

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

**Funktionelle Charakterisierung Tumorstroma-assoziiierter
Fibroblasten aus humanen kolorektalen Lebermetastasen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Freya A. Goumas
aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 08.12.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:	PD Dr. L. Fischer
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter:	Prof. Dr. H. Schäfer
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter:	PD Dr. G. Schuch

Meinen Eltern und Schwestern

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	4
2. Einleitung	5
2.1 Das kolorektale Karzinom	5
2.2 Metastasierung	7
2.3 Metastasen und die Bedeutung der CAF	8
2.4 Herkunft der CAF	9
2.5 Zellinteraktionen als Grundlage für Tumorentstehung und Tumorprogression...	10
2.6 Charakteristika und Bedeutung ausgewählter Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren	11
2.6.1 Interleukin-6	11
2.6.2 Interleukin-8	11
2.6.3 Basic Fibroblast Growth Factor	12
2.6.4 Vascular Endothelial Growth Factor	13
2.6.5 Platelet-derived Growth Factor	13
2.7 Therapieansätze mit Imatinib (STI571) in soliden Tumoren	14
3. Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.2 Zellisolation	17
3.2.1 Patienten	17
3.2.2 Probegewinnung	17
3.2.3 Isolation der CAF aus Gewebeproben	18
3.3 Zellkultur	18
3.3.1 Primärkultur der CAF	18
3.3.2 Reinheit der Zellkultur	19
3.3.3 Zellkultur von Tumorzellen	19
3.4 Stimulationsversuche	19
3.4.1 Stimulationsversuche für Proliferationsmessungen	19
3.4.2 Stimulationsversuche für RNA-Untersuchungen	19
3.5 Bestimmung der Proliferation	20
3.5.1 Methyl- ³ H-Thymidin-Proliferationsassay	20
3.5.2 Proliferationsmessung per Handzählung	21
3.5.3 Proliferationsmessung mit dem WST-1 Assay	21
3.6 Herstellen von konditioniertem Medium	22

3.7 Aufkonzentrieren des konditionierten CAF-Kulturmedium	22
3.8 Boyden Chamber Assay mit HUH7 und DLD1	22
3.9 Bestimmung der Zytokine und Wachstumsfaktoren	24
3.10. Nachweis spezifischer mRNA.....	24
3.10.1 RNA-Isolation aus der Zellkultur	24
3.10.2 Synthese mit Hilfe der Reversen Transkription	26
3.10.3 Herstellen einer DIG-markierten Sonde	27
3.10.3.1 RT-PCR	27
3.10.3.2 Herstellen eines 1,5 % Agarosegels und Gelelektrophorese	28
3.10.3.3 DIG-PCR	29
3.10.4 Northern Blot Analysen.....	29
3.10.4.1 Northern Blot.....	29
3.10.4.2 Gelelektrophorese.....	30
3.10.4.3 Durchführen des Northern Blots.....	31
3.10.4.4 Hybridisierung	32
3.10.4.5 Detektion der DIG-markierten Nukleinsäuren	32
3.11 Statistische Auswertung	34
4. Ergebnisse	35
4.1 Morphologie primärkultivierter CAF	35
4.2 Charakterisierung der CAF in situ und in vitro	36
4.3. Effekte von TGF- β , PDGF-BB und EGF	37
4.4 Einfluss von CAF-Medium auf die Proliferation von HUH7 und DLD1	39
4.5 Einfluss von CAF-Medium auf die Migration von HUH7 und DLD1	41
4.6 Expression von PDGF- Rezeptoren.....	43
4.7 Einfluss von Imatinib auf CAF.....	44
4.7.1 Morphologische Untersuchungen nach Inkubation mit Mediatoren	44
4.7.2 Imatinib blockiert die PDGF-BB induzierte Proliferation und vermindert die Zellviabilität	47
4.7.3 Einfluss auf die Expression von α -SMA durch PDGF-BB und Imatinib.....	52
4.7.4 Einfluss auf die Regulation tumorfördernder Zytokine durch PDGF-BB und Imatinib.....	53
5. Diskussion.....	56
6. Zusammenfassung	68
7. Literaturverzeichnis	69

8. Bezugsquellenverzeichnis.....	79
9. Abkürzungsverzeichnis.....	81
10. Abbildungsverzeichnis	83
11. Danksagung.....	86
12. Lebenslauf	87
13. Eidesstattliche Versicherung	88

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten (*englisch, carcinoma associated fibroblasts*, im Folgenden als *CAF* abgekürzt) in soliden Tumoren und Metastasen sind für die Bildung des Tumorgerüsts, die Migration sowie die Neoangiogenese von entscheidender Bedeutung. In Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms repräsentieren CAF den zellulären Hauptbestandteil des Tumorstromas. Die Funktion und die Eigenschaften der CAF und deren Interaktion mit den eigentlichen Tumorzellen ist im Falle von kolorektalen Lebermetastasen bislang noch weitgehend ungeklärt und Gegenstand dieser Forschungsarbeit.

Dabei soll die Hypothese überprüft werden, wonach CAF eine bedeutende Rolle in der Progression der Lebermetastasen einnehmen. Weitere zu prüfende Fragestellungen sind:

- Wird die Proliferation der CAF durch ausgewählte Zytokine, Chemokine bzw. Wachstumsfaktoren reguliert?
- Hat konditioniertes CAF-Medium einen proliferativen oder pro-migatorischen Effekt auf Kolonkarzinomzellen?
- Exprimieren CAF bzw. Kolonkarzinomzelllinien PDGF-Rezeptoren?
- Beeinflußt Imatinib die Morphologie der CAF?
- Hat Imatinib Einfluß auf die Proliferation der CAF?
- Ist Imatinib ein möglicher antiproliferativer Mediator?
- Beeinflußt Imatinib die Regulation tumorfördernder Zytokine?

2. Einleitung

2.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten bösartigen Tumoren weltweit. Die 5-Jahres-Überlebensrate variiert von Land zu Land. So beträgt sie 65 % in Nordamerika und 54 % in Westeuropa, während sie in Osteuropa und Indien lediglich bei 30 % liegt (Parkin et al., 2005).

In Deutschland stellt das kolorektale Karzinom bei den Frauen nach dem Mammakarzinom das zweithäufigste, bei den Männern nach dem Lungen- und Prostatakarzinom das dritthäufigste Karzinom dar. In der Statistik der Krebstodesfälle steht das kolorektale Karzinom somit an zweiter Stelle, nach dem Lungenkarzinom beim Mann und dem Mammakarzinom bei der Frau. Im Jahr 2000 verstarben deutschlandweit etwa 13.500 Männer und 15.300 Frauen an den Folgen der Erkrankung. Nach Schätzungen des Robert Koch Instituts erkrankten in Deutschland jährlich etwa 32.000 Männer und 34.000 Frauen an dem kolorektalen Karzinom. Obwohl die Inzidenz für beide Geschlechter seit einigen Jahren auf hohem Niveau stabil und die Sterblichkeit sogar rückläufig ist, finden sich bei etwa 25 % der Patienten zum Diagnosezeitpunkt Lebermetastasen und mehr als 50 % der Patienten entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung Lebermetastasen (Penna und Nordlinger, 2002)

Eine Heilung des hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinoms ist derzeit nur durch eine kurative Resektion erfolgversprechend. In vielen Fällen ist jedoch eine Resektabilität aufgrund einer ungünstigen Tumorlokalisation oder vor dem Hintergrund multipler Metastasenherde nicht gegeben und die abnehmende Leberfunktion stellt den limitierenden Faktor des Patientenüberlebens dar. Daher ist es wichtig neben der Leberteilesektion und der konventionellen Chemotherapie weitere kurative bzw. palliative Therapieansätze zu entwickeln.

Die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms ist vielfältig. Neben prädisponierenden Erkrankungen wie die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn kommt der Familienanamnese eine entscheidene Rolle zu, um Präkanzerosen wie zum Beispiel die Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die eine obligate Präkanzerose darstellt und das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) frühzeitig zu diagnostizieren.

Ernährungs- und Umweltfaktoren scheinen ebenfalls eine bedeutende Rolle für das Karzinomrisiko zu spielen. So korrelieren das Risiko für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen mit dem pro Kopf Verbrauch an Fleisch (Armstrong et al, 1975), an Fetten, insbesondere tierische Fette (Prentice et al, 1990), sowie faserarmer Ernährung (McKeown-Eyssen, 1994). Epidemiologische Studien zeigen auch übereinstimmend, dass Bewegungsarmut, Übergewicht und zentrale Adipositas Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms darstellen (Giovannucci, 2002). Dass das Risiko für die Entstehung von Kolonkarzinomen abhängig hinsichtlich Veränderungen von Umweltfaktoren ist, konnte in Migrationsstudien nachgewiesen werden. Zogen Populationen aus Gebieten, in denen das Risiko für die Entstehung des Karzinoms niedrig ist, in Gebiete mit höherem Risiko, so stieg auch die Erkrankungsrate bereits innerhalb der ersten Generation dementsprechend an (McMichael et al, 1980, Kolonel et al, 1980). Diese Untersuchungen belegen, dass Ernährungs- und Umweltfaktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Karzinomentstehung haben. Nicht-Steroidale-Antiphlogistika (NSAR) hingegen, wie zum Beispiel ASS, sollen eine protektive Wirkung aufweisen (Oshima und Taketo, 2002; Ricchi et al., 2003).

Da sich der maligne Tumor zu etwa 90% aus vorangehenden Adenomen entwickelt, bzw. entzündlichen Veränderungen (Adenom-Karzinom-Sequenz bzw. Dysplasie-Karzinom-Sequenz), führt eine konsequente Polypektomie zu einer Risikoreduktion um ca. 90 %. Der Früherkennung kommt eine wichtige Bedeutung durch eine frühzeitigere Entdeckung prognostisch günstiger Stadien zu, weil das kolorektale Karzinom klinisch erst in fortgeschrittenen Stadien symptomatisch wird.

Es äußert sich durch Blutbeimengungen im Stuhl, Änderungen der Stuhlgewohnheiten, sowie Tenesmen. Erste diagnostische Hinweise können die digital rektale Palpation, sowie die Untersuchung des Stuhls auf okkultes Blut liefern. Zur Diagnosesicherung dient die totale Koloskopie mit einer gleichzeitigen Biopsie aus veränderten Regionen.

In kurativer Intention ist je nach Tumorlokalisation das sphinktererhaltende restaurative Resektionsverfahren Therapie der Wahl. Ablative und destruktive Therapien können bei nicht-resektablen Lebermetastasen eingesetzt werden. Hierunter fallen die Kryotherapie und die Radiofrequenzablation. Als postoperatives/ adjuvantes Therapieverfahren steht die Chemotherapie zur Verfügung. Angewendet wird eine Kombination aus 5-Fluorouracil (5-FU), Folinsäure und Oxaliplatin (FOLFOX-Schema) und/ oder Irinotecan (FOLFIRI-Schema) (Vadegar HJ, 2007).

Auch aufgrund der Blutabflusswege ist die Leber das erste Zielorgan bei einer hämatogenen Metastasierung. Liegen bereits multiple Lebermetastasen vor, entfällt die Möglichkeit einer Leberteilesektion, und die palliative Chemotherapie bleibt die einzige Option.

Daher ist es wichtig, neben der Leberteilesektion sowie Chemotherapie, weitere kurative bzw. palliative Therapieansätze zu schaffen.

2.2 Metastasierung

Metastasierung beschreibt einen Transfer von Tumorzellen vom Primärtumor auf ein anderes Organ oder Gewebe, mit Ausbildung einer Metastase, ohne dass eine Kontinuität mit dem Ausgangsorgan oder Ausgangsgewebe besteht.

Patienten mit einer neudiagnostizierten Neoplasie weisen in etwa 30 % klinisch nachweisbare Metastasen auf. In mehr als 90 % der Fälle versterben die Tumorpatienten an ihren Metastasen und nicht am Primärtumor (Fidler et al, 2002). Metastasen treten häufig wie folgt auf:

- Der Primärtumor ist entfernt, und nach wenigen Monaten tritt die Metastasierung ein,
- zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors liegen bereits Metastasen vor,
- der Primärtumor wird entfernt, und eine Metastasierung tritt erst nach 5-10 Jahren auf,
- Metastasen treten bei einem okkulten Primärtumor auf.

Noch weitgehend ungeklärt sind sowohl die Faktoren, die die Metastasierung, sowie das Verteilungsmuster der metastatischen Absiedlungen beeinflussen und regulieren. Erklärt werden können diese Muster nur bedingt durch vorliegende anatomische und hämodynamische Gegebenheiten. Das Konzept, dass eine Metastasierung durch spezifische Zell-Zell-Interaktionen hervorgerufen wird, ist nicht neu. Bereits 1889 hatte der englische Chirurg Stephen Paget mit der „seed and soil- Theorie“ eine Diskussion in Gang gesetzt, die bis heute anhält. Er vertrat die Ansicht, dass eine Tumorzelle („seed“) auf eine fruchtbare Umgebung („soil“) treffen muß, um überhaupt die Möglichkeit der Proliferation zu erlangen (Paget, 1889). Dabei scheinen bei der organotropen Metastasierung spezifische Tumorzelladhäsionsprozesse eine bedeutende Rolle zu spielen. Auch weisen molekularbiologische und biochemische Untersuchungen darauf hin, dass die Mehrzahl der Neoplasien und somit auch deren Metastasen, ihren Ursprung von jeweils einer entarteten Zelle nimmt (Weiss, 1986). Aus einer erhöhten genetischen Instabilität des Tumorzellklons resultiert die „klonale Evolution“, aus der

eine zunehmende Heterogenität folgt. Die erhöhte genetische Instabilität kann dabei angeboren oder erworben sein. Am Beispiel des Kolonkarzinoms konnte die Tumorprogression bereits dargestellt werden (Fearon et al., 1990).

Charakterisiert ist die biologische und klinische Progression einer Tumorerkrankung bis zur Metastasierung durch die Entwicklung von Tumorzellvarianten, die aufgrund eines Selektionsvorteils zunehmend aggressive Wachstumsmuster aufweisen. Das erklärt, warum nicht nur Primärtumor und Metastasen, sondern auch die Metastasen untereinander eine Heterogenität aufweisen (Fidler et al. 2003, Kang et al., 2003).

Bevor eine maligne Zelle jedoch Ausgangspunkt einer Metastase wird, muss sie mehrere Barrieren eines komplexen Metastasierungsprozesses überwinden. Fidler und Poste beschrieben eine metastatische Kaskade, die mit einer unkontrollierten Proliferation beginnt, verschiedenen Stadien durchläuft und schließlich in der Ausbildung einer Metastase endet (Fidler und Poste, 1982).

2.3 Metastasen und die Bedeutung der CAF

Der Aufbau einer Metastase ist durch zwei Komponenten gekennzeichnet. Zum einen besteht sie aus dem Gewebe, das von der eigentlichen Tumorzelle gebildet wird, zum anderen aus dem sogenannten Tumorstroma, welches einen relevanten, in manchen Fällen sogar den größten zellulären Anteil der Metastase bildet. Das Tumorstroma wird von Entzündungszellen, kleinen Gefäßen, Immunzellen, sowie fibroblastischen und myofibroblastischen Zellen gebildet. Seine Zusammensetzung ist mit dem Granulationsgewebe vergleichbar, das im Rahmen einer Wundheilung gebildet wird. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit einer Wunde definierte Dvorak Tumoren deshalb als nicht heilende Wunden (Dvorak, 1986).

Die Myofibroblasten bilden den vorherrschenden Zelltyp. Im Folgenden werden diese Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten als *CAF* (englisch, *carcinoma associated fibroblasts*) abgekürzt. Es handelt sich hierbei um hoch differenzierte Zellen. Diese aktivierten Fibroblasten, die durch die Expression von α -smooth muscle actin (α -SMA) gekennzeichnet sind, produzieren Kollagen, extrazelluläre Matrixproteine und den Gewebefaktor, dem Initiator einer Kaskade, die letztlich zur Koagulation und Thrombinbildung führt (Vrana et al., 1996). Darüber hinaus sind sie an der „desmoplastischen Reaktion“ beteiligt. Darunter wird die Antwort von ansässigen Zellen auf Tumorzellen verstanden (Seemayer et al. 1979; Dvorak, 1986). Nicht

tumoröse Zellen, darunter auch die CAF, sezernieren außerdem Substanzen, die die Tumorprogression und -invasion beeinflussen und scheinen hier somit eine wichtige Rolle einzunehmen (De Wever und Mareel, 2003; Chung LW 1988, 2005).

2.4 Herkunft der CAF

Bereits seit drei Jahrzehnten wird die Herkunft der CAF und deren Bedeutung untersucht. Man vermutete, dass es sich dabei um Fibroblasten handelt, ähnlich der, die man in der Wundheilung antrifft, die jedoch in der Tumorumgebung einen modifizierten Phänotyp erwerben (Ryan et al., 1973, 1974; Tsukada et al., 1987).

Letztlich ist der Ursprung der CAF bis heute nicht eindeutig geklärt. Folgende Hypothesen können in Betracht gezogen werden. Im Rahmen von Untersuchungen von Verbrennungspatienten stellten Yang et al. die Hypothese auf, dass zirkulierende Fibrozyten eine wichtige Quelle der Fibroblasten während der Wundheilung darstellen könnten (Yang et al., 2002). Die Vermutung liegt auch deshalb nahe, da bei Verbrennungspatienten zum einen die Fibrozytenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ist, zum anderen aber auch das Zytokin TGF- β , das eine bedeutende Rolle in der Wundheilung einnimmt (Tredget et al., 1998). Eine weitere Hypothese besagt, dass CD34-positive Fibrozyten, die von myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks abstammen, den Ursprung für CAF des Kolonkarzinoms (Nakayama et al., 2000), Mammakarzinoms, sowie Pankreaskarzinoms (Barth et al., 2002) bilden. CD34 ist ein 110 kDa Oberflächenantigen, das sich selektiv auf humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen findet. Ishii et al. konnten in einem Tiermodell zeigen, dass sich sowohl Myofibroblasten, die ihren Ursprung im Knochenmark hatten (CD34+) als auch solche, die nicht dem Knochenmark entstammten, im entwickelnden Tumorstroma fanden (Ishii et al., 2003).

Hinsichtlich der CAF aus kolorektalen Lebermetastasen gibt es zwei weitere Annahmen: 1. CAF differenzieren sich aus hepatischen Sternzellen oder/ und 2. aus portalen Myofibroblasten. In der Leber selbst finden sich normalerweise praktisch keine Myofibroblasten. Sie lassen sich vielmehr durch die Aktivierung von Präkursorzellen herleiten. War über eine längere Zeit die These führend, dass die gut untersuchten hepatischen Sternzellen, die sich perisinusoidal finden als Ursprung dienten (Reeves und Friedman, 2002), so stellen neuere Untersuchungen die periportalen Fibroblasten,

basierend auf ihrem Expressionsprofil, auch als Ursprungsort für die Leberfibrose, in den Vordergrund (Tuchweber et al., 1996; Kinnmann et al., 2003).

2.5 Zellinteraktionen als Grundlage für Tumorentstehung und Tumorprogression

Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine sind von größter Bedeutung sowohl für die Tumorentstehung, als auch für die Tumorprogression. Hierbei können die Interaktionen durch autokrine und/ oder parakrine Mechanismen gesteuert werden, so dass beispielsweise auf diesem Weg das Tumorzellwachstum aufrechterhalten wird, das Immunsystem umgangen und/ oder auch die Angiogenese induziert wird.

So konnte nachgewiesen werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR2 mit seinen Liganden IL-8 und GRO-alpha, sowohl die Angiogenese in malignen Prozessen, als auch die Leukozyteninfiltration in die Tumorumgebung fördert. Untersuchungen haben gezeigt, dass chronisch entzündliche Prozesse prädisponierend für die Karzinomentstehung sind (Balkwill und Montavani, 2001; Balkwill und Coussens, 2004). Auf diesen chronischen Reiz hin, erfolgt eine erhöhte Sekretion unspezifischer proinflammatorischer Zytokine, wie Interferon-alpha (IFN- α), Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) (Szolsarek et al., 2006; Aggarwal et al., 2006). Infolgedessen wird die Expression proinflammatorischer Chemokine induziert (Wang et al., 2006), was in der Gesamtheit wiederum zu einer zellulären Transformation und Tumorgenese führen kann. In diesem gegebenen inflammatorischen Milieu gewinnen die Tumorzellen Funktionen, mit Hilfe derer sie ihre Umgebung neu gestalten können (Rangarajan et al., 2004). Desweiteren wird durch die Freisetzung von TGF- β und Interleukin-10 (IL-10) durch Makrophagen, Fibroblasten und die Tumorzellen selbst, das Immunsystem in der Tumorumgebung supprimiert und damit ein Milieu erzeugt, welches das Tumorwachstum erleichtert und fördert (Zou, 2005; Ben-Baruch, 2006).

Die Zellinteraktionen innerhalb des Tumorstromas sind bis heute noch unzureichend verstanden und aufgeklärt, so dass derzeit diesbezüglich noch ein hohes Forschungspotential besteht. Im Folgenden soll der cross-talk und seine möglichen Konsequenzen daher nur auszugsweise beleuchtet werden. Durch von Tumorzellen sezernierte chemotaktische Chemokine und/ oder Zytokine werden proinflammatorische und endotheliale Zellen rekrutiert (Bottazi et al. 1983). In dieser nun modifizierten Umgebung transdifferenzieren ansässige Fibroblasten in Tumorstroma-assoziierte

Myofibroblasten. Als Folge der wechselseitigen autokrinen und/ oder parakrinen Interaktionen zwischen Tumorzellen und stromalen Zellen (CAF, Leukozyten, Endothelzellen) können verschiedene Eigenschaften erworben werden, die die Tumorprogression unterstützen. Dazu zählen u.a. die autonome Proliferation, das Erwerben anti-apoptotischer Mechanismen, die Angiogenese, sowie ungehemmte replikatorische Prozesse (Hanahan und Weinberg, 2000).

2.6 Charakteristika und Bedeutung ausgewählter Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren

Für die vorliegende Arbeit bedeutende Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren werden im Folgenden näher beschrieben.

2.6.1 Interleukin-6

Das zur Familie der Zytokine zählende Interleukin-6 (IL-6) ist ein glykosyliertes Protein, das in verschiedenen Formen vorliegen kann, mit einer Molekularmasse von 21,5-28 kDa. Sezerniert wird dieses Protein hauptsächlich von Monozyten, endothelialen Zellen und Fibroblasten. Seine Wirkung entfaltet es dabei über den IL-6-Rezeptor CD126, der sich auf T-Zellen, aktivierten B-Zellen und einigen Tumorzelltypen, die sich von Makrophagen oder B-Zellen herleiten, findet. Es handelt sich um ein pleiotropes Zytokin, das antigenspezifische Immunantworten und inflammatorische Antworten beeinflusst. Es stellt eines der physiologischen Hauptmediatoren der akuten Phase Reaktion dar (Jumming und Vilcek, 1988). In einigen Tumorarten moduliert IL-6 in geringen Konzentrationen deren Wachstum (Nachbaur et al., 1991). So ist z.B. das Wachstum von einigen Myelomzellen IL-6-abhängig und kann auf diesem Wissen basierend, durch IFN- γ gehemmt werden. IL-6 kann in einigen Tumorarten das Wachstum in autokriner Weise beeinflussen.

2.6.2 Interleukin-8

Bei Interleukin-8 (IL-8) handelt es sich um ein nicht-glykosyliertes Chemokin der CXC-Chemokin Familie mit einer Molekularmasse von 8 kDa. Erstmals wurde es als chemotaktischer Faktor für Neutrophile in den Überständen aktivierter Monozyten entdeckt. Seitdem konnte die Expression von IL-8 jedoch auch in verschiedenen humanen Karzinomen gezeigt werden, wie einigen gynäkologischen oder gastrointestinalen Tumoren (Brew et al., 2000). Zelluläre Produktionsstätten sind

Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Chondrozyten, Hepatozyten, aber auch verschiedene Tumorzellen.

IL-8 zeichnet sich durch mitogene, angiogene, sowie motogene Effekte aus. Schadendorf et al. entdeckten, dass endogen produziertes IL-8 einen wichtigen Wachstumsfaktor für Melanomzellen darstellt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass ihm eine bedeutende Rolle in der Progression und Metastasierung zukommt (Schadendorf et al., 1993). Diese Eigenschaften konnten ebenfalls für das Pankraskarzinom und das Kolokarzinom (Brew et al., 2000) bestätigt werden. In der Angiogenese scheint IL-8 ebenfalls ein wichtiges Protein zu sein. Auf Endothelzellen konnte die Expression von IL-8-Rezeptoren nachgewiesen werden, die eine direkte Interaktion mit dem Chemokin erlauben (Yoshida et al., 1997), so dass die Angiogenese entweder durch aktive Migration der Endothelzellen oder durch Chemotaxis gefördert werden kann (Szekanecz et al., 1994).

2.6.3 Basic Fibroblast Growth Factor

Der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) konnte in fast allen Geweben mesodermalen und neuroektodermalen Ursprungs nachgewiesen werden, ebenso in Tumoren, die von diesen Geweben ausgehen. Bei bFGF handelt es sich um ein 18 kDa grosses Protein, bestehend aus 155 Aminosäuren, das in grossen Mengen von Endothelzellen gebildet wird. Viele Zellen exprimieren bFGF nur vorübergehend und speichern das Protein in einer biologisch inaktiven Form. Seine Freisetzung erfolgt nach Gewebeverletzungen, im Rahmen inflammatorischer Prozesse und der Proliferation von Tumorzellen (Davidson und Broadley, 1991). Die Wirkung entfaltet das Protein über FGF-Rezeptoren, die über die Signaltransduktion eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von Prozessen spielen, die in Zusammenhang mit Zellwachstum und Zelldifferenzierung stehen.

In seiner biologisch aktiven Form stimuliert es das Wachstum vieler Zellen, auch das der Fibroblasten, Myofibroblasten und Endothelzellen. FGF spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der physiologischen Gewebsregeneration und Wundheilung, sondern ist ebenfalls an der Angiogenese beteiligt (Sato et al., 1991; Vlodavsky et al., 1991), indem es die Proliferation und Migration der Gefäßendothelzellen kontrolliert. Desweiteren wird die Expression von Plasminogenaktivatoren und verschiedener Kollagenasen deutlich gesteigert. Es wird vermutet, dass bFGF auch an der

Tumorangiogenese beteiligt ist, indem es die Synthese von Proteasen induziert und somit das invasive Wachstum und die Metastasierung erleichtert.

