

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und
Transplantationschirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Björn Nashan

Untersuchungen zur Expression von Interleukin-8 in
tumorstromaassoziierten Fibroblasten aus humanen kolorektalen
Lebermetastasen und dessen Einfluss auf das Migrationsverhalten von
Karzinomzelllinien

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Nadia Karnatz
aus Rostock

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 01.12.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. L. Müller

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. A. Marx

Inhaltsverzeichnis

1. Fragestellung.....	3
2. Einleitung.....	4
2.1 Kolorektale Lebermetastasen.....	4
2.1.1 Allgemeine Betrachtung zu kolorektalen Lebermetastasen.....	4
2.1.2 Metastasierung.....	5
2.2 Fibroblasten der Leber und des Tumorstromas.....	5
2.2.1 Ursprung fibroblastischer Zellen der Leber.....	5
2.2.2 Fibroblasten des Tumorstromas.....	7
2.3 Inflammation und Tumorprogression.....	8
2.4 Chemokine	9
2.4.1 TNF- α und TNF-Rezeptoren.....	9
2.4.2 Interleukin-8.....	10
3. Materialien und Methoden.....	12
3.1 Materialien.....	12
3.2 Patienten.....	12
3.3 Methoden.....	12
3.3.1 Gewebeaufbereitung.....	12
3.3.2 Zellkultivierung und Zellpassage.....	13
3.3.3 Zellstimulationsversuche.....	14
3.3.4 RNA-Extraktion	14
3.3.5 Northern Blot.....	16
3.3.6 Herstellung der Hybridisierungssonden.....	17
3.3.7 Hybridisierung.....	18
3.3.8 Detektion der DIG-markierten Nukleinsäuren.....	18
3.3.9 Immunhistochemie.....	19
3.3.10 ELISA.....	20
3.3.11 Chemotaxis Assay.....	21
3.3.12 Statistische Auswertung.....	22

4. Ergebnisse.....	23
4.1 Charakterisierung des inflammatorischen Milieus von Lebermetastasen.....	23
4.2 Expression von IL-8.....	25
4.3 Wirkung des NF- κ B-Inhibitors Parthenolid auf die IL-8 Expression.....	31
4.4 Migrationsverhalten von HuH7, DLD-1, Colo-678 und HUVEC	35
5. Diskussion.....	40
5.1 Inflammatorische Zellen als Bestandteil kolorektaler Lebermetastasen	40
5.2 Expression des Zytokins Interleukin-8 in kolorektalen Lebermetastasen.....	42
5.3 Einfluss von IL-8 und konditioniertem Medium auf die Zellmigration.....	46
6. Zusammenfassung.....	50
7. Literaturverzeichnis.....	51
8. Anhang.....	65
8.1 Bezugsquellenverzeichnis.....	65
8.1.1 Lösungen und Puffer.....	65
8.1.2 Primer und Zelllinien.....	65
8.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Geräte.....	66
8.2 Abkürzungsverzeichnis.....	68
9. Danksagung.....	71
10. Lebenslauf.....	72
11. Eidesstattliche Versicherung.....	73

1. Fragestellung

Patienten mit kolorektalen Karzinomen haben ein hohes Risiko, im Verlauf ihrer Erkrankung Lebermetastasen zu entwickeln. Aufgrund häufig ungünstiger Lokalisationen sind sie nur schwer chirurgisch zu therapieren und in vielen Fällen Ursache für den letalen Ausgang. Daraus ergibt sich eine entscheidende Bedeutung für die Erforschung neuer Therapiekonzepte, die das Wachstum und die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms in der Leber hemmen.

Es ist bekannt, dass es sich bei der Progression und Proliferation von Tumoren um eine Interaktion verschiedener Faktoren handelt, die einen bestimmenden Einfluss auf das tumorumgebende Milieu haben. Einen besonderen Stellenwert nehmen dabei gewebeeigene Körperzellen ein, die das Tumorstroma bilden. Des Weiteren wird die Bedeutung von entzündlichen Vorgängen diskutiert, da hierbei eine Vielzahl verschiedener Chemokine freigesetzt wird, die einen starken modulierenden Einfluss nehmen können. Das Verständnis der Aktivitäten im Stroma gewährt Möglichkeiten der Kontrolle involvierter Zellen wie beispielsweise Karzinomzellen, Endothelzellen sowie Fibroblasten.

Ziel dieser Arbeit war die histologische Analyse der hepatischen kolorektalen Metastasen in Bezug auf das Vorkommen entzündlicher Zellen *in situ* und eine funktionelle Beschreibung der tumorstromaassoziierten Fibroblasten (TAF) hinsichtlich ihrer Reaktion auf proinflammatorische Substanzen *in vitro*.

Es erfolgte die Charakterisierung der Gewebeschnitte auf das Vorkommen von CD45-positiven Zellen als Anhalt auf eine entzündliche Aufbereitung sowie die mögliche Expression von Interleukin-8 (IL-8), einem inflammatorischen Chemokin, im Gewebe. Anhand von kultivierten TAF und Leberfibroblasten wird die Wirkung der Zytokine TNF- α (engl.: tumor necrosis factor- α), PDGF (engl.: platelet-derived growth factor) und TGF- β (engl.: transforming growth factor β) gemessen an der Interleukin-8 Expression *in vitro* sowie die Auswirkung des NF- κ B-Inhibitors Parthenolid (PTL) untersucht. Außerdem wurde der Einfluss von konditioniertem Medium aus stimulierten und nicht stimulierten tumorstromaassoziierten Fibroblasten auf die Migration von Tumorzelllinien analysiert.

2. Einleitung

2.1 Kolorektale Lebermetastasen

2.1.1 Allgemeine Betrachtung zu kolorektalen Lebermetastasen

Obwohl sich in den letzten 30 Jahren die Leberresektion als einzige Möglichkeit zur kurativen Behandlung von Lebermetastasen etablierte, stellt eine Metastasierung der Leber auch heute noch einen prognostisch ungünstigen Faktor dar. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 20-30% nach der Resektion der kolorektalen Lebermetastasen scheint eine kurative Zielsetzung zwar möglich, dennoch zeigten Studien, dass die Heilungsrate abhängig von der Art der Resektion ist [22; 32; 81]: So beträgt sie etwa 40%, insofern eine komplette R0-Sektion erfolgt, sollte dieses jedoch nicht möglich sein, ergibt sich dem Patienten trotz chirurgischer Intervention nur eine mittlere Überlebensdauer von 15-25 Monaten. [42; 73; 107] Patienten mit einem Primarius im Stadium Duke B, das bedeutet eine Tumorpenetration der Darmwand ohne regionalen Lymphknotenfall, haben dagegen eine 5-Jahresüberlebensrate von bis zu 60%. [12; 119]

Der Verlauf der Erkrankung wird folglich hauptsächlich durch die Fernmetastasierung bestimmt. Die Leber stellt, aufgrund ihrer anatomischen Lage und physiologischen Stellung, das primäre Organ für die hämatogene Tumorabsiedlung dar. Während 25% des Patientenguts schon bei Diagnosestellung Metastasen entwickelt haben, kommt es bei weiteren 25% zum Auftreten von Lebermetastasen nach der Resektion des kolorektalen Karzinoms. [63; 82]

Bis heute bleibt die chirurgische Intervention der einzige kurative Ansatz. Zusätzliche Therapieformen wie die Radiotherapie, Immuntherapie oder Kryotherapie bieten lediglich eine Möglichkeit zur Erhöhung der Wirksamkeit der Behandlung, jedoch keine alleinige Alternative. [68] Eine Sonderstellung nimmt die Chemotherapie ein, die zwar einerseits als palliative Maßnahme angesehen werden kann, andererseits mittlerweile auch als neoadjuvante Therapie zur Anwendungen kommt. Hierbei soll das Risiko von nicht diagnostizierbaren Mikrometastasen reduziert werden, um der Entstehung von Rezidiven günstig entgegenzuwirken. [1; 47]

2.1.2 Metastasierung

Sekundäre Lebermalignome sind in westlichen Ländern die zahlenmäßig am stärksten vertretenen Tumoren der Leber. Das Kolorektum nimmt dabei als eine der bevorzugten Lokalisationen der Primärtumoren eine entscheidende Position ein. [102; 110]

Das Prinzip der Metastasierung stellt dabei ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren dar, nach dem diejenigen Prozesse zusammengefasst werden, „die an einer Verschleppung maligner Zellen oder infektiöser Keime beteiligt sind und ihr An- und Weiterwachsen in entfernten Körperregionen“ verwirklichen. [102] Vieles deutet daraufhin, dass Zellen aufgrund der Mutationen von Genen, die die Fähigkeit besitzen, die Metastasierungspotenz von Zellen zu unterdrücken, sich ungehindert teilen und sich durch Verschleppung in entfernten Körperregionen ansiedeln. Ein Beispiel dafür ist das NM23-Gen auf dem langen Arm des Chromosomen 17 (=Anti-Metastasierungsgen). [125; 128] Der Verlust der Kohäsion der Zellen führt zu einem Aufspalten des Zellverbandes und somit zu einer Intravasation der Tumorzellen, vermittelt durch verschiedene Chemokine. [20] Neben Wachstumsfaktoren wie TGF- β und bFGF (engl.: basic fibroblast growth factor) sind auch Metalloproteinasen, welche in der Lage sind, die Zellmembran aufzulösen, von besonderer Relevanz. [101; 126] Um sich vor dem Angriff der eigenen Immunabwehr zu schützen, exprimieren die Zellen HLA-Selbsterkennungsmoleküle (engl.: human leucocyte antigen) und bilden eine Kapsel aus Fibrin. [130] Abhängig von organspezifischen Anheftungs- und Wachstumsbedingungen siedeln sich die Zellen in sekundären Organen an. [125] In Hinblick auf Blutversorgung, Mikroarchitektur und ungeklärter Adhäsionsprozesse („homing“) scheint die Leber gute Bedingungen für ein weiteres Heranwachsen der metastasierten Tumorzellen zu bieten. [20; 105]

2.2 Fibroblasten der Leber und des Tumorstromas

2.2.1 Ursprung fibroblastischer Zellen der Leber

Fibroblasten nehmen bei Erkrankungen der Leber eine gesonderte Rolle ein, da sie aufgrund ihrer Fähigkeit Septen zu bilden, aber auch wiederum das parenchymatöse Organ zu durchsetzen, einen prognostisch wichtigen Faktor für verschiedene Erkrankungen darstellen. [33] Bisher gab es wenige Studien, die sich mit dem Einfluss von histologischen Faktoren auf die Prognose beschäftigten. [72] Da das Stroma der gesun-

den Leber vergleichsweise wenig Fibroblasten besitzt, stellen sich die Fragen nach dem Ursprung der Zellen und den Grundlagen, die den Wachstums- und Differenzierungsvorgängen während der Fibrogenese zugrunde liegen.

Fibroblasten sind ubiquitär vorkommende Zellen, die in der Leber perivaskulär, in den perizentralen Arealen sowie in den Portalfeldern lokalisiert sind. [29; 30] Gerade in Bezug auf die Bedeutung der Herkunft der Fibroblasten bei neoplastischen Prozessen werden derzeit verschiedene Theorien diskutiert:

Zum einen gilt es als wahrscheinlich, dass residente, aktivierte hepatische Sternzellen (HSC) eine der Quellen darstellen. [37; 88]

Phänotypisch imponiert im Zytoplasma aktivierter HSC α -SMA (engl.: alpha-smooth muscle actin), ein Glattmuskel-Filament, und funktionell eine Progression der Zellproliferations- und Kollagenerzeugungsrate. [33] Zwar sind die aktivierten hepatischen Sternzellen nicht die einzigen matrixproduzierenden Zelltypen der Leberfibroblastenreihe, dennoch stellen sie den Hauptanteil an Zellen bei der Leberfibrogenese. [55] In der gesunden Leber findet neben der Speicherung von Vitamin A auch die Produktion von Teilen der Basalmembran in den HSC statt. [13] Verschiedene Studien zeigten jedoch, dass sie sich bei „Leberwunden“ in hochproliferierende myofibroblasten-ähnliche Zellen transformieren mit der Fähigkeit, extrazelluläre Matrix zu produzieren, eine Vielzahl verschiedener Zytokinrezeptoren zu exprimieren und mittels Rezeptoren modulierenden Einfluss auf ihre Umgebung zu nehmen. [83; 88]

Bei einer weiteren fibroblastischen Zellpopulation, die in die Fibrogenese der Leber involviert ist, handelt es sich um Myofibroblasten. Hierbei wird davon ausgegangen, dass zirkulierende Fibrozyten, deren extrahepatische Ursprünge unter anderem im Knochenmark zu suchen sind, bei Lebergewebsschädigung ansässig werden können und proliferieren. [29; 30]

Zur Unterscheidung beider Zellpopulationen können immunhistochemische Nachweise herangezogen werden, da zwar beide, aktivierte HSC und Myofibroblasten, α -SMA exprimieren, aber nur Myofibroblasten positiv für Fibulin-2 zu sein scheinen. [30] Folglich scheint es eine Auswahl von Möglichkeiten zu geben, welche Zellen bei der Fibrogenese ihren Beitrag leisten.

2.2.2 Fibroblasten des Tumorstromas

Die Beziehung zwischen Tumor- und Stromazellen ist essentiell für die Entwicklung von Neoplasien. [19; 59] Verschiedene Studien zeigten, dass deren Zusammenspiel entscheidend für das Karzinomwachstum sowie dessen Verbreitung ist. So gilt es als gesichert, dass bei der Entstehung bzw. Infiltration maligner Zellen in einem Gewebe eine „Stroma-reaktion“ auftritt, die unter anderem zu einer Ansammlung und Zunahme von Stützzellen und extrazellulärer Matrix (EZM) führt. [28] Eine bereits gut untersuchte zelluläre Komponente der Stromareaktion sind die Myofibroblasten, modifizierte Fibroblasten mit der Fähigkeit α -SMA zu exprimieren und Desmin, Fibronectin sowie Kollagen (TYP III und IV) als Bestandteile der EZM zu sezernieren. [84; 95; 118] Diese aktivierten myofibroblastischen Zellen können aufgrund ihrer Interaktionen entscheidenden Einfluss auf die Tumorzellen und das umgebende Stroma nehmen und dadurch zu morphologischen und molekularen Veränderungen, Immunreaktionen oder zu der Formation neuer Gefäße im Tumorstromagewebe beitragen. [19] Die stimulierten Fibroblasten, gelenkt durch das parakrine Feedback der malignen Zellen, sind mitverantwortlich für den Verlust des physiologischen Stromamilieus. [9]

Tumorstromaassoziierte Fibroblasten (TAF) stellen den Hauptanteil des Stromas in soliden Tumoren wie auch in ihren Metastasen. Untersuchungen des Phänotyps zeigten, dass es sich hierbei um eine heterogene Gruppe von Fibroblasten handelt, die maßgeblich zum komplexen Aufbau des tumorassoziierten Stromas beiträgt. [89; 98; 127]

Die TAF-Population ist multifunktional und induziert pathophysiologisch Tumorprogression, Invasion und Angiogenese. [28]

Karzinomzellen können wiederum die Proliferation der Fibroblasten fördern. Als Resultat der Interaktion zwischen Stroma- und Tumorzellen modifizieren Karzinomzellen ihre Morphologie und Migrationsmechanismen. [9]

Analog zur Fibrogenese der Leber scheint auch beim Tumorstroma der Ursprung nicht nur in organspezifischen residenten Fibroblasten zu liegen, sondern ist ebenso durch die Transdifferenzierung aus Blut- oder Knochenmarkstammzellen und mesenchymalen Epithelzellen mitbestimmt. [29]

2.3 Inflammation und Tumorprogression

Aufgrund zahlreicher Beispiele ist eine Korrelation zwischen der Karzinogenese und lokal entzündlichen Ereignissen derzeit unbestritten. Doch schon im Jahre 1863 vermutete Virchow einen Zusammenhang, bei dem er die erhöhte Zellproliferation durch die Irritation, die durch eine chronische Entzündung verursacht wird, begründete. [23]

Die Todesrate von Krebspatienten, deren Erkrankung auf eine Infektion und somit auf eine chronische Inflammation zurückzuführen ist, beträgt in Industrieländern derzeit 7% -10%. [108] So gilt bei zahlreichen Karzinomkrankungen, wie beispielsweise dem humanen Papillomavirus (HPV) und dem Zervixkarzinom, dem Hepatitis C Virus (HCV) und dem hepatozellulären Karzinom, ein Bezug als gesichert, aber auch bei nicht infektiösen chronischen Entzündungen, wie dem gastroösophagealen Reflux und dem Ösophaguskarzinom oder auch M.Crohn / Colitis ulcerosa und dem kolorektalen Karzinom, besteht eine kausale Relation. [41; 70; 77]

Um die Rolle der Entzündung bei der Entstehung von Tumoren zu verstehen, ist es bedeutsam, die zugrunde liegenden Abläufe zu erfassen: Eine Inflammation ist ein dynamischer Prozess, bei dem eine komplexe Reaktion der Blutgefäße und der Bestandteile des Blutes sowie des Immunsystems aufgrund einer lokalen Gewebeschädigung hervorgerufen wird. [102] Makrophagen und andere Entzündungszellen erzeugen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren (u.a. TGF- β), Zytokinen (Interleukine; TNF- α) und Radikalen, die einen Schaden in der DNA der Gewebezellen zur Folge haben können. Diese Veränderung im Umgebungsmilieu verursacht einen fortschreitenden Gewebeschaden, der eine unkontrollierte Zellproliferation und Tumorprogression induzieren kann. [70]

Andererseits besitzt der Körper die Neigung, einer Neoplasie mit einer entzündlichen Antwort auf die Tumorprogression zu begegnen: Das Tumorstadium ist verbunden mit einem erhöhten Zelltod, ausgelöst durch Apoptose oder auch Nekrose. Dabei entlassen nekrotische Zellen bei ihrem Zerfall diverse Entzündungsmediatoren, welche unter anderem potente Stimulanzen für inflammatorische Zellen darstellen. Die Tumorzellen sezernieren zudem Chemokine, die residente Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen aktivieren sowie eine Infiltration von Leukozyten und Monozyten im neoplastischen Gewebe zur Folge haben. [62] Des Weiteren bewirkt eine entzündliche Reaktion eine Erhöhung der Angiogenese, die eine deutliche Tumorprogression und fataler Weise auch eine erleichterte Metastasierung begründen kann. [87] Das zeigt, dass die Beziehung von

Tumoren und Inflammation keine Einbahnstraße ist, sondern dass eine rege Wechselbeziehung zwischen Ursache und Wirkung besteht.

