liu et al. 2000).

Das Plasminogen Aktivator(PA)-System spielt eine Schlüsselrolle in der Tumorprogression, vermutlich mittels Steigerung extrazellulärer Matrixdegeneration und Tumorzellmigration. Folglich wurden urokinase-Typ Plasmin Antagonisten (u-PA) als Hemmer des Tumorwachstums und Angiogenese entdeckt. Paradoxerweise

stehen hohe Konzentrationen an Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ-1 (PAI-1) in Zusammenhang mit einer schlechten Überlebensprognose (Bajou¹ et al. 2001).

PAI-1 stellt als Plasminogen Aktivator Inhibitor einen wichtigen Regulator in Gewebeumbauprozessen dar. Es besteht eine Korrelation zwischen Metastasierung, Invasion sowie Migration und der Konzentration an PAI-1 (Gershtein u. Kushlinskii 2001, McMahon et al. 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass PAI-1 die Tumorangiogenese fördert, jedoch auf einem noch unbekannten Weg. Es wurde vermutet, dass PAI-1 die endotheliale Zellmigration mittels seiner bekannten Interaktion mit Vitronektin und Integrinen stärkt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass PAI-1 nicht auf diesem Weg die Angiogenese begünstigt, sondern durch Inhibition proteolytischer Aktivität. Dieses lässt vermuten, dass ungehinderte Plasminproteolyse die Anhäufung von Tumorgefäßen verhindert (Bajou² et al. 2001).

Durch seine Funktion als Antiprotease soll PAI-1 demnach zu Proangiogenese führen (Bajou² et al. 2001) und allgemein für einen aggressiveren Tumorprozess und damit auch für eine schlechtere Prognose stehen (Grebentchikov et al. 2005, McMahon et al. 2001, Pedersen et al. 1994). Weiter gibt es Ergebnisse, wonach Tumorzellen durch PAI-1 vor Apoptose geschützt werden können (Romer et al. 2005).

Die beobachtete signifikante Expression von PAI-1 durch TAF legt nahe, dass diese Zellen eine wichtige Rolle für die Migration, Matrixdegradation und somit Tumordinvasion und Angiogenese spielen. Ferner konnte TGF- β 1 erstmals als Stimulator für die PAI-1-mRNA und PAI-1-Proteinsynthese in diesen Zellen identifiziert werden. Möglicherweise liegt hier ein wichtiger, tumorfördernder Reaktionsweg vor, der von potentiell pharmakologischem Interesse ist. Es ist zu folgern, dass die Möglichkeit der Isolation und Kultivierung von humanen TAF und LF für weitergehende funktionelle Analysen eine nützliche Basis darstellt. Mit der vorliegenden Arbeit sind daher wichtige zugrundeliegende Techniken und Grundlagen zur Isolation und Charakterisierung der TAF aus humanen kolorektalen Lebermetastasen gelungen.

