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

# Charakterisierung von Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten und deren Beteiligung an pro-inflammatorischen Mechanismen im Rahmen der hepatischen Metastasierung des kolorektalen Karzinoms

**Dissertation**
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Lena von Seggern
aus Hamburg

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 21.11.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Lutz Fischer
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. med. Andreas Block
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. med. Lars Müller

# Inhaltsverzeichnis


1. Arbeitshypothese und Fragestellung ..... 3
2. Einleitung ..... 4
   2.1 Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms ..... 4
   2.2 Metastasierung und Inflammation ..... 4
   2.3 Bedeutung der Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten ..... 6
   2.4 Zytokin-Chemokin-Netzwerk: Bedeutung bei Tumorprogression und Metastasierung ..... 6
      2.4.1 Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle ..... 7
      2.4.2 Wachstumsfaktoren ..... 8
      2.4.3 Der NF-kappaB-Pathway und seine Inhibitoren Parthenolide und Helenalin ..... 9
3. Materialien und Methoden ..... 12
   3.1 Materialien ..... 12
   3.2 Gewebeproben ..... 12
   3.3 Gewebeaufbereitung ..... 13
   3.4 Immunhistochemie ..... 13
      3.4.1 Immunhistochemische Färbungen ..... 13
      3.4.2 Anfertigen der Schnitte ..... 13
      3.4.3 TNF-α Paraffin-Schnitte und EnVision ..... 14
      3.4.4 MCP-1 Kryoschnitte ABC-AP-Methode ..... 15
   3.5 Fibroblastenkulturen ..... 16
      3.5.1 Anlegen der Zellkultur und Kultivierung ..... 16
      3.5.2 Passagierung der Zellkulturen ..... 17
      3.5.3 Stimulationsversuche ..... 17
   3.6 RNA-Isolierung ..... 19
      3.6.1 Allgemeines Vorgehen ..... 19
      3.6.2 RNA-Isolierung aus Gewebeproben ..... 19
      3.6.3 RNA-Isolierung aus Zellkulturen ..... 20
      3.6.4 Photometrische Messung ..... 21
   3.7 mRNA-Nachweismethoden ..... 21
      3.7.1 Allgemein ..... 21
      3.7.2 Herstellung von DIG-markierten Sonden ..... 21
      3.7.3 Northern Blot ..... 24
      3.7.4 Hybridisierung und Detektion ..... 25
   3.8 Bead-Array ..... 27
   3.9 Statistik ..... 28
4. Ergebnisse ..... 29
   4.1 Immunhistochemischer Nachweis von TNF-α und MCP-1 ..... 29
   4.2 Expression von IL-6, MCP-1 und ICAM-1 in kolorektalen Lebermetastasen ..... 31
   4.3 Stimulationsversuche der TAFs in Zellkulturen ..... 33
      4.3.1 Wachstumsverhalten und Morphologie der TAF und LF ..... 33
      4.3.2 Expression von IL-6 und MCP-1 ..... 34
      4.3.3 Expression von ICAM-1 ..... 38
      4.3.4 GAPDH ..... 39
   4.4 Expressionsmuster nach Inhibition durch Sesquiterpenlaktone ..... 40

4.4.1 Parthenolide und Helenalin hemmen die Expression von IL-6 und MCP-1 ..... 40
5. Diskussion ..... 44
6. Zusammenfassung ..... 51
7. Literaturverzeichnis ..... 52
8. Bezugsquellenverzeichnis ..... 62
8.1 Reagenzien ..... 62
8.2 Verwendete Primer ..... 66
8.3 Lösungen und Puffer ..... 67
8.4 Gefässe und Zubehör ..... 69
8.5 Geräte ..... 71
9. Abkürzungsverzeichnis ..... 73
10. Abbildungungsverzeichnis ..... 75
11. Danksagung ..... 77
12. Lebenslauf ..... 78
13. Erklärung ..... 79

# 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Entstehung und Ansiedelung von Metastasen ist ein komplexes Geschehen, an dem verschiedenste Gewebe und Zellen beteiligt sind. Tumorstroma-assoziierte-Fibroblasten (TAF) spielen eine wichtige Rolle bei der Progression und Metastasierung von Karzinomen, indem sie die Angiogenese und Inflammation fördern und Substanzen exprimieren, die Tumorzellwachstum fördern. In Bezug auf Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms sind TAF jedoch relativ unerforscht. Uns interessiert insbesondere die Beteiligung der TAF in der Entstehung einer peritumoralen Entzündungsantwort bei kolorektalen Lebermetastasen.

Hierzu erfolgen anhand einer Stichprobe von 11 Patienten an Gewebeproben und daraus isolierten Fibroblastenkulturen Charakterisierungen zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine (IL-6, MCP-1) sowie Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) auf Gen- als auch auf Protein-Ebene.

Dabei wurden im Zuge des Projekts folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Gibt es Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Tumorgewebe und vom Tumor entferntem Lebergewebe?
- Lassen sich TNF- α und MCP-1 in kolorektalen Lebermetastasen immunhistochemisch nachweisen, in welchen Zellen gelingt der Nachweis?
- Bestehen Zusammenhänge oder Korrelationen in der Expression der einzelnen Faktoren IL-6, MCP-1 und ICAM-1?
- Induzieren TNF-α und andere ausgewählte Wachstumsfaktoren eine Expression von IL-6, MCP-1 und ICAM-1 in Fibroblastenkulturen?
- Hemmen NF-kappaB-Inhibitoren (Parthenolide und Helenalin) die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen?

# 2. Einleitung

## 2.1 Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms

In Deutschland stellt das kolorektale Karzinom die zweithäufigste maligne Erkrankung und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache dar (Robert-Koch-Institut, 2006). Die Mehrheit der Todesfälle ist dabei dem Vorhandensein von Lebermetastasen zuzuschreiben, da diese maßgeblich über die Prognose entscheiden (Rudmik et al. 2005). Die Fernmetastasen des kolorektalen Karzinoms finden sich klassischerweise in der Leber, bei 14-25 % der Patienten sind Lebermetastasen bereits synchron mit dem Primärtumor manifest (Hughes et al. 1990) und bei 50 Prozent aller Patienten mit kolorektalen Karzinomen werden im Laufe ihrer Erkrankung Lebermetastasen nachgewiesen (Geoghegan et al. 1999). Die Entstehung von Lebermetastasen wird dabei zunächst von regional-anatomischen Verhältnissen beeinflusst, da die Leber bei der hämatogenen Metastasierung über die Pfortader gewissermaßen als „Filterstation“ fungiert. Auf zellulärer und molekularer Ebene erscheint die Metastasierung als ein hochselektiver Prozess, so weiß man, dass neben der Mikroarchitektur auch die zellulären Komponenten der Leber ein günstiges Milieu für die Adhäsion von Tumorzellen und die Ausbildung von Metastasen darstellen (Fidler 2002). Welche Mechanismen bei der hepatischen Metastasierung letztlich entscheidend sind und welche möglichen Therapieansätze sich daraus erschließen, ist weiterhin Thema der aktuellen Krebsforschung.

## 2.2 Metastasierung und Inflammation

Die Vorstellungen von Tumorentstehung und Metastasierung mussten im Laufe der Jahre ständig korrigiert werden (Hanna et al. 2008). Grund ist die zunehmend besser verstandene Interaktion zwischen Tumor und dem Tumorstroma, in dem sich die Tumorzellen ansiedeln. Die traditionelle „seed and soil“ Hypothese, 1889 von Stephen Paget hervor gebracht, beschrieb zuerst die wichtige Beziehung zwischen der Tumorzelle, der „Saat“ (engl. seed)

und dem umgebenden Tumorstroma der Sekundärlesion, dem „Acker“ (engl. soil) (Paget 1889). Diese Theorie kann weiterhin als aktuell angesehen werden, insbesondere durch die modernen Technologien konnten mittlerweile vielfältige Moleküle und Signalwege identifiziert werden, die mit Organ-spezifischen Metastasen korrelieren und so die „seed and soil“ Theorie unterstützen (Fokas et al. 2007). Heutzutage werden Tumoren als komplexe Gewebe verstanden, in denen zahlreiche Komponenten, zusammengefasst als „microenvironment“ (Tumorstroma) eine entscheidende Rolle spielen. Dazu gehören Entzündungszellen, Blutgefäße, Fibroblasten und extrazelluläre Matrixbestandteile (Pérez-Moreno 2009). Eine Fernmetastase ist letztlich das Ergebnis eines komplexen mehrschrittigen Prozesses, resultierend aus Interaktionen zwischen Tumorzellen und Gastgewebe (Fidler 2002; Craig u. Loberg 2006). Grundlegende Bestandteile der Metastasierungskaskade sind Auswanderung des Primärtumors und Intravasation, Zirkulation in der Blutbahn, Extravasation am Zielort, schließlich Angiogenese und Wachstum im Zielgewebe (Rudmik u. Magliocco 2005).

Betrachtet man das Verhalten von Immunzellen und anderen beteiligten Zellen im Rahmen der Metastasierung bestehen deutliche Parallelen zu Entzündung und Wundheilung (Aggarwal et al. 2006; Meyer u. Hart 1998). Es konnte auch bewiesen werden, dass gleiche inflammatorische Komponenten bei der Metastasierung beteiligt sind, wie Zell-Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1), Zytokine, Cadherine, Integrine, Selektine, Matrix-Metallo-Proteinasen und proteolytische Enzyme (Meyer u. Hart 1998). Diese inflammatorischen Signale wirken sowohl auf die Tumorzellen als auch auf das Tumorstroma und regulieren Adhärenz der Tumorzellen, Tumorwachstum, Angiogenese und Neuordnung des umgebenden Stromas (Bird et al. 2006; Raman et al. 2007). Experimentelle Studien mit Mausmodellen belegten, dass Inflammation, getriggert durch TNF-α, eine entscheidende Rolle bei der Metastasierungskaskade von kolorektalen Lebermetastasen spielt (Kitakata et al. 2002; Khatib et al. 2005).

## 2.3 Bedeutung der Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten

Tumorstroma-assoziierte-Fibroblasten (TAF) bilden den hauptsächlichen Bestandteil des desmoplasmatischen Tumorstromas von soliden Tumoren und ihrer Metastasen, so auch bei Lebermetastasen (Desmoulière et al. 2004). Es handelt sich dabei um aktivierte Fibroblasten, die üblicherweise Glattmuskel-Filamente (engl. α-smooth muscle actin) exprimieren (Mueller u Fusenig 2004). Bisher sind Ursprung und Aufgabe der Tumorstroma-assoziierten-Fibroblasten (TAFs) aber noch nicht vollständig aufgeklärt (Desmoulière et al. 2004). Hinsichtlich der TAF aus kolorektalen Lebermetastasen werden verschiedene Annahmen diskutiert: 1. TAF differenzieren sich aus hepatischen Sternzellen oder / und 2. aus portalen Myofibroblasten. Normalerweise finden sich in der Leber selbst praktisch keine Myofibroblasten, sie lassen sich vielmehr durch die Aktivierung von Präkursorzellen herleiten. Über eine längere Zeit war die These führend, dass die gut untersuchten hepatischen Sternzellen, die sich perisinusoidal finden, als Ursprung dienten (Reeves und Friedman, 2002), so stellen neuere Untersuchungen die periportalen Fibroblasten, basierend auf ihrem Expressionsprofil, auch als Ursprungsort für die Leberfibrose in den Vordergrund (Tuchweber et al. 1996).

Bekannt ist, dass ihre Produktion von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Extrazellulären-Matrix-Proteinen eine Förderung der Angiogenese bewirkt (Kalluri u. Zeisberg 2006). Studienergebnisse weisen darauf hin, dass vom Tumor freigesetzte Wachstumsfaktoren wie TGF-β und PDGF an der Rekrutierung und Aktivierung von TAF beteiligt sind (Elenbaas u. Weinberg 2001; Desmoulière et al. 2004). Es wird also zunehmend deutlich, dass TAF eine Schlüsselrolle in der Progression von malignen Tumoren spielen und so ein wichtiges Ziel für Therapiezwecke darstellen (Kalluri u. Zeisberg 2006).

## 2.4 Zytokin-Chemokin-Netzwerk: Bedeutung bei Tumorprogression und Metastasierung

### 2.4.1 Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle

**Tumor necrosis factor-α (TNF-α)** ist ein zentrales pro-inflammatorisches Zytokin, es wird hauptsächlich von aktivierten Monozyten / Makrophagen gebildet und freigesetzt, jedoch auch durch eine große Anzahl anderer Zellen wie Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen und Fibroblasten.

Im Rahmen von Entzündungsprozessen induziert TNF-α die Expression von Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6), Chemokinen z.B. MCP-1 und Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (Banno et al. 2005).

Das Zytokin **Interleukin-6 (IL-6)** wird insbesondere von T-Zellen, Monozyten und Fibroblasten gebildet. Als Akute-Phase-Protein reguliert es verschiedene Aspekte der Immunantwort durch Aktivierung von Leukozyten, insbesondere von B-Lymphozyten, wirkt aber auch auf verschiedenste andere Zellen (Sehgal et al 1995; Rose-John et al 2006). Studienergebnisse legen nahe, dass IL-6 auch eine Rolle bei der Tumorprogression spielt (Hong et al. 2007). Chung und Chang wiesen eine positive Korrelation zwischen hoher Serumkonzentration von IL-6 und fortgeschrittenem Krankheitsstadium beim kolorektalen Karzinom nach (Chung u. Chang 2003). Auch beim Magenkarzinom korrelierte IL-6 mit Tumorstadium und Metastasierung (Ashizawa et al. 2005).

**Monocyte chemoattracting protein-1 (MCP-1)** ist ein lösliches Chemokin der CC-Chemokine, das chemotaktisch auf Monozyten und T-Lymphozyten wirkt (Carr et al. 1994; Proost et al. 1996). Die Expresssion von MCP-1 und resultierende Infiltration mit Makrophagen sind assoziiert mit Tumorprogression und Neovaskularisation beim Melanom (Koga et al. 2008), Mammakarzinom (Saji et al. 2001), Prostatakarzinom (Lu et al. 2006) und Magenkarzinom (Kuroda 2005). Bei in vitro-Studien mit Tumorzellreihen des kolorektalen Karzinoms nahm die Akkumulation von Makrophagen mit zunehmendem Tumorstadium zu, und korrelierte mit der Expression von MCP-1 (Bailey et al. 2007). In normalem Lebergewebe wird MCP-1 mäßig exprimiert, in Leberbiopsien von inflammatorischem Gewebe wie bei chronischer Hepatitis und aktiver Leberzirrhose konnte MCP-1 jedoch stark hochreguliert gemessen werden (Marra et al 1998).

**Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)** gehört als Adhäsionsmolekül zu der Immunglobulin-Superfamilie und reguliert wichtige Zell-Zell und Zell-Matrix

Interaktionen (Staunton et al. 1988), sowohl im Rahmen von Inflammation, aber auch bei Metastasierung. Es wurde z.B. gezeigt, dass ICAM-1 ein Marker für die Progression beim maligen Melanom ist (Natali et al. 1990). Die Konzentration von löslichem ICAM-1 im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom war in Studien deutlich höher als in der gesunden Kontrollgruppe und korrelierte mit fortgeschrittenem Tumorstadium (Sánchez-Rovira et al.1998).
Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF-α die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen triggern. Und das führt zu vermehrter Adhäsion von kolorektalen Tumorzellen, und somit zu verstärkter Metastasierung (Gangopadhyay et al. 1998). Es gibt aber auch gegenteilige Beschreibungen in der Literatur, so beobachteten Tachimory et al, dass ICAM-1 die Metastasierung vom kolorektalen Karzinom im Tiermodell hemmt (Tachimori et al. 2005).

### 2.4.2 Wachstumsfaktoren

Vielfältige Faktoren haben Einfluss auf das beschriebene Zytokin-Chemokin-Netzwerk, als Wachstumsfaktoren werden dabei Proteine bezeichnet, die insbesondere Zellproliferation und Zelldifferentiation beeinflussen. Im Folgenden werden die Charakteristika der in der vorliegenden Arbeit zur Stimulation verwendeten Faktoren genannt:
Der **Transforming Growth Factor (TGF)** gehört zu den Zytokinen und wirkt u.a. auf Tumorstroma-assoziierte-Fibroblasten (Pardali et al. 2007). Die Stimulation von Fibroblasten mit TGF-β bewirkt in experimentellen Versuchen eine deutliche Zunahme der Epression von MCP-1 (Slavin et al. 1995). TGF-β gilt einerseits als Tumorsuppressor bei frühen Tumorstadien, im weiteren Verlauf der Tumorerkrankung bewirkt TGF-β allerdings Tumorprogression, Invasivität und Metastasierung (Derynck et al. 2001; Roberts u. Wakefield 2003). Besonders TGF-β1 scheint bei verschiedenen soliden Tumoren hochreguliert zu sein und steht so im Zentrum der Aufmerksamkeit (Dickson et al. 1987; Derynck et al. 1987).
Der **Platelet-derived growth factor (PDGF)** spielt physiologischerweise eine Rolle bei der Embryogenese, Zellproliferation, Zellmigration, Wundheilung und insbesondere bei der Angiogenese. PDGF wird mit verschiedenen Krankheiten wie Atherosklerose und Fibrose in Verbindung gebracht, sowie in der

Krebsforschung intensiv untersucht, da vermutlich die Überproduktion von PDGF Tumorwachstum stimuliert (Heldin et al.1999), jedenfalls wird PDGF von Tumorzellen produziert und korreliert mit Tumorprogression (Bronzert et al. 1987).

Das Signalmolekül **Epidermal Growth Factor (EGF)** stimuliert die Ausbildung einer Reihe von Zelltypen über Aktivierung seines spezifischen Rezeptors EGFR (engl. Epidermal growth factor receptor), einer Tyrosinkinase. Der zentrale Pathway ist hierbei der Ras/Raf/MEK/ERK-Pathway. Der EGF-Pathway wird seit Jahrzehnten mit Zellwachstum, Invasion, Angiogenese und Metastasierung in Verbindung gebracht und intensiv untersucht (Normanno et al. 2006). In klinischen Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen EGFR bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom wurde eine signifikante Wirksamkeit bewiesen (Cunningham et al. 2004). Mittlerweile ist der Tyrosinkinaserezeptor-Inhibitor Cetuximab seit 2004 beim metastasierten kolorektalen Karzinom zugelassen (Humblet 2004). Der vollständig humane Antikörper gegen EGFR Panitumumab ist in der EU seit 2007 als Monotherapie zugelassen zur Behandlung des metastasierten, EGFR-exprimierenden kolorektalen Karzinoms mit nicht-mutiertem (Wildtyp) *KRAS*-Gen bei Patienten, bei denen Fluoropyrimidin-, Oxaliplatin- und Irinotecan-haltige Chemotherapieregime versagt haben (Gibson et al. 2006). Ein klinisch bedeutsamer Punkt ist, dass Tumoren mit mutiertem *KRAS*-Gen jedoch nicht auf eine Anti-EGFR-Therapie wie mit Panitumumab ansprechen (Amado et al. 2008).

### 2.4.3 Der NF-kappaB-Pathway und seine Inhibitoren Parthenolide und Helenalin

Der oben bereits erwähnte Transkriptionsfaktor Nuclear Factor-kappaB (NFκB) kontrolliert die Expression von Genen für pro-inflammatorische Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Wachstumsfaktoren und andere inflammatorische Mediatoren (Nam 2006; Pahl 1999). In den meisten Zelltypen liegt NF-κB als Homo- oder Heterodimer im Zytoplasma vor, zusammengesetzt aus den Untereinheiten p50 und p65. (Karin et al. 2000). Durch die Bindung von inhibitorischen κB-Proteinen (IκBα) ist NF-κB zunächst inaktiv. Stimulation

durch pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF-α oder IL-1β, aber auch verschiedene andere Stimuli führen zu einer Aktivierung, auf dessen Endstrecke die IκBα-Proteine phosphoryliert, ubiquitinyliert und abgebaut werden. Die nun aktiven NF-κB-Moleküle gelangen in den Zellkern und binden an bestimmte Promotorregionen (Karin et al. 2000). So führt TNF-α z. B. über die Aktivierung von NF-κB zu einer verstärkten Expression von ICAM-1 (Holdon et al. 2004). Der NF-κß Pathway ist also ein zentraler Signalweg bei der Aktivierung von Zellen im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens (Barnes und Karin 1997; Holdon et al. 2004) und mittlerweile auch bekannt als wichtiges Stellglied bei malignen Prozessen und Metastasierung (Mauro et al 2009). Es wurde gezeigt, dass NF-κB in verschiedenen malignen Tumoren, wie Leukämie und Lymphomen (Stoffel 2005), Mammakarzinom (Nakshatri et al. 1997), Prostatakarzinom (Lindholm et al. 2000) Melanom (Dhawan et al. 2002), Adenokarzinom des Pankreas (Wang 1999) und auch kolorektalen Tumoren (Lind 2001) konstitutiv aktiviert ist (Oka et al. 2007).

Mittlerweile wurde eine Vielzahl verschiedener Inhibitoren des NF-κB-Pathways identifiziert (Nam 2006), wobei die genauen molekularen Mechanismen noch nicht vollständig bekannt sind. Parthenolide und Helenalin sind natürlich vorkommende Substanzen, die zu der Gruppe der Sesquiterpen-Laktone gehören (Rüngeler et al. 1999). Parthenolide wurden ursprünglich in der Volksmedizin bei Migraine, Fieber und Arthritis eingesetzt (Oka et al. 2007; Brown et al. 1997), man verwendete dazu Extrakte der Pflanze Mutterkraut (engl. Fewerfew; lat.: Tanacetum parthenium), die als Wirkstoff Parthenolide enthalten (Macias et al. 1999). Aktuelle Studien bekräftigen den anti-inflammatorischen Effekt von Parthenoliden, bei Atherosklerose beispielsweise beobachtete man im Tiermodell unter Gabe von Parthenoliden eine Verkleinerung der Plaques bei gleichzeitig reduzierter Expression von MCP-1 (Lopez-Franco et al. 2006). Es mehren sich zudem Hinweise auf anti-tumoröse Eigenschaften, so sind Parthenolide in vitro potente Inhibitoren von DNA-Synthese und Zellproliferation bei verschiedenen Tumorzellreihen (Woynarowski et al. 1981; Hall et al. 1988; Ross et al. 1999, Wen et al. 2002). Patel et al. berichteten, dass Parthenolide mittels NF-κB-Inhibition bestimmte Zellreihen des Mammakarzinoms für das Chemotherapeutikum Paclitaxel

sensibilisieren (Patel et al. 2000). Auch beim UVB-induzierten Hautkrebs konnte sowohl in vitro (Zellkultur) als auch in vivo (Mausmodell) ein wachstumshemmender Effekt unter Anwesenheit von Parthenoliden nachgewiesen werden (Won et al. 2004). Bei Tumorzellen der akuten myeloischen Leukämie (Guzman et al 2005) und Tumorzellreihen des Nierenzellkarzinoms (Oka et al. 2007) konnte auch in vivo ein deutlicher apoptotischer Effekt durch Parthenolide erzeugt werden.

