

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Becker)  
in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Tumorforschung  
Sektion für Molekulare Onkologie (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**TUMOR- ASSOZIIERTE FIBROBLASTEN AUS KOLOREKTALEN  
LEBERMETASTASEN ERHÖHEN DIE ZELLMIGRATION ÜBER DEN  
TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B- SIGNALWEG**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**SCHUMACHER, JENNIFER**

aus (**Steinheim**)

Kiel (**2011**)

Referent: Priv.-Doz. Dr. Lars Müller

Korreferent: Prof. Dr. Siebert, Institut für Humangenetik

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2012

# INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
<b><u>1. Einleitung</u></b>	1
1.1 Kolorektale Karzinome	1
1.2 Lebermetastasierung kolorektaler Karzinome	1
1.3 Die Ausbildung eines entzündlichen Tumor-Stromas	2
1.4 Der TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B- Signalweg	3
<b><u>2. Arbeitshypothese und Fragestellung</u></b>	5
<b><u>3. Material und Methoden</u></b>	6
3.1 Material und Bezugsquellenverzeichnis	6
3.2 Methoden	7
3.2.1 Primärkultur von Leberfibroblasten	7
3.2.2 Zellkultur	8
3.2.3 Kristallviolett Vitalitätsmessung	9
3.2.4 Scratch Wound Assay	10
3.2.5 Modifizierter Boyden Chamber Assay	11
3.2.6 Inhibition von NF- $\kappa$ B durch Parthenolide	12
3.2.7 PBMNC (peripheral blood mononuclear cells)- Isolierung mit Ficoll Dichtezentrifugation	12
3.2.8 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)	12
3.2.9 Statistische Auswertung	13
<b><u>4. Ergebnisse</u></b>	14
4.1 Messung des Einflusses von Parthenolide und TNF- $\alpha$ auf die Vitalität durch den Kristallviolett Assay	14
4.1.1 Einfluss von Parthenolide und TNF- $\alpha$ auf die Vitalität der HT29	15
4.1.2 Einfluss von Parthenolide und TNF- $\alpha$ auf die Vitalität der CAF und LF	17

4.2	Hemmung der TNF- $\alpha$ -vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in CAF durch Parthenolide	20
4.3	Modifizierter Boyden Chamber Assay	21
4.3.1	TNF- $\alpha$ -stimulierte CAF erhöhen die gerichtete Migration von HT29	22
4.3.2	Erhöhung der Migration peripherer mononukleärer Zellen zu CAF durch TNF- $\alpha$ -Stimulation	24
4.3.3	CAF und LF zeigen kein unterschiedliches Migrationsverhalten zu HT29	26
4.4	TNF- $\alpha$ beschleunigt den Wundverschluss bei HT29	27
	<b><u>5. Diskussion</u></b>	28
5.1	Tumor-Stroma-Interaktion in einem entzündlichen Mikromilieu bei kolorektalen Lebermetastasen	28
5.2	Tumor-assoziierte Makrophagen von peripheren mononukleären Zellen und Tumorimmunologie	34
5.3	Vergleich Migrationsverhalten von CAF und LF	36
5.4	NF- $\kappa$ B-Inhibition durch Parthenolide bei Lebermetastasen	37
	<b><u>6. Zusammenfassung</u></b>	40
	<b><u>7. Literaturverzeichnis</u></b>	41
	<b><u>8. Anhang</u></b>	52
8.1	Abkürzungsverzeichnis	52
8.2	Danksagung	54
8.3	Lebenslauf	55

# **1. Einleitung**

## **1.1 Kolorektale Karzinome**

Kolorektale Karzinome gehören bei beiden Geschlechtern zu den häufigsten Karzinomen in der westlichen Welt. Die Ursachen sind multifaktoriell. 90 % der kolorektalen Karzinome entstehen aus vorbestehenden Adenomen, ein kleinerer Teil entsteht aus präkanzerösen Läsionen z.B. durch die familiäre Adenomatosis coli und durch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Böcker 2004). Die Inzidenz beträgt 40 pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland. Die Inzidenz verdoppelt sich bei den über 40-jährigen alle 10 Jahre (Herold 2008). Einzig kurative Therapie ist die radikale Resektion des Karzinoms (Berchtold 2008).

## **1.2 Lebermetastasierung kolorektaler Karzinome**

Die Metastasierung der kolorektalen Karzinome erfolgt zunächst lymphogen. Meist erfolgt dann die hämatogene Metastasierung nach dem Pfortadertyp über die Vena portae. Gemäß der Abflusssituation aus dem Splanchnikusgebiet ist die Leber somit das bevorzugte Zielorgan für die Metastasierung (Böcker 2004). Auch bei Lebermetastasen ist eine Chance auf Heilung nur durch eine Resektion gegeben und die Heilungsrate beträgt dann bis zu 40 % (Berchtold 2008). Viele Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen sind allerdings inoperabel und bedürften anderer Therapiekonzepte (Primrose 2010). Zudem kommt es nach Resektion der Lebermetastasen häufig zum Rezidiv (Kobayashi, Miyagawa 2010).

Der Prozess der Metastasierung auf zellulärer Ebene ist derzeit noch nicht genau verstanden. Allgemein akzeptiert ist jedoch das Konzept, wonach es zunächst zur lokalen Infiltration des Primärtumors mit Verlust der epithelialen Differenzierung kommt (Yilmaz, Christofori 2010). Nach der lokalen Invasion folgt die Intravasation in Lymph- und Blutgefäße. Die Tumorzellen zirkulieren dann durch den Blutkreislauf und verbleiben in den Mikrogefäßen verschiedener Organe wie z.B. der Leber oder der Lunge (Gassmann *et al* 2009). Zur Bildung von Fernmetastasen ist die

Extravasation aus dem Gefäßsystem nötig. Aus den entstandenen Mikrometastasen entstehen dann unter anderem durch Wachstum und Neoangiogenese Makrometastasen (Wellner *et al.* 2010, Weinberg 2007).

### **1.3 Die Ausbildung eines entzündlichen Tumor-Stromas**

Zur Bildung eines Tumorknotens in makroskopischer Größe sind eine Vielzahl an biologischen Vorgängen und Zellen beteiligt.

Die Verbindung von Inflammation und Krebs wurde vor 150 Jahren von Rudolf Virchow insofern beschrieben, dass Malignome auf dem Boden chronischer Entzündung entstehen (O'Hayre *et al.* 2008, Sansone und Bromberg 2011).

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn haben gerade bei länger bestehender Dauer der Krankheit ein erhöhtes Risiko für die Entstehung kolorektaler Karzinome (McConnell, Yang 2009).

Die physiologische Rolle der Inflammation entsteht unter anderem nach Gewebsschädigung. Dabei kommt es zu einer hoch organisierten und limitierten Entzündungsreaktion mit Rekrutierung von Entzündungszellen, Fibroblasten und Makrophagen durch chemotaktische Faktoren und infolge dessen zur Bildung eines Granulationsgewebes. Dabei wird das geschädigte Gewebe durch Neoangiogenese, Synthese von extrazellulärer Matrix und Reepithelialisierung wiederhergestellt. Nach suffizienter Wundheilung werden die Vorgänge gestoppt (Coussens, Werb 2002).

Bei der Bildung einer Metastase kommt es ebenfalls zum Remodeling der extrazellulären Matrix, allerdings zeitlich nicht limitiert und weniger organisiert. Diesen Vorgang nennt man auch desmoplastische Reaktion. Genau wie bei der Wundheilung scheinen auch hier Fibroblasten und Makrophagen durch Bildung eines veränderten reaktiven Stromas z.B. durch die Bildung von Kollagen, welches für die derbe makroskopische Struktur des Tumors verantwortlich ist, involviert zu sein (Ohtani 1998, Martin *et al.* 1996). Der Tumorknoten besteht nicht nur aus malignen Zellen, sondern zum großen Teil auch aus Stromazellen: eine heterogene Zellpopulation aus Fibroblasten, Perizyten, Immunzellen und aus dem Knochenmark stammenden Stammzellen bzw. Progenitorzellen. Die Herkunft und Biologie insbesondere der fibroblastischen Zellen, die auch als Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten bzw. englisch als cancer-associated fibroblasts (CAF) bezeichnet

werden, wird zunehmend diskutiert. Eine Möglichkeit ist die Rekrutierung der CAF aus dem Tumor-infiltrierten Gewebe und die Aktivierung zu Myofibroblasten, die in der Immunhistochemie dann positiv für smooth-muscle-actin- $\alpha$  (SMA- $\alpha$ ) sind. Die andere Möglichkeit ist die Rekrutierung von Fibrozyten aus dem Knochenmark, die sich dann zu Myofibroblasten differenzieren (Wels *et al.* 2008, Le *et al.* 2008). In einer Arbeit konnte die SMA- $\alpha$  Expression im Tumor als Indikator für eine schlechte Prognose beim Kolonkarzinom in fortgeschritteneren Tumorstadien identifiziert werden, was dafür spricht, dass Myofibroblasten die Tumorprogression unterhalten (Tsujino *et al.* 2007).

Krebs wird daher häufig als „Wunde, die nicht heilt“ analog zur chronischen Inflammation beschrieben (Coussens, Werb 2002). Viele proinflammatorische Zielgene spielen eine Rolle bei essentiellen Vorgängen zur Tumorentstehung und – progression, wie die Hemmung der Apoptose, Proliferation, Angiogenese und Invasion (Aggarwal *et al.* 2006).

#### **1.4 Der TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweg**

Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) ist ein proinflammatorischer Transkriptionsfaktor, der durch Zytokine wie der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und viele andere Stimuli wie z.B. bakterielle Lipopolysaccharide oder oxidativen Stress aktiviert wird (Shen *et al.* 2005). TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und eine Immunantwort induzieren kann. Hauptsächliche TNF- $\alpha$ -Produzenten sind Makrophagen, aber viele andere Zellen wie lymphatische Zellen, endotheliale Zellen und Fibroblasten sind in der Lage, TNF- $\alpha$  zu sezernieren. Dysreguliertes TNF- $\alpha$  wurde in pathologischen entzündlichen Prozessen bei der rheumatoiden Arthritis und Morbus Crohn nachgewiesen. Durch die Stimulierung des TNF-Rezeptor 1, der ubiquitär auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wird der NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert (Li, Lin 2008).

Im inaktiven Zustand ist NF- $\kappa$ B im Zytoplasma an den Inhibitor I $\kappa$ B gebunden. I $\kappa$ B maskiert die nukleäre Lokalisationssequenz. Nach Stimulierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges wird I $\kappa$ B durch den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK) an Serin/Threonin-Resten phosphoryliert, was zur Ubiquitinierung und dem darauffolgenden Abbau des I $\kappa$ Bs und somit zur Freilegung der nukleären Translokationssequenz führt. Der

Transkriptionsfaktor ist nun in der Lage, in den Kern zu translozieren und spezifisch an die DNA zu binden, um die Transkription proinflammatorischer Zielgene zu aktivieren (Shen *et al.* 2005). Die genaue Signalantwort differiert je nach Stimulus und Zellart (Patel *et al.* 2000).

Der TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweg wird bei der physiologischen Wundheilung aktiviert (Palumbo *et al.* 2007) und ist ebenso bei der Entstehung von Metastasen involviert. So wurde in der experimentellen Studie von Kitakata gezeigt, dass der TNF-Rezeptor p55 bei der Bildung von Lebermetastasen eine essentielle Rolle spielt. Dabei bildeten sich bei nur 50 % der TNF-Rezeptor p55-knockout Mäusen nach intrasplenischer Tumorzellinjektion Lebermetastasen mit signifikant geringerem Gewicht und geringerem Volumen aus. Im Vergleich bildeten sich bei 90 % der Wildtyp-Mäusen Lebermetastasen aus. (Kitakata *et al.* 2002). Nach intrasplenischer Administration einer Lungenkarzinomzelllinie wurde eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung in der Leber nachgewiesen (Maeda *et al.* 2009).

Ebenso ist NF- $\kappa$ B konstitutiv überexprimiert in verschiedenen Krebsarten wie Brustkrebs (Patel *et al.* 2000) und in vielen Zelllinien von Prostata-, Brust- und Pankreaskarzinomen (Shen *et al.* 2005).

Parthenolide ist ein Sesquiterpene Lactone aus der Pflanze *Tanacetum parthenium*. Der Einsatz dieser Pflanze ist zur Behandlung von Migräne, Entzündungen, Fieber und rheumatoider Arthritis bei Naturvölkern beschrieben worden (Pajak *et al.* 2008). Parthenolide kann spezifisch die Aktivierung des TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweges unterbinden, indem es die Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes supprimiert und damit die Degradation des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B verhindert. Es hat somit eine antientzündliche Wirkung (Zhang *et al.* 2004 a).

## **2. Arbeitshypothese und Fragestellung**

Bei der Ausbildung von Metastasen sind nicht nur die malignen Zellen involviert, sondern auch das Tumorstroma. Dabei kommt es zu einer Entzündungsreaktion und einem entzündlichen Mikromilieu. Die Bedeutung der Stromazellen in diesem Prozess, insbesondere der CAF und deren Interaktion mit den Tumorzellen, ist noch nicht hinreichend erforscht. Die vorliegende Arbeit gründet auf der Hypothese, dass CAF aus der Leber in der Lage sind, hepatische Metastasenbildung zu fördern. Dabei liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der Zellmigration, welche einen essentiellen Schritt im Prozess der Metastasierung darstellt. Tumorzellen müssen in der Lage sein, sich vom Primarius fortzubewegen und im Zielorgan im Gewebe zu wandern, um dort eine Metastase zu bilden. Da auch die Inflammation bei der Tumorentstehung und -unterhaltung mehr und mehr in den Blickpunkt gerückt ist, stellt sich die Frage, ob zunächst CAF in der Lage sind, auf inflammatorische Signale durch den TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweg zu reagieren, und zudem, welchen Einfluss ein entzündliches Mikromilieu auf die Zellmigration von Tumorzellen hat. Ebenso wird die Zellmigration von PBMNCs (peripheral blood mononuclear cells) zu CAF untersucht, um zu klären, ob CAF durch Rekrutierung von Immunzellen ein entzündliches Mikromilieu unterhalten können. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Hemmung der Inflammation durch den beschriebenen NF- $\kappa$ B-Inhibitor Parthenolide die Interaktion der CAF mit den Tumorzellen stört und wie sich dies auf die Migration auswirkt. Zudem ist es interessant zu untersuchen, ob CAF selbst ebenfalls zu Tumorzellen migrieren können und ob sich normale Leberfibroblasten von den CAF hier in ihrem biologischen Verhalten unterscheiden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Material (Bezugsquellenverzeichnis)**

#### **Zelllinien:**

HT29 ATCC (Manassas, VA, USA)

#### **Verbrauchsmaterialien:**

Kulturflaschen (T175) Sarstedt (Newton, USA)  
 Zellkultur Lochplatten Sarstedt (Newton, USA)  
 Membran Inserts: „cell culture inserts“ BD Falcon™ (BD, Franklin Lakes, NY, USA)

#### **Chemikalien/ Reagenzien:**

DPBS (Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline) Gibco® Invitrogen (Grand Island, NY, USA)  
 DMEM (Dulbecco´s modified Eagle Medium) Gibco® Invitrogen (Grand Island, NY, USA)  
 FCS Gibco® Invitrogen (Grand Island, NY, USA)  
 Penicillin/Amphotericin/Streptomycin Gibco® Invitrogen (Grand Island, NY, USA)  
 Trypanblue stain 0,4% Gibco® Invitrogen (Grand Island, NY, USA)  
 Trypsin Gibco® Invitrogen (Grand Island, NY, USA)  
 Kristallviolett Merck (Darmstadt, Deutschland)  
 Methanol Sigma Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, Deutschland)  
 Matrigel (Basement membrane Matrix) BD Medical Systems (Franklin Lakes, NY, USA)  
 Hämalaun nach Mayer Waldeck (Münster, Deutschland)  
 Eosin Waldeck (Münster, Deutschland)  
 Collagenase/Dispase (von Achromobacter iophagus /Bacillus polymyxa) Sigma Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, Deutschland)  
 TNF-α (human) Sigma Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, Deutschland)  
 Parthenolide Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)  
 DMSO Sigma Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, Deutschland)