6. Zusammenfassung

Der genaue zelluläre Ursprung des Tumorstromas sowie dessen Funktion für die Tumorausbreitung bei kolorektalen Lebermetastasen sind bislang ungeklärt. Nach bisher vorherrschender Meinung werden Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten (TAF) in der Leber via Transdifferenzierung aus HSC rekrutiert. Im Gegensatz zu dieser Hypothese schränken neuere Arbeiten die universelle Rolle der HSC bei der Fibrogenese und damit auch bei der Bildung von Tumorstroma ein. Als Grundlage der Untersuchungen diente Lebergewebe von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen. Das Gewebe wurde histologisch, auf RNA- und Proteinebene untersucht. Für die Charakterisierung der TAF wurden diese aus dem Tumorgewebe und analog fibroblastenartige Zellen aus anhängendem gesundem Lebergewebe isoliert und kultiviert. Es wurden die phänotypischen und funktionellen Charakteristika von TAF der humanen kolorektalen Metastase untersucht. Eine Charakterisierung des Tumorstromas histologisch anhand eines Präparates sowie in vitro aus isolierten, humanen TAF aus Lebertumoren ist bislang in der Literatur nicht beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass sich Fibroblasten aus entfernt von der Metastase lokalisiertem Lebergewebe und aus tumor-assoziiertem Stroma in Kultur anzüchten lassen. Es wurde die Möglichkeit eröffnet, anhand von Marker-Färbungen den zellulären Ursprung des Tumorstromas bei Lebermetastasen zu erforschen. Dabei konnte durch die Übereinstimmung der immunhistochemischen Färbungen der Zellen in Kultur, der Zellen des Tumorgewebes (Kryoschnitt) sowie der Zellen des gesunden Leberstromas (Kryoschnitt) deutlich werden, dass es sich höchstwahrscheinlich um dieselben Zellen handelt, d.h. Leberfibroblasten (LF) vermutlich die Ursprungszellen des Tumorstromas sind. LF sind eine Untergruppe von (myo)fibroblastischen Zellen welche portal und perizentral im Lebergewebe lokalisiert sind und sich immunhistochemisch positiv für Vimentin, α -SMA und dem Zelloberflächen-glykoprotein Thy-1 anfärben. TAF und LF exprimierten den myofibroblastischen Faktor α -SMA, wichtige pro-invasive und pro-angiogenetische Faktoren, wie PAI-1 in vitro und waren dabei durch den Wachstumsfaktor TGF β -1 stimulierbar. Diese Ergebnisse lassen die Stroma/Tumor Interaktionen als offenes und aussichtsreiches Untersuchungsfeld erkennen. Hieraus ergeben sich möglicherweise pharmakologische Angriffspunkte in der Antitumorthherapie gegen die Metastasierung kolorektaler Tumore.

7. Literaturverzeichnis

Andreasen PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN (1990) Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Mol. Cell Endocrinol.* 68:1-19

Bajou¹ K, Devy L, Masson V, Albert V, Franken F, Noel A, Foidart JM (2001) Role of plasminogen activator inhibitor type 1 in tumor angiogenesis. *Therapie* 56:465-472

Bajou² K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A (2001) The Plasminogen Activator Inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol* 152:777-784

Barker TH, Grenett HE, MacEwen MW, MacEwen MW, Tilden SG, Fuller GM, Settlemen J, Woods A, Murphy-Ullrich J, Hagood JS (2004) Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity. *Exp Cell Res* 295:4884-96

Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *Journal of clinical investigation* 115(2):209-218

Behrendt N, Ronne E, Dano K (1995) The structure and function of the urokinase receptor—a membrane protein governing plasminogen activation on the cell surface. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376:269–279

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 43:332-337

Blasi F (1993) Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays* 15:105–111

Blasi F, Verde P (1990) Urokinase-dependent cell surface proteolysis and cancer. *Semin Cancer Biol* 1:117–126

Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T (2002) Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol.* 36:200–209

Cassiman D, Roskams T (2002) Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol.* 37:527-535

Chen YQ, Sloan-Lancaster J, Berg DT, Richardson MA, Grinnel B, Tseng-Crank J (2001) Differential mechanisms of plasminogen activator inhibitor-1 gene activation by transforming growth factor-beta and tumor nekrosis factor-alpha in endothelial cells. *Thromb Haemost* 86(6):1563-72

Chi-Li Chung MD MS FCCP, Chi-Hung Chen MD, Joen-Rong Sheu PhD, Yi-Chu Chen BS, Shi-Chuan Chang MD PhD FCCP (2005) Proinflammatory Cytokines, Transforming Growth Factor- β 1, and Fibrinolytic Enzymes in Loculated and Free-Flowing Pleural Exsudates. *Chest* 128:690-697

Claffey KP, Abrams K, Shih SC, Brown LF, Mullen A, Keough M (2001) Fibroblasts Growth Factor 2 Activation of Stromal Cell Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Angiogenesis. *Lab Invest* 81: 61-75

Costa ML, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS (2004) Desmin: molecular intersctions and puative functions of the muscle intermediate filament protein. *Brazilian journal of medical and biological research* 37(12): 1819-1830

Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L (1985) Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44:139-266

Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G (2004) The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 48:509-517

Direkze N, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulsom R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA (2004) Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *American Association for Cancer Research* 64:8492-8495

Duffy MJ (1996) The biochemistry of metastasis. *Adv Clin Chem* 32:135-166

Estreicher A, Muhlhauser J, Carpentier JL, Orci L, Vassalli JD (1990) The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J Cell Biol* 111:783–792