Arnikablüten (lat. Arnica montana*)* enthalten als Hauptwirkstoffe insbesondere Helenalin und Dihydrohelenalin und waren bereits im Mittelalter in Europa als entzündungshemmendes Heilmittel bekannt (Lyss et al. 1998). Heute weiß man, dass Helenalin über eine direkte Modifikation des NF-κB/IκB-Komplexes wirkt, indem es die p65 Untereinheit alkyliert (Lyss et al. 1998). Schon in den 80ern beschrieben Studien einen zytotoxischen Effekt von Helenalin bei Zellreihen der lymphatischen Leukämie (Williams et al. 1988) Auch bei anderen Zellreihen wirkte Helenalin in vitro wachtumshemmend (Grippo et al. 1992). Und im Rahmen einer in vitro Studie mit einer humanen Zellreihe des kolorektalen Karzinoms (COLO 320) bewies Helenalin eine deutliche Zytotoxizität (Woerdenbag et al. 1994).

# 3. Materialien und Methoden

## 3.1 Materialien

Die verwendeten Reagenzien, Primer, die angesetzten Lösungen und Puffer, sowie Materialien, Utensilien und Geräte, sind im Bezugsquellenverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt (8. Bezugsquellenverzeichnis).

## 3.2 Gewebeproben

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben von 11 Patienten mit Lebermetastasen vom kolorektalen Karzinom untersucht. Dabei wurde Gewebe aus der Metastase, aus dem Übergangsbereich zwischen Metastase und umliegenden Lebergewebe und aus entferntem normalen Lebergewebe mit mindestens 3 cm Abstand zur Metastase entnommen.
Das Gewebe wurde nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten im Rahmen von elektiven Leberresektionen gewonnen.

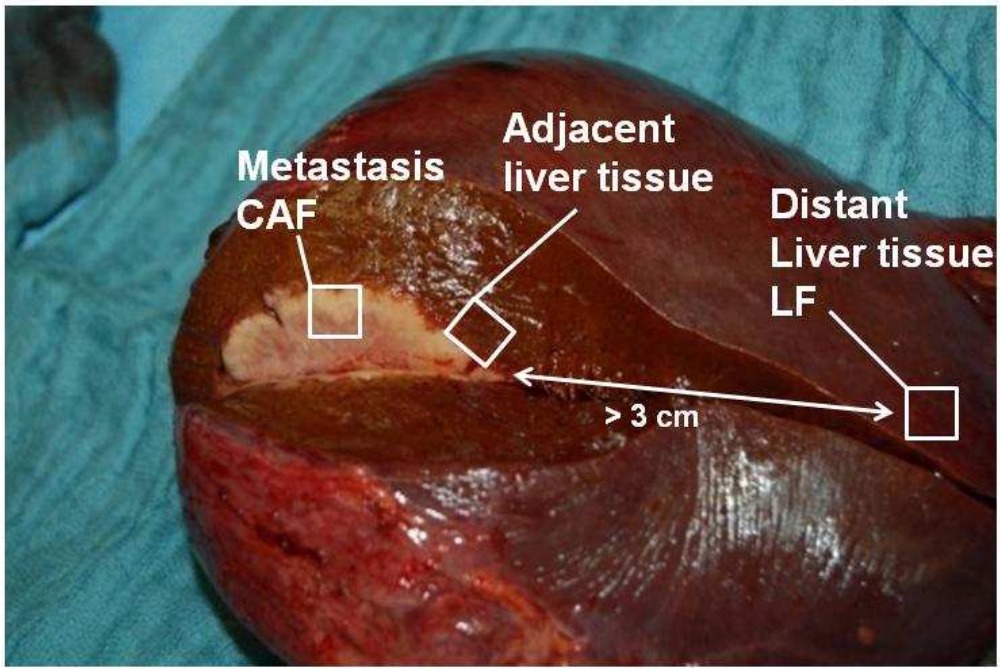



**Abbildung 1:** Operationspräparat einer Leberresektion, die kolorektale Lebermetastase ist zu Aufbereitungszwecken angeschnitten. Es wurde Gewebe aus der Metastase (Metastasis), aus angrenzendem Lebergewebe (Adjacent liver tissue) und aus entferntem normalen Lebergewebe (Distant liver tissue) entnommen. Tumorstroma-assoziierte-Fibroblasten (TAF bzw. CAF *englisch*) wurden aus dem Metastasengewebe, Leberfibroblasten (LF) aus dem gesunden entfernten Lebergewebe isoliert.

## 3.3 Gewebeaufbereitung

Für die **Immunhistochemie** wurden kleine Proben von Metastasengewebe und von entferntem Lebergewebe in Tissue-Tek® eingebettet und bei -80° C gelagert. Zusätzlich wurden Proben in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Für die Herstellung von **Fibroblastenkulturen** wurden Proben von Metastasengewebe und von entfernten normalen Lebergeweben in sterile 50 ml Falcon-Röhrchen mit Medium 199 überführt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die **mRNA-Analysen** wurden kleine Gewebeproben (ca. 0,7 $cm^3$) aus dem Metastasengewebe, von angrenzendem Lebergewebe und von gesundem Lebergewebe mit mindestens 3 cm Abstand zur Metastase benutzt. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C in sterilen NUNC-Röhrchen gelagert.

## 3.4 Immunhistochemie

### 3.4.1 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie dient dem qualitativen Nachweis und der Lokalisation von Antigenen in histologischen Gewebeschnitten. Wir fertigten Gewebeschnitte aus Metastasengewebe und aus normalem Lebergewebe an und detektierten darin den Wachstumsfaktor TNF-α und das Chemokin MCP-1.

Es wurden Methoden der indirekten immunhistologischen Färbung verwendet. Grundlage ist dabei ein für das Zielantigen spezifischer Primärantikörper, an den dann ein sogenannter Sekundärantikörper bindet, welcher wiederum mit einem Enzym gekoppelt ist. Bei Zugabe eines Substrates katalysiert das Enzym einen Farbumschlag, und zeigt somit das Antigen an.

Mit welcher Kombination aus Schnitttechnick, Färbetechnik und Vorverdünnung des Primärantikörpers sich das beste Färbeergebnis erzielen ließ, musste in Vorversuchen ermittelt werden.

### 3.4.2 Anfertigen der Schnitte

Herstellung der Gefrierschnitte: Die zu untersuchenden Gewebeproben wurden in Tissue-Tek® in Kryowells eingebettet, in flüssigem Stickstoff (-196° C) schockgefroren und bei -80° C gelagert. Die Gefrier blöcke wurden dann mit einem Kryostat bei -20° bis -26° C auf eine Schicht dicke von 5 µm geschnitten

und auf einen Glasobjektträger aufgetragen. Die angefertigten Schnitte wurden bis zur Weiterverwendung in Aufbewahrungsboxen bei -20°C gelagert.
Herstellung der Paraffinschnitte: Die Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcke wurden in 5µm dünne Gewebeschnitte geschnitten und auf Objektträger gelegt.

### 3.4.3 TNF-α Paraffin-Schnitte und EnVision

Für den qualitativen Nachweis von TNF-α in den Gewebeproben arbeiteten wir mit Paraffinschnitten.
Verwendeter monoklonaler Primärantikörper: TNF-α: Verdünnung 1:50, clone MAb11, subclass IgG1, BD Pharmingen ™, San Diego, CA, USA

Zur Farbreaktion wurde das Dako EnVision+ System- HRP (AEC) verwendet, eine Immunperoxidase-Färbung mit zwei Schritten. Dieses System basiert auf einem Anti-Maus-Sekundärantikörper, der zusammen mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) an ein Dextranpolymer gebunden ist. Das Enzym HRP katalysiert die Oxidation des Substrats AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) zu einem rötlich gefärbten Präzipitat an der Stelle des Antigens.

Durchführung: Die 5µm dünnen Paraffinschnitte wurden zunächst deparaffinisiert und in PBS-Puffer rehydriert. Um eine Demaskierung der durch die Fixation veränderten Antigene in den Gewebeschnitten zu bewirken, wurden die Schnitte für 5 Min in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte in 3% (0,03%) Wasserstoffperoxid gespült, um endogene Peroxidasen zu blocken.
Jetzt konnte der spezifische Primärantikörper aufgetragen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden. Danach wurde das mitgelieferte Peroxidasemarkierte Polymer auf die Schnitte gegeben und für 30 min inkubiert, dann wurde das gebrauchsfertige AEC+-Substratchromogenlösung auf die Präparate getropft und 10 min inkubiert. Die spezifische Umsetzung des Substrats AEC durch das Enzym HRP führte zu einer Rotfärbung
Nach Spülung mit destilliertem $H_2O$ erfolgten die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und die Bläuung der Zellkerne für 10 min unter fließendem

Leitungswasser. Die Präparate wurden in Aquatex® eingedeckt und die Färbung wurde mikroskopisch ausgewertet.
Als Negativkontrolle wurde der isotypische IgG Antikörper MOPC-21 (Sigma) eingesetzt.

Entsprechend den Anweisungen des Herstellers, erfolgte zwischen allen Arbeitsschritten ein dreimaliger Waschschritt in PBS für jeweils 5 Minuten, als Ausnahme wurde kein Waschschritt direkt vor dem Auftragen des Primärantikörpers durchgeführt.

### 3.4.4 MCP-1 Kryoschnitte ABC-AP-Methode

Für den qualitativen Nachweis von MCP-1 in den Gewebeproben arbeiteten wir mit Gefrierschnitten. Verwendeter spezifischer monoklonaler Primärantikörper: MCP-1, subclass IgG1, BD Pharmingen ™, San Diego, CA, USA

Für die immunohistochemische Färbung wurde das Vectostain® ABC-AP Kit (Avidin- / Biotin-Komplex-alkalische-Phosphatase Kitsystem) verwendet und nach Herstelleranweisung verfahren. Die Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) nutzt die starke Affinität von Avidin für Biotin zur Bildung von Komplexen aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplexen mit biotinylierten Sekundär-AK. Der biotinylierte Sekundärantikörper stellt dabei das Bindeglied zwischen Antigen-spezifischem Primärantikörper und dem Avidin-Biotin-Enzymkomplex dar, als Enzym wurde alkalische Phosphatase (AP) benutzt, das als Farbreaktion das Substrat in einen roten Farbstoff umsetzt.

Durchführung: Die kryokonservierten 5 µm dicken Gewebeschnitte wurden 15 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Sie wurden für 10 min in einer Aceton/PBS-Lösung (3:1) von 4° C fixiert und danach direkt in PBS-Puffer überführt. Die Schnitte wurden mit dem DAKO® Biotin Blocking System nach Herstelleranweisung behandelt um unspezifische Anfärbungen gegen das lebereigene Biotin und Avidin zu vermeiden. Die Schnitte wurden 10 Minuten mit einer Normalserumlösung gegen unspezifische Antikörperbindung blockiert

und der Überschuss nur abgeklopft. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C.
Der zum Kit gehörige biotinylierte Sekundärantikörper wurde 30 min inkubiert, es folgte die 30-minütige lichtgeschützte Inkubation mit der Vectastain® ABC-AP-Reagenz.

Nach Spülung mit destilliertem $H_2O$ erfolgten die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und die Bläuung der Zellkerne für 10 min unter fließendem Leitungswasser. Die Präparate wurden in Aquatex® und Deckgläsern eingedeckt und die Färbung wurde mikroskopisch ausgewertet.
Als Negativkontrolle wurde der isotypische IgG Antikörper MOPC-21 (Sigma) eingesetzt.

## 3.5 Fibroblastenkulturen

### 3.5.1 Anlegen der Zellkultur und Kultivierung

Zum Anlegen von Zellkulturen wurden die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Gewebeproben langsam aufgetaut und in 10 ml Medium überführt. Das nach einer Zentrifugation (300 g, 10 Minuten) verbleibende Zellpellet wurde in einer kleinen Menge Medium sorgfältig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 30 ml Medium auf Zellkulturplatten (145 cm² Nunclon™) pipettiert. Als Medium wurde *Dulbecos Modifies Eagle Medium* + *Glucose* + *Pyruvate* (DMEM + GlutaMAX™) mit 10% fetalem Kälberserum (FBS; Invitrogen) und 1 % antibiotisch-antimykotischer Lösung (Antibiotic-Antimycotic; Invitrogen) bestehend aus Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B verwendet. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C und einer Konzentration von 5% Kohlenstoffdioxid kultiviert.

Wachstum und Adhärenz wurden mittels Mikroskop verfolgt. Die aus den Gewebefragmenten ausgewanderten Zellen waren auf der Kulturplatte adhärent und erreichten am 20. bis 25. Tag nach Aussaat eine Konfluenz von 80 bis 90 %. Mikroskopisch zeigte sich ein homogener Zellrasen. Ihrer Morphologie nach zu urteilen handelte es sich hierbei um fibroblastische Zellen.

Mittels immunzytochemischer Färbungen konnte bestätigt werden, dass es sich bei den kultivierten Zellen um Myofibroblasten handelte.

Eine Adhärenz der Fibroblasten konnte innerhalb der ersten 48 Stunden beobachtet werden. Alle 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, dafür wurden die Zellen mit *Gey's Balanced Salt Solution* (GBSS) gewaschen und das Kulturmedium ausgewechselt.

Um eine Kontamination der Zellkulturen zu vermeiden wurden alle beschriebenen und folgenden Arbeitsschritte an einer Zellkulturbank (Hera Safe, Typ HS 18/2 1996) durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde steril angesetzt, es wurden steril verpackte oder autoklavierte Utensilien verwendet.

### 3.5.2 Passagierung der Zellkulturen

Sobald die Fibroblasten einen deutlich konfluenten Zellrasen gebildet hatten, erfolgte eine Passagierung der Zellen. Zuerst wurde das Medium mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt, danach erfolgte ein zweimaliger Waschschritt mit GBSS. Anschließend wurden 6 ml Trypsin-EDTA (0,5 %) auf die Platte verbracht, um ein Ablösen der Zellen von den Platten zu bewirken. Unter manuellem Schwenken und unter mikroskopischer Kontrolle wurde der Moment abgewartet, wenn sich der überwiegende Teil der Zellen gelöst hat. Dann konnte die Zellsupension in sterile 50 ml Falcon Röhrchen überführt werden. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 300 x g für 10 min, die Zellen sammelten sich als Pellet am Boden des Röhrchens, der Überstand wurde verworfen und der Wasch- und Zentrifugationsschritt mit Medium wiederholt. Das verbleibende Pellet wurde mit Medium resuspendiert und auf neue Kulturplatten ausplattiert.

### 3.5.3 Stimulationsversuche

In diesem Versuchsteil wurden die in Kultur gehaltenen Fibroblasten mit verschiedenen Faktoren stimuliert, um in anschließenden Versuchen untersuchen zu können, wie sich darunter die Expresssion von MCP-1, IL-6 und ICAM-1 verändert.

Zur Durchführung wurden die Zellen einer Zellreihe von den Platten abtrypsiniert und mit Medium gewaschen (wie unter 3.5.2 beschrieben). Das

erhaltene Zellpellet wurde mit Medium resuspendiert. Um die Vitalität der Zellen und die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension zu prüfen, wurde eine Probe von 10 µl mit 10 µl Tryptanblau versetzt und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Der Anteil der nicht-angefärbten, also vitalen Zellen wurde ermittelt und die Gesamtanzahl der Zellen hochgerechnet.
Daraufhin wurde auf jede Platte mit 30 ml Medium eine Menge von 1x $10^6$ Zellen gegeben. Um eine Adhärenz der Zellen zu gewährleisten erfolgte eine Inkubation für 48 Stunden. Im Anschluss wurde zunächst zweimal mit GBSS gewaschen um die Zellen vom Medium und Zellresten zu befreien. Es folgte eine Präkonditionierung mit 30 ml 0,5 % FBS Medium für 4 Stunden.

Im nächsten Schritt wurden die Kulturen je nach Fragestellung mit den jeweiligen Faktoren für 24 Stunden stimuliert. Für die Stimulation mit den Wachstumsfaktoren wurden diese in je 30 ml 0,5 % FBS-Medium gelöst und dann auf die Platten verbracht. Zusätzlich wurden eine Kontrolle mit 0,5 % FBS-Medium und eine mit 10 % FBS-Medium angesetzt. Verwendete Wachstumsfaktoren (Verdünnung, Hersteller, Kat.-Nr.):

- TGF-β1 (5 ng / ml, Roche, 1412272)
- PDGF- β / β (10 ng / ml, Roche, 1276956)
- TNF-α (10 ng / ml, Sigma, T0157)
- EGF (10 ng/ ml, Sigma, E9644)

Für die Stimulation mit den NF-κB-Inhibitoren Helenalin und Parthenolid wurden diese in DMSO gelöst und in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

- Helenalin (BIOMOL Research Laboratories, EI301-0500 )
  + 0,1 µM / ++ 1,0 µM / +++ 10,0 µM
- Parthenolide (Calbiochem, Bad Soden, Germany, 512732 )
  + 1,0 µM / ++ 5,0 µM / +++ 10,0 µM

Die typische Stimulationsreihe der NF-κB-Inhibitoren beinhaltete eine Kontrolle mit 0,5 % FBS-Medium und eine mit DMSO, eine Stimulation mit TNF-α, sowie Stimulationen mit TNF-α plus dem Inhibitor in den abgestuften Konzentrationen.

Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde der Überstand abpipettiert und für weitere Analysen (3.8 Bead Array) in sterilen Falcon Röhrchen bei -80° C

gelagert. Die Zellen wurden sorgfältig und vollständig mittels Trypsin-EDTA von den Platten gelöst, mit GBSS gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm). Das gewonnene Zellpellet wurde in sterilen 0,5 ml Eppendorf-Tubes mit 1 ml Medium resuspendiert. Nach einem weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde die Probe in 350 µl RLT-Puffer + 3,5 µl Mercaptoethanol resuspendiert, geschüttelt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur lysiert, dann bis zur weiteren Verwendung (3.6. RNA-Isolierung) bei -80° C gelagert.

## 3.6 RNA-Isolierung

### 3.6.1 Allgemeines Vorgehen

Um später spezifische mRNA-Nachweismethoden durchführen zu können, musste zuerst die Gesamt-RNA aus den Gewebeproben und den Zellkulturen isoliert werden. Für die RNA-Isolierung aus den Gewebeproben wurde das RNeasy® Midi Kit und für die Zellkulturen das RNeasy® Mini Kit der Firma Quiagen (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet. Die Herstelleranweisungen wurden exakt befolgt. Bei der angewandten Methode wird die RNA an eine selektiv bindende Silicagel-Membran im Zentrifugationsröhrchen gebunden und mit ethanolhaltigem Puffer gewaschen.

Um einen Abbau der empfindlichen RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen zu vermeiden, wurden Gefäße und Utensilien vor Benutzung einer Dampfsterilisation im Autoklaven unterzogen, Lösungen unter sterilen Bedingungen angesetzt, die Proben auf Eis kalt gehalten, sowie kurz vor Arbeitsbeginn Arbeitsflächen und Materialien mit RNase AWAY® (Molecular Bio Products, San Diego, CA, USA) behandelt.

### 3.6.2 RNA-Isolierung aus Gewebeproben

Das Gewebe ist bei -80° C in sterilen Röhrchen gela gert. Bis zum Einbringen in die Pufferlösung (RLT + Mercaptoethanol) ist ein Auftauen der Proben zu verhindern, deshalb werden diese in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.
Pro Probe werden ca. 200 mg Gewebe abgewogen. Die gefrorenen Proben wurden in je 4 ml Puffer-Lösung mit Hilfe eines Mikro-Dismembrenators für 45

Sekunden mechanisch zerkleinert und homogenisiert. Das erhaltene Lysat wurde in sterile 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und für 10 Minuten bei 400g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, mit 4 ml Ethanol versetzt und nach gutem Durchmischen auf neue RNeasy® Säulen gegeben. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 400 g wurde der Durchfluss verworfen und es schlossen sich 3 Waschschritte mit Pufferlösungen an. Dazu wurden 4 ml RW1-Puffer auf die Säulen gegeben, für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal mit RPE-Puffer wiederholt und die Säule abschließend trocken zentrifugiert. Nun konnte die Säule auf ein 1,5 ml-„Biopur Röhrchen“ gegeben und die RNA in 2 Schritten mit je 150 µl RNase-freiem Wasser (Sigma) aus der Membran gelöst werden. Die gewonnenen Proben wurden auf Eis kalt gestellt, die RNA-Ausbeute photometrisch bestimmt (siehe 3.6.4 Photometrische Messung).

### 3.6.3 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Als Grundlage dienten die Fibroblasten aus den Stimulationsversuchen (siehe 3.5.3 Stimulationsversuche). Die Zellen waren resuspendiert in RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol in sterilen 15 ml Falcons bei -80° C gelagert. Für die RNA-Isolierung wurden die Zellsuspensionen zuerst im Wärmeschüttler bei 37° C aufgetaut und anschließend auf eine Shreddarsäule gegeben (QIAShredder™ Quiagen). Diese wurde auf ein mitgeliefertes 2 ml-Röhrchen gesetzt und bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, zu dem Durchfluss wurde 350 µl 70% Ethanol gegeben und kräftig durchmischt. Das erhaltene Eluat konnte nun auf die Säulen des RNAeasy® Mini-Kits gegeben werde. Es erfolgte eine Zentrifugation bei > 10000 x g für 30 Sekunden, der Durchfluss wurde verworfen. Zur Reinigung der RNA von anderen Zellbestandteilen und Rückständen erfolgten analog des Herstellerprotokolls unter Benutzung der RNeasy-Mini-Säulen 3 Waschschritte mit 2 verschiedenen Pufferlösungen (RW1 Puffer und RPE Puffer) und anschließender Zentrifugation bei 10.000 g. Um die RNA aus der Membran zu lösen, wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-BioPur-Röhrchen gesetzt und es erfolgte eine Elution in 2 Schritten mit 40µl und 15 µl RNAse-freiem Wasser. Die Proben wurden in den sterilen 1,5 ml-Röhrchen auf Eis gelagert.

### 3.6.4 Photometrische Messung

Reinheit und Konzentration der isolierten RNA wurden photometrisch bestimmt. Hierfür wurden Alliquots mit der Verdünnung 1:20 in RNase-freiem-Wasser hergestellt und in eine Küvette gegeben. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 260 nm und bei 280 nm.