2.4 Chemokine

2.4.1 TNF- α und TNF-Rezeptoren

1893 berichtete Cole von seinen Beobachtungen, dass bakterielle Infektionen scheinbar einen kurativen Effekt auf Tumorpatienten im Endstadium hatten. [21] Später zeigte sich, dass ein von Carswell beschriebenes Chemokin, das sich als das Produkt einer von bakteriellen Endotoxinen getriggerten Spaltung von körpereigenen Faktoren darstellte, ebenfalls eine antitumorale Wirkung zeigte. Folglich beschrieb Cole eine indirekte Wirkung der bakteriellen Infektion. [6; 18] Bei dem Chemokin handelte es sich um den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). [8] TNF- α gehört mit zu den zentralen Zytokinen der Entzündungsprozesse und wird vor allem von Makrophagen und Lymphozyten sezerniert. Wie schon seit längerem bekannt, handelt es sich bei TNF- α als Mitglied der TNF-Liganden-Familie um ein pluripotentes Zytokin, das bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie beispielsweise inflammatorischen Ereignissen, involviert ist. [3; 36] Durch seine hochaffine Bindung an den Rezeptor der Zielzelle induziert TNF- α unter anderem hämorrhagische Nekrosen, eine Hemmung des Triglyzeridstoffwechsels in Adipozyten, die Aktivierung von Neutrophilen sowie die Stimulation der Proto-Onkogene c-myc und c-fas in Fibroblasten. [31]

Der Tumornekrosefaktor- α ist ein stellvertretendes Beispiel von Zytokinen der TNF-Rezeptor-Ligandenfamilie, die weitere Mitglieder, wie Lymphotoxin, CD40L (engl.: cluster of differentiation), CD95L und CD30L, umfasst. [3; 69] Die Aufgaben der Liganden sind vielfältig und beinhalten Zellschädigungen wie Apoptose oder entzündliche Ereignisse sowie Proliferationsprozesse wie die Stimulation der Angiogenese und die Erhöhung der Produktion der MHC-Klasse-I-Proteinen (engl.: major histocompatibility complex). [104; 123] Inzwischen konnte auch beobachtet werden, dass zwischen TNF- α und Interleukinen wie Interleukin-1 und Interleukin-2 ein synergetischer Effekt besteht. [31]

Man unterscheidet 2 Varianten des TNF- α :

1. ein human lösliches TNF (sTNF) mit 17kDa
2. ein Typ-II-Membranprotein (mTNF) mit 26 kDa

Die humane lösliche Form des TNF- α ist ein nicht glykosyliertes Protein, das durch Prozessierung der Membranform entsteht. Beide Formen sind aktiv als nicht kovalent gebundene Trimere. [11; 17]

Der Tumornekrosefaktor übt seine biologische Funktion über die Bindung und Aktivierung zweier verschiedener Zelloberflächenrezeptoren aus, die zur Familie der Typ-I-Transmembran-Glykoproteinen gehören, den TNF-Rp75 (75kDa) und TNF-Rp55 (55kDa). [6; 39] TNF-Rp55 und TNF-Rp75 können über die Stimulation durch TNF- α unter anderem eine Induktion der Apoptose oder die Aktivierung von NF- κ B (engl.: nuclear factor kappa) hervorrufen. [52; 67] Bei NF- κ B handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Genexpression verschiedener Gene reguliert, wie beispielsweise auch die des Interleukins-8. [86]

2.4.2 Interleukin-8

Das niedermolekulare Interleukin-8 (IL-8) ist ein Mitglied der Chemokinen-Superfamilie und strukturell und funktionell verwandt mit den inflammatorischen Zytokinen, die die Immigration von Zellen wie Neutrophilen, Monozyten, Lymphozyten und Fibroblasten stimulieren. [65] So wird die Klasse der Chemokine unterteilt in 3 Subtypen, basierend auf Struktur und Chromosomenlokalisierung: Die Gene des Interleukin-8 als Mitglied der C-X-C-Familie sind auf dem Chromosom 4 (Lokation: 4q21) verschlüsselt. [10; 15] Mittlerweile sind verschiedene Unterarten des Interleukin-8 bekannt, deren Größe zwischen 69 und 99 Aminosäuren variieren. Verschiedenen Studien zufolge wird die 77-Aminosäuren-Form hauptsächlich von Endothelzellen sezerniert, im Vergleich zu den T-Zellen und Monozyten, die wiederum überwiegend die 72-Aminosäuren-Form bilden, welche das potentere Chemoattractant darstellt. [15] Aber auch nicht hämatopoetische Zellen wie Fibroblasten und Keratinozyten besitzen die Fähigkeit, dieses Zytokin zu sezernieren. [60]

Eine der bedeutenden biologischen Funktionen des Interleukin-8 besteht in der Auslösung der Chemotaxis. Durch die Ausschüttung des Interleukins kommt es zu einer zielgerichteten Wanderung von Zellen, insbesondere von Neutrophilen und Makrophagen, entlang des Konzentrationsgefälles des IL-8. [44; 104]

CXCR-1 und CXCR-2, auch genannt IL-8RA und IL-8RB, sind Rezeptoren für das Interleukin-8. Beide Rezeptoren binden das Chemokin mit einer hohen Affinität, wobei

CXCR2 auch in der Lage ist, andere Chemokine der C-X-C-Familie zu binden. So konnte eine Expression von CXCR-1 und CXCR-2 auf Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden. [65]

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Die Aufführung der in „Materialien und Methoden“ verwendeten Geräte, Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Lösungen, Antikörper und Primer ist im Kapitel 8.1 „Bezugsquellenverzeichnis“ nachzulesen.

3.2 Patienten

Das zu untersuchende Gewebe von 20 Patienten wurde nach schriftlicher Einwilligung aus kolorektalen Lebermetastasen, metastasenkorrespondierendem Gewebe und dem gesunden Lebergewebe entnommen.

Für die folgenden Experimente dienten zusätzlich die aus dem Tumorgewebe gewonnenen tumorstromaassoziierten Fibroblasten (TAF) sowie die aus dem gesunden Lebergewebe stammenden Leberfibroblasten (LF).

3.3 Methoden

3.3.1 Gewebeaufbereitung

Für die Gewebeaufbereitung wurde auf Resektionspräparate von kolorektalen Lebermetastasen zurückgegriffen. Dabei handelte es sich um Gewebeproben vom Metastasengewebe, vom marginalen Rand der Metastase und von entferntem Lebergewebe.

Für die Immunhistochemie wurde das Gewebe in Tissue Tek[®] (Sakura Finetek; Zoeterwoude; Niederlande) eingebettet und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Zur Vorbereitung der Färbung wurden Gewebeschnitte aus dem in Tissue Tek[®] eingebetteten Gewebe mittels Kryostaten (MIKROTOM HM 505E; Richard Allen Scientific; Kalamazoo; USA) mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und auf einen Glasobjektträger (HistoBondR; Marienfeld Glassware; Lauda-Königshofen; Deutschland) gebracht. Bei den Proben für die mRNA-Analyse handelte es sich um Gewebestücke der jeweiligen Anteile des Lebergewebes, die in flüssigem Stickstoff konserviert und bei -80°C gelagert wurden.

3.3.2 Zellkultivierung und Zellpassage

Die Anzucht und Zellkultivierung von TAF- und LF-Zelllinien erfolgte gemäß einem standardisierten Protokoll (37°C; 5% CO₂).

Zur Gewinnung der TAF- und LF-Linien wurden intraoperativ steril Tumorstücke entnommen, die Metastasengewebe bzw. korrespondierendes gesundes Gewebe enthielten. Nach der Zerkleinerung der Gewebestücke in kleine Segmente erfolgte die Inkubation mit 1mg/ml Kollagenase Type IV (Sigma; Steinheim; Deutschland) in Medium 199 (Invitrogen; Grand Island; New York; USA) für 60 Minuten bei 37°C.

Die isolierten Zellen wurden nach Entfernung des Kulturmediumüberstandes mit 10 ml Gays Balanced Salt Solution (GBSS; Sigma) gewaschen und in 30 ml Kulturmedium angesetzt. Nach 20 Tagen lagen die Zellen, mikroskopisch kontrolliert, konfluent vor.

Zur Passagierung der Zellen wurden sie nach der Entfernung des Kulturmediumüberstandes und 2-maligem Waschen mit GBSS mit 5 ml Trypsin/ EDTA (Invitrogen) bei 37°C behandelt. Nach 10 Minuten lagen die Zellen gelöst vor und konnten in ein 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One; Cellstar; Solingen; Deutschland) überführt werden. Der Inhalt wurde bei 1300 rpm und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und das verbliebene Zellpellet mit 10 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma) resuspendiert. Zu den pro Kulturplatte (Nunclon™ Nunc; Roskilde; Dänemark) vorgelegten 30 ml Kulturmedium konnten nun 2-3 ml Zellsuspension hinzugesetzt und verteilt werden. Der Mediumwechsel erfolgte anschließend im 2 bis 3-tägigen Rhythmus, bis die Zellen erneut Konfluenz erreichten und passagiert werden konnten. Für die beschriebenen Versuche wurden Zellen zwischen der 3.-10. Passage verwendet.

Für die Zellkultivierung, den Boyden Chamber Assay sowie für die Stimulationsversuche fanden folgende Medien Verwendung:

Kulturmedium (10% „FBS-Medium“):

500 ml DMEM versetzt mit 50 ml fetalem Kälberserum (FBS; Invitrogen) und ergänzt mit 1%-iger antibiotisch-antimykotischer Lösung (Invitrogen)

Konditionierungsmedium (0,5% „FBS-Medium“):

Die Herstellung erfolgte analog zum Kulturmedium, jedoch mit 2,5 ml fetalem Kälberserum.

Assay Medium:

200 ml DMEM wurden versetzt mit 200 mg bovinem Serumalbumin (BSA; high quality; Sigma) und ergänzt mit 2 ml 1%-iger antibiotisch-antimykotischer Lösung (Invitrogen)

3.3.3 Zellstimulationsversuche

Da die tumorstromaassoziierten Fibroblasten und Leberfibroblasten nicht nur in Hinblick auf ihre morphologischen Unterschiede untersucht werden sollten, sondern auch in Bezug ihres Verhaltens gegenüber verschiedenen Wachstumsfaktoren, wurden sie Stimulationsversuchen unterzogen, um so Erkenntnisse über den Einfluss der Faktoren auf die Zellen zu erlangen. Folgende Wachstumsfaktoren wurden dazu verwendet:

- PDGF-BB (10 ng/ml; Roche Diagnostics GmbH; Mannheim; Deutschland)
- TGF- β (5 ng/ml; Roche Diagnostics GmbH)
- TNF- α (50 ng/ml; Sigma)

Für eine einheitliche Konditionierung wurden 1×10^6 TAF bzw. LF im Kulturmedium für 48 Stunden kultiviert und nach einer zweimaligen Spülung mit GBSS im Konditionierungsmedium, mit den aufgeführten Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, zum anderen als Negativkontrolle ohne diese, für weitere 24h inkubiert: Das Medium wurde für die Proteinanalyse (ELISA), die Zellschicht für die RNA-Isolierung verwendet.

Für den Boyden Chamber Assay wurde TAF- bzw. LF-konditioniertes Medium mit ansteigenden Konzentrationen (2,5%; 5%; 10%; 20%; 40% und 80%) genutzt; als Kontrolle kam hier das 10% FBS-Medium zum Einsatz.

3.3.4 RNA-Extraktion

Die RNA-Isolierung ist eine mechanische und chemische Methode, bei der die Membran der Zellen zerstört und in deren Folge die freigesetzte RNA gewonnen werden kann. Durch eine reversible Bindung der RNA an eine Membran kann diese anschließend mittels Waschens wieder eluiert werden. Zur RNA-Isolierung wurde der RNeasy[®] Mini Kit sowie der RNeasy[®] Midi Kit der Firma QIAGEN (QIAGEN; Hilden; Deutschland) verwendet.

Als Vorbereitung auf die Isolierung der RNA wurden die kultivierten Zellen mit GBSS gewaschen und mit 5 ml Trypsin/ EDTA von den Kulturplatten gelöst.

Nach der Überführung in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Falcon®; Becton Dickinson and Company; Franklin Lakes; New Jersey; USA), in dem zuvor 10 ml GBSS vorgelegt wurden, konnten die TAF beziehungsweise LF bei 1300 rpm und 20°C 10 Minuten zentrifugiert werden (Rotana/RP-Zentrifuge; Hettich; Tuttlingen; Deutschland). Darauf folgte die Wiederholung des Schrittes. Das Zellpellet von bis zu 5×10^6 Zellen wurde danach in 1 ml GBSS aufgenommen und in ein 1,5 ml RNase-freies Aliquot überführt. Nach der erneuten Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und mit 1 ml RLT-Puffer und 10 µl β-Mercaptoethanol zum Lysieren versetzt und gründlich resuspendiert. Das Gemisch wurde auf eine Shredder-Säule (QIAshredder™ QIAGEN; Hilden; Deutschland) pipettiert, die sich in einem 2 ml Tube befand. Nach 2-minütiger Zentrifugation des Gemisches bei maximaler Drehzahl wurde das Eluat mit gleichen Volumenanteilen 70%-igem Ethanol (Merck; Darmstadt; Deutschland) und Sigma-Wasser versetzt und die Säulen des RNeasy® Mini Kits aufgefüllt.

Das Gemisch wurde für 20 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert und die filtrierte Flüssigkeit verworfen. Nun wurden 700 µl RW1-Puffer in den Filter gegeben und erneut bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Wieder wurde das Filtrat verworfen und das Prozedere wiederholt. Danach wurde der Filter in ein 2 ml Tube überführt und eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit (10000 rpm) zentrifugiert. Im Anschluss wurden 40 µl RNase-freies Wasser (Sigma) auf den Filter pipettiert, der zuvor in ein RNase-freies 1,5 ml „Biopur-Tube“ verbracht wurde. Das Tube wurde erneut bei maximaler Geschwindigkeit 2-malig zentrifugiert, ohne das Zentrifugat zu werfen. Von dem sich ergebenden Eluat konnte nun der RNA-Gehalt photometrisch gemessen werden. (Uvette®; Eppendorf; Deutschland)

In Bezug auf die RNA-Gewinnung bei Geweben wurde ähnlich vorgegangen: 200-250 mg zerkleinertes Lebergewebe wurden mit RLT-Puffer und Mercaptoethanol versetzt und für 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zum gleichen Anteil mit 70%-igem Ethanol suspendiert und mittels Mini Shaker (IKA-Werke GmbH & Co; Staufen; Deutschland) durchmischt. Gemäß dem Protokoll des RNeasy® Midi Kits wurde nach mehreren Waschschritten für die Lösung der RNA der Filter in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit 250 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Messung der Ausbeute erfolgte photometrisch.

3.3.5 Northern Blot

Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, basierend auf der Fähigkeit, RNA nach ihrer Größe durch Anlegen eines elektrischen Feldes zu trennen und anschließend mit Ethidiumbromid anzufärben.

Eine Vorbehandlung der Gelelektrophoresekammer, der Kämme und des Trays für 20 Minuten mit 0,1%-igem Diethylpyrocarbonat (DEPC) diente der Inaktivierung der RNasen. Für die Herstellung des 1%-igen Agarosegels wurden 2 g Agarose in 176 ml RNasen-freies Wasser gegeben und aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig löste. Während die Flüssigkeit auf 70°C abkühlte, wurde sie mit 20 ml Formaldehyd, 24 ml 10-fach Running Buffer (RB) und 5 µl 1%-igem Ethidiumbromid (Merck) versetzt.

Danach wurde die Flüssigkeit möglichst blasenfrei in eine Elektrophoresekammer gegossen und polymerisierte innerhalb der nächsten anderthalb Stunden unter dem Abzug. Pro Probe wurden 10 µg RNA mit 7,5 µl Sampling-Buffer vermischt, für 10 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend für 2-3 Minuten auf Eis gekühlt. Danach wurde jede Probe mit 3 µl Loading-Buffer versetzt und bei 10000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Im Anschluss liefen die Proben in den Geltaschen des polymerisierten Gels, bedeckt durch einfach RB unter einer Spannung von 80V für 1-2 Stunden in der Elektrophoresekammer (Sub-Cell GT; BioRad Laboratories GmbH; München; Deutschland). Danach wurde das Gel unter UV-Licht fotografisch dokumentiert. (Gelprinter MWG-Biotech GmbH; Ebersberg; Deutschland)

Northern Blot

Zielgedanke des Northern Blots ist es, die elektrophoretisch aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran zu transferieren, um so durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne RNA nachweisen zu können.

Für den Transfer der Nukleinsäuren von dem Gel auf die Membran benötigt man einen Aufbau wie folgt: Über eine Plastikwanne gefüllt mit 20-fach Sodium Salt Citrate (SSC; Invitrogen) wurde eine Glasplatte gelegt, auf der sich zwei Streifen Whatman-Papier (Whatman Chromatography Paper; Merck Eurolab; Darmstadt; Deutschland) befanden, deren Enden auf beiden Seiten in die Flüssigkeit reichten.

Nach der Anfertigung einer Fotografie des Gels wurde dieses für 15 Minuten in Aqua dest. und nochmals in 20-fach SSC für zweimal 20 Minuten gewaschen. Das Gel

wurde mit den Taschenöffnungen nach unten zentral auf dem Whatman-Papier platziert und mit Parafilm fixiert. Eine auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene Nylonmembran (Filter Hybond-N+; Amersham Pharmacia; Little Chalfont; Großbritannien) wurde blasenfrei auf das Gel gelegt und mit 2 Streifen Whatman-Papier derselben Größe, das in 2-fach SSC Puffer getränkt wurde und einem Stapel Zellstoff sowie einer Glasplatte bedeckt. Das Ganze wurde mit einem 750 g Gewicht für 24 Stunden beschwert.

Nach der Entnahme des Filters wurde die RNA mittels UV-Crosslinker (Hoefler TM; UVC 500 UV-Crosslinker; Amersham Biosciences Europe GmbH; Little Chalfont; Großbritannien) auf dem Filter stabilisiert. Nach der Markierung der 18S und 28S Untereinheiten der rRNA zur späteren Größenordnung wurde der Filter bis zum weiteren Gebrauch in 20-fach SSC in Frischhaltefolie und im Kühlschrank aufbewahrt.

3.3.6 Herstellung der Hybridisierungssonden

Die Herstellung der Hybridisierungssonden erfolgte in drei Abläufen.

Erster Schritt:

Zur Synthese der cDNA wurde die RNA aus den Leberproben unter Verwendung des 1st Strang cDNA Synthesis Kits for RT-PCR (AMV; Roche Diagnostics GmbH) vorab reverse transkribiert, der Übersetzung der RNA-Sequenz in eine cDNA. Der Ansatz der Proben bestand aus: 2,0 µl 10-fach Reaction Buffer, 4,0 µl 25mM MgCl₂, 2,0 µl Desoxynucleotide Mix, 2,0 µl Oligo-p(dT)₁₅Primer, 1,0 µl RNase Inhibitor, 0,8 µl AMV Reverse Transkriptase, 7,2 µl Sigma-H₂O und 1 µg RNA.

Die Komponenten, vermischt in einem sterilen 0,5 ml Safe-Lock-Tube (safe-lock tubes; Eppendorf AG), inkubierten im Thermocycler (Biometra; Biomedizinische Analytik GmbH; Göttingen; Deutschland) bei folgendem Programm: 10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 99°C und 5 Minuten bei 4°C.

Zweiter Schritt:

Zur Herstellung der Hybridisierungssonden wurde die im ersten Schritt gewonnene cDNA mittels PCR (engl.: polymerase chain reaction) amplifiziert.

Hierzu wurden in entsprechender Reihenfolge folgende Reagenzien gemischt: 40,75 µl Aqua dest., 5,0 µl 10-fach Reaction Buffer, 1,0 µl NTP, 1,0 µl Template DNA, 1,0 µl Vorwärts-Primer, 1,0 µl Rückwärts-Primer, 0,25 µl Taq-Polymerase und

1,0 µl RT-Produkt. Die Polymerase bildete aufgrund der spezifischen Primer Abzüge der Einzelstränge. Analog zu Schritt 1 inkubierten die Proben im Thermocycler; Programm: 3 Minuten bei 95°C, 40 Zyklen aus je 1 Minute bei 95°C, 1 Minute 30 Sekunden bei 57°C, 2 Minuten bei 72°C und abschließend 10 Minuten bei 72°C.

Dritter Schritt:

Die Bildung von DNA-Einzelsträngen aus den unter Schritt 2 synthetisierten DNA-Doppelsträngen und die Einfügung von DIG-dUTP dienten der Herstellung und Markierung der Sonden.

Für den Ansatz wurden die Komponenten 37 µl Aqua dest., 5,0 µl 10-fach Buffer, 5,0 µl DIG-PCR-Nukleotide, 1,0 µl Rückwärts-Primer, 1,0 µl Template DNA und 1,0 µl Enzymmischung in einem sterilen 0,5 ml Safe-Lock-Tube auf Eis vermischt, zentrifugiert und im Thermocycler bei folgenden Einstellungen inkubiert: 3 Minuten bei 95°C, 40 Zyklen mit jeweils 1 Minute bei 95°C, 1 Minute bei 57°C und 2 Minuten bei 72°C.

Die Proben der PCR und DIG-PCR wurden in einem 2%-igen Agarosekontrollgel mit Ethidiumbromid analysiert. Zum Schluss wurde die hergestellte Hybridisierungssonde mit 10 ml DIG-Easy-HYBR-Hybridisierungspuffer (Roche Diagnostics GmbH) versetzt. Die Konservierung der Sonden erfolgte bei -20°C.