2.6.4 Vascular Endothelial Growth Factor

Bei dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) handelt es sich um ein glykosyliertes Protein mit einer Molekularmasse von 46-48 kDa. Das Protein wird in einer Vielzahl von Zellen produziert, neben Makrophagen und Epithelzellen auch von Tumorzellen. Es tritt dabei in verschiedenen Varianten auf, die sich lediglich in der Aminosäuresequenz unterscheiden. Seine Wirkung entfaltet VEGF über die Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) und VEGFR-3 (Flt-4), die sich auf Gefäßendothelzellen finden. Das Protein scheint spezifisch auf diese zu wirken und nicht das Wachstum anderer Zelltypen zu beeinflussen. Darüber hinaus scheint es neben dem proliferativen Effekt auch die Gefäßpermeabilität zu beeinflussen und ist somit ein entscheidender Faktor für die Angiogenese (Takeda et al., 2002). Desweiteren induziert VEGF in den Endothelzellen die Synthese des von Willebrand Faktors (Brock et al., 1991), von Plasminogenaktivatoren, sowie Metalloproteinasen und interstitieller Kollagenasen (Pepper et al., 1991; Claffey et al., 1992). Hypoxie stellt einen entscheidenden Faktor für die vermehrte Bildung von VEGF dar (Brogi et al., 1994).

In der Klinik finden spezifische Antikörper als anti-angiogene Therapie bereits Anwendung in der Behandlung von Karzinompatienten (Hurwitz et al., 2004; Homsy und Daud, 2007).

2.6.5 Platelet-derived Growth Factor

Der Platelet-derived Growth Factor (PDGF) ist ein hitzestabiles, hydrophiles Protein mit einer Molekularmasse von 30 kDa. Hauptproduktionsstätten sind die Megakaryozyten, in deren Granula es gespeichert und schließlich bei Aktivierung der Zellen freigesetzt wird. In einer Vielzahl anderer Zellen wird es ebenfalls synthetisiert; in Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, glialen Zellen, Astrozyten, Myoblasten und smooth muscle Zellen, sowie vielen Tumorzellen.

Das Protein besteht aus zwei verwandten Peptidketten und kann als PDGF-AA, -BB oder -AB vorliegen. Diese drei Isoformen binden mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptoren und unterscheiden sich auch in ihrer Wirkung.

PDGF-Rezeptoren werden von verschiedenen Zellen exprimiert. Mit einer Dichte von etwa 40.000 bis 300.000 Kopien liegen sie auf Fibroblasten, Osteoblasten,

Chondroblasten, smooth muscle Zellen, glialen Zellen, sowie Endothelzellen vor (Heldin und Westermark, 1999). Zwei unterschiedliche Rezeptoren, PDGFR-alpha (PDGFR- α) und PDGFR-beta (PDGFR- β) wurden beschrieben (Cleason-Welsh et al., 1991). Während PDGFR- α in der Lage ist alle drei Isoformen, also sowohl PDGF-AA , PDGF-BB und PDGF-AB zu binden, bindet PDGFR- β nur PDGF-BB. Die heterodimere Form PDGF-AB kann sowohl an den PDGFR- α als auch PDGFR- β binden (Heldin und Westermark, 1990; Heldin et al., 1992). PDGF bindet an verschiedene Plasmaproteine; die Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix erleichtert es, eine gewisse lokale Konzentration desselben zu erreichen. In Interaktion mit bFGF (s.o.), das die PDGF- α Rezeptoren hochreguliert, hat es einen Einfluss auf die DNA Synthese rezeptortragender Zellen (Brogi et al., 1994).

PDGF reguliert die Synthese seiner eigenen Rezeptoren, beeinflusst die Expression einiger Membranrezeptoren und induziert in diversen Zelltypen die Expression verschiedener Gene, die ihre Funktion als Zytokine entfalten. Das Protein PDGF wirkt in niedrigen Konzentrationen als chemotaktischer Faktor für Fibroblasten, hämatopoetische Zellen, mesenchymale Zellen, aber auch für Monozyten und Neutrophile, deren Aktivität es steuern kann (Siegbahn et al., 1990). Die T-Zell-Funktionen kann es ebenfalls beeinflussen (Daynes et al., 1991). Mittels PDGFR- β kann PDGF die Expression des Wachstumsfaktors VEGF stimulieren, wodurch PDGF und seine Rezeptortyrosinkinase PDGFR auch an der Angiogenese beteiligt sind (Brogi et al., 1994). Desweiteren ist PDGF ein potenter Vasokonstriktor (Berk et al., 1986).

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine lokale Applikation von rekombinantem PDGF die Heilungszeit ulzeröser Läsionen positiv beeinflusst (Pierce et al., 1991; Robson et al., 1992). Untersuchungen zeigen, dass der Einsatz von PDGF bzw. seine Blockade von möglicher klinischer Relevanz sein kann (Kuwai et al., 2008).

2.7 Therapieansätze mit Imatinib (STI571) in soliden Tumoren

Aufgrund der limitierten Optionen in der Behandlung solider Tumoren ist es wichtig, neue Therapieansätze zu schaffen, sowohl kurativer als auch palliativer Art.

Die Möglichkeit, Signaltransduktionswege innerhalb der Zelle zu beeinflussen, schafft neue Perspektiven in der Behandlung neoplastischer Erkrankungen. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Hemmung verschiedener Tyrosinkinasen, da diese an zahlreichen Signalwegen beteiligt sind.

Tyrosinkinasen katalysieren die Übertragung von Phosphatgruppen von ATP auf bestimmte Zielproteine und nehmen somit eine Schlüsselposition im Regulationsmechanismus der Signaltransduktion ein. Phosphorylierungsvorgänge sind nicht nur von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Organismus, sondern auch für die Tumorentstehung und Progression. So nehmen Tyrosinkinasen an Phosphorylierungsprozessen von Proteinen teil, die an der Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Zellmigration und der Apoptose beteiligt sind.

Sie lassen sich in mehrere Untergruppen einteilen. Die membranständigen Tyrosinkinasen sind gleichzeitig Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, beispielsweise für EGF, VEGF, FGF und PDGF. Somit ist die autokrine und/ oder parakrine Expression dieser Liganden essentiell.

Die Entwicklung selektiver Inhibitoren von Proteinkinasen ist ein vielversprechender Ansatz für die Schaffung neuer Medikamente. Derzeit zählt Imatinib (STI571) zu den klinisch wirksamsten Tyrosinkinaseinhibitoren (Druker und Lydon, 2000). Ursprünglich wurde Imatinib als Inhibitor der Platelet-derived growth factor (PDGF)- Rezeptor-Kinase entwickelt. Seine Aktivität gegen ABL und c-kit wurde dabei als Nebeneffekt entdeckt. Es wirkt als kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindung an der katalytischen Domäne der ABL-Kinase, unterbindet die Phosphorylierung von Proteinen und hemmt somit ein Netzwerk von Signalkaskaden (Deininger, 2001).

In verschiedenen Tumorzelllinien wurde bereits eine Expression, entweder von PDGF oder von PDGF gemeinsam mit dem Rezeptor PDGFR beschrieben, unter anderem in Mammakarzinom-, Ovarialkarzinom-, Prostatakarzinom-, Kolonkarzinom-, Melanom-, sowie Glioblastomzelllinien. Demzufolge besteht hier die Möglichkeit einer Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege durch parakrine und/ oder autokrine Stimulation des PDGFR (Shawyer, 1999) und stellt somit einen möglichen Therapieansatz dar.

Verschiedene Studien zeigten bereits, dass einige Kolonkarzinomzellen c-kit-Transkripte exprimieren (Bellone et al., 1997). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde in den humanen Adenokarzinomzelllinien HT29 und DLD1 des Kolons die Expression der c-kit mRNA nachgewiesen (Bellone et al., 2001). Darüber hinaus fanden Bellone und Mitarbeiter heraus, dass c-kit Mutationen die Tumorzellen vor der Apoptose schützen und deren invasives Potential steigert. (Bellone et al., 2001).

Der c-kit Ligand wurde nicht nur in Tumorzellen, sondern ebenso in tumorfreien interstitiellen Epithelzellen entdeckt, so dass angenommen wird, dass in autokriner und/oder parakriner Weise die Zellproliferation, das Zellüberleben, die Invasion und die Tumorigenese gesteuert wird (Shimizu et al., 2001)

Imatinib wird bereits erfolgreich in der Klinik zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) eingesetzt. Im März 2000 fand es darüber hinaus erstmals Verwendung in der Behandlung Gastrointestinaler Stromatumoren (GIST). Die Behandlung erfolgte bei einer 50-jährigen Patientin, die bei einem hepatisch metastasierten GIST, welches zuvor erfolglos mit einer Polychemotherapie, Thalidomid und Interferon behandelt wurde. Nach einjähriger Therapie mit Imatinib dokumentierte die Verlaufskontrolle ein nahezu vollständiges Verschwinden aller Metastasen (Joensuu et al., 2001).

Bereits veröffentlichte Nachweise von c-kit mRNA in vielen Tumorzelllinien, die möglichen Interaktionen von Wachstumsfaktoren mit der membranständigen Tyrosinkinase, sowie der bereits erfolgreiche klinische Einsatz des Tyrosinkinaseinhibitors implizieren die Durchführung weiterer Studien. Mit der vorliegenden Arbeit sollen mitunter weitere mögliche Therapieoptionen untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien, Lösungen, Puffer, Nährmedien, Wachstumsfaktoren sowie verwendeten Geräte sind in Kapitel 3.2, sowie im Bezugsquellenverzeichnis, Kapitel 8, aufgeführt.

3.2 Zellisolation

3.2.1 Patienten

Als Grundlage für die Versuche dienten CAF aus kolorektalen Lebermetastasen, die im Rahmen von Leberteilesektionen gewonnen wurden. An den vorliegenden Untersuchungen nahmen 20 Patienten teil. Diese Patienten gaben im präoperativen Gespräch eine schriftliche Einverständniserklärung ab, in der sie sich zu Tumorgewebeentnahme für die vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchungen bereit erklärten.

3.2.2 Probegewinnung

Die humanen Gewebeproben wurden aus Leberteilesektaten gewonnen, ohne dabei die Aussagekraft der Begutachtung durch den Pathologen hinsichtlich der Dignität und des Sicherheitsabstandes zu beeinflussen.

Die Probegewinnung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Hierbei wurden Gewebeproben an drei unterschiedlichen Stellen entnommen. Probe I wurde aus dem Zentrum der kolorektalen Lebermetastase gewonnen, Probe II aus der Tumorumgebung, Übergang der Metastase zum gesunden Gewebe und Probe III aus dem tumorfreien Lebergewebe, 3 cm von der Metastase entfernt. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Gewebeproben unterschiedlich aufgearbeitet. Für RNA-Untersuchungen wurden Gewebestückchen mit einem Volumen von ca. 0,7 cm³ in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in 1,8 ml Cryoröhrchen (Langensfeld, Deutschland) überführt. Gewebeproben, aus denen die Zellen für die Zellkultivierung (Probe I und III) gewonnen werden sollten, wurden jeweils in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben, das lediglich Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) ohne weitere Zusätze enthielt und dem Transport der Proben diente.

3.2.3 Isolation der CAF aus Gewebeproben

Die gewonnene Gewebeprobe wurde auf eine Kulturplatte gegeben und mit einem Skalpell in winzige Fragmente zerteilt. Auf diese wurden 30 ml Medium 199 gegeben, welches mit 1 mg/ml Kollagenase Typ IV versetzt war, und für 60 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Gewebefragmente auf eine 145 cm² Kulturplatte gegeben und mit 30 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) bedeckt. DMEM war mit 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin/ Amphotericin B (Invitrogen, Auckland, N.Z.) versetzt. Die aus den Gewebefragmenten ausgewanderten Zellen waren auf der Kulturplatte adhärent und erreichten am 20. bis 25. Tag nach Aussaat eine Konfluenz von 80 bis 90 %. Mikroskopisch zeigte sich ein homogener Zellrasen. Ihrer Morphologie nach zu urteilen handelte es sich hierbei um fibroblastische Zellen. Mittels immunzytochemischer Färbungen konnte bestätigt werden, dass es sich bei den kultivierten Zellen um Myofibroblasten handelte (Kapitel 4).

3.3 Zellkultur

3.3.1 Primärkultur der CAF

Nachdem eine 70 bis 80 %-ige Konfluenz der Myofibroblasten auf den Kulturplatten erreicht war erfolgte die Zellpassage. Hierbei wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml GBSS gewaschen. Anschließend wurde auf die Kulturplatte 5 ml Trypsin EDTA gegeben und für 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zentrifugation der Zell-Trypsin-Suspension erfolgte bei Raumtemperatur für 10 min und bei 300 × g. Der Überstand wurde abpipettiert, das verbliebene Zellpellet resuspendiert und zu gleichen Teilen auf die Kulturplatten gegeben, in denen bereits 30 ml Nährmedium vorgelegt war. Die aufgeführten Arbeitsschritte fanden unter der sterilen Werkbank statt. Die Reagenzien wurden vor Gebrauch auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Die Inkubation der Zellen fand im Brutschrank bei 37°C unter 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Begasung statt. Etwa alle 72 Stunden im Verlauf der Kultur wurden die Zellen mit GBSS gewaschen und das Medium ausgewechselt, um den CAF ausreichend Nährstoffe zur Verfügung zu stellen und um abgestorbene Zellen, sowie Zellreste zu entfernen.

3.3.2 Reinheit der Zellkultur

Die Zellkulturen wurden neben der Beurteilung im inversen Mikroskop immunzytochemisch untersucht. Auf chamber slides kultivierte Zellen wurden hierzu fixiert und nach den strikten Anleitungen von Dako auf ihre Markerproteine hin untersucht. Zur Identifizierung der Myofibroblasten kamen Desmin, Laminin, Vimentin, sowie α -SMA zur Anwendung.

3.3.3 Zellkultur von Tumorzellen

Zur Untersuchung des Einflusses von Zellkulturüberständen der CAF auf das Wachstumsverhalten verschiedener Tumorzellen wurden weitere Zelllinien in Kultur genommen (HUH7, DLD1, SW480). Die Kulturbedingungen entsprach denen der CAF.

3.4 Stimulationsversuche

Grundlage dieser Untersuchungen waren Experimente, bei denen CAF in ihrem natürlichen Verhalten in der Kultur beeinflusst wurden.

3.4.1 Stimulationsversuche für Proliferationsmessungen

CAF einer zu 80 % konfluent bewachsenen Kulturplatte wurden mit GBSS gewaschen und anschließend 5 ml Trypsin EDTA hinzugefügt. Nach Ablösen der adhären Zellen wurde die Zellsuspension 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, dem verbliebenen Zellpellet 1 ml DMEM + 10 % FBS hinzugefügt und die Suspension gut vermengt. Mithilfe der Neubauer-Kammer wurde nun die Zellzahl bestimmt.

Für die folgenden Proliferationsmessungen wurden die CAF in einer Dichte von 3×10^3 Zellen pro well in eine 96-well-Platte in 200 μ l Medium (DMEM + 10 % FBS) ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit GBSS gewaschen. Hiernach wurden die Zellen zunächst für 24 h in serumreduziertem Medium, das 0,5 % FBS enthielt, mit 100 μ l/ well präinkubiert, bevor die Mediatoren in ihren unterschiedlichen Konzentrationen auf die Zellen gegeben wurden.

3.4.2 Stimulationsversuche für RNA-Untersuchungen

CAF wurden mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen auf 145 cm² Kulturplatten in 30 ml DMEM + 10 % FBS + 1 %-iger Antibiotika-Antimykotika-Lösung ausgesät und 72

Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationsperiode wurden die CAF gewaschen. Nachdem die Zellen in 30 ml serumreduziertem Medium (DMEM + 0,5 % FBS) 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ präinkubiert wurden, erfolgte die Inkubation mit den Wachstumsfaktoren bzw. mit konditioniertem Medium aus Zellkulturüberständen bei 37°C und 5 % CO₂ für 24 Stunden.

3.5 Bestimmung der Proliferation

3.5.1 Methyl-³H-Thymidin-Proliferationsassay

Mit Hilfe des Methyl-³H-Thymidin-Proliferationsassay ist es möglich, die Proliferation von Zellen unter bestimmten Kulturbedingungen zu analysieren. Hierzu wird Methyl-³H-Thymidin dem Kulturmedium zugesetzt und während der Proliferationsphase der Zellen als Nukleotid eingebaut. Die anschließend gemessene Stärke der Radioaktivität ist proportional zur Menge des eingebauten Methyl-³H-Thymidins und damit proportional zur Proliferationsrate.

Vor Ablauf der 24-stündigen Präinkubation mit serumreduziertem Medium (DMEM + 0,5 % FBS) wurden die zu untersuchenden Faktoren vorbereitet. Hierbei wurde jeweils 1 ml der verwendeten Wachstumsfaktoren/ Inhibitoren in ihren verschiedenen Konzentrationen (FGF 0,5 ng/ml, TGFβ 5 ng/ml, PDGF-BB 10 ng/ml, EGF 10 ng/ml) in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde jedem mit dem Mediator vorbereiteten tube, ³H-Thymidin in einer Aktivität von 2 µCi/ml zugefügt. Danach wurden die Mediatoren mit dem zugefügten Thymidin auf die wells verteilt mit je 100 µl/well und 24 Stunden lang bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Stimulations- und Markierungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro well 100 µl Trypsin/ EDTA gegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Zur Ernte der Zellen wurde in das Gerät Automash 2000 das Whatman Filterpapier eingespannt, ebenso die 96-well-Platte. Die wells der 96-well-Platte wurden gewaschen. Die Suspension, die destilliertes Wasser, Trypsin/ EDTA, sowie die abgelösten Zellen enthielt, wurde durch das Filterpapier geleitet. In dem Whatman Filter verblieben nur die Zellen. Die Flüssigkeit wurde in ein dafür bereit gestelltes Glasgefäß geleitet. Die ausgestanzten Filter mit den darin enthaltenden Zellen wurden in je ein Szintillationsglas gegeben, dem jeweils 3 ml des Szintillationscocktail,

zugefügt wurde. Mit einem Beta-Counter wurde anschließend die Zahl der radioaktiven Zerfälle („counts“) pro Szintillationsglas bestimmt.

3.5.2 Proliferationsmessung per Handzählung

Zur Proliferationsmessung der Zellen per Handzählung unter dem Mikroskop wurden diese in einer Dichte von 3×10^5 auf eine $56,7 \text{ cm}^2$ Kulturplatte ausgesät und 48 Stunden in DMEM + 10 % FBS und 1 %-iger Antibiotika-Antimykotika-Lösung bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationsperiode wurden die Zellen mit GBSS gewaschen und erneut 24 Stunden in serumreduziertem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Wachstumsfaktoren bzw. Zellkulturüberständen inkubiert. Die Wachstumsfaktoren und Kontrollmedien wurden alle 72 Stunden erneuert, die Zellzählung erfolgte alle 96 Stunden. Hierzu wurden die Zellen der auszuzählenden Kulturplatte mit GBSS gewaschen und dann abtrypsiniert. Die Zellzahl wurde anschließend per Zellzählung unter dem Mikroskop ermittelt.

3.5.3 Proliferationsmessung mit dem WST-1 Assay

Das Wachstum vitaler Zellen führt zur Erhöhung der Gesamtaktivität mitochondrialer Dehydrogenasen. Beim WST-1 Assay wird das zartrote Tetrazoliumsalz WST-1 von zellulären Enzymen metabolisch aktiver Zellen in das dunkelrote Formazan umgewandelt. Die Erhöhung der Enzymaktivität führt wiederum zu einer vermehrten Formazanbildung, was die Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur widerspiegelt.

WST-1 (Roche, Mannheim) wurde zur Bestimmung der Proliferation/ Vitalität der CAF, sowie der Tumorzelllinien eingesetzt. Im Vorfeld wurden die optimalen Bedingungen für die zu untersuchenden Zelllinien bestimmt, insbesondere die Zelldichte und Inkubationszeit mit dem Reagenz WST-1. Die zu untersuchenden Zellen wurden auf eine 96-well-Platte (CAF mit 3000 Zellen/well, Kolonkarzinomzellen 5000 Zellen/ well) ausgesät und mit dem zu untersuchenden Zytokin und/ oder Inhibitor versetzt, und auf ein Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$ Medium aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank mit dem WST-1 Reagenz versetzt, je well $10 \mu\text{l}$, und für weitere 4 Stunden inkubiert. Danach wurden die Platten mit dem ELISA-Reader bei 450 nm Wellenlänge gegen einen Hintergrund von

650 nm, gemessen. Jede Messung wurde in Triplets ausgeführt. Als Kontrollen wurden wells, die lediglich mit Medium bestückt waren, gemessen. Die erhobenen Werte jedes Ansatzes wurden gemittelt.

3.6 Herstellen von konditioniertem Medium

Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ auf eine 145 cm² Kulturplatte in 32 ml DMEM + 0,5 % FBS + 1 %-iger Antibiotika-Antimykotika-Lösung ausgesät und 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationsperiode wurden die Zellen mit GBSS gewaschen und mit Mangelmedium, welches DMEM + 0,5 % FBS + 1 %-ige Antibiotika-Antimykotika-Lösung enthielt, versetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, aliquotiert und bei - 20°C asserviert.

3.7 Aufkonzentrieren des konditionierten CAF-Kulturmedium

Zur weiteren Verwendung des Kulturmediums mit darin enthaltenen chemotaktischen Faktoren, die von den CAF in das Medium sezerniert werden, wurden Zellkulturen für 24 Stunden in serumreduziertem Medium inkubiert, das Medium gesammelt und mit einer Centriprep YM-3 (Millipore) Säule aufkonzentriert.

Das serumhaltige Kulturmedium der CAF wurde entfernt und durch 30 ml serumreduziertes Medium ersetzt. Nach 24 stündiger Inkubation wurde das konditionierte Medium der CAF gesammelt. 15 ml Medium wurden in eine Centriprep YM-3 Säule pipettiert. Die Säule wurde 95 min bei 3000 × g zentrifugiert bis eine Aufkonzentrierung von 1 ml erreicht wurde. Dieses aufkonzentrierte, konditionierte Medium der CAF wurde als chemotaktisches Agens im Boyden Chamber Assay eingesetzt.

3.8 Boyden Chamber Assay mit HUH7 und DLD1

Der Boyden Chamber Assay dient zur Testung des Migrationsverhaltens verschiedener Zelllinien. Bei dem Assay werden auf der einen Seite des Filters Zellen aufgebracht, während sich auf der anderen Filterseite verschiedene Testsubstanzen befinden, die die Migration der Zellen hemmen oder auch fördern können, bzw. deren Eigenschaft mit Hilfe dieses Assays abgeklärt werden soll.

Der Polycarbonat-Filter der Boyden Kammer wurde am Tag vor dem Versuch mit Kollagen beschichtet, damit die Zellen adhären konnten. Dazu wurde 1,5 ml Vitrogen mit 48,5 ml 0,1 %-iger Essigsäure gemischt und der Filter über Nacht in der Lösung bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Filter mehrmals mit 1 × PBS/ 0,1 % BSA gewaschen und unter der Werkbank getrocknet.

Als Zelllinien wurden HUH7, sowie DLD1 eingesetzt. Die Zellen wurden nach dem Trypsinieren zentrifugiert bei 200 × g für 5 min. Das Trypsin wurde abgenommen, die Zellen in 10 ml Vollmedium gewaschen und 5 min bei 200 × g zentrifugiert. Anschließend folgte zweimaliges Waschen mit Boyden Medium, wobei zwischen jedem Waschschrift jeweils eine Zentrifugation erfolgte, bei 200 x g für 5 min. Vor der letzten Zentrifugation wurden die Zellen gezählt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet mit dem Volumen Boyden Medium aufgefüllt, so dass sich eine Anzahl von 300.000 Zellen pro ml Medium befanden, was 15.000 Zellen/ well für den 96-well Boyden Chamber Assay entspricht.

PBS/ 0,1 % BSA

100 ml PBS

100 mg Bovines Serumalbumin (BSA)

Boyden Medium

200 ml DMEM

200 mg BSA

Das konditionierte Medium der CAF wurde mit dem Boyden Medium in einer Verdünnungsreihe von 0 % - 80 % angesetzt. Jede Verdünnungsstufe wurde als Triplet aufgetragen. Die untere Kammer der Boyden Chamber, bestehend aus 96 wells, wurde mit 32 µl CAF-Medium pro well luftblasenfrei befüllt, so dass sich ein positiver Meniscus ausbildete. Anschließend wurde die Kammer verschlossen. Die Zellen, HUH7 bzw. DLD1 wurden gut resuspendiert in jeweils 50 µl pro well, was 15.000 Zellen entspricht, luftblasenfrei in die obere Kammer pipettiert. Anschließend wurde das gesamte Boyden Chamber System 5 Stunden bei 37°C unter 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Kammer auseinandergelöst und alle Kammerteile, bis auf den Filter, in destilliertes Wasser gegeben. Die Oberseite des Filters (die nicht migrierte Seite) wurde mit einem Watteträger, der zuvor in Aqua dest.

getaucht wurde, vorsichtig abgewischt, um die nicht migrierten Zellen zu entfernen. Die Zellen der Unterseite des Filter wurden mit Diff Quick fixiert und gefärbt. Anschließend wurde der Filter unter der Werkbank getrocknet. Der Filter konnte nun unter dem Mikroskop betrachtet werden. Zunächst wurde bei geringer Vergrößerung die Verteilung der Zellen in jedem well beurteilt. Bei 40-facher Vergrößerung wurden 5 Felder pro well ausgezählt und das Ergebnis mit zwei multipliziert. Nach dem Zählen wurde die Standardabweichung zwischen den einzelnen Triplikaten berechnet und graphisch ausgewertet.

3.9 Bestimmung der Zytokine und Wachstumsfaktoren

Für die Bestimmung der Zytokine im Überstand wurde der Cytometric Bead Array (CBA) (Human Soluble Protein Flex Set, BD Biosciences, San Diego CA, USA) verwendet.