DDT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
NaCl	J.T. Baker, Niederlande
HEPES	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
KCl	Roth (Karsruhe, Deutschland)

**Kits:**

Ficoll Paque Plus	GE Healthcare Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
Gelshift™ NF-κB Carcinoma	Active Motif (Rixensart, Belgien)
DC™ Protein Microplate Assay	Bio-Rad (Hercules, USA)

**Lösungen:**

Kulturmedium: DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Amphotericin/Streptomycin

EMSA-Puffer I: HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,2 mM, DDT 1 mM

EMSA-Puffer II: HEPES 20 mM, NaCl 0,4 M, EDTA 0,4 mM, DDT 1 mM

Kristallviolett-Färbung: 0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol, 79,5 % Aqua

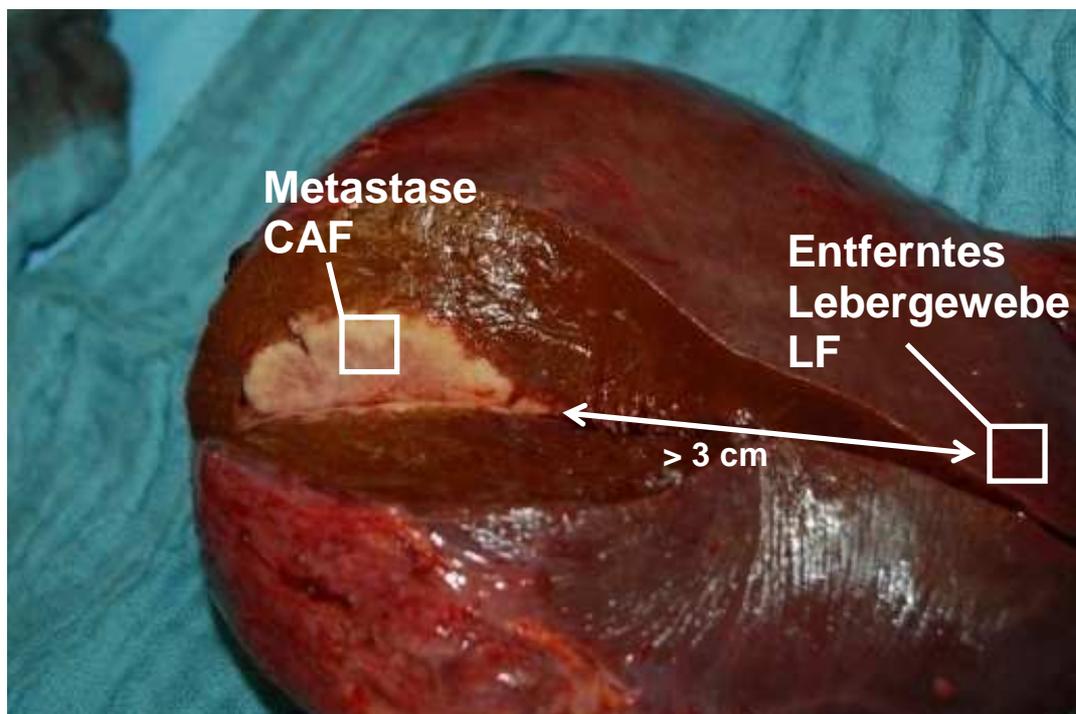
Einfriermedium: 20 % DMSO, 80 % FCS

**3.2 Methoden****3.2.1. Primärkultur von Leberfibroblasten**

Die Primärkulturen wurden aus Geweben entnommen, welche während einer OP mit Einverständnis der Patienten asserviert wurden. Das Gewebe wurde sofort nach der Entnahme mit einem Einmalskalpell in kleine Stücke geschnitten und in einem Falcon (Sarstedt Nürnberg) mit DMEM und 1 mg/ml Collagenase (Sigma, Steinheim, Deutschland) eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach

wurde das Gemisch bei 1420 rpm zehn Minuten zentrifugiert. Die großen Stücke wurden aus der Suspension entnommen, das Zellpellet wurde resuspendiert und in 6-Loch Platten mit 1,5 ml DMEM gebracht. Nach einigen Tagen wurden die adhärennten Fibroblasten trypsinisiert und in großen Kulturflaschen expandiert.

CAF wurden direkt aus der Metastase entnommen. Leberfibroblasten (LF) wurden aus Lebergewebe, welches mindestens drei Zentimeter von der Metastase entfernt war, für die Gewebeaufbereitung genutzt (siehe Abb. 1). Die Kultivierung und das Passagieren der Fibroblasten erfolgt wie in 3.2.2 beschrieben.



**Abb.1 Intraoperatives Leberresektat**

Kolorektale Lebermetastase mit umgebenden Lebergewebe. Aus der Makrometastase wurden die CAF gewonnen, Leberfibroblasten wurden aus einem Gebiet generiert, welches mindestens drei Zentimeter von der Makrometastase entfernt war

**3.2.2 Zellkultur**

HT29 wurden in T175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bei 37°C in einer 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Das verwendete Zellkulturmedium war DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco® Invitrogen New York, USA) mit 10 % FCS (Fetales Kälber Serum,

Gibco® Invitrogen New York, USA) und 1 % Penicillin/Amphotericin/Streptomycin (Gibco® Invitrogen New York, USA). Das Kulturmedium wurde alle drei Tage gewechselt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 % wurden die HT29 passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 7 ml PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco® Invitrogen New York, USA) gewaschen und bis zum sichtbaren Ablösen der Zellen mit 7 ml 10%igem Trypsin (Gibco® Invitrogen New York, USA) in PBS inkubiert. Danach wurde die Zell-Trypsin-Suspension 1:1 mit Medium gemischt und bei 1420 rpm vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in DMEM resuspendiert und auf neue Kulturflaschen gebracht.

Zum Einfrieren der Zellen wurden die Zellen trypsinisiert und zentrifugiert wie oben beschrieben. Nach Trypsinierung und Zentrifugation wurde das Zellpellet (ca. eine Millionen Zellen) in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen pipettiert. Dieses Röhrchen wurde langsam in einem Isopropanolbad im -80°C Gefrierschrank abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen aus flüssigem Stickstoff erfolgte durch rasches Schwenken im 37°C warmen Wasserbad. Die aufgetaute Suspension wurde mit Medium gemischt und zentrifugiert, um das Einfriermedium zu entfernen. Das Zellpellet wurde mit DMEM aufgelöst und in eine Kulturflasche gebracht.

Für die Zellzahlbestimmung wurden aus der Zellsuspension 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau gemischt. Von diesem Gemisch wurden 10 µl in die Neubauerzählkammer gebracht und vier Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Summe der vier Quadrate}}{4} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 = \text{Zellzahl /1000 } \mu\text{l}$$

4

### 3.2.3 Kristallviolett Vitalitätsmessung

Der Kristallviolettassay dient dem Nachweis der Zellvitalität bei adhärenenten Zellen. Kristallviolett ist ein Farbstoff, der die Zellen färbt. Die toten gefärbten Zellen

verlieren ihre Adhärenz und können fort gewaschen werden. Somit werden bei dieser Methode nur die lebenden adhärennten Zellen gefärbt. Nach Trocknen der Lochplatte wird das getrocknete Kristallviolett in den Zellen in Methanol gelöst und die Intensität der Färbung im Mikrotiterplattenphotometer bei 590 nm gemessen.

Für die Vitalitätsmessung mit Kristallviolett wurden  $1 \times 10^4$  HT29 oder  $0,5 \times 10^4$  Fibroblasten in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz wurde der Überstand abgesaugt und 100 µl frisches DMEM als Kontrolle und DMEM plus Zusätzen pro Loch dazu pipetiert.

Bei Beendigung des Assays wurde der Überstand mit den gelösten toten Zellen vorsichtig entfernt, 50 µl in 20 % Methanol gelöstes Kristallviolett (Merck, Darmstadt, Deutschland) in die Wells pipetiert und 20 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die 96-Loch-Platte mit einer Mehrfachpipette mit Aqua destillata gewaschen und getrocknet (entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder zwei Stunden bei 37°C im Inkubator). Nach dem Trocknen wurde 200 µl 100%iges Methanol in die Wells pipetiert und die Platte wieder 20 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Die Färbung mit Kristallviolett korreliert mit der Anzahl der lebenden adhärennten Zellen. Anschließend wird die Platte bei 590 nm photometrisch gemessen. Die unbehandelte Kontrolle entspricht 100 %, die Messwerte der behandelten Zellen werden dazu in Relation gesetzt.

### **3.2.4 Scratch Wound Assay**

Der Scratch Wound Assay wird genutzt, um die zweidimensionale Migration adhärennter Zellen zu untersuchen.

Für den Assay wurden  $0,75 \times 10^6$  HT29 in 6-Lochplatten ausgesät. Nach 24 Stunden war der Monolayer nahezu konfluent. Unterhalb der Wells wurde mit einem Fineliner ein gerader Strich gezogen. Mit einer 200µl-Pipettenspitze wurden im 90° Winkel zu der Finelinerline drei Risse gekratzt. Die dabei gelösten Zellen wurden durch vorsichtiges Waschen mit PBS entfernt. Dann wurde das Medium mit und ohne Zusätze dazugegeben. Die Endkonzentration von FCS betrug in allen Wells 5 %. Gleich nach der Zugabe des frischen Mediums und der Zusätze wird mit dem Phasekontrastmikroskop bei 100facher Vergrößerung von jedem Riss ein Foto angefertigt, wobei auf jedem Bild der Finelinerstrich zu sehen ist, um immer die

gleiche Stelle zu fotografieren. Die Messzeitpunkte lagen bei 0 und 24 Stunden, gemessen wurde der Abstand der Wundränder. Der Wundverschluss wurde in Prozent im Vergleich zum Wundrandabstand zum Zeitpunkt Null angegeben. 100% entspricht vollständigem Wundschluss nach 24 Stunden.

### **3.2.5 Modifizierter Boyden Chamber Assay**

Der modifizierte Boyden Chamber Assay erlaubt die Untersuchung der gerichteten Zellmigration in einem 3D-Modell durch ein mit Poren durchsetztes Membraninsert. Mit diesem Modell kann auch die Migration einer Zelllinie/ Primärkultur in Kokultur untersucht werden, dabei sind die zu migrierenden Zellen im Insert, lösliche Stoffe können ungehindert durch die Poren des Membraninserts ausgetauscht werden.

Die Transwell-Inserts mit 8 µm großen Poren im 24 Loch-Format (BD Falcon™, Franklin Lakes, NY, USA) wurden mit 500 µl Matrigel (1mg/ml) (BD Medical Systems, Franklin Lakes, NY, USA) beschichtet und 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Inserts mit 500 µl FCS-freiem Medium gewaschen. Als nächsten Schritt werden die Zellen dazugegeben, darauf folgend die Zusätze wie TNF-α (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) oder /und Parthenolide. Am Ende das Volumen auf 300 µl im Insert und 900 µl im unterem Well mit DMEM aufgefüllt.

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Inserts mit einer sterilen Pinzette in eine zweite 24-Loch-Platte gesetzt und mit 10%igem Formalin 1 Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Nach Fixierung wurde das Formalin abgesaugt und die Inserts mit H<sub>2</sub>O gewaschen. In einer weiteren 24-Loch-Platte wurden 500 µl Hämalaun und 500 µl Eosin vorgelegt. Zunächst wurden die Inserts 30 Minuten im Hämalaun gefärbt und danach mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach dem Waschen wurde vorsichtig mit einem Wattestäbchen die Innenseite der Inserts ausgewischt. Nach einem weiteren Waschschrift mit H<sub>2</sub>O wird kurz mit Eosin gefärbt und nach einem letzten Waschschrift die Inserts in eine 24-Loch-Platte gesteckt. Um Austrocknung zu verhindern, wird jeweils 500 µl Aqua destillata in die Inserts und unteren Wells pipettiert. Die Quantifizierung der durch die Membran gewanderten Zellen erfolgte durch Auszählung von drei zufällig gewählten Sichtfeldern pro Well, die unter dem

Mikroskop bei 100facher Vergrößerung fotografiert wurden. Für die Auswertung wurde das Programm „Scion Image“ benutzt.

### **3.2.6 Inhibition von NF- $\kappa$ B durch Parthenolide**

Parthenolide (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) wurde 20%igem DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgelöst und in der Zellkultur eingesetzt. Die Endkonzentration des DMSO war in keinem Ansatz höher als 0,1 %, bei dieser geringen Konzentration kann eine Beeinflussung der Experimente durch DMSO ausgeschlossen werden.

### **3.2.7 PBMNC (peripheral blood mononuclear cells)- Isolierung mit Ficoll Dichtezentrifugation**

Gesunden Probanden wurden 50-80 ml Cubitalvenenblut entnommen. Diesem Blut wurde die PBMNC-Fraktion nach dem Ficoll- Paque Plus Protokoll entnommen. Dazu wurde in ein Falcon 3 ml Ficoll-Paque Plus zugegeben und vorsichtig die Blutprobe auf die Ficoll-Plaque Plus-Schicht überlagert. Dieses wurde bei 400xg für 40 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Mit einer Pisteu rpipette wurde die entstandene Lymphozytenschicht entnommen. Die gewonnenen Zellen wurden ein zweites Mal zentrifugiert, in DMEM resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und dann sofort im Versuch eingesetzt. Diese Methode wurde durch die technischen Angestellten Bianca Zinke und Alexandra Sieger durchgeführt.

### **3.2.8 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

Mit dem EMSA können Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden, die an die DNA im Kern gebunden haben. Die DNA-Fragmente im Komplex mit den Transkriptionsfaktoren werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und für den Nachweis mit einem radioaktiven Isotop  $^{32}\text{P}$  markiert. Für den EMSA wurden  $2 \times 10^5$

Fibroblasten in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach Stimulation wurde das Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und die Wells mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 500 µl EMSA-Puffer I zugegeben und die Zellen mit dem Scraper abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorftube pipettiert. Die Eppendorftubes wurden 5 Minuten bei 4°C bei maximaler Geschwindigkeit (14500 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit der Glaspipette abgesaugt. Zum verbliebenden Pellet wurde 40 µl EMSA-Puffer II zugegeben. Auf Eis wurden die Eppendorftubes bei 500 rpm 20 Minuten geschüttelt und danach 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (14500 rpm) und 4°C zentrifugiert. Diesmal wird der Überstand in ein neues Eppendorftube überführt. 16 µl von diesem Überstand werden für die Proteinbestimmung aliquotiert, um bei der Gelelektrophorese immer die gleiche Proteinmenge einsetzen zu können. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Herstellerempfehlung des DC™ Protein Microplate Assay (Bio-Rad, Hercules, USA) Protokolls. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren. Für die Gelelektrophorese wurde das NF-κB (Carcinoma) Gelshift™ Kit Reaction (Active Motif, Rixensart, Belgien) Protokoll nach Herstellerempfehlung befolgt. Diesen Schritt führte Birgit Fricke durch. Dabei wurden 3µg Protein aufgetragen. Das 6% Polyacrylamid-Gel wurde im Anschluss an das Protokoll getrocknet und in einer Filmkassette auf ECL-Chemilumineszenz-Hyperfilm belichtet. Dieses wurde bei -80°C eingefroren und vor dem Entwickeln wieder aufgetaut. Die Filmentwicklung erfolgte in der Dunkelkammer mit dem Curix 60-Filmentwickler (AGFA).