3.3.7 Hybridisierung

Zunächst wurden die Filter zur Minimierung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei 50°C mit Hybridisierungspuffer (DIG-Easy-HybR; Roche Diagnostics GmbH) prähybridisiert. Zwischenzeitlich wurden die tiefgekühlten Sonden auf 68°C erwärmt. Anschließend wurde für die Haupthybridisierung der Hybridisierungspuffer verworfen und durch die Sonden ersetzt und über Nacht bei 65°C im Hybridisierungs-ofen (Amersham Pharmacia; Biotech Europe GmbH; Chalfont; Großbritannien) unter ständiger Rotation hybridisiert. Die Sonden wurden für einen nochmaligen Gebrauch bei -20°C verwahrt.

3.3.8 Detektion der DIG-markierten Nukleinsäuren

Nach der Hybridisierung wurden die Nylonmembranen vorab jeweils zweimal für 15 Minuten mit 2-fach Waschwasser (2-fach SSC + 0,1% Sodiumdodecylsulfate (SDS))

bei Raumtemperatur und in 0,5-fach Waschpuffer (0,5-fach SSC + 0,1% SDS) bei 68°C gewaschen. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des DIG Wasch und Block Puffer Sets (Roche Diagnostics GmbH). Zur Barriere unspezifischer Bindungsstellen wurden die Nylonmembranen in einer Blockierungslösung auf einem Wippschüttler (neoLab Migge Laborbedarfsbetrieb GmbH; Heidelberg; Deutschland) gewaschen. Die Blockierungslösung wurde nach 60 Minuten durch einen Ansatz aus Antikörper-Blockierungslösung (Verhältnis 1:20000) ersetzt. Hierbei bildete der mit alkalischer Phosphatase konjugierte Anti-DIG-Antikörper (Anti-digoxigenin-AP conjugate; Fab fragmente; Roche Diagnostics GmbH) Komplexe mit dem DIG-dUTP der Sonden. Bei späterer Zugabe des Substrats CDP (CDP-Star; ready to use; Roche Diagnostics GmbH) konnte das dadurch entstandene Chemolumineszenzsignal mithilfe des Phospho-Imager (Fluor-STM MultiImager; BioRad; München; Deutschland) quantifiziert werden. Zuvor aber erfolgte nach 30-minütiger Inkubation und anschließender Waschung eine 2-minütige Behandlung mit Detektionpuffer zur Äquilibrierung des pH-Wertes für die Substratreaktion.

Nach der Detektion wurde der Filter für zweimal 15 Minuten in 90°C heißem einfach Tris-EDTA-Puffer (Sigma) gewaschen und für erneute Hybridisierungsreaktionen genutzt.

3.3.9 Immunhistochemie

Die Avidin: Biotinylated Enzyme Complex (ABC)-Technik

Bei dieser indirekten immunhistochemischen Färbemethode wird zur Darstellung des gesuchten Antigens ein enzymkatalysierter Farbumschlag genutzt, nachdem zuvor das Antigen mittels eines Primärantikörpers und Sekundärantikörpers an den entsprechenden Strukturen lokalisiert wurde.

Zur Charakterisierung der Lebermetastasen kolorektaler Karzinome und deren peritumoralen Anteile wurden diese mit Antikörpern für IL-8 (1/50, Klon B-K8; Serotec; Düsseldorf; Deutschland), Laminin (1/25, clone 4C7; Dako; Glostrup; Dänemark) und CD45 (1/50, clone T29/33; Dako) gefärbt, um somit Unterschiede zwischen dem humanen Metastasengewebe, den peritumoralen Rändern und den tumorfreien Anteilen aufzuzeigen.

Die angefertigten Gefrierschnitte mussten bei 4°C für 10 Minuten in einer Aceton/Phosphate Buffered Saline (PBS)-Lösung fixiert werden, bevor sie nach einer Spülung mit

PBS mit dem DAKO® Biotin Blocking System (DAKO Corporation; Carpintera; USA) behandelt wurden. So konnten unspezifische Färbungen gegen endogenes Biotin bzw. Avidin vermieden werden. Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung wurden die Proben 10 Minuten mit Normalserum (1 ml:10 ml PBS; Normal Goat Serum; Vector; Laboratories; Burlingame; USA) inkubiert, um daraufhin mit den entsprechenden Primärantikörpern über Nacht auf Eis beschichtet zu werden. In den darauf folgenden Arbeitsphasen wurden die Proben mit dem Sekundärantikörper sowie der Vectastain ABC-AP-Reagenz des Vectastain® ABC-AP Kits (Vector) für jeweils 30 Minuten inkubiert und danach mit Alkaliner Phosphatase Substratlösung für weitere 30 Minuten behandelt, wobei nach jedem Schritt die Gefrierschnitte mit PBS gewaschen wurden.

Zur Erleichterung der morphologischen Beurteilung der Fibroblasten wurden diese mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Zum Einfärben der Kerne wurden die Kryoschnitte 10 Minuten mit fließendem Wasser behandelt und anschließend eingedeckt (Aquatex; Merck). Als Negativkontrolle dienten Proben, bei denen der Primärantikörper durch jeweils irrelevante isotyp-spezifische Maus IG ersetzt wurden.

Zur Identifizierung von Kupffer-Zellen und Leukozyten wurden die Präparate zusätzlich auf CD45 gemäß dem Protokoll nach DAKOCytomation EnVision®+ System-HRP (DAKO) gefärbt.

3.3.10 ELISA

Zur Quantifizierung der Freisetzung von IL-8 durch kultivierte TAF und LF diente der Endogen® Human IL-8 ELISA Kit (EH2 IL-8; Pierce Endogen; Rockford; Irland), eine enzymgebundene immunologische Nachweismethode für die Messung von IL-8 in Zellkulturüberständen.

Gemäß der zuvor erläuterten Stimulationsversuche wurden die Fibroblasten dementsprechend konditioniert und der generierte Zellkulturüberstand für die Messung herangezogen.

Die einzelnen Wells der mit Anti-IL-8-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte wurden mit 50 µl der Proben versetzt und für eine Stunde inkubiert. Das freie IL-8 der Proben konnte während dieser Zeit über ein definiertes Epitop an die feste Phase binden. Danach wurde durch mehrmaliges Waschen mit einer Waschlösung der restliche Überstand verworfen und in die Wells wurde 50 µl biotinkonjugierte Antikörper-Lösung pipettiert.

Nach einstündiger Inkubation und wiederholtem Waschen wurden 100 µl der Streptavidin-HRP-Lösung hinzugefügt, wodurch ein zweiter monoklonaler HRP gekoppelter Anti-IL-8-Antikörper über ein weiteres definiertes Epitop binden konnte. Nach Ablauf der Inkubationsphase von 30 Minuten wurde die Mikrotiterplatte abermals gewaschen und 100 µl der Tetramethylbenzidine-Substrat-Lösung pro Well hinzugefügt und nach 30 Minuten mithilfe von 100 µl einer Lösung, die 0,18M Schwefelsäure enthielt, gestoppt. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration des IL-8 und konnte photometrisch bei 450 nm bestimmt werden. Zur Messung und Auswertung diente der Microplate Reader Dynatech MR 5000 (Thermo Bioscience GmbH; Egelsbach; Deutschland) mit der Software MicroWin 2000 (Mikrotek Laborsysteme; Overath; Deutschland).

3.3.11 Chemotaxis Assay

Zur Analyse der Wanderung von DLD-1-, Colo-678 Kolonkarzinomzellen (DSMZ GmbH; Braunschweig; Deutschland), HuH7 Hepatomzellen (JCRB-Zellbank; Tokio; Japan) und HUVECs (Cascade Biologics; Mansfield; Großbritannien) in vitro gegenüber einer zunehmenden Mediumkonzentration, gewonnen aus den Kulturen der TAF und LF sowie eines Kulturmediums von TAF, das zuvor 24 Stunden TNF- α ausgesetzt war, wurde der Boyden Chamber Assay gewählt.

Dabei handelt es sich um eine modifizierte 96-Well Boyden Kammer mit einer Porengröße von 8 µm (Neuroprobe; Leamington; Großbritannien). Zur Vorbereitung musste der Filter bei 37°C über Nacht in 1,5 ml Vitrogen (Cohesion; Fremont; USA) ad 48,5 ml 0,1%-iger Essigsäure beschichtet werden, um ihn danach mehrmalig mit PBS/0,1%-igen BSA zu waschen und trocknen zu lassen.

Im unteren Teil der aus zwei Anteilen bestehenden Kammer wurden die Testsubstanzen in verschiedenen Verdünnungen (30-32 µl/well) befüllt, so dass sich ein luftblasenfreier positiver Meniskus bildete. Danach wurde auf das untere Kammerteil der Filter und die Silikondichtung montiert. Als Kontrolle kam das 10% FBS-Medium zum Einsatz.

Anschließend wurde der obere Teil der Boyden Kammer mit 50 µl Zellsuspension befüllt, nachdem zuvor die Konzentration (300000 Zellen/ml) der zu untersuchenden Zellen eingestellt wurde.

Nach einem Zeitraum von etwa 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Inkubation unterbrochen und der Filter auf der Oberseite von den nicht immigrierten Zellen befreit.

Die Unterseite mit den immigrierten Zellen wurde mit Hilfe DIFF QUIK[®] (Medion Diagnostics; Dünningen; Schweiz) angefärbt und unter Zuhilfenahme eines 40-fach Objektivs und eines kalibrierten Gitters quantifiziert.

3.3.12 Statistische Auswertung

Alle Messdaten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm$ S.E.) von n unabhängigen Experimenten angegeben. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen Gruppen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferronis multipler Vergleichstest angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des inflammatorischen Milieus von Lebermetastasen

Es besteht bis heute noch kein vollständiger Überblick über die pathologischen Zusammenhänge zwischen Entzündungen und Neoplasien und trotzdem scheint es als gesichert, dass es eine Assoziation zwischen kolorektalen Metastasen und einer lokalen Entzündungsreaktion gibt. [77] Dabei nehmen Kupffer-Zellen einen entscheidenden Platz im Rahmen der verschiedenen Abwehrmechanismen der Leber ein. In ihrer Rolle als ansässige Makrophagen nehmen sie Endotoxine aus dem Pfortaderblut auf, setzen nach ihrer Aktivierung ein weites Spektrum löslicher Mediatoren wie Zytokine frei und modulieren beispielsweise über parakrine Wirkungen die Funktionen der angrenzenden Zellen der Leber [26; 54].

Physiologisch sezernieren Kupffer-Zellen, die innerhalb der sinusoidalen Kapillaren lokalisiert sind, eine Vielzahl immunregulatorischer und entzündlicher Zytokine, einschließlich Interleukin-1, Interleukin-6, TNF- α und TGF- β . [61]

Nachweis von CD45-positiven Zellen im Areal kolorektaler Lebermetastasen

Zur Charakterisierung der Umgebung von kolorektalen Lebermetastasen wurden Gewebeschritte des Metastasengewebes sowie des peritumoralen Gewebes und des entfernten Lebergewebes analysiert.

Die immunhistochemische Färbung auf das Leukocyte Common Antigen (CD45) markiert leukozytäre Zellen. Zu denen zählen in der Leber Kupffer-Zellen, den ansässigen Makrophagen, und infiltrierende Leukozyten. [115] Zusätzlich wurde auf Laminin angefärbt, um Gefäße oder gefäßähnliche Strukturen, die von einer lamininhaltigen Basalmembran umgeben waren, kenntlich zu machen.

Wie in Abbildung 1 zu erkennen, konnte eine verstärkte Anfärbung auf infiltrierende CD45-positive Zellen innerhalb der Stromasepten in Nähe zu den stromalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Auch im Bereich des Tumorrandes zeigte sich ein intensives Färbeergebnis.

Des Weiteren legte die Markierung des Laminin dar, dass sich die CD45-positiven Zellen außerhalb der Gefäße befanden.

Nachweis von CD45-positiven Zellen

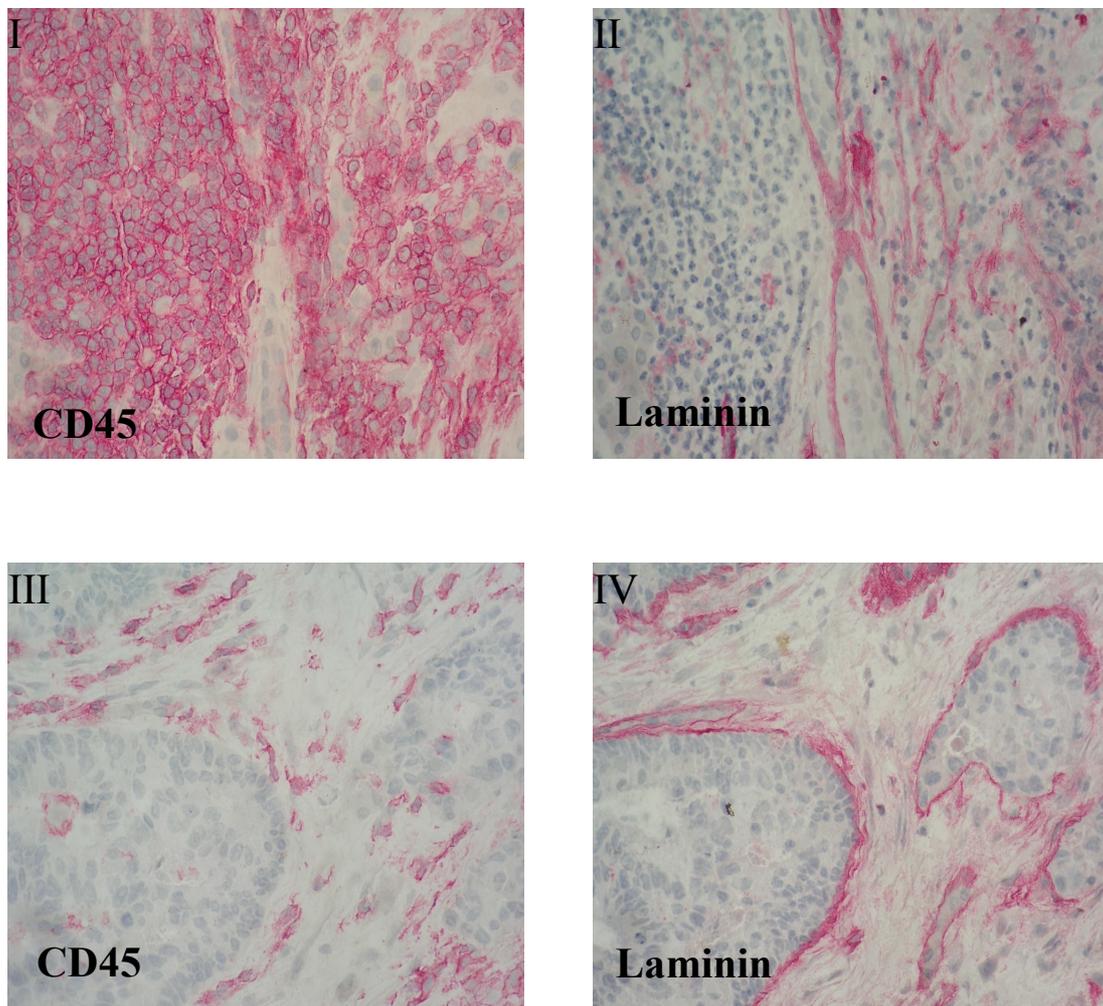


Abb.1 Immunhistochemische Analyse: die Abbildung zeigt peritumorales Lebergewebe (I, II) und Tumorgewebe (III, IV) gefärbt gegen CD45 (I, III) und Laminin (II, IV) (400-fache Originalvergrößerung)

Zur besseren Darstellung wurde in Abbildung 2 die durchschnittliche Anzahl der CD45-positiven Zellen in den einzelnen Anteilen ausgewertet:

Das Maximum war im Grenzgebiet der Metastasen zu verzeichnen und gegenüber dem entfernten normalen Lebergewebe erwies sich auch die Menge an CD45-positiven Zellen innerhalb der Metastasen als merklich erhöht.

Anzahl von CD45-positiven Zellen

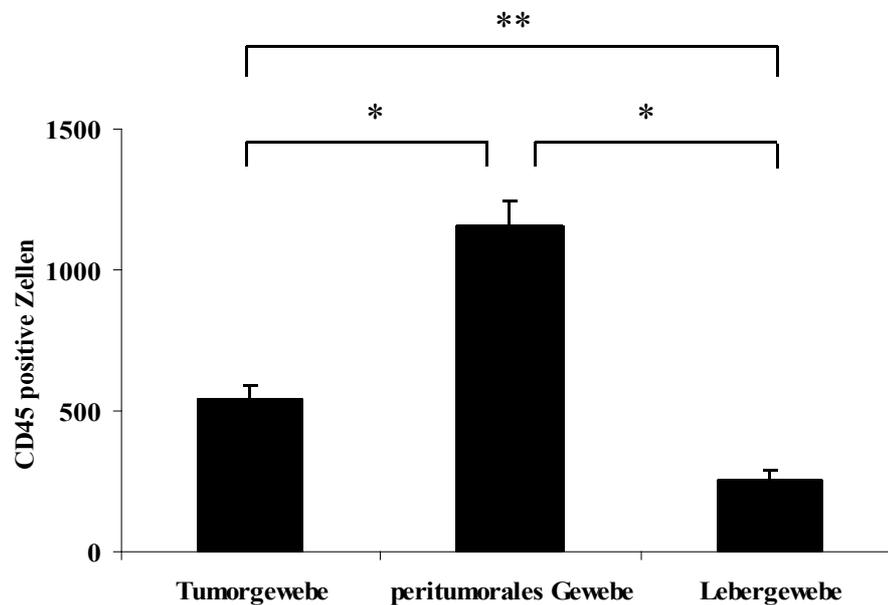


Abb.2 mittlere Anzahl von CD45-positiven Zellen im Tumorgewebe, peritumoralen Gewebe und Lebergewebe (n=14; **: p < 0,05; *: p < 0,01 versus Kontrolle (Lebergewebe); Ergebnisse sind Mittelwerte, angegeben als \pm S.E.)

4.2 Expression von IL-8

Untersuchungen zeigten, dass IL-8 nicht nur von Zellen wie Monozyten und Neutrophilen bzw. nicht hämatopoetischen Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert wird, sondern auch in Kolonkarzinomzellen und malignen Melanomen. [14; 15] So konnte eine Beteiligung des IL-8 bei Prozessen des Tumorzellwachstums und der Metastasierung in Melanomen und Karzinomen der Lunge, des Magens, des Pankreas, der Leber, der Gallenblase und der Prostata nachgewiesen werden. Zudem scheint IL-8 eine regulierende Wirkung auf die Angiogenese bei dem humanen Bronchialkarzinom und dem nichtkleinzelligen murinen Lungenkarzinom zu haben. [65]

Nachweis der IL-8 mRNA-Expression im Gewebe kolorektaler Lebermetastasen

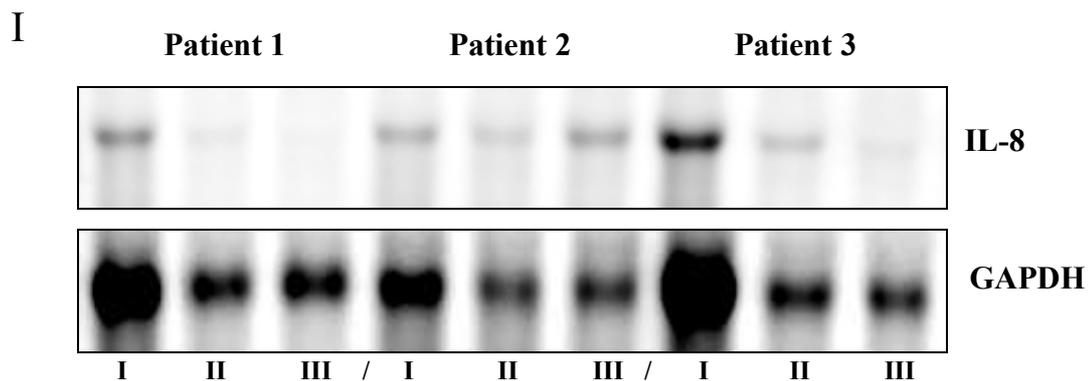
Als Nachweismethode für das Expressionsmuster von IL-8 diente die Northern Blot Technik, bei der mit Hilfe von DIG-markierten DNA-Sonden die mRNA der Leber analysiert wurde. Dazu wurde das entnommene Lebergewebe in 3 Abschnitte unterteilt:

- (I) Tumorgewebe
- (II) peritumorales Lebergewebe
- (III) entferntes Gewebe

Abbildung 3/I zeigt, dass beim Vergleich der einzelnen Anteile im Metastasengewebe das höchste Niveau der IL-8 mRNA-Expression festgestellt werden konnten. Im Gegensatz dazu wurde in dem angrenzenden und dem entfernten Lebergewebe eine geringere Expression von IL-8 mRNA beobachtet, zudem konnte kein Unterschied zwischen diesen beiden Anteilen festgestellt werden.