Der CBA ist eine Methode zum quantitativen Nachweis von Proteinen mittels Durchflusszytometrie. Nach 24-stündiger Inkubation wurde der Überstand gewonnen und mithilfe des CBA auf die Zytokine IL-6, IL-8, sowie die Faktoren bFGF und VEGF untersucht. Die Antikörper gegen die Zytokine wurden in Form von beads zu 50 µl des Überstandes gegeben. Diese beads besitzen unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten, die im Durchflußzytometer (BD FACSCanto™) identifiziert und so detektiert werden können. Die Beads sind mit Anti-Zytokin-Antikörpern beschichtet und binden an die freien Zytokine, die sich im Überstand befinden. Im Folgenden wurde der Detektionsantikörper hinzugefügt, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) konjugiert ist. Dieser bindet ebenfalls an das jeweilige Zytokin und kann im Durchflußzytometer detektiert werden. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Menge des gebundenen Zytokins oder Wachstumsfaktors. Als Kontrolle wurde ein Standard mit bekannter Zytokin-/ Wachstumsfaktorkonzentration mitgeführt. Die Durchführung erfolgte strikt nach dem Protokoll des Herstellers.

3.10. Nachweis spezifischer mRNA

3.10.1 RNA-Isolation aus der Zellkultur

Bei folgenden Arbeitsschritten musste darauf geachtet werden, dass die Präparation der RNA unter sorgfältigsten Bedingungen geschah. Alle verwendeten Materialien wurden, sofern sie nicht schon steril waren, autoklaviert und die Lösungen und Puffer unter

RNase-freien Bedingungen angesetzt. Diese Sorgfalt diente der Vermeidung der Zerstörung der RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen. Daher war es auch notwendig, dass einige Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt werden mußten.

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Zuerst wurden die verwendeten Zellen mit GBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen abtrypsiniert, aliquotiert und bei Raumtemperatur 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen und verworfen wurde, konnte das Pellet in frischem GBSS aufgenommen, homogenisiert und die Zellen gezählt werden. Es wurden bis zu 5×10^6 Zellen in ein RNase-freies 1,5 ml tube gegeben, welches erneut zentrifugiert wurde. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Dem Zellpellet wurde 1 ml RLT-Puffer und 10 μ l Mercaptoethanol hinzugefügt, die Suspension gevortext und anschließend 15 bis 30 min bei Raumtemperatur, unter mehrmaligem Vortexen, lysiert. Bis zur weiteren Verarbeitung bestand die Möglichkeit die Zellen bei -80°C wegzufrieren. Erfolgte eine Weiterverarbeitung der eingefrorenen Zellen, so wurden diese zunächst im Thermomixer 20 min bei 37°C aufgetaut, um eine Kristallisierung des RLT-Puffers zu vermeiden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zunächst gevortext, bevor weitere Arbeitsschritte vorgenommen wurden.

Anschließend wurden die Zellen auf eine Shredder Säule (QIAshredderTM, Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben, die auf ein 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt wurde und 2 min bei maximaler Umdrehungszahl mit $20.800 \times g$ zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 350 μ l 70 %-igem Ethanol in Sigma Water aufgefüllt, mit einer Pipette gut durchmischt und anschließend auf die RNeasy-Mini Kit Säulen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 20 s bei $10.600 \times g$. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden 700 μ l RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 20 s bei $10.600 \times g$ wurde der Durchfluss mitsamt Röhrchen verworfen und die Säule auf ein neues, 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde auf die Säule 500 μ l RPE-Puffer gegeben und eine Zentrifugation bei 10.000 rpm folgte für 20 s. Der Durchfluss wurde verworfen. Die letzten beiden Schritte wurden wiederholt, bevor die Säule auf ein neues, 2 ml Reaktionsgefäß gegeben wurde und diese erneut zentrifugiert wurde, diesmal bei maximaler Umdrehungszahl für 1 min. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml „Biopur“ tube gegeben und mit 30 - 50 μ l RNase- freiem Wasser aufgefüllt. Nachdem das Ganze für eine Minute stehen gelassen wurde, erfolgte eine letzte Zentrifugation bei $10.844 \times g$ für 1 min.

Abschließend wurde die Ausbeute der RNA mit dem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Hierzu wurden jeweils 2 µl RNA Eluat in 58 µl RNase-freies Wasser aus dem Mini Kit in eine Uvette gegeben, gut gemischt und im Photometer bei einer Extinktion von 260 nm gemessen.

3.10.2 Synthese mit Hilfe der Reversen Transkription

Im folgenden Schritt konnte die gewonnene RNA unter Zuhilfenahme des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Die Umschreibung der mRNA in cDNA ist notwendig, da diese für die folgende PCR benötigt wird. Bei der Gewinnung der cDNA dient die mRNA als Vorlage.

Ansatz

Sigma Water	7,2 µl
10 × Puffer	2,0 µl
25 mM MgCl ₂	4,0 µl
dNTP Mix 10 mM each	2,0 µl
Oligo dT Primer 0,8 µg/µl	2,0 µl
Rnase Inhibitor 50 U/µl	1,0 µl
AMV Reverse Transkriptase 25 U/µl	0,8 µl

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR (AMV, Roche). Der Ansatz (s.o.) wurde in ein spezielles, dünnwandiges und wärmeleitendes 0,2 ml tube (Gene Amp®, Applied Biosystems, Foster City, CA) gegeben. Der Lösung wurde 1,0 µg RNA Template hinzugefügt und vorsichtig mit der Pipette durchmischt. Anschließend wurde das tube in den Thermocycler verbracht. Hier erfolgte zunächst für 10 min bei 25°C die Anlagerung des Primers an die RNA. Danach wirkte bei 42°C für 60 min die Reverse Transkriptase. Im Anschluss erfolgte bei 99°C für 5 min die Denaturierung der entstandenen Doppelstränge. Damit die entstandene cDNA stabil blieb, wurde das Gemisch zum Schluss auf 4°C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur aufbewahrt, bis die weiteren Arbeitsschritte folgten oder bei -20°C gelagert.

3.10.3 Herstellen einer DIG-markierten Sonde

3.10.3.1 RT-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion bietet die Möglichkeit durch Auswahl zweier spezifischer Oligonukleotidsequenzen, den Primern, die einen Bereich des gesuchten Zielgens flankieren, diese DNA-Sequenz selektiv zu amplifizieren. Das Enzym Taq (*Thermophilus aquaticus*) Polymerase ist thermostabil, so dass es auch bei der Denaturierung des DNA-Doppelstranges in Einzelstrang-DNA aktiv bleibt und nach Anlagerung der Primer den komplementären Doppelstrang synthetisiert, wodurch eine logarithmische Zunahme der Ausgangs-DNA auftritt. Die Größe des gesuchten PCR-Produktes wird in einem 1,5 %-igen Agarosegel überprüft.

50 µl Reaktionsansatz

Sigma Water	40,75 µl
10 × PCR Puffer	5 µl
dNTP 10 mM each	1 µl
Primer sense 10 pmol/µl	1 µl
Primer antisense 10 pmol/µl	1 µl
Taq Polymerase 5 U/µl	0,25 µl
cDNA Template	1 µl

Bevor der Reaktionsansatz (s.o.), der in ein gut wärmeleitendes, dünnwandiges Gefäß pipettiert wurde, in den Thermocycler Biometra überführt wurde, erfolgte eine vorsichtige Durchmischung. Im Thermocycler wurde er unter folgenden Reaktionsbedingungen inkubiert:

Reaktionsbedingungen

95°C, 2 min		
95°C, 1 min	Denaturierung	} 35 Zyklen
60°C, 1,5 min	spez. Annealing Temperatur	
72°C, 1,5 min	Elongation	
72°C, 5 min		
4°C, ∞		

Um eine Verdunstung zu verhindern betrug die Deckeltemperatur 105°C.

Die Größe der PCR-Fragmente wurde in einem 1,5 % Agarosegel überprüft.

3.10.3.2 Herstellen eines 1,5 % Agarosegels und Gelelektrophorese

Um die Größe des hergestellten PCR-Produktes zu überprüfen, wurde dieses in einem 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im UV-Licht wurden die dabei entstandenen Banden sichtbar gemacht.

2,25 g Agarosepulver (Agarose, Invitrogen life technologies) wurde in 150 ml 1 × TBE Puffer gegeben und in der Mikrowelle aufgekocht, bis alle Agarosepartikel gelöst waren. Anschließend wurde in die Agarose-TBE-Lösung 8 µl 1 %-iger Ethidiumbromidlösung gegeben, durchgeschwenkt und zum Abkühlen kurz stehen gelassen, bis die Lösung handwarm war. Das Ethidiumbromid dient der Darstellung der getrennten Nukleotidfragmente. Die Ethidiumbromidmoleküle interkalieren zwischen den Basenpaaren. Mittels UV-Licht werden zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und es kommt zum Sichtbarwerden der Banden. Das abgekühlte, jedoch noch handwarme Gel wurde nun luftblasenfrei ins Tray gegossen, in dem ein für die Taschenbildung vorgesehener Kamm, eingespannt war. Das gegossene Gel wurde nun 30-45 min stehen gelassen, damit es abkühlte und härtete. Der Tray wurde nun in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit 1 × TBE-Puffer aufgefüllt, so dass das Gel knapp bedeckt war. Anschließend wurde der Kamm aus dem Gel entfernt, in dem sich nun die Taschen befanden. Nun folgte die Gelelektrophorese, bei der Nukleinsäuren entsprechend ihrer Ladung in dem Agarosegel im elektrischen Feld wandern können. Sie sind bei einem pH-Wert von 8 durch ihren Phosphatrest negativ geladen und wandern zur Anode, wobei sie nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

1 µl 6 × Loading Dye und 5 µl des PCR-Produkts wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben und gut durchmischt. Als Marker diente der Standard DNA-Marker, DNA Ladder Mix (Fermentas). Nach Einpipettieren des Markers und der Proben in die Taschen des hergestellten 1,5 % Agarosegels, wurde der Horizontallaufträger (Sub-Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit einem Deckel verschlossen und die Spannung angelegt. Zunächst wurde für 10 min eine Spannung von 80 V. Der Auftrennungsvorgang erfolgte für 1,5 Stunden bei 120 V.

Abschließend wurde das Gel unter UV-Licht (Gelprinter MWG-Biotech GmbH, Ebersberg, Deutschland) fotografiert.

3.10.3.3 DIG-PCR

Erbrachte die Gelelektrophorese das gewünschte Ergebnis und das PCR-Produkt hatte die erwartete Größe, wurde die DIG-PCR durchgeführt, um das hergestellte Fragment mit Digoxigenin zu markieren und zu vervielfältigen.

Verwendet wurde hierbei das PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

50 µl Ansatz

Sigma Water	33,25 µl
10 × PCR Puffer mit 15 mM MgCl ₂	5 µl
10 × PCR DIG Probe Syntheses mix (Labeling Mix-2 mM each dNTP)	5 µl
Primer antisense 10 pmol/µl	1 µl
Enzym Mix Expand high Fidelity 3,5 U/µl	0,75 µl
RT-PCR Template	5 µl

Die Reagenzien wurden gut miteinander vermischt und anschließend in den Thermocycler Biometra überführt und nach denselben Reaktionsbedingungen, wie bereits in Kapitel 3.10.3.1 beschrieben, behandelt.

Nach Ablauf der Reaktionsschritte wurde abschließend 5 µl des PCR-Produktes und 1 µl 6 × Loading Dye auf ein Agarosegel gegeben und wie bereits beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt. Das Chemolumineszenz-Signal wurde mit dem PhotoImager (Fluor-STMMultiImager, Bio Rad, München, Deutschland) gemessen. Entsprechend den geforderten Ansprüchen, so wurden die restlichen 45 µl des Produktes in 15 ml Puffer (DIG Easy Hyb, Roche) bei -20°C gelagert und stand für die folgenden Versuche zur Verfügung.

3.10.4 Northern Blot Analysen

3.10.4.1 Northern Blot

Der Northern Blot ist eine molekularbiologische Methode zur Übertragung der in der Gelelektrophorese aufgetrennten RNA auf eine Membran. Durch Hybridisierung mit komplementären Sonden ist die spezifische Markierung von RNA-Sequenzen auf der Membran möglich.

Für den ausgeführten Kapillarblot, bei dem durch Sog RNA-Fragmente aus dem Gel auf die Membran transferiert wurde, wurden folgende Reagenzien benötigt:

5 × Gel Running Buffer (nach Maniatis)

100 mM Mops (Sigma)

40 mM Sodium Acetat (Sigma)

5 mM EDTA (Sigma)

50 mM Na-Acetat

Sigma Water

Zunächst wurden 50 mM Na-Acetat (3,28 g) in 800 ml Sigma Water gelöst. Der Lösung wurden 20,9 g Mops und 10 ml 0,5M EDTA Lösung hinzugefügt. Mit Hilfe von 2N NaOH wurde der pH-Wert auf 7 eingestellt. Getestet wurde dieses, indem die Lösung mit einer Pipette auf den pH Indikatorstreifen (Merck, Darmstadt, Deutschland) geträufelt wurde. Anschließend wurde die Lösung mit Sigma Water auf 1 Liter aufgefüllt. Der nun fertige Puffer wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt.

6 × Loading Dye Solution (Fermentas)

1,33 × Sample Buffer, zu dessen Herstellung 1 Teil Probe und 3 Teile Puffer gemischt wurden und man folgendes für eine Probe benötigte:

5 × Running Buffer	2 µl
37 % Formaldehyd (Sigma)	3,5 µl
Formamid (Sigma)	10 µl

RNA Molekular Weight Marker 1 DIG gelabelt, 0,3-6,9 Kb (Roche)

3.10.4.2 Gelelektrophorese

Für die folgende Gelelektrophorese wurde ein 1 % RNA-Agarose Gel hergestellt. Hierzu wurden für 250 ml 2,5 g Agarose (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) in 187,5 ml Sigma Water und 50 ml 5 × Running Buffer (s.o.) gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf 60°C wurden der Lösung 5 µl 1 % Ethidiumbromidlösung sowie 12,5 ml 37 % Formaldehyd beigefügt, geschwenkt und

sofort in den dafür vorgesehenen Tray gegeben. Unter dem Abzug ließ man das gegossene Gel eine Stunde lang fest werden. In dieser Zeit erfolgte die Vorbereitung der Proben. Hierzu wurden 10 µg der isolierten Gesamt-RNA mit Sigma Water auf ein Volumen von 10 µl egalisiert und diesem 30 µl 1,33 × Sample Buffer hinzugefügt. Die Lösung wurde durchmischt und 15 min bei 65°C inkubiert, 3 min auf Eis gesetzt und anschließend 1 min bei 10.844 × g abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden der Lösung 5 µl 6 × Loading Dye hinzugefügt.

Zur Vorbereitung des RNA-Markers wurden 5 µl RNA-Marker mit 12,5 µl Sample Buffer vermischt. Die weiteren Schritte entsprachen denen der Probearbeitung. Nach Zentrifugation wurden der Lösung 3,5 µl 6 × Loading Dye hinzugefügt.

Nachdem das Gel fest geworden war, erfolgte zunächst ein Gelvorlauf ohne Probe bei 80 V für 15 min. Danach wurden die Proben in die Taschen pipettiert und bei 80 V 2 Stunden laufen gelassen.

3.10.4.3 Durchführen des Northern Blots

Nach der zweistündigen Laufzeit wurde das Gel fotografiert, zurechtgeschnitten und für 10 min in Sigma Water inkubiert. Danach erfolgte dreimal ein 15-minütiges Equilibrieren in 20 × SSC-Puffer. An die Inkubation schloss sich der Blot an, der wie folgt aufgebaut wurde.

Eine Plastikwanne, mit einer Glasplatte abgedeckt, wurde mit 20 × SSC-Puffer aufgefüllt. Die Platte wurde mit 2 Whatman Paper Streifen (Schleicher & Schuell), die Kontakt mit dem Puffer in der Wanne hatten, bedeckt. Nach allen Seiten hin wurde diese mit Parafilm abgedichtet. Auf das Whatman Paper wurde das Gel mit den Taschen zu diesem weisend, gelegt. Auf dieses wurde die Nylon Transfer Membran (Amersham) und zwei weitere mit 2 × SSC-Puffer durchtränkte Whatman Paper aufgetragen. Darauf wurde Zellstoff, mit einer Höhe von ca. 10 cm geschichtet, der mit einer Glasplatte und darauf einem 750 g schweren Gewicht beschwert wurde. Das Gel verblieb nun für 20 Stunden in diesem Aufbau. In dieser Zeit erfolgte die Übertragung der in der Gelelektrophorese aufgetrennten RNA auf die Nylon Transfer Membran.

Am nächsten Tag wurde der Blot vorsichtig abgebaut und die Membran unter UV-Licht fotografiert. Abschließend wurde die Membran in den Crosslinker (Hoefer) gelegt und von vorn nach hinten gecrosslinked, um die RNA mit der Membran zu vernetzen.

3.10.4.4 Hybridisierung

Zur Prähybridisierung wurde die Membran in die mit 10 ml DIG Easy Hybridisierungspuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) vorbereitete Roller Bottle (Roche) luftblasenfrei überführt. Die Prähybridisierung erfolgte bei 50°C 1 Stunde im Hybridisierungssofen (Amersham Pharmacia, Biotech Europe GmbH, Little Chalfort, GB). Währenddessen wurde die Sonde (45 µl) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 15 ml DIG Easy Hyb gegeben und bei 65°C-68°C 10 min im Wasserbad linearisiert. Nach Ablauf der Prähybridisierungszeit wurde der Prähybridisierungspuffer dekantiert und die vorbereitete, linearisierte Sonde in die Roller Bottle gegeben. Die Hybridisierung erfolgte unter ständiger Rotation im Hybridisierungssofen bei 50°C für 20 Stunden.

3.10.4.5 Detektion der DIG-markierten Nukleinsäuren

Nach erfolgter 20-stündiger Hybridisierung erfolgte das Waschen der Membran. Hierbei wurde das DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Membran wurde in aufgeführter Reihenfolge mit folgenden Puffern gewaschen:

2 × SSC Waschlotion

25 ml 20 × SSC

+ 2,5 ml 10 % SDS-Lösung

ad 250 ml aqua dest.

Dies erfolgte zweimal für 15 min.

0,5 × SSC Waschlotion

6,25 ml 20 × SSC

2,5 ml 10 % SDS-Lösung

ad 250 ml Aqua dest.

Dies erfolgte zweimal für 15 min bei 68°C.

Washing Buffer

40 ml Washing Buffer (Lösung 1 im Kit)

ad 400 ml aqua dest.

Darin inkubierte die Membran 5 min.

Blocking Solution

15 ml Blocking Solution (Lösung 3 im Kit)
+ 13,5 ml Maleic Acid Buffer (Lösung 2 im Kit)
ad 150 ml aqua dest.

In dieser Lösung inkubierte die Membran 60 min.

Nach diesen Waschsritten wurde die Membran für 30-60 min mit dem mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-DIG-Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP conjugate, Fab fragmente, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), zusammengesetzt aus 50 ml Blocking solution und 2,5 µl Antikörper (Verdünnung 1 : 20.000), inkubiert.

Im Anschluß folgten weitere Waschsritte:

Mit dem

Washing Buffer (s.o.)

zweimal für 15 min

und für 5 min inkubierte die Membran im

Detection Buffer

5 ml (Lösung 4 im Kit)

ad 50 ml aqua dest.

Nach erfolgten Waschvorgängen wurde die Membran 5 min in dem Chemilumineszenz (CDP-Star ready to use, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Im Anschluß daran wurde sie in den Phospho-Imager (Fluor-STM MultiImager, Bio Rad, München, Deutschland) gegeben. Das Lesen des Chemilumineszenz-Signals erfolgte bei einer Belichtungszeit von 300 s.

3.11 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Proliferationsmessung wurden auf ihre statistische Signifikanz hin untersucht. Jeder Versuch wurde mindestens in Triplikatform durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Aus mehreren unabhängigen Versuchen wurde der Mittelwert und der Standardfehler (SEM) hinsichtlich der gemessenen Effekte ermittelt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). 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 Morphologie primärkultivierter CAF

Die nach der Isolation auf die Kulturplatten ausplattierten Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten aus den kolorektalen Lebermetastasen adhärten im Allgemeinen nach 24 Stunden. Morphologisch handelt es sich bei diesen Zellen um spindelförmige, verzweigte Zellen, die durch verschieden breite Zytoplasmafortsätze miteinander in Verbindung stehen. Ihr Zelleib ist platt. Ihr relativ großer, chromatinhaltiger Zellkern hat die Form eines Ellipsoids und enthält ein bis mehrere kleine Nukleolen.

Initial kontaminierende Hepatozyten und sinusoidale Endothelzellen konnten unter den Kulturbedingungen nicht anwachsen, so dass davon auszugehen ist, dass es sich um eine weitgehend reine Zellkultur handelt.

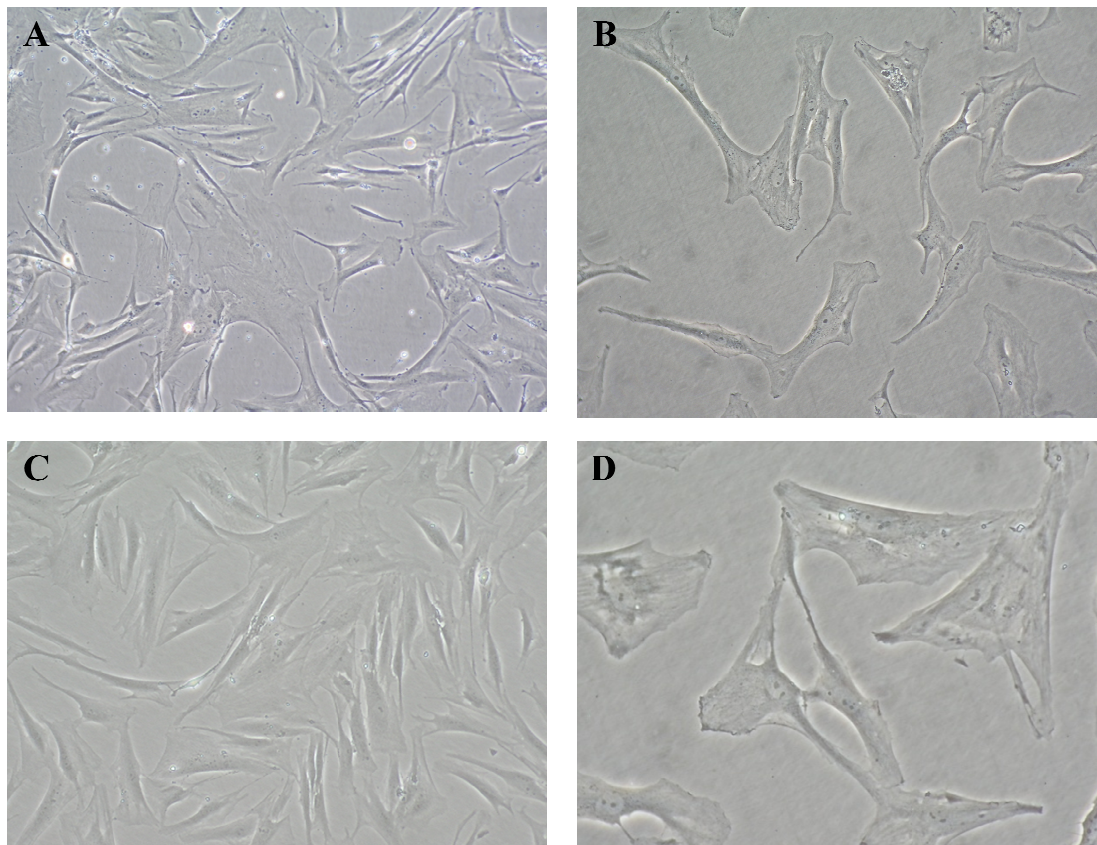


Abb. 1: A+B: Primärkultivierte CAF aus kolorektalen Lebermetastasen nach 24-stündiger Inkubation unter serumreduzierten Bedingungen, DMEM + 0,5% FBS; (A: 100-fache Vergrößerung, B: 400-fache Vergrößerung). C+D: CAF nach 24-stündiger Inkubation unter Kulturbedingungen, DMEM + 10 % FBS, (C: 100-fache Vergrößerung, D: 400-fache Vergrößerung).

4.2 Charakterisierung der CAF in situ und in vitro

Neben der Beurteilung im inversen Mikroskop wurden die Zellkulturen immunzytochemisch untersucht. Zur Charakterisierung und Identifizierung der Zellen, wurden diese auf chamber slides kultiviert, fixiert und mittels immunhistochemischer Färbungen auf charakteristische Markerproteine hin untersucht. Die Zellen waren positiv für α -SMA und Vimentin. Diese Marker sind charakteristisch für den myofibroblastischen Phänotyp.

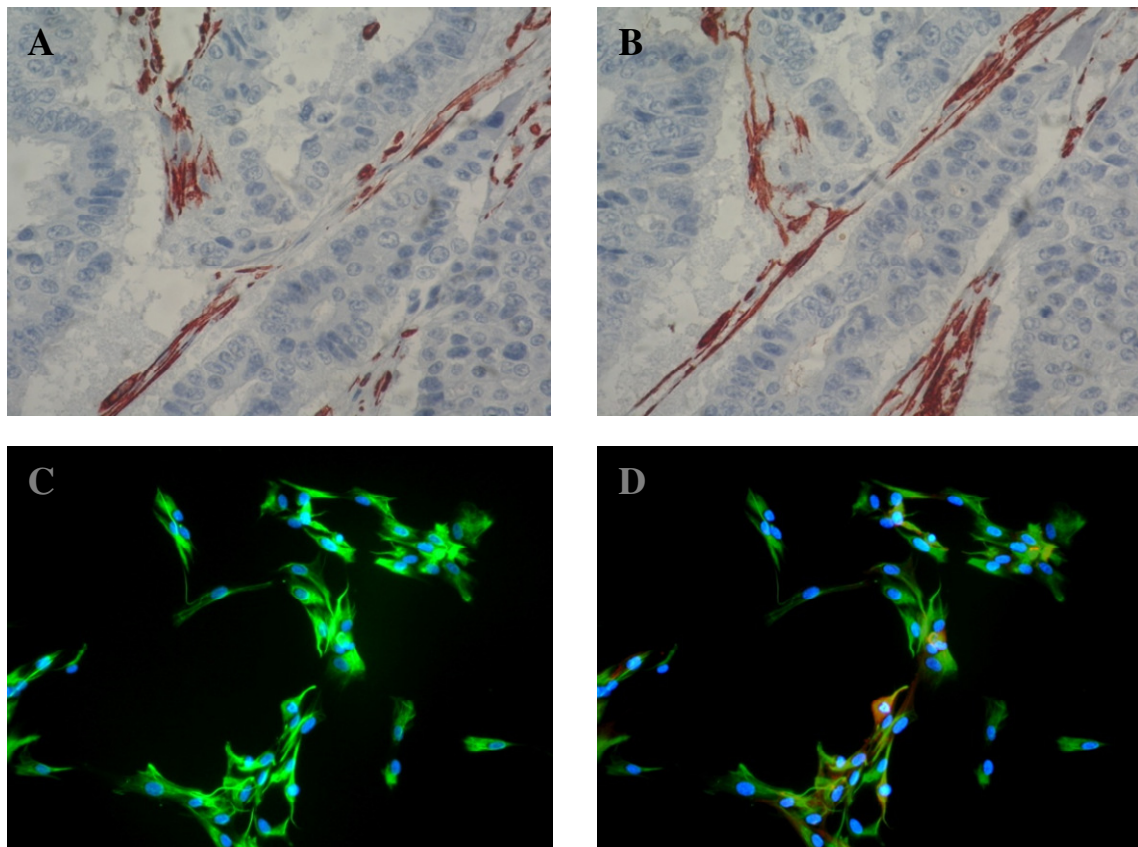


Abb. 2: Lokalisation und Phänotyp der CAF aus kolorektalen Lebermetastasen. A+B: Immunhistochemie nach Serienschnitten aus Lebermetastasen, positiv (rot) für Vimentin (A) und α -SMA (B), weisen auf einen myofibroblastischen Phänotyp der CAF hin, die sich im Tumorstroma finden. C: Immunfluoreszenz kultivierter CAF gegen Vimentin (grün). D: Vimentin + α -SMA (α -SMA: rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Originalgröße 400 \times . Die Fotos repräsentieren 4 unabhängige Versuche von 4 Patienten.

Zur Charakterisierung der Gewebeprobe aus den kolorektalen Lebermetastasen wurden Kryogewebeschnitte angefertigt und gefärbt. Diese immunhistochemischen Färbungen der Gewebeprobe zeigten, dass die Mehrzahl der Zellen an der Grenzregion, die tumorfreies gesundes Gewebe darstellt, positiv für Vimentin und α -SMA sind. Positivität für diese beiden Marker zeigten auch die Zellen in den fibrösen Septen der Gewebeprobe.

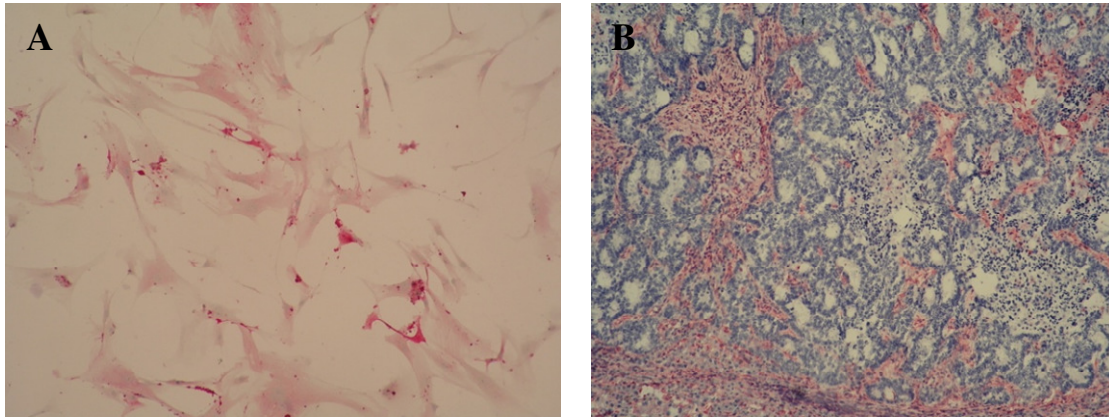
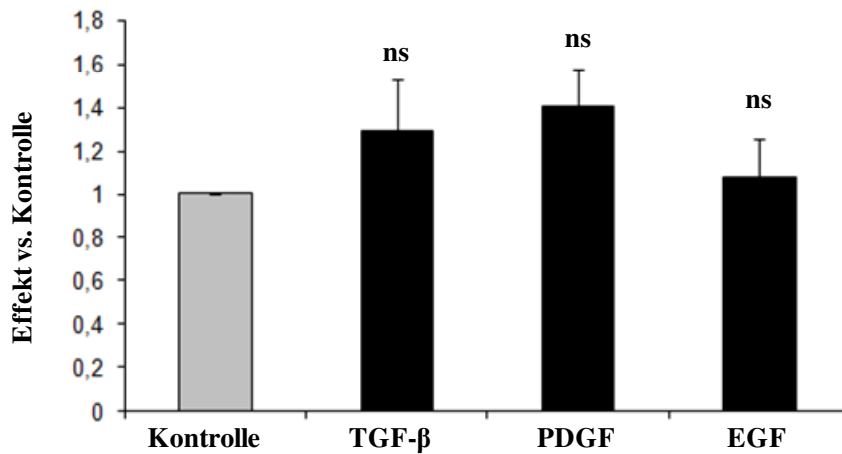


Abb. 3: A: CAF wurden auf chamber slides kultiviert. Anschließend erfolgte eine immunzytochemische Färbung gegen α -SMA. B: Immunhistochemie nach Kryogewebeschnitten von Lebermetastasen, gefärbt gegen Vimentin (rot); Grenzregion zwischen kolorektaler Lebermetastase und normalem Lebergewebe.

4.3. Effekte von TGF- β , PDGF-BB und EGF

Der Einfluß der Zytokine TGF- β , PDGF-BB und EGF auf die Proliferation wurde mit dem Methyl- 3 H-Thymidin-Assay und der Zellzählung unter dem Mikroskop statistisch ermittelt. Nach 24-stündiger Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-BB, 5 ng/ml TGF- β , bzw. 10 ng/ml EGF unter serumreduzierten Bedingungen (DMEM + 0,5 % FBS), erfolgten die Assays. Es zeigte sich bei den Myofibroblasten, die aus dem tumorfreien Lebergewebe stammten, 3 cm von der Metastase entfernt, ein geringer Anstieg der DNA- Syntheserate, der jedoch statistisch nicht signifikant war (Abb. 4A). CAF zeigten nach 24-stündiger Inkubation mit humanem PDGF-BB einen signifikanten Anstieg der DNA-Syntheserate auf das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4B). Wurden die CAF für 24 h mit TGF- β oder EGF inkubiert, so wurde die Syntheserate geringfügig gesenkt, es besteht jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 4B).

A



B

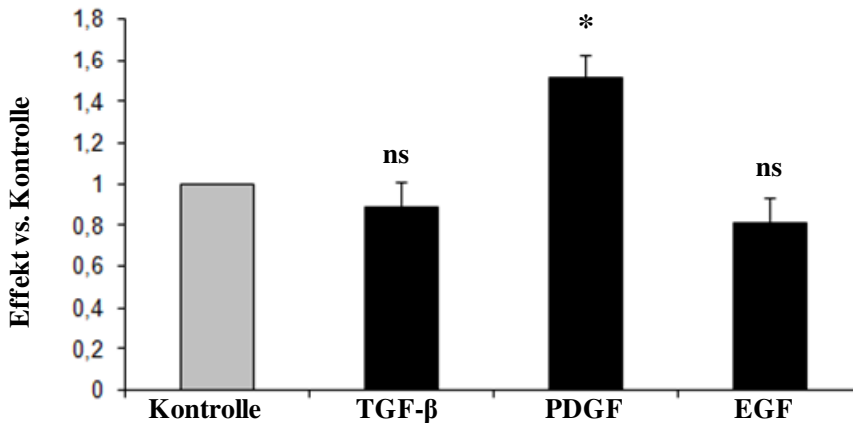


Abb. 4: ³H-Thymidin-Inkorporationsmethode. A: Proliferation der Fibroblasten aus tumorfreiem Lebergewebe nach 24-stündiger Inkubation mit den Mediatoren PDGF-BB (10 ng/ml), TGF-β (5 ng/ml) und EGF (10 ng/ml) B: Proliferation der CAF nach 24-stündiger Inkubation mit den Mediatoren PDGF-BB (10 ng/ml), TGF-β (5 ng/ml) und EGF (10 ng/ml). N=5; * p < 0,05; ns, nicht signifikant.

Bei der Zellzählung unter dem Mikroskop (Abb.5) zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Proliferationsanstieg der CAF unter dem Einfluß des Zytokins PDGF-BB. Die Zellzählung erfolgte nach einem Tag, nach drei und schließlich nach fünf Tagen. Das Medium bzw. die Wachstumsfaktoren wurden alle 72 Stunden erneuert. Im Verlauf der Kultur konnte unter Stimulation mit 10 ng/ml PDGF-BB ein stetiger Anstieg der Proliferation beobachtet werden.

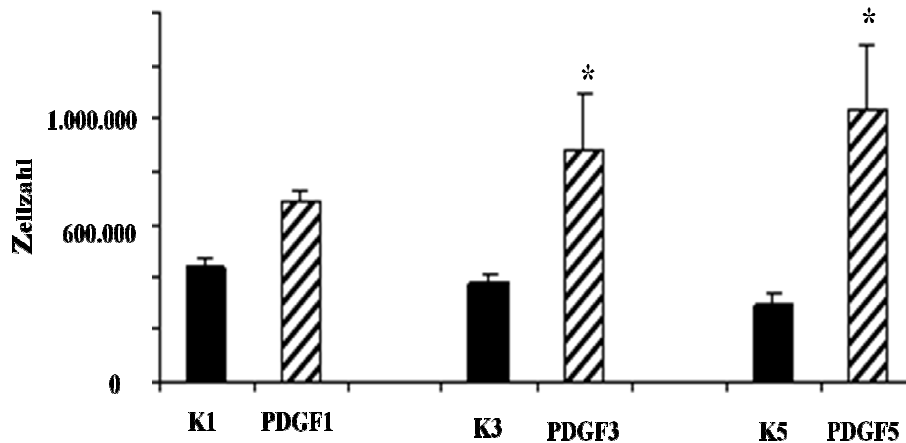
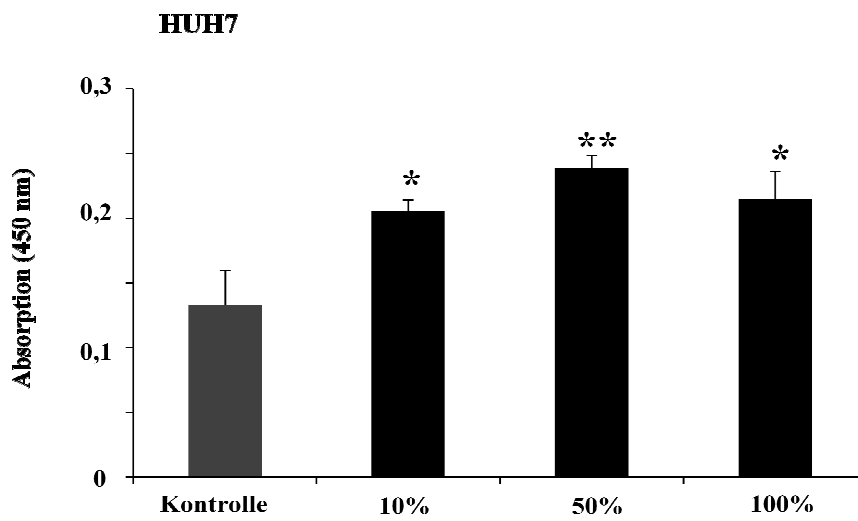


Abb. 5: Proliferation der CAF aus kolorektalen Lebermetastasen nach 24-stündiger Inkubation mit PDGF-BB. Zellzählung unter dem Mikroskop 1, 3 und 5 Tage nach Stimulation mit PDGF-BB (10 ng/ml); K=Kontrolle. N=5, * $p < 0,05$.

4.4 Einfluss von CAF-Medium auf die Proliferation von HUH7 und DLD1

Nach der Untersuchung des Einflusses verschiedener Wachstumsfaktoren auf die CAF, wurde nun der Einfluss des Fibroblastenmediums auf die Proliferation von HUH7 und DLD1 evaluiert. Das konditionierte Medium wurde hierbei in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben. Die Untersuchungen erfolgten mit dem WST-Assay, bei dem die metabolische Aktivität der Zellen gemessen wird. 24 Stunden nach Aussaat der Zellen (3000 Zellen/well) wurden je well 10 μ l des Reagenz hinzugegeben. Die kolorimetrischen Messungen wurden 4 Stunden nach Zugabe des Reagenz durchgeführt. Wie in der Abbildung 6A erkennbar ist, zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (0,5 % FBS) bereits bei einer Konzentration von 10 % CAF-Medium ein signifikanter Proliferationsanstieg der HUH7. Bei einer Konzentration von 50 % des konditionierten Mediums ist der größte Effekt erkennbar ($p < 0,005$). Das Maximum der Proliferation liegt bei 4 Stunden nach Zugabe des Reagenz. Sechs Stunden nach Zugabe ist kein weiterer Proliferationsanstieg zu verzeichnen (nicht dargestellt). Während das konditionierte Medium die Proliferation der HUH7 signifikant beeinflusst, zeigt sich bei den DLD1 (Abb. 6B), unabhängig von der Konzentration kein signifikanter Effekt. Die Proliferation der DLD1-Zellen unter dem Einfluss von CAF-Medium verhält sich ähnlich der Kontrolle. Die Auswertungen ergeben keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten.

A



B

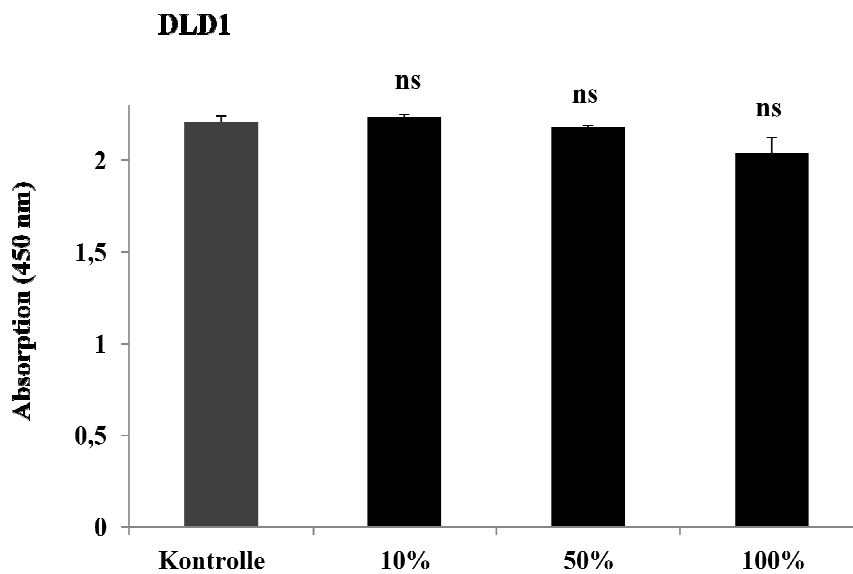
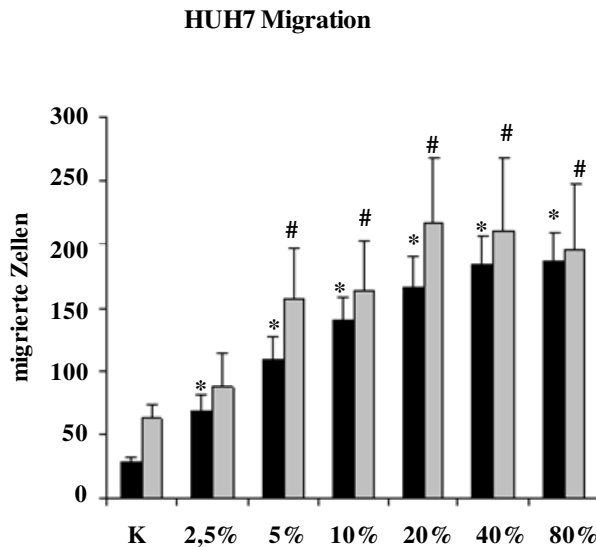


Abb. 6: WST-Assay. A: HUH7 wurden mit konditioniertem Medium, gewonnen aus Zellkulturüberständen der CAF, 24 h inkubiert. Die Konzentration des CAF-Mediums betrug 10 %, 50 % und 100 %. B: DLD1 wurden mit konditioniertem Medium, gewonnen aus Zellkulturüberständen der CAF, 24 h inkubiert. Die Konzentration des CAF-Mediums betrug 10 % 50 % und 100 %. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, N=5.

4.5 Einfluss von CAF-Medium auf die Migration von HUH7 und DLD1

Nachdem ein Effekt des konditionierten Mediums auf die Proliferation der HUH7 erkennbar ist, ist es nun interessant zu untersuchen, ob konditioniertes Medium ebenfalls Einfluss auf die Migration der Zelllinien HUH7 und DLD1 hat und ob sich der Effekt gleichsinnig zu dem der Proliferation verhält.

A



B

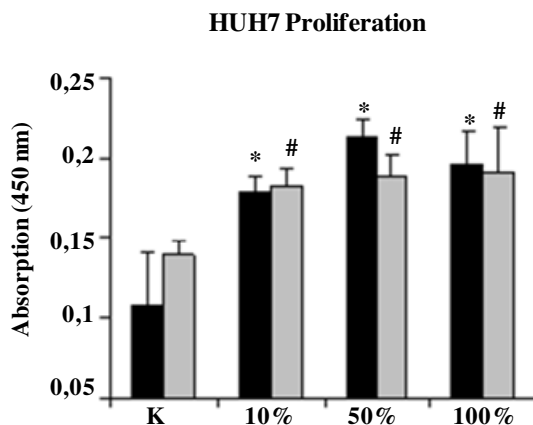


Abb. 7: Gegenüberstellung der Migration (A) und der Proliferation (B) der HUH7 nach Inkubation mit konditioniertem Medium der CAF in verschiedenen Konzentrationen. A: Die Chemotaxis der HUH7-Zellen wurde anhand des Boyden Chamber Assay nach 5-stündiger Inkubation mit CAF-Medium ermittelt, wie in Kapitel 3.8 beschrieben. B: Die Proliferation der HUH7 wurde nach 24-stündiger Inkubation mit CAF-Medium in den Konzentrationen 10%, 50%, sowie 100% anhand des WST-Assays ermittelt, beschrieben in Kapitel 3.5.3. Grauer Balken: Fibroblasten aus tumorfreiem Lebergewebe; schwarzer Balken: CAF. K=Kontrolle, N=5, * $p < 0,01$ und # $p < 0,001$ vs Kontrolle.

Um den Einfluss des konditionierten Mediums von CAF auf die Migration von HUH7 und DLD1 zu untersuchen, wurden Boyden Chamber Assays durchgeführt. Hierzu wurde aufkonzentriertes CAF-Medium in steigender Konzentration in die wells gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden, bzw. 24 Stunden ließen sich die folgenden Effekte, gezeigt in den Abbildungen 7 und 8, beobachten. Konditioniertes Medium erhöhte signifikant die Anzahl der migrierten Zellen, sowohl von HUH7, als auch der DLD1.

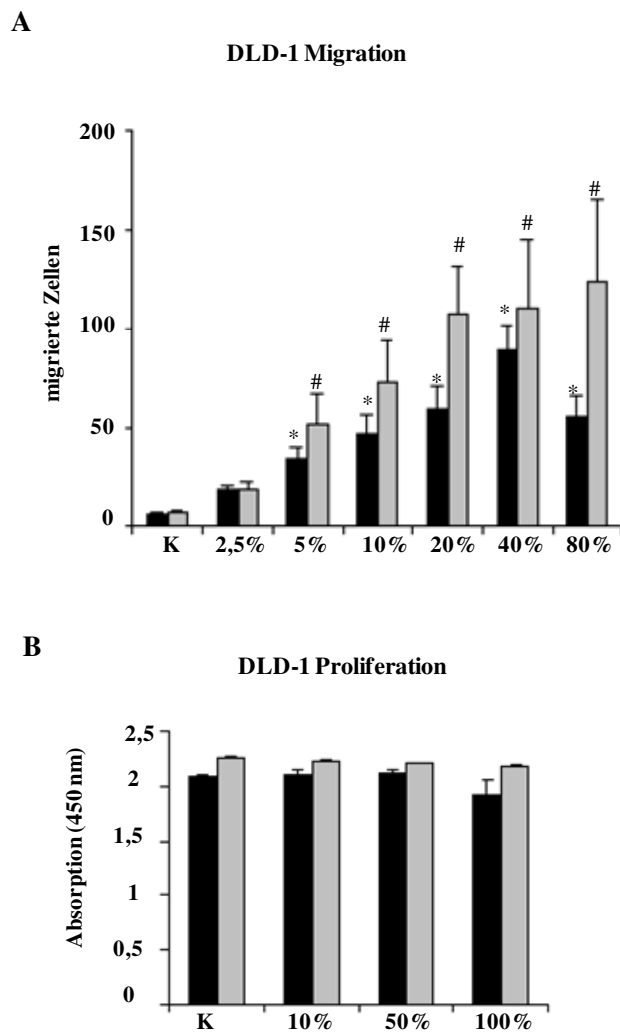


Abb. 8: Gegenüberstellung der Migration (A) und der Proliferation (B) der Kolonkarzinomzelllinie DLD1 nach Inkubation mit konditioniertem Medium der CAF in unterschiedlichen Konzentrationen. A: Die Chemotaxis der HUH7-Zellen wurde anhand des Boyden Chamber Assay ermittelt, wie in Kapitel 3.8 beschrieben. B: Die Proliferation der DLD1 wurde nach 24-stündiger Inkubation mit CAF-Medium in den Konzentrationen 10%, 50%, sowie 100% anhand des WST-Assays ermittelt, beschrieben in Kapitel 3.5.3. Grauer Balken: Fibroblasten aus tumorfreiem Lebergewebe; schwarzer Balken: CAF. K=Kontrolle, N=5, * $p < 0,01$ und # $p < 0,001$ vs Kontrolle.

Der Migrationsanstieg erfolgte, wie aus den Abbildungen ersichtlich wird, konzentrationsabhängig. Bei einer 40 %-igen Konzentration des CAF-Medium war die Migration beider Zelllinien am Höchsten. Dieses impliziert, dass in diesem Konzentrationsbereich die für die Migration wichtigen Faktoren in einem migrationsfördernden und somit in einem ausreichenden Verhältnis für die stattfindenden Zellinteraktionen vorliegen.

4.6 Expression von PDGF- Rezeptoren

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von PDGF-BB ein signifikanter Proliferationsanstieg der CAF zu erkennen ist. Die folgenden Untersuchungen sollten feststellen, ob mRNA für PDGF- α - und PDGF- β -Rezeptoren exprimiert wird. Hierfür wurden sowohl die Myofibroblasten, um den Interaktionsmechanismus besser zu verstehen, als auch die Tumorzellen selbst auf die spezifische mRNA- Expression hin untersucht.

Die CAF exprimierten sowohl mRNA für den PDGFR- α also auch für den PDGFR- β . Die humanen Hepatomzellen HUH7 exprimierten nur mRNA für den PDGFR- α , während die Kolonkarzinomzelllinie SW480 für beide Transkripte negativ war.

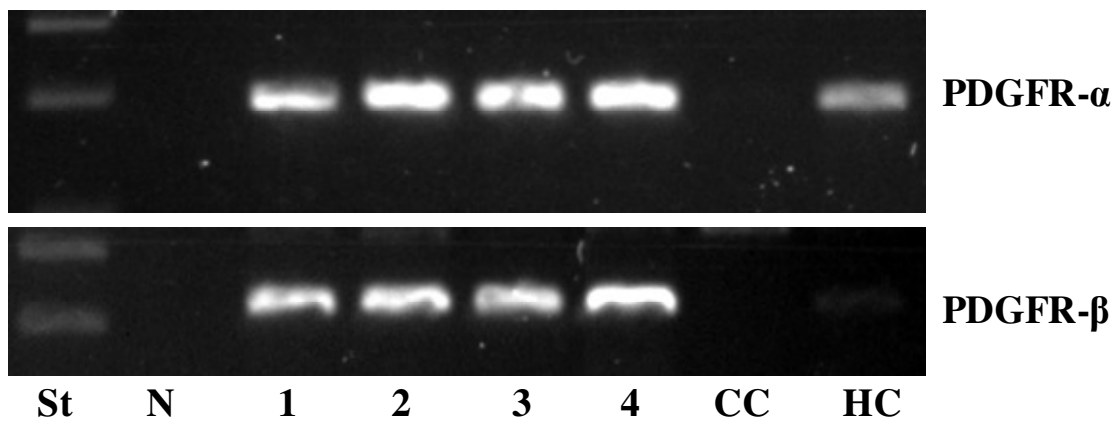


Abb. 9: RT-PCR-Analyse von PDGFR- α - und PDGFR- β -mRNA aus 4 verschiedenen CAF-Isolationen [1-4], SW480 Kolonkarzinomzellen (CC) und HUH7-Zellen (HC). St, Standard Molekulargewicht; N, negative Kontrolle.

Mittels ELISA- Messungen konnte eine potentielle Stimulation, durch autokrine PDGF-Freisetzung aus den Myofibroblasten der kolorektalen Lebermetastasen selbst, ausgeschlossen werden. Hierzu wurden sowohl Fibroblasten, als auch Zellkulturüberstände untersucht. Verwendet wurden Überstände von CAF, nach vorheriger 24-stündiger Inkubation mit 1 μM und 10 μM Imatinib, sowie DMSO als Kontrolle. Eine PDGF- Freisetzung aus den Zellen, die oberhalb der minimal detektierbaren Menge von 15 pg/ml liegt, fand nicht statt.

4.7 Einfluss von Imatinib auf CAF

Imatinib hemmt selektiv die Tyrosinkinase Abl, Bcr-Abl, Tel-Abl, PDGF-R, tel-PDGF-R und c-kit (Druker et al., 2000). Erstmals wurde das Medikament erfolgreich in der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt. Es verdrängt ATP von der spezifischen Bindungsstelle an der Tyrosinkinasedomäne von Abl und verhindert somit die Phosphorylierung von Substraten.

Wie die Untersuchungen der Myofibroblasten aus den kolorektalen Lebermetastasen gezeigt haben, weisen diese im Gegensatz zu der Kolonkarzinomzelllinie SW480, eine Positivität für den PDGF-R- α und PDGFR- β auf. PDGF-Rezeptoren besitzen eine Rezeptor-Tyrosinkinase und können somit für das Medikament Imatinib einen möglichen Angriffspunkt darstellen.

Um mögliche Auswirkungen von Imatinib auf die Myofibroblasten aus den kolorektalen Lebermetastasen zu erfassen wurde in der vorliegenden Studie der Einfluß des Tyrosinkinaseinhibitors hinsichtlich der Zellmorphologie, Proliferation, sowie Zellviabilität untersucht.