### **3.2.9 Statistische Auswertung**

Angegeben ist der Mittelwert (MW) aller Messdaten  $\pm$  Standardfehler (SEM) von n. N repräsentiert dabei die Anzahl der unabhängigen Versuche. Signifikanztests der Unterschiede wurden mittels t-test durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Messung des Einflusses von Parthenolide und TNF- $\alpha$ auf die Vitalität durch den Kristallviolett Assay**

Die Vitalität der HT29 Karzinomzellen, der CAF und LF wurde mit dem Kristallviolett Assay gemessen. Dabei wurde geprüft, ob TNF- $\alpha$ , Parthenolide oder die Kombination beider Stimulanzen einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben. Weiterhin wurde evaluiert, bei welchen Konzentrationen beider Substanzen keine störenden Einflüsse bei den nachfolgenden Experimenten durch Veränderungen der Zellvitalität zu erwarten sind.

Das fotometrische Messergebnis der Kontrolle (nur Zugabe von 10 % FCS) entspricht 100 %, der Messwert der behandelten Zellen wurde dazu in Relation gesetzt. Nach 24-stündigem Anwachsen mit definierter Zellzahl in der 96-Lochplatte wurden die Zellen in aufsteigender Konzentration mit Parthenolide behandelt (1, 5, 10, 20  $\mu$ M Parthenolide). Zudem wurde jede Zellreihe mit TNF- $\alpha$  (50ng/ml) alleine und in Kombination mit Parthenolide in aufsteigender Konzentration (ebenfalls 1, 5, 10 und 20  $\mu$ M) behandelt. Die gemessenen Zeitpunkte pro Zellart nach Inkubation mit den Stimulanzen sind 24, 48 und 96 Stunden.

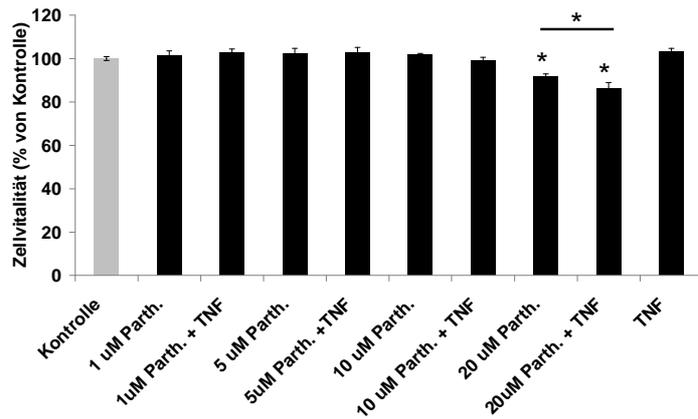
#### 4.1.1 Einfluss von Parthenolide und TNF- $\alpha$ auf die Vitalität der HT29

Abbildung 2 zeigt, dass Parthenolide in den niedrigeren Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  nach 24 Stunden im Vergleich mit der Kontrolle keinen Effekt auf die Vitalität hat. Erst ab 20  $\mu\text{M}$  Parthenolide zeigt sich eine Vitalitätsabnahme um 9 %. Auch bei der Kombination von Parthenolide in den Konzentrationen 1, 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$  mit TNF- $\alpha$  fällt die Vitalität erst ab 20  $\mu\text{M}$  Parthenolide ab. Die Vitalitätsabnahme ist hier bei 14 %. Die Inkubation der Zellen mit 50ng/ml TNF- $\alpha$  alleine verändert die Zellvitalität der HT29 nicht.

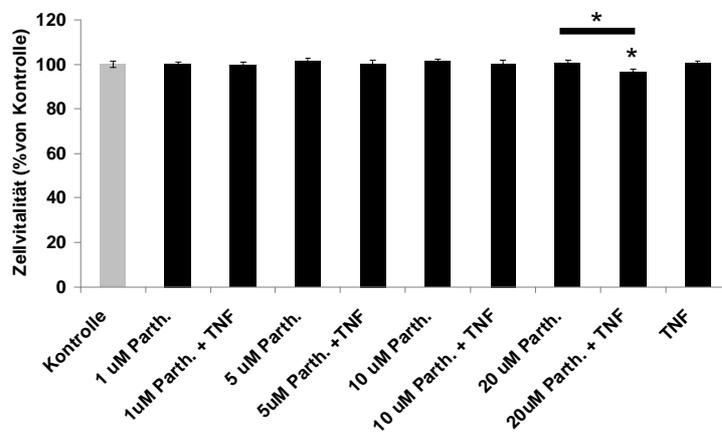
Auch nach 48 Stunden zeigt sich bei den HT29 keine nennenswerte Abnahme der Zellvitalität nach Inkubation mit Parthenolide in den oben genannten Konzentrationen. Die gemeinsame Stimulation mit Parthenolide und TNF- $\alpha$  zeigt ebenso kaum eine Veränderung der Zellvitalität, lediglich bei 20  $\mu\text{M}$  Parthenolide mit TNF- $\alpha$  sinkt die Zellvitalität um 4 %. Die alleinige Zugabe von TNF- $\alpha$  hat auch nach 48 Stunden keinen Effekt auf die Vitalität.

Nach 96 Stunden zeigt sich bei der Kombination von Parthenolide und TNF- $\alpha$  keine signifikante Veränderung der Vitalität der HT29, bei der alleinigen Zugabe von Parthenolide nimmt die Vitalität bei 5  $\mu\text{M}$  um 4 % zu, bei 10  $\mu\text{M}$  um 2 %, um dann bei 20  $\mu\text{M}$  um etwa 3 % abzunehmen. In diesem Versuchsansatz zeigt sich bei der alleinigen Zugabe von TNF- $\alpha$  eine Zunahme der Zellvitalität etwa um 4 %.

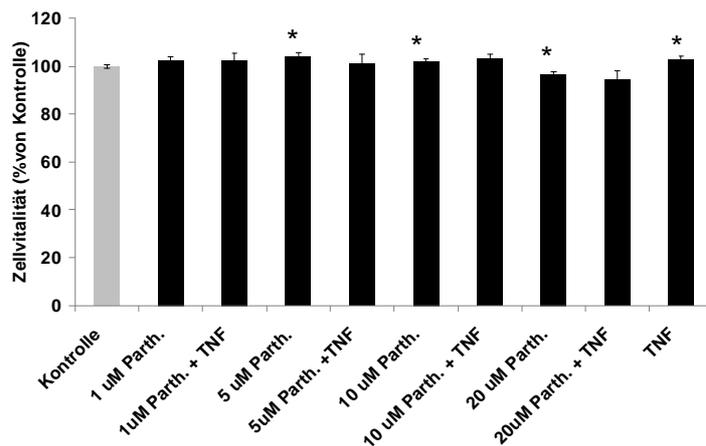
### I Vitalität HT29 (24h)



### II Vitalität HT29 (48h)



### III Vitalität HT29 (96h)



**Abb.2 (I-III) Kristallviolett Assay: Vitalität HT29 nach 24 (I), 48 (II) und 96 (III) Stunden nach TNF- $\alpha$ - und Parthenolide-Stimulation**

Darstellung der gemessenen Extinktionswerte bei 590 nm. Extinktionswert der unbehandelten Kontrolle (10% FCS) = 100%, Extinktionswerte der behandelten Zellen sind dazu in Relation. Parth. = Parthenolide in  $\mu\text{M}$ , TNF = TNF- $\alpha$  (50ng/ml), MW  $\pm$  SEM in %, n=3, \* = p<0.05 vs. Kontrolle bzw.  $\pm$ TNF- $\alpha$

#### 4.1.2 Einfluss von Parthenolide und TNF- $\alpha$ auf die Vitalität der CAF und LF

Zur Vitalitätskontrolle der CAF wurden Fibroblasten benutzt, die primär aus intraoperativ gewonnenem Tumorgewebe einer kolorektalen Metastase stammen. Die LF entstammen gesundem Lebergewebe. Neben der Vitalitätskontrolle wurden mit diesem Versuch CAF und LF vergleichend nebeneinander gestellt.

Nach 24-stündiger Inkubation mit aufsteigender Parthenolide-Konzentration zeigt sich in Relation zur Kontrolle bei Inkubation mit 1 und 5  $\mu\text{M}$  Parthenolide keine nennenswerte Veränderung der Vitalität sowohl bei CAF als auch bei den LF. Bei der Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Parthenolide sinkt die Vitalität der CAF um 30 %. Bei der Zugabe um 20  $\mu\text{M}$  Parthenolide reduziert sich die Vitalität der CAF um 24 %. Bei den LF sinkt die Vitalität bei Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Parthenolide nur leicht ab und reduziert sich erst bei der Parthenolidekonzentration von 20  $\mu\text{M}$  signifikant um 40 %. Bei der Koinkubation von Parthenolide mit TNF- $\alpha$  (50ng/ml) kommt es bei den CAF erst ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Parthenolide zu einer signifikanten Abnahme der Vitalität um 22 % und um 33 % bei der Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  Parthenolide zusammen mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$ . Bei den LF zeigt sich bei der zusätzlichen Zugabe von 50 ng/ml TNF- $\alpha$  kein nennenswerter Unterschied im Gegensatz zur alleinigen Parthenolidestimulation bei der dosisabhängigen Abnahme der Vitalität. Die Messung weist keine signifikante Änderung der Vitalität bei alleiniger Zugabe von 50 ng/ml TNF- $\alpha$  sowohl bei den CAF als auch bei den LF auf (siehe Abb. 3.I).

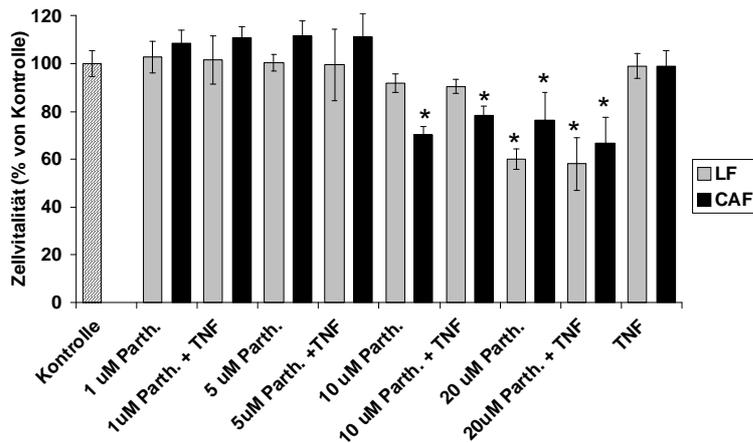
Nach 48 Stunden fällt die Vitalität der CAF bei einer Konzentration bei 5  $\mu\text{M}$  um 20 %. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  Parthenolide sinkt der Wert unter 50 % ab. Die Kombination von TNF- $\alpha$  mit aufsteigenden Konzentrationen von Parthenolide (1, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) zeigt sich eine etwas geringere Abnahme der Vitalität der CAF bei 10 und 20  $\mu\text{M}$  Parthenolide, die Vitalität liegt hier aber dennoch bei über 50 %. Signifikant ist der Vitalitätsunterschied beim Vergleich der alleinigen Stimulation mit Parthenolide und in Kombination mit TNF- $\alpha$  bei 5  $\mu\text{M}$  Parthenolide, bei der Kostimulation sinkt die Vitalität lediglich um 4 % statt um 20 %. Die LF zeigen bei 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Parthenolide eine geringfügige Abnahme der Vitalität und eine deutlichere Abnahme um 51 % bei 20  $\mu\text{M}$ . Auch bei diesem Zeitraum hat die alleinige Inkubation mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  keine vitalitätsverändernde Wirkung bei

CAF. Bei den LF kommt es allerdings zu einer signifikanten Zunahme der Vitalität um 14 % (siehe Abb. 3.II).

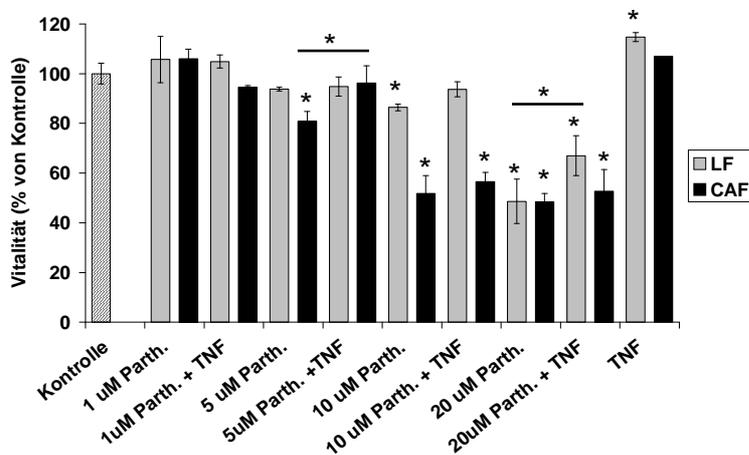
Deutlicher fällt der Vitalitätsabfall der CAF nach 96-stündiger Inkubation auf. Bei der Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Parthenolide zeigt sich noch keine Veränderung, bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  fällt die Vitalität bereits um 30 % ab. Bei der Inkubation der CAF mit 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  Parthenolide zeigt sich eine deutliche Reduktion der Vitalität in Relation zur Kontrolle um 65 %. Bei den LF zeigt sich ab 5  $\mu\text{M}$  eine geringfügige Abnahme der Vitalität, eine signifikante Reduktion jedoch erst bei 10 und 20  $\mu\text{M}$  Parthenolide um jeweils 24 % und 52 %. Die gemeinsame Inkubation der LF mit  $\text{TNF-}\alpha$  und Parthenolide zeigt ähnliche Ergebnisse. Im Vergleich zur alleinigen Parthenolidestimulation ergeben bei der 96-stündigen Stimulation keine signifikanten Unterschiede zur Kostimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$ . Genau wie bei den vorherigen Zeitpunkten hat  $\text{TNF-}\alpha$  keinen vitalitätsreduzierenden Einfluss auf die CAF. Aber auch hier zeigen LF eine signifikante Zunahme der Vitalität um 18 % bei alleiniger  $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation (siehe Abb. 3.III).

Im Vergleich verhält sich die Vitalität bei LF und CAF ähnlich. Bei den LF kommt es bei allen Versuchsansätzen eher bei etwas höheren Parthenolidekonzentrationen zu einem signifikanten Vitalitätsverlust. Weiterhin auffällig ist, dass LF nach 48 und 96 Stunden mit einer signifikanten Vitalitätszunahme auf die alleinige Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$  reagieren, was bei den CAF nicht zu beobachten ist. Ansonsten sind CAF und LF bei der Vitalitätsprüfung ohne nennenswerte Unterschiede gleichsinnig.

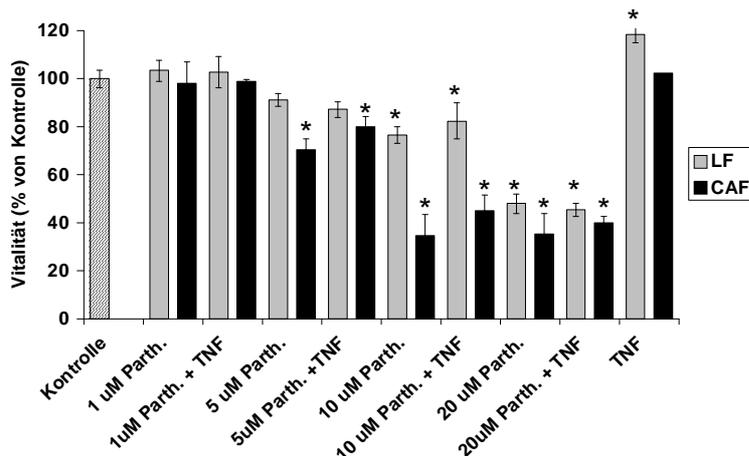
### I. Zellvitalität CAF und LF (24h)



### II. Zellvitalität CAF und LF (48h)



### III. Zellvitalität CAF und LF (96h)



**Abb.3(I-III) Kristallviolettassay: Vitalität CAF u. LF nach 24(I), 48(II) und 96(III) h**  
 Darstellung der gemessenen Extinktionswerte bei 590 nm. Extinktionswert der unbehandelten Kontrolle (10% FCS) =100%, Extinktionswerte der behandelten Zellen sind dazu in Relation. Parth. = Parthenolide in µM, TNF = TNF-α (50ng/ml), MW ± SEM in %, n=3, \* = p<0.05 vs. Kontrolle bzw. ±TNF-α

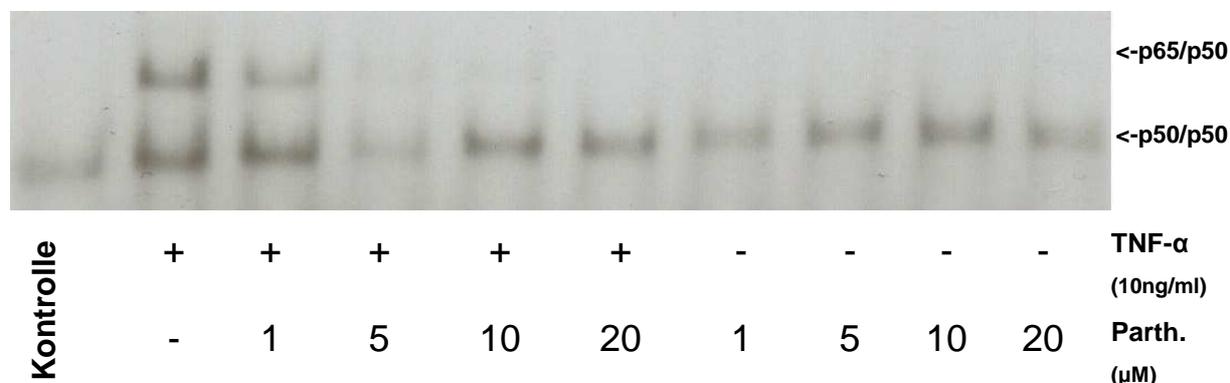
In Zusammenschau mit diesen Ergebnissen wurden die Inkubationszeiten und Konzentrationen von Parthenolide und TNF- $\alpha$  bei den folgenden Experimenten so gewählt, dass eine Verfälschung der Ergebnisse durch signifikante Reduktion der Zellzahl analog zur Vitalität oder zum Verlust des adhärenen Verhaltens der Zellen ausgeschlossen war.

#### **4.2 Hemmung der TNF- $\alpha$ -vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in CAF durch Parthenolide**

Ob CAF nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  mit einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung reagieren, wurde mittels Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) ermittelt. Der EMSA ist eine sehr sensitive Methode, um spezifisch die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B an die DNA im Zellkern nachzuweisen. Ebenso wurde getestet, ob Parthenolide als beschriebener NF- $\kappa$ B-Inhibitor in der Lage ist, eine mögliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors in CAF zu hemmen.

CAF ohne Stimulation in DMEM zeigten keine konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Nach dreißigminütiger Zugabe von 10 ng/ml TNF- $\alpha$  ist im Autoradiogramm ein deutliches Signal als Korrelat einer starken Bindung des besagten Transkriptionsfaktors an seine Zielgene zu sehen. Zur Testung der Hemmung wurden die CAF eine Stunde mit aufsteigender Konzentration Parthenolide präinkubiert und danach eine weitere halbe Stunde mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Parthenolide ist dosisabhängig in der Lage, in CAF die durch TNF- $\alpha$  induzierte Bindung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B an die DNA zu inhibieren. Schon bei geringen Konzentrationen von 1  $\mu$ M Parthenolide ist das Signal abgeschwächt. Eine fast vollständige Inhibition sieht man bei 5  $\mu$ M und vollständig ist sie dann ab 10  $\mu$ M. Die alleinige Zugabe von Parthenolide in den oben erwähnten Konzentrationen führt zu keiner verstärkten Aktivierung von NF- $\kappa$ B im Zellkern (siehe Abb.4).

## Dosisabhängige Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in CAF nach TNF- $\alpha$ -Stimulation



### Abb.4 EMSA (Elektrophoretic mobility shift assay):

**NF- $\kappa$ B-Aktivierung in CAF nach TNF- $\alpha$ -Stimulation wird dosisabhängig durch Parthenolide gehemmt.**

Die Banden zeigen den an die DNA im Kern gebundenen Heterodimer p65/p50 und den Monodimer p50/p50 des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch radioaktiv markierte Sonden bei CAF. 1h Präinkubation mit 1,5,10 und 20  $\mu$ M Parthenolide, danach Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  für 30 min.

### 4.3 Modifizierter Boyden Chamber Assay

Ein wesentlicher und unverzichtbarer Bestandteil der Metastasierung eines Primärtumors ist die Zellmigration. Ein Modell, um Migrationsverhalten der Zellen zu testen, ist der modifizierte Boyden Chamber Assay, bei dem Zellen durch ein perforiertes Membraninsert in Richtung einer unteren Kammer wandern können. In der unteren Kammer wurden entweder TNF- $\alpha$  und/ oder Parthenolide zugefügt und zusätzlich Zellen mit und ohne den oben erwähnten Stimulanzen. Zur Auswertung wurden die Zellen quantifiziert, die durch 8  $\mu$ m große Poren des Membraninserts in Richtung der unteren Kammer gewandert waren, und die Anzahl in Relation zur Kontrolle dargestellt.

Mit diesem Versuch wurde die Hypothese getestet, ob die Präsenz von TNF- $\alpha$  und die Aktivierung des TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweges allein bereits die Zellmigration erhöht. Ein weiterer Ansatz ist die Kokultur, in der die zu migrierenden Zellen in

Richtung einer zweiten Zelllinie in der unteren Kammer wandern können. Durch die Poren des Membraninserts können Zytokine und Chemokine ungehindert ausgetauscht werden. Durch Zugabe von TNF- $\alpha$  entsteht ein Modell eines entzündlichen Mikromilieus, welches die Migration der Zellen erhöhen könnte.

Weiterhin wurde in diesem Versuchsansatz getestet, ob Parthenolide durch die nachgewiesene Hemmung der TNF- $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in der Lage ist, die Migration insbesondere im Kokulturansatz zu hemmen.

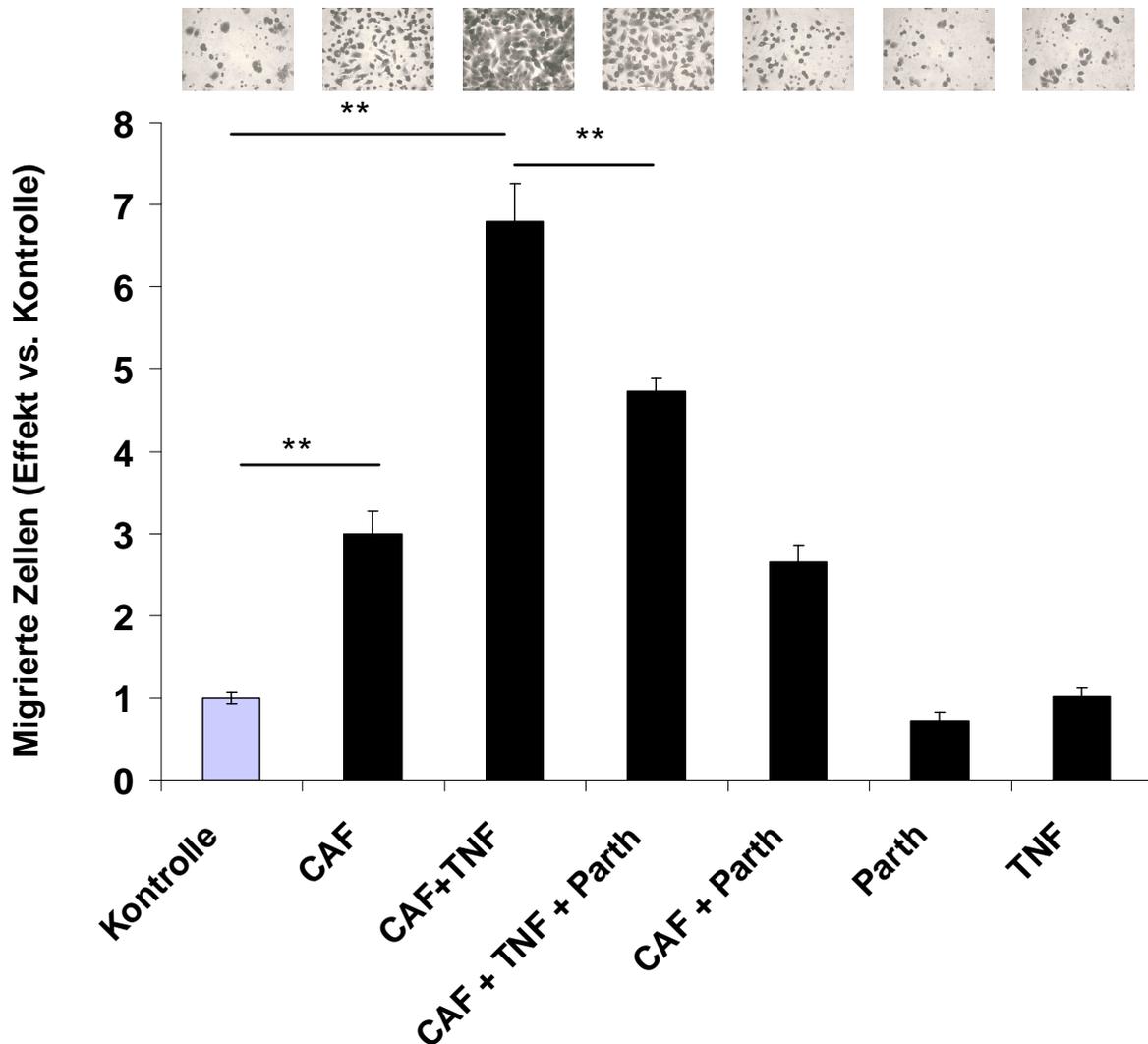
#### **4.3.1 TNF- $\alpha$ -stimulierte CAF erhöhen die gerichtete Migration von HT29**

Die Kokultur mit CAF steigert die Migration der HT29 signifikant um das dreifache. Die Stimulation der CAF mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  steigert die Migration auf das siebenfache. Die Zugabe von 5  $\mu$ M Parthenolide zu den mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  stimulierten CAF reduziert die Migration der HT29 signifikant im Vergleich zum Ansatz ohne Parthenolide, allerdings bleibt die Migration auch hier im Vergleich zur Kontrolle um das fünffache erhöht.

Die alleinige Zugabe von Parthenolide zu den CAF ohne TNF- $\alpha$  verändert das Migrationsverhalten der HT29 zu den CAF nicht wesentlich.

Die alleinige Zugabe von TNF- $\alpha$  oder Parthenolide in die untere Kammer ohne CAF hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der HT29 verglichen mit der Kontrolle (siehe Abb. 5).

## Erhöhte HT29-Migration zu TNF- $\alpha$ -stimulierten CAF und Hemmung der erhöhten Migration durch Parthenolide



**Abb.5 Modifizierter Boyden Chamber Assay: Erhöhte Migration von HT29 zu CAF, Steigerung dieses Effekts durch TNF- $\alpha$ -Stimulation und Hemmung der Steigerung durch Parthenolide**

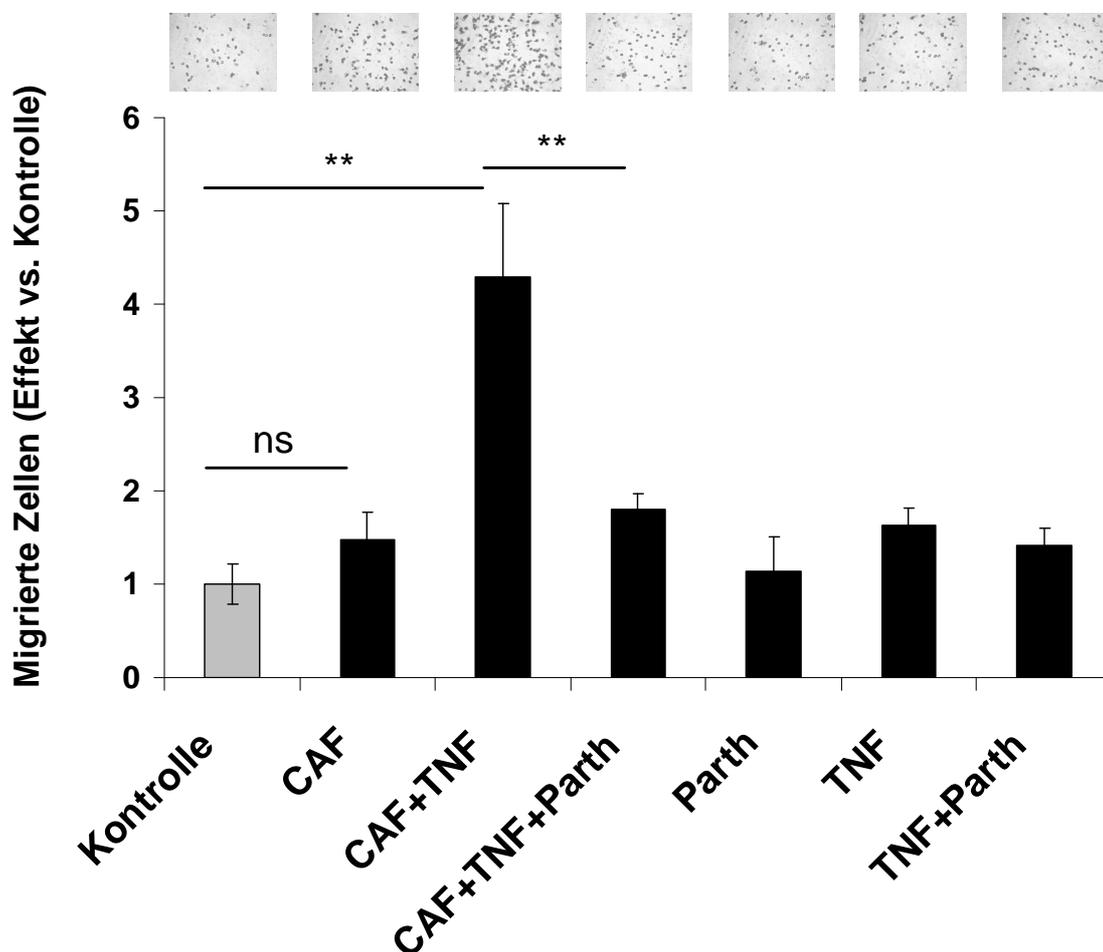
Dargestellt ist die relative Änderung der migrierten HT29 zu CAF. Dazu wurden in Doppelbestimmung je drei zufällig gewählte Sichtfelder nach H.E.-Färbung mit 100-facher Vergrößerung fotografiert und ausgezählt. Anzahl der migrierten Zellen bei der Kontrolle (10% FCS) entspricht 1. Observationszeit 48h, 100.000 HT29 pro Insert, 50.000 CAF pro Kammer. Parth = Parthenolide 5 $\mu$ M, TNF= TNF- $\alpha$  50ng/ml. n=6, \*\*=p<0.05, MW  $\pm$  SEM

#### **4.3.2 Erhöhung der Migration peripherer mononukläerer Zellen zu CAF durch TNF- $\alpha$ -Stimulation**

Die Migration von PBMNCs im Insert zu CAF in der unteren Kammer steigt im Vergleich zur Kontrolle (10% FCS) um das 1,5-fache an, allerdings ist dieser Anstieg nicht signifikant. Bei Zugabe von 50 ng/ml TNF- $\alpha$  zu der Kammer mit den CAF steigt die Migration der PBMNCs signifikant um das 4,5-fache verglichen mit der Kontrolle. Die Zugabe von 5  $\mu$ M Parthenolide in die untere Kammer zu den mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  stimulierten CAF reduziert die Migration der PBMNCs signifikant verglichen mit dem gleichen Ansatz ohne Parthenolide. Statt 4,5-facher Erhöhung der Migration ist die Anzahl der migrierten Zellen nur noch etwa doppelt so hoch.