Diese Beobachtung bestätigte sich bei der Quantifizierung durch die optische Bandenanalyse. Es zeigte sich im Abschnitt I eine annähernd 3-mal höhere Expression gegenüber den Anteilen II und III. (Abb. 3/II)

IL-8 mRNA-Expression



II

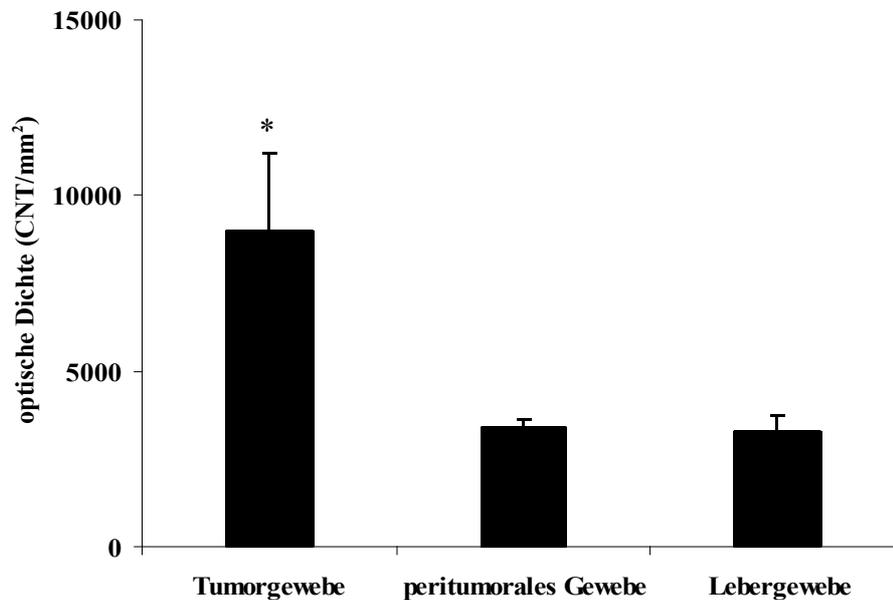


Abb.3 (I) Northern Blot Analyse: Vergleich der IL-8 mRNA-Expression in kolorektalem Lebermetastasesengewebe, peritumoralem Gewebe und entferntem Gewebe. Die unteren Banden zeigen die GAPDH mRNA-Expression zur Normalisierung nach Rehybridisierung.
(II) Darstellung der densitometrischen Bandenanalyse der IL-8 mRNA-Expression in Tumorgewebe, peritumoralem Gewebe und Lebergewebe (Kontrolle) (n=10; *: $p < 0,01$ vs. Kontrolle; ANOVA-Test und Bonferroni-Adjustierung)

Nachweis der IL-8 Expression in situ

Zur Vervollständigung der Ergebnisse wurden die Lebermetastasen kolorektaler Karzinome und deren peritumorale Anteile in histologischen Schnitten auf ihre IL-8 Expression hin untersucht. (Abb. 4) Die immunhistochemische Analyse ergab, dass die Gewebeschnitte innerhalb der stromalen Septen sowie im Grenzgebiet der Metastasen eine erhöhte Intensität der Färbung aufwiesen.

Interleukin-8 Expression

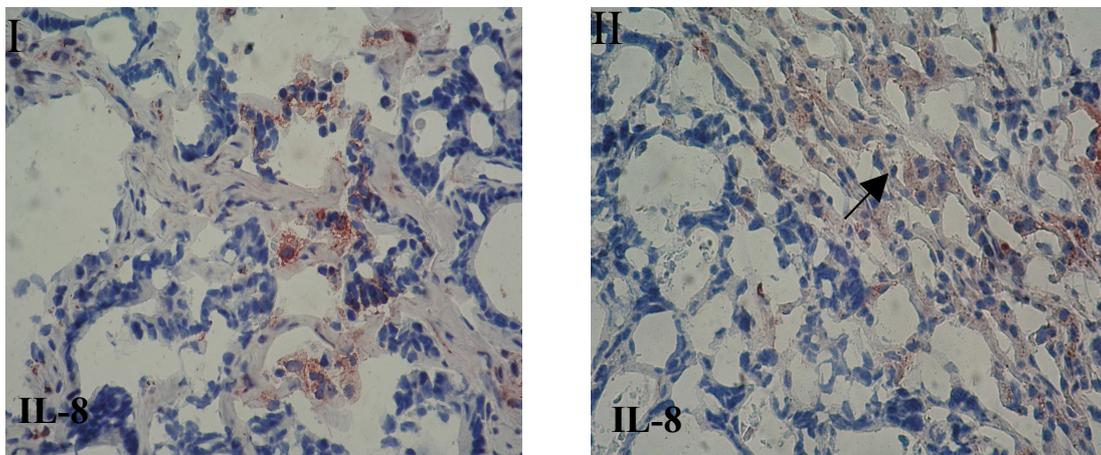


Abb.4 Immunhistochemische Analyse: Die Abbildungen zeigen Tumorgewebe (I) und Tumorränder (II, Pfeil) gefärbt gegen IL-8 (400-fache Originalvergrößerung)

Nachweis der IL-8 mRNA-Expression in TAF und LF nach Stimulation

Es wurde der Einfluss der Zytokine TGF- β , PDGF-BB und TNF- α auf die IL-8 mRNA-Expression in TAF und LF in vitro untersucht.

Zur Beurteilung der IL-8 mRNA-Expression wurde die mRNA der Zellen mittels DIG-markierter DNA-Sonden in Northern Blot Technik analysiert, nachdem die Fibroblasten zuvor mit den entsprechenden Zytokinen inkubiert wurden. Um eine Änderung des Expressionsniveaus zu ermitteln, wurden die stimulierten Zellen mit den unstimulierten verglichen. Im Gegensatz zu den nicht vorbehandelten Kontrollen (0,5% FBS; 10% FBS) zeigte sich bei den inkubierten Zellkulturen nur bei TNF- α eine deutliche Steigerung der Expression des IL-8. Dagegen führten PDGF-BB und TGF- β kaum bzw. gar nicht zu einem Anstieg. (Abb. 5/I) Die Quantifizierung mit Hilfe der densitometrischen Analyse ergab, dass sich die mittlere Expression der IL-8 mRNA in den mit TNF- α behandelten Proben der TAF ungefähr um das 12-fache, in den der LF sich um das 34-fache erhöhte, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. (Abb. 5/II)

IL-8 mRNA-Expression

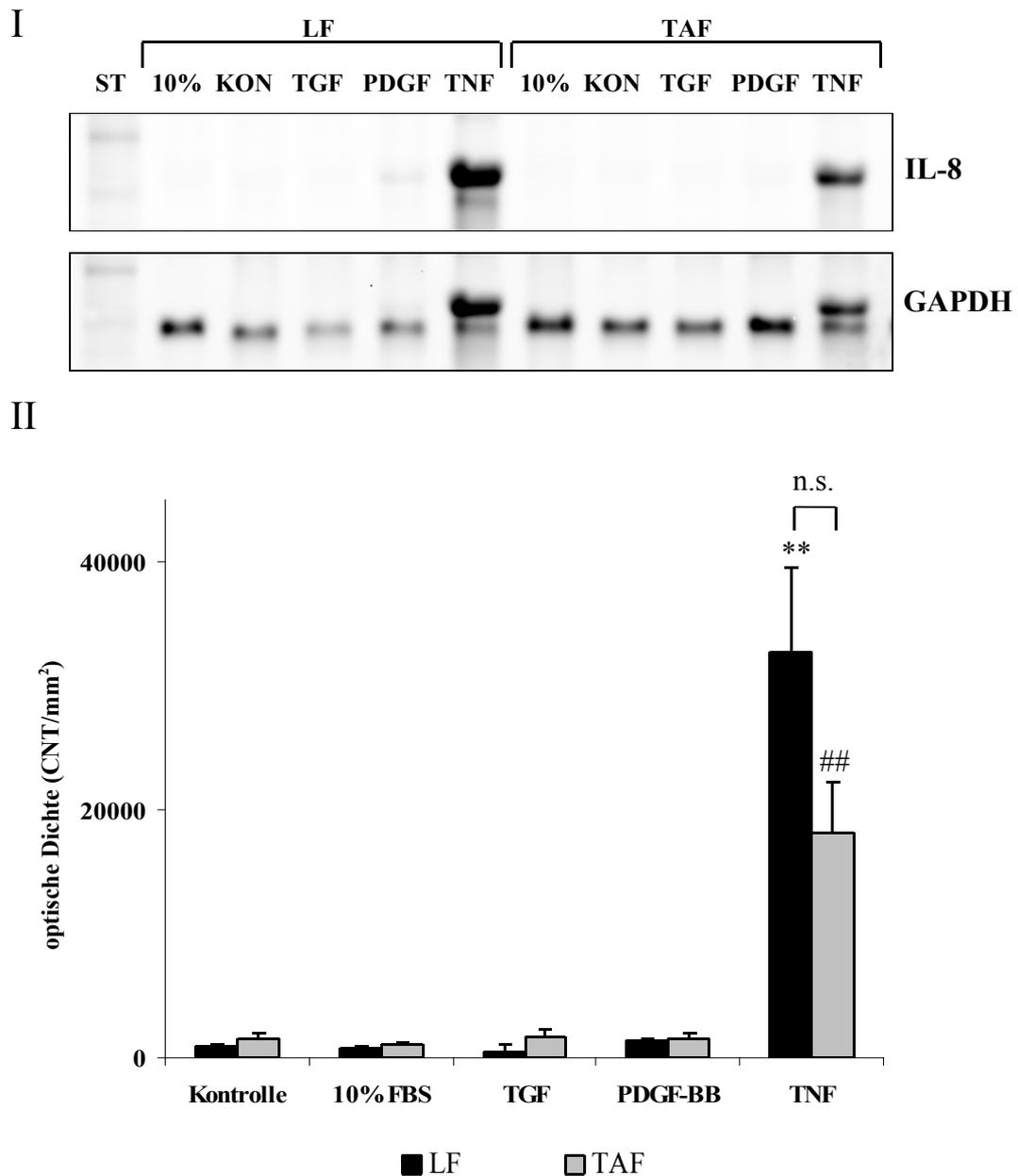


Abb.5 (I) Northern Blot Analyse: Wirkung der Zytokine TGF- β , PDGF-BB und TNF- α auf die IL-8 mRNA-Expression in tumorstromaassoziierten Fibroblasten (TAF) und Leberfibroblasten (LF) im Vergleich zur Kontrolle (Kon: 0,5% FBS) und 10% FBS. Es zeigt sich eine verstärkte Bandenintensität bei TNF- α . Die unteren Banden zeigen die GAPDH mRNA-Expression zur Normalisierung nach Rehybridisierung. (ST=molekularer Marker) (II) Darstellung der densitometrischen Bandenanalyse der IL-8 mRNA-Expression der TAF und LF. (n=4; **, ##: p< 0,01 vs. Kontrolle; ANOVA-Test und Bonferroni-Adjustierung)

Nachweis von IL-8 Protein

Die bisher nur auf mRNA-Ebene nachgewiesene IL-8 Expression sollte mit Hilfe der ELISA-Analyse von IL-8 auf Proteinebene verifiziert werden.

Die Abbildung 6 zeigt, dass die Behandlung mit TNF- α bei den TAF der kolorektalen Lebermetastasen und den Fibroblasten aus dem gesunden Lebergewebe im Vergleich zu der Kontrolle (0,5% FBS) zu einer verstärkten Induktion der IL-8 Expression führte. Hier rangierte das Expressionsniveau zwischen 0-390 pg/ml bei den TAF und zwischen 0-175 pg/ml bei den LF. Im Gegensatz dazu stieg die Konzentration des IL-8 bei beiden mit TNF- α behandelten Zellenarten deutlich an (Konzentrationen zwischen 994 pg/ml-12357 pg/ml bei den LF und 4280 pg/ml-12609 pg/ml bei den TAF), allerdings ohne statistisch signifikanten Unterschied. Ferner konnte ein leichter Einfluss auf die durch PDGF-BB stimulierten Zellen beobachtet werden; ein geringer Anstieg, der wiederum im Vergleich zu den Kontrollen keine statistische Signifikanz aufwies.

Folglich konnte die schon bei der mRNA-Analyse des IL-8 beobachtete stimulierende Wirkung des TNF- α auf die Fibroblasten bei der Proteinquantifizierung bestätigt werden.

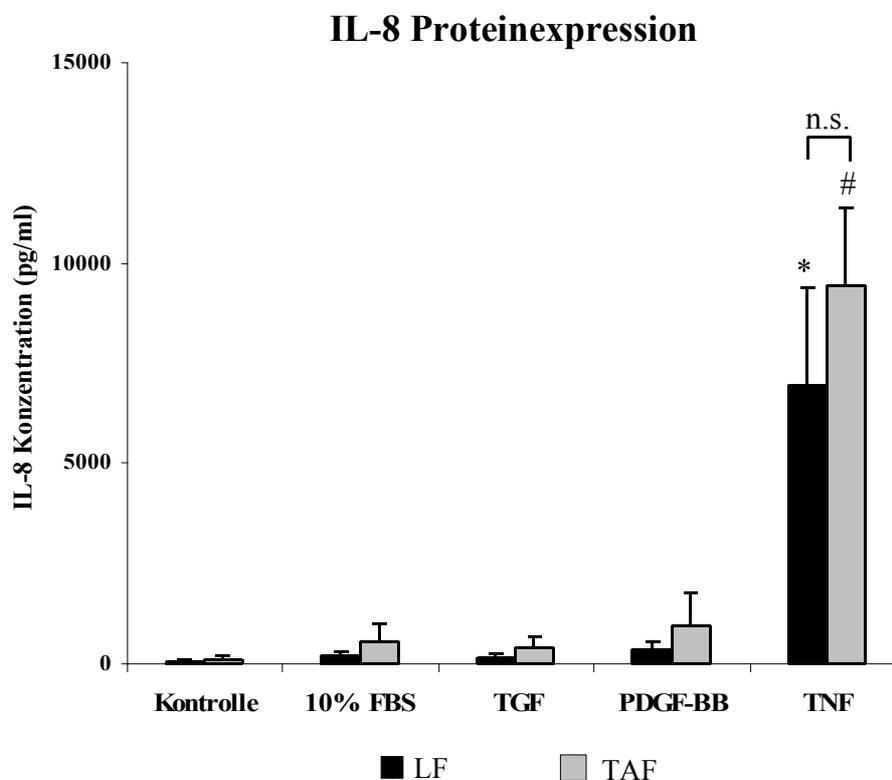


Abb.6 ELISA-Technik: Proteinexpression von IL-8 durch TAF und LF in vitro; (n=5; *, #: p<0,01 vs. Kontrolle; Ergebnisse sind Mittelwerte angegeben als \pm S.E.)

4.3 Wirkung des NF- κ B-Inhibitors Parthenolid auf die IL-8 Expression

Verschiedene Gene, so auch der chromosomale Abschnitt für IL-8, werden über den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert.

Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt unter anderem über TNF- α . Folglich kann eine Hemmung der Kaskade auf Ebene des NF- κ B-Transkriptionsfaktors durch Parthenolid die Aktivierung der IL-8 Genexpression, ausgelöst durch TNF- α , inhibieren. [27; 80]

Lichtmikroskopische Analyse Parthenolid-behandelter kultivierter TAF

Für die Beurteilung des eventuell schädigenden Einflusses von TNF- α und Parthenolid auf die isolierten und kultivierten TAF wurden die Zellen mit zunehmenden Konzentrationen des Parthenolids mit und ohne TNF- α inkubiert.

Nach der Inkubation der Fibroblasten mit dem Parthenolid zeigte sich eine dosisabhängige Ablösung der Zellen ungeachtet des Zusatzes von TNF- α . In den lichtmikroskopisch aufgenommenen Ausschnitten der Objektträger ist eine deutlich sichtbare Abtrennung der zuvor kultivierten Zellen zu erkennen, was auf eine erhöhte Sterblichkeitsquote auf die Parthenolidbehandlung der Zellen im Vergleich zu den identisch behandelten Zellen weist. (Abb. 7)

Ursächlich könnte eine toxische oder aber auch eine proapoptotische Wirkung des Reagenzes sein.

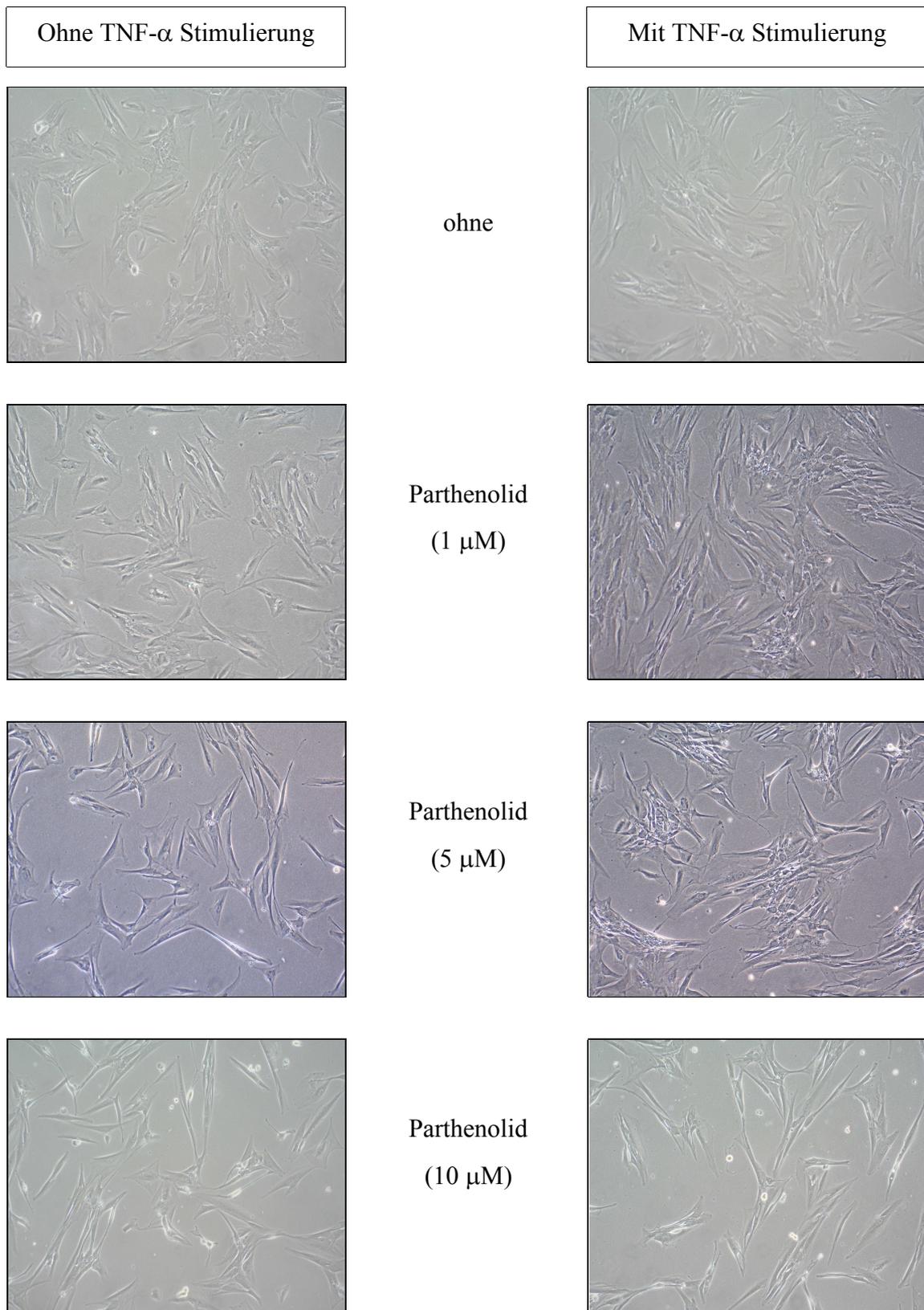
Lichtmikroskopische Analyse

Abb.7 400-fache Vergrößerung mit Phasenkontrast: kultivierte TAF nach 24-stündiger Inkubation mit Parthenolid (0 μ M, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M) mit oder ohne TNF- α (10 ng/ml)

Nachweis der IL-8 mRNA-Expression in TAF nach Parthenolidbehandlung

Ausgehend von dem Schluss, dass TNF- α in den TAF eine Steigerung der IL-8 mRNA-Expression hervorruft, sollte nunmehr die Wirkung des Parthenolid auf diese Beobachtung untersucht werden.