4.7.1 Morphologische Untersuchungen nach Inkubation mit Mediatoren

Der Effekt von PDGF-BB und/ oder Imatinib auf die Zellmorphologie der Myofibroblasten wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Hierzu wurden die Zellen jeweils 24 und 72 Stunden mit den Mediatoren inkubiert. Als Mediatoren dienten PDGF-BB in einer Konzentration von 10 ng/ml und Imatinib in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM . Die Zellen wurden entweder nur mit PDGF-BB oder Imatinib inkubiert oder mit beiden Faktoren in unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 10A und 10B).

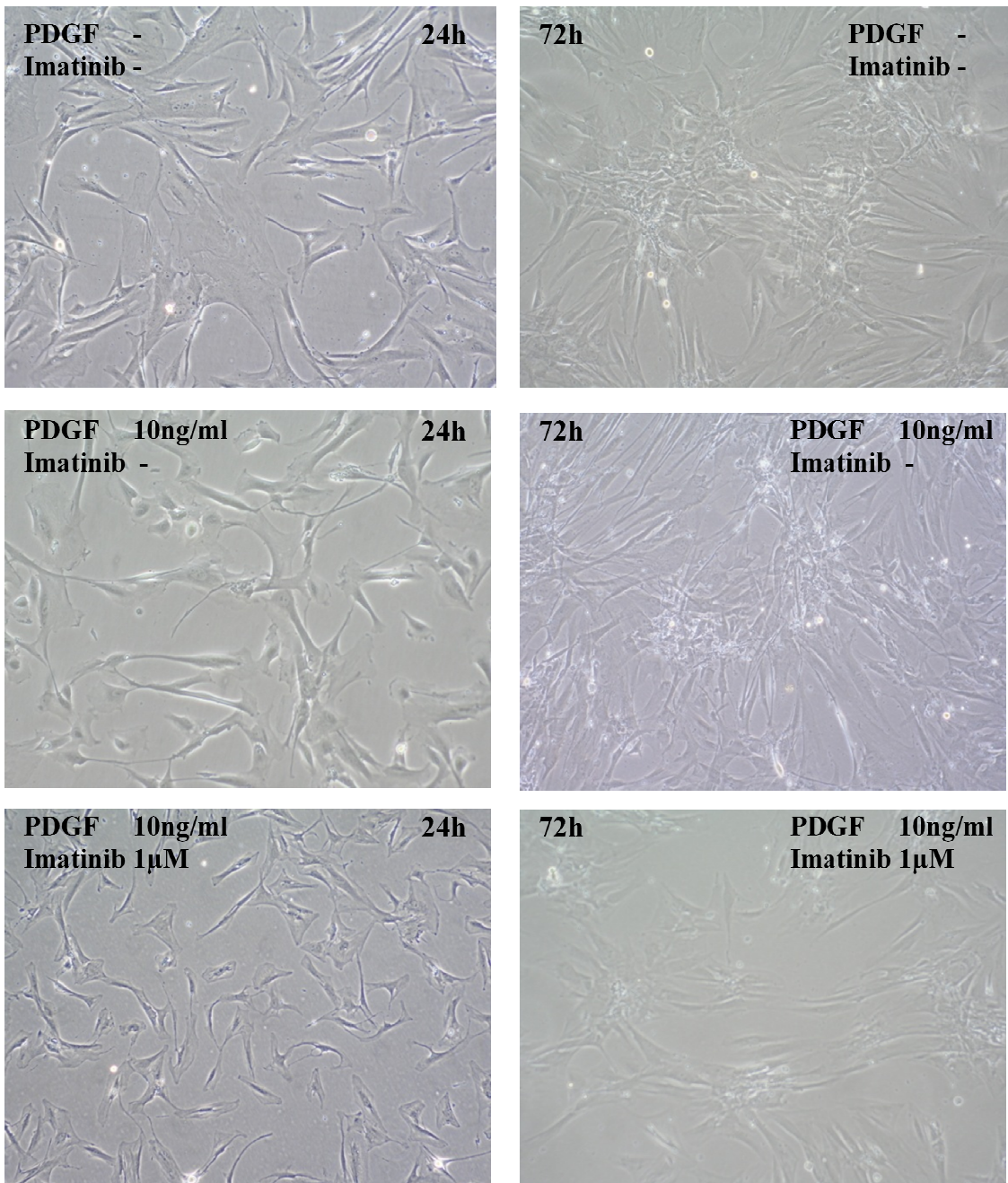


Abb. 10A: Effekt von Imatinib und PDGF-BB, jeweils alleine oder in Kombination, auf die Fibroblastenmorphologie nach Inkubation mit ansteigender Konzentration von Imatinib. 1×10^6 Zellen wurden auf 145 cm^2 Kulturplatten ausgesät und für 24 h in DMEM + 10 % FBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 % FBS inkubiert, ohne oder mit PDGF-BB (10 ng/ml) und ohne oder mit Zusatz von $1 \mu\text{M}$ Imatinib. 24 h bzw. 72 h später wurden repräsentative Areale fotografiert, 100-fache Vergrößerung.

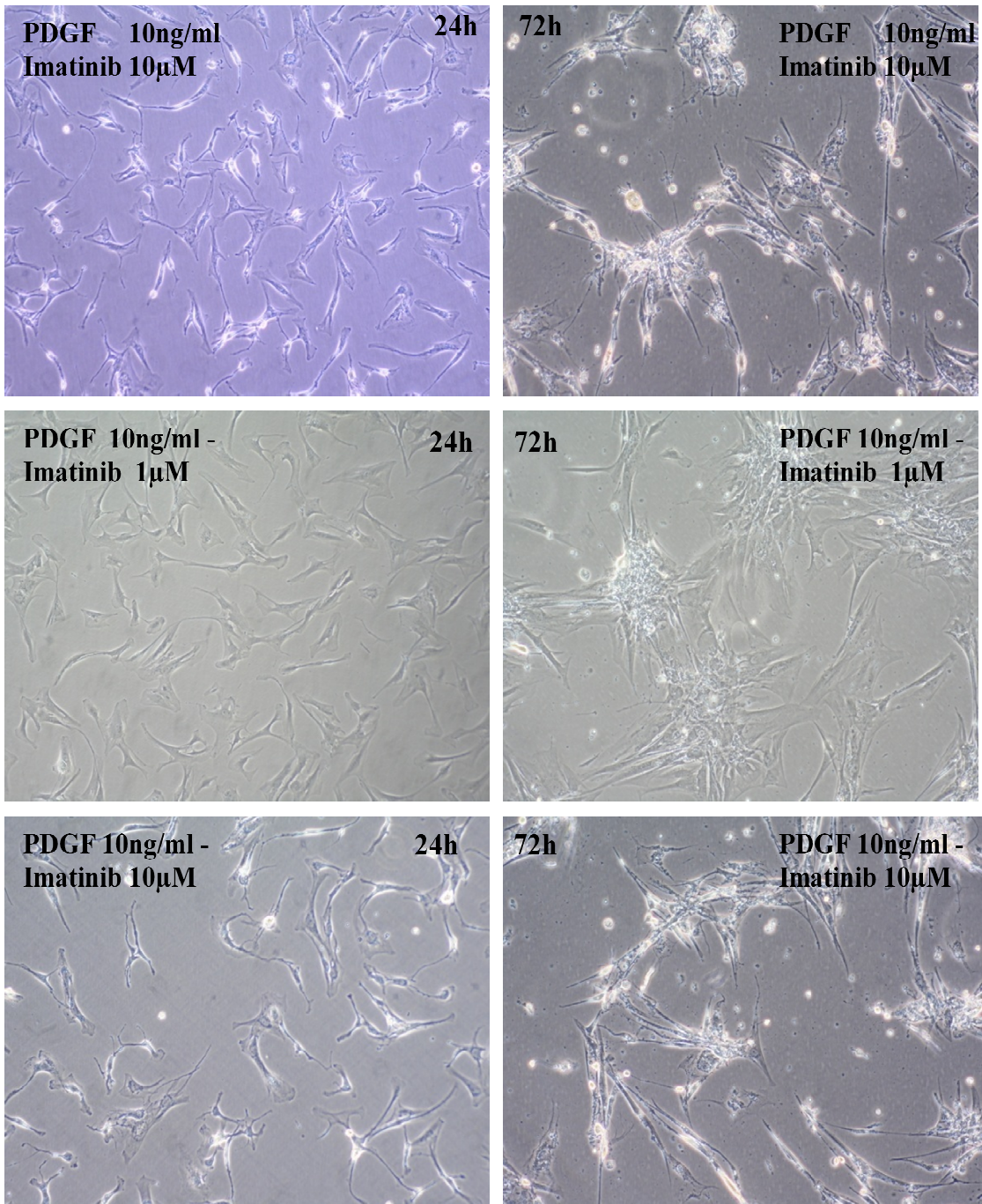


Abb. 10B: Effekt von Imatinib und PDGF-BB, jeweils alleine oder in Kombination, auf die Fibroblastenmorphologie nach Inkubation mit ansteigender Konzentration von Imatinib. 1×10^6 Zellen wurden auf 145 cm^2 Kulturplatten ausgesät und für 24 h in DMEM + 10 % FBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 % FBS inkubiert, mit 10 ng/ml PDGF-BB und dem Zusatz von 1 µM bzw. 10 µM Imatinib. 24 h bzw. 72 h später wurden repräsentative Areale fotografiert, 100-fache Vergrößerung.

Die Inkubation der Zellen mit DMEM + 0,5 % FBS diente als Kontrolle. Nach 24 - und 72 - stündiger Inkubation der Zellen mit Imatinib in einer Konzentration von 1 μM ist keine bedeutende Zellyse oder Ablösen der Zellen von der Kulturplatte, also ein Verlust der Adhäsion, erkennbar. Sind die Myofibroblasten dem Imatinib jedoch in einer Konzentration von 10 μM ausgesetzt, so zeigt sich bereits nach 24 Stunden eine veränderte Zellmorphologie. Die Myofibroblasten mit ihren sonst plumpen Zelleibern und den breiten Zytoplasmafortsätzen sind nicht mehr zu finden. Stattdessen zeigen sich geschrumpfte und sehr schmale Zellen mit filiformen Zytoplasmafortsätzen. Verglichen mit der Kontrolle ist auch die Anzahl der von den Kulturplatten abgelösten Zellen deutlich sichtbar angestiegen. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von PDGF führte in dieser hohen Konzentration zu keinen morphologischen Unterschieden.

4.7.2 Imatinib blockiert die PDGF-BB induzierte Proliferation und vermindert die Zellviabilität

Neben dem Einfluss auf die Zellmorphologie besitzt der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib einen hemmenden Einfluss auf die PDGF- induzierte Zellproliferation. Es galt nun diese Hypothese zu überprüfen. Um dieses zu untersuchen wurden Zellzählungen unter dem Mikroskop durchgeführt. Diese erfolgten jeweils nach 24- bzw. 72- stündiger Inkubation mit den jeweiligen Mediatoren Imatinib (in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM) und PDGF-BB (10 ng/ml). Als Kontrolle diente auch hier DMEM + 0,5 % FBS. Um einen Einfluss von DMSO, in dem Imatinib gelöst wurde auszuschließen, war auch dieses ein Kontrollparameter.

Wie aus Abb. 11 ersichtlich wird, ist die Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation mit PDGF-BB der hier untersuchten Zelllinien leicht erhöht, verglichen mit der Kontrolle jedoch nicht signifikant. Nach 24-stündiger Co-Inkubation mit Imatinib ist ein beginnender Abfall der Zellzahl sichtbar, der bei einer Co-Inkubation mit Imatinib 10 μM bereits deutlich erkennbar ist, jedoch keine Signifikanz aufweist. Untersuchungen nach 72-stündiger Co-Inkubation von PDGF-BB mit Imatinib zeigen sowohl bei einer Konzentration von 10 μM , als auch von 1 μM Imatinib einen statistisch signifikanten Unterschied, vergleicht man die Ergebnisse mit denen der alleinigen 72-stündigen Inkubation mit PDGF-BB ($p < 0,05$). Die Inkubation der Myofibroblasten mit DMSO führt, verglichen mit der Kontrolle (DMEM + 0,5 % FBS), zu keinen nennenswerten Veränderungen der Zellzahlen.

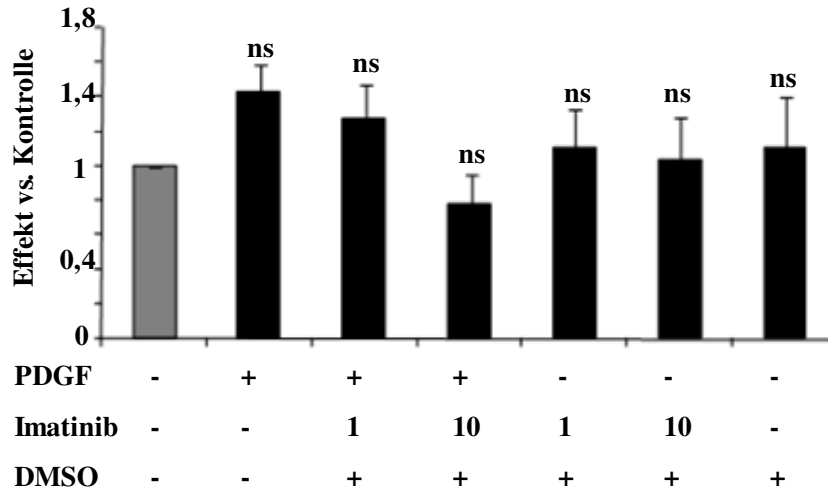
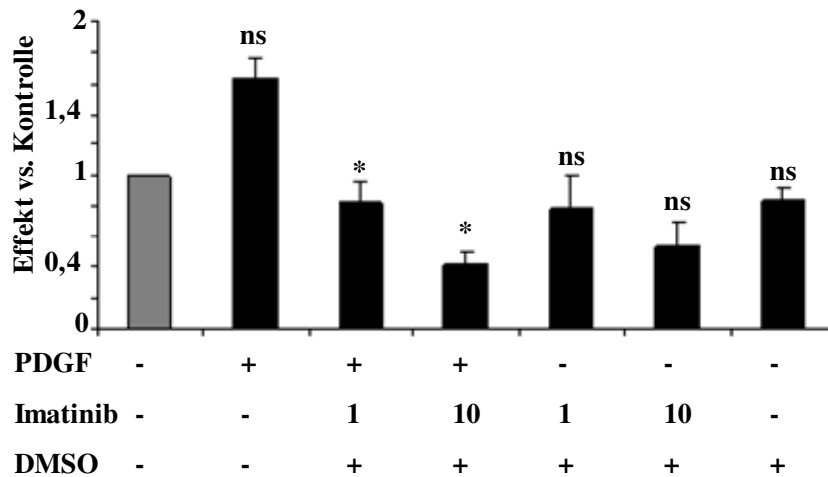
A**Zellzählung nach 24h****B****Zellzählung nach 72h**

Abb. 11: A: Ergebnisse der Zellzählung unter dem Mikroskop nach 24-stündiger Inkubation mit 0,5 % FBS als Kontrolle, ohne oder mit PDGF-BB (10 ng/ml), ohne oder mit Zugabe von Imatinib in den Konzentrationen 1 μ M bzw. 10 μ M und ohne oder mit DMSO in den Konzentrationen 1 μ M bzw. 10 μ M. B: Ergebnisse der Zellzählung unter dem Mikroskop nach 72-stündiger Inkubation mit 0,5 % FBS als Kontrolle, ohne oder mit PDGF-BB (10 ng/ml), ohne oder mit Zugabe von Imatinib in den Konzentrationen 1 μ M bzw. 10 μ M und ohne oder mit DMSO in den Konzentrationen 1 μ M bzw. 10 μ M. Die Kontrolle wurde 1 gleichgesetzt (graue Säule). Veränderungen wurden als Effekt versus Kontrolle angegeben. Die Säulen umfassen jeweils 3 verschiedene Präparationen der CAF. * $p < 0,05$ versus einfacher PDGF-BB Inkubation; ns, nicht signifikant.

Um den quantitativen Effekt auf die Viabilität der Myofibroblasten aus den kolorektalen Lebermetastasen weitergehend zu untersuchen, wurde der WST- Assay durchgeführt.

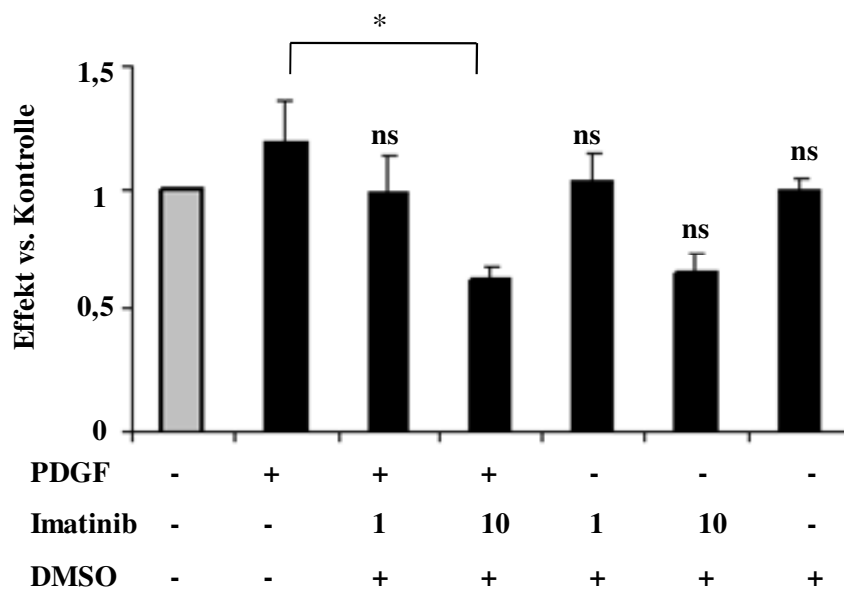


Abb. 12: WST-1 Assay. Effekt von PDGF-BB und Imatinib auf die Viabilität der CAF. CAF wurden 24h mit 0,5 % FBS als Kontrolle, DMSO, mit oder ohne PDGF-BB (10 ng/ml) und/ oder ansteigender Konzentration von Imatinib (1 μM, 10 μM) inkubiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 4 verschiedenen Präparationen. * p < 0,05; ns, nicht signifikant.

Mit den bereits erhobenen Daten aus den Zellzählungen übereinstimmend zeigen sich auch hier, wie aus Abb. 12 ersichtlich, nach Exposition mit PDGF-BB und/ oder Imatinib nur geringfügige Unterschiede. Eine statistisch signifikante Veränderung im WST- Assay wurde beobachtet, wenn man die alleinige Inkubation mit PDGF-BB mit der Co-Inkubation der Zellen mit PDGF-BB und 10 μM Imatinib vergleicht. Dagegen zeigt eine Inkubation mit der niedrigeren Dosierung von Imatinib (1 μM) weder nach alleiniger Inkubation, noch in der Kombination mit PDGF-BB, einen Effekt auf die Viabilität der CAF. Betrachtet man die Abnahme des WST-cleavage und die veränderte Zellmorphologie nach Inkubation der Myofibroblasten mit 10 μM Imatinib als eine zusammenhängende Einheit, so könnte die Ursache dafür in der Induktion des Zelltodes liegen, auch wenn der Unterschied nach Inkubation mit 1 μM und 10 μM statistisch nicht signifikant ist.

Desweiteren wurde der Einfluss von PDGF-BB und Imatinib auf die DNA-Synthese mithilfe der ³H-Thymidin-Inkorporationsmethode untersucht (Abb.13). Die kultivierten Zellen wurden auch hier mit PDGF-BB und Imatinib in den Konzentrationen von 1 µM und 10 µM inkubiert. Als Kontrolle diente, wie bereits in den zuvor durchgeführten Versuchen, serumreduziertes Medium, das 0,5 % FBS enthält.

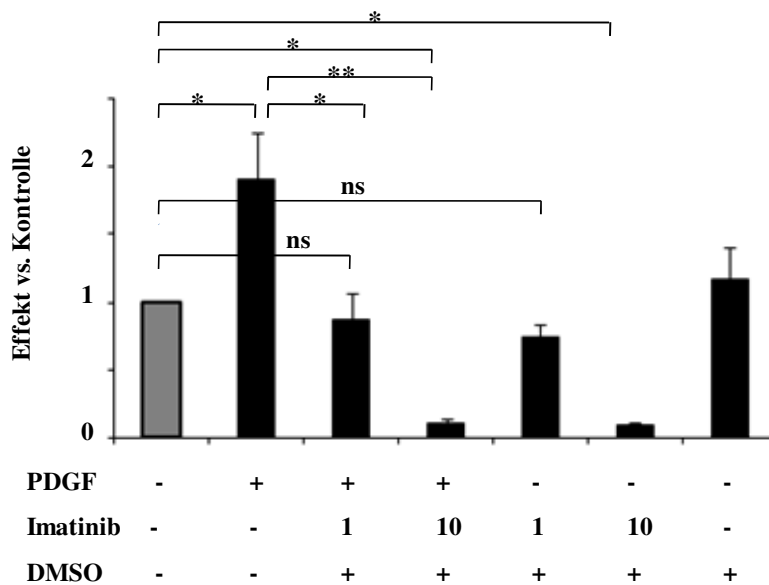
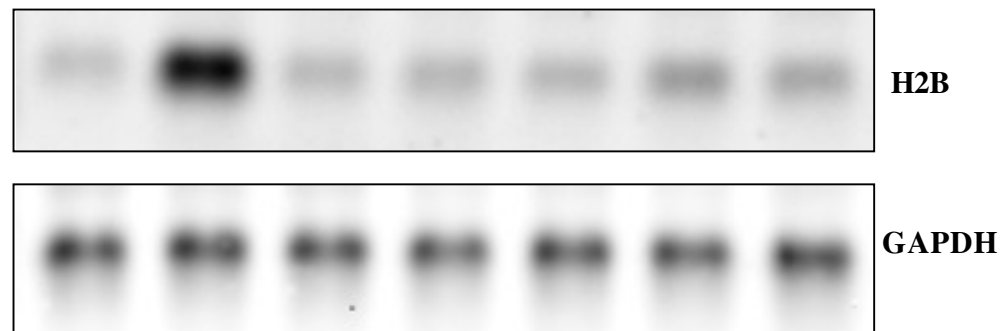


Abb. 13: Effekt von PDGF-BB und Imatinib auf die DNA-Synthese der CAF, gemessen anhand der ³H-Thymidin-Inkorporationsmethode. Die Ergebnisse sind als Effekt versus Kontrolle (DMEM + 0,5 % FBS) dargestellt. Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 4 verschiedenen Präparationen. * p < 0,05; ** p < 0,001; ns, nicht signifikant.

Ein weiterer objektiver Marker zur Beurteilung der DNA-Synthese ist der Transkriptionsmarker Histonprotein, die H2B-mRNA. Mit Northern Blot Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die Myofibroblasten nach 24-stündiger Inkubation mit PDGF-BB deutlich vermehrt H2B-mRNA produzieren. Die Co-Inkubation mit 1 µM Imatinib hemmte den durch PDGF-BB hervorgerufenen Effekt. Die alleinige Exposition der Zellen mit Imatinib erbrachte hingegen keinen weiteren Abfall des mRNA-Levels für H2B, der in geringem Maße ohnehin von den Myofibroblasten exprimiert wird.



PDGF	-	+	+	+	-	-	-
Imatinib	-	-	1	10	1	10	-
DMSO	-	-	+	+	+	+	+

Abb. 14: Repräsentativer Northern Blot, der den Effekt von PDGF-BB (10 ng/ml) mit/ ohne Imatinib (1 μ M, 10 μ M) auf die mRNA-Expression des Histonproteins H2B darstellt. 10 μ g Gesamt-RNA wurden auf 1 % Agarosegel aufgetragen, wie in Kapitel 3.10.4 beschrieben. Als Kontrolle wurde der Northern Blot mit einer GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert.

4.7.3 Einfluss auf die Expression von α -SMA durch PDGF-BB und Imatinib

In der vorliegenden Studie wurde desweiteren die Expression der mRNA für α -SMA untersucht, einem Marker für die myofibroblastische Transdifferenzierung und Aktivierung. Northern Blot Analysen der zu untersuchenden Myofibroblasten aus den kolorektalen Lebermetastasen zeigen das Vorliegen zweier Banden. Zum einen von einer Größe von 2,1 kb, die der mRNA für die β -Isoform entspricht, die zweite Bande weist eine Größe von 1,7 kb auf. Dieses Transkript entspricht dem für α -SMA (Hansson et al., 1989).

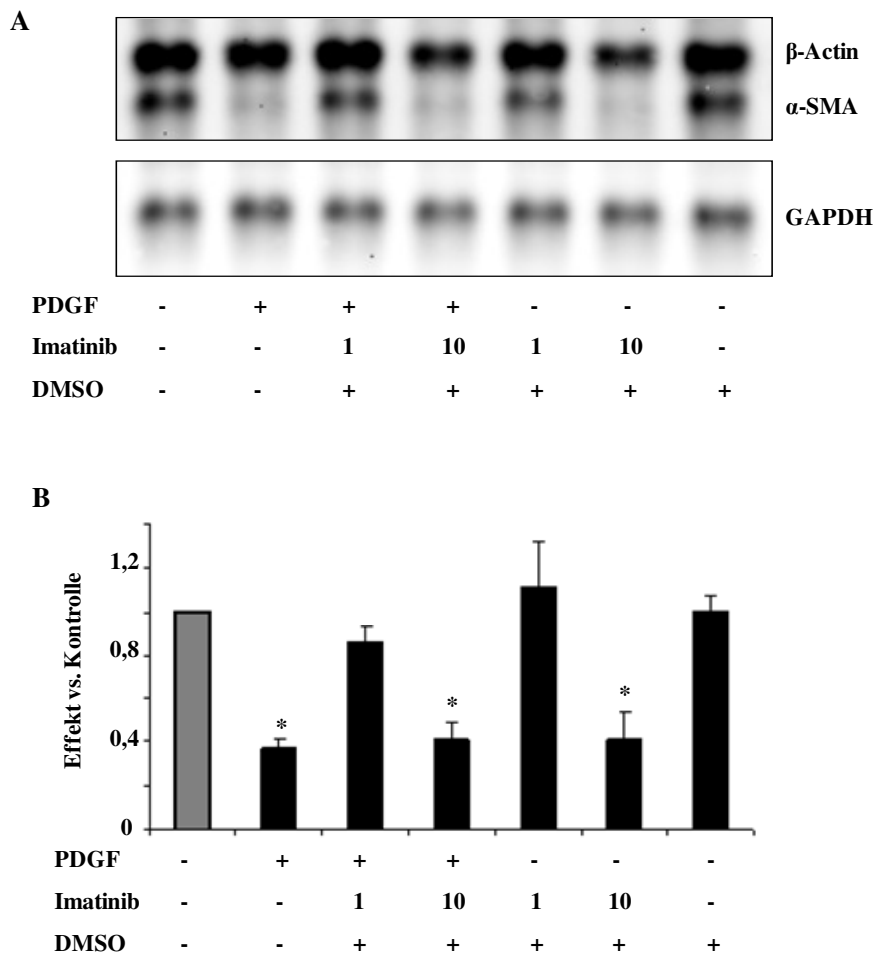


Abb 15: Effekt von PDGF-BB (10 ng/ml) mit/ ohne Imatinib (1 μ M, 10 μ M). A: Repräsentativer Northern Blot, der den Effekt auf die Expression von α -SMA und β -Actin darstellt. 10 μ g Gesamt-RNA wurden auf 1 % Agarosegel aufgetragen, wie in Kapitel 3.10.4 beschrieben. Als Kontrolle wurde der Northern Blot mit einer GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert. B: Densitometrische Analyse des Northern Blots für α -SMA. Die mRNA ist im Vergleich zur Kontrolle (DMEM + 0,5 %) dargestellt. Die Kontrolle wurde 1 gleichgesetzt. CAF Präparationen aus 4 Patienten. * $p < 0,05$ vs Kontrolle; ns, nicht signifikant.

Zu einer signifikanten Abnahme des 1,7 kb großen Transkripts führte die Stimulation der Zellen mit PDGF-BB, verglichen mit der Kontrolle, auf $37 \pm 3,7 \%$ ($p < 0,05$). Eine 24-stündige Co-Exposition mit $1 \mu\text{M}$ Imatinib ließ den Level der Expression für $\alpha\text{-SMA}$ wieder auf $86 \pm 7 \%$ des Kontrollwertes anheben. Während die alleinige Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ Imatinib keinen signifikanten Anstieg der $\alpha\text{-SMA}$ mRNA zur Folge hatte, so jedoch die Inkubation in der Konzentration von $10 \mu\text{M}$. Die Exposition in dieser Konzentration führte sowohl in Anwesenheit von PDGF-BB, als auch in seiner Abwesenheit zu einem signifikanten Abfall der Expression von $\alpha\text{-SMA}$ mRNA, $41,2 \pm 8 \%$ bzw. $41,5 \pm 12 \%$ ($p < 0,05$).

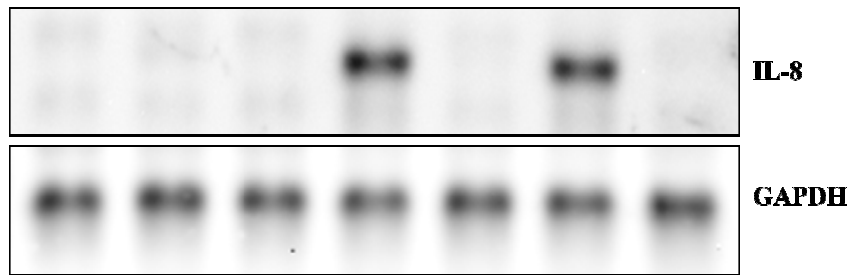
Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Proliferationsmessungen zeigen auch diese erhobenen Daten die Expression der $\alpha\text{-SMA}$ mRNA betreffend, antagonistische Effekte von PDGF-BB und Imatinib in der niedrigeren Konzentration von $1 \mu\text{M}$.

4.7.4 Einfluss auf die Regulation tumorfördernder Zytokine durch PDGF-BB und Imatinib

Um den Einfluß von PDGF-BB und Imatinib auf die Myofibroblasten hinsichtlich der Expression pro-angiogenetischer und pro-invasiver Mediatoren zu überprüfen, wurde zunächst die Regulation von IL-8 auf mRNA-Ebene untersucht. Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, sieht man eine schwache Bande der IL-8 mRNA, gewonnen aus CAF, die dem Kontrollmedium (DMEM + 0,5 % FBS) exponiert waren. Die Inkubation mit PDGF-BB führte zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Stimulation der mRNA. Die Inkubation der Zellen mit Imatinib in der höheren Konzentration von $10 \mu\text{M}$, unabhängig davon, ob dies in An- oder Abwesenheit von PDGF-BB geschah, führte zu einer signifikanten Zunahme der IL-8 mRNA auf $390 \pm 45 \%$ bzw. $690 \pm 220 \%$.

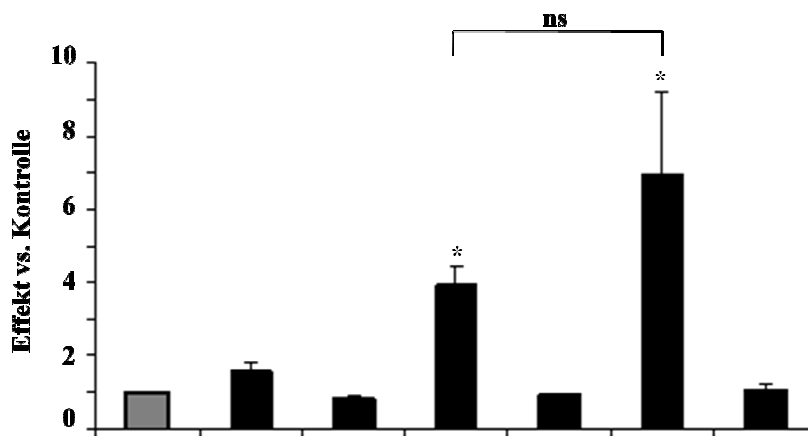
In abschließend durchgeführten Bead Arrays (Abb.17) wurden die Überstände der CAF auf IL-6, IL-8, VEGF und bFGF untersucht, ob diese von den Zellen freigesetzt wurden. Die Ergebnisse der Messungen das IL-8 Protein betreffend, fanden mit denen der mRNA Übereinstimmung. Die Überstände nach 24- bzw. 72-stündiger Inkubation, zeigten einen sehr deutlichen IL-8-Anstieg nach Exposition mit $10 \mu\text{M}$ Imatinib, während die Inkubation mit PDGF-BB lediglich einen leichten Anstieg ausmacht. Übereinstimmende Ergebnisse mit denen für das IL-8 Protein, lieferten die Untersuchungen der Überstände auf das Zytokin IL-6. Auch hier erfolgt ein Anstieg des Proteins im Überstand nach Inkubation der Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Imatinib.

A



PDGF	-	+	+	+	-	-	-
Imatinib	-	-	1	10	1	10	-
DMSO	-	-	+	+	+	+	+

B



PDGF	-	+	+	+	-	-	-
Imatinib	-	-	1	10	1	10	-
DMSO	-	-	+	+	+	+	+

Abb. 16: Effekt von PDGF-BB (10 ng/ml) mit oder ohne Imatinib (1 μ M, 10 μ M). A: Repräsentativer Northern Blot. Darstellung des Effekts auf die Expression von IL-8. 10 μ g Gesamt-RNA wurden auf 1 % Agarosegel aufgetragen, wie in Kapitel 3.10.4 beschrieben. Als Kontrolle wurde der Northern Blot mit einer GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert. B: Densitometrische Analyse des Northern Blots für IL-8. Die mRNA ist im Vergleich zur Kontrolle (DMEM + 0,5 %) dargestellt. Die Kontrolle wurde 1 gleichgesetzt. CAF Präparationen aus 4 Patienten. * $p < 0,05$ versus Kontrolle; ns, nicht signifikant.

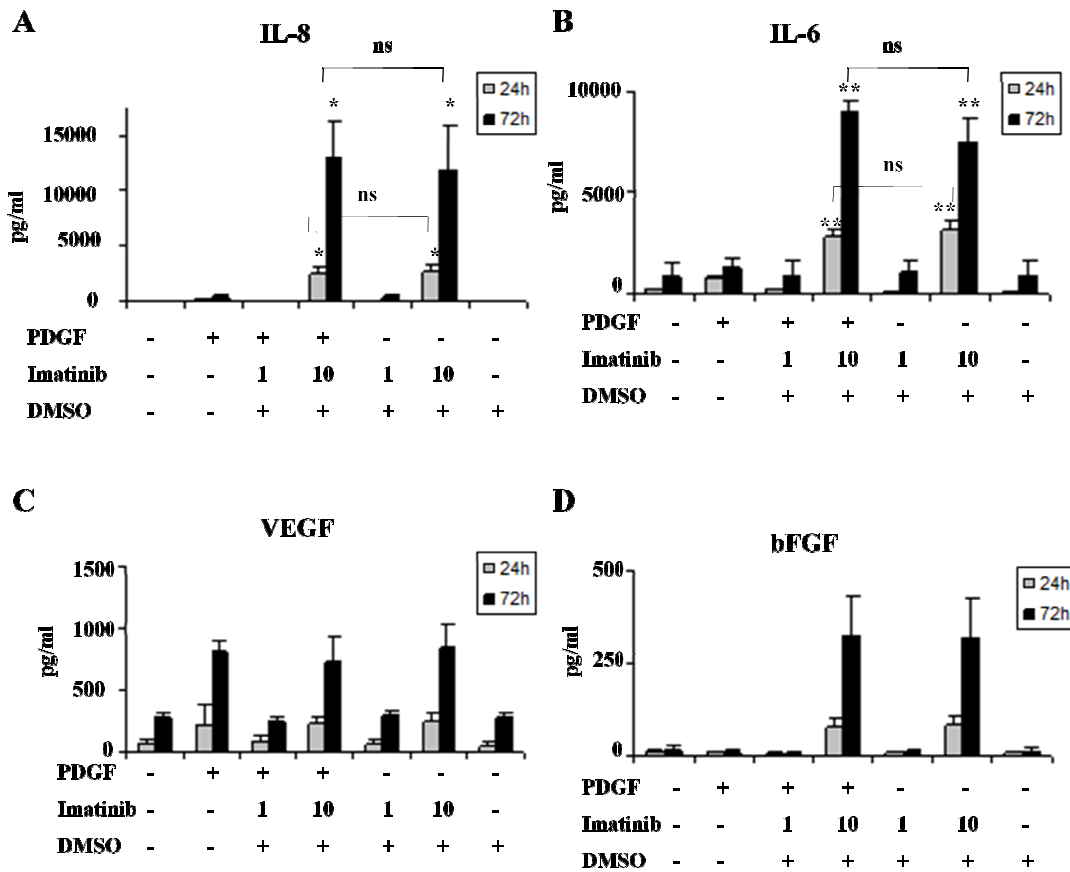


Abb. 17: Bead Array Messung. Freisetzung von IL-8, IL-6, VEGF und bFGF in die Zellkulturüberstände durch die CAF. Primärkultivierte Zellen wuchsen bis zu einer 80 %-igen Konfluenz. 48 h nach Aussaat wurden die Zellen 24 h bzw. 72 h mit DMEM + 0,5 % FBS inkubiert, jeweils mit oder ohne Zusatz von 10 ng/ml PDGF-BB und Imatinib (1 μ M und 10 μ M). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse von Myofibroblastenpopulationen von drei verschiedenen Patienten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; ns, nicht signifikant.

Die Inkubation der Zellen mit sowohl PDGF-BB, als auch Imatinib führte in den untersuchten Zellkulturüberständen zu einem Anstieg des proangiogenetischen Proteins VEGF. Diese Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant. Hierfür ursächlich können Schwankungen in den Ergebnissen sein, die dadurch zustande kommen, dass es sich um Myofibroblasten von verschiedenen Patienten handelt. Messungen hinsichtlich des Proteins bFGF zeigen vom Profil her eine Ähnlichkeit mit denen von IL-8 und IL-6. Die Menge an dem durch die Zellen freigesetzten Protein liegen aber deutlich niedriger und das Ergebnis ist statistisch nicht signifikant.

5. Diskussion

Die Interaktion zwischen den Tumorzellen und dem umgebenden Stroma nimmt eine Schlüsselrolle in der Tumorgenese und Tumorprogression ein. Tumorzellen sind im Stroma eingebettet und können dieses modifizieren. Sie verändern das umgebende Bindegewebe sowie den Stoffwechsel residenter Zellen dahingehend, dass diese anstatt die physiologische Homöostase und Gewebearchitektur aufrechtzuerhalten, Stroma und Faktoren produzieren, die der Aufrechterhaltung der malignen Zellen dienen. Neben der Matrixkomponente ist das Tumorstroma sehr zellreich. Hierzu zählen smooth muscle Zellen, Endothelzellen, dendritische Zellen, Makrophagen und eine Vielzahl anderer inflammatorischer Zellpopulationen, sowie die Fibroblasten, die in der Metastase die weitaus größte Komponente des Stromas bilden.

Durch die Produktion und das Freisetzen löslicher Faktoren oder Zell-Zell-Interaktionen findet in der Umgebung von Tumorzellen ein intensiver Informationsaustausch statt. Die Tumorzellen selbst produzieren hierbei eine Vielzahl von Faktoren, die in parakriner oder autokriner Wirkweise der Kommunikation und der Regulation der eigenen bzw. umgebenden Zellen dienen. Auch über direkte Kontakte zu den Stromazellen, wie z.B. Integrine können sie den physiologischen Zellmetabolismus zu ihrem Vorteil steuern. Die Freisetzung verschiedenster Chemokine und Zytokine dient dem Anlocken von Zellen, insbesondere auch inflammatorischer Zellen, die dann ihrerseits wiederum durch die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu einer Veränderung des Milieus führen und in Interaktion mit anderen Zellen treten, diese anlocken und zur Proliferation anregen können. Im Folgenden wird also eine sehr komplexe Kaskade an Geschehnissen in Gang gesetzt, die den Unterhalt und die Vermehrung der malignen Zellen gewährleistet.

Fibroblasten waren lange Zeit eine unbeachtete Zellpopulation im Tumorgeschehen. In der Zwischenzeit hat sich dieses jedoch geändert; die Rolle der Fibroblasten wurde zunehmend untersucht. Sie scheinen in einer Vielzahl von Erkrankungen eine bedeutende Rolle einzunehmen. Sie sind nicht nur für die Synthese, sowie Umgestaltung der extrazellulären Matrix verantwortlich, sondern gleichzeitig Quelle für parakrine Wachstumsfaktoren, die das Wachstum der malignen Zellen beeinflussen (Mueller und Fusenig, 2004). Es sind neuere Daten vorhanden, die sogar so weit gehen, dass die stromalen Fibroblasten, die sich in Tumoren finden nicht als bloße

Zellpopulation angesehen werden, die dem Unterhalt von Tumoren dienen, sondern sogar als „Induktoren“ bestimmter Karzinome bezeichnet werden (Kuperwasser et al., 2004). Fest steht, dass die Fibroblasten zumindest eine nicht zu unterschätzende Bedeutung in der Tumorprogression einnehmen.

Zellcharakterisierung

Die genaue Herkunft der Fibroblasten aus den kolorektalen Lebermetastasen ist derzeit noch nicht eindeutig belegt. Wie schon in der Einleitung, in Kapitel 2.4 beschrieben, gibt es eine Reihe von Hypothesen. Lange Zeit ging man davon aus, dass die CAF aus den gut untersuchten hepatischen Sternzellen (HSC) hervorgehen (Reeves und Friedmann, 2002). Die HSC wurden insbesondere hinsichtlich der Pathogenese der Leberfibrose untersucht, wobei festgestellt wurde, dass sie während dieses Prozesses die Fähigkeit erlangen sich myofibroblastisch zu transformieren (Guyot et al., 2006; Gressner und Weiskirchen, 2006). Andere Untersuchungen wiederum stellen die periportal gelegenen Fibroblasten als Ursprungsort, auch für die Leberfibrose, in den Vordergrund (Kinnmann et al., 2003). Weitere Untersuchungen über die Herkunft der Fibroblasten in Tumoren, legen die Vermutung nahe, dass zumindest ein Anteil des Tumorstromas seinen Ursprung aus mesenchymalen Vorläuferzellen des Knochenmarks hat. So beobachteten Direkze und Mitarbeiter in einem experimentell induzierten Pankreastumor bei Mäusen, dass 25% der Myofibroblasten aus dem transplantierten Knochenmark stammten (Direkze et al., 2004). Ebenso bei der Leberfibrose gibt es Vermutungen, dass die hier involvierten Zellen ihren Ursprung im Knochenmark haben (Forbes et al., 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fibroblasten aus den kolorektalen Lebermetastasen zeigten in immunhistochemisch untersuchten Gewebeschnitten, dass diese Zellen phänotypische Ähnlichkeit zu den in der Leber befindlichen periportalen Fibroblasten zeigen (Mueller et al., 2007). Das Hauptaugenmerk in der vorliegenden Arbeit ist jedoch nicht auf die Herkunft der Fibroblasten gerichtet.

Die angefertigten Gewebeschnitte, sowie chamber slides, dienten lediglich der Charakterisierung und Identifizierung der zu untersuchenden Zellen, um diese Zellpopulation, gewonnen aus kolorektalen Lebermetastasen, die weiteren Versuchen dienete, einordnen zu können. Sowohl die immunhistochemischen Färbungen der Gewebeschnitte, als auch die Immunfluoreszenz der kultivierten Zellen waren alle positiv für Vimentin und α -SMA, was eine Bestätigung für den myofibroblastischen

Phänotyp ist (Schmitt-Gräff et al., 1994). So wurden die aus den Metastasen gewonnene und kultivierte Zellpopulation identifiziert, was jedoch keine weiteren Rückschlüsse auf die Herkunft zulässt.

PDGF

Eine unangemessen hohe Produktion von PDGF wird in einer Vielzahl von fibroproliferativen Erkrankungen beobachtet, u.a. bei der Fibrose, Arteriosklerose aber auch bei neoplastischen Erkrankungen. In einer Reihe von Tumorzelllinien wurde die Expression von PDGF und/oder seinem Rezeptor beschrieben, u.a. in Mamma- und Kolonkarzinomzelllinien. Weil PDGF ein potentes Mitogen für Fibroblasten und Myofibroblasten ist und ein potenter Faktor, der die Chemotaxis fördert, stellten Studien seine Bedeutung und mögliche Einflußnahme in Tumoren in den Vordergrund.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bereits eine 24-stündige Inkubation der CAF aus den kolorektalen Lebermetastasen mit humanen PDGF-BB, zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Syntheserate auf das 1,5-fache führt. Eine Aktivierung setzt eine Interaktion von PDGF mit dem spezifischen PDGF-Zellmembranrezeptor voraus und der folgenden Stimulierung der Tyrosinkinase, die eine Autophosphorylierung des Rezeptors befähigt. Antoniades machte die Beobachtung, dass die Zellen, die auf das Protein PDGF keinen Effekt zeigen, wie z.B. Epithelzellen, auch keine Rezeptoren exprimierten (Antoniades, 1991). Für die in dieser Arbeit untersuchten CAF kann diese Beobachtung bestätigt werden. RT-PCR-Analysen zeigten, dass sowohl eindeutig mRNA für den PDGF- α -, als auch für den PDGF- β - Rezeptor vorhanden ist. Die untersuchten humanen Hepatomzellen HUH7 hingegen zeigten nur für den PDGFR- α eine Positivität, während die SW480 Kolonkarzinomzellen für beide Rezeptoren negativ waren. Ähnliche Ergebnisse haben Lindmark und Mitarbeiter veröffentlicht, die die Expression von PDGF-Rezeptoren in Biopsien kolorektaler Karzinome untersuchten. Es zeigte sich, dass PDGF von den Kolonkarzinomzellen exprimiert wird, während die Rezeptoren hauptsächlich auf den Stromal-Zellen zu finden sind (Lindmark et al., 1993). Diese Beobachtung weist auf das Vorhandensein stromaler Interaktionen mit den Karzinomzellen hin. Die Vermutung, dass die Tumorzellen PDGF exprimieren um die Mikroumwelt zu ihrem Gunsten aufrechtzuerhalten liegt nahe. Zum einen rekrutieren sie so die Myofibroblasten, die unter anderem das Tumorerüst bilden, andererseits konnten in in vivo Assays proangiogenetische Effekte verschiedener PDGF-Isoformen

beobachtet werden (Risau et al., 1992). Dies führte erstmals zu Spekulationen, dass PDGF mit der Angiogenese in Verbindung gebracht werden kann. Diese Annahme konnte von Li und Mitarbeitern bekräftigt werden, die im Mausversuch zeigten dass das Protein das Tumorwachstum beschleunigte, u.a. auch durch Stimulation der Neoangiogenese (Li et al., 2003).

Diese Ergebnisse weisen übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der PDGFR- Signalweg eine entscheidende Rolle sowohl in der Stromagenese, als auch in der Progression des Tumors einnimmt.

Einfluss von konditioniertem Medium der CAF auf die Proliferation von Tumorzellen

Die Frage nach dem genauen Mechanismus der Metastasierung, insbesondere der frühen Stufen, ist bisher noch weitgehend ungeklärt. Es stellt sich die Frage, ob die Tumorzellen aktiv an Blutgefäße bzw. an deren Endothelzellen anhaften und somit über diesen Weg die Möglichkeit haben, sich in einem Zweitgewebe wieder anzusiedeln und dort die Metastasen zu bilden. Bekannt ist, dass Tumorzellen endotheliale Adhäsionsrezeptormoleküle ähnlich der der Leukozyten ausbilden und ihnen so die Möglichkeit geben, entlang des Endothels zu „rollen“ und sich an diesem festzuhalten (Ruoslahti E., 1994; Fidler IJ, 2002) und ggf. auszutreten. Wong und Mitarbeiter haben gezeigt, dass Tumorzellen durchaus in der Lage sind, im Gefäßlumen zu überleben, sich zu vermehren und sich konsekutiv als kleine Zellabsiedlung in einem sekundären Gewebe anzusiedeln (Wong et al., 2002). Diese unterschiedlichen Beobachtungen deuten darauf hin, dass einige Manifestationen der Metastasen aktiv durch die Tumorzellen selbst initiiert werden, andere wiederum zufällig ohne einen festen Mechanismus entstehen. Myofibroblasten, ein spezialisierter Typ der Fibroblasten, bilden eine der Hauptkomponenten des Tumorstromas (Schmitt-Gräff et al., 1994). Myofibroblasten werden nicht nur als bloße Produktionsstätte für die strukturelle Matrix angesehen, sondern auch als Zellen, die ausgestattet sind mit Profilen, die das Tumorwachstum in ihrer Umgebung fördern (Powell et al., 1999; Elenbaas und Weinberg, 2001).

Die vorliegende Arbeit zeigt unter Zuhilfenahme von Proliferationsassays mit konditioniertem Medium der CAF, dass dieses Medium die Zellproliferation von HUH7 Zellen in einem höherem Maße stimuliert, als das konditionierte Fibroblastenmedium,

das aus gesundem Lebergewebe stammt. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Nakagawa und Mitarbeiter überein, die den Einfluß des konditioniertem Mediums auf die Kolonkarzinomzelllinie HCT11 untersucht haben (Nakagawa et al., 2004). Untersuchungen der Kolonkarzinomzelllinie DLD1 in dieser Arbeit zeigen hingegen keinen Proliferationsanstieg nach Inkubation mit konditioniertem Medium aus Fibroblasten. Es zeigt sich desweiteren kein Unterschied in der Proliferationsrate, werden die Zellen mit CAF- konditioniertem Medium oder konditioniertem Medium aus Fibroblasten, die aus tumorfreiem Lebergewebe stammen, inkubiert. Dieses Ergebnis, das zwischen den unterschiedlichen konditionierten Medien keinen Unterschied in der Proliferationsrate der Tumorzellen aufweist, erwartet man zunächst nicht. Bedenkt man jedoch, dass schon die Anwesenheit einer einzigen Lebermetastase die gesamte Leber durch einen parakrinen Effekt affektieren kann, scheint das Ergebnis nicht unmöglich. Es ist somit möglich, dass die Myofibroblasten, die aus tumorfreiem Lebergewebe gewonnen wurden, durch bereits stattgefundene parakrine Effekte eine Heterogenität in ihrem Expressionsprofil aufweisen können und somit einen möglicherweise vorhandenen Unterschied zwischen den Fibroblasten bereits aufgehoben haben. Nakagawa und Mitarbeiter zeigten in Microarray-Untersuchungen, dass sowohl Fibroblasten, die aus der Haut gewonnen wurden, als auch Fibroblasten aus kolorektalen Lebermetastasen ein homogenes Muster aufwiesen. Fibroblasten, die jedoch in einiger Entfernung der Metastase aus gesundem Lebergewebe gewonnen wurden zeigten in ihrem Expressionsprofil ein heterogenes Muster, was ebenfalls durch eine parakrine Wirkweise der Tumorzellen erklärbar ist (Nakagawa et al., 2004).

Konditioniertes Medium der CAF wirkt migrationsfördernd auf Tumorzellen

Die Fähigkeit der Migration ist eine essentielle Bedingung für die Invasivität von Tumoren und eine wichtige Voraussetzung für eine oft fatale Progression des Tumorleidens. Dem zugrunde liegen multiple Mechanismen, wie zum Beispiel stattgehabte Mutationen oder eine Rezeptorüberexpression und/oder Blockade von Enzymen oder Signalkaskaden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass konditioniertes Medium gewonnen aus Fibroblasten kolorektaler Lebermetastasen, konzentrationsabhängig die Anzahl der migrierten, sowohl HUH7- als auch DLD1- Zellen signifikant erhöht. Die Migration beider Zelllinien war bei einer 40 %-igen Konzentration des Fibroblastenmediums am Höchsten. Die Ursache hierfür geht aus den durchgeführten Versuchen nicht hervor. Eine genauere Charakterisierung der beteiligten Rezeptoren

und Signaltransduktionswege in Abhängigkeit von der Konzentration des konditionierten Mediums steht für diese Zellpopulation noch aus.

Erklärend für dieses Phänomen ist eine Freisetzung verschiedener Mediatoren, die die Migration und somit das Tumorwachstum und seine Erhaltung fördern. Das Zusammenspiel von Mediatoren und nachfolgenden Signalkaskaden kann man sich als sehr komplex vorstellen, bedenkt man, dass auch die Konzentration einen wichtigen Einfluß auf die Quantität der Migration hat, was aus der vorgestellten Arbeit hervorgeht.

Die Sekretion des Macrophage migratory inhibitory factors (MIF) käme unter anderem auch als ein möglicher Faktor für die gesteigerte Migration von Tumorzellen nach Inkubation mit Fibroblastenmedium in Betracht. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression von MIF in malignen und metastatischen Tumoren gesteigert ist (del Vecchio et al, 2000; Meyer-Siegler et al., 2007). So konnten u.a. in Mamma-, Prostata- und ebenso in Kolonkarzinomen signifikant höhere MIF- Level nachgewiesen werden, verglichen mit gesunden Zellen als Pendant. Einige Untersuchungen weisen sogar darauf hin, dass die Expression von MIF eng mit dem metastatischen Potenzial, sowie der Tumoraggressivität in Zusammenhang steht. Mitchell und Mitarbeiter zeigten, dass murine Fibroblasten in Abhängigkeit von Stimulation mit Wachstumsfaktoren MIF sezernierten (Mitchell et al., 1999). Aufgrund des möglichen potentiellen Angriffspunktes, der mit dem Verlust bzw. Hemmung von MIF gegeben sein könnte, ist dies ein interessanter Faktor für weitere Untersuchungen.

Ein weiterer Signalweg, der hier eine wichtige Rolle spielen könnte, ist der CXCR4/SDF-1- Signalweg. Paget hatte bereits 1889 die „seed and soil“ Theorie aufgestellt. Der stromal-derived Faktor-1 (SDF-1) gehört der CXC-Subfamilie der Chemokine an und wird von vielen Stromazellen exprimiert (Muller et al., 2001). Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses Chemokin lediglich an CXCR4 bindet. CXCR4 wird wiederum in einer Reihe von Tumorzellen exprimiert, wie z.B. von Mammakarzinom-, Prostatakarzinom- und Pankreaskarzinomzelllinien (Wang et al., 2008). Eine SDF-1 Expression konnte u.a. im Knochenmark, in Lymphknoten, der Leber und den Lungen nachgewiesen werden, so dass diese Organe ein chemotaktisches Potential aufweisen und damit mögliches Ziel einer Metastasierung solider Tumoren aber auch leukämischer Zellen sein können (Kucia et al., 2004).

Einfluß von Imatinib auf CAF

Tumorprogression und Metastasierung sind komplexe biologische Vorgänge. Es ist anzunehmen, dass diese aufgrund der verschiedenen Tumorentitäten und betroffenen Organe, heterogen sind. Einige Grundlagen sind jedoch für alle soliden epithelialen Tumoren und deren Metastasen in parenchymatösen Organe charakteristisch. Der entscheidende Aspekt hierbei ist die ungehemmte Zellteilung der neoplastisch transformierten Zellen. Die konventionelle Chemotherapie und pharmakologische Inhibition greift hier in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus ein, wobei bei der systemischen Behandlung auch die proliferativen, nicht neoplastischen Gewebe mitbetroffen sind.

Die Strategie geht dahin, die systemische Chemotherapie mit Kombinationspartnern wie Antikörper, die gegen spezifische Zielstrukturen gerichtet sind zu kombinieren, um die Lebensqualität unter der Therapie aber insbesondere auch die Überlebensrate der Tumorpatienten zu verbessern. Der Fokus der vorliegenden Arbeit ist hierbei auf den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, STI 571, gerichtet.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass CAF die Rezeptoren PDGF- α und - β exprimieren, die beide den Wachstumsfaktor PDGF binden. Die Inkubation mit PDGF führte zu einem Proliferationsanstieg der Zellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass der PDGFR-Signalweg eine Schlüsselrolle in der Stromagenese und Tumorprogression spielen könnte.

Die Ergebnisse der Arbeit weisen auf, dass es mindestens 2 Wege gibt, über die Imatinib agieren könnte. Mittels der ^3H -Thymidin-Inkorporationsmethode, sowie auch dem H2B Northern Blot Signal konnte gezeigt werden, dass die Proliferation nach Inkubation mit 1 μM Imatinib signifikant gesenkt wurde. Die Proliferationshemmung war unter alleiniger Inkubation mit 1 μM Imatinib ohne den Zusatz von PDGF-BB abgeschwächt, so dass man mutmaßen kann, dass in dieser Konzentration eine selektive Hemmung des PDGFR-Signalwegs stattgefunden haben könnte. Nach Inkubation der Zellen mit einer hohen Imatinib-Konzentration, 10 μM , kam es jedoch unabhängig von einer Co-Stimulation mit PDGF-BB zu einem Arrest der Proliferation. Die CAF präsentierten sich nach Inkubation mit der hohen Dosis vielmehr mit morphologischen Anzeichen von Stress, verminderter Zellzahl und -viabilität, gemessen mit dem WST-1 Assay.

Die untersuchten CAF wiesen in den Überständen keine Sekretion von PDGF auf, so dass eine autokrine Wirkung ausgeschlossen werden kann und man somit davon ausgehen muss, dass neben dem PDGF/PDGFR-Signalweg weitere Mechanismen vorliegen, die zu dem Arrest führen. Eine Klärung weiterer möglicher Signalwege, sei es über rezeptorvermittelte oder nicht-rezeptorvermittelte Aktivierung von Tyrosinkinasen durch noch nicht identifizierte autokrine Faktoren, ist bisher noch nicht erfolgt. In einem von Buchdunger und Mitarbeitern durchgeführten Experiment wurden Muskelzellen, die aus der Rattenaorta stammten (A10-Zellen) in serumfreiem Medium gehalten und mit PDGF-BB stimuliert. Hier führte bereits eine Zugabe von 0,2 $\mu\text{M/l}$ Imatinib zu einer 50 %-igen Hemmung der Proliferation. Wurden die A 10-Zellen jedoch in serumhaltigem Medium (+ 10 % FCS) ohne Zugabe des Wachstumsfaktor PDGF-BB kultiviert, war eine deutlich höhere Konzentration von Imatinib $>10 \mu\text{M/l}$ notwendig, um den gleichen Effekt zu erzielen. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Imatinib in vitro in niedrigen Konzentrationen durch eine Blockade des PDGF-Signalwegs einen antiproliferativen Effekt ausübt. Ähnliche Ergebnisse werden in vorliegender Arbeit beobachtet. Es wird darüber hinaus deutlich, dass unter den serumhaltigen Bedingungen möglicherweise durch andere im Serum enthaltene Wachstumsfaktoren, Signalwege aktiviert werden und so den nicht vorhandenen PDGF-Signalweg ausgleichen. Zumindest in vitro scheint der PDGF-Signalweg unter serumhaltigen Kulturbedingungen für die Zellproliferation nicht notwendig zu sein.

Imatinib weist keine Spezifität für die alpha- oder beta-Untereinheit des PDGF-Rezeptors auf (Roskoski, et al., 2003). Die in der vorgestellten Arbeit untersuchten Fibroblasten wiesen sowohl den PDGFR- α , als auch PDGFR- β auf. Es wurde bereits gezeigt, dass die Bindung von PDGF zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors führt. Diese Phosphorylierung aktiviert wiederum RAS, RAF und MEK 1/2. Hierbei spielt die Bedeutung von RAF als potentielles therapeutisches Target eine bedeutende Rolle. Dies beruht auf der Tatsache, dass in zahlreichen soliden Tumoren membranständige Rezeptoren ständig aktiv sind, so auch RAS. Eine gezielte Blockade von RAF könnte wiederum zu einer Unterbrechung des pro-tumorigenen Signalweges führen. Sinnvoll ist es an mehreren Stationen des Signalweges Blockaden vorzunehmen, um Mutationen und somit Resistenzentwicklungen vorzubeugen.

Um die Frage des Einflusses von PDGF-BB und Imatinib auf die CAF weiter zu klären, wurde ein Marker für den myofibroblastischen Phänotyp, α -SMA, herangezogen. Es konnte hier gezeigt werden, dass Imatinib in einer niedrigen Konzentration von 1 μ M den hemmenden Effekt auf die α -SMA mRNA-Expression aufhob. Im Gegensatz dazu hemmte Imatinib in hohen Konzentrationen, unabhängig von der Anwesenheit von PDGF, die Expression von α -SMA. Dieser Mechanismus ist ebenfalls nicht über den antagonisierenden Effekt des PDGFR-Signalwegs erklärbar und impliziert, dass noch nicht bekannte Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Der negative Effekt von PDGF-BB auf die Expression von α -SMA war unerwartet, da PDGF in der Literatur mehrheitlich als ein, die myofibroblastische Konversion unterstützender Faktor beschrieben wurde (Kinnman et al., 2003; Oh et al., 1998). Yoshiji und Mitarbeiter beschrieben, dass Imatinib zudem zu einer Reduktion der mRNA für α -SMA führte und postulierte damit einen anti-fibrogenen Effekt des Tyrosinkinasehemmers (Yoshiji et al., 2004). Die vorliegende Arbeit zeigt den gegenteiligen Effekt nach Inkubation mit Imatinib, nämlich einen Anstieg der Expression von α -SMA. Die Arbeitsgruppen um Kaplan-Albuquerque und Dandre berichten jedoch, wie auch diese Arbeit zeigt, von einer verminderten mRNA-Expression von α -SMA unter dem Einfluß von PDGF-BB (Kaplan Albuquerque, 2003; Dandre, 2004).

Diese unterschiedlichen Reaktionen der fibroblastischen Zellen auf PDGF-BB und Imatinib heben die Komplexität und Heterogenität der Zellbiologie und Zelldifferenzierung hervor. Sie weisen desweiterm daraufhin, dass der zelluläre Ursprung der CAF aus kolorektalen Lebermetastasen noch nicht eindeutig charakterisiert ist.

Der Wachstumsfaktor PDGF-BB hat auf fibroblastische Zellen, die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren betreffend, einen stimulierenden Effekt. In der Literatur wurden hierfür unter anderem die Faktoren IL-6, IL-8, VEGF und b-FGF beschrieben (Nilsson et al., 2005; Takeda et al., 2002). Mit diesen Daten übereinstimmend, hat die vorliegende Arbeit leichte Anstiege der genannten Faktoren in den Überständen, nach Stimulation mit PDGF-BB gezeigt. Insbesondere die Zytokine sind an wichtigen Schritten der Tumorprogression, wie der Tumordinvasion, sowie Angiogenese beteiligt. Der Einfluß des Tyrosinkinasehemmers Imatinib auf eine überschüssige Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokine ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Nach Inkubation der CAF in einer hohen Imatinib-

Konzentration war bereits nach 24 Stunden ein signifikanter Anstieg der Zytokine, sowohl von IL-6, als auch IL-8 zu beobachten. Ein spezifischer tyrosinkinaseabhängiger Signalweg, der die Induktion der Zytokinexpression erklären könnte, ist in der Literatur nicht zu finden. Dieses Phänomen könnte über eine Aktivierung unspezifischer stressinduzierter alternativer Signalwege hervorgerufen werden, vor dem Hintergrund die Homöostase aufrechtzuerhalten, die durch den Tyrosinkinasehemmer ins Ungleichgewicht geraten zu sein scheint; ein reaktiver Schutzmechanismus zur Aufrechterhaltung des Milieus.

Ein Tumor wird auch als eine chronische Wunde, also eine Entzündung, betrachtet (Coussens und Werb, 2002). Sowohl Entzündungs- als auch Tumorzellen produzieren eine Vielzahl von Mediatoren, unter anderem PDGF und TNF, um ein tumorförderndes, inflammatorisches Milieu aufrechtzuerhalten. TNF nimmt eine Schlüsselposition in der Entzündungsantwort ein und wird über den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. Auch IL-8 ist in Entzündungsreaktionen ein wichtiger proinvasiver, chemotaktischer Faktor für Leukozyten und wird von vielen Zellen nach Exposition mit TNF vermehrt gebildet (Larsen et al., 1989). In Tumoren zeigte IL-8 einen proangiogenen, promotogenen, sowie proinvasiven Effekt (Matsushima et al., 1992; Lane et al., 2002). So wurde beobachtet, dass eine erhöhte Expression von IL-8 beim primären Kolonkarzinom mit einer erhöhten Präsenz von Lebermetastasen korrelierte (Terada et al., 2005). Desweiteren zeigten Itoh und Mitarbeiter, dass IL-8 zu einer vermehrten Migration von Kolonkarzinomzellen führte (Itoh et al., 2005). Es kann somit spekuliert werden, dass ein Zusammenhang zwischen Inflammation und Angiogenese besteht. Mukaida und Mitarbeiter wiesen nach, dass eine bestimmte Sequenz, eine nur kleine Region, wichtig für die konstitutive Aktivität des IL-8-Promotors ist (Mukaida et al., 1994). Diese Region enthält desweiteren auch das Bindungsareal für u.a. NF- κ B, über welches wiederum das Zielgen für TNF- α aktiviert wird. Khatib und Mitarbeiter zeigten in einem Mausmodell, dass erhöhte TNF-Level eng mit dem Metastasierungspotential korrelierten (Khatib et al., 2005). Möglicherweise affektiert die Anwesenheit von Imatinib über noch nicht geklärte Signalwege, die von Mukaida untersuchte Region und führt über eine vermehrte Produktion von TNF wiederum zu erhöhten IL-8-Leveln. Wolf und Mitarbeiter zeigten, dass Imatinib potente antiinflammatorische Effekte aufweist. Sie zeigten, dass der Tyrosinkinaseinhibitor die LPS und ConA induzierte TNF-alpha-Produktion für periphere mononukleare Blutzellen und Monozyten hemmt

(Wolf et al., 2005). Es darf hier jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass fibroblastische Zellen, deren Ursprung nicht eindeutig geklärt ist, sich ganz anders verhalten können als die untersuchten peripheren Blutzellen. Eine andere Theorie, die die nach Imatinib-Inkubation erhöhten IL-8 Level erklären könnte, ist damit begründet, dass die IL-8 Expression auch von der Tumor- Mikroumwelt abhängig ist; Tumorphoxie, sowie Azidose erhöhen die Expression von IL-8 (Takeda et al., 2002). IL-8 stimuliert nicht nur die Proliferation einiger Tumoren, sondern induziert auch die Angiogenese. Shi und Mitarbeiter zeigten in einem Mausmodell, dass die IL-8-Expression in vitro direkt mit dem Ausmaß des lokalen Wachstums und der Entwicklung von Lebermetastasen korrelierte (Shi et al., 1999). Klinische Studien weisen ebenfalls darauf hin, dass erhöhte IL-8- und IL-6-Level im Serum mit einer höheren Rate von Lebermetastasen korreliert (Li et al., 2001; Ueda et al., 1994). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass eine Überexpression von IL-8 mit einer erhöhten Tumoraggressivität einhergeht.

Für das Zytokin IL-6 gibt es ähnliche Beobachtungen. Cohen und Mitarbeiter zeigten bereits 1996, dass IL-6 die Freisetzung von VEGF/VPF aus Zervixkarzinomzellen, sowie Glioblastomzellen fördert. Das progressive Wachstum und die Verbreitung solider Tumoren ist abhängig von dem Prozess der Angiogenese. IL-6 fördert die endotheliale Zellmigration, so z.B. beim Ovarialkarzinom (Nilsson et al., 2005). Eine weitere Publikation beschrieb eine positive Korrelation von erhöhten IL-6-Spiegeln in Patienten mit malignem Melanom und dem metastatischem Potential (Moretti et al., 2001). Vaskuläre Strukturen dienen der Zufuhr von Nährstoffen sowie Sauerstoff, um das Tumorwachstum voranzutreiben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass trotz positiver Effekte durch den Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren mögliche Nebenwirkungen, die die erwünschte Wirkung ins Gegenteil verkehren könnten, nicht übersehen werden dürfen. Es wird deutlich, dass eine Notwendigkeit besteht Nebenwirkungen, hervorgerufen durch Imatinib, genauer zu evaluieren, um nachfolgend in in vivo Studien Therapiekonzepte zu entwickeln, die neben einer Proliferationshemmung die Produktion proinvasiver und proangiogener Zytokine supprimieren. Mit der Arbeit ist es gelungen aufzuzeigen, dass die Bedeutung der Myofibroblasten aus den kolorektalen Lebermetastasen, über die es in der Literatur derzeit nur sehr wenige Informationen gibt, nicht zu unterschätzen ist. Möglicherweise

können sie sogar einen Angriffspunkt für zukünftige pharmakologische Therapieansätze darstellen, über die auf die Tumorzellen zugegriffen werden kann.

6. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten bösartigen Tumoren weltweit. Bei etwa 25 % der Patienten finden sich zum Diagnosezeitpunkt bereits Lebermetastasen und mehr als 50 % der Patienten entwickeln diese im Verlauf der Erkrankung. Der weitaus größte Anteil einer Metastase wird vom Tumorstroma gebildet. Die Formation von reaktivem Stroma ist wiederum wichtig für das Wachstum und die Vaskularisierung solider Tumoren. In hepatischen kolorektalen Metastasen bilden CAF den zellulären Hauptbestandteil des Tumorstromas. Ihre genaue Herkunft und ihre Funktionen sind jedoch wenig erforscht. Grundlage der Arbeit war die Etablierung von Fibroblastenkulturen und die Gewebekonservierung, gewonnen aus den Zellen von kolorektalen Lebermetastasen (aus 20 Leberteilresektionen). Anhand dieser konnte deren funktionelles Verhalten untersucht werden. Zellproliferationsexperimente von CAF unter Stimulation mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren und Inhibition mit Imatinib, sowie das Kulturverhalten von Tumorzelllinien unter dem Einfluss von konditioniertem CAF-Medium wurde mittels Handzählung, der ³H-Thymidin-Inkorporationsmethode, sowie dem WST-1 Assay untersucht. Untersuchungen der Zellmigration erfolgten mit dem Boyden Chamber Assay. Untersuchungen von mRNA und Proteinen erfolgten mittels Northern Blot und dem Cytometric Bead Assay. Die aus den Lebermetastasen kultivierten fibroblastischen Zellen zeigten mit der Expression von Vimentin, α -SMA, Desmin und Laminin einen myofibroblastischen Charakter. PDGF-BB, jedoch nicht TGF- β , EGF oder bFGF induzierten die Proliferation der CAF. Konditioniertes Medium der CAF induzierten die Proliferation und die Migration von HUH7- und DLD1-Zellen. CAF exprimierten sowohl den PDGFR- α , als auch den PDGFR- β , womit eine mögliche Zielstruktur für den Tyrosinkinasehemmer Imatinib gegeben ist. Die Inkubation der CAF mit Imatinib führte zu morphologischen Veränderungen der Zellen. Imatinib minderte die Zellproliferation und -viabilität, führte jedoch zu einer vermehrten Expression der mRNA von α -SMA und β -Actin, sowie zu einem signifikanten Anstieg der Zytokine IL-8 und IL-6 in den Zellkulturüberständen. Die Ergebnisse zeigen, dass PDGF-BB ein wichtiger Mediator ist, der eine führende Rolle in der Formation des Tumorstroma spielt. Durch die Sekretion tumorfördernder Faktoren und autokrine/ parakrine Mechanismen mit ihrer Umgebung, nehmen CAF eine Schlüsselposition in der Schaffung eines geeigneten Tumormilieus ein und sind somit von potentiell pharmakologischem Interesse.

7. Literaturverzeichnis

Aggarwal BB, Shisodia S, Sandur SK, Pandey G, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Pharmacol* 2006; 72: 1605-1621.

Antoniades HN. PDGF: a multifunctional growth factor. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1991; 5 (4): 595-613.

Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference o dietary practices. *Int. J Cancer* 1975; 15: 617-631

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-545.

Balkwill F, Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. *Nature* 2004; 431: 405-406.

Barth PJ, Ebrahimsade S, Hellinger A, Moll R, Ramaswamy A. CD34+ fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions. *Virchows Arch* 2002; 440: 128-133.

Barth PJ, Ebrahimsade S, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. *Virchows Arch* 2002; 440: 298-303.

Bellone G, Silvestri S, Artusio E, Tibaudi D, Turletti A, Geuna M, Giachino C, Valente G, Emanuelli G, Rodeck U. Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF- β 1. *J Cell Physiol* 1997; 172: 1-11.

Bellone G, Carbone A, Sibona N, Bosco O, Tibaudi D, Smirne C, Martone T, Gramigni C, Camandona M, Emanuelli G, Rodeck U. Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and and enhances their invasive potential. *Cancer Res* 2001; 61: 2200-2206.

Ben-Baruch A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Sem Canc Biol* 2006; 16: 38-52.

Berk BC, Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Webb RC. Vasoconstriction: a new activity for platelet-derived growth factor. *Science* 1986; 232 (4746): 87-90.

Bottazzi B, Polentarutti N, Acero A, Balsari D, Boraschi P, Ghezzi P. Regulation of tje macrophage content of neoplasms by chemoattractants. *Science* 1983; 220: 210-212.

Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE. Interleikin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 2000; 12: 78-85.

Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increases systolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *American Journal of Pathology* 1991; 138: 213-221.

Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994; 90 (2): 649-652.

Buchdunger E, O'Reilly T, Wood J. Pharmacology of Imatinib (STI 571). *Eur J Cancer* 2002 Sep; 38 Suppl 5: S28-36.

Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1 (7): 493-502.

Chung LW, Chang SM, Bell C, Zhau H, Ro JY, von Eschenbach AC. Prostatic carcinogenesis evoked by cellular interaction. *Health Perspect* 1988; 77: 23-28.

Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhau HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol* 2005; 173: 10-20.

Claesson-Welsh L, Eriksson A, Westermark B, Heldin CH. Cloning and expression of human platelet-derived growth factor alpha and beta receptors. *Methods in Enzymology* 1991; 198: 73-77.

Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 16317-16322.

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271:736-741.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 19-26; 420 (6917): 860-867.

Dandre F, Owens GK. Platelet-derived growth factor-BB and Ets-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286 (6): H2042-2051.

Davidson JM, Broadley KN. Manipulation of the wound-healing process with basic fibroblast growth factor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991; 638: 306-315.

Daynes RA, Dowell T, Arameo BA. Platelet-derived growth factor is a potent biologic response modifier of T-cells. *Journal of Experimental Medicine* 1991; 174 (6): 1323-1333.

Deininger M. Grundlagen der molekularen Therapie BCR-ABL-positiver Leukämien. *TargetForum* 2001, Sonderausgabe Imatinib: 11-15.

Del Vecchio MT, Tripodi SA, Arcuri F, Pergola L, Hako L, Vatti R, Clintorino M. Macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes. *Prostate* 2000 Sep 15; 45(1): 51-57.

Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alston MR, Wright NA. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res* 2004; 64; 8492-8495.

Druker BJ, Lydon NB. Lessons learned from development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 2000; 105:3-7.

Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315: 1650-1659.

Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 2001, 10; 264 (1): 169-184.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.

Fidler IJ, Poste G. The biologic diversity of cancer metastases. *Hosp Pract* 1982; 17: 57-64.

Fidler IJ. Critical determinants of metastases. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 89-96.

Fidler IJ. The organ microenvironment and cancer metastases. *Differentiation* 2002; 70: 498- 505.

Fidler IJ, Kripke, ML. Genomic analysis of primary tumors does not address the prevalence of metastatic cells in population. *Nature Genet* 2003; 34: 23.

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

Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 925-943.

Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 79-99.

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

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon γ inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific α -smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med* 1989;170(5):1595-1608.

Heldin CH, Westermark B. Signal transduction by the receptors for platelet-derived growth factor. *Journal of Cell Science* 1990; 96: 193-196.

Heldin CH, Ostman A, Eriksson A, Siegbahn A, Claesson-Welsh L, Westermark B. Platelet-derived growth factor: Isoform-specific signalling via heterodimeric or homodimeric receptor complexes. *Kidney International* 1992; 41(3): 571-574.

Heldin CH and Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews* 1999; 79 (4): 1283-1316.

Homsy J and Daud AI. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer control* 2007; 14 (3): 285-294.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. *N Engl J Med* 2004; 3350: 2335-2342.

Ishii G, Sangai T, Oda T, Aoyagi Y, Hasebe T, Kanomata N, Endoh Y, Okumara C, Okuhara Y, Magae J, Emura M, Ochiya T, Ochiai A. Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to cancer-induced stromal reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 309 (1): 232-240.

Itoh Y, Joh T, Tanida S, Sasaki M, Kataoka H, Itoh K, Oshima T, Ogasawara N, Togawa S, Wada T, Kubota H, Mori Y, Ohara H, Nomura T, Higashiyama S, Itoh M. IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* 2005; 29 (6): 275-282.

Joensuu H, Roberts PJ, Sarloma-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri GD. Effect of tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001; 344 (4):1052-1056.

Jumming L, Vilcek J. Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Laboratory Investigations* 1988; 61: 588-602.

Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massague J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003; 3: 537-549.

Kaplan-Albuquerque, Garat C, Desseva C, Jones PL, Nemenoff RA. Platelet-derived growth factor-BB-mediated activation of Akt suppresses smooth muscle-specific gene expression through inhibition of mitogen-activated protein kinase and redistribution of serum response factor. *J Biol Chem* 2003; 10; 278 (41): 39830-39838.

Khatib AM, Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Samani A, Kontogianna M, Meterissian S, Brodt P. Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis. *Am J Pathol* 2005; 167 (3): 749-759.

Kinnmann N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 163-173.

Kolonel LN, Hinds MW, Hankin JH. Cancer Patterns among Migrant and Native-bon Japanese in Hawaii in Relation to Smoking, Drinking and Dietary Habits. In: Gelboin HV, MacMahon B, Matsushima T, et al. (eds). *Genetic and Environmental factors in Experimental and Human Cancer*. Tokyo, Japan: Japan Scientific Societies Press; 1980: 327-340.

Kruh GD, King CR, Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh SC, McBride WO, Aaronson SA. A novel human gene closely related to the abl proto-oncogene. *Science* 1986; 19; 234 (4783): 1545-1548.

Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, Richardson A, Weinberg RA. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101 (14): 4966-4971.

Kuwai T, Nakamura T, Sasaki T, Kitadai Y, Kim J, Langley RR, Fan D, Wang X, Do K, Kim S, Fidler IJ. Targeting the EGFR, VEGFR, and PDGFR on colon cancer cells and stromal cells is required for therapy. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 477-489.

Lane BR, Liu J, Bock PJ, Schols D, Coffey MJ, Strieter RM, Polverini PJ, Markovitz DM. Interleukin-8 and growth-regulated oncogene alpha mediate angiogenesis in Kaposi's sarcoma. *J Virol* 2002; 76 (22): 11570-11583.

Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, Matsushima. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 1989; 68 (1): 31-36.

Lazarides E, Balzer DR Jr. Specificity of desmin to avian and mammalian muscle cells. *Cell* 1978; 14: 429-438.

Li A, Varney ML, Singh RK. Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3298-3304.

Lindmark G, Sundberg C, Glimelius B, Pahlman L, Rubin K, Gerdin B. Stromal expression of platelet-derived growth factor beta-receptor and platelet-derived growth factor B-chain in colorectal cancer. *Lab Invest* 1993; 69 (6): 682-689.

Matsushima K, Baldwin ET, Mukaida N. Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines. *Cehm Immunol* 1992; 51: 236-265.

McKeown-Eyssen G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/ or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 687-695

McMichael AJ, McCall MG, Hatchorne JM, Woodings TL. Patterns of gastrointestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. *Int J Cancer* 1980; 5: 431-437.

Meyer-Siegler KL, Vera PL, Iczkowski KA, Bifulco C, Lee A, Gregersen PK, Leng L, Bucla R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphisms are associated with increased prostate cancer incidence. *Genes Immun* 2007 Dec; 8 (8): 646-652.

Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* 1999 Jun 18; 274 (25): 18100-18106.

Mork C, van Deurs B, Peterson OW. Regulation of vimentin expression in cultured human mammary epithelial cells. *Differentiation* 1990; 43: 146- 156.

Moretti S, Chiarugi A, Semplici F. Serum imbalance of cytokines in melanoma patients. *Melanoma Res* 2001; 11: 395-399.

Mueller MM and Fusenig NE. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Cancer* 2004;4:839-849.

Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, Broering DC. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *The Am Journal of Pathology* 2007; 171 (5):

Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukocyte Biol* 1994; 56: 554-558.

Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56.

Nachbaur DM, Herold M, Maneschg A, Huber H. Serum levels of interleukin-6 in multiple myeloma and other hematological disorders: correlation with disease activity and other prognostic parameters. *Annals of Hematology* 1991; 62: 54-58.

Nakagawa H, Liyabarachchi S, Davuluri RV, Auer H, Martin EW, De la Chapelle A, Frankel WL. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 2004; 23: 7366-7377.

Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Hiroi M. Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. *J Clin Pathol* 2000; 53: 626-629).

Nilsson MB, Langley RR, Fidler IJ. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer Res* 2005; 65 (23): 10794-10800.

Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin-6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2 (12): 691.

Oh SJ, Kurz H, Christ B, Wilting J. Platelet-derived growth factor-B induces transformation of fibrocytes into spindle-shaped myofibroblasts in vivo. *Histochem Cell Biol* 1998; 109 (4): 349-357.

Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571 *Blood* 2001; 97(8):2440-8.

Oshima M, Taketo MM. COX selectivity and animal models for colon cancer. *Curr Pharm Res* 2002; 8: 1021-1034.

Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889; 1: 571-573.

Parkin DM; Bry F; Ferley J; Piasani P; Global Cancer Statistics 2002; *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108

Penna C, Nordlinger B. Colorectal metastasis (liver and lung). *Surg Clin North Am* 2002; 82 (5): 1075-1090.

Pepper MS, Ferrara N, Ocri L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991; 181: 902-906.

Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry* 1991; 45 (4): 319-326.

Powel DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts.I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277: C1-9.

Powel DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts.II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999; 277: C183-201.

Prentice RL, Sheppard L. Dietary fat and cancer: consistency of the epidemiologic data, and disease prevention that may follow from a practical reduction in fat consumption. *Cancer Causes Control* 1990; 1: 81-87

Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* 2004; 6: 171-183.

Reeves HL and Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells- a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-d826.

Ricci, P, Zarrilli, R., Di Palma, A, Acquaviva, AM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br. J. Cancer* 2003; 88, 803-807.

Risau W, Drexler H, Mirnov V, Smits A, Siegbahn A, Funa K, Heldin CH. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors* 1992; 7 (4): 261-266.

Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Altrock BW, Pence PC, Hegggers JP, Johnston AF, McHugh TP, Anthony MS, Robson LE, et al. Recombinant platelet-derived growth factor-BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Annals of Plastic Surgery* 1992; 29: 193-201.

Roskoski R Jr. STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309 (4): 709-717.

Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994, 20; 77 (4): 477-478.

Ryan GB et al. Myofibroblasts in an avascular fibrous tissue. *Lab Invest* 1973; 29: 197-206).

Ryan GB et al. Myofibroblasts in human granulation tissue. *Hum Pathol* 1974; 5: 55-67.

Sato Y, Shimada T, Takaki R. Autocrinological role of basic fibroblast growth factor on tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991; 180 (2): 1098-1102).

Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherlin M, Czarnetzki BM. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* 1993; 151: 2667-2675.

Schmid E. Distribution of vimentin and desmin filaments in smooth muscle tissue of mammalian and avian arta. *Exp Cell Res* 1982; 137: 329-340.

Schmit-Gräff A, Desmouliere A, Gabianni G. *Virchows Arch* 1994; 425: 3-24.

Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Tremblay G. Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma: a possible host response to neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1979; 3: 525-533.

Shawyer LK. American Society of Clinical Oncology 1999. Educational Book, 29-37, 1999.

Shi Q, Abbruzese JL, Huang S, Fidler IJ, Xiong Q, Xie K. Constitutive and inducible interleukin-8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin cancer Res* 1999; 5: 3711-3721.

Shimizu M, Minkuchi K, Tsuda A, Hiroi T, Tanaka N, Koga J, Kiyono H. Role of stem cell factor and c-kit signaling in regulation of fetal intestinal epithelial cell adhesion to fibronectin. *Exp Cell Res* 2001; 266: 311-322.

Siegbahn A, Hammacher A, Westermarck B, Heldin CH. Different effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *Journal of Clinical Investigation* 1990; 85: 916-920.

Szekanecz Z, Shah MR, Harlow LA, Pearce WH, Koch AE. Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are involved in human aortic endothelial cell migration. The possible role of these cytokines in human aortic aneurismal blood vessel growth. *Pathobiology* 1994; 62: 134-139.

Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumor necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Canc* 2006; 42: 745-750.

Takeda A, Stoeltzing O, Ahmad SA, Reinmuth N, Liu W, Parikh A, Fan F, Akagi M, Ellis LM. Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastases. *Annals of Surg Oncol* 2002; 9(7): 610-616.

Takizawa H, Ohtoshi T, Yamashita N, Hirohata S, Hirai K, Hiramats K, Ito K. Growth inhibition of human lung cancer cell lines by interleukin 6 in vitro : a possible role in tumor growth via an autocrine mechanism. *Cancer Research* 1993; 15: 4175-4181.

Terada H, Urano T, Konno H. Association of interleukin-8 and plasminogen activator system in the progression of colorectal cancer. *Eur Surg Res* 2005; 37 (3): 166-172.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodeling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 349-363.

Tsukada T, McNutt MA, Ross R, Gown AM. HHF35, a muscle actin-specific monoclonal antibody. II. Reactivity in normal, reactive and neoplastic human tissues. *Am J Pathol* 1987; 127: 389-402.

Tredget, EE, Shankowky EE, Pannu R, Nedelec B, Iwashina T, Ghahary A, Taerum TV, Scott PG. Transforming growth factor-beta in thermally injured patients with hypertrophic scar: effects on interferon alpha-2b. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102: 1317-1328.

Tuchweber B, Desmouliere, Bochaton-Piallat ML, Rubbia-Brandt L, Gabianni G. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 1996; 74: 265-278.

Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J Gastroenterol* 1994; 29: 423-429.

Vadegar H J, Current therapeutic options for colorectal liver metastases. *Indian Journal of Gastroenterology*; 2007; 26: January-February.

Vlodavsky I, Fuks Z, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Levi E, Korner G, Bar-Shavit R, Klagsbrun M. Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor: implication of the control of angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* 1991; 45: 167-176.

Vrana JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res* 1996; 56: 5063-5070.

Wang D, Wang H, Brown J, Daikoku T, Ning W, Shi Q. CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *J Exp Med* 2006; 203: 941-951.

Wang Z, Ma Q, Liu Q, Yu H, Zhao L, Shen S, Yao J. Blockade of SDF-1/CXCR4 signalling inhibits pancreatic cancer progression in vitro via inactivation of canonical Wnt pathway. *Br J Cancer* 2008; 99: 695-1703.

Weiss L. Metastatic inefficiency: causes and consequences. *Cancer Metastasis Rev.* 1986; 3: 1-24.

Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Ludwiczek S, Enrich B, Gastl G, Weiss G, Tilg H. The kinase inhibitor imatinib mesylate inhibits TNF- α production in vitro and prevents TNF-dependent acute hepatic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(38): 13622-13627.

Wong CW, Song C, Grimes MM. Intravascular location of breast cancer cells after spontaneous metastasis to the lung. *Am J Pathol* 2002; 161: 749-753.

Yang L, Scott PG, Giffre J, Shankowsky HA, Ghahary A, Tredget EE. Periperal blood fibrocytes from burn patients: identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. *Lab Invest* 2002; 82: 1183-1192.

Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. Involvement of Interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4015-4023.

Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Masaki T, Fukui H. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288 (5): G907-913.

Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Canc* 2005; 5: 263-274.

8. Bezugsquellenverzeichnis

Chemikalien und Reagenzien

Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK): Methyl-³H-Thymidine, Nylon Transfer Membran.

BD Biosciences (San Diego, CA, USA): CBA Human IL-8 Flex Set, CBA Human IL-6 Flex Set, CBA Human basic FGF Flex Set, CBA Human VEGF Flex Set, Human Soluble Protein Master Buffer Kit.

Biochrom AG (Berlin, Deutschland): Fetal Bovine Serum (FBS).

Biodesign (Saco, MN, USA): FITC-coupled anti-human vimentin.

Cohesion (Palo Alto, CA): Vitrogen.

DAKO (Glostrup, Dänemark): α -SMA (1/50, clone 1A4), Vimentin (1/50, clone V9), Desmin (1/50, clone D33), Laminin (1/25, clone 4C7).

DSMZ (Braunschweig, Deutschland): DLD-1, SW480.

Invitrogen (Auckland N.Z.): GIBCO Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Trypsin-EDTA.

Invitrogen (Grand Island, NY, USA): Medium 199, Fetal Bovine Serum, Antibiotika-Antimykotika-Lösung (Penicilline, Streptomycin, Amphotericin B), Trypanblau, PBS, Agarose.

Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK): Rhodamine RedTM-X-conjugated Affini Pure Donkey-Anti-Mouse IgG.

JCRB cell bank (Tokio, Japan): HUH-7.

Merck (Darmstadt, Deutschland): Ethanol 70%, Ethidiumbromid.

Novartis (Basel, Schweiz): Imatinib.

Qiagen (Hilden, Deutschland): RNeasy Midi Kit.

Roche (Mannheim, Deutschland): Cell Proliferation Reagent WST-1, human PDGF B/B (10ng/ml), 1st strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, Protector RNase Inhibitor, Primer p(dT), Reverse Transkriptase, Taq Polymerase, PCR dNTP Mix, PCR DIG Probe Synthesis Kit, DIG Easy Hybridisierungspuffer, DIG Wash and Block Buffer Set, Anti-DIG-AB, CDP-Star ready to use, 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit.

Sigma (Steinheim, Deutschland): Gey's Balanced Salt Solution (GBSS).

Sigma (St. Louis, MO, USA): VEGF, Kollagenase Typ IV, Sigma Water, Mops, Sodium Acetat, EDTA, Formaledhyd, Formamid, Transformin Growth Factor β 1 (5 ng/ml).

Sigma-Aldrich (München, Deutschland): Tris-EDTA-Puffer, Detergent Powder Terg-A-Zyme.

Sigma-Aldrich Company (Aryshire, UK): RNase-freies Wasser.

Vector Laboratories (Burlingame, Ca, USA): Vectastain ABC-AP Kit.

Primer

Folgende Primerpaare, die von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) käuflich erworben wurden, wurden verwendet:

α -SMA (NM_001613.1):

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

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

Histon H2B (BC101411.1):

Forward Primer: 54- AGT GAC AAA GGC CCA GAA GA

Reverse Primer: 366- GTA CTT GGT GAC GGC CTT G

II-8 (NM_000584):

Forward Primer: 17- CTT TCA GAG ACA GCA GAG CAC

Reverse Primer: 972- ACT GTG AGG TAA GAT GGT GGC

GAPDH (NM_002046.2):

Forward Primer: 81- GAA GGT GAA GGT CGG AGT C

Reverse Primer: 306- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

9. Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	alpha-smooth muscle actin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintri-phosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovines Serumalbumin
CAF	Cancer associated fibroblasts
CBA	Cytometric Bead Array
cDNA	komplentäre DNA
DAPI	Diamidino-phenylindol
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DUTP	Desoxyuridintri-phosphat
DTTP	Desoxythymidintri-phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
HNPPC	Hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom
HSC	Hepatische Sternzellen
PDGF-BB	Platelet-Derived Growth Factor B/B, human
IL	Interleukin
INF	Interferon
LF	Leberfibroblasten
MIF	Macrophage migratory inhibitor factor
mRNA	messenger RNA
N	Anzahl
NSAR	Nicht-Steroidale Antiphlogistika

PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
RB	running buffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	reverse Transkription
SEM	Standardabweichung
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-Alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: A+B: Primärkultivierte CAF aus kolorektalen Lebermetastasen nach 24-stündiger Inkubation unter serumreduzierten Bedingungen, DMEM + 0,5 % FBS (A: 100-fache Vergrößerung, B: 400-fache Vergrößerung). C+D: CAF nach 24-stündiger Inkubation unter Kulturbedingungen, DMEM + 10 % FBS (C:100-fache Vergrößerung, D: 400-fache Vergrößerung).....35

Abb. 2: Lokalisation und Phänotyp der CAF aus kolorektalen Lebermetastasen. A+B: Immunhistochemie nach Serienschnitten aus Lebermetastasen, positiv (rot) für Vimentin (A) und α -SMA (B), weisen auf einen myofibroblastischen Phänotyp der CAF hin, die sich im Tumorstroma finden. C: Immunfluoreszenz kultivierter CAF gegen Vimentin (grün). D: Vimentin + α -SMA (α -SMA: rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Originalgröße 400 \times . Die Fotos repräsentieren 4 unabhängige Versuche von 4 Patienten.....36

Abb. 3: A: CAF wurden auf chamber slides kultiviert. Anschließend erfolgte eine immunzytochemische Färbung gegen α -SMA. B: Immunhistochemie nach Kryogewebeschnitten von Lebermetastasen, gefärbt gegen Vimentin (rot); Grenzregion zwischen kolorektaler Lebermetastase und normalem Lebergewebe.....37

Abb. 4: ^3H -Thymidin-Inkorporationsmethode. A: Proliferation der Fibroblasten aus tumorfreiem Lebergewebe nach 24-stündiger Inkubation mit den Mediatoren PDGF-BB (10 ng/ml), TGF- β (5 ng/ml) und EGF (10 ng/ml) B: Proliferation der CAF nach 24-stündiger Inkubation mit den Mediatoren PDGF-BB (10 ng/ml), TGF- β (5 ng/ml) und EGF (10 ng/ml). N=5; * p < 0,05; ns, nicht signifikant.....38

Abb. 5: Proliferation der CAF aus kolorektalen Lebermetastasen nach 24-stündiger Inkubation mit PDGF-BB. Zellzählung unter dem Mikroskop 1, 3 und 5 Tage nach Stimulation mit PDGF-BB (10 ng/ml); K=Kontrolle. N=5, * p < 0,05.....39

Abb. 6: WST-Assay. A: HUH7 wurden mit konditioniertem Medium, gewonnen aus Zellkulturüberständen der CAF, 24 h inkubiert. Die Konzentration des CAF-Mediums betrug 10 %, 50 % und 100 %. B: DLD1 wurden mit konditioniertem Medium, gewonnen aus Zellkulturüberständen der CAF 24 h inkubiert. Die Konzentration des CAF-Mediums betrug 10 % 50 % und 100 %. * p < 0,05, ** p < 0,005, N=5.....40

Abb. 7: Gegenüberstellung der Migration (A) und der Proliferation (B) der HUH7 nach Inkubation mit konditioniertem Medium der CAF in verschiedenen Konzentrationen. A: Die Chemotaxis der HUH7-Zellen wurde anhand des Boyden Chamber Assay nach 5-stündiger Inkubation mit CAF-Medium ermittelt, wie in Kapitel 3.8 beschrieben. B: Die Proliferation der HUH7 wurde nach 24-stündiger Inkubation mit CAF-Medium in den Konzentrationen 10%, 50%, sowie 100% anhand des WST-Assays ermittelt, beschrieben in Kapitel 3.5.3. Grauer Balken: Fibroblasten aus tumorfreiem Lebergewebe; schwarzer Balken: CAF. K=Kontrolle, N=5, * p < 0,01 und # p < 0,001 vs Kontrolle.....41

Abb. 8: Gegenüberstellung der Migration (A) und der Proliferation (B) der Kolonkarzinomzelllinie DLD1 nach Inkubation mit konditioniertem Medium der CAF in unterschiedlichen Konzentrationen. A: Die Chemotaxis der HUH7-Zellen wurde anhand des Boyden Chamber Assay nach 5-stündiger Inkubation mit CAF-Medium ermittelt, wie in Kapitel 3.8 beschrieben. B: Die Proliferation der DLD1 wurde nach 24-stündiger Inkubation mit CAF-Medium in den Konzentrationen 10%, 50%, sowie 100% wurde anhand des WST-Assays ermittelt, beschrieben in Kapitel 3.5.3. K=Kontrolle, N=5, * p < 0,01 und # p < 0,001 vs Kontrolle.....42

Abb. 9: RT-PCR-Analyse von PDGFR- α - und PDGFR- β -mRNA aus 4 verschiedenen CAF-Isolationen [1-4], SW480 Kolonkarzinomzellen (CC) und HUH7-Zellen (HC). St, Standard Molekulargewicht; N, negative Kontrolle.....43

Abb. 10A: Effekt von Imatinib und PDGF-BB, jeweils alleine oder in Kombination, auf die Fibroblastenmorphologie nach Inkubation mit ansteigender Konzentration von Imatinib. 1×10^6 Zellen wurden auf 145 cm^2 Kulturplatten ausgesät und für 24 h in DMEM + 10 % FBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 % FBS inkubiert, ohne oder mit PDGF-BB (10 ng/ml) und ohne oder mit Zusatz von $1 \mu\text{M}$ Imatinib. 24 h bzw. 72 h später wurden repräsentative Areale fotografiert, 100-fache Vergrößerung.....45

Abb. 10B: Effekt von Imatinib und PDGF-BB, jeweils alleine oder in Kombination, auf die Fibroblastenmorphologie nach Inkubation mit ansteigender Konzentration von Imatinib. 1×10^6 Zellen wurden auf 145 cm^2 Kulturplatten ausgesät und für 24 h in DMEM + 10 % FBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 % FBS inkubiert, mit 10 ng/ml PDGF-BB und dem Zusatz von $1 \mu\text{M}$ bzw. $10 \mu\text{M}$ Imatinib. 24 h bzw. 72 h später wurden repräsentative Areale fotografiert, 100-fache Vergrößerung.....46

Abb. 11: A: Ergebnisse der Zellzählung unter dem Mikroskop nach 24-stündiger Inkubation mit 0,5 % FBS als Kontrolle, ohne oder mit PDGF-BB (10 ng/ml), ohne oder mit Zugabe von Imatinib in den Konzentrationen $1 \mu\text{M}$ bzw. $10 \mu\text{M}$ und ohne oder mit DMSO in den Konzentrationen $1 \mu\text{M}$ bzw. $10 \mu\text{M}$. B: Ergebnisse der Zellzählung unter dem Mikroskop nach 72-stündiger Inkubation mit 0,5 % FBS als Kontrolle, ohne oder mit PDGF-BB (10 ng/ml), ohne oder mit Zugabe von Imatinib in den Konzentrationen $1 \mu\text{M}$ bzw. $10 \mu\text{M}$ und ohne oder mit DMSO in den Konzentrationen $1 \mu\text{M}$ bzw. $10 \mu\text{M}$. Die Kontrolle wurde 1 gleichgesetzt (graue Säule). Veränderungen wurden als Effekt versus Kontrolle angegeben. Die Säulen umfassen jeweils 3 verschiedene Präparationen der CAF. * p < 0,05 versus einfacher PDGF-BB Inkubation; ns, nicht signifikant.....48

Abb.12: WST-1 Assay. Effekt von PDGF-BB und Imatinib in auf die Viabilität der CAF. CAF wurden 24h mit 0,5 % FBS als Kontrolle, DMSO, mit oder ohne PDGF-BB (10 ng/ml) und/ oder ansteigender Konzentration von Imatinib ($1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$) inkubiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 4 verschiedenen Präparationen. * p < 0,05; ns, nicht signifikant.....49

Abb. 13: Effekt von PDGF-BB und Imatinib auf die DNA-Synthese der CAF, gemessen anhand der ³H-Thymidin-Inkorporationsmethode. Die Ergebnisse sind als Effekt versus Kontrolle (DMEM + 0,5 % FBS) dargestellt. Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 4 verschiedenen Präparationen. * p < 0,05; ** p < 0,001; ns, nicht signifikant.....50

Abb. 14: Repräsentativer Northern Blot, der den Effekt von PDGF-BB (10 ng/ml) mit/ ohne Imatinib (1 µM, 10 µM) auf die mRNA-Expression des Histonproteins H2B darstellt. 10 µg Gesamt-RNA wurden auf 1 % Agarosegel aufgetragen, wie in Kapitel 3.10.4 beschrieben. Als Kontrolle wurde der Northern Blot mit einer GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert.....51

Abb. 15: Effekt von PDGF-BB (10 ng/ml) mit oder ohne Imatinib (1 µM, 10 µM). A: Repräsentativer Northern Blot, der den Effekt auf die Expression von α-SMA und β-Actin darstellt. 10 µg Gesamt-RNA wurden auf 1 % Agarosegel aufgetragen, wie in Kapitel 3.10.4 beschrieben. Als Kontrolle wurde der Northern Blot mit einer GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert. B: Densitometrische Analyse des Northern Blots für α-SMA. Die mRNA ist im Vergleich zur Kontrolle (DMEM + 0,5 %) dargestellt. Die Kontrolle wurde 1 gleichgesetzt. CAF Präparationen aus 4 Patienten. * p < 0,05 vs Kontrolle; ns, nicht signifikant.....52

Abb 16: Effekt von PDGF-BB (10 ng/ml) mit oder ohne Imatinib (1 µM, 10 µM). A: Repräsentativer Northern Blot. Darstellung des Effekts auf die Expression von IL-8. 10 µg Gesamt-RNA wurden auf 1 % Agarosegel aufgetragen, wie in Kapitel 3.10.4 beschrieben. Als Kontrolle wurde der Northern Blot mit einer GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert. B: Densitometrische Analyse des Northern Blots für IL-8. Die mRNA ist im Vergleich zur Kontrolle (DMEM + 0,5 %) dargestellt. Die Kontrolle wurde 1 gleichgesetzt. CAF Präparationen aus 4 Patienten. * p < 0,05 versus Kontrolle; ns, nicht signifikant.....54

Abb. 17: Bead Array Messung. Freisetzung von IL-8, IL-6, VEGF und bFGF in die Zellkulturüberstände durch die CAF. Primärkultivierte Zellen wuchsen bis zu einer 80 %-igen Konfluenz. 48 h nach Aussaat wurden die Zellen 24 h bzw. 72 h mit DMEM + 0,5 % FBS inkubiert, jeweils mit oder ohne Zusatz von 10 ng/ml PDGF-BB und Imatinib (1 µM und 10 µM). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse von Myofibroblastenpopulationen von drei verschiedenen Patienten; *p < 0,05; **p < 0,001 vs. Kontrolle; ns, nicht signifikant.....55

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank an Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. X. Rogiers für die wissenschaftliche Förderung und die zur Verfügung gestellten Arbeitsbedingungen.

Herrn Professor Dr. med. B. Nashan und insbesondere Herrn PD Dr. med. L. Fischer möchte ich herzlich für die Möglichkeit des Abschlusses der Promotion danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. L. Müller. Er hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und Anliegen und hat mich wissenschaftlich gefördert.

Ein ganz herzlicher Dank an das gesamte Laborteam, allen voran Frau Sigrid Himpel († 2007). Auf ihre Hilfe und Ratschläge konnte ich mich immer verlassen. Ihr und meinen Mitdoktoranden Susanne Sandtner und Anni Affeldt verdanke ich die gute Atmosphäre, die in unserem Labor herrschte. Ich habe mich dort immer wohl gefühlt.

Regina Peters und Silke Brilloff möchte ich für die Unterstützung bei der Laborarbeit danken.

Besonders wichtig war in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit auch der Rückhalt, den ich bei meinen Freunden finden durfte.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und Schwestern, die immer für mich da sind. Ihre Unterstützung begleitete mich durch die gesamte Zeit der Erstellung der Arbeit.

12. Lebenslauf

Originalarbeiten

Müller L*, Goumas FA*, Himpel S, Brilloff S, Rogiers X, Broering DC.
Imatinib mesylate mesylate inhibits proliferation and modulates cytokine expression of human cancer-associated stromal fibroblasts from colorectal metastases. Cancer Lett. 2007 ; 8 ; 250 (2) : 329-338. (*gleichberechtigte Co-Autoren)

Mueller L, Goumas FA, Affeldt M Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, Broering DC. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. Am J Pathol 2007; 17 (5): 1608-1618.

Vorträge und Poster

F. Goumas, L. Müller, P. Kahl, M. Affeldt, S. Herbst, X. Rogiers, D.C. Bröring.
Tumorstroma-Fibroblasten aus koloretalen Lebermetastasen als zelluläres Target für TGF-beta, PDGF und VEGF und Produktionsort für proangiogenetische Faktoren. (121. Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie)

P. Kahl, L. Müller, M. Affeldt, F. Goumas, S. Herbst, X. Rogiers, D.C. Broering.
Phänotypische Charakterisierung von primärkultivierten Tumorstroma-assoziierten Myofibroblasten bei kolorektalen Lebermetastasen. (121. Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie)

Freya A. Goumas, Lars Müller, Marianne Affeldt, Susanne Herbst, Sigrid Himpel, Silke Brilloff, Katrin Lamszus, Regina Fillbrandt, Ursula M. Gehling, Xavier Rogiers, Dieter C. Broering. Phenotypic and functional characterization of cancer stroma associated myofibroblasts from hepatic metastases of colorectal cancer. (2nd Annual International Tumor Metabolism Summit)

L. Müller, F. Goumas, S. Sandtner, S. Himpel, S. Brilloff, X. Rogiers, D.C. Broering.
Identifizierung einer proangiogenetischen Rolle von Tumorstroma-assoziierten Myofibroblasten aus kolorektalen Lebermetastasen unter dem Einfluss inflammatorischer Mediatoren. (123. Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie)

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 Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

Freya A. Goumas