Die alleinige Zugabe von Parthenolide verändert die Migration nicht. Die alleinige Zugabe von TNF- $\alpha$  erhöht die Migration auf das 1,6-fache, dieser Anstieg kann durch die Zugabe von Parthenolide dezent auf das 1,4-fache reduziert werden, diese Unterschiede sind allerdings statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 6).

## Parthenolide hemmt die erhöhte Migration peripherer mononukleärer Zellen zu TNF- $\alpha$ -stimulierten CAF

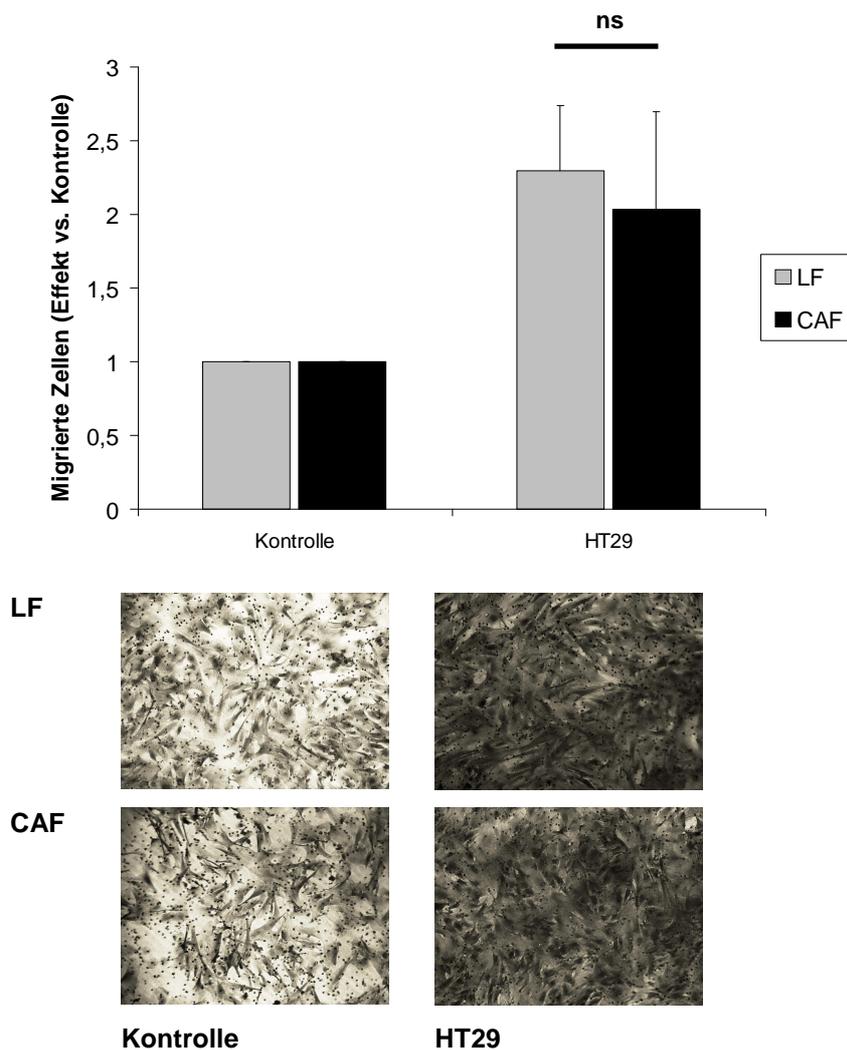


**Abb.6 Modifizierter Boyden Chamber Assay: Erhöhte PBMNC-Migration (periphere mononukleäre Zellen engl. peripheral blood mononuclear cells) zu CAF nach TNF- $\alpha$ -Stimulation und Hemmung der Migrationssteigerung durch Parthenolide**

Dargestellt ist die relative Änderung der migrierten PBMNC zu CAF. Dazu wurden in Doppelbestimmung je drei zufällig gewählte Sichtfelder nach H.E.-Färbung mit 100-facher Vergrößerung fotografiert und ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Anzahl der migrierten Zellen bei der Kontrolle (10% FCS) entspricht 1. Observationszeit 48h, 1 Millionen PBMNC pro Insert, 50.000 CAF pro Kammer. Parth = Parthenolide 5 $\mu$ M, TNF= TNF- $\alpha$  50ng/ml., \*\* =  $p < 0.05$ , ns = nicht signifikant, n=6, MW $\pm$  SEM

### 4.3.3 CAF und LF zeigen kein unterschiedliches Migrationsverhalten zu HT29

Mit dem modifizierten Boyden Chamber Assay wurde getestet, ob sich das Migrationsverhalten von gesunden Leberfibroblasten und CAF zu kolorektalen Karzinomzellen unterscheidet. Dabei ergab sich ein deutlicher Anstieg der Migration zu HT29 im Vergleich zur Kontrolle mit 10% FCS. Allerdings gab es beim direkten Vergleich des Migrationsverhaltens normaler Leberfibroblasten und CAF in Richtung HT29 keinen signifikanten Unterschied bei der Anzahl migrierter Zellen.



**Abb.7 Kein signifikanter Unterschied beim Migrationsvergleich von CAF und LF zu HT29 im modifizierten Boyden Chamber Assay**

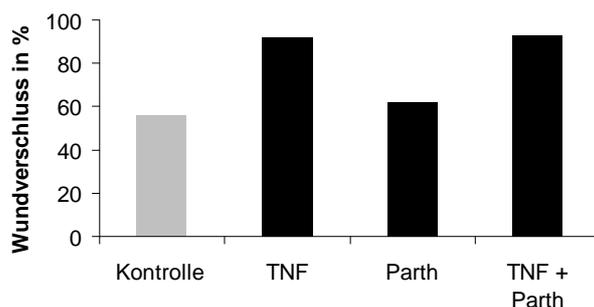
I. Kontrolle mit 10% FCS entspricht 1,  $1 \times 10^5$  HT29 in der unteren Kammer.  $1 \times 10^4$  Fibroblasten im Insert mit 8  $\mu$ m Poren, Inkubationszeit 20 h, Mittelwert aus drei zufällig ausgezählten Sichtfeldern, Doppelbestimmung. MW  $\pm$  SEM. ns= nicht signifikant

II. H.E.-Färbung der migrierten Fibroblasten an der Unterseite des Inserts, 100x fache Originalvergrößerung

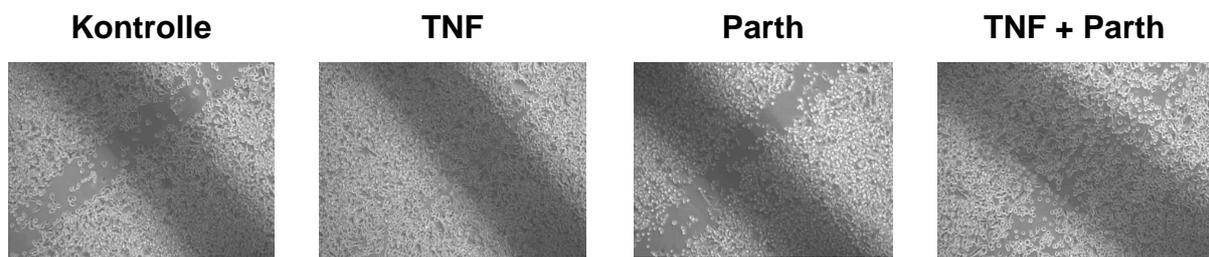
#### 4.4 TNF- $\alpha$ beschleunigt den Wundverschluss bei HT29

Mit dem Scratch Wound Assay wurde untersucht, ob TNF- $\alpha$  in einem zweidimensionalen Migrationsmodell zum beschleunigten Wundverschluss bei HT29 führt und wie der Wundverschluss durch Parthenolide beeinflusst wird. Dazu wurde in einem konfluenten Monolayer der HT29 mit einer Pipettenspitze ein Kratzer verursacht und die Annäherung der Wundränder nach 24 Stunden von der Distanz zum Zeitpunkt 0 prozentual miteinander verglichen. Bei der Kontrolle ist die Wunde nach 24 Stunden zu fast 60 % wieder verschlossen. Nach Zugabe von 10 ng/ml TNF- $\alpha$  ist die Annäherung der Wundränder nahezu komplett. Die Zugabe von 5  $\mu$ M Parthenolide beeinflusst den Wundverschluss mit und ohne TNF- $\alpha$  nicht. TNF- $\alpha$  beschleunigt den Wundverschluss bei HT29 ohne deutlichen Einfluss durch Parthenolide.

I



II



**Abb.8 Beschleunigter Wundverschluss durch TNF- $\alpha$  bei HT29 im Scratch Wound Assay**

I. Dargestellt ist der prozentuale Wundverschluss (MW Distanz der Wundränder in einem konfluenten HT29 Monolayer) nach 24 h. Kontrolle 10% FCS, TNF = TNF- $\alpha$  10 ng/ml, Parth = Parthenolide 5  $\mu$ M, n=6

II. Bilder der Wunde nach 24 Stunden, dunkler Strich: Finelinerstrich unter der Kulturplatte zur Orientierung, diagonal dazu die mit einer Pipettenspitze gesetzte Wunde, Fotos 100fache Originalvergrößerung

## **5. Diskussion**

### **5.1 Tumor-Stroma-Interaktion in einem entzündlichen Mikromilieu bei kolorektalen Lebermetastasen**

Die begünstigende Wirkung eines entzündlichen Mikromilieus bei der Tumorentstehung und bei der Progression der Erkrankung ist inzwischen allgemein akzeptiert (O'Hayre *et al.* 2008, Sansone und Bromberg 2011).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CAF aus der Leber durch TNF- $\alpha$  in der Kokultur in der Lage waren, die gerichtete Migration von kolorektalen Tumorzellen (HT29) zu CAF massiv zu steigern (Abb.5). Diese Steigerung wurde durch die Zugabe von Parthenolide signifikant gehemmt. Im EMSA konnte in CAF nach TNF- $\alpha$ -Stimulation eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung nachgewiesen werden, diese Aktivierung ließ sich dosisabhängig ebenfalls durch Parthenolide hemmen (Abb.4). Somit scheinen CAF über den TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweg die gerichtete Migration kolorektaler Zellen zu steigern. Zusätzlich erhöhen TNF- $\alpha$ -stimulierte CAF die Migration von PBMNC im Boyden Chamber Assay, auch hier vermindert sich die Migration signifikant durch die Zugabe von Parthenolide (Abb.6). TNF- $\alpha$  alleine führte im Boyden Chamber Assay zu keiner signifikanten Steigerung der HT29-Migration, allerdings führte beim Scratch Wound Assay die Zugabe von TNF- $\alpha$  zu HT29 zu einem beschleunigten Wundverschluss, ohne dass Parthenolide darauf einen Einfluss hatte (Abb.8).

Für die Untersuchung der Migration wurde der modifizierte Boyden Chamber Assay benutzt, der es erlaubt, die gerichtete Migration von Zellen quantitativ zu erfassen. Zusätzlich können die zu migrierenden Zellen im Insert bei dieser Methode mit einer zweiten Zellart kommunizieren, die sich in der unteren Kammer befindet, ohne dass es zu einem direkten Kontakt der verschiedenen Zellen kommt. Daher beruht eine Migrationssteigerung auf chemotaktischen löslichen Faktoren, die ungehindert durch die Membranporen des Inserts gelangen können. Eine Limitierung erfährt diese Methode dadurch, dass sie nicht in der Lage ist, komplexe *in vivo*-Verhältnisse nachzuahmen. So fehlt beispielsweise ein typisches Endothel wie im Gefäßsystem mit darunter liegender Basalmembran, die bei der Migration aus der Blutbahn überwunden werden müssen. Beim 2D-Migrationsmodell des Scratch Wound Assays

wird der Wundverschluss einer konfluent gewachsenen Zelllinie untersucht. Diese Methode wurde durchgeführt, um die Bedeutung von TNF- $\alpha$  auf die Tumorzellmigration weiter einzugrenzen.

TNF- $\alpha$  ist schon bei der Entstehung einer Lebermetastase entscheidend. Wenn Karzinomzellen in die hepatische Mikrozirkulation gelangen, induzieren sie eine schnelle inflammatorische Antwort durch TNF- $\alpha$ -Produktion von hepatischen Sternzellen. Diese Zellen sind Perizyten von sinusoidalen Endothelzellen in der Leber und sind in der Lage, sich zu Myofibroblasten zu differenzieren und sind unter anderem auch für die Leberregeneration nach Verletzungen verantwortlich (Antoine *et al.* 2009). Auch Kupferzellen reagieren nach dem Einstrom von Tumorzellen in die Leber mit TNF- $\alpha$  Produktion (Khatib *et al.* 2005). Die lokale Entzündungsreaktion durch die hepatischen Sternzellen führt zu einer vermehrten Expression von E-selectin und anderen endothelialen Adhäsionsmolekülen. Dies erlaubt den Karzinomzellen, ans Endothel zu binden und aus dem Gefäßbett ins Parenchym zu wandern (Antoine *et al.* 2009). Es gibt außerdem die Theorie, dass kolorektale Karzinomzellen parakrin unter anderem mit TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) die Expression von E-selectin fördern und die eigene Extravasation damit unterstützen (Gout, Huot 2008). Das Modell der Extravasation ist zwar nur bedingt auf das Migrationsmodell des modifizierten Boyden Chamber Assays zu übertragen, da hier keine Extravasation mit Adhäsion ans Endothel zum Tragen kommt. Es ist aber durchaus vorstellbar, dass die Tumorzellen in vivo einem ähnlichen chemischen Gradienten an chemotaktisch wirksamen Stoffen folgen, wie sie im modifizierten Boyden-Assay durch die TNF- $\alpha$ -stimulierten CAF gebildet werden. Diese löslichen Faktoren führten zur Migrationssteigerung der HT29 (Abb.5). Dies zeigt auf, welche vielfältige Rolle TNF- $\alpha$  bei der Metastasenbildung spielt. TNF- $\alpha$  selbst scheint promigratorische Effekte auf Tumorzellen zu haben wie Dong *et al.* mit MCF-1 Zellen mit dem Boyden Chamber Assay nachwies (Dong *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit hat TNF- $\alpha$  alleine keinen nennenswerten Effekt auf die Anzahl migrierter Zellen im Boyden Chamber Assay, allerdings ist der Wundverschluss beim Scratch Wound Assay durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  deutlich beschleunigt (Abb. 5 und 8). Dies verdeutlicht, dass vor allem die Interaktion der CAF mit den Tumorzellen im Kokulturmodell entscheidend für die Migration ist, TNF- $\alpha$  alleine aber durchaus auch promigratorische Signale in der Tumorzelle auslöst.

In dieser Arbeit gelang der Nachweis, dass CAF aus der Leber nach TNF- $\alpha$ -Stimulation mit einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung reagieren (Abb.4). Über diesen Signalweg könnten sie auf vielfältige Weise in den Entzündungsprozess miteingreifen. Auch in der Literatur ist eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sowohl für maligne Zellen als auch für Tumor-Stromazellen beschrieben. Bei den Stromazellen werden hier vor allem Immunzellen genannt, die dann durch die Sezernierung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und angiogenetischen Faktoren die Tumorprogression unterstützen (Inoue *et al.* 2007). In der Arbeit von Vadoros *et al.* wurde in Myofibroblasten aus dem Tumorstroma des Primärtumors im Kolon phosphoryliertes I $\kappa$ B (p-I $\kappa$ B- $\alpha$ ) als Korrelat der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nachgewiesen, im normalen Kolon war diese Aktivierung nicht nachweisbar (Vadoros *et al.* 2006).

Es stellt sich die Frage, welche Zielgene von NF- $\kappa$ B, insbesondere welche Chemokine, hauptsächlich für Stimulierung der Zellmigration verantwortlich sind. Verschiedene Zyto- bzw. Chemokine wurden bei dem Vorgang der Metastasierung identifiziert. So wurde gezeigt, dass die Expression des Chemokines CCL2 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) sich bei progredientem Tumorstadium erhöhte (Bailey *et al.* 2007). Chemokine stellen eine Superfamilie mit etwa 50 Liganden und 20 Rezeptoren dar, welche die Zellmigration regulieren und in der Lage sind, durch Chemokine-Rezeptor-Signalwege das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen in einem anderen Organ zu gewährleisten z.B. durch die Anregung zur Sezernierung von MMPs (Matrix-Metalloproteinasen). MMPs degradieren die Extrazellulärmatrix und erleichtern somit ein Durchdringen von Chemokinen und malignen Zellen (Hatfield *et al.* 2010). Ebenso bilden Chemokine ein entzündliches Mikromilieu durch Rekrutierung von Immunzellen wie Neutrophile, Makrophagen und Dendritische Zellen (O'Hayre *et al.* 2008), welche wiederum das entzündliche Mikromilieu unterhalten. Die zelluläre Herkunft der Zytokine ist noch nicht bis ins Detail erforscht, aber es liegt nahe, dass auch Stromazellen daran beteiligt sind.

IL-8 (Interleukin-8) ist ein Chemokin, welches die Chemotaxis von Immunzellen wie Neutrophile erhöht und für deren Degranulation sorgt. Erhöhte IL-8-Expression wurde bisher im Tumor und bei Immunzellen nachgewiesen und ist mit Angiogenese und Metastasenbildung im Tiermodell korreliert. Der IL-8-Signalweg erhöht die Migration von Tumorzellen, Endothelzellen und Neutrophilen (Waugh *et al.* 2008). TNF- $\alpha$  stimuliert CAF zur IL-8-Stimulation. Somit könnte IL-8 ausgehend von CAF

ein promigratorischer Faktor sein, allerdings zeigte die Blockade von IL-8 im Kokulturmodell keine Migrationsinhibition (Müller *et al.* 2007).

Auch IL-6 (Interleukin-6) scheint die Bildung von Metastasen durch Tumor-Stroma-Interaktion zu begünstigen und wird durch NF- $\kappa$ B reguliert (Maeda *et al.* 2009, Aggarwal *et al.* 2006). So bildeten sich in einem Xenograft-Mausmodell bei Koinjektion von Fibroblasten und Brustkrebszellen nur dann Tumore aus, wenn die injizierten Fibroblasten IL-6 sezernierten. Ebenso stimulierte IL-6 von Fettzellen die Invasivität und Migration von Brustkrebszellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Studebaker *et al.* 2008, Walter *et al.* 2009). Nicht nur lösliche Faktoren, sondern auch Zelloberflächenproteine wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) sind bei der Zellmigration involviert. Die Blockade von ICAM-1 führte zur Herabsetzung der Migration einer hochinvasiven Brustkrebszelllinie (MDA-MB-435), ebenso scheint die ICAM-1-Protein-Expression an der Zelloberfläche positiv korreliert zu sein mit Potenzial, Metastasen auszubilden (Rosette *et al.* 2005).

Die Betrachtung von IL-8, IL-6 und ICAM-1 sind ausgewählte Beispiele. Welche Zytokine und welche Signalwege neben dem TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweg und durch diesen vermittelt in dieser Arbeit für die Migrationsstimulierung verantwortlich sind, bietet ein breites Spektrum an Folgeexperimenten z.B. durch die selektive Hemmung eines löslichen Chemokines oder durch den Block eines Chemokinrezeptors.

Nicht nur die chemotaktische Wirkung der CAF auf HT29, sondern umgekehrt der migrationsstimulierende Effekt von HT29 auf CAF ließ sich in dieser Arbeit ebenfalls nachweisen (Abb.7). Auch in der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Tumorzellen Fibroblasten chemotaktisch anlocken (Higashi *et al.* 2002). Es gibt viele Faktoren wie TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) (Brenmoehl *et al.* 2009), IL-8 (Interleukin-8) (Dunlevy, Couchman 1995) und andere, die die gerichtete Migration der Fibroblasten stimulieren. Insbesondere TGF- $\beta$  wurde als Interaktionsmolekül zwischen Tumorzellen und CAF und als Chemoattraktant für mesenchymale Zellen identifiziert. TGF- $\beta$  wird eine Hauptrolle bei der Rekrutierung von Fibroblasten durch Tumorzellen zugeschrieben. Außerdem induziert der Faktor die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten und sorgt für die Bildung von Extrazellulärer Matrix insbesondere der Sekretion von Kollagenen und Proteasen (Micke, Östmann 2005, Denys *et al.* 2008, Hauptmann *et al.* 2003). So wurde nachgewiesen, dass eine kolorektale Maus-Zelllinie (Colon 38) durch Fibronectin-Sezernierung die Motilität von

Fibroblasten erhöht (Morimoto, Irimura 2001). Fibronectin ist ein Glykoprotein der Extrazellulärmatrix, welches unter anderem TGF- $\beta$ -vermittelt sezerniert wird. Die Bedeutung des Versuchsansatzes der Kokultur zur Untersuchung der Migrationsstimulierung wurde in einer Arbeit von Shimao et al deutlich, bei der konditioniertes Medium von mit Tumorzellen kokultivierten Fibroblasten die Migration erhöhte, wohingegen konditioniertes Medium von Fibroblasten in Reinkultur die Migration nicht erhöhte. Die Migrationsstimulierung schien auch hier durch TGF- $\beta$  vermittelt zu sein (Shimao *et al.* 1999). Im Prostatakrebs führt die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch TGF- $\beta$  zu einem aggressiveren Phänotyp durch EMT (epithelial-mesenchymale Transition) und ist mit erhöhter Invasivität des Prostatakarzinoms korreliert (Zhang *et al.* 2009). TGF- $\beta$  wurde in der Literatur häufig als NF- $\kappa$ B-Suppressor gesehen, inzwischen wird allerdings davon ausgegangen, dass TGF- $\beta$  über NF- $\kappa$ B eine inflammatorische Antwort induziert und sogar synergistisch die TNF- $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Antwort erhöht (Ishinaga *et al.* 2009). Dies verdeutlicht die Komplexität der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B neben TNF- $\alpha$  und insgesamt die reziproke migratorische Stimulierung von Tumor- und Stromazellen. Auch hier bedarf es weiterer Untersuchungen, welche löslichen Faktoren maßgeblich für die Migration sind.

Aber nicht nur in Bezug auf die in dieser Arbeit untersuchte Migration ist die Interaktion der Tumorzellen mit den Stromazellen für die Bildung und Unterhaltung eines makroskopischen Tumorknotens wichtig. Dazu gibt es zahlreiche Belege in der Forschung. Nachdem sich Mikrometastasen in der Leber nach Extravasation der Tumorzellen gebildet haben, bilden Fibroblasten eine kollagenreiche extrazelluläre Matrix und sorgen für Neovaskularisation (Higashi *et al.* 2002), dies sind entscheidende Vorgänge bei der desmoplastischen Reaktion. Dabei wird hauptsächlich Kollagen Typ I gebildet. In einer *in vitro* Studie von Conti *et al* zeigte sich, dass Kollagen Typ I das Wachstum und die Chemoresistenz von kolorektalen Karzinomzellen erhöht und somit mit einer erhöhten Malignität einhergeht (Conti *et al.* 2008). Eine erhöhte desmoplastische Reaktion ist ein Faktor für eine schlechte Prognose bei Patienten mit Kolonkarzinom (Sis *et al.* 2005). Isolierte Myofibroblasten aus Darmpolypen scheinen zusätzlich in der Lage zu sein, das Wachstum von HT29 zu fördern, wie ein Kokulturmodell von Chen *et al.* zeigte (Chen *et al.* 2005). Nach immunhistochemischer Analyse exprimieren peritumoröse Fibroblasten häufig HIF1 $\alpha$

(Hypoxie-induzieren Faktor 1 $\alpha$ ). HIF1 $\alpha$  sorgt für die Neubildung von Blutgefäßen und somit für die Gefäßversorgung des wachsenden Tumors (Naomoto *et al.* 2007, Sivridis *et al.* 2005). Ebenso gibt es aufgrund immunhistochemischer Analysen die Theorie, dass das Tumor-assoziierte Stroma beim Kolonkarzinom übermäßig anfallende Produkte des anaeroben Metabolismus der Tumorzellen recycelt, um damit das Tumorüberleben und Wachstum zu unterstützen (Koukourakis *et al.* 2006). Auch bei anderen Tumorentitäten ist die Tumor-Stroma-Interaktion im Interesse der Forschung. Bei einem *in vitro* Versuch erhöhte konditioniertes Medium von Stromazellen das Überleben von Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika (Gemcitabine) und nach Radiotherapie. In einem orthotopen *in vivo* Modell erhöhte die Koinjektion von Tumorzellen mit Stromazellen die Inzidenz, Größe und Präsenz von Metastasen (Hwang *et al.* 2008). In einer anderen Studie waren Pankreaskarzinomzellen in Kokultur mit Fibroblasten weniger empfindlich für das Chemotherapeutikum Etoposid. Die Chemoresistenz der Zellen ist möglicherweise über NF- $\kappa$ B vermittelt (Müerköster *et al.* 2004). Auch beim Brustkrebs wurde durch ein Tiermodell die vielfältige tumorunterstützende Rolle von CAF untersucht. Dabei erhöhten CAF das Wachstum der Karzinomzellen. Zusätzlich rekrutierten CAF endotheliale Progenitorzellen zur Angiogenese über Sekretion von SDF-1 (Stromal cell derived factor-1) (Orimo *et al.* 2005).

Ein weiteres Beispiel für die komplexe Tumor-Stroma-Interaktion ergibt sich aus einer Studie von Kaminski *et al.*, bei der Fibroblasten mit konditioniertem Medium von Prostatakarzinomzellen (PC-3) inkubiert wurden. Fibroblasten sezernieren daraufhin unter anderem TNF- $\alpha$ , MMPs, VEGF (vascular endothelial growth factor) und viele andere Zytokine (Kaminski *et al.* 2006). VEGF ist ein wichtiges Protein für die Tumervaskularisierung (Kim *et al.* 1993). Die Wirkung von Fibroblasten-konditioniertem Medium auf die Prostatazelllinie war vielfältig: unter anderem erhöhte es die Migration der PC-3-Zellen im Scratch Wound-Assay und stimulierte die Tumorzellen zur Sekretion von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und PDGF (platelet derived growth factor) (Kaminski *et al.* 2006). Auch bei Kolonkarzinomzellen wurde VEGF bei der Kokultivierung mit Fibroblasten aus dem Kolon vermehrt sezerniert (Koshida *et al.* 2006). Beim intrahepatischen Cholangiocarcinom (ICC) erhöhte TNF- $\alpha$  die ICC-Zell-Migration, möglicherweise durch verstärkte Interaktion der Tumorzellen und dem Stroma über den SDF-1/CXCR4-Signalweg. SDF-1 und seinem spezifischen Rezeptor CXCR4 werden eine promigratorische Funktion zugesprochen (Ohira *et al.*

2006). TNF- $\alpha$  erhöht die Zellmigration also nicht nur über den TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweg wie in der vorliegenden Arbeit, sondern auch bei anderen Tumorentitäten und über andere Signalwege. Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit belegt dies, welche entscheidende Rolle TNF- $\alpha$  bei der Tumor-Stroma-Interaktion zur Progression einer Tumorerkrankung spielt.

## 5.2 Rekrutierung peripherer mononukleärer Zellen durch CAF

Neben der Betrachtung der Migrationssteigerung maligner Zellen durch TNF- $\alpha$  wurde untersucht, ob CAF auch in der Lage sind, die Chemotaxis von PBMNCs zu erhöhen. PBMNCs enthalten Monozyten und Lymphozyten des peripheren Bluts (Lüllmann-Rauch 2003). In dieser Arbeit war die Migration von PBMNCs zu TNF- $\alpha$ -stimulierten CAF deutlich erhöht (Abb.6). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass auch CAF Immunzellen chemotaktisch anlocken und zur Entstehung eines entzündlichen Mikromilieus beitragen. Die Betrachtung der Migrationssteigerung im Boyden Chamber Assay verdeutlicht, dass CAF chemotaktische Stoffe sezernieren, die die gerichtete Chemotaxis der PBMNC erhöhen. Die Situation *in vivo* ist wesentlich komplexer als in dem Zweikammermodell des Boyden Chamber Assays, da hier die Immunzellen aus der Blutbahn zunächst an Gefäßendothel binden müssen, um ins Gewebe zu wandern (Müller-Esterl 2004).

Sicherlich dienen Immunzellen wie Lymphozyten in erster Linie der Eliminierung entarteter Körperzellen z.B. durch zytotoxische T-Zellen. Sollte es aber den malignen Zellen gelingen, den körpereigenen Abwehrmechanismen zu entgehen, nutzen sie die Immunzellen für ihr eigenes Überleben, z.B. durch Sezernierung von Wachstumsfaktoren und über zahlreiche andere Mechanismen (Mantovani *et al.* 2008; Mueller, Fusenig 2004).

Die Betrachtung der Monozyten, die im peripheren Blut nur 6 % der Leukozyten ausmachen, ist insofern interessant, weil sie sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren (Lüllmann-Rauch 2003, Coussens & Werb 2002). Nach Infiltration des Tumors werden die Monozyten auch als Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet und werden in der Literatur vielfach diskutiert (Wels *et al.* 2008, Mantovani *et al.* 2010). TAM werden häufig angelockt durch Chemokinsekretion von Tumorzellen, Fibroblasten und Endothelzellen (Murdoch *et al.* 2004). Die Expression

von Adhäsionsmolekülen und der immunhistochemische Nachweis von TNF- $\alpha$  in den Lebersinusoiden sind gleichzeitig erhöht. Somit wird nicht nur die Adhäsion von Tumorzellen, sondern vornehmlich auch die Bindung von Immunzellen wie Monozyten und Leukozyten an die Sinusoide ermöglicht (Gulubova 2002). Auch Monozyten und infiltrierende T-Zellen stellen neben den Kupfferzellen der Leber die Hauptquelle von TNF- $\alpha$  und IL-1 (Interleukin-1) dar, beides Zytokine, die ein inflammatorisches Mikromilieu aufrechterhalten (Bortolami *et al.* 2002). TNF- $\alpha$  wiederum wird nicht nur von Monozyten gebildet, sondern ist auch in der Lage, die Chemotaxis der Monozyten in einem *in vitro* Migrationsmodell direkt zu erhöhen (Hofbauer *et al.* 1998). CAF könnten also für die Einwanderung von PBMNC aus der Blutbahn sorgen. Ein mögliches Szenario könnte sich wie folgt darstellen: Bereits aus der Blutbahn rekrutierte Monozyten differenzieren sich zu TAM, welche ihrerseits die Invasion weiterer Monozyten induzieren. Dies wäre eine sich selbst unterhaltende Entzündungsreaktion, angestoßen unter anderem durch CAF und TNF- $\alpha$ . Eine weitere wichtige Rolle der TAM neben der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion im Tumorgewebe ist die Unterstützung der Immunescape-Mechanismen der Tumorzellen. So scheinen TAM für den Zelltod von T-Zellen verantwortlich zu sein (Lu, Finn 2008). Bestimmte Subtypen von T-Zellen stellen eine Reaktion des Organismus gegen entartete Zellen dar, dazu gehören die Killer T-Zellen (CD8+ T-Zellen) und die CD4-positiven T-Helfer-Zellen (CD4+ T-Zellen) (Müller-Esterl 2004). Der Zelltod dieser genannten T-Zellen durch TAM könnte somit das Überleben des Tumors sichern. TNF- $\alpha$ , welches unter anderem durch TAM sezerniert wird (Jedinak *et al.* 2010), spielt eine kritische Rolle bei den Immunescape-Mechanismen des Tumors, indem es Tr1-Zellen aktiviert. Tr1-Zellen sind eine Subklasse von T-Zellen, die durch ihr Zytokinexpressionsprofil eher protumoröse Eigenschaften besitzen (Grimm *et al.* 2010). Das komplexe Zusammenspiel zwischen Tumorstroma und Tumorzellen wird auch dadurch deutlich, dass CAF nicht nur indirekt über die Anlockung von Makrophagen tumortoxische T-Zellen abwehren, sondern selbst eine Barriere für infiltrierende T-Zellen, die gegen den Tumor gerichtet sind, bilden können (Desmoulière *et al.* 2004). Die Rolle von Makrophagen ist allerdings eher heterogen, was allein schon durch die Unterschiede der Lokalisation der Zellen zum Tumor deutlich wird. So waren bei einer immunhistochemischen Untersuchung von Lebermetastasen entweder

intratumoral oder peritumoral mehr Makrophagen nachweisbar, ohne dass es einen erkennbaren Grund für die unterschiedliche Lokalisation gab (Giuşcă *et al.* 2010).

Die Rolle und Funktion der infiltrierenden Immunzellen im Tumorstroma bedarf noch weiterer Untersuchungen. Allerdings ist die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Migrationssteigerung der peripheren mononukleären Zellen durch TNF- $\alpha$ -stimulierte CAF ein weiterer Aspekt, wie CAF das entzündliche Mikromilieu im Tumor-Stroma aufrechterhalten könnten.

### **5.3 Vergleich des Migrationsverhaltens von CAF und LF**

Es stellt sich die Frage, ob sich CAF von normalen Fibroblasten aus einer gesunden Leber in ihrem biologischen Verhalten unterscheiden. In dieser Arbeit gibt es keinen Unterschied bei dem quantitativen Migrationsverhalten von CAF und LF zu HT29 (Abb.7). In der Literatur wird jedoch zwischen gesunden Fibroblasten und CAF häufig unterschieden. So erhöhte konditioniertes Medium von CAF die Proliferation von der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 mehr als konditioniertes Medium von Hautfibroblasten. Beim Vergleich der Expressionsprofile von CAF und von Hautfibroblasten waren bei CAF 170 Gene hochreguliert, unter anderem proinflammatorische Gene wie Wachstumsfaktoren (Nakagawa *et al.* 2004). Der Versuchsansatz mit konditioniertem Medium könnte insofern kritisiert werden, dass hier keine aktive Interaktion von Fibroblasten und Tumorzellen stattfindet wie in dem Kokulturmodell. In Bezug auf die Proliferation wurde in einem direkten Kokulturmodell gezeigt, dass Myofibroblasten aus einem Darmpolyp die Proliferation der Tumorzellen mehr erhöhte als normale Myofibroblasten (Chen *et al.* 2005). In einem Kokulturmodell von Krueger *et al.* erhöhten Fibroblasten die Migration von HT29 nicht, entgegen zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Allerdings handelte es sich bei den Fibroblasten der Arbeitsgruppe Krueger *et al.* um humane Hautfibroblasten und nicht um CAF, die aus der Leber gewonnen wurden. Bemerkenswerterweise waren in dieser Arbeitsgruppe Monozyten in der Lage, die Invasivität von HT29 um das 5-fache zu steigern (Krueger *et al.* 2005).

Das gleiche Migrationsverhalten von CAF und normalen Leberfibroblasten und das Potenzial von CAF aus Leber, die HT29-Migration zu stimulieren, spricht dafür, dass gerade in der Leber die Fibroblasten auch im nicht alterierten Zustand bereits das Potenzial besitzen, Lebermetastasen auszubilden und zu unterstützen, mehr als

Fibroblasten aus dem Kolon oder gar Hautfibroblasten. Außerdem bleibt die Frage offen, inwieweit eine Tumorerkrankung nicht als systemische Krankheit begriffen werden muss, z.B. durch eine systemische inflammatorische Immunantwort und die Unterscheidung zwischen gesunden Fibroblasten und CAF somit hinfällig wird, sofern sie aus dem gleichen Organ stammen (Wels *et al.* 2008).

#### **5.4 NF- $\kappa$ B-Inhibition durch Parthenolide bei Lebermetastasen**

In dieser Arbeit konnte mittels EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) gezeigt werden, dass die CAF mit einer NF- $\kappa$ B-Induktion auf TNF- $\alpha$ -Stimulierung reagieren (Abb. 4). Diese Stimulierung lässt sich durch Parthenolide dosisabhängig inhibieren. Ebenso inhibiert Parthenolide die durch CAF induzierte Migrationsstimulierung sowohl bei HT29 als auch bei peripheren Blutmonozyten (Abb. 5 und 6).

Die NF- $\kappa$ B-Hemmung in Brustkrebszellen durch die Überexpression des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B führte ebenfalls zu einem Verlust der Migration *in vitro* (Helbig *et al.* 2003). Auch in der Studie von Choo *et al.* wurde die TNF- $\alpha$ -induzierte Metastasierung von Leber- und Lungenmetastasen durch die NF- $\kappa$ B-Hemmung durch ein Ginseng Saponin Metabolit verringert (Choo *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit scheint allerdings gar nicht die eigentliche Hemmung der migratorischen Fähigkeiten der Tumorzellen die größte Rolle zu spielen, sondern vielmehr die NF- $\kappa$ B-Hemmung in den TNF- $\alpha$ -stimulierten Fibroblasten und einhergehend die Herabsetzung der chemotaktischen Faktoren, die von den Fibroblasten ausgehen. Dies verdeutlicht, welche entscheidende Rolle die CAF und TNF- $\alpha$  bei der Migration von HT29 und peripherer mononukleärer Zellen spielen.

Neben der Migrationshemmung scheint die Hemmung von NF- $\kappa$ B anderen therapeutischen Nutzen zu haben. Viele längst gut etablierte Chemotherapeutika induzieren NF- $\kappa$ B in Tumorzellen und sorgen für eine Chemoresistenz durch Herabsetzung der Apoptose. Die NF- $\kappa$ B-Hemmung könnte ein Ansatz sein, die Tumorzellen wieder für Chemotherapie zu sensibilisieren (Inoue *et al.* 2007, Nakanishi *et al.* 2005). Dies zeigt sich in der Studie von Patel *et al.*, bei der sich in einer Brustkrebszelllinie die Apoptoserate nach Gabe eines Chemotherapeutikums (Paclitaxel) deutlich erhöhte, wenn die Zellen mit Parthenolide inkubiert wurden.

Auch in den Tumorzellen konnte die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA ab Zugabe von 1  $\mu$ M Parthenolide gehemmt werden (Patel *et al.* 2000). Beim Nierenzellkarzinom zeigte sich *in vitro* eine Proliferationshemmung und erhöhte Apoptose der Tumorzellen durch Parthenolide. In einem Xenograft Modell war die Tumorgröße signifikant erniedrigt, ebenso die IL-8 und VEGF-Produktion. Zudem war in der Immunhistochemie des Tumors unter anderem die Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-xL und der angiogenetische Faktor MMP-9 nach Parthenolideapplikation der Maus erniedrigt nachweisbar (Oka *et al.* 2007). Die Zugabe von Parthenolide zu Tumorzellen scheint diese sogar für TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose zu sensitivieren. Indem der Signalweg vom TNF-Rezeptor zu NF- $\kappa$ B blockiert wurde, könnte ein alternativer proapoptotischer Signalweg induziert werden (Zhang *et al.* 2004 b, Pająk *et al.* 2008). Über den genauen molekularen Mechanismus herrscht noch Unklarheit, ein möglicher Weg könnte NF- $\kappa$ B-unabhängig über Apoptose-induzierende Kaspasen zum Zelltod führen (Anderson, Bejcek 2008, Zhang *et al.* 2004 b, Carlisi *et al.* 2011). Ein Vitalitätsverlust von Fibroblasten und Tumorzellen wurde in der vorliegenden Arbeit erst bei höheren Parthenolidekonzentrationen beobachtet (Abb. 2 und 3). Die Koinkubation von TNF- $\alpha$  und Parthenolide zeigte keinen Vitalitätsunterschied sowohl bei HT29 als auch bei den Fibroblasten, was dafür spricht, dass zumindest bei dem Versuchsansatz der vorliegenden Arbeit Parthenolide nicht zur TNF- $\alpha$ -induzierten Apoptose führt.

Insgesamt könnte die NF- $\kappa$ B-Hemmung in CAF bei der Entstehung von Lebermetastasen durch die gehemmte Bildung eines proinflammatorischen Mikromilieus und die verringerte Rekrutierung von peripheren Blutmonozyten einen neuen Therapieansatz darstellen. Ebenso ist der Aspekt nicht zu verachten, dass Parthenolide für Chemotherapeutika zu sensitivieren vermag. Allerdings ist durch die *in-vitro*-Modelle nicht absehbar, welche systemische Wirkungen Parthenolide auf den Organismus hat, da es in höheren Dosierungen durchaus zytotoxisch wirkt (Zanotto-Filho *et al.* 2011). Weiterhin ist nicht abzusehen, welche Auswirkungen die systemische Hemmung von NF- $\kappa$ B hat, da auch gesunde Zellen von der Hemmung mit betroffen sein dürften. Welche Folgen dies auf das Immunsystem hat und ob es zu Wundheilungsstörungen und zur fehlenden physiologischen Entzündungsantwort auf eintretende Erreger führt oder gar zu einer Sepsis prädisponiert, bleibt noch zu klären.

Zusammenfassend begünstigen CAF durch die Erhöhung der Migration durch den TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweg sowohl die Entstehung einer hepatischen Metastase und unterstützen das Wachstum und die Progression des Tumors durch Bildung und Aufrechterhaltung eines entzündlichen Stromas. Die genaue in vivo Untersuchung der Tumor-Stroma-Interaktion insbesondere der CAF mit den Tumorzellen in Verbindung mit TNF- $\alpha$  und der NF- $\kappa$ B-Hemmung durch Parthenolide könnte auf dem Boden dieser Arbeit weitergehende Erkenntnisse und neue therapeutische Möglichkeiten bei Lebermetastasen kolorektaler Karzinome ergeben.

## **6. Zusammenfassung**

Die Leber ist das bevorzugte Zielorgan kolorektaler Metastasen. Trotz kurativer Therapiemöglichkeiten durch Resektion bedarf es anderer Therapiekonzepte, da ein Großteil der Patienten inoperabel ist. Die Metastase besteht neben den Tumorzellen aus einer Vielzahl an Stromazellen wie Fibroblasten, Perizyten, Immunzellen und Makrophagen in einem entzündlichen Mikromilieu. Der TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweg ist generell bei der Entstehung des entzündlichen Mikromilieus entscheidend.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle der Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAF engl. Cancer associated fibroblasts) bei der Entstehung und der Progression einer Lebermetastase in einem durch TNF- $\alpha$  generierten entzündlichen Milieu. Da Zellmigration einen der wichtigsten Schritte bei der Metastasierung darstellt, wurde hier ein Schwerpunkt gesetzt. Mit dem EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) wurde nachgewiesen, dass CAF nach TNF- $\alpha$ -Stimulation mit einer Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B reagieren, diese Aktivierung ließ sich durch Parthenolide aus der Pflanze *Tanacetum parthenium* hemmen. TNF- $\alpha$ -stimulierte CAF steigern signifikant die gerichtete Migration kolorektaler Karzinomzellen (HT29) und peripherer mononukleärer Zellen (PBMNCs, peripheral blood mononuclear cells) im modifizierten Boyden Chamber Assay. Die Steigerung der gerichteten Zellmigration kann durch den pflanzlichen NF- $\kappa$ B-Inhibitor Parthenolide signifikant gehemmt werden. Dies legt nahe, dass die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ Bs durch Parthenolide in CAF zur geringeren Migrationsstimulation von HT29 und PBMNC führt. Tumorzellen ihrerseits erhöhen die gerichtete Migration von CAF und normalen Leberfibroblasten ohne signifikanten Unterschied. Nicht nur CAF, sondern auch normale Leberfibroblasten scheinen somit prädisponiert für die Ausbildung des Tumorstromas zu sein. TNF- $\alpha$  alleine erhöht die Zellmigration der HT29 in einen Scratch Wound Assay.

Insgesamt verdeutlicht diese Arbeit, dass CAF durch den TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweg die Zellmigration von Tumorzellen und peripheren mononukleären Zellen erhöhen und somit potentiell die Lebermetastasierung entscheidend begünstigen. Daraus ergibt sich ein weiterer Einblick in die komplexe Tumor-Stroma-Interaktion. Parthenolide könnte einen neuen therapeutischen Ansatz bei der Entstehung kolorektaler Lebermetastasen darstellen.

## **7. Literaturverzeichnis**

Aggarwal B, Shishodia S, Sandur S, Pandey M, Sethi G (2006): Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical pharmacology*, 72, 1605-1621

Anderson KN, Bejcek BE (2008): Parthenolide induces apoptosis in glioblastomas without effecting NF- $\kappa$ B. *Journal of Pharmacological Sciences* 106, 318-320

Antoine M, Tag CG, Gressner AM, Hellerbrand C, Kiefer P (2009): Expression of E-selectin ligand-1 (CFR/ESL-1) on hepatic stellate cells: implications for leukocyte extravasation and liver metastasis. *Oncology Reports* 21(2):357-362

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. *Clinical Exp Metastasis*, 24 (2):121-30

Berchtold (2008), *Chirurgie* 6. Aufl. Urban & Fischer München

Böcker, Denk, Heitz (2004), *Pathologie* 3. Aufl. Urban & Fischer München

Bortolami M, Venturi C, Giacomelli L, Scalerta R, Bacchetti S, Marino F, Floreani A, Lise M, Naccarato R, Farinati F (2002): Cytokine, infiltrating macrophage and T-cell-mediated response to development of primary and secondary human liver cancer. *Dig Liver Dis.* 34(11):794-801

Brenmoehl J, Miller SN, Hofmann C, Vogl D, Falk W, Schölmerich J, Rogler G (2009): Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World Journal of Gastroenterology*15(12):1431-1442

Carlisi D, D'Anneo A, Angileri L, Lauricella M, Emanuele S, Santulli A, Vento R, Tesoriere G (2011): Parthenolide sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by inducing the expression of death receptors through inhibition of STAT3 activation. *J Cell Physiol.* 226(6):1632-41

Chen AL, Soman KV, Rychahou PG, Luxon BA, Evers BM (2005): Proteomic analysis of colonic myofibroblasts and effect on colon cancer cell proliferation. *Surgery* 138 (2):382-390

Choo MK, Sakurai H, Kim DH, Saiki I (2008): A ginseng saponin metabolite suppresses tumor necrosis factor-alpha-promoted metastasis by suppressing nuclear factor-kappaB signaling in murine colon cancer cells. *Oncology Reports* 19:595-600

Conti JA, Kendall TJ, Bateman A, Armstrong TA, Papa-Adams A, Xu Q, Packham G, Primrose JN, Benyon RC, Iredale JP (2008): The desmoplastic reaction surrounding hepatic colorectal adenocarcinoma metastases aids tumor growth and survival via  $\alpha_v$  integrin ligation. *Clin Cancer Res.* 14 (20), 6405-13

Coussens LM & Werb Z (2002): Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860-7

Denys H, Derycke L, Hendrix A, Westbroek W, Gheldof A, Narine K, Pauwels P, Gespach C, Bracke M, De Wever O (2008): Differential impact of TGF- $\beta$  and EGF on fibroblast differentiation and invasion reciprocally promotes colon cancer cell invasion. *Cancer Letters* 266(2): 263-274

Desmoulière A, Guyot C, Gabbaini G (2004): The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int. J. Dev. Biol.* 48(5-6):509-517

Dong R, Wang Q, He XL, Chu YK, Lu JG, Ma QJ (2007): Role of nuclear factor kappa B and reactive oxygen species in the tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells. *Brazilien Journal of Medicine and Biological Research* 40(8):1071-1078

Dunlevy JR, Couchman JR (1995): Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. *Journal of Cell Science* 108, 311-321

Gassmann P, Haier J, Schlüter K, Domikowsky B, Wendel C, Wiesner U, Kubitza R, Engers R, Schneider SW, Homey B, Müller A (2009): CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo. *Neoplasia* 11 (7), 651-661

Giușcă SE, Zugun FE, Tărcoveanu E, Carasevici E, Amălinei C, Căruntu ID (2010): Immunohistochemical study of colorectal cancer liver metastases: the immune/inflammatory infiltrate. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 51(1):73-79

Gout S, Huot J (2008): Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenvironment* 1:69-83

Grimm M, Gasser M, Bueter M, Strehl J, Wang J, Nichiporuk E, Meyer D, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Thalheimer A (2010): Evaluation of immunological escape mechanisms in a mouse model of colorectal liver metastasis. *Biomed Central Cancer* 10:82

Gulubova MV (2002): Expression of cell adhesion molecules, their ligands and tumour necrosis factor alpha in the liver of patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *Histochem J* 34(1-2):67-77

Hatfield KJ, Reikvam H, Bruserud Ø (2010): The crosstalk between the matrix metalloprotease system and the chemokine network in acute myeloid leukemia. *Curr Med Chem.* 17(36):4448-61

Hauptmann S, Siegert A, Berger S, Denkert C, Köbel M, Ott S, Siri A, Borsi L (2003): Regulation of cell growth and the expression of extracellular matrix proteins in colorectal adenocarcinoma: a fibroblast-tumor cell coculture model to study tumor-host interactions in vitro. *Eur J Cell Biology* 82(1):1-8

Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE, Nakshatri H (2003): NF- $\kappa$ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of Biological Chemistry* 278(24): 21631-21638

Herold G (2008) *Innere Medizin Gerd Herold, Köln*

Higashi N, Ishii H, Fujiwara T, Morimoto-Tomita M, Irimura T (2002): Redistribution of fibroblasts and macrophages as micrometastases develop into established liver metastases. *Clinical & Experimental Metastasis* 19(7): 631-638

Hofbauer R, Hofbauer L, Moser D, Salfinger H, Speiser W, Frass M, Kapiotis S (1998): Leukocyte migration: a new triple migration chamber assay allows investigation of various cell interactions simultaneously. *Life science* 63(19), 1725-1737

Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD (2008): Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Research* 68 (3):918-926

Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K (2007): NF- $\kappa$ B activation in development and progression of cancer. *Cancer sci.* 98 (3), 268-274

Ishinaga H, Jono H, Lim JH, Komatsu K, Xu X, Lee J, Woo CH, Xu H, Feng XH, Chen LF, Yan C, Li JD (2009): Synergistic induction of nuclear factor- $\kappa$ B by transforming growth factor- $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  is mediated by protein kinase A-dependent RelA acetylation. *Biochemical Journal* 417(2): 583-591

Jedinak A, Dudhgaonkar S, Sliva D (2010): Activated macrophages induce metastatic behavior of colon cancer cells. *Immunobiology* 215(3): 242-249

Kaminski A, Hahne JC, Haddouti el-M, Florin A, Wellmann A, Wernert N (2006): Tumor-stroma interactions between metastatic prostate cancer cells and fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine* 18(5): 941-950

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

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N (1993): Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362(6423):841-4

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 Research* 62(22): 6682-6687

Kobayashi A, Miyagawa S (2010): Advances in therapeutics for liver metastasis from colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 2(10): 380-389

Koshida Y, Kuranami M, Watanabe M (2006): Interaction between stromal fibroblasts and colorectal cancer cells in the expression of vascular endothelial growth factor. *J Surg Res.* 134 (2): 270-7

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E (2006): Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Research* 66: (2) 632-637

Krueger S, Kalinski T, Wolf H, Kellner U, Roessner A (2005): Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture – regulation of cathepsin B expression and invasiveness. *Cancer Letters* 223(2):313-322

Le NH, Franken P, Fodde R (2008): Tumour-stroma interactions in colorectal cancer: converging on  $\beta$ -catenin activation and cancer stemness. *British Journal of Cancer* 98(12): 1886-1893

Li H, Lin X (2008): Positive and negative signaling components involved in TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. *Cytokine* 41(1): 1-8

Lu B, Finn OJ (2008): T-cell death and cancer immune tolerance. *Cell Death Differ* 15(1):70-79

Lüllmann-Rauch R (2003) Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Maeda S, Hikiba Y, Sakamoto K, Nakagawa H, Hirata Y, Hayakawa Y, Yanai A, Ogura K, Karin M, Omata M (2009): Ikappa B kinasebeta/nuclear factor- kappaB activation controls the development of liver metastasis by way of interleukin-6 expression. *Hepatology* 50(6):1851-60

Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM (2008): Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 371(9614):771-83

Mantovani A, Sica A (2010): Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 22(2):231-7

Martin M, Pujuguet P, Martin F (1996): Role of stromal myofibroblasts infiltrating colon cancer in tumor invasion. *Pathol. Res Pract.* 192(7):712-7

McConnell BB, Yang VW (2009): The role of inflammation in the pathogenesis of colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 5(2): 69-74

Micke P, Ostman A (2005): Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as target in cancer therapy. *Expert Opinion Ther Targets* 9 (6):1217-1233

Morimoto M, Irimura T (2001): Fibroblast migratory factor derived from mouse colon carcinoma cells: Potential roles of fibronectin in tumor stroma formation. *Journal of Cellular Biochemistry* 80(4):635-646

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

Müerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H (2004): Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1 $\beta$ . *Cancer Research* 64(4): 1331-1337

Müller-Esterl 2004, Biochemie, 1. Auflage Elsevier GmbH, München

Müller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, Broering D (2007): Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *The American Journal of Pathology* 171(5): 1608-1618

Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE (2004): Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104(8): 2224-2234

Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, 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(44): 7366-7377

Nakanishi C, Toi M (2005): Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 5(4): 297-309

Naomoto Y, Gunduz M, Takaoka M, Okawa T, Gunduz E, Nobuhisa T, Kobayashi M, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Sonoda R, Matsuoka J, Tanaka N (2007): Heparanase promotes angiogenesis through Cox-2 and HIF1 $\alpha$ . *Medical Hypotheses* 68(1): 162-165

O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ (2008): Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intracellular communication in the microenvironment. *Biochemical Journal* 409(3): 635-649

Ohtani H (1998): Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Patho Int.* 48(1):1-9

Ohira S, Sasaki M, Harada K, Sato Y, Zen Y, Isse K, Kozaka K, Ishikawa A, Oda K, Nimura Y, Nakanuma Y (2006): Possible regulation of migration of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by interaction of CXCR4 expressed in carcinoma cells with tumor necrosis factor- $\alpha$  and stromal-derived factor-1 released in stroma. *American Journal of Pathology* 168(4): 1155-1168

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- $\kappa$ B. *Int. J. Cancer* 120(12):2576-2581

Orimo A, Gupta P, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005): Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121(3): 335-348

Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A (2008): Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Folia histochemica et cytobiologica* 46(2): 129-135

Palumbo R, Galvez BG, Pusterla T, De Marchis F, Cossu G, Marcu KB, Bianchi ME (2007): Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF- $\kappa$ B activation. *The Journal of Cell Biology* 179 (1): 33-40

Patel N, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S, Gelfanov V, Boswell SH, Coulet RJ Jr, Sledge GW Jr, Nakshatri H (2000): Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF- $\kappa$ B is enhanced by I $\kappa$ B $\alpha$  super-repressor and parthenolide. *Oncogene* 19(36): 4159-4169

Primrose JN (2010): Surgery for colorectal liver metastases. *British Journal of Cancer* 102(9): 1313-1318

Rosette C, Roth RB, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, Denissenko MF (2005): Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 26(5): 943-950

Sansone P, Bromberg J (2011): Environment, inflammation, and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 21(1): 80-5

Shen G, Jeong WS, Hu R, Kong AN (2005): Regulation of Nrf2, NF- $\kappa$ B, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents. *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (11&12): 1648-1663

Shimao Y, Nabeshima K, Inoue T, Kono M (1999): Role of fibroblasts in HGF/SF-induced cohort migration of human colorectal carcinoma cells: Fibroblasts stimulate migration associated with increased fibronectin production via upregulated TGF- $\beta$ 1. *Int. J. Cancer*: 82(3): 449-458

Sis B, Sarinoglu S, Sokmen S, Sakar M, Kupelioglu A, Fuzun M (2005): Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: an independent prognostic marker in colorectal carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 58(1):32-8

Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI (2005): Proliferating fibroblasts at the invading tumour edge of colorectal adenocarcinomas are associated with endogenous markers of hypoxia, acidity, and oxidative stress. *J. Clin. Pathol.* 58(10):1033-1038

Studebaker AW, Storci G, Werbeck JL, Sansone P, Sasser AK, Tavorari S, Huang T, Chan MW, Marini FC, Rosol TJ, Bonafé M, Hall BM (2008): Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner. *Cancer Res* 68 (21):9087-95

Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M (2007): Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 13 (7) 2082-2090

Vandoros GP, Konstantinopoulos PA, Sotiropoulou-Bonikou G, Komeia A, Papachristou GI, Karamouzis MV, Gkermepesi M, Varakis I, Papavassilou AG (2006): PPAR-gamma is expressed and NF-KB pathway is activated and correlates positively with COX-2 expression in stromal myofibroblasts surrounding colon adenocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 132(2): 76-84

Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R (2009): Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 28(30): 2745-2755

Waugh DJ, Wilson C (2008): The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res* 14(21): 6735-6741

Weinberg R (2007): *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group New York

Wellner UF, Keck T, Brabletz T (2010): Liver metastases: pathogenesis and oncogenesis. *Chirurg*. 81(6):551-6

Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D (2008): Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes & Development* 22(5):559-574

Yilmaz M, Christofori G (2010): Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* 8(5):629-42

Zanotto- Filho A, Braganhol E, Schröder R, de Souza LH, Dalmolin RJ, Pasquali MA, Gelain DP, Battastini A, Moreira JC (2011): NF $\kappa$ B inhibitors induce cell death in glioblastomas. *Biochemical Pharmacology* 81(3):412-424

Zhang Q, Helfand BT, Jang TL, Zhu LJ, Chen L, Yang XJ, Kozlowski J, Smith N, Kundu SD, Yang G, Raji AA, Javonovic B, Pins M, Lindholm P, Guo Y, Catalona WJ, Lee C (2009): Nuclear factor- $\kappa$ B-mediated transforming growth factor- $\beta$ -induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 15(10):3557-3567

Zhang S, Ong CN, Shen HM (2004 a): Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Cancer Letters* 211(2): 175-188

Zhang S, Lin ZN, Yang CF, Shi X, Ong CN, Shen HM (2004b): Suppressed NF- $\kappa$ B and sustained JNK activation contribute to the sensitization effect of parthenolide to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in human cancer cells. *Carcinogenesis* 25(11): 2191-2199

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
CAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten (engl. Cancer associated fibroblasts)
CD	cluster of differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DDT	dichlorodiphenyltrichloroethan
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Media
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ehtylendiamintetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
FCS	fetal calf serum
h	Stunde
H.E.-Färbung	Hämalaun- und Eosin-Färbung
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N-ethansulfonsäure
HIF- $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor- $\alpha$
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
ICC	intrahepatisches Cholangiokarzinom
I $\kappa$ B	Inhibitor Kappa B
IKK	I $\kappa$ B-Kinase-Komplex
INF- $\gamma$	Interferon-gamma
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
KCl	Kaliumchlorid
LF	Leberfibroblasten
MCP-1	monocyte chemotatic protein-1

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
nm	Nanometer
OP	Operation
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	plateled derived growth factor
p- I $\kappa$ B	phosphoryliertes I $\kappa$ B
rpm	rounds per minute
SDF-1	stromal derived factor-1
SEM	standard error of the mean
SMA- $\alpha$	smooth-muscle-actin- $\alpha$
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TNF-Rezeptor	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
VEGF	vascular endothelial growth factor
$\mu$ l	Microliter
2D	zweidimensional

## **Danksagung**

Ich danke PD Dr. Lars Müller sehr für seine stetige Betreuung der Arbeit, seiner Bereitschaft, die Arbeit durchgehend zu betreuen und jederzeit Fragen mit produktiven Ideen und motivierenden Tipps zu beantworten. Insbesondere danke ich ihm für seine Förderung sowohl im wissenschaftlichen Bereich als auch darüber hinausgehend.

Herrn Prof. Kalthoff danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein Interesse an der Arbeit.

Herrn Prof. Becker und Herrn Dr. C. Bröring danke ich für die Bereitschaft, in ihrer Klinik promovieren zu können.

Weiterhin danke ich meinen Laborkollegen Betül Temel, Alexander Bernsmeier, Alexandra Sieger, Bianka Zinke, Birgit Fricke, Bianka Körtge, Dr. Christian Röder, Andreas Noak, Dr. Sanjay Tiwari, Lena Kornienko, Stefanie Klose, PD Dr. Ania Trauzold, Carola Conradt-Zenker, Angelika Duttman und allen anderen für die vielen lustigen Stunden im Labor, die Einarbeitung und die stete Bereitschaft Fragen zu beantworten.

Meiner Familie danke ich für jegliche Unterstützung in allen Bereichen und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr haben.

Meinen Freunden danke ich für ihr Interesse an der Arbeit und den vielen Gesprächen und der zusammen verbrachten Zeit.

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name	Jennifer Schumacher
Geburtsdatum	11.05.1985
Geburtsort	Steinheim, Kreis Höxter
Staatsangehörigkeit	deutsch

### **Bildung**

1991-1995	Kath. Grundschule Oeynhausen
1995-2004	Städt. Gymnasium Bad Driburg
WS 05/06- WS 11/12	Studium der Humanmedizin an der CAU

### **Famulaturen**

09.02.2009- 24.02.2009	Praxis für Gastroenterologie Dr. med. Klaus Gülzow
02.03.2009- 05.04.2009	Anästhesie Lubinus Clinicum
03.08.2009- 16.08.2009	Poliklinik 2. Medizin UK-SH
17.08.2009- 13.09.2009	Internistische Aufnahmestation Städtisches Krankenhaus Kiel
21.09.2009- 18.10.2009	UK-SH, Klinik für Neurologie

## Praktisches Jahr

1. Terial Innere Medizin Spital Rheinfelden, Gesundheitszentrum Fricktal, Schweiz
2. Terial Anästhesiologie UK-SH, Klinik für Anästhesiologie und Operative  
Intensivmedizin
3. Terial Chirurgie Städt. Krankenhaus Kiel

## Promotion

Ab August 2008 bis Februar 2012 in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel unter dem Thema: „Tumor-assoziierte Fibroblasten aus kolorektalen Lebermetastasen erhöhen die Zellmigration über den TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Signalweg“

## Veröffentlichungen

Poster:

Tumor-assoziierte Fibroblasten aus Lebermetastasen bilden ein proinflammatorisches Mikromilieu und erhöhen die Migration colorektaler Karzinomzellen

Schumacher J, Seggern L von, Temel B, Kalthoff H, Bröring DC, Müller L.  
64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen 30.9.- 3.10.2009, Hamburg

Publikation:

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. Biochemical and Biophysical Research Communications 397(3): 586-591