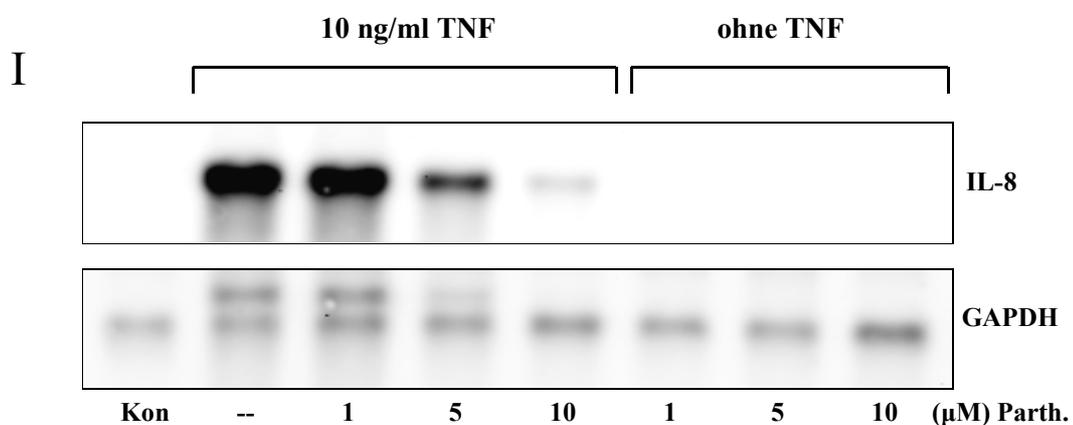
Wie auch bei der vorherigen Untersuchung wurde wieder auf DIG-markierte DNA-Sonden zurückgegriffen, um die mRNA der TAF mit Hilfe der Northern Blot Technik zu analysieren.

Hierzu wurden die Zellen mit TNF- α (10 ng/ml) und einer steigenden Konzentration des Parthenolids (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M) inkubiert. Um einen Einfluss des Parthenolids auf die IL-8 mRNA-Expression auszuschließen, wurde zusätzlich eine zweite Versuchsreihe ausschließlich mit Parthenolid behandelt ohne Zusatz des TNF- α .

Analog zu dem unter 4.2 beschriebenen Ergebnis findet sich bei der lediglich mit TNF- α stimulierten Probe eine deutliche Bande, deren Intensität mit erhöhter Konzentration des Parthenolids abnimmt. (Abb. 8/I)

Mit Hilfe der densitometrischen Analyse konnte verdeutlicht werden, dass aber erst ab einer Konzentration von 5 μ M eine Inhibition der mRNA-Expression des IL-8 eintrat. (Abb. 8/II) Die niedrige Konzentration von 1 μ M schien keinerlei Wirkung auf die TNF- α induzierte IL-8 Expression zu haben. Zudem konnte weder in der Kontrolle (0,5% FBS) noch in der zweiten Versuchsreihe, die alleinig mit Parthenolid versetzt wurde, eine Zunahme des IL-8 Niveau ausgemacht werden.

IL-8 mRNA-Expression



II

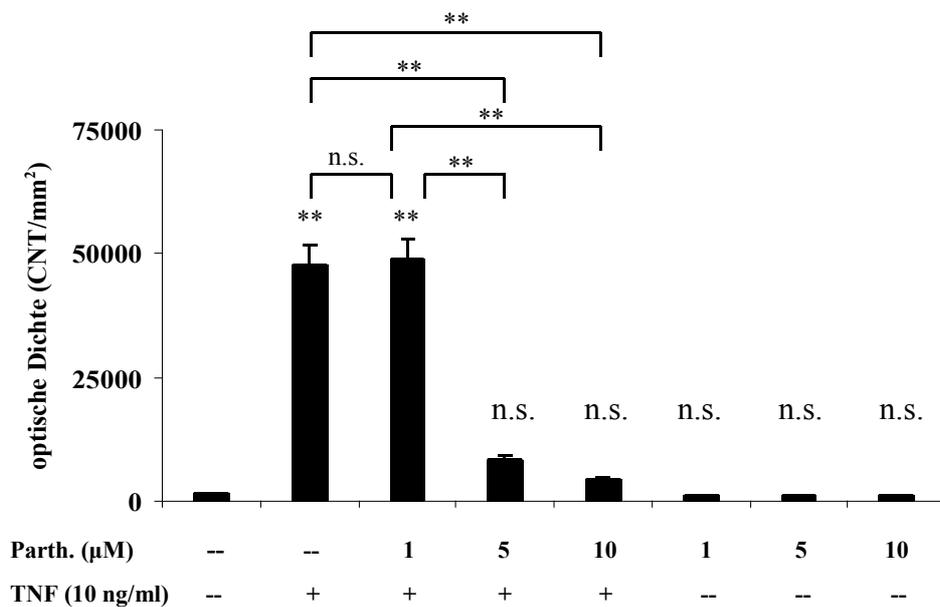


Abb.8 (I) Northern Blot Analyse: Einfluss von Parthenolid auf die durch TNF- α induzierte IL-8 mRNA-Expression in tumorstromaassoziierten Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle (Kon: 0,5% FBS). Die untere Bandendarstellung zeigt die GAPDH mRNA-Expression zur Normalisierung nach Rehybridisierung.

(II) Darstellung der densitometrischen Bandenanalyse: Quantifizierung der IL-8 mRNA-Expression mit und ohne TNF- α bei zunehmender Konzentration von Parthenolid (n= 4; *: p< 0,05; **: p< 0,001vs. Kontrolle; ANOVA-Test und Bonferroni-Adjustierung)

Nachweis von IL-8 auf Proteinebene nach Parthenolidbehandlung der TAF

Zur Bestätigung der Untersuchungen in Bezug auf die IL-8 mRNA-Expression in den tumorstromaassoziierten Fibroblasten wurde die ELISA-Expressionsanalyse angewandt. Wie in Abbildung 9 zu sehen, sind die Ergebnisse der Proteinanalyse vergleichbar mit denen der mRNA-Analyse. Die höchste Expression der Proteine entsprach den Proben, die auch die höchste mRNA-Expression aufwiesen. So rangierten die Werte der mit TNF- α inkubierten Zellen zwischen 6235 pg/ml und 10308 pg/ml und der mit TNF- α und Parthenolid (1 μ M) behandelten zwischen 7040 pg/ml und 11236 pg/ml. Die mittleren Werte der ebenfalls mit TNF- α , aber ergänzend dazu mit steigenden Parthenolidkonzentrationen stimulierten TAF, fielen dagegen erheblich ab. Daneben zeigte auch hier die zweite Versuchsreihe keine Wirkung des Parthenolid auf die IL-8 Expression im Vergleich zur Kontrolle.

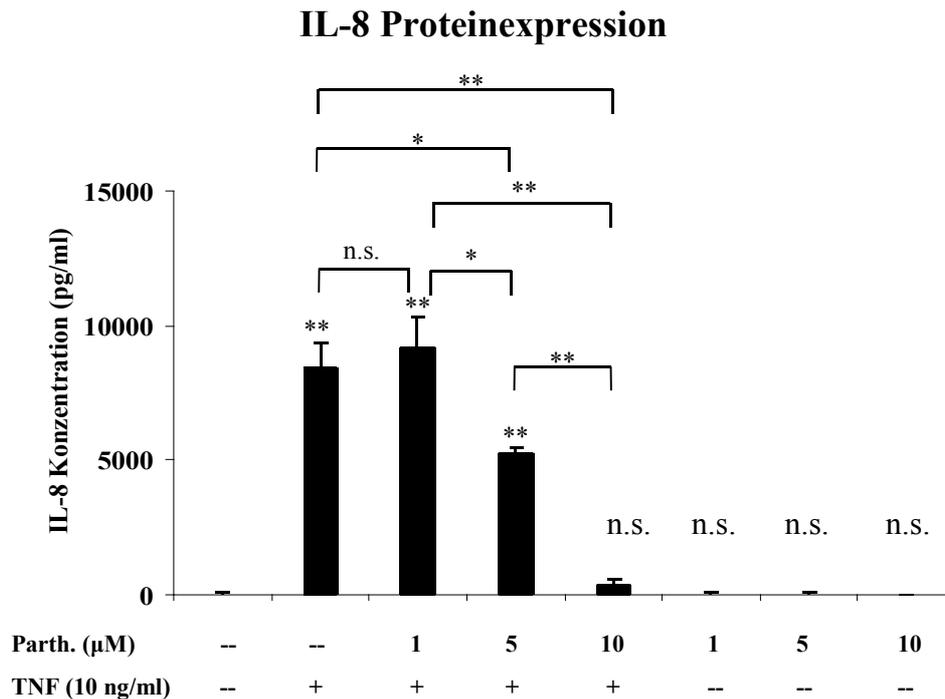


Abb.9 ELISA-Technik: IL-8 Proteinexpression durch TAF in An- und Abwesenheit von TNF- α (10 ng/ml) und Parthenolid (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M) in vitro; (n=4; *: p<0, 05, **: p<0,001 vs. Kontrolle; Ergebnisse sind Mittelwerte angegeben als \pm S.E.)

4.4 Migrationsverhalten von HuH7, DLD-1, Colo-678 und HUVEC

Schon im Jahre 1863 begründete Virchow die Hypothese, dass ein enger Zusammenhang zwischen chronischen Entzündungen und dem Ursprung von neoplastischen Prozessen besteht. Dabei scheint das inflammatorische Milieu nicht nur Einfluss auf die Entstehung, sondern auch auf die Progression und Metastasierung eines Tumors zu haben. Tumorasoziierte Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, erzielen hierbei durch Expression von Selektinen, Chemokinen und deren Rezeptoren eine Umgebung, die vermeintlich Folgen für die Migration wie auch für das Metastasierungspotential der Karzinomzellen hat. [23] So veröffentlichten Li et al. 2001 eine Arbeit, die zeigte, dass eine Korrelation zwischen der Expression von IL-8 und seiner Rezeptoren in Kolonkarzinomzellen und deren Metastasierungspotential besteht und dass IL-8 als wichtiger Parameter bei der Zellmigration, Proliferation sowie Angiogenese gewertet werden kann. Demgemäß wurde die Bedeutung des proinflammatorischen Zytokin TNF- α , beziehungsweise der

milieubestimmenden tumorstromaassoziierten Fibroblasten und Leberfibroblasten, für das Migrationsverhalten verschiedener Zelllinien untersucht. Dabei handelte es sich um:

- | | |
|---------------------|----------------------------------------------------------|
| (1) HuH7 | Hepatomezellen; Zelllinie des hepatozellulären Karzinoms |
| (2) DLD-1/ COLO-678 | Kolonkarzinomzellen; Zelllinien des Kolonkarzinoms |
| (3) HUVECs | Humane Nabelschnurendothelzellen |

Chemotaktische Wirkung des konditionierten Mediums von TAF und LF

Um die Zellmigration der Karzinomzelllinien HuH7, DLD-1, Colo-678 sowie der HUVECs in vitro im zweidimensionalen Raum gegenüber einer ansteigenden Konzentration des konditionierten Mediums von TAF und der LF zu analysieren, wurde der Boyden Chamber Assay gewählt.

Dazu wurde der untere Teil der Kammer mit Medium unterschiedlicher Konzentrationen versetzt. Die konditionierten Medien beider Kulturen wiesen eine signifikante konzentrationsabhängige Erhöhung der übergesiedelten HuH7 Hepatomzellen, DLD-1 und Colo-678 Kolonkarzinomzellen sowie der HUVECs im Vergleich zur Kontrolle (unkonditioniertes 10% FBS-Medium) auf. Der Höhepunkt lag bei Konzentrationen zwischen 20% und 80%.

Interessanterweise fiel die Reaktion der DLD-1 Zellen auf das Medium der Leberfibroblasten stärker aus als auf das Medium der TAF-Kulturen, jedoch war der Unterschied nicht statistisch signifikant. Ferner konnte ebenso bei den HUVECs eine Steigerung der Migration auf die Medien verzeichnet werden, dennoch war auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied nachzuweisen. (Abb. 10) Folglich scheinen sowohl tumorstromaassoziierte Fibroblasten als auch Leberfibroblasten Faktoren zu sezernieren, die die Chemotaxis der Tumorzellen und endothelialer Zellen beeinflussen.

Migrationsverhalten der Zelllinien HuH7, DLD-1, Colo-678 und HUVEC

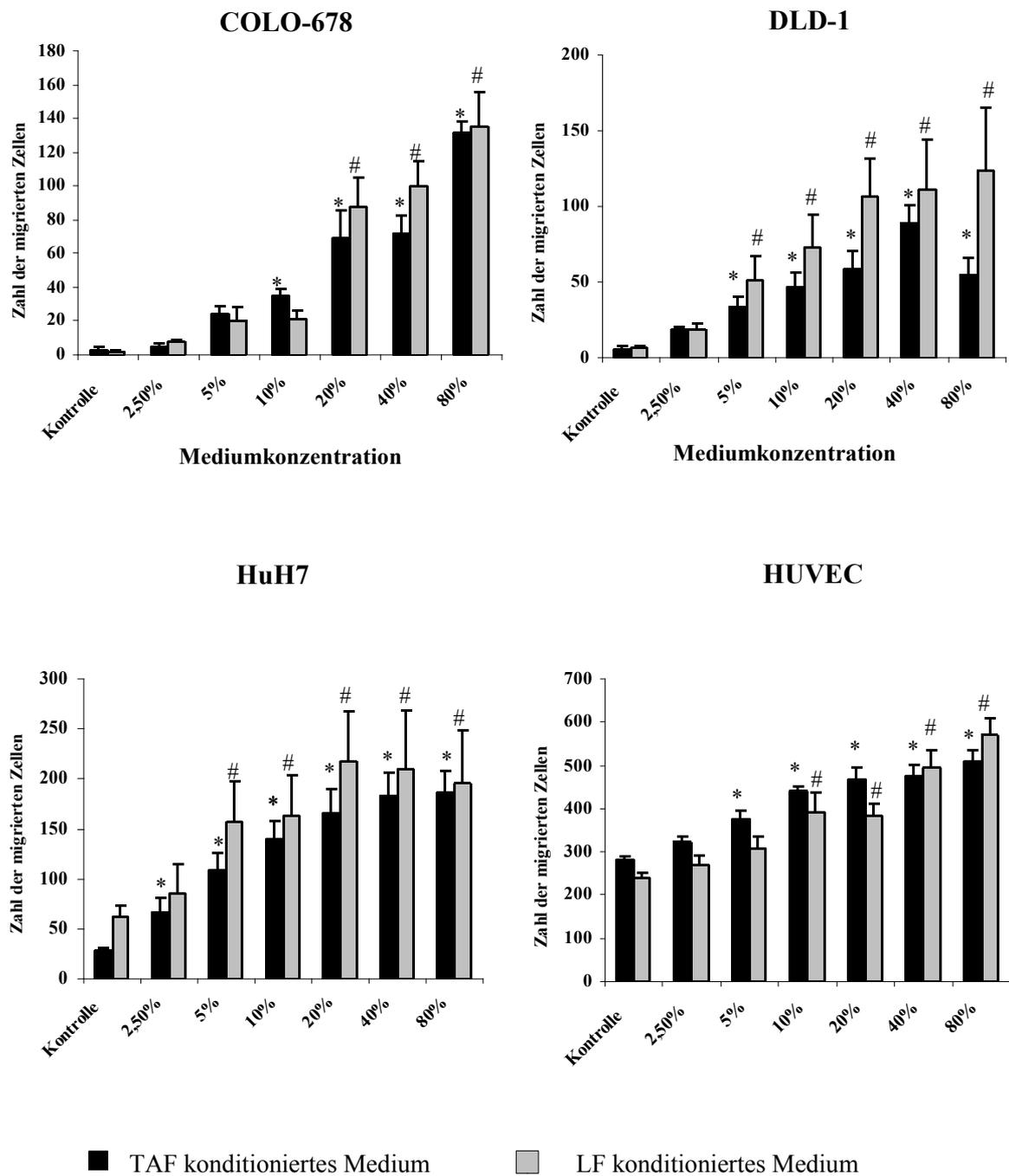


Abb.10 Boyden Chamber Analyse: Chemotaxis von HuH7 Hepatomzellen, DLD-1 Kolonkarzinomzellen, Colo-678 Kolonkarzinomzellen und HUVECs induziert durch konditioniertes Medium von LF- und korrespondierenden TAF-Kulturen. Die Konzentrationen der Medien betragen 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%, 80%. Jeder experimenteller Ansatz wurde mittels 4-facher Messung ausgewertet. (n=5; *, #: p < 0,001 versus Kontrolle; Ergebnisse sind Mittelwerte angegeben als \pm S.E.)

Einfluss von TNF- α auf die chemotaktischen Eigenschaften

Da IL-8 als Chemoattractant bekannt ist, sollte untersucht werden, inwiefern die IL-8 Proteinexpression, ausgelöst durch die Stimulation der TAF mit TNF- α , Auswirkungen auf die Migration der Tumorzelllinien und der HUVECs hat.

Dazu wurden die tumorstromaassoziierten Fibroblasten zuvor mit TNF- α (10 ng/ml) inkubiert, wie in „Materialien und Methoden“ erläutert, und das gewonnene Medium in Hinblick auf die chemotaktische Reaktion der Tumorzellen sowie der endothelialen Zellen untersucht. Als Vergleich diente das Kontrollmedium unstimulierter TAF, dem aber, um einen Einfluss des exogenen TNF- α auszuschließen, nach der Inkubation das Zytokin zugesetzt wurde. Des Weiteren sollte die Hemmung des IL-8 mithilfe eines IL-8 neutralisierenden Antikörpers getestet werden.

Wie vorher schon gezeigt, löst eine Stimulation mit TNF- α eine Hochregulierung der IL-8 Expression in den TAF aus, trotzdem konnte kein eindeutiger Effekt auf das Migrationsverhalten nachgewiesen werden:

Wie in Abbildung 11 zu sehen, ist lediglich bei der Colo-678 Zelllinie eine Zunahme der Chemotaxis auf das Medium TNF- α stimulierter TAF gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Auch die Neutralisation des Interleukins durch den Antikörper anti-IL-8 weist zwar eine leichte aber keine signifikant hemmende Wirkung auf.

Wie die Colo-678 Zellen wurden auch die HuH7 Hepatomzellen, DLD-1 Kolonkarzinomzellen und HUVECs analog auf ihre Migration untersucht. Nach der Auswertung des Boyden Assay konnte aber weder ein deutlicher Anstieg der Wanderung bei den Zellen beobachtet werden noch eine vernehmliche inhibierende Auswirkung des Antikörpers.