Faouzi S, Lepreux S, Bedin C, Dubuisson L, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmouliere A, Rosenbaum J (1999) Activation of cultured rat hepatic stellate cells by tumoral hepatocytes. *Laboratory investigation a journal of technical methods and pathology* 79(4): 485-93

Fidler IJ (2000) *Cancer Res.* 60:1552–556

Fidler IJ (2002) The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 70: 498–505

Fernandez E, Bosetti C, La-Vecchia C, Levi F, Fioretti F, Neri E (2000) Sex differences in colorectal cancer mortality in Europe, 1955-1996. *European Journal of Cancer Prevention* 9(2): 99-104

Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR (2004) A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 126(4):955-963

Friedmann SL (1993) The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 328:1828-835

Fujiita M, Hayashi I, Yamashina S, Fukamizu A, Itoman M, Majima M (2005) Angiotensin type 1a receptor signaling-depent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis* 26(2): 271-9

Gershtein ES , Kushlinskii NE (2001) Urokinase and Tissue Plasminogen Activators and Their Inhibitor PAI-1 in Human Tumors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 131: 67-72

Grebenchtchikov N, Maguire TM, Riisbro R, Geurts-Moespot A, O'Donovan N, Schmitt M, McGreal G, McDermott E, O'Higgins N, Brunner N, Sweep CGJ, Duffy MJ (2005) *Oncology Reports* 14(1):235-239

Gregoire M, Lieubeau B (1995) The role of fibroblasts in tumor behaviour. *Cancer Metast Rev* 14:339-350

Gressner AM (1996) Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney-Int-Suppl.* 54: 39-45

Gulubova MV (2000) Ito cell morphology, alpha-smooth muscle actin and collagen type IV expression in the liver of patients with gastric and colorectal tumors. *Histochem J* 32:151-164

Gulubova MV (2004) Collagen type IV, laminin, alpha-smooth muscle actin (alphaSMA), alpha1 and alpha6 integrins expression in the liver with metastases from malignant gastrointestinal tumours. *Clin Exp Metastasis* 21 6:485-494

Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouliere A (2006) Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Bioch & Cell Biol.* 38:135–151

Hinz B (2006) Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *European journal of cell biology* 85(3-4):175-81

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G (2007) The myofibroblast: one function, multiple origins. *American journal of pathology* 170(6):1807-16

Hirashima Y, Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, Kanayama N, Terao T (2003) Transforming growth factor-beta1 produced by ovarian cancer cell line HRA stimulates attachment and invasion through an up-regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human peritoneal mesothelial cells. *J. Biol. Chem.* 278(29):26793-26802

Hudon-David F, Bouzeghrane F, Couture P, Thibault G (2007) Thy-1 expression by cardiac fibroblasts: lack association with myofibroblast contractile markers. *Journal of molecular and cellular cardiology* 42(5):991-1000

Ikegami T, Zhang Y, Matsuzaki Y (2007) Liver fibrosis: Possible Involvement of EMT. *Cells Tissues Organs* 185(1-3): 213-21

Ishikawa S, Takenaka K, Yanagihara K, Miyahara R, Kawano Y, Otake Y, Hasegawa S, Wada H, Tanaka F (2004) Matrix metalloproteinase-2 status in stromal fibroblasts, not in tumor cells, is a significant prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Clinical-Cancer-Res.* 10(19): 6579- 85

Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE (2007) Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Experimental cell research* 313(10): 2050-62

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ (2004) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 54:8-29

Johnson SJ, Burr AW, Toole K, Dack CL, Mathew J, Burt AD (1998) Macrophage and hepatic stellate cell responses during experimental hepatocarcinogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 13(2): 145-151

Kharbanda KK, Rogers DD, Wyatt TA, Sorrell MF, Tuma DJ (2004) Transforming growth factor-beta induces contraction of activated hepatic stellate cells. *Journal of hepatology* 41(1):60-66

Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA (2006) Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *Journal of hepatology* 45(3): 429-438

Knittel¹ T, Dinter C, Kobold D, Neubauer K, Mehde M, Eichhorst S, Ramadori G (1999) Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *American journal of pathology* 154(1): 153-67

Knittel² T, Kobold D, Saile B (1999) Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 117:1205-221

Knittel³ T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G (1999) Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseases rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol.* 112:387–401

Kohne-Wompner CH, Schoffski P, Schmoll HJ (1994) Adjuvant therapy for colon adenocarcinoma: Current status of clinical investigation. *Annals of Oncology* 5(3): 97-104

Koumas L, Smith TJ, Feldon S, Blumberg N, Phipps RP (2003) Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. *American Journal of Pathology* 163(4): 1291-1300

Kruithof EK (1988) Plasminogen activator inhibitors – a review. *Enzyme* 40:113-121

Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, Nishida T (2003) Expression of functional ICAM-1 on cultured human keratocytes induced by tumor necrosis factor-alpha. Japanese Journal of Ophtalmology 47(2):134-141

LaRue A, Masuya M, Ebihara Y (2006) Hematopoietic origins of fibroblasts: I. in vivo studies of fibroblasts associated with solid tumors. Exp Hematol 34:208-218

Li Y, Wang MN, Li H, King KD, Bassi R, Sun H, Santiago A, Hooper AT, Bohlen P, Hicklin DJ (2002) Active Immunization Against the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor flk1 Inhibits Tumor Angiogenesis and Metastasis. The Rockefeller University Press 195:1575-584

Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ (1991) 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. J Cell Biol 113:437-449

Liu C, Yao J, Mercola D, Adamson E (2000) The transkription factor EGR-1 directly transactivates the fibrinonektin gene and enhances attachment of human glioblastoma cell line U251. J. Biol. Chem. 275(27):20315-23

Liu CF, Chen ZW, Chen ZH, Zhang T, Lu Y (2006) Multiple tumor types may originate from bone marrow-derived cells. Neoplasia 8(9): 716-U19

Lunevicius R, Nakanishi H, Ito S, Kozaki KI, Kato T, Tatematsu M, Yasui K (2001) Clinicopathological significance of fibrotic capsule formation around liver metastasis from colorectal cancer. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 127(3): 193-199

Marincovich MP (2007) Tumor microenviement: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. Nature Reviews Cancer 7 (5): 370-80

Maubach G, Lim MC, Zhang CY, Zhung L (2006) GFAP promoter directs lacZ expression specifically in a rat hepatic stellate cell line. World journal of gastroenterology WJG 12(5): 723-30

McMahon GA, Petitclerc E, Stefansson S, Smith E, Wong MKK, Wetsrick J, Ginsburg D, Brooks PC, Lawrence DA (2001) Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates Tumor Growth and Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 276 No. 36:33964-968

Mercurio AM, Rabinovitz I (2001) Towards a mechanistic understanding of tumor invasion—lessons from the $\alpha 6 \beta 4$ integrin. *Seminars in cancer biology* 11(2): 129-41

Mercurio AM, Rabinovitz I, Shaw LM (2001) The $\alpha 6 \beta 4$ integrin and epithelial cell migration. *Current opinion in cell biology* 13(5): 541-5

Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV (2004) Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 23:7366-377

Neaud V, Fauzi S, Guirouilh J, et al. (1997) Human Hepatic Stellate Cells in Experimental Melanoma metastasis. *Hepatology* 26 :1458-466

Nordt TK, Eschenfelder E, Peter K, Sobel BE, Bode C (2003) Independence of growth factor induced plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) expression from the 4G/5G polymorphism of the PAI-1 gene. *Thromb Haemost* 90(1):36-42

Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM (2004) Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 53(3): 438-45

Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, SanchoBru P, Friedman SL, Vidal-Vanaclocha F (2003) Proangiogenic Role of Tumor-Activated Hepatic Stellate Cells in Experimental Melanoma metastasis. *Hepatology* 37:674-685

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 121(3): 335-48

Orimo A, Weinberg RA (2006) Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell-Cycle* 5(15):1597-601

Pandey M, Loskutoff DJ, Samad F (2005) Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipocytes. *The FASEB Journal* 19(19):1317-9

Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I (2002) Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Seminars in cancer biology* 12(3): 197-207