Anschließend wurde die isolierte RNA in sterilen Tubes bei -80℃ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## 3.7 mRNA-Nachweismethoden

### 3.7.1 Allgemein

Ziel war die Bestimmung der Genexpression von MCP-1, IL-6 und ICAM-1 in den Gewebeproben und Fibroblastenkulturen. Um die spezifischen Transkripte aus der isolierten Gesamt-RNA nachzuweisen wurde die Northern Blot Analyse (Thomas 1980) durchgeführt. Dabei wurde die Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Markierung erfolgte mit der Digoxigenin-Methode (Trayhurn et al. 1994, Peterhaensel C et al. 1998). Hierfür musste zuerst eine spezifische Digoxigenin (DIG)-markierte Gensonde hergestellt werden. Diese war komplementär zu der mRNA auf der Membran und konnte in der Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

### 3.7.2 Herstellung von DIG-markierten Sonden

In einer reversen Transkriptase-Reaktion wurde Total-RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Im nächsten Schritt wurde die cDNA in einer Standard-PCR (Polymerase Kettenreaktion) eingesetzt, um mit Hilfe spezifischer Primer den gewünschten DNA-Abschnitt zu amplifizieren. Aus den entstandenen DNA-Doppelsträngen konnten in einer DIG-labeling-PCR-Reaktion unter Verwendung eines humanen antisense-Primers spezifische DNA-Einzelstränge synthetisiert und diese gleichzeitig mit Digoxigenin markiert werden. Die gewonnen Produkte dienten als komplementäre Gensonden.

Um Verunreinigung und Denaturierung der Proben zu vermeiden, wurde sorgfältig und mit sterilen Utensilien gearbeitet, der Versuchsansatz in einem sterilen 0,5 ml Reaktionsgefäß (safe-lock tubes, Eppendorf) angesetzt, die Proben wurden auf Eis kühl gehalten

cDNA-Synthese

Gesamt-RNA wurde durch das RNA-abhängige Enzym Reverse-Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Es wurden das 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche) sowie die zu dem Kit gehörigen Einzel-Reagenzien verwendet. Es wurde folgender Reaktionsansatz angesetzt:

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

Die Proben wurden vorsichtig durchmischt. Für die Reaktionsabläufe der cDNA-Synthese wurden die Proben in einen Thermocycler (Biometra) überführt. Es wurde für 10 min bei 25° C inkubiert, um die Primer anlagerung zu ermöglichen. Es folgte eine 60 min-Inkubation bei 42℃ (Transkri ptionsreaktion), dann 5 min bei 99℃ (Denaturierung). Anschließend wurde auf 4° C runtergekühlt.

Standard-PCR

Das gebildete Produkt der RT-PCR, ein cDNA/mRNADoppelstrang, diente in der Standard-PCR als Matrize. Dabei wurde mit spezifischen Primern ein ca. 200 bis 400 bp langer Abschnitt innerhalb der Zielsequenz zu DNA-Doppelsträngen amplifiziert. Die verwendeten spezifischen Primerpaare (8.2 Verwendete Primer) wurden unter Verwendung des Programmes „Primer3“ (http://primer3.sourceforge.net/) selbst konstruiert und von der Firma MWG-Biotech (Germany) bezogen. Folgende Komponenten wurden in angegebener Reihenfolge zusammenpipettiert:

- 40,75 µl Sigma Water

- 5 µl 10 x Reaktionspuffer
- 1 µl Desoxynukleotide (dNTP 10 mM)
- 1 µl Primer sense (10 pmol / µl)
- 1 µl Primer antisense (10 pmol / µl)
- 0,25 µl Taq Polymerase (5 U / µl)
- 1 µl cDNA Template

Die Bestandteile wurden vorsichtig durchmischt und im Thermocycler inkubiert. Zu Beginn erfolgte ein Aufheizen des Deckels auf eine Temperatur von 105° C, dann eine einmalige Denaturierung bei 95° C für 2 m in, gefolgt von 35 Zyklen, die sich zusammensetzten aus Denaturierung bei 95℃ für 1 min, Anlagern der Primer bei 60℃ für 1,5 min und einer Auffüllreakti on (Elongation) bei 72℃ für 1,5 min. Zuletzt folgte eine einmalige Auffüllreaktion bei 72℃ für 5 min und abschließendes Abkühlen auf 4° C. Nach einer Kontro lle der korrekten Banden mittels gelelektrophoretischer Auftrennung (1,5 % Agarosegel) konnten die PCR-Templates in der DIG-PCR eingesetzt werden.

DIG-PCR

In diesem Schritt wurde das PCR-Produkt durch den direkten Einbau von DIG-dUTP anstatt dTTP als Sonde markiert. Es wurde lediglich der jeweilige Antisense-Primer verwendet, so konnte eine Transkript-spezifische konzentrierte Einzelstrang-cDNA hergestellt werden. Verwendet wurde das PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche). Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengestellt:

- 33,25 µl Sigma Water
- 5 µl 10 x PCR Reaktionspuffer (mit 15 mM $MgCl_2$)
- 5 µl DIG-PCR-Nukleotide (10 x PCR DIG Probe Synthesis mix 2mM)
- 1 µl Primer antisense (10 pmol / µl)
- 0,75 µl Enzym Mix (3,5 U / µl)
- 5 µl PCR-Template

Die Proben wurden vorsichtig vermischt und in den Thermocycler gegeben. Es wurde das gleiche Programm verwendet wie bei der Standard-PCR (3.7.2 Standard-PCR). Nach Verifizierung der korrekten Identität mittels Gelektrophorese (1,5 % Agarosegel) wurden die hergestellten Produkte in

sterile 15 ml Falcons mit 10 ml Hybridisierungspuffer pipettiert. Bis zur weiteren Verwendung im Rahmen der Hybridisierung wurden die Sonden bei -20° C gelagert.

### 3.7.3 Northern Blot

Die Northern Blot Methode dient der Übertragung der in einer Gelelektrophorese aufgetrennten RNA auf eine Membran zur Detektion gesuchter mRNA. Der Versuchsablauf folgt den Beschreibungen von Maniatis et al. (1982). Um einen Abbau der empfindlichen RNA zu verhindern, wurden Agarosegel und Probenpuffer unter sterilen Bedingungen angesetzt, verwendete Gefäße und Utensilien autoklaviert. Der Gelschlitten wurde mit RNase AWAY® behandelt.

Zuerst wurde ein 1% Agarosegel bei 100° C aufgekocht, auf 60° C abgekühlt und vor dem Gießen mit Formaldehyd (37%) und Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Aushärten (ca 1h) wurde das Gel auf seinem Gelschlitten in die mit 5x Gel Running Buffer als Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer transferiert.

Die Vorbereitung der Proben erfolgte in sterilen 0,5 ml Eppendorf Tubes und auf Eis. Es wurden je 10 µg Total-RNA eingesetzt, das Volumen mit Sigma Wasser auf 10 µl egalisiert und 30 µl Proben-Puffer (1,33 x Sample Buffer) dazu pipettiert. Zur Denaturierung wurden die Proben bei 65° C für 15 Minuten im Thermoblock erhitzt, und dann sofort für 5 Minuten auf Eis kaltgestellt um ein erneutes Zusammenlagern zu verhindern. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert (1 Minute bei 100 rpm) und mit je 5 µl Loading Dye versetzt. Ein RNA-Standard-Marker wurde mit 5 µl RNA-Marker, 15µl 1,33 x Sample Puffer und 3,3 µl 6 x Loading Dye angesetzt. Die Proben und der RNA-Standard-Marker wurden in die Taschen des Gels aufgetragen, die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V für 90-120 Minuten. Im Anschluß wurde das Gel vorsichtig aus der Kammer entnommen und die aufgetrennten RNA-Banden unter UV-Licht visualisiert. Es waren dabei deutlich die 28 S und 18 S rRNA als distinkte Banden zu erkennen. Das Gel wurde zurechtgeschnitten, in eine saubere Plastikschale gelegt und 10 Minuten in Aqua dest. gewaschen um das Gel von Rückständen zu befreien, dann folgten zur Äquilibrierung 3 Waschschritte à 15 Minuten mit 20 X SSC unter leichtem Schütteln.

Anschließend fand der Transfer auf eine Nylonmembran statt. Dazu wurde eine Plastikschale mit 20 x SSC Lösung gefüllt und eine Glasplatte quer darauf gelegt. Zwei zurechtgeschnittene Lagen Filterpapier (Whatman Papier) wurden als Papierbrücke flach über die Glasplatte gelegt, mit 20 x SSC Lösung angefeuchtet und luftblasenfrei ausgerollt, die Papierenden tauchten dabei an beiden Seiten in die 20 x SSC Lösung. Das Gel wurde mit der Taschenöffnung nach unten auf die Filterpapiere gelegt, und die Seiten mit Parafilm abgeklebt. Eine Nylonmembran wurde in Größe des Gels geschnitten und auf das Gel aufgebracht. Im Anschluss wurde eine auf Gelgröße geschnittene doppelte Lage Filterpapier in 2 x SSC getränkt und als Abschluss luftblasenfrei auf der Membran platziert. Das Konzentrationsgefälle der SSC Lösungen erzeugt Kapillärkräfte, die den Transport der RNA-Proben aus dem Gel in die Membran bewirken. Zur Verstärkung des Kapillareffekts wurde ein ca. 10 cm hoher Stapel saugfähigen Zellstoffes aufgelegt, mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem Gewicht (750 g) beschwert.
Nach 20 Stunden wurde der Blot abgebrochen und die Nylonmembran entnommen. Die RNA wurde mit ultraviolettem Licht auf der Membran fixiert. Der Transfer der RNA wurde anhand der 28 S und 18 S rRNA Banden unter UV-Licht überprüft und die Banden für die spätere Größenzuordnung markiert. Die Membran wurde dann entweder direkt für die Hybridisierung verwendet oder luftdicht in Plastik verschlossen bei +4°C ge lagert.

### 3.7.4 Hybridisierung und Detektion

In diesem Schritt wurden die spezifischen RNA-Sequenzen auf der Membran durch Hybridisierung mit den komplementären DIG-markierten Gensonden markiert. Die Detektion erfolgte mit einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörper. Der enzymatische Umsatz des Substrates CDP erzeugte ein messbares Chemilumineszenzsignal.

Die Membran wurde mit der RNA-tragenden Seite nach innen in einen Hybridisationszylinder überführt, als Hybridisierungspuffer diente DIG Easy-Hyb. Um unspezifische Bindungsstellen der RNA-Nylonmembran abzusättigen, wurde die Membran zuerst 1 Stunde mit 10 ml Hybridisierungspuffer bei 50℃

im Hybridisierungsofen unter ständiger Rotation prähybridisiert. Für die Markierung der zu untersuchenden mRNA wurden die bei -20° C gelagerten DIG-markierten Sonden verwendet, diese wurden bei 65° C im Wasserbad aufgetaut, der Schritt diente gleichzeitig der Linearisierung der DNA-Einzelstränge. Die Membran wurde mit der jeweiligen Sonde für eine Dauer von 16-20 Stunden hybridisiert, wieder bei 50° C unter Rotation im Hybridisierungsofen. Anschließend wurde die Sonde in einem sterilen 15 ml Falcon Röhrchen aufgefangen und bei -20° C wieder e ingefroren. Die Sonden wurden maximal für 3 Hybridisierungen verwendet. Die Membran wurde jeweils aus dem Hybridisationszylinder entnommen und in eine saubere Platikschale gelegt.

Die folgenden Detektionsschritte erfolgten mit dem DIG Wasch und Block Puffer Set (Roche Diagnostics), der Versuchsablauf richtete sich nach den Herstelleranweisungen. Um unspezifische gebundene DNA zu beseitigen schlossen sich Waschschritte bei Raumtemperatur auf einer Schüttelvorrichtung an, zweimal für je 15 Minuten mit 2 x Waschlotion, zweimal für je 15 Minuten mit 0,5 x Waschlotion, einmalig für 5 Minuten mit Wasch-Puffer. Um unspezifische Bindungsstellen abzudecken wurde die Membran für eine Stunde mit Blockierungslösung inkubiert (Blocking Solution). Anschließend wurde der mit alkalischer Phosphatase konjugierte Anti-Digoxigenin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20000 aufgebracht und für 30 Minuten inkubiert. Zum Entfernen der nicht gebundenen Antikörper folgten 2 Waschschritte mit Waschpuffer für je 15 Minuten. Nach einer 5-minütigen Äquilibrierung mit Detektionspuffer (Detection Puffer), wurde die Membran auf eine saubere transparente Plastikfolie gelegt. Zur Erzeugung des Signals in Form von Chemilumineszenz wurde das Substrat CDP-*Star* für 5 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenssignale und die quantitative densitometrische Auswertung der gespeicherten Daten wurde mit dem Fluor S Mult-Imager (BioRad, Deutschland) durchgeführt.

Für eine Rehybridisierung der Membran wurde diese in 100° C heißer 0,1% SDS-Lösung ausgekocht, und unter Schwenken bis zum Abkühlen auf 60° C in der Lösung ausgewaschen. Danach konnte die Membran für eine neue Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

Grundsätzlich stellten wir für jede neue Probenreihe und zu detektierendes RNA-Produkt eine neue Northern Blot Membran her, da so die besten Ergebnisse erzielt wurden. Standardmäßig erfolgte mit jeder Membran eine abschließende Rehybridisierung mit einer für GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) spezifischen Sonde. Die Normalisierung zu dem konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gen GAPDH diente als interne Kontrolle und zur Quantifizierung der zu vergleichenden Proben (Barber et al. 2005).

## 3.8 Bead-Array

In dieser Arbeit sollte die Produktion von IL-6 und MCP-1 durch die in Kultur gehaltenen Fibroblasten nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren und NF-κβ-Inhibitoren bestimmt werden. Dazu wurde die Konzentration der beiden löslichen Proteine im Überstand aus den Stimulationsversuchen gemessen.
Wir wählten eine durchflusszytometrische Bead Array Analyse und arbeiteten mit Hilfe des BD™ CBA Cytokine / Chemokine Flex Set (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Der Versuchsablauf richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers, alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zur Messung diente ein BD Facs Canto.

Der Cytometric Bead Array (CBA), im Prinzip ein Sandwich-Immunoassay, basiert auf Partikeln (Capture Beads), die mit spezifischen Fänger-Antikörpern gekoppelt sind. Der Nachweis gelingt über Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper, die sich an die Capture Beads anlagern und so die zu detektierenden Proteine markieren. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff Phycoerithrin (PE) erzeugt eine rote Fluoreszenz. Die Analyse erfolgt mit einem Durchflusszytometer (FACS, fluorescence activated cell sorter). Die Proben werden dabei durch eine feine Nadel angesaugt und passieren einen Laserstrahl. Das erzeugte Fluoreszenzsignal wird gemessen. Dabei können aus einer Probe in einem Durchgang mehrere Zytokine / Chemokine gleichzeitig quantitativ bestimmt werden, in unserem Fall also IL-6 und MCP-1 parallel in einem Versuchsdurchlauf.

Als Eichkurve für die spätere Messung musste für beide Proteine initial eine standardisierte Verdünnungsreihe angesetzt werden. Die mitgelieferten Standards lagen in konzentrierter Form vor, mussten mit 0,2 ml Assay Diluent vermischt werden. Es wurde eine 1:2 Serienverdünnung mit 9 Proben in absteigender Verdünnung (5000 pg/ml bis 20 pg/ml) und eine Negativkontrolle erstellt.

Die Vorbereitung der Reagenzien und Proben erfolgte in sauberen Kunststoffröhrchen (FACS Tubes). Die als Proben eingesetzten Überstände aus den Stimulationsversuchen (3.5.3 Stimulationsversuche) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Versuchsansatz bestand aus 50 µl Probe bzw. Standard und je 50 µl Capture Bead pro Chemokin/Cytokin. Während einer einstündigen Inkubation konnten die spezifischen Capture Beads an die zu detektierenden Proteine binden. Danach wurden 50 µl Detektions-Reagens (PE Detection Reagent) hinzugefügt und 2 Stunden lichtgeschützt inkubiert, um eine photochemische Inaktivierung der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden.

Um die ungebundenen Reagenzien zu entfernen folgte ein Waschschritt mittels 1 ml Waschpuffer und Zentrifugation bei 200 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das winzige Pelett am Boden des Röhrchens in 300 µl Waschpuffer gut resuspendiert. Nach Kalibrierung des Flusszytometers FacsCanto wurde die Intensität der roten Fluoreszenz der einzelnen Proben gemessen und mit Hilfe der BD CBA Software (Pharmingen, D) ausgewertet.

## 3.9 Statistik

Die Ergebnisse wurden durch Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung dargestellt. N gibt die Anzahl der jeweiligen Zell- oder Gewebeproben von unterschiedlichen Patienten wieder.

Die Signifikanz wurde mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni-Adjustierung geprüft. Als signifikant gelten p-Werte $< 0,05$.

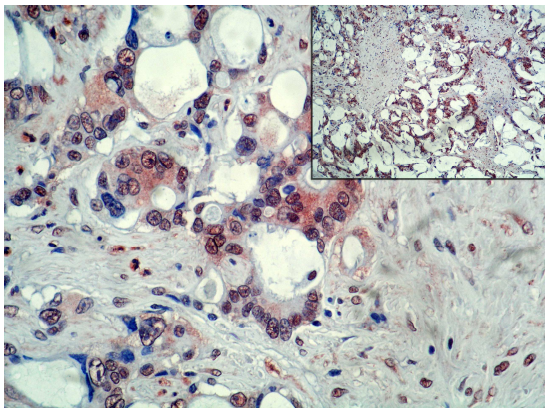
# 4. Ergebnisse

## 4.1 Immunhistochemischer Nachweis von TNF-α und MCP-1

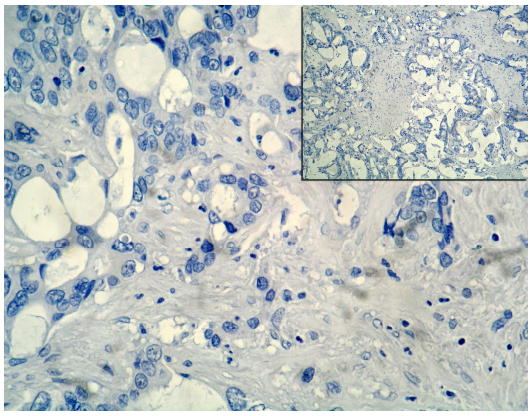
Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen konnte TNF-α und MCP-1 in Gewebeschnitten von kolorektalen Lebermetastasen detektiert werden. Die Protein-Expressionsmuster waren aussagekräftig und in wiederholten Färbungen reproduzierbar. Zu unterscheiden war dabei die Anfärbung im Tumorgewebe, im angrenzenden Stroma und im entfernten Lebergewebe.
Unspezifische Anfärbungen wurden durch Kontroll-Anfärbung mit dem isotypischen IgG Antikörper MOPC-21 ausgeschlossen.

Direkt in der Metastase konnte **TNF-α** in Tumorzellen, aber auch in mononukleären Zellen und Granulozyten nachgewiesen werden. Fibroblasten waren in der Metastase und im angrenzenden Stroma deutlich darzustellen, zeigten aber keine Immunreaktivität für TNF-α. Im Lebergewebe, das von der Metastase entfernt war, war TNF-α deutlich in Leukozyten und Endothelzellen anzufärben, es färbte sich nahezu das gesamte Zytoplasma an.

**A**



**B**



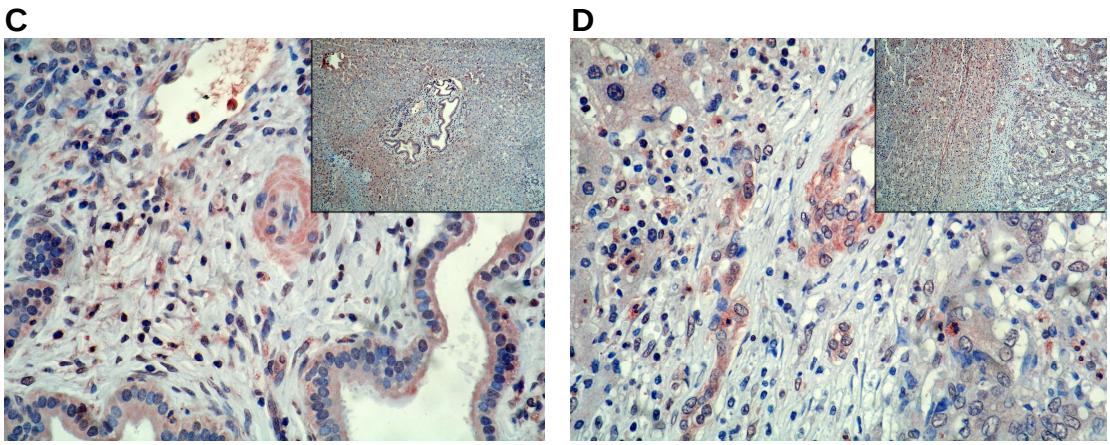
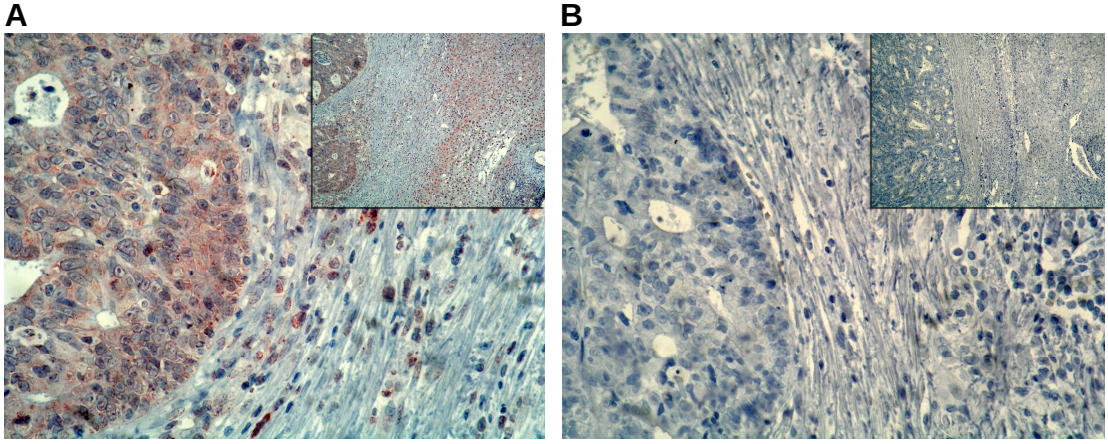



**Abbildung 2:** Immunhistochemische Detektierung von TNF-α in Gewebe von kolorektalen Lebermetastasen, jeweils Detail-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung und die entsprechende Übersichts-Darstellung des angeschnittenen Areals. (A,C,D) Immunzytochemische Färbung gegen TNF- α (rot). (B) Exemplarische Kontrollfärbung zu dem Paraffin-Schnitt von (A) mit dem isotypischen IgG Antikörper MOPC-21.

**MCP-1** war deutlich in den Tumorzellen im Metastasengewebe nachzuweisen, insbesondere im Vergleich zum angrenzenden Stroma waren Karyoplasma und Zytoplasma der Tumorzellen stark positiv. Im gesamten Gewebe vorkommende Entzündungszellen fielen durch eine starke Anfärbung der Kerne auf. Dargestellte Fibroblasten waren gar nicht bis schwach positiv, im Falle einer Anfärbung imponierte diese in Form von gefärbten Kernen. Im Vergleich zu TNF-α zeigten die Endothelzellen im entfernten Lebergewebe keine Immunreaktivität für MCP-1.



C D

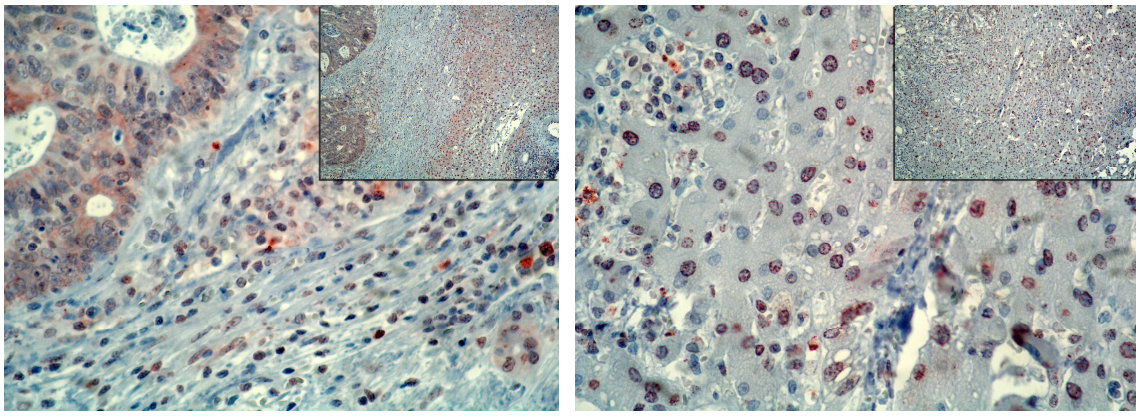


**Abbildung 3**: (A,C,D) Immunhistochemie nach Kryogewebeschnitten von kolorektalen Lebermetastasen, gefärbt gegen MCP-1 (rot); Grenzregion zwischen kolorektaler Lebermetastase und normalem Lebergewebe. (B) Exemplarische Kontrollfärbung zu dem Paraffin-Schnitt von (A) mit MOPC.

## 4.2 Expression von IL-6, MCP-1 und ICAM-1 in kolorektalen Lebermetastasen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von IL-6, MCP-1 und ICAM-1 in kolorektalen Lebermetastasen anhand der originalen Gewebeproben von 11 Patienten untersucht. Es wurde dabei zwischen Metastasengewebe, angrenzendem Gewebe (Übergangsgewebe zwischen Metastase und gesundem Lbergewebe) und Lebergewebe mit Abstand zur Metastase unterschieden. Aus den jeweils gemessenen mRNA-Levels wurden Mittelwerte errechnet. Beim direkten Vergleich zwischen Expression in der Metastase und im angrenzenden Lebergewebe konnten nur leichte Unterschiede vermerkt werden: 1,12 (IL-6), 1,68 (MCP-1), 0,93 (ICAM-1). Das heißt, dass IL-6 und MCP-1 tendenziell vermehrt im Metastasengewebe, ICAM-1 hingegen vermehrt im angrenzenden Lebergewebe exprimiert wird. Es zeigten sich insgesamt deutliche Fluktuationen in der Stärke der mRNA-Expression zwischen den einzelnen Patienten.

Die Zusammenhänge der einzelnen Expressionsraten von IL-6, ICAM-1 und MCP-1 im Metastasengewebe wurden genauer analysiert. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MCP-1 und IL-6 ($r=0,55$, $p=0,03$). Die Expression von MCP-1 korrelierte zudem signifikant mit der von

ICAM-1 (r=0,81, p=0,001). Zwischen der Expression von IL-6 und ICAM-1 konnte keine Korrelation nachgewiesen werden (Abb. 4).

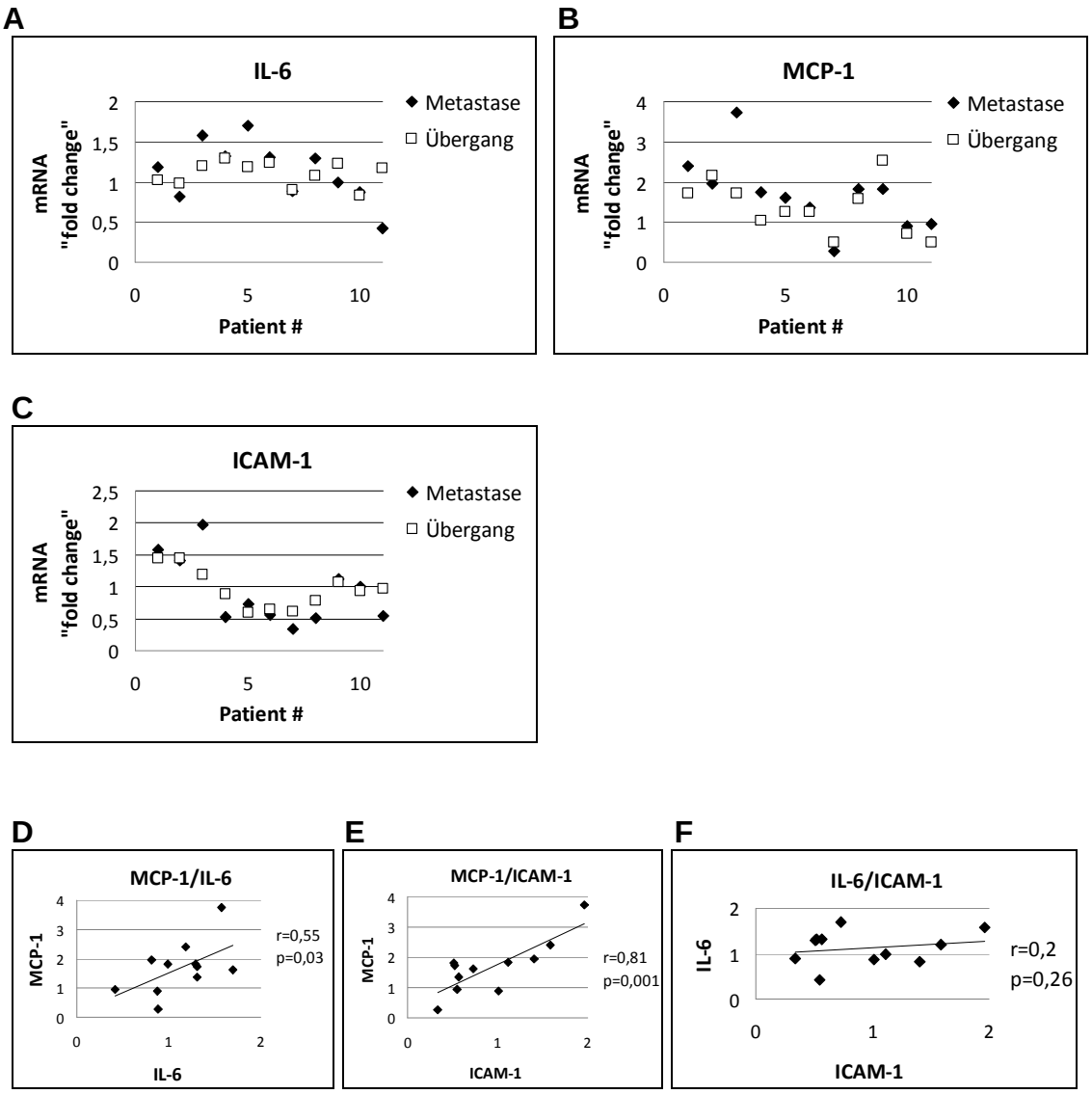



**Abbildung 4:** Vergleich der gemessen mRNA Expression von IL-6 (A), MCP-1 (B) and ICAM-1 (C) im Metastasengewebe (Metastase) vs angrenzendes Lebergewebe (Übergang) von 11 Patienten. Die mRNA Levels wurden als „fold change“ versus dem entfernten Lebegewebe berechnet. (D) Korrelation zwischen MCP-1 und IL-6 mRNA Levels im Tumorgewebe. (E) Korrelation zwischen MCP-1 und ICAM-1 mRNA im Tumorgewebe. (F) Korrelation zwischen IL-6 und ICAM-1 mRNA Levels im Tumorgewebe.

Nebenbefundlich fiel beim Vergleich von Metastasengewebe, angrenzendem Gewebe und Lebergewebe mit Abstand zur Metastase auf, dass die Signalstärke des Housekeeping-Enzyms GapdH stark schwankte, es wurde

vermehrt im Metastasengewebe exprimiert und deutlich schwächer in den anderen Proben. Dieses Phänomen wird wiederholt in der Literatur beschrieben, es spiegelt die vermehrte Aktivität im Metastasengewebe wider.

## 4.3 Stimulationsversuche der TAFs in Zellkulturen

In dieser Arbeit wurde die Expression von IL-6, MCP-1 und ICAM-1 in vitro untersucht, insbesondere der Effekt unter Stimulation mit TNF-α (10 ng/ml) sowie der Wachstumsfaktoren TGF-β1 (5 ng/ml), PDGF-BB (10 ng/ml), und EGF (10 ng/ml). Auch hier wurde zwischen TAF und LF unterschieden, je nach Herkunftsgewebe der primär isolierten Fibroblasten.

### 4.3.1 Wachstumsverhalten und Morphologie der TAF und LF

Die nach der Isolation auf die Kulturplatten ausgebrachten Fibroblasten aus den kolorektalen Lebermetastasen bildeten nach 24-48 Stunden einen homogenen adhärenten Zellrasen. Morphologisch imponieren die Fibroblasten als typische spindelförmige, verzweigte Zellen mit plattem Zellleib. Die Zellen stehen durch verschieden breite Zytoplasmafortsätze miteinander in Verbindung. Ihr relativ großer, chromatinhaltiger Zellkern hat die Form eines Ellipsoids und enthält ein bis mehrere kleine Nukleolen. Initial kontaminierende Hepatozyten und sinusoidale Endothelzellen konnten unter den Kulturbedingungen nicht anwachsen.

Wachstumsverhalten unter Stimulation: Interessanterweise fielen bereits beim Wachstumsverhalten der Fibroblastenkulturen Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Stimulationsfaktor auf. Als Kontrolle diente die Kultivierung mit 0,5% FBS. Unter Stimulation mit TGF wurde ein deutlich langsameres, unter Stimulation mit EGF ein schnelleres und dichteres Wachstum der Fibroblasten verfolgt.

Es wurden geringe inter-indivuduelle Unterschiede im Wachstumsverhalten je nach Ursprungsgewebe (Patient) beobachtet, der oben beschriebene Einfluss der Wachstumsfaktoren war dabei aber nicht verändert.

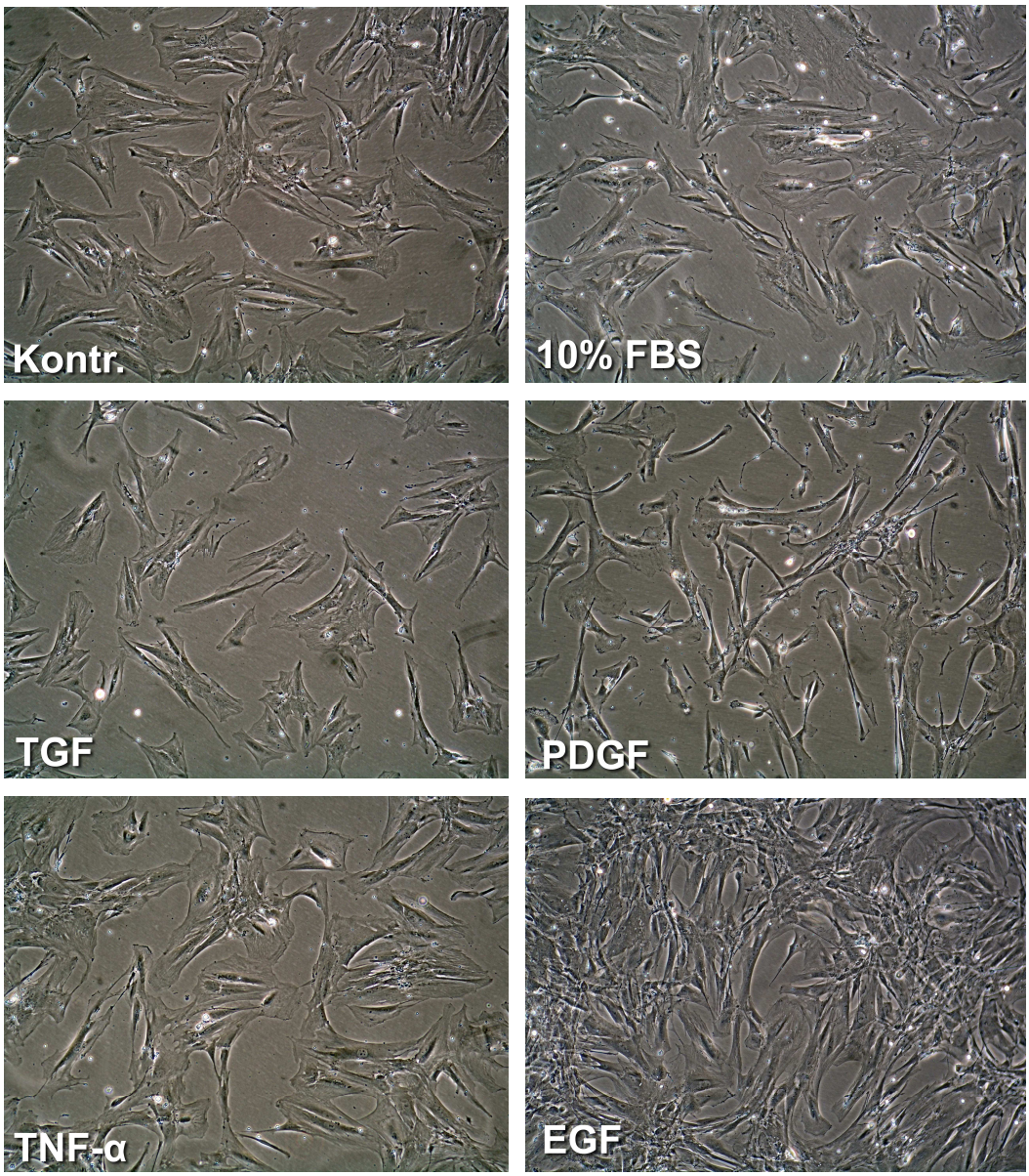



**Abbildung 5:** Primärkultivierte Fibroblasten aus kolorektalen Lebermetastasen (100-fache Vergrößerung). 24-stündige Inkubation unter Kulturbedingungen mit 0,5 % FBS (Kontrolle), 10 % FBS, TGF-β1 (5 ng / ml), PDGF- β / β (10 ng / ml), TNF-α (10 ng / ml) und EGF (10 ng/ ml).

### 4.3.2 Expression von IL-6 und MCP-1

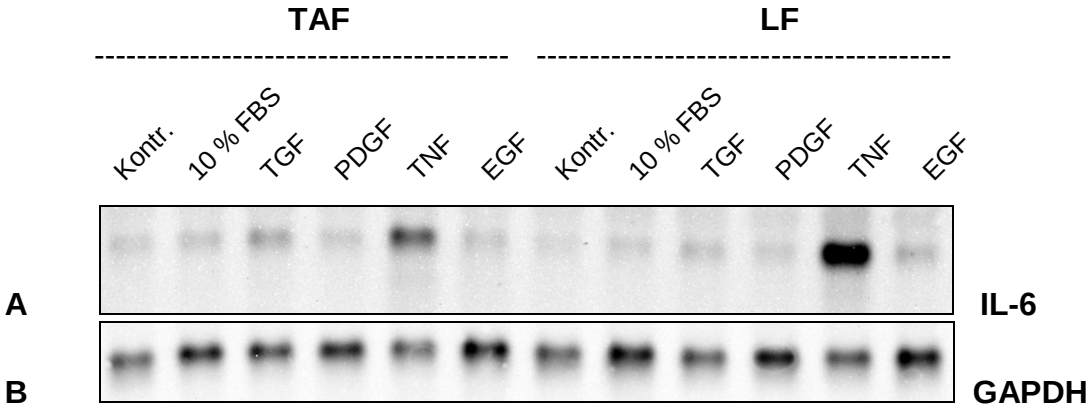
**IL-6** mRNA wurde in allen Versuchsanteilen nachgewiesen.

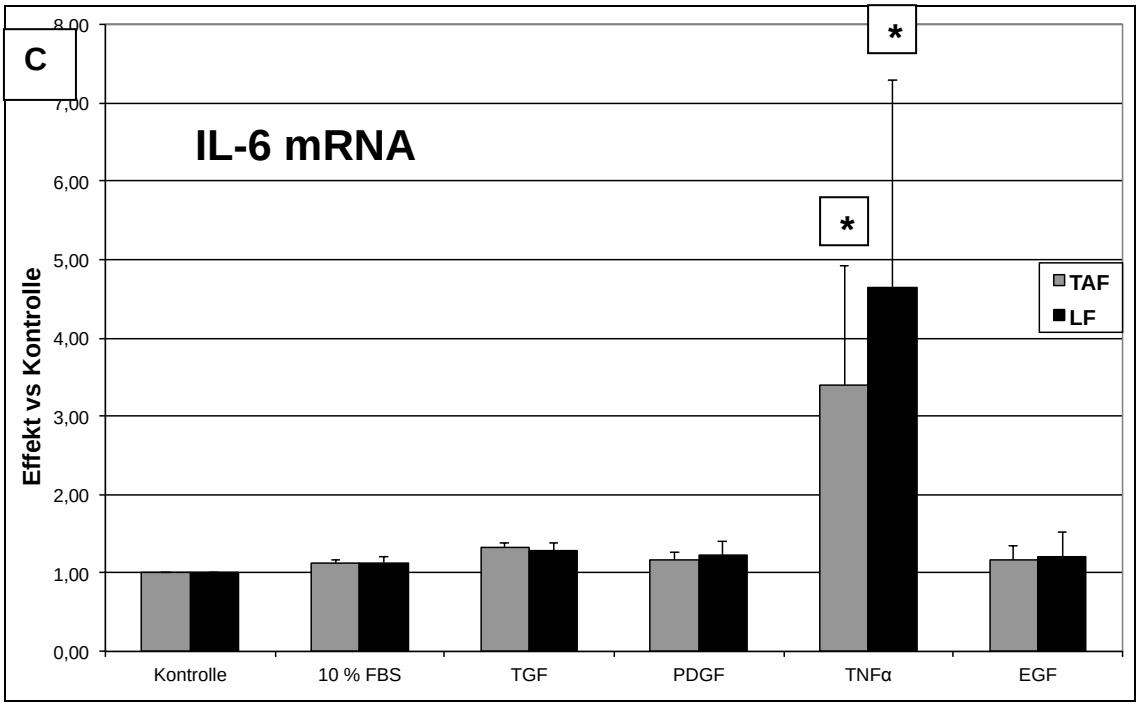
Unter Stimulation der Fibroblastenkulturen mit TNF-α wurde eine starke Induktion von IL-6 mRNA gemessen (n = 6 (3x TAF, 3x LF), Abb. 6). Die anderen Wachstumsfaktoren zeigten auf mRNA-Level keinen signifikanten Einfluss.

Die mRNA von **MCP-1** konnte in sämtlichen Proben in jeweils unterschiedlicher Stärke gemessen werden. Die Inkubation mit TNF-α führte zu einem starken Anstieg der MCP-1 mRNA, im Vergleich zur Kontrolle war der Anstieg in Fibroblastenkulturen aus TAF 15-fach, in Fibroblastenkulturen aus Leberfibroblasten 10-fach erhöht ($p < 0.001$; $n = 6$ (3xTAF, 3x LF); Abb. 7). Interessanterweise war unter Stimulation von TGF-β1 eine verminderte Expression von MCP-1 in beiden Zelltypen zu verzeichnen. Die anderen eingesetzten Wachstumsfaktoren zeigten keinen relevanten Effekt.

In abschließend durchgeführten **Bead Arrays** wurden die Überstände der TAF auf IL-6 und MCP-1 untersucht, ob diese Proteine von den Zellen freigesetzt wurden. Die Ergebnisse der Messungen IL-6 und MCP-1 betreffend, fanden mit denen der mRNA Übereinstimmung, als dass ein signifikanter Anstieg unter Stimulation mit TNF vorlag.
Leichte, aber nicht signifikante Anstiege in der Expression von IL-6 Protein wurden nach Inkubation 10 % FBS, TGF-β1, PDGF-ßß, und EGF beobachtet.

Die Unterschiede in der Expression zwischen TAF und LF waren weder bei IL-6 noch bei MCP-1 signifikant, weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene.





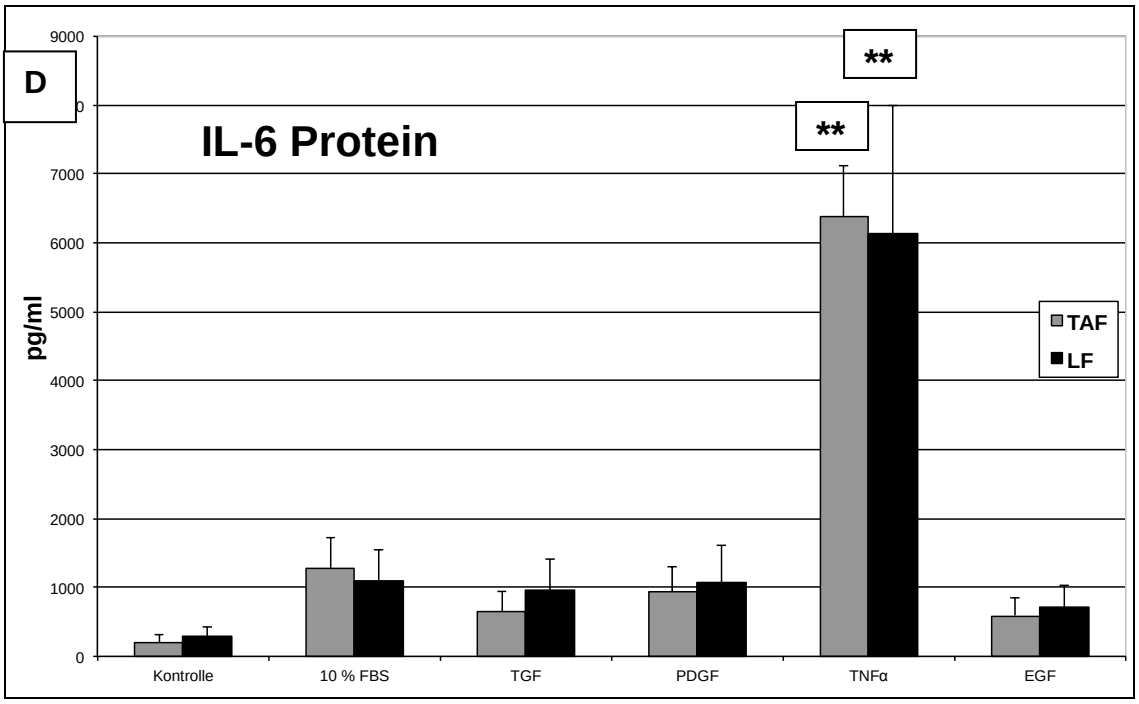
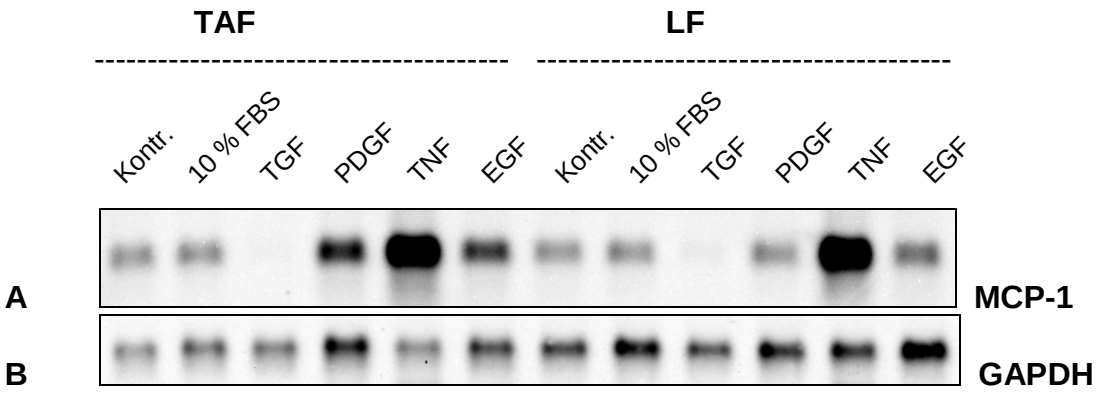
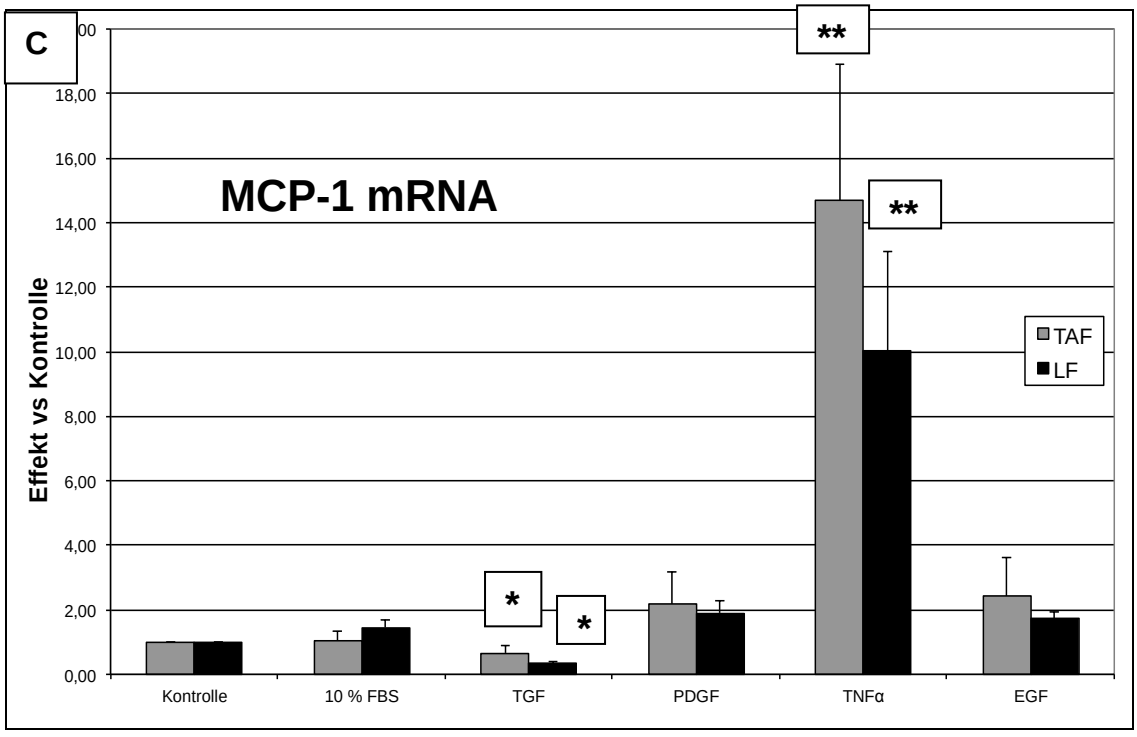




**Abbildung 6:** Effekt der Stimulation mit 10 % FBS, TGF-β1, PDGF-BB, TNF-α und EGF auf die mRNA- und Protein-Expression von IL-6 durch TAF und LF unter Zellkultur-Bedingungen. (A) Ein repräsentativer Northern Blot zeigt die deutliche Zunahme der Expression von IL-6 mRNA unter Stimulation mit TNF-α. (B) Zur Kontrolle wurde der Northern Blot mit einer GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert. (C) Diagramm zur Darstellung der densitometrsichen Analyse der mRNA Expression. (D) Ergebnisse der FACS-Messung aus den Überständen der Fibroblastenkulturen der TAF und LF wie unter 3.8 beschrieben (n = 6 (3x TAF, 3x LF; Mittelwert ± SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ Effekt vs. Kontrolle).


TAF
LF
Kontr.
10 % FBS
TGF
PDGF
TNF
EGF
Kontr.
10 % FBS
TGF
PDGF
TNF
EGF
A
MCP-1
B
GAPDH


C
MCP-1 mRNA
Effekt vs Kontrolle
18,00
16,00
14,00
12,00
10,00
8,00
6,00
4,00
2,00
0,00
**
**
*
*
TAF
LF
Kontrolle
10 % FBS
TGF
PDGF
TNFα
EGF

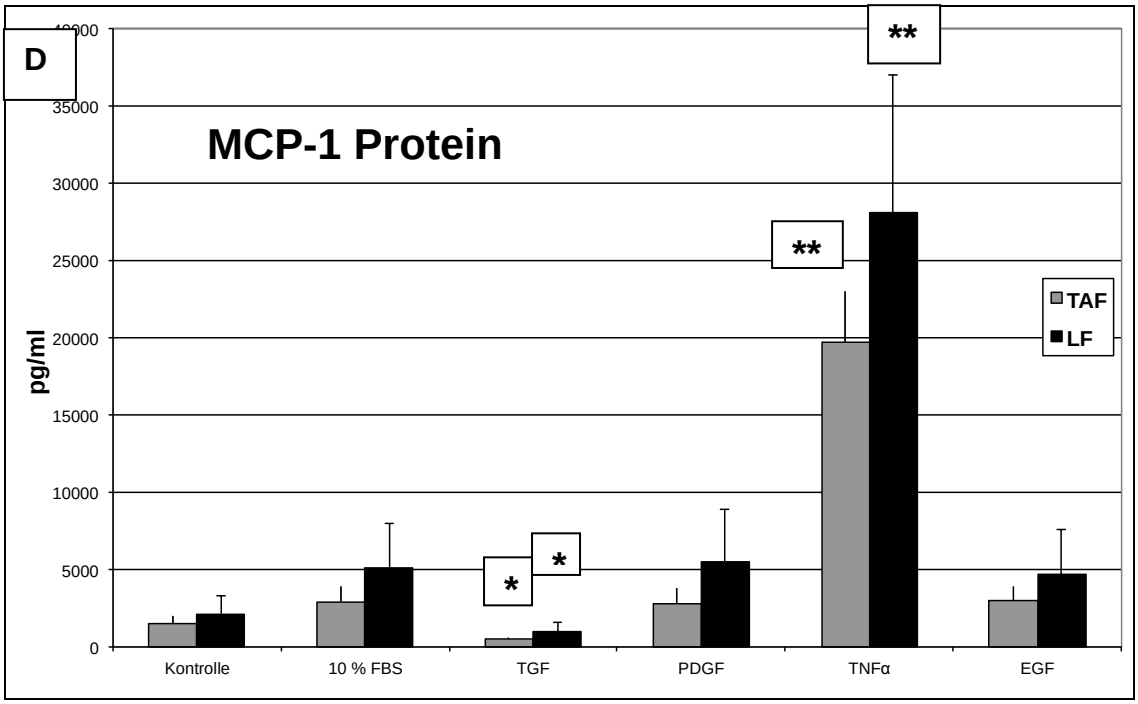



**Abbildung 7:** Stimulationsversuche mit Fibroblastenkulturen von kolorektalen Lebermetastasen (TAF) und aus entferntem Lebergewebe (LF). Inkubation mit den Faktoren 10 % FBS, TGF-β1, PDGF-BB, TNF-α und EGF. (A) mRNA Expression von MCP-1, hier ein Northern Blot aufgeführt. (B) Negativ-Kontrolle mittels Re-Hybridisierung mit GAPDH-spezifischer Sonde. (C) Im Diagramm werden die Ergebnisse der mRNA-Expression von MCP-1 unter Stimulation dargestellt. Die mRNA ist im Vergleich zur Kontrolle (DMEM + 0,5% FBS) aufgeführt (n = 6 (3x TAF, 3x LF). (D) Messung der Protein-Expression von MCP-1 aus den Zellkulturüberständen der TAF und LF. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 4 verschiedenen Präparationen. (Mittelwert ± SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ Effekt vs. Kontrolle)

### 4.3.3 Expression von ICAM-1

Die vorliegenden Daten zeigten nur einen schwachen Nachweis von ICAM-mRNA Expression im nativen Gewebe der kolorektalen Metastasen, wie unter 4.2 beschrieben.

In den Stimulationsversuchen der angelegten Fibroblastenkulturen hingegen konnte ICAM-1 mRNA deutlich nachgewiesen werden, insbesondere unter Stimulation mit TNF-α war die Expression signifikant erhöht (n=6, $p< 0,05$ Signifikanz). Die anderen Wachstumsfaktoren hatten keinen nachweisbaren Einfluss auf die mRNA Expression. Wie bereits bei IL-6 und MCP-1 beschrieben konnte auch bei ICAM-1 kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen TAF und LF nachgewiesen werden.

Die Daten legen die Vermutung nahe, dass die erhöhten ICAM-1 Werte bei Patienten mit kolorektalem Karzinom vielmehr auf die im Stroma befindlichen Fibroblasten als auf die primären Tumorzellen zurückzuführen sind.

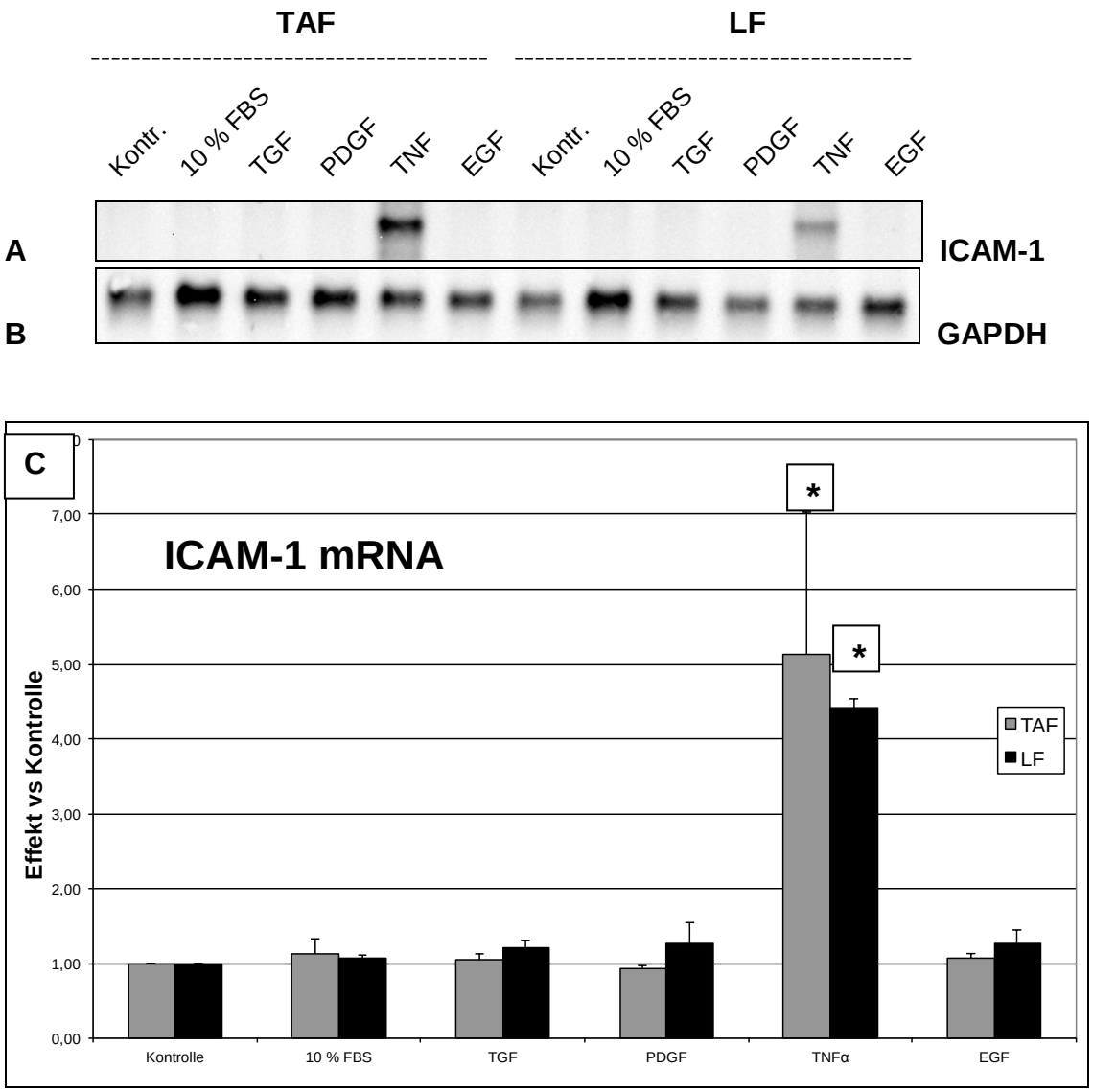



**Abbildung 8:** mRNA Expression von ICAM-1 durch Fibroblastenkulturen TAF und LF von 6 Patienten. (A) Ein repräsentativer Northern Blot zeigt die signifikant erhöhte Expression von ICAM-1 unter Stimulation mit TNF-α. (B) Die Normalisierung zu dem konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gen GAPDH diente als interne Kontrolle. (C) Dieses Diagramm veranschaulicht die Ergebnisse der densitometrischen Analyse der Northern Blots der Stimulationsversuche, die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. **(**n = 6; Mittelwert ± SEM; * p < 0,05 versus Kontrolle)

### 4.3.4 GAPDH

Im Rahmen der Stimulationsversuche wurden alle Northern Blots zur Kontrolle einer Hybridisierung mit dem Housekeeping-Enzym GAPDH unterzogen. Die GAPDH Signale waren erwartungsgemäß homogen stark und gleichförmig bei allen Proben nachzuweisen, da GAPDH auf mRNA-Ebene keine Regulierung erfährt (Abb. 6 (B); Abb. 7 (B); Abb. 8(B)).

## 4.4 Expressionsmuster nach Inhibition durch Sesquiterpenlaktone

Parthenolide und Helenaline sind für ihre potente anti-inflammatorische Wirkung bekannt, die durch die TNF-α-vermittelte Inhibition des Transkriptionsfaktors NF-κB verursacht wird.

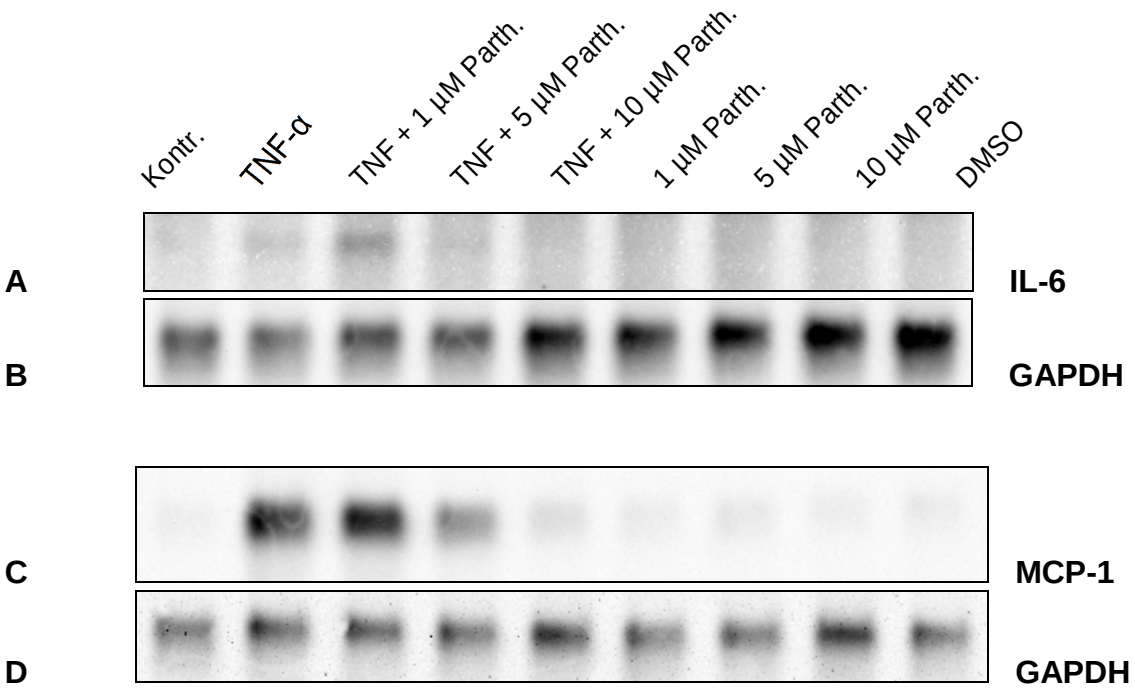
### 4.4.1 Parthenolide und Helenalin hemmen die Expression von IL-6 und MCP-1

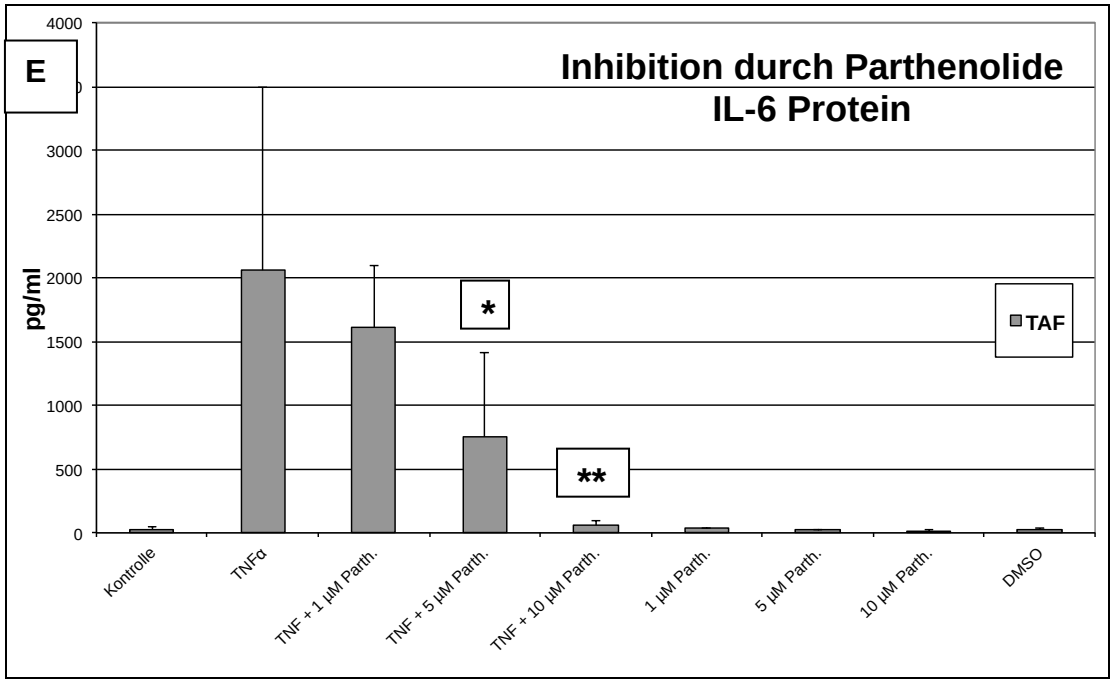
Die isolierten Fibroblastenkulturen wurden mit TNF-α und mit Parthenolin (1, 5 and 10 μM) bzw. Helenalin (0,1, 1 and 10 μM) in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert, die Expression von IL-6 und MCP-1 wurde auf mRNA- und auf Protein-Ebene bestimmt.
Wachstumsverhalten und Morphologie der Fibroblastenkulturen zeigten zunächst keine wesentlichen Unterschiede in Abhängigkeit von Parthenolin oder Helenalin. Es fiel aber eine vermehrte Adhärenz der Zellen unter der Konzentration von 10 μM Parthenolin und Helenalin auf.

**Abbildung 9:** Photographien der Fibroblastenkulturen unter Stimulation mit / ohne TNF und Stimulation mit dem NF-κB-Inhibitor Parthenolin in definierten aufsteigenden Konzentrationen. Exemplarische Aufnahmen der Morphologie der Fibroblasten in 100-facher Vergrößerung.

Die Inkubation mit Parthenolin in niedriger Konzentration zeigte zunächst keinen signifikanten Effekt. Die höhere Konzentrationen von Parthenolin (5 μM) war deutlich inhibitorisch, die mRNA Expression von IL-6 und MCP-1 war nachweislich gehemmt (Abb. 9).

Der inhibitorische Effekt von Parthenolin auf die TNF-α-vermittelte Expression von IL-6 and MCP-1 war ebenfalls auf Protein-Ebene nachweisbar (Abb. 9). Die Ergebnisse hier waren vergleichbar mit der mRNA-Expression. Unterschiede zwischen TAF und LF waren nicht signifikant.



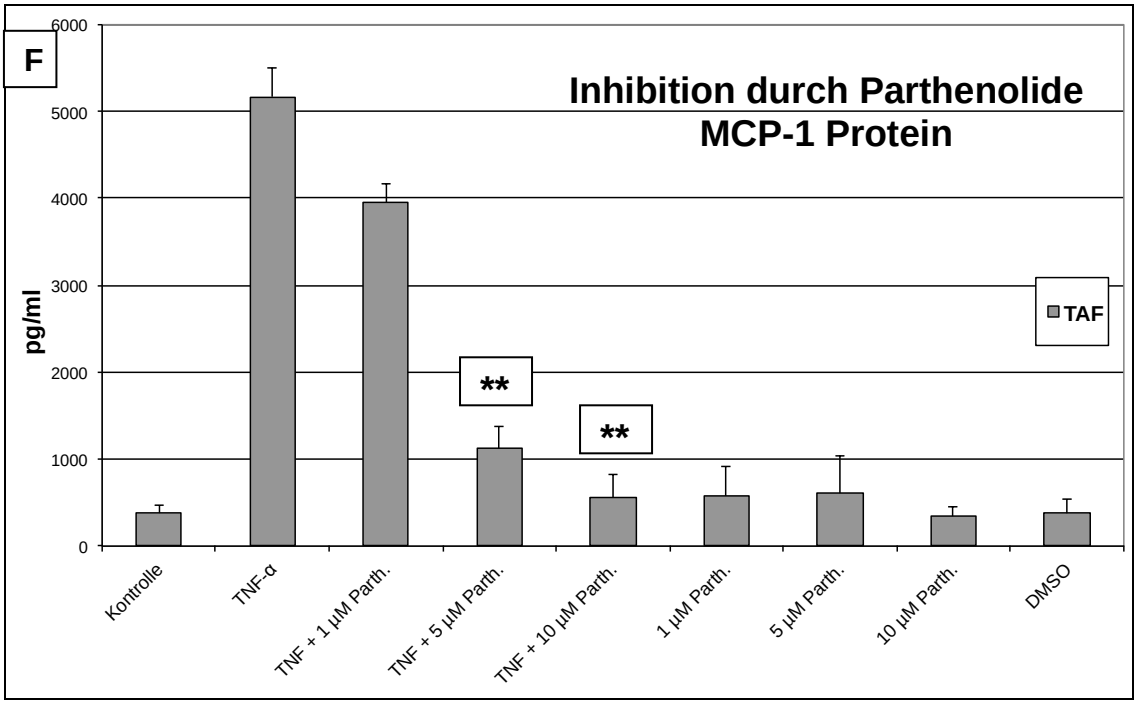



**Abbildung 10:** Parthenolin inhibiert die TNF-α induzierte Expression von IL-6 und MCP-1. (A, C) Repräsentative Northern Blots. Dargestellt ist die mRNA Expression von IL-6 (A) und MCP-1 (C) durch TAF unter Inkubation mit / ohne TNF-α und aufsteigenden Konzentrationen von Parthenolin. (B,D) Als Kontrolle wurde der Northern Blot jeweils mit einer GAPDH-spezifischen Sonde rehybridisiert. (E,F) Der kombinierte Effekt von Inkubation mit / ohne TNF-α und aufsteigenden Konzentrationen von Parthenolin wurde mittels Bead-Array in Form der Protein Expression von IL-6 und MCP-1 gemessen. Die Fibroblastenkulturen waren 24 Stunden unter Stimulation wie in Kap. 3.5.3 beschrieben. (n = 2; Mittelwert ± SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ versus Inkubation mit TNF-α allein).

Auch unter Stimulation mit Helenalin konnten die gleichen Effekte beobachtet werden, also eine Inhibition der Expression von IL-6 und MCP-1 unter aufsteigender Konzentration des Inhibitors Helenalin (1µM), sowol auf mRNA als auch auf Protein-Ebene. Aufgrund der geringen Fallzahl können die Ergebnisse für den inhibitorischen Effekt von Helenalin leider nicht mittels Diagramm dargestellt werden.

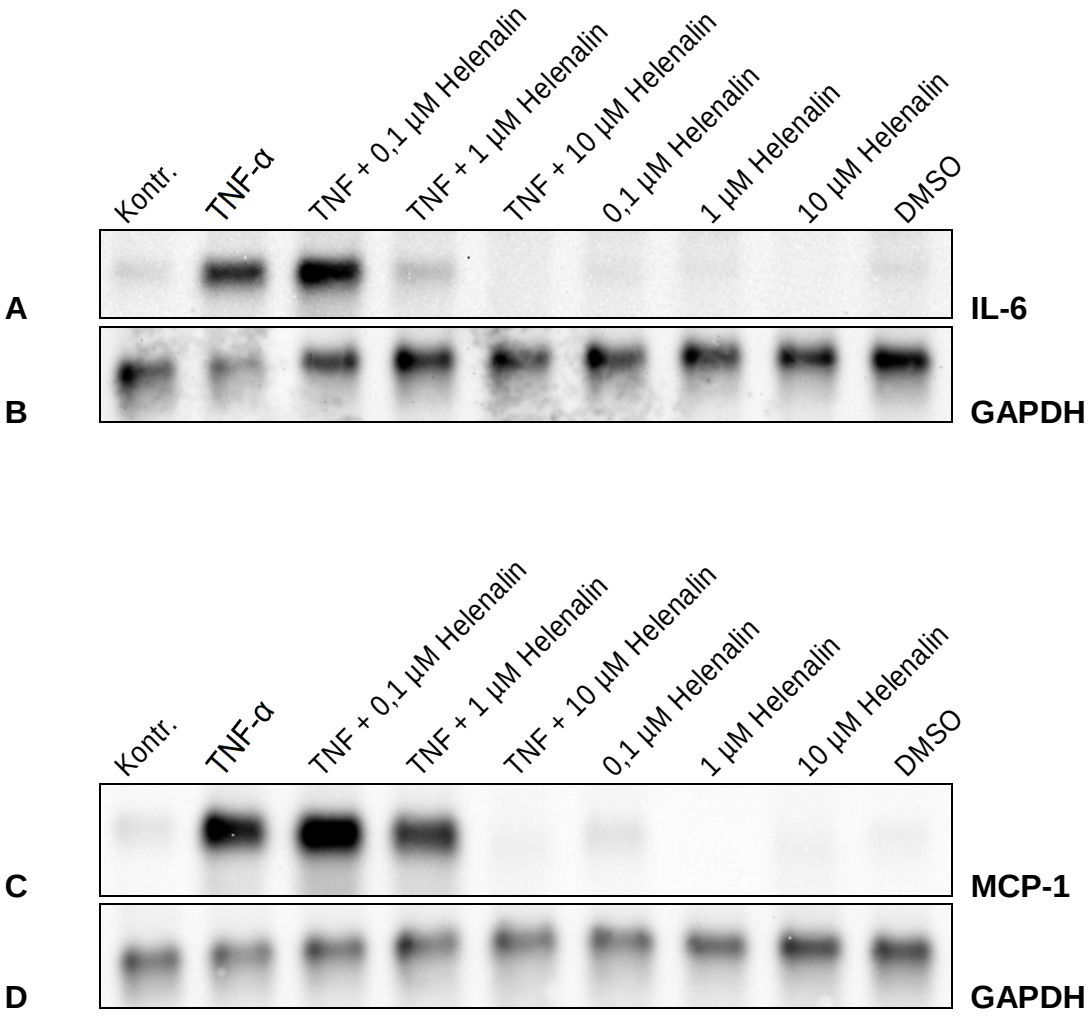



**Abbildung 11:** Helenalin inhibiert die TNF-α induzierte Expression von IL-6 und MCP-1 (n=2 (1xTAFs, 1xLF)). (A, C) Repräsentative Northern Blots. Dargestellt ist die mRNA Expression von IL-6 und MCP-1 durch TAF und LF unter Inkubation mit / ohne TNF-α und aufsteigenden Konzentrationen von Helenalin. (B, D) Kontrolle mittels Housekeeping-Enzym GAPDH.

# 5. Diskussion

Inwieweit Tumorstroma-assoziierte-Fibroblasten (TAF) tatsächlich an der Produktion von inflammatorischen Faktoren beteiligt sind und so ein geeignetes Milieu für die Ansiedlung und Progression von kolorektalen Lebermetastasen kreieren, sollte in der vorliegenden Arbeit weiter evaluiert werden. Nach Isolierung der TAF und Leberfibroblasten (LF) aus Gewebe von kolorektalen Lebermetastasen konnte gezeigt werden, dass diese unter Zellkulturbedingungen das Zytokin IL-6, das Chemokin MCP-1 und das Adhäsionsmolekül ICAM-1 produzieren.

TNF-α, dem eine zentrale Rolle in inflammatorischen Prozessen zugeschrieben wird, wurde immunhistochemisch in Tumorzellen und in mononukleären Zellen nachgewiesen (Abb. 2). Das Chemokin MCP-1 war mittels immunhistochemischer Färbung deutlich in den Tumorzellen im Metastasengewebe nachzuweisen. Wie zu erwarten, wurde MCP-1 zudem in den vorkommenden Entzündungszellen nachgewiesen, die Fibroblasten des Tumorstromas ließen sich jedoch kaum anfärben (Abb. 3).

In den Versuchen mit primär isolierten Fibroblastenkulturen induzierte TNF-α die Expression von IL-6, MCP-1 und ICAM-1 (Abb. 6; Abb. 7; Abb. 8), umgekehrt konnte eine Inhibition durch die Sesquiterpenlaktone Parthenolin und Helenalin nachgewiesen werden, die als selektive Inhibitoren des NF-κB-Signalweges bekannt sind (Abb. 10; Abb. 11).

**Expressionsmuster der Metastase versus Lebergewebe**

Es wurde untersucht, ob Gewebe von kolorektalen Lebermetastasen eine hochregulierte mRNA-Expression von IL-6, MCP-1 und ICAM-1 besitzt. Dieses würde erklären, warum bei Patienten mit fortgeschrittenen kolorektalen Lebermetastasen deutlich erhöhte Serumwerte von inflammatorischen Faktoren und insbesondere von IL-6 gemessen werden. In den beschriebenen Versuchen mit Gewebe von 11 Patienten konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von IL-6, ICAM-1 und MCP-1 im Metastasengewebe vs. angrenzendes Lebergewebe nachgewiesen werden. Von diesen Daten ausgehend bleibt es zunächst unklar, inwieweit die erhöhten Werte von IL-6,

MCP-1 and ICAM-1 einfach den Anteil von Tumorgewebe in der Leber widerspiegeln oder weitere Aussagen abgeleitet werden können.
In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis von einer signifikanten Korrelation der Expressionsmuster innerhalb der einzelnen Patienten (Abb. 4). Auch wenn der dafür verantwortliche Mechanismus noch unklar ist, kann spekuliert werden, dass individuelle Unterschiede in lokaler und systemischer inflammatorischer und immunregulatorischer Aktivität bestehen. Eine andere Möglichkeit, und damit potentielle Limitation unserer diesbezüglichen Daten, ist die Tatsache, dass die Gewebeproben aus dem entfernten Lebergewebe durch das chirurgische Trauma im Rahmen der Lebeteilresektion artifiziell eine erhöhte inflammatorische Aktivität aufweisen.

**Effekt des Zytokin-Chemokin-Netzwerkes**

Die vorliegenden Daten zeigen, dass primär kultivierten Fibroblastenkulturen von humanen kolorektalen Lebermetastasen eine bedeutende Quelle für pro-inflammatorische Moleküle sind, die wiederum Tumorprogression und Metastasierung fördern. Insbesondere TNF-$\alpha$ führt zu einer signifikanten Hochregulation der pro-inflammatorischen Faktoren IL-6, MCP-1 und ICAM-1. Die prominente pro-inflammatorische Aktivität von TNF-$\alpha$ via NF-$\kappa$B im Vergleich zu anderen Wachstumsfaktoren in Hinblick auf TAF und Fibroblasten vom normalen Lebergewebe ist evident.
Es ist anzunehmen, dass ein wichtiger Zusammenhang zwischen Inflammation und Angiogenese besteht. Khatib und Mitarbeiter konnten im Mausmodell zeigen, dass erhöhte TNF-Level eng mit dem Metastasierungspotential korrelierten (Khatib et al. 2005). Es darf hierbei jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass fibroblastische Zellen, deren Ursprung nicht eindeutig geklärt ist, sich ganz anders verhalten können als die in der genannten Studie untersuchten peripheren Blutzellen.
Heutiger wissenschaftlicher Konsens ist, dass sowohl von Entzündungs- als auch von Tumorzellen eine Vielzahl von Mediatoren produziert werden, unter anderem PDGF und TNF, und so ein tumorförderndes, inflammatorisches Milieu geschaffen wird. TNF nimmt eine Schlüsselposition in der Entzündungsantwort ein und wird über den Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert. IL-6 wiederum ist in Entzündungsreaktionen ein wichtiger proinvasiver,

chemotaktischer Faktor und wird von vielen Zellen nach Exposition mit TNF vermehrt gebildet. Gerade bei malignen Prozessen triggern die pro-inflammatorischenden Faktoren TNF und IL-6 Tumor-assoziierte Entzündungsprozesse und Tumorgenese und gelten als führende Regulatoren (Grivennikov und Karin 2011).

Wie bereits in Kapitel 2.4.1 beschrieben, wurde in Studien nachgewiesen, dass bei Patienten mit kolorektalem Karzinom das Serumlevel von IL-6 positiv mit der IL-6 Expression im Tumorgewebe, mit der Tumorgröße und mit dem Vorliegen von Lebermetastasen korreliert (Kinoshita et al. 1999; Ueda et al. 1994). In experimentellen in vitro Studien jedoch zeigten Zelllinien des Kolonkarzinoms sehr unterschiedliche Proliferation unter IL-6, und nur eine Minderheit der getesteten Zelllinien hatte eine ernsthafte Translation des IL-6 Proteins (Brozek et al. 2005; Matsuo et al. 2003; Schneider et al. 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass erhöhte IL-6 Serumlevel bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen vielmehr durch Produktion im Tumorstroma und nicht in den Tumorzellen selbst zustande kommen.

Es steht fest, dass IL-6 durch Hoch-Regulation von Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren vielfältige Rollen bei Entzündungsprozessen und Angiogenese spielt (Cohen et al. 1996), und es ist weiter zu prüfen, inwieweit das von TAF produzierte IL-6 indirekt das Mikromilieu der Tumorzellen moduliert, so dass Metastasierung fortschreiten kann.

MCP-1 ist neben seiner typischen Rolle als chemotaktischer Faktor für Monozyten auch als chemotaktisch wirkend auf Endothelzellen beschrieben worden (Salcedo et al. 2000), und wird als mitogener Faktor für Tumorzellen eingeschätzt, wie beim Prostatakarzinom bereits bewiesen wurde (Lu 2006). Die aktuell vorliegenden Daten der Literatur legen nahe, dass TNF-$\alpha$ induzierte Expression durch TAF über einen pro-inflammatorischen Mechanismus die Metastasierung triggert. Unser Nachweis, dass TAF durch Induktion von TNF-$\alpha$ signifikante Mengen an MCP-1 produzieren (Abb. 7), unterstützt die Hypothese, dass diese Zellen einen bedeutenden Anteil der Tumorprogression triggern.

In unseren in vitro Experimenten mit den Fibroblastenkulturen war die Expression von MCP-1 unter Stimulation mit TGF-β1 deutlich herunter reguliert, bei TAF und LF in gleichem Maße. Die Expression von IL-6 und ICAM-1

hingegen blieb im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Die bisher veröffentlichten Arbeiten zum Effekt der Zytokine auf IL-6 und MCP-1, produziert durch Fibroblasten, sind widersprüchlich und komplex. Im Gegensatz zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit wird in der Literatur beschrieben, dass in Fibroblasten aus humanem Gewebe der Tenon`schen Kapsel TGF-β1 die IL-6 Expression induziert (Seong et al. 2009). In Fibroblastenkulturen, isoliert aus penilen fibrotischen Plaques von Patienten mit Peyronie's disease, bewirkte TGF-β1 eine Hochregulation von MCP-1, und dies insbesondere im Vergleich zu Fibroblasten aus gesunder peniler Haut (Szardening-Kirchner et al. 2009). Arbeiten bezüglich des Effektes von TGF-β1 auf IL-6 und MCP-1 explizit zu Tumorstroma-assoziierten Fibroblasten oder zu kolorektalen Lebermetastasen finden sich aktuell noch nicht in der Literatur.

Unsere Daten zeigen, dass ICAM-1 von TAF aus kolorektalen Lebermetastasen produziert wird. In der Literatur wird ICAM-1 eine widersprüchliche Rolle zugeschrieben. Einerseits ist ICAM-1 ein Ligand für $\beta_2$-Integrine die von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten präsentiert werden, und auf diesem Weg direkt oder zumindest indirekt an der Tumorprogression beteiligt (Witkowska et al. 2004; Roland et al 2007). Die lösliche Form von ICAM-1 (sICAM-1) hat in Studien bei Patienten mit kolorektalem Karzinom in direktem Zusammenhang mit Tumorlast und Progress der Erkrankung gestanden (Araki et al. 2001; Alexiou et al. 2001). Darüber hinaus wurde sICAM-1 in experimentellen Studien als angiogenetischer Faktor identifiziert (Gho et al. 2001). Andererseits gibt es Daten, dass die Expression von ICAM-1 durch Kolonkarzinom-Zellen im Primärtumor eine negative Korrelation zum Vorliegen von Leber-Metastasen hat, am ehesten verursacht durch lokale Immunaktivierung (Maeda et al. 2002). So kann möglicherweise erklärt werden, warum sich in unseren Untersuchungen der Trend zeigte, dass ICAM-1 im Vergleich zum Metastasengewebe verstärkt im Lebergewebe (vom Tumor entfernt) exprimiert wird, die TAF hier also eine größere Bedeutung als die Tumorzellen haben. Demzufolge sind hier weitere Untersuchungen von großer Relevanz.

**Funktionelle Unterschiede zwischen Tumorstroma-assoziierten-Fibroblasten (TAF) und „normalen“ Leberfibroblasten (LF)**

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit in den Zellkulturversuchen kein signifikanter Unterschied zwischen den TAF, die als “aktivierte Fibroblasten” beschrieben werden, und den aus entferntem Lebergewebe (nicht-Tumor) isolierten Fibroblasten nachgewiesen werden. Dieses widerspricht zunächst der Hypothese, dass Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten spezielle Eigenschaften aufweisen und sich von „normalen“ Fibroblasten unterscheiden, so wie es in der Literatur wiederholt beschrieben wurde. TAF aus dem Tumorstroma des Mammakarzinoms zeigten z.B. einen deutlich stärkeren Effekt auf das Tumorwachstum als „normale“ Fibroblasten aus dem Brustgewebe derselben Patienten (Orimo et al. 2004). Die gleichen funktionellen Unterschiede wurden zwischen TAF und Fibroblasten beim Prostatakarzinom beschrieben (Olumi et al. 1999). Aus kolorektalen Lebermetastasen isolierte TAF zeigten im Unterschied zu „unbeteiligten“ Fibroblasten derselben Patienten ein deutlich hoch-reguliertes Expressionsprofil und stimulierten die Proliferation einer Kolonkarzinom-Zelllinie (Nakagawa et al. 2004).

Bedenkt man jedoch die Möglichkeit, dass schon die Anwesenheit einer einzigen Lebermetastase die gesamte Leber durch einen parakrinen Effekt beeinflussen kann, scheint das Ergebnis unserer Daten nicht unmöglich. Es ist somit möglich, dass die Myofibroblasten, die aus tumorfreiem Lebergewebe gewonnen wurden, durch bereits stattgefundene parakrine Effekte eine Heterogenität in ihrem Expressionsprofil aufweisen können und somit einen möglicherweise vorhandenen Unterschied zwischen den Fibroblasten bereits aufgehoben haben. Dieser Aspekt ist durchaus denkbar, so haben Kaplan et al. beispielsweise in ihrer großen in-vivo Studie gezeigt, dass ortsständige Fibroblasten im Stroma bereits vermehrt das extrazelluläre Matrix Protein Fibronectin produzierten, bevor dort Tumorzellen zirkulierten und sich dort eine Metastase ansiedelte (Kaplan et al. 2005).

Eine andere Erklärung wäre, dass bestehende Unterschiede zwischen TAF und Organ-spezifischen Fibroblasten sich durch unsere Kultivierung auf Plastik-

Material unter den gewählten Kulturbedingungen nicht in vitro reproduzieren lassen, da diese nie dem originalen Milieu in vivo entsprechen.

Zusammenfassend bedeutet dieses, dass TAF als eine heterogene, Tumor- und Organ-spezifische Zellpopulation zu verstehen sind, die über verschiedene Mechanismen Tumorentstehung begünstigen, deren Herkunft und Zusammenhang mit normalen Fibroblasten oder Fibroblasten-Vorstufen noch nicht gelöst sind. Falls Fibroblasten aus gesundem Lebergewebe aber tatsächlich die Möglichkeit besitzen, die gleichen Eigenschaften wie TAF auszubilden, würde dieses indizieren, dass Lebergewebe potente fibroblastische Zellen besitzt, die bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt Metastasierung und Progress vorantreiben können.

**Der TNF-α/NF-κB pathway**

Das „microenvironment“ eines Tumors und besonders die Interaktion zwischen Tumor und Tumorstroma spielen eine kritische Rolle bezüglich Tumorentstehung, Metastasierung und Progress. Die Funktionen des Tumorstromas sind durchaus schlechter verstanden als die der Tumorzellen selbst. Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten TAF sind die die dominierende Komponente im Tumorstroma der Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms. Inhibition des TNF-α/NF-κB pathways, insbesondere gezielt im Mikromilieu der Tumorzellen, kann eine effektive Möglichkeit darstellen um den Progress von Lebermetastasen beim kolorektalen Karzinom abzuschwächen (Wang et al. 2009). Ein Kennzeichen von NF-κB besteht darin, dass zahlreiche Gene unter seiner Kontrolle stehen, dies prädestiniert NF-κB für den Einsatz bei Prozessen, die eine schnelle und umfassende Änderung der Gentranskription erforderlich machen. Die Sesquiterpenlaktone Parthenolid und Helenalin, pflanzliche Extrakte aus dem Mutterkraut (engl. Feverfew) und aus Arnikablüten, sind als Inhibitoren des NF-κB-Pathways identifiziert (Nam 2006; Rüngeler et al. 1999).

In vorangegangenen Arbeiten an ebenfalls aus kolorektalen Lebermetastasen isolierten TAF konnte demonstriert werden, dass die TNF-α vermittelte Expression von IL-8 gehemmt wird (Müller et al. 2007). Der gleiche Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit für die Expression von IL-6 und MCP-1 unter

Ko-Stimulation mit Parthenolid und Helenalin nachgeweisen werden. Damit ist die Expression dieser wichtigen pro-inflammatorischen Faktoren über die gezielte Inhibition des NF-κB-Pathways zu steuern und als relevanter Ansatzpunkt für eine pharmakologische Therapie zu interpretieren.

Die Therapie des fortgeschrittenen und metastasierten kolorektalen Karzinoms umfasst heute neben den klassischen Chemotherapeutika (u.a. Fluorppyrimidine, Irinotecan, Oxaliplatin) zunehmend monoklonale Antikörper gegen angiogenetische Faktoren oder intrazelluläre Signalwege: VEGF-Inhibitor (Bevacizumab) und Inhibitoren des EGF-Rezeptors (Cetuximab und Panitumumab) (Folprecht 2010). Trotz guter klinischer Erfolge der bisher etablierten oben genannten Target-Therapie beim metastasierten kolorektalen Karzinom bedarf es der Erforschung weiterer relevanter Signalwege und Wachstumsfaktoren, die auf Metastasierung und Tumorprogress einen Einfluss haben. Ein attraktives Ziel ist hierbei das Tumorstroma und in diesem Zusammenhang der TNF-α vermittelte NF-κB pathway. In der aktuellen Literatur wird der akzeptierte Zusammenhang zwischen Entzündung und Tumorgenese betont, der Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert Zellproliferation, immunologische und infektiologische Prozesse und Tumorentstehung (Wang et al. 2009). Diese Daten implizieren die Inhibition des NF-κB-pathway als wichtiges therapeutisches Ziel beim kolorektalen Karzinom.