In Bezug auf den konzentrationsabhängigen Anstieg, dargestellt in Abbildung 10, zeigte die fehlende Empfänglichkeit der Zelllinien auf das IL-8 beziehungsweise auf das TNF- α in dem Boyden System, dass noch andere nicht identifizierte Chemoattractants eine entscheidende Bedeutung für die Chemotaxis der untersuchten Zelllinien haben müssen.

Migrationsverhalten der Zelllinien HuH7, DLD-1, Colo-678 und HUVEC

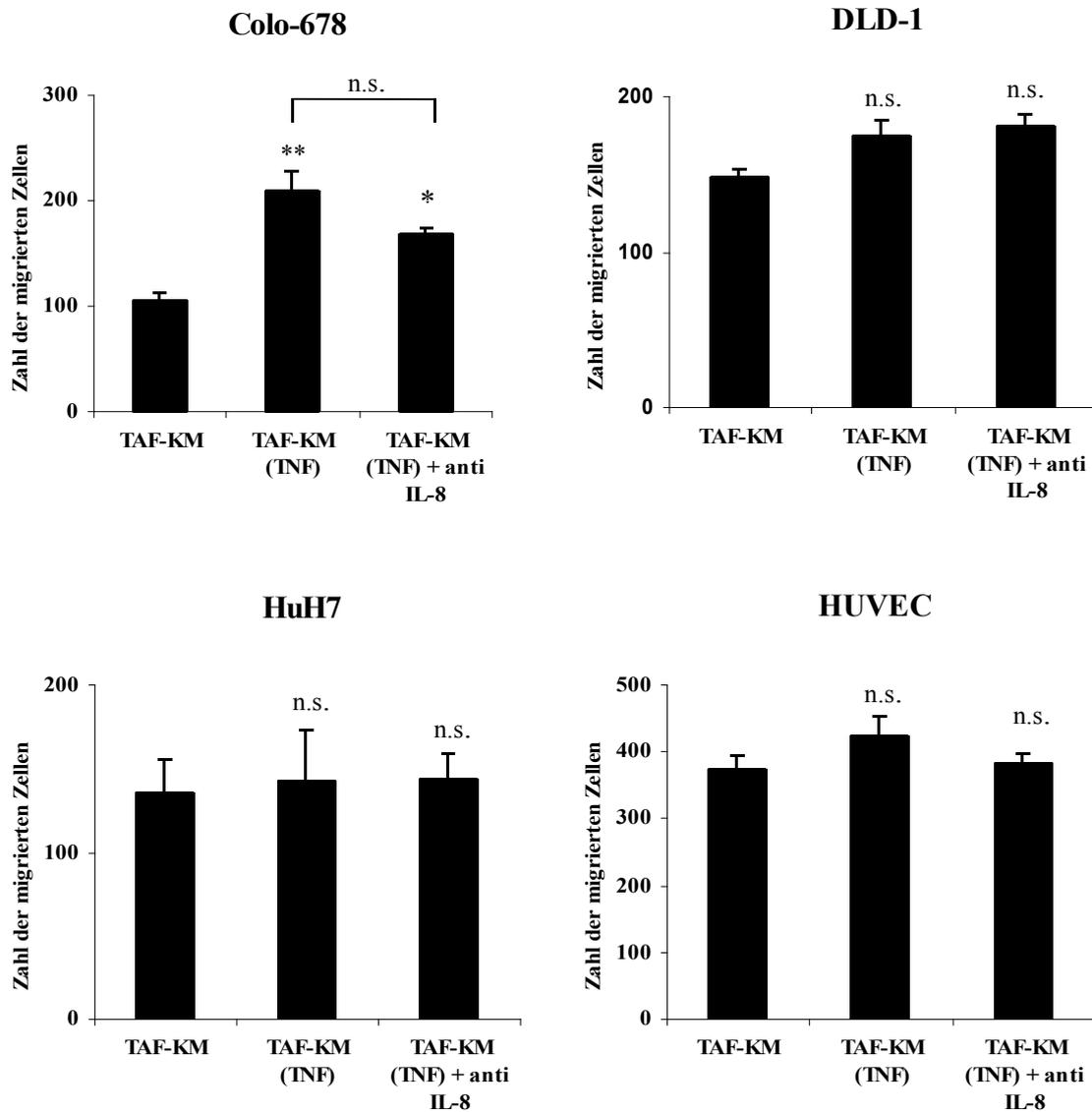


Abb.11 Boyden Chamber Analyse: Wirkung von TNF- α auf die chemotaktischen Eigenschaften von Colo-678 Kolonkarzinomzellen, DLD-1 Kolonkarzinomzellen, HuH7 Hepatomzellen sowie HUVECs. Induktion der Chemotaxis durch konditioniertes Medium von TAF nach 24-stündiger TNF- α (10 ng/ml) Inkubation [TAF-KM(TNF- α)] im Vergleich zum Medium (0,5% FBS) der nicht stimulierten tumorstromaassoziierten Fibroblasten [TAF-KM] als Kontrolle. Zusätzlich wurde die Wirkung eines IL-8 neutralisierenden Antikörper getestet [TAF-KM(TNF- α) + anti-IL-8]. (n=4; *: p < 0,05 versus Kontrolle (TAF-KM); Ergebnisse sind Mittelwerte angegeben als \pm S.E.)

5. Diskussion

5.1 Inflammatorische Zellen als Bestandteil kolorektaler Lebermetastasen

Angesichts verschiedener Publikationen, die beinhalten, dass eine grundlegende Wechselwirkung zwischen der Lokalisation von Neoplasien und lokal entzündlichen Ereignissen besteht, wurde das Gewebe kolorektaler Lebermetastasen auf das Vorkommen von CD45-tragenden Zellen als Anhalt für eine inflammatorische Aufbereitung untersucht. [5; 74] Hierbei ließ sich mithilfe der immunhistochemischen Analyse eine deutliche Anreicherung von CD45-positiven Signalen im Bereich des peritumoralen Gewebes nachweisen. (Abb. 1) Obwohl das Metastasengewebe der kolorektalen Karzinome im Vergleich zum Grenzgebiet weniger markierte Zellen enthielt, war dennoch auch hier eine deutliche Zunahme gegenüber dem gesunden Lebergewebe zu verzeichnen. (Abb. 2)

Die Expression des Oberflächenmarkers CD45, der unter anderem auf Leukozyten und Kupffer-Zellen, den leberansässigen Makrophagen, exprimiert wird, legte die Vermutung der Ausbreitung einer entzündlichen Reaktion nahe. Durch die zusätzliche Anfärbung auf Laminin konnte zudem bewiesen werden, dass die Population der CD45-tragenden Zellen das Gewebe infiltriert, da sie sich außerhalb der Gefäße befand. (Abb. 1)

Es wird im Allgemeinen angenommen, dass ortsansässige Makrophagen durch Stimulierung chemotaktische Substanzen sezernieren, die in der Lage sind, direkt Migration von weiteren Entzündungszellen zu induzieren und so inflammatorische Bedingungen zu schaffen. [103; 116] Einmal aktivierte Makrophagen sind zudem eine wichtige Quelle von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die wiederum endotheliale, epitheliale und mesenchymale Zellen für eine lokal entzündliche Umgebung stimulieren. [23] Ebenso kommt es aufgrund der Tumor-Stroma-Interaktion zu einem erheblichen Anstieg von Chemokinrezeptoren in neoplastischen Geweben. [96] Khatib et al. zeigten 2005 in einer Studie, dass metastatische Lungenkarzinomzellen sowie Kolonkarzinomzellen eine TNF- α Sekretion in Kupffer-Zellen sowie eine Hochregulierung der Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle induzieren. Außerdem gelang der Nachweis einer Korrelation zwischen der Konzentration des TNF- α und der Prognose für das Kolonkarzinom besonders im Stadium DUKE C. [35] Alles deutet daraufhin, dass TNF- α hierbei eine zwiespältige Rolle einnimmt: Einerseits ist von TNF- α bekannt, dass es unter anderem synergetisch mit anderen Mediatoren proapoptische protektive Effekte bewirkt, die das

Tumorwachstum inhibieren, andererseits aber die Metastasierung unterstützt, indem es eine Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle auf der luminalen Oberfläche der Gefäße fördert. [4; 62]

In der Phase der Metastasierung bzw. der Entzündungsreaktion greift zusätzlich das neoplastische Gewebe ins Geschehen ein. Zins et al. beschrieben 2007 Kolonkarzinomzellen mit einem erhöhten TNF- α Expressionsmuster. [131] Auf diese Weise kann die Tumorzelle doppelt Einfluss auf ihr Milieu zu nehmen: zum einen, indem sie autonom chemotaktische Faktoren freisetzt, zum anderen, indem sie die Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen mithilfe von TNF- α bei Nachbarzellen moduliert. Das Resultat wäre eine Begünstigung der neoplastischen Steuerung inflammatorischer Prozesse wie CAM-Ligand-Interaktion (engl.: cell adhesion molecule), MMP-Produktion (engl.: matrix metalloproteinases) und Chemokinfunktionen.

Man nimmt an, dass eine zentrale Bedeutung der Expression von TNF- α bei Kupffer-Zellen in der erleichterten Rekrutierung von Leukozyten aus den Gefäßen in den extravasalen Raum liegt und somit eine Abwehrfunktion gegenüber metastatischer Zellen bedingt. [106]

Aber die Expression eines Moleküls, das der verstärkten Migration von Zellen nutzt, die die antitumorale Immunabwehr fördern, verbessert auch die Wanderung von malignen Zellen und wirkt somit nicht nur protektiv, sondern bietet auch Vorteile für die Progression und Proliferation des Tumors. [7; 48]

Gulubova et al. veröffentlichten 2002 eine Arbeit, die zeigte, dass mit der Steigerung des TNF- α ein paralleler Anstieg von Adhäsionsmolekülen in Lebersinusoiden und in Metastasen zu verzeichnen ist. Zudem scheint eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise ICAM (engl.: intercellular cell adhesion molecule) ein Marker für die Möglichkeit der Kontrolle für die Rekrutierung der Leukozyten und Makrophagen darzustellen. Weitere Studien zeigten, dass in einer gesunden Leber die eigentliche Basisexpression für ICAM niedrig ist, in einer metastatischen Leber dagegen die von ICAM und E-Selektin wesentlich erhöht. [40; 49] Hierbei wird das verstärkte Aufkommen von CAM auf Endothelzellen unter anderem moduliert durch die Zellen des Stromas. [34]

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass das Eindringen von malignen Zellen in hepatisches Gewebe eine proinflammatorische Kaskade induziert, die mit einer erhöhten TNF- α Produktion beginnt, die die ansässigen Kupffer-Zellen aktiviert und zu einer

Hochregulierung der Expression von Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise E-Selektin, VCAM (engl.: vascular cell adhesion molecule) oder auch ICAM führt. [105] Es resultiert eine erleichterte Leukozyteninfiltration. Dabei stammen die Leukozyten und Makrophagen aus den Sinusoiden der Leber. [43; 93] Demgemäß scheinen unsere Beobachtungen über ein erhöhtes Vorkommen von Leukozyten und Kupffer-Zellen in kolorektalen Metastasen die Studien zu bestätigen. Neoplastische Veränderungen stellen inflammatorische Areale dar.

Auch die Tatsache, dass die Steigerung der CD45-tragenden Zellen vornehmlich im Grenzgebiet zwischen Metastase und umgebenden Parenchym lokalisiert war, wurde für andere Tumoren beschrieben. So berichteten Peeters et al. 2005 in ihren Ausführungen ursächlich hierfür sei die Heterogenität des Metastasengewebes in Bezug auf die Angiogenese und die ungleiche Expression von Endotheladhäsionsrezeptoren. [91]

Natürlich setzt die immunhistochemische Analyse Grenzen in Bezug auf die genaue Zuordnung der CD45-positiven Zellen sowie deren Quantifizierung, überdies hängen die Ergebnisse der Immunhistochemie im Besonderen vom Fixierungsprozess, von den verwendeten Antikörpern und der Definition von Positivität der angefärbten Zellen ab. Trotz der Subjektivität der Auszählung, die mittels zweifacher Auswertung von zwei unabhängigen Beobachtern zu mindern versucht wurde und der Gefahr von Artefakten, bietet die immunhistochemische Analyse aufgrund ihrer guten Spezifität eine anerkannte Möglichkeit der Darstellung. [16]

5.2 Expression des Zytokins Interleukin-8 in kolorektalen Lebermetastasen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine verstärkte Einwanderung von inflammatorischen Zellen in das Areal von kolorektalen Lebermetastasen erfolgt, stellte sich die Frage über die Ursachen für diese Beobachtung. In den folgenden Experimenten lag der Schwerpunkt auf der Analyse der Expression von IL-8 mRNA und - Protein. Von dem Interleukin, das aus der CXC-Familie stammt, ist bekannt, dass es ein Schlüsselmediator bei der Aktivierung und bei der Chemotaxis von Leukozyten in der Pathogenese von entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen darstellt. [124] Umfangreiche Studien belegten zudem die grundlegende Rolle des IL-8 für das Tumorwachstum: IL-8 schafft eine tumorbegünstigende Umgebung in beispielsweise Gastrointestinalkarzinomen [50;

129] und Melanomen [112; 113], wirkt mit bei der Regulation der Angiogenese [56; 66] und hat Einfluss auf die Migration und Proliferation von Zellen. [46]

Die immunhistochemische Färbung sowie die Northern Blot Analyse sollten Aufschluss über die Expression von IL-8 in primären kolorektalen Lebermetastasen geben:

Hierbei ließ sich eine intensive Anfärbung als Nachweis der IL-8 Expression im Tumorgewebe, den Stromalen Septen und in den Tumorrändern zeigen. (Abb. 4) Die weitere Untersuchung mithilfe des Northern Blot konnte die Verteilung der IL-8 mRNA-Expression im Gewebe darlegen. Im Metastasengewebe konnte ein deutlicher Anstieg im Vergleich zum umgebenden Tumorgewebe und dem Lebergewebe nachgewiesen werden. (Abb. 3)

Die Bestätigung der IL-8 mRNA-Expression liefert somit einen Beitrag zum Verständnis der kolorektalen Lebermetastasen. So zeigten Li et al. 2001, dass Kolonkarzinomzellen in der Lage sind IL-8 zu exprimieren. Die von ihnen untersuchten primären malignen Neoplasmen bestanden aus Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotential, welche über spezifische Gene den Metastasierungsphänotyp regulieren. Interessanterweise scheint ein Zusammenhang zwischen der IL-8 Expression, der Expression der Rezeptoren in Karzinomzellen und der Tendenz zur Metastasierung zu bestehen, das heißt, dass anscheinend die endogene IL-8 Produktion und das Metastasierungspotential mitunter positiv korrelieren. [65; 112] Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Melanomzellen postuliert. [113; 114] Das scheint unsere Beobachtung zu bestätigen, da kolorektale Lebermetastasen ebenfalls IL-8 produzieren.

Da bisher nur der Nachweis der IL-8 Expression in der Gesamtheit des Gewebes belegt wurde, sollte geklärt werden, inwiefern die isolierten tumorstromaassoziierten Fibroblasten an der IL-8 Produktion beteiligt sind. Dabei wurde erneut auf die Northern Blot Technik und ELISA zurückgegriffen, da trotz des relativ großen Aufwands und der mitunter schwierigen Handhabung ein spezifischer Nachweis der Expression von mRNA bzw. von Proteinen gelingt. [78]

Die TAF wurden mit TGF- β , PDGF-BB und TNF- α stimuliert, um eine Modifikation im IL-8 Expressionsmuster zu induzieren. Dabei konnte ein TNF- α vermittelter Anstieg der IL-8 Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Die Fibroblasten, die mit den anderen Faktoren inkubiert wurden, wiesen dagegen keine nennenswerte Erhöhung auf. (Abb. 5) Die Ergebnisse konnten mithilfe der ELISA-Technik verifiziert werden. (Abb. 6)

Für die Untersuchung der Einflussnahme von Parthenolid auf die TNF- α vermittelte IL-8 Produktion wurden die TAF mit PTL inkubiert. Bei Parthenolid handelt es sich um ein Reagenz, von dem bekannt ist, dass es die Fähigkeit besitzt, den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu inhibieren. [80] Das Interleukin-8 gehört zu den Zielgenen des Transkriptionsfaktors. Die TNF-vermittelte NF- κ B-Aktivierung entspricht einer Kaskade beginnend mit der Ligandenbindung des TNF-Moleküls an den Rezeptor TNF-R. Die Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes induziert unter anderem die Rekrutierung von NF- κ B und die anschließende Expression von IL-8. [86; 129]

Eine Hemmung von NF- κ B sollte daher die TNF- α vermittelte IL-8 Expression inhibieren. In unseren Studien zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der IL-8 Produktion sowohl bei der mRNA als auch dem Protein. (Abb. 8; Abb. 9) Zudem konnten wir in der lichtmikroskopischen Analyse die Ablösung der kultivierten Zellen beobachten, was als eine erhöhte Sterblichkeit der Zellen gewertet wurde. (Abb. 7)

Die Ursachen dafür könnten vielfältig sein. Einerseits wäre eine toxische Komponente des Parthenolid zu diskutieren. Eine Behinderung aufgrund der bekannten Toxizität des Dimethylsulfoxid (DMSO) kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da zwar Parthenolid in DMSO gelöst wurde, aber die finale Konzentration nicht 0,1% überstieg und in allen Ansätzen entsprechend gleich war. [94] Zum anderen ist eine proapoptotische Wirkung von PTL in Myelomzellen und Pankreaskarzinomzellen bekannt. [121; 122] Ebenso wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben, dass Parthenolidkonzentrationen zwischen 5-100 μ M anscheinend einen schnellen apoptotischen Zelltod durch den Verlust von nukleärer DNA, Extraktion von Zellmembranbestandteilen und der Depolarisation von mitochondrialer Membran induzieren. [132] Ähnliche Ergebnisse konnten auch in unseren Beobachtungen gezeigt werden, da bei der densitometrischen Bandenanalyse erst ab einer Konzentration von 5 μ M eine Beeinflussung der IL-8 Expression beobachtet werden konnte. (Abb. 8) Somit scheint nicht nur die alleinige Inhibition des NF- κ B ursächlich für das Ergebnis zu sein, sondern zusätzlich die apoptotische Wirkung des PTL und die daraus resultierende verringerte Anzahl an exprimierenden Zellen.

Es konnte also gezeigt werden, dass TNF- α die IL-8 Expression in TAF erhöht und das Reagenz Parthenolid in der Lage ist, diesen Anstieg negativ zu beeinflussen.

Die Tatsache, dass TAF die Fähigkeit besitzt, IL-8 nach Stimulation zu sezernieren, gibt einen guten Einblick in die Vorgänge des Tumorwachstums. Einige der physiologischen Funktionen von IL-8 sind beispielsweise die Regulierung des Tumorwachstums, der

Angiogenese und der Metastasierung von Karzinomzellen. [113] Einhergehend mit der Beteiligung an der Transkription der Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 scheint eine Korrelation zwischen der IL-8 Expression und dem Metastasierungspotential evident. [64; 71] Eine von verschiedenen Arbeitsgruppen beschriebene erhöhte Immunreaktivität von TNF- α in der Umgebung kolorektaler Lebermetastasen und in der Tumorperipherie von intrahepatischen Cholangiokarzinomen könnte auf ein Zusammenspiel von Karzinom- und Stromazellen bei der Formation von kolorektalen Metastasen weisen. [40; 85] Die starke Beziehung der beiden Tumorkomponenten konnte schon in anderen Bezügen nachgewiesen werden: Nakamura et al. zeigten 1997, dass Karzinomzellen, die nicht die Fähigkeit besaßen den Hepatocyte Growth Factor (HGF) zu sezernieren, wiederum in der Lage sind, durch die Expression von Chemokinen, Fibroblasten dazu zu animieren; bei der Ko-Kultivierung von Tumor- und Stromazellen sezernierten die Fibroblasten HGF. Zusätzlich stieg die Zahl der invasiven Zellen. Eine derartige Tumor-Stroma-Interaktion wird nachgewiesenermaßen vermittelt durch Zytokine wie IL-1, bFGF und PDGF. [51; 79] Der Nachweis der Expression von IL-8, seines Rezeptors und TNF- α gelang bisher in den Kolonkarzinomzellen und scheint von hoher Relevanz bezugnehmend auf den autokrinen bzw. parakrinen Mechanismus. [24; 65; 131] Es besteht für die Kolonkarzinomzellen die Möglichkeit mithilfe des Stromas die Wirkung des Interleukin-8, um ein Vielfaches zu potenzieren. Inwiefern diese Art der Wechselbeziehung auch auf die von uns untersuchten Zellen zu übertragen ist, bleibt unklar, da die Zytokin produzierende Zellpopulation in den Metastasen stark heterogen ist.