Pedersen H, Br  nner N, Francis D,   sterlind K, R  nne E, Hansen HH, Dan   K, Gr  ndahl-Hansen J (1994) Prognostic Impact of Urokinase, Urokinase Receptor, and Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor in Squamous and Large Cell Lung Cancer Tissue. *Cancer Research* 54:4671-675

Pei Y, Sherry DM, McDermott AM (2004) Thy-1 distinguishes human corneal fibroblasts and myofibroblasts from keratocytes. *Experimental eye research* 79(5): 705-12

Peterhaensel C, Obermaier I, Rueger B (1998) Nonradioactive Northern blot analysis of plant RNA and the application of different haptens for reprbing. *Anal. Biochem* 264:279-283

Ramadori G, Saile B (2004) Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest*. 84:153–159

Ramont L, Pasco S, Hornebeck W, Maquart FX, Monboisse JC (2003) Transforming growth factor-beta 1 inhibits tumor growth in a mouse melanoma model by down-regulating the plasminogen activation system. *Experimental cell research* 291(1):1-10

Rockey DC (2001) Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 21:337-349

Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt N, Lund LR, Dano K, Appella E, Blasi F (1990) Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis *EMBO J* 9:467–474

Romer MU, Due AK, Larsen JK, Hofland KF, Christensen IJ, Buhl-Jensen P, Almholt K, Nielsen OL, Brunner N, Lademann U (2005) Indication of a role of plasminogen activator inhibitor type I in protecting murine fibrosarcoma cells against apoptosis. *Thrombosis and haemostasis* 94(4): 859-866

Rosenbaum J (1998) Liver myofibroblasts: Physiology, role in liver fibrosis and liver cancer, and pharmacological modulation. *Pharmaceutical Biology* 36: 69-74

Roskams T, Cassiman D, de Vos R, Libbrecht L (2004) Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 280A:910–923

Rougier P, Mitry E (2003) Epidemiology, treatment and chemoprevention in colorectal cancer. *Annals of Oncology* 14: ii3-ii5

Rudmik LR, Magliocco AM (2005) Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 92:347-359

Saile B, Matthes N, Neubauer K, Eisenbach C, El-Armouche H, Dudas J, Ramadori G (2002) Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells differ in CD95-mediated apoptosis and response to TNF- α *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, Issue 2:435-444

Sancho-Bru P, Bataller R, Gasull X, Colmenero J, Khurdayan V, Gual A, Nicolas JM, Arrojo V, Gines P (2005) Genomic and functional characterization of stellate cells isolated from human cirrhotic livers. *J-hepatol.* 43(2): 272-82

Sanders YY, Kumbha P, Hagood JS (2007) Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in Thy-1(-) lung fibroblasts. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36(2): 226-35

Saksela O, Rifkin DB (1988) Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* 4:93–126

Schwable J, Wittrock J, Schweizer P, Girgert R (1998) Detection of rare target genes on northern blots with cDNA probes labeled by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with simultaneous digoxigenin incorporation. *Anal. Biochem* 262:77-79

Shigeki TA, Parsons CJ, Rippe RA (2006) Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica chimica acta* 364 (1-2):33-60

Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K (2002) Differential Regulation of TGF- β Signal in Hepatic Stellate Cells Between Acute and Chronic Rat Liver Injury. *Hepatology* 35:49-61

Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M (2007) Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 13(7): 2082-90

Uchio K, Tuchweber B, Manabe N, Gabbiani G, Rosenbaum J, Desmoulière A (2002) Cellular Retinol-Binding Protein-1 Expression and Modulation during In Vivo and In Vitro Myofibroblastic Differentiation of Rat Hepatic Stellate Cells and Portal Fibroblasts. *Lab Invest* 82:619-628

Wakahara K, Kobayashi H, Yagyu T, Matsuzaki H, Kondo T, Kurita N, Sekino H, Inagaki K, Suzuki M, Kanayama N, Terao T (2004) *Journal of cellular biochemistry* 93 (3): 437-453

Wang TN, Albo D, Tuszynski GP (2002) Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery* 132:220-225

Welch, Steeg, Rinker-Schaefer (2000) *Breast Cancer Res* 2:408-416

Yamaguchi K, Zhang D, Byrn RA (1994) A modified nonradioactive method for northern blot analysis. *Anal. Biochem* 218:343-346

Zetter B (1998) Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 49:407-414

8. Bezugsquellenverzeichnis

8.1 Chemikalien und Reagenzien

Baxter GmbH (S.A., B-7860 Lessines): Aqua ad injectabilita.

BD Biosciences (Bedford, MA, USA): Thy-1 (1/25, clone 5E10)

Biesterfeld Chemiedistribution GmbH (Hamburg, Deutschland): Aceton

DAKO (Glostrup, Dänemark): α -SMA (1/50, clone 1A4), Vimentin (1/50, clone V9), Desmin (1/50, clone D33), CD45 (1/50, clone T29/33), cytokeratin 7 (1/50, clone OV-TL 12/30), cytokeratin 19 (1/100, clone RCK108), neural cell adhesion molecule (NCAM; 1/25, clone T199), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1; 1/50, clone 6.5B5) Laminin (1/25, clone 4C7) glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1/25, clone 6F2) DAKO® Biotin Blocking System, Cytomation EnVision®+System-HRP

Dulbecco: Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)

Invitrogen (Grand Island, N.Y., USA): Agarose, Medium 199, fetales Kälber Serum (FCS), antibiotisch-antimykotische Lösung: Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B, (Ethylendiaminotetraacetat) EDTA, Sodium salt citrat (SSC) 20x, Trypsin, Trypanblau (CatNo: 15250-061), PBS (14190)

Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC. Rhodamine Red™-X-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)

Merck (Darmstadt, Marienfeld Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland): Aquatex, Ethanol 70%, Ethidiumbromid

Pierce (Rockford, USA): Diaminobenzidin (DAB substrate kit 10x)

Qiagen (Hilden, Deutschland): RNeasy Midi Kit

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland): 1st strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), PCR DIG Probe Synthesis Kit, PCR Nukleotide Mix, Taq DNA-Polymerase und dazugehörige Reaktionspuffer, Hybridisierungspuffer DIG Easy Hyb, DIG Wasch- und Blockierungspuffer Set, Anti digoxigenin AP conjugate, Fab-Fragmente, CDP-Star™ ready to use, humaner PDGF-BB (10ng/ml), humaner TGF- β 1 (5ng/ml)

Sakura Finetek (Zoeterwoude, NL): Tissue Tek®

Sigma (Steinheim, Deutschland): GBSS G-9779, β -Mercaptoethanol, Bromophenolblau, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Formaldehyd, Meyers Hematoxylin Solution (HHS16), humaner TNF- α (50 ng/ml), humaner EGF(10 ng/ml), Tris-EDTA-Puffer, RNase-freies Wasser, Kollagenase Type IV

Serotec (Oxford, UK): IL-8 (1/50, clone B-K8)

Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA): Normal Goat Serum, Vectastain® ABC-AP Kit

8.2 Primer

Die folgenden Sets von Primern wurden benutzt:

α -SMA:

Sequenz Forward Primer: 643-CTG AGC GTG GCT ATT CCT TC,

Sequenz Reverse Primer: 1113-GCT GGA AGG TGG ACA GAG AG.

PAI-1:

Sequenz Forward Primer: 5'-GAC ATC CTG GAA CTG CCC TA-3'

Sequenz Reverse Primer: 5'-TGA CAG CTG TGG ATG AGG AG-3'.

Die Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) gekauft.

8.3 Lösungen und Puffer

1% Agarosegel	2 g Agarose + 176 ml H ₂ O + 20 ml Formaldehyd + 24 ml 10fach RB + 5 μ l Ethidiumbromid.
2% Agarosegel	5 g Agarose + 250 ml 1fach TBE- Puffer + 10 μ l Ethidiumbromid.
10fach RNA Running Buffer (RB)	200 mM MOPS + 50 mM Natriumacetat + 10 mM EDTA + Aqua dest.

20fach SSC	3 M NaCl + 0,3 M Trinatriumcitrat + Aqua dest.
2fach Waschpuffer	0,25 g SDS + 25 ml 20fach SSC + Aqua dest.
0,5fach Waschpuffer	0,25 g SDS + 6,25 ml 20fach SSC + Aqua dest.

9. Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
CD45	Leukozyten common antigen
cDNA	komplementäre DNA
CK	Cytokeratin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DIG	Digoxigenin
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetales Kälberserum
GBSS	Gays Balanced Salt Solution
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSC	hepatische Sternzellen
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule-1
IF	Intermediärfilament
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KLM	kolorektale Lebermetastase
LF	Leberfibroblasten
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl

NCAM	neuronal cell adhaesions molecule
nm	Nanometer
NTP	Nucleosidtriphosphat
P	portale Gefäße
PA	Plasmin-Aktivatoren
PAI-1	plasminogen-activator-inhibitor-typ-1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Plateled-derived growthfactor
RB	Running Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsen	Ribunukleinsäure abbauende Enzyme
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
SEM	Standartabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SSC	Sodium salt citrate
TAF	Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten
Thy-1	thymus cell antigen
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF- α	tumor necrosis factor- α
t-PA	tissue-plasminogen activator
u-PA	urokinase-plasminogen activator
u-PAR	urokinase-plasminogen activator receptor

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phasenkontrastmikroskopie isolierter kultivierter TAF der zweiten Passage mit typischer fibroblastischer Gestalt (100-fache Vergrößerung).....	22
Abb. 2: Phänotyp der TAF in situ. Immunhistochemische Analysen von Vimentin (A), α -SMA (B), Thy-1(C) sowie ICAM-1 (D) an Gewebeschnitten von kolorektalen Lebermetastasen. (400-fache Vergrößerung).....	23
Abb. 3: Die Abbildung zeigt Lebergewebe gefärbt gegen Vimentin (A), α -SMA (B), Thy-1 (C) und ICAM-1 (D). (400-fache Vergrößerung).....	24
Abb. 4: Immunhistochemische Markierung von Thy-1 (A), Vimentin (B) und α -SMA (C) + TAF in der Grenzregion (Pfeile) zwischen Tumorgewebe (T) der kolorektalen Lebermetastase, angrenzendem Lebergewebe (L), und innerhalb der Septen der Metastase. (100-fache Vergrößerung).....	25
Abb. 5: Immunhistologische Färbung gegen Thy-1. Lebergewebe (A); kolorektale Lebermetastase (B). Der Thy-1 Antikörper färbt Fibroblasten und Myofibroblasten in Portalen Gefäßen und perivaskulärem Raum in Lebergewebe. In dem Stroma der kolorektalen Lebermetastase zeigt sich eine Immunreaktivität für Thy-1. (400-fache Vergrößerung).....	25
Abb. 6: Färbeserie von kultivierten TAF (A) und LF (B) in vitro. Es wird der myofibroblastische Phänotyp mit vergleichbarem Markerprofil der TAF und LF deutlich. (400-fache Vergrößerung).....	26
Abb. 7: Doppel-Immunfluoreszenz Färbung der TAF gegen α -SMA und Vimentin. Die Kerne sind mit DAPI blau angefärbt. (100-fache Vergrößerung).....	28
Abb. 8: (A): mRNA Expression unter Wachstumsfaktoreinfluss im Vergleich zur Kontrolle (CON, 0,5% FCS) und zu 10% FCS. Bandendarstellung des Northern Blots, links TAF rechts LF. Es zeigt sich eine verstärkte Bandenintensität bei 10% FCS, sowie durch TGF- β 1. Die unteren Banden zeigen die GAPDH mRNA-Expression zur Normalisierung nach Rehybridisierung. (B): Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Analyse der α -SMA mRNA-Expression durch TAF (schwarz) und LF (grau) unter Stimulation mit den Wachstumsfaktoren im Vergleich zur Kontrolle (CON, 0,5% FCS) und 10% FCS. (*: $p < 0,05$ vs. control; ANOVA-Test und Bonferroni-Adjustierung).....	29
Abb. 9: Repräsentative Northern Blot Analysen von vier verschiedenen Patienten zeigen die PAI-1 mRNA-Expression des jeweiligen Tumorgewebes (I), angrenzendem Lebergewebe (II) und entferntem Lebergewebe (III).....	30

Abb. 10: Vergleich der PAI-1 mRNA Expression aus Leber-Tumorgewebe und aus primärkultivierten TAF; Tumorgewebe (I), angrenzendes Lebergewebe (II) und entferntes Lebergewebe (III (Pat.1) und (Pat. 2). (1) und (2) primärkultivierte TAF (3. Passage) aus demselben Tumor (Pat. 2).....31

Abb. 11: (A): Repräsentative Northern Blot Analysen zeigen den Einfluss von TGF- β 1 auf die PAI-1 mRNA-Expression primärer TAF in drei unterschiedlichen Isolationen vs. TAF in 0,5% FCS (CON).
(B): Dieses Balkendiagramm zeigt die densitometrische Analyse der PAI-1 mRNA-Expression durch TAF unter Stimulation mit TGF- β 1 im Vergleich zur Kontrolle (0,5% FCS). Die Daten zeigen Mittelwerte +/- SEM (**: $p < 0,01$; N=5; ANOVA-Test und Bonferroni-Adjustierung).....32

Abb. 12: Immunzytochemische Messung mittels ELISA Technik der PAI-1-Expression durch Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten der kolorektalen Lebermetastase (TAF; grau) und Leberfibroblasten aus entferntem Lebergewebe (LF; schwarz).....33

11. Danksagung

Herrn *Prof. Dr. med. Dr. h.c. X. Rogiers* möchte ich für die zur Verfügung gestellten Arbeitsbedingungen und die wissenschaftliche Förderung danken.

Bei Herrn *Priv.-Doz. Dr. med. Lutz Fischer* und *Prof. Dr. med. Björn Nashan* bedanke ich mich für die Möglichkeit des Abschlusses der Promotion und die Unterstützung.

Besonders möchte ich mich bei *Herrn Dr. med. Lars Müller* für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit bedanken. Er war jederzeit ansprechbar und hat mich in allen Belangen fachlich kompetent unterstützt.

Silke Brillof danke ich für den Beistand bei der experimentellen Arbeit und bei Fragen zur schriftlichen Ausarbeitung.

Mein Dank gilt auch *Sigrid Himpel*, die immer für Fragen offen und zur praktischen Hilfe bereit war.

Susanne Sandtner, Freya Goumas und *Christian Wilms* danke ich für die nette Zusammenarbeit und gegenseitige motivierende Unterstützung im chirurgischen Forschungslabor.

Dankbar bin ich *Tobias Braasch, meiner Familie und Freunden* und *Fam. Braasch* für die geduldige emotionale, finanzielle und positive Unterstützung, ohne die es diese Arbeit nicht geben würde.

Außerdem danke ich *Anett Müller, Ullrich Coerdts, Mareen Glorius, Matthias Hansel* und *Anna Regenbrecht* für die wichtige Hilfestellung bei den Korrekturen.

12. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Marianne Angela Affeldt
Anschrift	Mittelweg 65, 20149 Hamburg
E-Mail Adr.	marianneaffeldt@gmx.de
Geburtsdatum	02.05.1979
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULBILDUNG

1986 – 1990	Grundschule Am Friedhof, Hamburg-Rahlstedt
1990 – 1999	Gymnasium Rahlstedt, Hamburg
06/1999	Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

10/1999	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
08/2001	ärztliche Vorprüfung
08/2002	1. Staatsexamen
03/2005	2. Staatsexamen
10/2006	3. Staatsexamen

PRAKTISCHES JAHR

10/2005-01/2006	I. Medizinische Klinik , Schwerpunkt Kardiologie Allgemeines Krankenhaus Barmbek, Hamburg
02/2006-04/2006	Abteilung für Chirurgie, Princess Alexandra Hospital, Brisbane, Australien
04/2006-06/2006	Abteilung für Chirurgie, Singapore General Hospital, Singapur
06/2006-09/2006	Abteilung für Anästhesie, Asklepios Klinik Barmbek, Hamburg

ASSISTENZÄRZTIN

Seit 12/2006	Klinikum Eilbek, Abteilung für Anästhesie, Hamburg
--------------	---

DISSERTATION

Seit 11/2002	Doktorarbeit in der Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Viszerale Transplantation, Universitätsklinikum Hamburg
--------------	--

13. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgaben (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

(Marianne Affeldt)