# 6. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom stellt in Deutschland eine der häufigsten Krebserkrankungen dar, wobei besonders das Auftreten von Lebermetastasen für den Patienten eine schlechte Prognose bedeutet. In hepatischen kolorektalen Metastasen bilden Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten (TAF) den zellulären Hauptbestandteil des Tumorstromas, wobei ihre genaue Herkunft und ihre Funktionen jedoch wenig erforscht sind.

Ziel der Arbeit war zu prüfen, inwieweit TAF ein proinflammatorisches Milieu erzeugen und so die Progression der kolorektalen Lebermetastasen steuern. Die Stichprobe umfasste dabei 11 Gewebeproben von kolorektalen Lebermetastasen und resultierende Fibroblastenkulturen. Die verwendeten Labor-Nachweismethoden waren Immunhistochemie, RT-PCR, Northern-Blot und Cytometric Bead-Array. Anhand dieser konnte das Expressionsmuster der TAF sowie der Leberfibroblasten (LF) untersucht werden.

Die Produktion von TNF-α und MCP-1 war immunhistochemisch in kolorektalen Lebermetastasen nachweisbar. Die aus den Lebermetastasen kultivierten fibroblastischen Zellen exprimierten IL-6, MCP-1 und ICAM-1. Die Stimulation der TAF, aber auch der LF, mit TNF-α bewirkte eine deutliche Induktion von IL-6, MCP-1 und ICAM-1 auf mRNA und auf Protein-Ebene. Unter Stimulation mit PDGF- β / β und EGF zeigte sich kein verändertes Expressionsmuster. TGF-β1 führte zu einer signifikanten Hemmung der Expression von MCP-1; auf IL-6 und ICAM-1 hatte TGF-β1 keinen Effekt. Die Ko-Stimulation mit den NF-kappaB-Inhibitoren Parthenolin und Helenalin führte zu einer signifikanten Inhibition der Expression von IL-6 und MCP-1.

Dadurch bestätigt sich die These, dass TAF, aber eben auch Leber-spezifische Fibroblasten aus nicht-tumorösem Gewebe, sehr sensibel auf TNF-α vermittelte Wachstumssignale reagieren und dementsprechend ihr Expressionsmuster verändern. Diese Zellen stellen somit im Stroma der kolorektalen Lebermetastasen eine Quelle für die pro-inflammatorischen Faktoren IL-6, MCP-1 und ICAM-1 dar. Der TNF-α vermittelte NF-kappaB-Pathway erscheint als aussichtsreiches Ziel für medikamentöse Therapiezwecke gegen die hepatische Metasasierung kolorektaler Karzinome.

# 7. Literaturverzeichnis


Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G (2006) Inflammation and cancer: how hot is the link? Biochem Pharmacol 72(11):1605-1621.

Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis I, Tsigris C (2001) Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery, Eur. J. Cancer 37:2392-2397.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008 Apr 1;26(10):1626-34.

Araki T, Miki C, Kusunoki M(2001) Biological implications of circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 in colorectal cancer patients, Scand. J. Gastroenterol. 36:399-404.

Ashizawa T, Okada R, Suzuki Y, Takagi M, Yamazaki T, Sumi T, Aoki T, Ohnuma S, Aoki T (2005) Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: role of IL-6 as a prognostic factor. Gastric Cancer 8(2):124-131.

Bailey C, Negus R, Morris A, Ziprin P, Goldin R, Allavena P, Peck D, Darzi A (2007) Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. Clin Exp Metastasis 24(2):121-30.

Banno T, Gazel A, Blumenberg M (2005) Pathway-specific profiling identifies the NF-kappa B-dependant tumor necrosis factor alpha-regulated genes in epidermal keratinocytes. J Biol Chem 280: 18973-18980.

Barnes PJ, Karin M (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med. 336:1066-1071.

Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiol Genomics 21:389-395.

Bierie B, Moses HL (2006) TGF-β and cancer. Cytokine Growth Factor Rev 17:29-40.

Bird NC, Mangnall D, Majeed AW (2006) Biology of colorectal liver metastasis: A review. J Surg Oncol 94:68-80.

Brivanlou AH., Darnell Jr JE (2002) Signal Transduction and the Control of Gene Expression. Science 295:813-818.

Bronzert DA, Pantazis P, Antoniades HN, Kasid A, Davidson N, Dickson RB, Lippman ME (1987) Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A. 84(16):5763-7.

Brown AMG, Edwards CM, Davey MR, Power JB, Lowe KC (1997) Pharmacological activity of feverfew [Tanacetum parthenium (L.) Schultz-Bip.]: assessment by inhibition of human polymorphonuclear leukozyte chemiluminescence in-vitro. J Pharm Pharmacol 49:558-561.

Brozek W, Bises G, Girsch T, Cross HS, Kaiser HE, Peterlik M (2005) Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumour progression. Eur. J. Cancer 41:2347-2354.

Chung YC, Chang YF (2003) Serum interleukin-6-levels reflect the disease status of colorectal cancer. J Surg Oncol 83(4):222-226.

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

Craig MJ, Loberg RD (2006) CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) in cancer bone metastasis. Cancer metastasis Rev 25:611-619.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 351(4):337-45.

Derynck R, et al. (1987) Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. Cancer Res 47(3):707-712.

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A (2001) TGF-beta signalling in tumor suppression and cancer progression. Nat Genet 29(2):117-129.

Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G (2004) The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. Int J Dev Biol 48(5-6):509-17.

Dhawan P, Singh AB, Ellis DL, Richmond A (2002) Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. Cancer Res 62(24):7335-42.

Dickson RB, et al. (1987) Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17 beta-estradiol or v-Ha-ras oncogene. Proc Natl Acad Sci 84(3):837-841.

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

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

Fokas E, Engenhart-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F, An HX (2007) Metastasis: the seed and soil theory gains identity. Cancer Metastasis Rev 26(3-4):705-715.

Folprecht G (2010) Current medical treatment of metastasized colorectal carcinoma. Chirurg 81(6):507-15.

Geoghegan JG, Scheele J (1999) Treatment of colorectal liver metastases. British Journal of Surgery 86:158-169.

Gho YS, Kim PN, Li HC, Elkin M, Kleinman HK (2001) Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1. Cancer Res 61:4253-4257.

Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A (2006) Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer 6(1):29-31.

Grippo AA, Hall IH, Kiyokawa H, Muraoka O, Shen YC, Lee KH (1992) The cytotoxicity of Helenalin, its mono and difunctional esters, and related sesquiterpene lactones in murine and human tumor cells. Drug Des Disc 8(3):191-206.

Grivennikov SI, Karin M (2011) Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. Ann Rheum Dis 70 Suppl 1:i104-8.

Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L, Li X, Peterson DR, Howard DS, Jordan CT (2005) The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. Blood 105 (11): 4163–9.

Hall IH, Williams WL, Grippo AA, Lee KH, Holbrook DJ, Chaney SG (1988) Inhibition of nucleic acid synthesis in P-388 lymphocytic leukemia cells in culture by sesquiterpene lactones. Anticancer Res 8:33-42.

Hanna E, Quick J, Libutti SK (2009) The tumour microenvironment: a novel target for cancer therapy. Oral Dis 15(1):8-17.

Heldin CH, Westermark B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiol Rev 79(4):1283-316.

Holdon NS, Catley MC, Cambridge LM, Barnes PJ, Newton R (2004) ICAM-1 expression is highly NF-κB-dependant in A549 cells. Eur J Biochem 271(4):785-791.

Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R (2007) Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for Translational Therapeutics. Cancer 110(9):1911-28.

Hughes K, Sugarbaker PH (1990) Resection of the liver for metastatic solid tumors. Surgical Treatment of metastatic cancer. In: Rosenberg SA (Hrsg) Surgical treatment of metastatic cancer. JB Lippincott Company, Philadelphia, S. 125-164.

Humblet Y (2004) Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. Expert Opin Pharmacother 5(7):1621-33.

Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer 6(5):392-401.

Kaplan R, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. Nature 438:820-827.

Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity. Annu Rev Immunol 18: 621-663.

Khatib AM, Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Samani A, Kontogiannea M, et al. (2005) Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis. Am J Pathol 167:749-759.

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):6682-7.

Koga M, Kai H, Egami K, Murohara T, Ikeda A, Yasuoka S, Egashira K, Matsuishi T, Kai M, Kataoka Y, Kuwano M, Imaizumi T (2008) Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. Biochem Biophys Res Commun 365(2):279-84.

Kuroda T, Kitadai Y, Tanaka S, Yang X, Mukaida N, Yoshihara M, Chayama K (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment. Clin Cancer Res 11(21):7629-7636.

Kinoshita T, Ito H, Miki C (1999) Serum interleukin-6 level reflects the tumor proliferative activity in patients with colorectal carcinoma. Cancer 85:2526-2531.

Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, Moldawer LL, Copeland EM 3rd, Mackay S (2001) Nuclear factor-κB is upregulated in colorectal cancer. Surgery 130(2):363–369.

Lindholm PF, Bub J, Kaul S, Shidham VB, Kajdacsy-Balla A (2000) The role of constitutive NF-κB activity in PC-3 human prostate cancer cell invasive behavior. Clin Exp Metastasis 18:471-9.

Loong HH, Ma BB, Chan ATC (2009) Update in antiepidermal growth factor receptor therapy in the management of metastatic colorectal cancer. J Oncol 2009:967920.

Lopez-Franco O, Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, Sanjuan G, Suzuki Y, Ortega L, Blanco J, Egido J, Gomez-Guerrero C (2006) Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(8):1864-70.

Lu Y, Cai Z, Galson DL, Xiao G, Liu Y, George DE, Melhem MF, Yao Z, Zhang J (2006) Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion. Prostate 66(12):1311-1318.

Lyss G, Knorre A, Schmidt TJ, Pahl HL, Merfort I (1998) The anti-inflammatory sesquiterpene lactone Helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. J Biol Chem 273(50):33508-16.

Macias FA, Galindo JC, Castellano D, Velasco RF (1999) Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models (I.): trans,trans-germacranolides. J Agric Food Chem 47:4407-4414.

Maeda K, Kang SM, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, et al. (2002) Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. Oncol. Rep. 9:511-514.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, pp. 411-413 and 418-419 Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Marra F, DeFranco R, Grappone C, Dilani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilizi P (1998) Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. Am J Pathol 152(2):423-430.

Marrone D, Pertosa G, Simone S, Capobianco C, Cifarelli M, Memoli B, Schena FP, Schena G (2007) Local activation of interleukin 6 signaling is associated with arteriovenous fistula stenosis in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 49(5):664-673.

Matsuo K, Oka M, Murase K, Soda H, Isomoto H, Takeshima F, et al. (2003) Expression of interleukin 6 and its receptor in human gastric and colorectal cancers, J. Int. Med. Res. 31:69-75.

Mauro C, Zazzeroni F, Papa S, Bubici C, Franzoso G (2009) The NF-kappaB transcription factor pathway as a therapeutic target in cancer: methods for detection of NF-kappaB activity. Methods Mol Biol 512:169-207.

Meyer G, Hart I (1998) Mechanism of Tumour Metastasis. Eur J Cancer 34(2):214-221.

Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, Broering DC (2007) Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment.The Am Journal of Pathology 171(5):1608-18.

Mueller L, von Seggern L, Schumacher J, Goumas F, Wilms C, Braun F, Broering DC (2010) TNF-alpha similarly induces IL-6 and MCP-1 in fibroblasts from colorectal liver metastases and normal liver fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2;397(3):586-91.

Müller M (2005) Chirurgie, 8.Auflage. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach.

Mueller MM, Fusenig NE (2004) Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. Nat Rev Cancer 4(11):839-49.

Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, E.W. Martin EW Jr, de la Chapelle A, Frankel WL (2004) Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles, Oncogene 23: 7366-7377.

Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ Jr, Sledge GW Jr (1997) Constitutive activation of NF-κB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. Mol Cell Biol 17:3629-39.

Nam NH (2006) Naturally occuring NF-kappaB inhibitors. Mini Rev Med Chem 6(8):945-951.

Natali P, Nicotra MR, Cavalier R, Bigotti A, Romano G, Temponi M, Ferrone S (1990) Differential expression of ICAM-1 in primary and metastatic melanoma lesion. Cancer Res 50:1271–1278.

Newman SF, Sultana R, Perluigi M, Coccia R, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Turner DM, Butterfield DA (2007). An increase in S-gluthathionylated proteins in the Alzheimer's diesase inferior parietal lobule, a preteomics approach. J Neurosc Res 85(7):1506-1514.

Normanno N, De Luca A, Bianco C Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Gene 17;366(1):2-16.

Oka D, Nishimura K, Shiba M, Nakai Y, Arai Y, Nakayama M, Takayama H, Inoue H, Okuyama A, Nonomura N (2007) Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF-κB. Int J Cancer 120(12):2576-81.

Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. Cancer Res. 59:5002-5011.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell 121:335-348.

Paget S (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. Lancet 1:571-573.

Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 18:6853-6866.

Pardali K, Moustakas A (2007) Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. Biochim Biophys Acta 1775(1):21-62.

Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S, Gelfanov V, Boswell SH, Goulet RJ Jr, Sledge GW Jr, Nakshatri H (2000) Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kB is enhanced by IkBa super-repressor and parthenolide. Oncogene 19:4159-4169.

Pérez-Moreno M (2009) When neighbourhodd matters: tumour microenvironment. Clin Transl Oncol 11(2):70-74.

Peterhaensel C, Obermaier I, Rueger B (1998) Nonradioactive Northern blot analysis of plant RNA and the application of different haptens for reprobing. Anal Biochem 15;264(2):279-83.

Proost P, Wuyts A, Van Damme J (1996) Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. J Leukoc Biol 59(1):67-74.

Quin Z, Krüger-Krasagakes S, Kunzendorf U, Hock H, Diamantstein T, Blankenstein T (1993) Expresson of Tumor Necrosis Factor by different tumor cell lines results either in tumor suppression or augmented metastasis. J Exp Med 178:355-360.

Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A (2007) Role of Chemokines in tumor growth. Cancer Lett 256:137-165.

Reeves HL and Friedman SL (2007) Activation of hepatic stellate cells- a key issue in liver fibrosis. Front Biosci 7: d808-d826.

Robert Koch-Institut (Hrsg) 2006 Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch-Institut, Berlin.

Roberts AB, Wakefield LM (2003) The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 100(15):8621-8623.

Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC Jr (2007) ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. Surgery 141:705-707.

Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones S (2006) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. J Leukoc Biol 80(2):227-236.

Ross JJ, Arnason JT, Birnboim HC (1999) Low concentrations of the feverfew component parthenolide inhibit in vitro growth of tumor lines in a cytostatic fashion. Planta Med 65:126-129.

Rudmik LR, Magliocco AM (2005) Molecular Mechanism of hepatic metastasis in colorectal cancer. J Surg Oncol 92(4):347-59.

Rüngeler P, Castro V, Mora G, Gören N, Vichnewski W, Pahl HL, Merfort I, Schmidt TJ (1999) Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. Bioorg Med Chem 7(11):2343-52.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel, S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K, Toi M (2001) Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. Cancer 92(5):1085-91.

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, et al. (2000) Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression, Blood 96:34-40.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2. Auflage Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez-Rovira P, Jimenez E, Carracedo J, Barneto IC, Ramirez R, Aranda E (1998) Serum levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in patients with colorectal cancer: inhibitory effect on cytotoxicity. Eur J Cancer 34(3):394-398.

Schneider MR, Hoeflich A, Fischer JR, Wolf E, Sordat B, Lahm H (2000) Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells, Cancer Lett. 151:31-38.

Sehgal PB (1996) Interleukin-6-type cytokines in vivo: regulated bioavailability. Proc Soc Exp Biol Med 213(3):238-47.

Simmons D, Makgoba MW, Seed B (1988) ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. Nature 331 (6157):624-627.

Seong GJ, Hong S, Jung SA, Lee JJ, Lim E, Kim SJ, Lee JH (2009) TGF-beta-induced interleukin-6 participates in transdifferentiation of human Tenon's fibroblasts to myofibroblasts. Mol Vis 15:2123-8.

Slavin J, Unemori E, Hunt TK, Amento E (1995) Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) mRNA is down-regulated in human dermal fibroblasts by dexamethasone: differential regulation by TGF-beta. Growth Factors 12(2):151-157

Stoffel A (2005) The NF-kappaB signalling pathway: a therapeutic target in lymphoid malignancies? Expert Opin Ther Targets 9(5):1045-61.

Szardening-Kirchner C, Konrad L, Hauck EW, Haag SM, Eickelberg O, Weidner W (2009) Upregulation of mRNA expression of MCP-1 by TGF-beta1 in fibroblast cells from Peyronie's disease. World J Urol 27(1):123-30.

Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, Yashiro M, Maeda K, Ohira M, Nishino H, Hirakawa K (2005) Up-regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumor growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. Eur J Cancer 41(12):1802-1820.

Thomas PS (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci USA 77(9):5201-5.

Trayhurn P, Duncan JS, Nestor A, Thomas ME, Rayner DV (1994) Chemiluminescent detection of mRNAs on northern blots with digoxigenin end-labeled oligonucleotides. Anal Biochem 222(1):224-30.

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

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

Vollmar A, Dingermann T (2005) Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer (2009) Cell Mol Immunol 6(5):327-34.

Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ (1999) The nuclear factor-κB RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. Clin Cancer Res 5:119–27.

Wen J, You KR, Lee SY, Song CH, Kim DG (2002) Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone Parthenolide.

Williams WL Jr, Hall IH, Grippo AA, Oswald CB, Lee KH, Holbrook DJ, Chaney SG (1988) Inhibition of nucleic acid synthesis in P-388 lymphocytic leukemia

tumor cells by helenalin and bis(helenalinyl)malonate in vivo. J Pharm Sci 77(2):178-84.

Witkowska AM, Borawska MH (2004) Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview, Eur. Cytokine Netw. 15:91-98.

Woerdenbag HJ, Merfort I, Passreiter CM, Schmidt TJ, Willuhn G, van Uden W, Pras N, Kampinga HH, Konings AW (1994) Cytotoxicity of flacenoids and sesquiterpene lactones from Arnica species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. Planta Med 60(5):434-437.

Won YK, Ong CN, Shi X, Shen HM (2004) Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. Carcinogenesis 25(8):1449-58.

Woynarowski JM, Konopa J (1981) Inhibition of DNA biosynthesis in HeLa cells by cytotoxic and antitumor sesquiterpene lactones. Mol Pharmacol 19:97-102.

Yamashiro S, Takeya M, Nishi T, Kuratsu J, Yoshimura T, Ushio Y, Takahashi K (1994) Tumor-derived monocyte protein-1 induces intratumoral infiltration of monocyte derived macrophage subpopulation in transplantated rat tumors. Am J Pathol 145(4):856-67.

Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman M (1989). Human monocyte chemoattracting protein-1. FEBS Lett 244(2): 487-493.

# 8. Bezugsquellenverzeichnis

## 8.1 Reagenzien

**Reagenzien Immunohistochemie**

| | | | |
|---|---|---|---|
| ABC-AP Kit | Vectastain ® ABC Kit, Alkaline Phosphatase Mouse IgG | Vector, Grünberg, Germany | AK-5002 |
| DAKO® Biotin Blocking Kit | DAKO® Biotin Blocking Kit | DAKO Corporation, Carpenteria, USA | |
| EnVision™ system | EnVision™ system | Dako, Hamburg, Germany | K 4004 |
| Levamisol | Levamisole Solution | Vector | SP-5000 |
| Hematoxylin | Hematoxylin | DAKO | S 3309 |
| Methanol | Methanol | Sigma | 53401-3 |
| Normalserumlösung | Normal Goat Serum | Vector | |
| PBS-Puffer | Phosphate buffered Saline | Sigma | P-3813 |
| PCNA Kit | Zymed® PCNA Staining Kit | Zymed Laboratories Inc., San Francisco / USA | 93-1143 |
| Substrat Kit | Alkaline Phosphatase Substrate Kit I | Vector | SK-5100 |
| TissueTek® | TissueTek® O.C.T. Compound | Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL | 4583 |

**Reagenzien Zellkultur**

| Artikel | Produktbezeichnung | Hersteller | Bestell-Nr. |
|---|---|---|---|
| Antibiotikum/ Antimykotikum | Antibiotic-Antimycotic | Gibco (Invitrogen GmbH Karlsruhe) | 15240-112 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxid | Sigma | |
| EGF | Epidermal Growth Factor human | Sigma | E 9644 |
| FBS | Fetal Bovine Serum | Gibco | 10500-064 |
| GBSS | Gey's balanced salt solution, 500ml | Sigma, Steinheim | G 9779 |
| Helenalin | Helenalin | BIOMOL Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA | EI301-0500 |
| Parthenolide | Parthenolide | Calbiochem, Bad Soden / D | 512732 |
| PDGF | Platelet-derived Growth Factor B/B, human (hPDGF B/B) | Roche | 1276956 |
| TGF-ß1 | Transforming Growth Factor-b1, human (hTGF-b1) | Roche | 1412272 |
| TNF-α | Tumor Necrosis Factor-α human | Sigma | T0157 |
| Trypsin-EDTA | .05% Trypsin-EDTA | Gibco | 25300-054 |
| Zellkulturmedium | DMEM+GlutaMAX; 500ml | Gibco | 31966-021 |

**Reagenzien molekularbiologische Verfahren**

| Artikel | Produktbezeichnung | Hersteller | Bestell-Nr. |
|---|---|---|---|
| Agarose | Agarose | Invitrogen | 15510-027 |
| Antikörper (Northern Blot) | Anti-Digoxin-AP Fab Fragments | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim | 11 093274910 |
| cDNA-Synthese-Set | 1st strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) | Roche | 11 483 188 001 |
| CDP-Star, ready-to-use | CDP-Star, ready-to-use | Roche | 12 041 677 001 |
| DIG-PCR-Set | PCR DIG Probe Synthesis Kit | Roche | 11 636 090 910 |
| DIG Wash and Block Buffer Set | DIG Wash and Block Buffer Set | Roche, Mannheim | 11 585 762 001 |
| DNA Standard | Gene Ruler™ DNA Ladder Mix | Fermentas | #SM0331 |
| EDTA | EDTA, 5 mM | Sigma | E 7889 |
| Ethanol | Ethanol, Alcool Ethylique Ethanol (C2H5OH | J.T.Baker, Deventer, Holland | 200-578-6 603002005 |
| Ethidiumbromid | Ethidiumbromid, 1% Lösung | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland | 111608 |
| Formaldehyd | Formaldehyde solution | Sigma | F 8775 |
| Formamid | Formamide | Sigma | F 9037 |
| Hybridisierungs-puffer | DIG Easy Hyb | Roche | 11 603 558 001 |
| Loading Dye | 6x Loading Dye Solution | Fermentas | #R0611 |
| Mercaptoethanol | 2-Mercaptoethanol, min. 98 %, 25 ml | Sigma | M3148-25ML |

| | | | |
|---|---|---|---|
| MOPS | MOPS 100 mM<br>3-N (Morpholino)-propanesulfonic | Sigma | M 3183 |
| Natrium-Acetat | Sodium acetate | Sigma | S 2889 |
| Natronlauge | Natronlauge 2 mol / l | Merck | 1.09186.1000<br>60105401 |
| 10x Reaction Buffer | 10 x Reaction Buffer | Roche | 11483 |
| RNA-Isolierung | QIAshredder™ (50) | Qiagen GmbH, Hilden | 79654 |
| RNA-Isolierung | RNeasy® Midi Kit (50) | | 75144 |
| RNA-Isolierung | RNeasy® Mini Kit (50) | | 74104 |
| RNase-Away | RNase AWAY® | Molecular Bio Products | 7002 |
| RNA-Marker | RNA Molecular Weight Marker I, DIG-labeled, 0.3-6.9 kb | Roche | 11 526 529 910 |
| RT-PCR (Puffer) | PCR reaction buffer, 10x conc. | Roche | 11 271 318 001 |
| RT-PCR (Nuclotide Mix) | PCR Nucleotide Mix<br>10 mM each dNTP | Roche | 11 581 295 001 |
| RT-PCR (Reverse Transkriptase) | Taq Polymerase<br>5 U / µl | Roche | 11 418 432 |
| SDS 10% | 10 % SDS<br>Sodium Dodecyl Sulfate Solution | Gibco | 15553-035 |
| Sigma Wasser | Water, 1l | Sigma, Steinheim | W4502 |
| SSC Buffer (20 X) | 20 X SSC Buffer | Invitrogen | 15557-036 |
| TBE Buffer (10x) | 10 x TBE Buffer, 1000 ml | Invitrogen | 15581-044 |

**Reagenzien Bead-Array**

| Artikel | Produktbezeichnung | Hersteller | Bestell-Nr. |
|---|---|---|---|
| Bead Array Kit | BD™Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Master Buffer Kit | BD Biosciences | 558264 |
| FACS Clean | FACS Clean | BD Biosciences | 340346 |
| FACS Flow | FACS Flow | BD Biosciences | 340345 |
| FACS Rinse | FACS Rinse | BD Biosciences | 342003 |
| IL-6 Antikörper (Bead A7) | BD ™CBA Human IL-6 Flex Set | BD Biosciences | 558276 |
| MCP-1 Antikörper (Bead D8) | BD ™CBA Human MCP-1 Flex Set | BD Biosciences | 558287 |

## 8.2 Verwendete Primer

| | |
|---|---|
| Zielgen | **ICAM-1, human** |
| Sequenz Forward Primer | 644- GGC TGG AGC TGT TTG AGA AC |
| Sequenz Reverse Primer | 1021- CCT CTG GCT TCC TCA GAA TC |
| PCR-Produkt-Länge | 378 bp |
| GenBank Accession No. | X06990 (NM_000201.1) |
| Literaturstelle | Simmons et al (1988) |

| | |
|---|---|
| Zielgen | **IL-6, human** |
| Sequenz Forward Primer | 65- GAA CTC CTT CTC CAC AAG CG |
| Sequenz Reverse Primer | 325- TTT TCT GCC AGT GCC TCT TT |
| PCR-Produkt-Länge | 262 bp |
| GenBank Accession No. | NM_000600.1 |
| Literaturstelle | Marrone et al. (2007). |

| | |
|---|---|
| Zielgen | **MCP-1, human** |
| Sequenz Forward Primer | 82- CTC TGC CGC CCT TCT GTG CC |
| Sequenz Reverse Primer | 369- GTC TTC GGA GTT TGG GTT TGC 3’ |
| PCR-Produkt-Länge | 288 bp |
| GenBank Accession No. | X14768 (NM_002982.3) |
| Literaturstelle | Yoshimura et al. (1989) |

| | |
|---|---|
| Zielgen | **GapdH, human** |
| Sequenz Forward Primer | 81- GAA GGT GAA GGT CGG AGT C |
| Sequenz Reverse Primer | 306- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC |
| PCR-Produkt-Länge | 225 bp |
| GenBank Accession No. | NM_002046 |
| Literaturstelle | Newman et al. (2007) |

## 8.3 Lösungen und Puffer

**1,5 % Agarosegel für Standard-Gelektrophorese (60 ml Ansatz)**

- 0,9 g Agarose
- 60 ml 1x TBE
- 4µl Ethidiumbromid (1%)

**1% Agarosegel für Northern Blot Analyse (250 ml Ansatz)**

- 2,5 g Agarose (Invitrogen)
- 187,5 ml Sigma Water
- 50 ml 5x Running Buffer
- 12,5 ml Formaldehyd (37%)
- 3 µl Ethidiumbromid (1%)

**5x Gel Running Buffer**

- 3,28 g Natriumacetat (50 mM Natriumacetat,
- 800 ml Sigma Water (Sigma)

- 20,9 g MOPS (100 mM MOPS, Sigma)
- 10 ml EDTA (5 mM EDTA, Sigma)
- 18-20 ml Natronlauge (2 M Natronlauge Merck), auf PH von 7,0 einstellen

- mit Sigma Water auf 1000 ml auffüllen
- bei Raumtemperatur und lichtgeschützt lagern

**1,33 x Sample Buffer (Ansatz für eine Probe)**

- 2 µl 5 x Running Buffer
- 3,5 µl Formaldehyd (37%)
- 10 µl Formamid

- immer frisch zubereiten oder bei -20°C lagern

**0,1 % SDS Lösung**

- 10 ml 10% SDS (Gibco)
- auf 1 l Aqua dest.

**2 X SSC Lösung**

- 100 ml 20 X SSC
- auf 1 l Sigma Water

**2 x Waschlotion**

- 0,25 g SDS (0,1 % SDS, )
- 25 ml 20 x SSC
- auffüllen mit Aqua dest. auf 250 ml

**0,5 x Waschlotion**

- 0,25 g SDS (0,1 %, )
- 6,25 ml 20 x SSC
- auffüllen mit Aqua dest. auf 250 ml

## 8.4 Gefässe und Zubehör

| Artikel | Produktbezeichnung | Hersteller | Bestell-Nr. |
|---|---|---|---|
| Aquatex® | Aquatex® (aqueous mounting agent) | Merck KGaA, Darmstadt, D | 1.08562 |
| Deckglas | Deckglas, 24 x 60 mm, Stärke No. 1 | Marienfeld, D | 01 012 43 |
| Einmalpinzette, steril | Polysterol-Pinzette | J.Söllner GmbH | 50.40.00 |
| Einmalskalpell | Surgical Disposable Scalpels | B Braun / Aesculap AG, Tuttlingen, D | 5518040 |
| FACS-Tubes | BD Falcon™ 5 ml Polysterole Round-Bottom Tube | BD Biosciences | 352052 |
| Falcon, 50 ml, steril | Cellstar®, 20 Pieces, PP-Test tubes, 50 ml, sterile | Greiner bio-one, Frickenhausen | 227261 |
| Falcon, 15 ml, steril | Cellstar®, 100 Pieces, PP-Test tubes, 15 ml, sterile | Greiner bio-one, Frickenhausen | 188 271 |
| Handschuhe | Peha-soft® Powderfree, small | Hartmann | 942 160 |
| Hybridisierungs-zylinder „Roller Bottle“ | Hybridization bottle, 260 × 40 mm (external dimensions) | Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nümbrecht, D | RPN2516 |
| Küvette | UVette® | Eppendorf AG, Hamburg | 0030 106.300 |
| Membran für Northern Blot | Hybond N+ Nylon Transfer Membran | Amersham Biosciences | RPN303B |
| Multipipetten- | Eppendorf Biopur | Eppendorf | 0030 069.439 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Aufsatz 1,0 ml | Combitips plus 1,0 ml | AG, Hamburg | |
| Multipipetten-Aufsatz 2,5 ml | Eppendorf Biopur Combitips plus 2,5 ml | Eppendorf AG, Hamburg | 0030 069.447 |
| Multipipetten-Aufsatz 5 ml | Eppendorf Biopur Combitips plus 5 ml | Eppendorf AG, Hamburg | 0030 069.455 |
| Parafilm | Parafilm “M” | Brand | 340-284971650 |
| PH-Indikatorstreifen | Neutralit® pH 5-10 | Merck | 1.09533.0001 |
| Pipettenspitzen 10 µl | Filter 10 µl, PCR clean/ sterile | Eppendorf | 0030.000.811 |
| Pipettenspitzen 100 µl | Filter 100 µl, PCR clean/ sterile | Eppendorf | 0030077.067 |
| Pipettenspitzen 1000 µl | Filter 1000 µl, PCR clean/ sterile | Eppendorf | 0030.000.919 |
| Plastikschale groß | Instrumentenschale aus Melamin | PS Kunst-stoffwerke | 2034410010 |
| Plastikschale klein | Instrumentenschale aus Melamin | PS Kunst-stoffwerke | 2035580010 |
| Serolog. Pipettenaufsatz 2 ml | Advantage™ 2 ml Serological pipet | Falcon® | 35 6507 |
| Serolog. Pipettenaufsatz 5 ml | Advantage™ 5 ml Serological pipet | Falcon® | 35 6543 |
| Serolog. Pipettenaufsatz 10 ml | Advantage™ 10 ml Serological pipet | Falcon® | 35 6551 |
| Serolog. Pipettenaufsatz 25 ml | Advantage™ 25 ml Serological pipet | Falcon® | 355 6525 |
| Reaktionsgefäß, steril | Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf Biopur® | Eppendorf AG, Hamburg | 0030 121.589 |
| Reaktionsgefäß, unsteril | Safe-Lock Tubes 1,5 ml, | Eppendorf AG, Hamburg | 0030 120.086 |
| Whatman Papier | Whatman Paper | Schleicher & Schell | 10426693 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Zellstoff | Pehazell® Zellstoff | Hartmann | 9140102 |
| Zellkulturschalen | Nunclon™Surface (150 x 20 mm) | Nunc, Wiesbaden | 168381 |

**Tabelle Gefässe und Zubehör**

## 8.5 Geräte

| **Gerät** | **Bezeichnung** | **Hersteller** |
|---|---|---|
| Autoklav | Autoklav | Medizin und Labortechnik KG, Fritz Gössner, GmbH & Co |
| Bio Doc Analyser | Bio Doc Analyze | Biometra |
| Brutschrank | Heraaeus Function Line, Typ BB16 | Heraeus |
| Digitalkamera | Camedia C 5050 | Olympus |
| FACS | BD FACS Canto™ | BD Biosciences |
| Feinwaage | Adventurer™ | Ohaus Corporation, Giessen Germany |
| Gelelektrophoresekammer | Power Pac 1000 | BioRad |
| Hybridisierungsofen | Hybridization Oven / Shaker | Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nümbrecht, D |
| Magnetrührer / Heizplatte | Rühromag | Retsch |
| Mikro-Dismembranator | Mikro-Dismembranator | B.Braun Melsungen |
| Mikropipette 10 µl | Research® 10 | Eppendorf, Hamburg, Germany |
| Mikropipette 100 µl | Research® 100 | Eppendorf, Hamburg, Germany |
| Mikropipette 1000 µl | Research® 1000 | Eppendorf, Hamburg, Germany |
| Mikroskop | CX41 | Olympus |
| Mikroskop | Wilovert S | Hund Wetzlar |
| Mikrowelle | HMT 822 L | Bosch |
| MultiImager | Fluor-S™ MultiImager | Bio-Rad |
| Multipipette | Multipipette® plus | Eppendorf, Hamburg, |

| | | |
|---|---|---|
| | | Germany |
| Neubauer Zählkammer | Neubauer Zählkammer | Merck, Darmstadt, D |
| PCR-Thermocycler | T3 Thermocycler | Biometra |
| Photometer | Bio Photometer | Eppendorf, Hamburg, Germany |
| Pipettierhilfe | Pipet-aid | Drummond Scientific Co. , Broomall, PA, USA |
| Pumpe | Absauggerät Miniport | Servox Medizintechnik GmbH, Köln |
| Schüttler | KS 501 digital | IKA® Werke GmbH & Co (Staufen, Germany) |
| Speed Zentrifuge | Concentrator 5301 | Eppendorf, Hamburg, Germany |
| Thermomixer | Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg, Germany |
| UV-Crosslinker | UVC 500,<br>UV Crosslinker | Hoefer |
| Vortexgerät | MS 2 Minishaker | IKA® Werke GmbH & Co (Staufen, Germany) |
| Wasserbad | Inkubationsbad<br>Modell 1004 | GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel |
| Werkbank/Bench | Hera Safe, Typ HS 18/2<br>1996 | Heraeus Instruments GmbH |
| Zentrifuge | Centrifuge 5810 R | Eppendorf, Hamburg, Germany |
| Zentrifuge | Centrifuge 5417 R | Eppendorf, Hamburg, Germany |

**Tabelle Geräte**

# 9. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| cDNA | komplementäre DANN |
| CDP | Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.13,7]decan}-4-yl) phenyl phosphate |
| cm | Centimeter |
| CO2 | Kohlenstoffdioxid |
| DIG | Digoxigenin |
| dl | Deziliter |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermal growth factor |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FCS | fetales Kälberserum |
| G | Gramm |
| G | Gravitationskonstante |
| GapdH | Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase |
| GBSS | Gays Balanced Salt Solution |
| ICAM-1 | Intercellular adhesion molecule-1 |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| LF | Leberfibroblasten |
| MCP-1 | monocyte chemoattracting protein-1 |
| mg | Miligramm |
| mRNA | Messenger RNA |
| n | Anzahl |
| nm | Nanometer |
| NF- κB | Nuclear factor-kappa-B |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |

| | |
|---|---|
| PDGF | platelet derived growth factor |
| RNA | ribonucleic acid |
| rpm | rounds per minute |
| rRNA | ribosomale RNA |
| SDS | Sodiumdodecylsulfate |
| SSC | Sodium Salt Citrate |
| TAF | Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten |
| TGF-β1 | transforming growth factor β1 |
| TNF-α | tumor necrosis factor- α |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |

# 10. Abbildungungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Operationspräparat einer Leberresektion, die kolorektale Lebermetastase ist zu Aufbereitungszwecken angeschnitten. Es wurde Gewebe aus der Metastase (Metastasis), aus angrenzendem Lebergewebe (Adjacent liver tissue) und aus entferntem normalen Lebergewebe (Distant liver tissue) entnommen. Tumorstroma-assoziierte-Fibroblasten (TAF bzw. CAF *englisch*) wurden aus dem Metastasengewebe, Leberfibroblasten (LF) aus dem gesunden entfernten Lebergewebe isoliert..... 12

**Abbildung 2:** Immunhistochemische Detektierung von TNF-α in Gewebe von kolorektalen Lebermetastasen, jeweils Detail-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung und die entsprechende Übersichts-Darstellung des angeschnittenen Areals. (A,C,D) Immunzytochemische Färbung gegen TNF- α (rot). (B) Exemplarische Kontrollfärbung zu dem Paraffin-Schnitt von (A) mit dem isotypischen IgG Antikörper MOPC-21. ..... 30

**Abbildung 3:** (A,C,D) Immunhistochemie nach Kryogewebeschnitten von kolorektalen Lebermetastasen, gefärbt gegen MCP-1 (rot); Grenzregion zwischen kolorektaler Lebermetastase und normalem Lebergewebe. (B) Exemplarische Kontrollfärbung zu dem Paraffin-Schnitt von (A) mit MOPC. ..... 31

**Abbildung 4:** Vergleich der gemessen mRNA Expression von IL-6 (A), MCP-1 (B) and ICAM-1 (C) im Metastasengewebe (Metastase) vs angrenzendes Lebergewebe (Übergang) von 11 Patienten. Die mRNA Levels wurden als „fold change“ versus dem entfernten Lebegewebe berechnet. (D) Korrelation zwischen MCP-1 und IL-6 mRNA Levels im Tumorgewebe. (E) Korrelation zwischen MCP-1 und ICAM-1 mRNA im Tumorgewebe. (F) Korrelation zwischen IL-6 und ICAM-1 mRNA Levels im Tumorgewebe... 32

**Abbildung 5:** Primärkultivierte Fibroblasten aus kolorektalen Lebermetastasen (100-fache Vergrößerung). 24-stündige Inkubation unter Kulturbedingungen mit 0,5 % FBS (Kontrolle), 10 % FBS, TGF-β1 (5 ng / ml), PDGF- β / β (10 ng / ml), TNF-α (10 ng / ml) und EGF (10 ng/ ml). . 34

**Abbildung 6:** Effekt der Stimulation mit 10 % FBS, TGF-**β**1, PDGF-BB, TNF-**α** und EGF auf die mRNA- und Protein-Expression von IL-6 durch TAF und LF unter Zellkultur-Bedingungen. (A) Ein repräsentativer Northern Blot zeigt die deutliche Zunahme der Expression von IL-6 mRNA unter Stimulation mit TNF-**α**. (B) Zur Kontrolle wurde der Northern Blot mit einer GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert. (C) Diagramm zur Darstellung der densitometrsichen Analyse der mRNA Expression. (D) Ergebnisse der FACS-Messung aus den Überständen der Fibroblastenkulturen der TAF und LF wie unter 3.8 beschrieben (n = 6 (3x TAF, 3x LF; Mittelwert ± SEM; * p < 0,05, ** p < 0,001 Effekt vs. Kontrolle) ..... 36

**Abbildung 7:** Stimulationsversuche mit Fibroblastenkulturen von kolorektalen Lebermetastasen (TAF) und aus entferntem Lebergewebe (LF). Inkubation mit den Faktoren 10 % FBS, TGF-**β**1, PDGF-BB, TNF-**α** und EGF. (A)

mRNA Expression von MCP-1, hier ein Northern Blot aufgeführt. (B) Negativ-Kontrolle mittels Re-Hybridisierung mit GAPDH-spezifischer Sonde. (C) Im Diagramm werden die Ergebnisse der mRNA-Expression von MCP-1 unter Stimulation dargestellt. Die mRNA ist im Vergleich zur Kontrolle (DMEM + 0,5% FBS) aufgeführt (n = 6 (3x TAF, 3x LF). (D) Messung der Protein-Expression von MCP-1 aus den Zellkulturüberständen der TAF und LF. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 4 verschiedenen Präparationen. (Mittelwert ± SEM; * p < 0,05, ** p < 0,001 Effekt vs. Kontrolle) ..... 38

**Abbildung 8:** mRNA Expression von ICAM-1 durch Fibroblastenkulturen TAF und LF von 6 Patienten. (A) Ein repräsentativer Northern Blot zeigt die signifikant erhöhte Expression von ICAM-1 unter Stimulation mit TNF-**α**. (B) Die Normalisierung zu dem konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gen GAPDH diente als interne Kontrolle. (C) Dieses Diagramm veranschaulicht die Ergebnisse der densitometrischen Analyse der Northern Blots der Stimulationsversuche, die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. (n = 6; Mittelwert ± SEM; * p < 0,05 versus Kontrolle)..... 39

**Abbildung 9:** Photographien der Fibroblastenkulturen unter Stimulation mit / ohne TNF und Stimulation mit dem NF-κB-Inhibitor Parthenolin in definierten aufsteigenden Konzentrationen. Exemplarische Aufnahmen der Morphologie der Fibroblasten in 100-facher Vergrößerung..... 40

**Abbildung 10:** Parthenolin inhibiert die TNF-α induzierte Expression von IL-6 und MCP-1. (A, C) Repräsentative Northern Blots. Dargestellt ist die mRNA Expression von IL-6 (A) und MCP-1 (C) durch TAF unter Inkubation mit / ohne TNF-α und aufsteigenden Konzentrationen von Parthenolin. (B,D) Als Kontrolle wurde der Northern Blot jeweils mit einer GAPDH-spezifischen Sonde rehybridisiert. (E,F) Der kombinierte Effekt von Inkubation mit / ohne TNF-α und aufsteigenden Konzentrationen von Parthenolin wurde mittels Bead-Array in Form der Protein Expression von IL-6 und MCP-1 gemessen. Die Fibroblastenkulturen waren 24 Stunden unter Stimulation wie in Kap. 3.5.3 beschrieben. (n = 2; Mittelwert ± SEM; * p < 0,05, ** p < 0,001 versus Inkubation mit TNF-α allein)..... 42

**Abbildung 11:** Helenalin inhibiert die TNF-α induzierte Expression von IL-6 und MCP-1 (n=2 (1xTAFs, 1xLF)). (A, C) Repräsentative Northern Blots. Dargestellt ist die mRNA Expression von IL-6 und MCP-1 durch TAF und LF unter Inkubation mit / ohne TNF-α und aufsteigenden Konzentrationen von Helenalin. (B, D) Kontrolle mittels Housekeeping-Enzym GAPDH. .... 43

# 11. Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Lutz Fischer für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion und seine freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Björn Nashan danke ich für die Bereitstellung der erforderlichen Arbeitsbedingungen und die wissenschaftliche Förderung.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Priv.-Dozent Dr. med. Lars Müller für die ausgezeichnete und engagierte Betreuung meiner Arbeit bedanken. Insbesondere sein Fachwissen, seine freundlichen Ermutigungen und seine fachlich kompetente Unterstützung weiß ich sehr zu schätzen.

Ein großer Dank geht an das gesamte Team des chirurgischen Forschungslabors. Frau Sigrid Himpel († 2007) hat mir von Anfang an das präzise Ausführen der verschiedenen Methoden beigebracht und mir immer wieder Vertrauen in das Gelingen der Arbeit vermittelt. Frau Silke Brillof war jederzeit für mich ansprechbar und hat mich maßgeblich bei der Durchführung der Versuche unterstützt.

Ganz herzlich möchte ich meinen Eltern und Janne für die geduldige emotionale und positive Unterstützung und die ständige Motivierung danken.
Gerne hätte ich die Freude über den Abschluss der Promotion mit meinem Großvater geteilt.

Und natürlich ein extra Dankeschön an Uli.
Nicht zuletzt ein Dank an meine Freunde, ohne deren Rückhalt und ständige Nachfragen diese Arbeit wohl nie fertig geworden wäre.

# 12. Lebenslauf

**Persönliche Details**

| | |
|---|---|
| Name | Lena von Seggern |
| E-Mail-Adresse | Lena.vonSeggern „ät“ med.uni-duesseldorf.de |
| Geburtsort | Hamburg |
| Staatszugehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

**Studium**

| | |
|---|---|
| 12/2008 | Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung |

**Ärztliche Tätigkeit**

| | |
|---|---|
| Seit 05/2009 | Urologische Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf |

**Originalarbeit**

Mueller L, von Seggern L, Schumacher J, Goumas F, Wilms C, Braun F, Broering DC (2010) TNF-alpha similarly induces IL-6 and MCP-1 in fibroblasts from colorectal liver metastases and normal liver fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2;397(3):586-91.

## 13. Erklärung

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 benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgaben (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzen 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.

(Lena von Seggern)