Bei der Betrachtung der von uns untersuchten Zellen gilt alleinig die TNF- α vermittelte IL-8 Expression als gesichert. Auf welche Weise die involvierten Tumorzellen der Metastase Einfluss nehmen, wäre Gegenstand weiterer Untersuchungen und könnte unter Umständen eine Erklärung bieten, warum ein starkes Gefälle zwischen Tumorgewebe und Tumorrand besteht.

Die Frage der IL-8 Expression scheint daher so evident, da IL-8 eine große Bedeutung bei der Tumorprogression und Metastasierung zu haben scheint. IL-8, produziert durch Tumorzellen, reguliert die Neovaskularisierung, die Zellproliferation und die Streuung von humanen gastrinalen Karzinomzellen sowie Prostatakarzinomzellen. [45; 50]

Zur Triggerung der Angiogenese werden derzeit verschiedene Theorien diskutiert: der angiogenetische Effekt beruht entweder auf den IL-8 rekrutierten Leukozyten oder auf

der Bindung von Interleukin-8 auf den Endothelzellen. [92] Dass in der Umgebung von kolorektalen Lebermetastasen Leukozyten ansässig sind, zeigten wir unter 4.1.

Folglich besteht die Möglichkeit, dass die tumorfördernde Rolle von Entzündungen wenigstens zum Teil der Induktion der Chemokinexpression im Stroma bedingt durch physiologische TNF- α Sezernierung, durch beispielsweise Makrophagen, Kupffer-Zellen aber auch Tumorzellen zuzuschreiben ist.

So lassen die Ergebnisse vermuten, dass das invasive und metastatische Potential der diversen Arten von Kolonkarzinomzellen durch die Interaktion von Tumor- und Stromazellen, wie den von uns untersuchten tumorstromaassoziierten Fibroblasten, reguliert wird und dass die TNF- α vermittelte IL-8 Expression in den TAF einen Weg der Modulation in der Tumorumgebung darstellt.

5.3 Einfluss von IL-8 und konditioniertem Medium auf die Zellmigration

Bis hier konnte unter anderem gezeigt werden, dass tumorstromaassoziierte Fibroblasten TNF- α vermittelt IL-8 sezernieren. Des Weiteren sollte nun nachgewiesen werden, inwiefern die von den TAF exprimierten Faktoren, das Invasions- bzw. Metastasierungsverhalten von verschiedenen Tumorzelllinien beeinflussen.

Für die Untersuchungen standen drei etablierte Tumorzelllinien sowie Endothelzellen aus Nabelschnurvenen zur Verfügung. Durch die Nutzung des zweidimensionalen Migrationsmodells nach Boyden (1962) konnte die Zellbewegung durch speziell mit extrazellulären Matrixkomponenten beschichtete Membranen beobachtet werden [2; 53] Die Vorteile dieses Systems liegen in der einfachen und schnellen Nutzung sowie der raschen Analyse der Ergebnisse. In unserer Studie wurden sowohl Colo-678-, DLD-1- und HuH7-Tumorzellen sowie von Nabelschnurvenen stammende Endothelzellen als Monolayer auf die beschichtete Boyden Kammer ausplattiert und die Migration, ausgelöst durch das TAF-stimulierte Medium, beobachtet.

Der Nachweis einer konzentrationsabhängigen Steigerung der übergesiedelten HuH7 Hepatomzellen, DLD-1 und Colo-678 Kolonkarzinomzellen sowie der HUVECs gegenüber der Kontrolle (unkonditioniertes 10% FBS-Medium) deutete auf eine durch das konditionierte Medium induzierte erhöhte Migration hin. Ferner fiel die Reaktion der DLD-1 Zellen auf das Medium der Leberfibroblasten stärker aus als auf das Medium der TAF-Kulturen. (Abb. 10)

Demzufolge liegt die Vermutung nahe, dass sowohl tumorstromaassoziierte Fibroblasten als auch Leberfibroblasten Faktoren exprimieren, die die Übersiedlung von Tumorzellen und endothelialer Zellen beeinflussen.

Aufgrund der Tatsache, dass das Interleukin-8 als ein wichtiger Faktor bei der Chemotaxis von Zellen bekannt ist und der Beobachtung einer TNF- α vermittelten IL-8 Expression bei TAF, sollte geklärt werden, ob es sich bei der erhöhten Übersiedlung der Tumorzellen und Endothelzellen um eine durch IL-8 induzierte Migration handelt. Um einen chemotaktischen Gradienten zu produzieren, nutzten wir konditioniertes Medium, in dem nach vorherigen Analysen mithilfe des ELISA der Nachweis von IL-8 nach TNF- α Behandlung der TAF gelang sowie Medium mit anti-IL-8 als Inhibitor eines eventuellen direkten Stimulus. (Abb. 11) In unserem Fall schienen die untersuchten Zellen, außer Colo-678, jedoch resistent gegenüber einer vermuteten IL-8 vermittelten Wanderung zu sein. Dagegen sind sie, wie erwähnt, empfänglich für das konzentrationsabhängige konditionierte Medium. Naheliegend ist die Vermutung, dass nicht Interleukin-8 alleine für die Migration von Colo-678, DLD-1, HuH7 und HUVEC verantwortlich ist.

Bei der Aktivierung der Chemotaxis handelt es sich um eine Vielzahl von einzelnen Schritten, die in ihrer Gesamtheit die Migration von Zellen auslösen, das schließt die Ausschüttung einer Anzahl verschiedener „Lotsenstoffe“ für den Aufbau eines Chemokingradienten und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen ein, was letztlich zur einer erleichterten Migration von Zellen führt. [120]

Unterschiedliche Migrationsauslöser wurden in der Literatur postuliert: Eine direkte IL-8 induzierte Migration konnte bei Melanomzellen [97] und bei promyeloischen Leukämiezellen [117] und interessanterweise ebenfalls bei Zellen aus murinen kolorektalen Lebermetastasen nachgewiesen werden. In diesem Fall förderte das murine CXC-Chemokin MIP-2 (engl.: macrophage inflammatory protein), ein funktional analoges Zytokin zum humanen IL-8, die Zellmigration sowie die Proliferation der metastatischen Zellen. [58]

Andere Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie eine direkte oder indirekte Migration von Zellen induzieren können, sind u.a. SDF-1 (engl.: stromal cell-derived factor) [57], HGF [99], IL-1- α [76; 100] und MCP (engl.: monocyte chemoattractant protein) [25] So begünstigt beispielsweise MCP mithilfe des C-C-Chemokinrezeptors 2 (CCR2) die Chemotaxis der HSC bei der Entwicklung der hepatischen Fibrose in Mäusen. [109]

Des Weiteren berichteten Shimizu et al. 2000 über eine Verstärkung des Migrationspotentials von Kolonkarzinomzellen durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von aus Ratten stammenden HSC, wobei hier PDGF-AB und HGF als Stimulus betrachtet wurden. Für die Ergebnisse, die zu unseren im Widerspruch stehen, gibt es verschiedene Interpretationen [111]. Das Aufkommen reiner rekombinanter Zytokine hat die Identifizierung von Zytokinfunktionen *in vitro* sehr erleichtert, führt aber aus mehreren Gründen zu Fehlinterpretationen [104]: So handelt es sich *in vivo* um die Interaktion vieler Zytokine, zudem gibt es *in vivo* Zytokininhibitoren, ein Beispiel dafür ist der lösliche TNF- α Rezeptor.

Auch die *in vivo* Videomikroskopie konnte einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Migration leisten; in einem Mäuselebermodell konnte das Überleben in der Zirkulation, das Verbleiben der Zellen in den periportal Sinusoiden aufgrund der Größenrestriktion und die Extravasation ins Gewebe, die je nach metastatischem Potential zwischen 48 und 72 Stunden lag, analysiert werden. [38]

Vor diesem Hintergrund zeigt sich, dass aufgrund der Vielzahl der verschiedenen Faktoren, die eine Chemotaxis verursachen können, eine eindeutige Zuordnung des Weiteren als gar nicht so leicht erscheint und dass neben den möglichen Chemokinen höchstwahrscheinlich auch die Konzentration, der Zeitraum, die analysierten Zellen sowie das metastatische Potential eine wichtige Rolle einnehmen. Deshalb könnte möglicherweise ein zusätzlicher Anstieg des Interleukin bzw. der Konzentration und eine Veränderung der Stromaaktivitäten diese Zellen im Allgemeinen für die IL-8 induzierte Migration sensibilisieren.

Neben den erwähnten Modellen sind für zukünftige Arbeiten physiologisch besser geeignete *in vitro* sowie *in vivo* Modelle vorgesehen. Beispiel für ein physiologisches *in vitro* Modell ist das sogenannte Konfrontationsmodell, bei dem normales Gewebe mit Tumorzellen in Kontakt gebracht wird [75], dabei stellt das gesunde Gewebe das Zielgewebe für die invasiven Zellen dar und wird von diesen zerstört bzw. ersetzt.

In dieser Arbeit ist der Nachweis gelungen, dass kolorektale Lebermetastasen entzündliche Areale darstellen, die Expression von IL-8 im Gewebe unter anderem durch tumorstromaassoziierten Fibroblasten, behandelt mit TNF- α , stattfindet und das konditioniertes Medium zwar in Tumorzelllinien und Endothelzellen Migration auslöst, wahrscheinlich aber nicht alleinig durch IL-8 bedingt.

Anknüpfend an die Ergebnisse wäre eine weiterführende Analyse der CD45-positiven Zellen in den kolorektalen Lebermetastasen bezüglich der möglichen Zellpopulationen denkbar. Weitere Untersuchungen mit inhibitorischen Antikörpern gegen Zytokine könnten zeigen, welches mitunter an der Vermittlung des migrierenden Signals der von uns untersuchten Zellen beteiligt ist. Bei einer Ko-Kultivierung und deren Analyse von Tumorzellen und tumorstromaassoziierten Fibroblasten bestünde die Eventualität aufschlussreicher Einblicke in die Interaktionen im Tumorstromagebiet. Diese Tatsache ist sinnvoll, wenn man bedenkt, dass es in vivo Inhibitoren gibt und dass der autokrine Feedback-Mechanismus von hemmenden Produkten anderer Zellen abgefangen und moduliert werden kann.

Eine besondere Bedeutung in der Arbeit kommt der Feststellung über die inhibitorische Wirkung von Parthenolid zu, da es eventuell einen Ansatz zur medikamentösen Behandlung dieser Erkrankung darstellt. Berichten zufolge wurde beobachtet, dass Fenretinid, ein synthetisches antitumorales Retinoid, in Kombination mit Parthenolid die Apoptoserate in Hepatomzellen effektiv erhöhte. [90]

Folglich sind die beschriebenen Ergebnisse eine nützliche Basis für weiterführende Experimente und erlauben eine Einordnung der Erkenntnisse über aus kolorektalen Lebermetastasen isolierten tumorstromaassoziierten Fibroblasten in die Literatur.

6. Zusammenfassung

Kolorektale Lebermetastasen stellen mit die häufigsten sekundären Lebermalignome dar. Dass auch hier eine enge Korrelation zwischen Karzinomzellen und dem reaktiven Tumorstroma besteht, gilt als unbestritten. Der Entzündung als Stimulus kommt dabei ein besonderer Stellenwert zu, weil eine Vielzahl von Faktoren freigesetzt wird, die modulierend auf die Tumorumgebung einwirken können. Angesichts autokriner und parakriner Mechanismen resultiert eine Beeinflussung des Zellverhaltens.

Durch den Nachweis von CD45-positiven Zellen, unter anderem Leukozyten und Kupfer-Zellen, im Bereich der kolorektalen Lebermetastasen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es sich hierbei um entzündliche Areale handelt, die zudem eine Expression von Interleukin-8 in der Gesamtheit des Gewebes aufwiesen. Bei IL-8 handelt es sich um ein Chemokin, das eine entscheidende Rolle bei der Invasion von Krebszellen und der Tumorangiogenese spielt. Die Analyse der kultivierten tumorstromaassoziierten Fibroblasten, isoliert aus dem Metastasengewebe, sowie der Leberfibroblasten zeigte ebenfalls eine starke Expression von IL-8 auf, induziert durch den Tumornekrosefaktor- α ; folglich leisten die Fibroblasten einen Beitrag zur Produktion des IL-8. Die Wirkung des TNF- α auf die TAF konnte wiederum mithilfe von Parthenolid, einem Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ b, gehemmt werden.

Bei der Untersuchung des Einflusses von konditionierten Medien der LF und TAF auf das Migrationsverhalten von Tumorzellen (HuH7 Hepatomzellen, DLD-1 und Colo-678 Kolonkarzinomzellen) sowie den Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVECs) deutete eine konzentrationsabhängige Erhöhung der migrierten Zellen auf eine chemotaktische Wirkung hin. Eine Stimulation der Zellen mit Medium der TNF- α konditionierten TAF steigerte lediglich bei den Colo-678 Kolonkarzinomzellen die Migration, bei den anderen untersuchten Zellen zeigte sich kein Anstieg der Migration, obwohl TNF- α nachgewiesenermaßen die Expression von IL-8 in tumorstromaassoziierten Fibroblasten induziert. Eine zusätzliche Behandlung mit einem Antikörper ließ keine inhibierende Wirkung erkennen.

Schlussfolgernd eröffnet die Tatsache, dass das pluripotente proinflammatorische Zytokin TNF- α einen starken positiven Einfluss auf die IL-8 Produktion in TAF hat und die Expression sich wiederum durch den NF- κ B-Inhibitor Parthenolid hemmen lässt, Möglichkeiten, die von therapeutischem Interesse sein könnten.

7. Literaturverzeichnis

1. Aigner KR, Link KH, Schwemmler K (1984) Short intermittent arterial infusion in local chemotherapy of liver tumors and metastases. *Chirurg* 55(8):494-8
2. Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN (1987) A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47(12):3239-45
3. Armitage RJ (1994) Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 6(3):407-13
4. Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Burnier J, Bikfalvi A, Brodt P (2007) The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation. *Am J Pathol* 170(5):1781-92
5. Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet* 357(9255):539-45
6. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W (1993) Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73(3):431-45
7. Bayón LG, Izquierdo MA, Sirovich I, van Rooijen N, Beelen RH, Meijer S (1996) Role of Kupffer cells in arresting circulating tumor cells and controlling metastatic growth in the liver. *Hepatology* 23(5):1224-31
8. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A (1985) Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316(6028):552-4
9. Bhomwick NA, Moses HL (2005) Tumour stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 15(1):97
10. Bièche I, Chavey C, Andrieu C, Busson M, Vacher S, Le Corre L, Guinebretière JM, Burlinon S, Lidereau R, Lazennec G (2007) CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 14(4):1039-52

11. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells . *Nature* 385(6618):729-33
12. Bosman FT (1995) Prognostic value of pathological characteristics of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 31A(7-8):1216-21
13. Brandão DF, Ramalho LN, Ramalho FS, Zucoloto S, Martinelli Ade L, Silva Ode C (2006) Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. *Acta Cir Bras* 21 Suppl 1:54-7
14. Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE (2000) Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 12(1):78-85
15. Brew R, Southern SA, Flanagan BF, McDicken IW, Christmas SE (1996) Detection of interleukin-8 mRNA and protein in human colorectal carcinoma cells. *Eur J Cancer* 32A(12):2142-7
16. Büttner R, Thomas C (2003) *Pathologie: Allgemeine Pathologie*, 3. Aufl. Schattauer Gmbh Stuttgart, 11-26
17. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F (1991) The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* 202(1):3-14
18. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* 72(9):3666-70
19. Castelló-Cros R, Cukierman E (2009) Stromagenesis during tumorigenesis: characterization of tumorassociated-fibroblasts and stroma-derived 3D matrices. *Methods Mol Biol* 522:275–305
20. Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Berdel WE (2004) *Innere Medizin*, 5. Aufl. Urban und Fischer München, 117ff, 725
21. Cole AD (1893) The place of the laboratory in teaching physics. *Science* 21(540):316-317

22. Cole DJ, Ferguson CM (1992) Complications of hepatic resection for colorectal carcinoma metastasis. *Am Surg* 58(2):88-91
23. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860-7
24. Csiszár A, Szentes T, Haraszi B, Balázs A, Petrányi GG, Pócsik E (2004) The pattern of cytokine gene expression in human colorectal carcinoma. *Pathol Oncol Res* 10(2):109-16
25. Dambach DM, Watson LM, Gray KR, Durham SK, Laskin DL (2002) Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* 35(5):1093-103
26. Decker K (1990) Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 192(2):245-61
27. Dell'Agli M, Galli GV, Bosisio E, D'Ambrosio M (2009) Inhibition of NF- κ B and metalloproteinase-9 expression and secretion by parthenolide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 19(7):1858-60
28. Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G (2004) The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behaviour. *Int J Dev Bio* 48:509-517
29. Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulsom R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA (2004) Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res* 64(23):8492-5
30. Dudas J, Saile B, El-Armouche H, Aprigliano I, Ramadori G (2003) Endoreplication and polyploidy in primary culture of rat hepatic stellate cells. *Cell Tissue Res* 313(3):301-11
31. Eck MJ, Sprang SR (1989) The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264(29):17595-605
32. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH (1999) Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 230(3):309-18

33. Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR (2004) A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 26(4):955-63
34. Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U (2009) The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 19(5):298-309
35. Fukushima Y, Tanizaki E, Takagi K, Takano M, Soma G (1995) Inducibility of endogenous tumor necrosis factor by tumor cells from colorectal tumor patients at Dukes stage C as a novel prognostic factor following curative operation. *Dis Colon Rectum* 38(10):1059-66
36. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83(5):793-802
37. Gressner AM (1996) Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 54:39-45
38. Groom AC, MacDonald IC, Schmidt EE, Morris VL, Chambers AF (1999) Tumour metastasis to the liver, and the roles of proteinases and adhesion molecules: new concepts from in vivo videomicroscopy. *Can J Gastroenterol* 13(9):733-43
39. Gruss HJ, Dower SK (1995) Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85(12):3378-404
40. Gulubova MV (2002) Expression of cell adhesion molecules, their ligands and tumour necrosis factor alpha in the liver of patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *Histochem J* 34(1-2):67-77
41. Hagemann T, Balkill F, Lawrence T (2007) Inflammation and Cancer: A double-Edged Sword. *Cancer Cell* 2(4):300-301
42. Henne-Bruns D, Vogel I, Kremer B (1995) Results of liver resection in 113 patients with metastases of colorectal carcinomas. *Zentralbl Chir* 20(2):84-9

43. Heuff G, van der Ende MB, Boutkan H, Prevoo W, Bayon LG, Fleuren GJ, Beelen RH, Meijer S, Dijkstra CD (1993) Macrophage populations in different stages of induced hepatic metastases in rats: an immunohistochemical analysis. *Scand J Immunol* 38(1):10-6
44. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI (2009) Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *J Immunol* 183(5):2895-7
45. Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, Yano S, Bar-Eli M, Radinsky R, Pettaway CA, Dinney CP (2000) Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6(5):2104-19
46. 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 (2005) IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* 29(6):275-82
47. Junginger T, Kneist W, Seifert JK (2003) Surgical treatment of colorectal liver metastases. *Zentralbl Chir* 128(11):911-930
48. Khatib AM, Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Samani A, Kontogiannea M, Meterissian S, Brodt P (2005) Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis. *Am J Pathol* 167(3):749-59
49. Khatib AM, Kontogiannea M, Fallavollita L, Jamison B, Meterissian S, Brodt P (1999) Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res* 59(6):1356-61
50. Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H, Yasui W, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E (1998) Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol* 152(1):93-100

51. Kitadai Y, Sasaki T, Kuwai T, Nakamura T, Bucana CD, Fidler IJ (2006) Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma. *Am J Pathol* 169(6):2054-65
52. Kitakata H, Nemoto-Sasaki Y, Takahashi Y, Kondo T, Mai M, Mukaida N (2002) Essential roles of tumor necrosis factor receptor p55 in liver metastasis of intrasplenic administration of colon 26 cells. *Cancer Res* 62(22):6682-749
53. Kleinman HK, Jacob K (2001) Invasion assays. *Curr Protoc Cell Biol*. Chapter 12:Unit 12.2
54. Kmiec Z (2001) Cooperation of liver cells in health and disease *Adv Anat Embryol. Cell Biol.* 161:III-XIII : 1-151
55. Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G (1999) Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 117(5):1205-21
56. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM (1992) Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258(5089):1798-801
57. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD (2007) Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. *Neoplasia* 9(10):862-70
58. Kollmar O, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK (2006) Macrophage inflammatory protein-2 promotes angiogenesis, cell migration, and tumor growth in hepatic metastasis. *Ann Surg Oncol* 13(2):263-75
59. Kuo TH, Kubota T, Watanabe M, Furukawa T, Teramoto T, Ishibiki K, Kitajima M, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM (1995) Liver colonization competence governs colon cancer metastasis. *Proc Natl Acad* 92(26):12085-9
60. Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, Matsushima K (1989) Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 68(1):31-6

61. Laskin DL, Weinberger B, Laskin JD (2001) Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J Leukoc Biol* 70(2):163-70
62. Le Bitoux MA, Stamenkovic I (2008) Tumor-host interactions: the role of inflammation. *Histochem Cell Biol* 130(6):1079-90
63. Lehnert T, Golling M (2001) Indications and outcome of liver metastases resection. *Radiologe* 41(1):40-8
64. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK (2003) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170(6):3369-76
65. Li A, Varney ML, Singh RK (2001) Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* 7(10):3298-304
66. Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK (2005) Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis* 8(1):63-71
67. Liu G (2005) Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 15(1):24-7
68. Liu LX, Zhang WH, Jiang HC (2003) Current treatment for liver metastases from colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 9(2):193-200
69. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor super-families: integrating mammalian biology. *Cell* 104(4):487-501
70. Lu H, Ouyang W, Huag C (2006) Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Mol Cancer Res* 4(4):221-233
71. Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M (1997) Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 151(4):1105-13
72. Lunevicius R, Nakanishi H, Ito S, Kozaki K, Kato T, Tatematsu M, Yasui K (2001) Clinicopathological significance of fibrotic capsule formation around liver metastasis from colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 127(3):193-9

73. Malafosse R, Penna C, Sa Cunha A, Nordlinger B (2001) Surgical management of hepatic metastases from colorectal malignancies. *Ann Oncol* 12(7):887-94
74. Mantovani A (2009) Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* 457(7225):36-7
75. Mareel M, Kint J, Meyvisch C (1979) Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart in vitro *Virchows. Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 30(1): 95-111
76. Matsuo Y, Sawai H, Ma J, Xu D, Ochi N, Yasuda A, Takahashi H, Funahashi H, Takeyama H (2009) IL-1alpha secreted by colon cancer cells enhances angiogenesis: the relationship between IL-1alpha release and tumor cells potential for liver metastasis. *J Surg Oncol* 99(6):361-7
77. McConnell B, Yang V (2009) The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 5(2): 69-74
78. Naess O, Grünfeld TB, Beraki K, GjØen K, Flikke M, Orstavik I, Paulssen EJ, Gautvik KM (1989) Hybridization in situ. A new technic for the demonstration of viruses and gene products in histologic and cytologic specimens. *Tidsskr Nor Laegeforen* 109(2):183-5
79. Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A, Tano Y, Nakamura T (1997) Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: in vitro analysis of tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 57(15):3305-13
80. Nam NH (2006) Naturally occurring NF-kappaB inhibitors *Mini. Rev Med Chem* 6(8):945-51
81. Neumann UP, Seehofer D, Neuhaus P (2010) The surgical treatment of hepatic metastases in colorectal carcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 107(19):335-42
82. Nuzzo G, Giuliani F, Giovannini I, Tebala GD, Clemente G, Vellone M (1997) Resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 44(15):751-9

83. Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM (2004) Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 53(3):438-45
84. Ogawa M, LaRue AC, Drake CJ (2006) Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: its pathophysiologic implications. *Blood* Vol 108(9):2893-6
85. Ohira S, Sasaki M, Harada K, Sato Y, Zen Y, Isse K, Kozaka K, Ishikawa A, Oda K, Nimura Y, Nakanuma Y (2006) Possible regulation of migration of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by interaction of CXCR4 expressed in carcinoma cells with tumor necrosis factor-alpha and stromal-derived factor-1 released in stroma. *Am J Pathol* 168(4):1155-68
86. Oliveira IC, Mukaida N, Matsushima K, Vilcek J (1994) Transcriptional inhibition of the interleukin-8 gene by interferon is mediated by the NF-kappa B site. *Mol Cell Biol* 14(8):5300-8
87. Ono M (2008) Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci* 99(8): 101-1506
88. Ooi LP, Crawford DH, Gotley DC, Clouston AD, Strong RW, Gobe GC, Halliday JW, Bridle KR, Ramm GA (1997) Evidence that "myofibroblast-like" cells are the cellular source of capsular collagen in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 26(4):798-807
89. Orimo A, Weinberg RA (2006) Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 5(15):1597-601
90. Park JH, Liu L, Kim IH, Kim JH, You KR, Kim DG (2005) Identification of the genes involved in enhanced fenretinide-induced apoptosis by parthenolide in human hepatoma cells. *Cancer Res* 65(7):2804-14
91. Peeters CF, Ruers TJ, Westphal JR, de Waal RM (2005) Progressive loss of endothelial P-selectin expression with increasing malignancy in colorectal cancer. *Lab Invest* 85(2):248-56

92. Petzelbauer P, Watson CA, Pfau SE, Pober JS (1995) IL-8 and angiogenesis: evidence that human endothelial cells lack receptors and do not respond to IL-8 in vitro. *Cytokine* 7(3):267-72
93. Phillips NC (1989) Kupffer cells and liver metastasis. Optimization and limitation of activation of tumoricidal activity. *Cancer Metastasis Rev* 8(3):231-52
94. Qi W, Ding D, Salvi RJ (2008) Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures. *Hear Res* 236(1-2):52-60
95. Ramadori G, Saile B (2004) Portal tract fibrogenesis in the liver. *Laboratory Investigation* 84:153-159
96. Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A (2007) Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 256(2):137-65
97. Ramjeesingh R, Leung R, Siu CH (2003) Interleukin-8 secreted by endothelial cells induces chemotaxis of melanoma cells through the chemokine receptor. *CXCR1 FASEB J* 17(10):1292-4
98. Räsänen K, Vaheri A (2010) Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 316(17):2713-22
99. Ren Y, Cao B, Law S, Xie Y, Lee PY, Cheung L, Chen Y, Huang X, Chan HM, Zhao P, Luk J, Vande Woude G, Wong J (2005) Hepatocyte growth factor promotes cancer cell migration and angiogenic factors expression: a prognostic marker of human esophageal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 11(17):6190-7
100. Rhim JH, Kim SA, Lee JE, Kim DJ, Chung HK, Shin KJ, Chung J (2008) Cancer cell-derived IL-1alpha induces IL-8 release in endothelial cells. *Cancer Res Clin Oncol* 34(1):45-50
101. Ria R, Reale A, Castrovilli A, Mangialardi G, Dammacco F, Ribatti D, Vacca A (2010) Angiogenesis and progression in human melanoma. *Dermatol Res Pract* 185687:Epub 2010 Jun 6
102. Riede UN, Schaefer HE, Werner M (2004) *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 4. Auflage Thieme Verlag Stuttgart, 207ff, 373ff, 777

103. Robinson-Smith TM, Isaacsohn I, Mercer CA, Zhou M, Van Rooijen N, Hussein-zadeh N, McFarland-Mancini MM, Drew AF (2007) Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer Res* 67(12):5708-16
104. Roitt IM, Brostoff J, Male DK (1995) *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, 3. Aufl. Thieme Verlag Stuttgart, 97ff
105. Rudmik LR, Magliocco AM (2005) Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 92(4):347-59
106. Sakamoto S, Okanou T, Itoh Y, Nakagawa Y, Nakamura H, Morita A, Daimon Y, Sakamoto K, Yoshida N, Yoshikawa T, Kashima K (2003) Involvement of Kupffer cells in the interaction between neutrophils and sinusoidal endothelial cells in rats. *Shock* 19(4):394-5
107. Scheele J, Altendorf-Hofman A, Stangl R, Schmidt K (1996) Chirurgische Resektion kolorektaler Lebermetastasen: Goldstandard für solitäre und radikal resektable Herde. *Swiss Surg* 4:4-174
108. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J (2010) Chronic Inflammation: A Common and Important Factor in the Pathogenesis of Neoplasia. *Cancer J Clin* 56: 69-83
109. Seki E, de Minicis S, Inokuchi S, Taura K, Miyai K, van Rooijen N, Schwabe RF, Brenner DA (2009) CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 50(1):185-97
110. Sharma S, Camci C, Jabbour N (2008) Management of hepatic metastasis from colorectal cancers: an update. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 15(6):570-80
111. Shimizu S, Yamada N, Sawada T, Ikeda K, Kawada N, Seki S, Kaneda K, Hirakawa K (2000) In vivo and in vitro interactions between human colon carcinoma cells and hepatic stellate cells. *Jpn J Cancer Res* 91(12):1285-95
112. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ (1994) Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res* 54(12):3242-7

113. Singh RK, Varney ML (2000) IL-8 expression in malignant melanoma: implications in growth and metastasis. *Histol Histopathol* 15(3):843-9
114. Singh RK, Varney ML, Bucana CD, Johansson SL (1999) Expression of interleukin-8 in primary and metastatic malignant melanoma of the skin. *Melanoma Res* 9(4):383-7
115. Solaun MS, Mendoza L, De Luca M, Gutierrez V, López MP, Olaso E, Lee Sim BK, Vidal-Vanaeloch F (2002) Endostatin inhibits murine colon carcinoma sinusoidal-type metastases by preferential targeting of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 35(5):1104-16
116. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Han W, Sadikot RT, Yull FE, Blackwell TS, Fingleton B (2008) Host nuclear factor-kappaB activation potentiates lung cancer metastasis. *Mol Cancer Res* 6(3):364-7
117. Tsai WH, Hsu HC, Lin CC, Ho CK, Kou YR (2007) Role of interleukin-8 and growth-regulated oncogene-alpha in the chemotactic migration of all-trans retinoic acid-treated promyelocytic leukemic cells toward alveolar epithelial cells. *Crit Care Med* 35(3):879-85
118. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M (2007) Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 13(7):2082-90
119. Uribarrena-Amezaga R, Ortego J, Fuentes J, Raventós N, Parra P, Uribarrena-Echevarría R (2010) Prognostic value of lymph node micrometastasis in patients with colorectal cancer in Dukes stages A and B (T1-T4, N0, M0). *Rev Esp Enferm Dig* 102(3):176-8:176-8
120. Voura EB, Sandig M, Siu CH (1998) Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells. *Microsc Res Tech* 43(3):265-75
121. Wang W, Adachi M, Kawamura R, Sakamoto H, Hayashi T, Ishida T, Imai K, Shinomura Y (2006) Parthenolide-induced apoptosis in multiple myeloma cells involves reactive oxygen species generation and cell sensitivity depends on catalase activity. *Apoptosis* 11(12):2225-35

122. Wang W, Adachi M, Zhang R, Zhou J, Zhu D (2009) A novel combination therapy with arsenic trioxide and parthenolide against pancreatic cancer cells. *Pancreas* 38(4):e114-23
123. Wang X, Lin Y (2008) Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?. *Acta Pharmacol Sin* 29(11):1275-88
124. Waugh DJ, Wilson C (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14(21):6735-41
125. Welch DR, Steeg PS, Rinker-Schaeffer CW (2000) Molecular biology of breast cancer metastasis Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Res* 2:408-416
126. Wright JA, Turley EA, Greenberg AH. (1993) Transforming growth factor beta and fibroblast growth factor as promoters of tumor progression to malignancy. *Crit Rev Oncog* 4(5):473-92
127. Xing F, Saidou J, Watabe K (2010) Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci* 15:166-79
128. Yang Y, Lu S, Li MF, Wang ZH (2009) Effects of tumor metastasis suppressor gene nm23-H1 on invasion and proliferation of cervical cancer cell lines. *Ai Zheng* 28(7):702-7
129. Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M, Matsushima K (1992) Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem* 267(31):22506-11
130. Ye SR, Yang H, Li K, Dong DD, Lin XM, Yie SM (2007) Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Mod Pathol* 20(3):375-8
131. Zins K, Abraham D, Sioud M, Aharinejad S (2007) Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. *Cancer Res* 67(3):1038-45

-
132. Zunino SJ, Ducore JM, Storms DH (2007) Parthenolide induces significant apoptosis and production of reactive oxygen species in high-risk pre-B leukemia cells. *Cancer Lett* 254(1):119-27

8. Anhang

8.1 Bezugsquellenverzeichnis

8.1.1 Lösungen und Puffer

1% Agarosegel:

2 g Agarose + 176 ml H₂O + 20 ml Formaldehyd + 24 ml 10fach RB + 5 µl Ethidiumbromid

2% Agarosegel:

5 g Agarose + 250 ml 1fach TBE- Puffer + 10 µl Ethidiumbromid

10fach RNA Running Buffer (RB):

200mM MOPS + 50mM Natriumacetat + 10mM EDTA + Aqua dest.

20fach SSC:

3M NaCl + 0,3M Trinatriumcitrat + Aqua dest.

2fach Waschpuffer:

0,25 g SDS + 25 ml 20fach SSC + Aqua dest.

0,5fach Waschpuffer:

0,25 g SDS + 6,25 ml 20fach SSC + Aqua dest.

8.1.2 Primer und Zelllinien

Die folgenden Primer wurden benutzt:

IL-8: Sequenz Forward Primer: 17-CTTTCAGAGACAGCAGAGCAC
 Sequenz Reverse Primer: 972-ACTGTGAGGTAAGATGGTGGC

GAPDH: Sequenz Forward Primer: 81-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
 Sequenz Reverse Primer: 306-GAAGATGGTGATGGGATTTC

Die Primer wurden von MWG-biotechnisch (Ebersberg, Deutschland)

Die folgenden Zelllinien wurden benutzt:

DLD-1/ Colo-678-Kolonkarzinomzellen: DSMZ; Braunschweig; Deutschland

HuH7: JCRB-Zellbank; Tokyo; Japan

HUVEC: Kaskade Biologics; Mansfield; Vereinigtes Königreich

8.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Geräte

Chemikalien und Reagenzien:

Baxter GmbH (S.A.; B-7860 Lessines):

Aqua ad injectabilia

Biesterfeld Chemiedistribution GmbH (Hamburg; Deutschland):

Aceton

DAKO (Glostrup; Dänemark):

CD45 (1/50, clone T29/33), Laminin (1/25, clone 4C7) DAKO® Biotin Blocking System, Cytomation EnVision®+System-HRP

Invitrogen (Grand Island; N.Y.; USA):

Agarose, Medium 199, fetales bovines Serum (FBS), antibiotisch-antimykotische Lösung: Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B, Ethylendiaminotetraacetat (EDTA), Sodium salt citrat (SSC) 20x, Trypsin, PBS (14190)

Merck (Darmstadt; Marienfeld Glassware; Lauda-Königshofen; Deutschland):

Aquatec, Ethanol 70%, Ethidiumbromid

Pierce Endogen (Rockford; USA):

Human IL-8 ELISA-Kit

QIAGEN (Hilden; Deutschland):

RNeasy Midi Kit, RNeasy Mini Kit

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim; Deutschland):

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

Sakura Finetek (Zoeterwoude; Niederlande):

Tissue Tek ®

Sigma (Steinheim; Deutschland):

GBSS G-9779, BSA (high quality), Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)
β-Mercaptoethanol, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Formaldehyd, Meyers Hematoxylin
Solution (HHS16), humaner TNF-α (50 ng/ml), Tris-EDTA Puffer, RNase-freies
Wasser, Kollagenase Type IV

Serotec (Oxford; UK):

IL-8 (1/50, clone B-K8)

Vector Laboratories (Burlingame; CA; USA):

Normal Goat Serum, Vectastain®ABCAP Kit

Geräte:

Mikroskop: Zeiss; Oberkochen; Deutschland

Rotana/ RP-Zentrifuge: Firma Hettich; Tuttlingen; Deutschland

Photometer: Uvette®; Eppendorf; Deutschland

Thermocycler: Biometra; Biomedizinische Analytik GmbH; Göttingen; Deutschland

Hybridisierungssofen: Amersham Pharmacia; Biotech Europe GmbH; Chalfont; GB

UV-Crosslinker: Hoefer TM; UVC 500 UVCrosslinker; Amersham Biosciences
Europe GmbH; Little Chalfont; GB

Kryostaten: Mikrothom HM MIKROTOM HM 505E; Richard Allen Scientific; Kalama-
zoo; USA

8.2 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Technik	Avidin-Biotinylated Enzyme Complex-Technik
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
Aqua dest.	destilliertes Wasser
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CAM	cell adhesion molecule
CCR	Chemokinrezeptor
CD45	Leukocyte Common Antigen
CD-L	Cluster of Differentiation-Ligand
cDNA	komplementäre DNA
CNT	counts
Colo-678	Kolonkarzinomzelllinie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DLD-1	Kolonkarzinomzelllinie
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleid Acid
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EBV	Epstein-Barr Virus
EZM	Extrazellulärmatrrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAS-L	FAS-Ligand
FBS	fetales bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBSS	Gays Balanced Salt Solution
HCV	Hepatitis C Virus
HGF	hepatocyte growth factor
HLA	human leucocyte antigen

HPV	humanes Papillomavirus
HSC	hepatische Sternzellen
HuH7	human hepatoma cell line
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HYBR	Hybridization
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-8-R	Interleukin-8 Rezeptor
kDa	kiloDalton
LF	Leberfibroblasten
KM	konditioniertes Medium
MCP	monocyte chemoattractant protein
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP	matrix metalloproteinases
mRNA	messenger RNA
mTNF	membrane tumor necrosis factor
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NK-kB	nuclear factor kappa
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PTL	Parthenolid
RB	Running Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
S.E.	Standardabweichung
SDF-1	stromal cell-derived factor
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SSC	Sodium Salt Citrate
sTNF	soluble tumor necrosis factor

TAF	tumorstromaassoziierte Fibroblasten
TGF- β	transforming growth factor-beta
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R	TNF-Rezeptor
UV	ultraviolett
VCAM	vascular cell adhesion molecule

9. Danksagung

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Dr. h.c. X. Rogiers für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie der Universität Hamburg. Bei Herrn PD Dr. med. Lutz Fischer bedanke ich mich für die Möglichkeit des Abschlusses der Promotion und die Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. med. Lars Müller für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die Zeit, die er sich genommen hat, um viele konstruktive Anregungen zu geben und die Arbeit durchzusehen. Er war stets verfügbar und trug insbesondere mit seiner Geduld wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Zudem gebührt mein spezieller Dank Frau Silke Brilloff, die mir in schwierigen Situationen immer mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne deren Unterstützung vieles nicht möglich gewesen wäre.

Besonders erwähnenswert ist die hervorragende Hilfeleistung, die ich durch die Mitarbeiter des chirurgischen Forschungslabors erfahren durfte und die mir tatkräftig geholfen haben. Ein persönlicher Dank gilt Frau Sigrid Himpel für ihr Engagement.

Meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Mutter für die vielfältige Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit sowie beim Korrekturlesen ganz herzlich bedanken.

10. Lebenslauf

- Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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 einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: