

Technische Universität München

Chirurgische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar

Einfluss der Fibroblasten-Tumor-Zellinteraktion bei Interferon alpha Behandlung von HCC-Zelllinien

Saphira Virginia Böhm

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Zahnheilkunde (Dr. med. dent.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. J. Kleeff
2. Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff

Die Dissertation wurde am 06.04.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.12.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom.....	1
1.1.1	Charakteristika und Inzidenz.....	1
1.1.2	Ätiologie.....	2
1.1.3	Therapiemöglichkeiten.....	2
1.2	Hauptrisikofaktor Leberzirrhose.....	4
1.2.1	Bedeutung der Tumorumgebung.....	4
1.2.2	Leberzirrhose als Präkanzerose.....	4
1.2.3	Fibropathogenese.....	5
1.3	Interferon alpha (IFN α).....	7
1.3.1	Einteilung der Interferone.....	7
1.3.2	Therapie mit Interferon alpha.....	8
1.3.3	Interferon alpha Rezeptor (IFNAR) und Signaltransduktion.....	9
2	Ziel der Arbeit.....	12
3	Material.....	14
3.1	Laborgeräte.....	14
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	14
3.3	Chemikalien und Reagenzien.....	15
3.4	Zelllinien.....	16
3.5	Zellkultur-Medien.....	16
3.6	Antikörper.....	17
3.6.1	primäre Antikörper.....	17
3.6.2	sekundäre Antikörper.....	17
3.7	Expressionsprimer.....	18
3.8	Rekombinantes Zytokin.....	18
3.9	Antibiotika.....	18
3.10	Enzyme.....	18
3.11	Größenmarker.....	18

3.12	Kits.....	18
3.13	Statistik	19
4	Methoden	20
4.1	Zellkultur.....	20
4.1.1	Auftauen der Zellen.....	20
4.1.2	Kultivierung der Zellen	20
4.1.3	Lösen, Passagieren und Aussäen der Zellen	20
4.1.4	Zellzahlbestimmung.....	21
4.1.5	Kokultivierung	21
4.1.6	Magnetische Zellsortierung (<i>MACS</i>)	21
4.1.7	Interferon Behandlung	24
4.1.8	MTT-Vitalitätstest.....	24
4.1.9	BrdU-Proliferationstest	25
4.2	Molekularbiologische RNA-Methoden.....	26
4.2.1	RNA-Isolierung aus Zelllinien.....	26
4.2.2	RNA-Isolierung aus Patientengewebe	27
4.2.3	RNA-Konzentrationsmessung	27
4.2.4	cDNA-Synthese.....	28
4.2.5	Quantitative Real-Time-PCR.....	29
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	30
4.3.1	Herstellung des Proteinlysates	30
4.3.2	Proteinkonzentrationsmessung.....	31
4.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
4.3.4	Western-Blot-Analyse.....	33
4.4	Histologie der Patientengewebe.....	34
4.4.1	Schneiden der Paraffinblöcke	34
4.4.2	Hämatoxilin-Eosin Färbung.....	34
4.4.3	Immunhistochemische Darstellung von <i>IFNAR1</i> und α - <i>SMA</i>	35
5	Ergebnisse.....	37
5.1	MTT-Vitalitätstest von <i>IFNα</i> behandelten Zelllinien	38
5.2	Expression von <i>IFNAR1</i> und <i>IFNAR2</i> in den Zelllinien.....	40

5.3	BrdU-Proliferationstest von IFN α behandelten Zelllinien	43
5.4	Western-Blot-Analyse des STAT1/p-STAT1-Signalweges	44
5.4.1	STAT1/p-STAT1-Signalweg der Monokultur	44
5.4.2	STAT1/p-STAT1-Signalweg der Kokultur.....	46
5.5	Expression von <i>IFNA</i> , <i>IFNAR1</i> und <i>IFNAR2</i> im Patientengewebe	47
5.6	Histologische Untersuchung der Patientengewebe.....	49
5.6.1	Immunhistochemische Darstellung von IFNAR1	49
5.6.2	Zusammenhang von IFNAR1 und der Leberhistologie.....	51
5.6.3	Immunhistochemische Darstellung von α -SMA.....	52
5.6.4	Zusammenhang von α -SMA und der Leberhistologie.....	53
5.6.5	Zusammenhang von IFNAR1 und der Fibrose	54
6	Diskussion	56
6.1	Zusammenhang zwischen Rezeptorexpression (<i>IFNAR1</i> und <i>IFNAR2</i>) und Proliferation der Zellkultur unter Interferon Behandlung.....	57
6.2	STAT1-Signalweg in den Zelllinien.....	59
6.3	<i>IFNA</i> und <i>IFNAR1</i> mRNA-Expression im Patientengewebe	60
6.4	Immunhistologie von IFNAR1 im Patientengewebe.....	61
7	Zusammenfassung	63
8	Abkürzungsverzeichnis	64
9	Literaturverzeichnis	66
10	Abbildungsverzeichnis	72
11	Tabellenverzeichnis	73
12	Danksagung	74
13	Lebenslauf.....	75
14	Eidesstattliche Erklärung	76

1 Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Charakteristika und Inzidenz

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre Lebertumor. Es stellt einen hochmalignen epithelialen Tumor dar. Global betrachtet steht das HCC bei Männern an 5. Stelle und bei Frauen an 7. Stelle der häufigsten malignen Tumoren (El-Serag, 2012). Es ist die dritthäufigste Ursache eines Tumor assoziierten Versterbens (Zhu, 2006). Je nach Vorkommen verantwortlicher Risikofaktoren (v. a. Hepatitis B und Hepatitis C) tritt das HCC geografisch mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Hohe Inzidenzen sind in Ost- und Südostasien, Mittel- und Westafrika ($>20/100.000$ Einwohner) zu verzeichnen. Während mittlere Inzidenzen in Südeuropa auftreten, zeigen sich niedrigere ($<5/100.000$ Einwohner), aber langsam steigende Inzidenzen in Süd-, Zentral- und Westasien, in Nord-, Zentral- und Osteuropa, Amerika und Australien (El-Serag, 2012; Jemal et al., 2011). Als Ursache steigender Inzidenz in westlichen Ländern wird ein längeres Überleben mit Leberzirrhose und folgender HCC-Entstehung angenommen (Fattovich et al., 2004). Ebenso ist eine Zunahme von Risikofaktoren wie Diabetes mellitus und Adipositas zu verzeichnen, welche als Folge die Entwicklung einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) oder einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) nach sich ziehen können (El-Serag, 2007). Der Erkrankungsgipfel liegt in Regionen niedriger Inzidenz bei ca. 65 Jahren und ist damit höher als in Hochrisikogebieten wie beispielsweise China, wo er bei 45 Jahren liegt (El-Serag, 2012). Global sind Männer mehr als doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Jemal et al., 2011). Die Mehrzahl der Patienten überlebt nach Diagnosestellung nicht einmal ein Jahr und nur 6,5 % weisen eine Überlebensrate von 5 Jahren auf (Denzler et al., 2006).

1.1.2 Ätiologie

Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC können klar umrissen werden. Vor allem chronische Infektionen mit dem Hepatitis B Virus (HBV) und Hepatitis C Virus (HCV), chronischer Alkoholabusus, Lebererkrankungen (Hämochromatose, alpha-1 Antitrypsin Mangel) und lebertoxische Medikamente sind ursächlich an der Entwicklung eines HCC beteiligt. In Entwicklungsländern spielt die Exposition mit dem Schimmelpilzgift Aflatoxin in der Nahrung eine wichtige Rolle. In modernen und wohlständigen Staaten, beispielsweise in den USA, mit einem hohen Prozentsatz an Übergewichtigen und Diabetikern, gewinnt die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) zunehmend als Risikofaktor an Bedeutung. In Deutschland stellen die Hepatitis C Virus Infektion und der Alkoholkonsum die wichtigsten Risikofaktoren dar (Leitlinienprogramm Onkologie HCC, 2013).

Außer dem, in gesunden Lebern auftretenden, Aflatoxin assoziierten HCC, entstehen 80-90 % der Leberzellkarzinome in einer durch die genannten Faktoren zirrhotisch vorgeschädigten Leber (El-Serag, 2012; Fattovich et al., 2004).

1.1.3 Therapiemöglichkeiten

Die Therapie des HCC hat sich allgemein bislang als sehr schwierig dargestellt. Ein Grund hierfür liegt unter anderem an einer meist späten Diagnosestellung, da Symptome häufig uncharakteristisch sind und erst in fortgeschrittenem Tumorstadium auftreten (Raphael et al., 2012). Das Organ ist zu diesem Zeitpunkt durch die zugrundeliegende Zirrhose meist stark geschädigt. Im Folgenden werden einige etablierte HCC-Therapieverfahren beschrieben, die jedoch nur bei einem Teil der Patienten anwendbar und effektiv sind:

Als kurative Therapie des HCC kommen die chirurgische Resektion, Lebertransplantation und Tumorablation in Frage (Leitlinienprogramm Onkologie HCC, 2013). Durch eine späte Erstdiagnose befinden sich die Patienten jedoch meist in einem fortgeschrittenen, nicht mehr

operationsfähigen Stadium, so dass eine Tumorresektion wegen der Tumorgröße und der Leberzirrhose und damit verbundener zu großer postoperativer Komplikationen außer Frage steht (Blum et Hopt, 2003). Lebertransplantationen sind durch die geringe Anzahl an Spenderorganen oder dem Vorliegen extrahepatischer Tumormanifestationen ebenso stark limitiert. Hieraus ergibt sich, dass lokal interventionellen und nicht chirurgischen Therapieoptionen ein hoher Stellenwert zukommt (Blum et Hopt, 2003). In einem sehr frühen Tumorstadium, mit geringer Tumorgröße und fehlender extrahepatischer Manifestation, kann mit minimal invasiven Ablationsverfahren effektiv vorgegangen werden (Forner et al., 2012). Am häufigsten kommen die perkutane Ethanolinjektion und die perkutane Radiofrequenz-Thermoablation zum Einsatz. Mit diesen Verfahren möchte man eine Nekrotisierung des Tumors erreichen.

Es stehen auch verschiedene palliativmedizinische Methoden zur Verfügung. Bei der transarteriellen Chemoembolisation wird die arterielle Versorgung des HCC unterbunden und der Tumor chemotherapeutisch behandelt. Patienten mit mittlerem oder fortgeschrittenem Tumorstadium, bei welchen keine der vorangegangenen Therapiemöglichkeiten angewendet werden können, stehen teilweise in Kombination verabreichte, nur noch systemisch-palliative Medikamente zur Verfügung (Raphael et al., 2012). Bei fortgeschrittenem Leberkrebs wird mit dem Tyrosinkinasehemmer Sorafenib ein längeres Überleben angestrebt.

In Anbetracht der schwierigen Behandlung des HCC kommt der Tumorprävention, im Sinne einer Behandlung von präkanzerösen Lebererkrankungen, ein hoher Stellenwert zu. Für HCC-Patienten, deren Prognose allgemein als schlecht einzustufen ist, wären erfolgversprechendere Behandlungsmethoden wünschenswert. Um diese zu entwickeln, müssen die molekularen Mechanismen der HCC-Entstehung, einschließlich des Einflusses des Mikromilieus auf die Karzinogenese, noch weiter erforscht werden.

1.2 Hauptrisikofaktor Leberzirrhose

1.2.1 Bedeutung der Tumorumgebung

Um die Mechanismen der Hepatokanzerogenese besser zu verstehen, wird in der heutigen Forschung der Fokus nicht mehr auf die Tumorzelle alleine gelegt, sondern der Tumorumgebung zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt (Pietras et Östman, 2010). Man weiß, dass verschiedene Zelltypen im Tumor und Tumor-umgebenden Gewebe über parakrine Kommunikation Einfluss auf die Tumorentstehung und -progression ausüben (Li et al., 2012). Welcher Zusammenhang zwischen dem HCC-Stroma, bestehend aus extrazellulärer Matrix, Fibroblasten, inflammatorischen Zellen, Endothelzellen, Periozyten etc. (Li et al., 2012) und dem Tumor selbst bzw. seiner Beeinflussung durch Medikation steht, ist noch unzureichend bekannt.

1.2.2 Leberzirrhose als Präkanzerose

80-90 % der Leberzellkarzinome entstehen in einer zirrhotisch vorgeschädigten Leber (El-Serag, 2012; Fattovich et al., 2004). Die Leberzirrhose gilt als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines HCC und kann als Präkanzerose bezeichnet werden (Fattovich et al., 2004). Abhängig von der Ersterkrankung gibt es jedoch ein unterschiedlich hohes Risiko ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln. Nach Fattovich et al. (2004) ergeben sich folgende kumulative Inzidenzen innerhalb von 5 Jahren an HCC zu erkranken:

Bei hereditärer Hämochromatose 21 %, bei Hepatitis C bedingter Zirrhose 17 %, bei Hepatitis B bedingter Zirrhose 10 %, bei Alkoholzirrhose 8 % und bei biliärer Zirrhose 4 %. Wenn mehrere der genannten Faktoren zusammenkommen erhöht sich das Krebsrisiko, ebenso mit steigendem Alter und männlichen Geschlechts.

1.2.3 Fibropathogenese

Bei anhaltenden Noxen (Hepatitis B/C Virus, Alkohol, NASH/NAFLD, Autoimmunerkrankungen, lebertoxische Medikamente, Cholestase, genetische Stoffwechselerkrankungen etc.) kommt es durch chronische Entzündung, Nekrose und Regeneration zu deutlichen Umbauvorgängen zu Gunsten des Bindegewebes in der Leber. Das hochspezialisierte Lebergewebe wird letztendlich durch funktionsuntüchtiges Mesenchym ersetzt und es entsteht eine zirrhotische Leber. Nach Schuppan et al. (2008) kann man die Fibropathogenese im Einzelnen folgendermaßen beschreiben:

Durch Schädigung des Epithelgewebes kommt es zu Entzündungsprozessen und Absterben von Leberzellen. Bei der Zerstörung der Hepatozyten werden Mediatoren freigesetzt, die Immunzellen anlocken und Makrophagen (Kupffer-Sternzellen) aktivieren, welche wiederum Zytokine und Wachstumsfaktoren, v. a. TGF- β (*transforming growth factor β*) und PDGF (*platelet-derived growth factor*) freisetzen. Durch diese werden portale und perivaskuläre Leberfibroblasten, zirkulierende Fibrozyten, Knochenmarkzellen, epithelial-mesenchymal-transformierte (EMT) Hepatozyten, Cholangiozyten und physiologisch ruhende hepatische Stellatumzellen (HSC) zu aktiven Myofibroblasten transformiert (Friedman, 2010). Diese produzieren überschießende Mengen extrazellulärer Matrix (ECM), vor allem Kollagen Typ 1, und stören die Abbauvorgänge der ECM durch Hemmung proteolytischer Enzyme, zum Beispiel Matrix Metalloproteinasen. Daneben wird von den Myofibroblasten α -SMA (*alpha smooth muscle actin*) produziert. Es liegt ein Ungleichgewicht mit überschießender Fibrogenese und mangelnder Fibrolyse vor. Nach Jahren der Fibrose und weiter einwirkender Angriffe auf das Organ wird zunehmend Parenchym zerstört und der bindegewebige Umbau führt zur Degeneration der Läppchen- und Gefäßarchitektur mit Bildung hyperplastischer Regeneratknoten. Endstadium ist eine geschrumpfte, verhärtete und funktionsuntüchtige Leber.

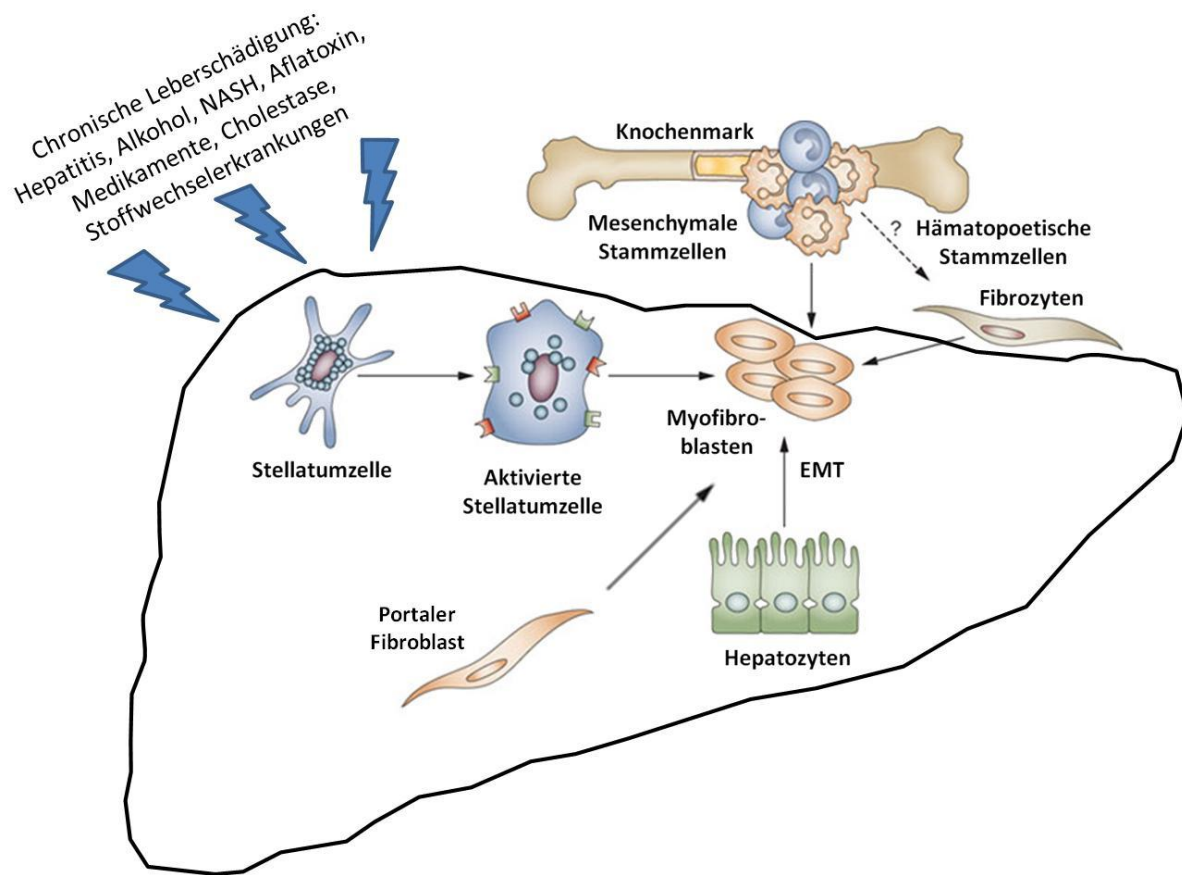


Abbildung 1: Darstellung der Herkunft Fibrose bildender Zellen. Stellatumzellen, portale Fibroblasten, zirkulierende Fibrozyten, Knochenmarkzellen, Epithelial-mesenchymale Transition von Hepatozyten. Durch anhaltende Leberschädigung (Hepatitis, Alkohol, NAFLD/NASH, Aflatoxin, Medikamente, Cholestase, Stoffwechselerkrankungen) kommt es zur Aktivierung und Fibrosebildung der Zellen. Abbildung modifiziert nach Friedman, 2008.

1.3 Interferon alpha

1.3.1 Einteilung der Interferone

Interferone wurden im Jahr 1957 von Isaak und Lindenmann als erste in die Virusreplikation eingreifende („interferierende“) Zytokine entdeckt. Interferone sind körpereigene Botenstoffe, die von Zellen bei Kontakt mit Viren, Bakterien, Tumorzellen etc. ausgeschüttet werden (Essers et al., 2009). Eingeteilt werden menschliche Interferone in Typ 1 Interferone (IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN ω), Typ 2 Interferon (IFN γ) und Interferon-ähnliche Zytokine (IL-28A, IL28B, IL-29) (Pestka, 2000). Beim Menschen wurden 12 verschiedene α -Interferone und ein β -Interferon entdeckt. Diese werden von Genen kodiert, welche auf Chromosom 9 lokalisiert sind.

Die Eigenschaften der Interferone erstrecken sich neben der Abwehr von RNA- und DNA-Virusinfektionen, beispielsweise HBV und HCV, auch auf die Regulation normaler Zellen und Tumorzellen (Borden et al., 2007; Ferrantini et al., 2007).

Interferone entfachen ihre Wirkung direkt, indem sie Zellen durch Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion hemmen, und indirekt durch Immunmodulation und Antiangiogenese (Hemmung von Endothelzellen) (Damdinsuren et al., 2007).

Die bekanntesten Wirkmechanismen nach Samuel (2001) werden im folgenden Abschnitt umrissen:

Interferone induzieren die Aktivierung von RNA-abhängigen Proteinkinasen, wodurch die virale Translation gehemmt wird. Beim zweiten Mechanismus wird durch Interferon das Enzym 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase aktiviert, welches RNasen aktiviert, die wiederum Virus RNA zerstören. Eine weitere Wirkung beruht auf der Stimulierung von Virus-Translations-hemmenden MX Proteinen. Die immunmodulatorische Wirkung findet über eine Aktivierung der Natürlichen Killerzellen und Makrophagen, sowie über die

vermehrte Ausbildung von MHC-I Oberflächenantigenen statt. Der antitumoröse Effekt, die Basis für die Tumor-Therapie, kommt zustande durch Proliferationshemmung der Tumorzellen und Aktivierung von Natürlichen Killerzellen.

1.3.2 Therapie mit Interferon alpha (IFN α)

IFN α ist das Zytokin mit dem längsten klinischen Einsatz. Es findet Anwendung in der Behandlung von Patienten mit Leukämie, Lymphom, Malignem Melanom und Kaposi Sarkom etc. (Pestka, 2007). Zur Behandlung von Hepatitiden kam IFN α als Monopräparat vor 25 Jahren auf den Markt. Da dieses nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden aufweist, verabreicht man es seit mehr als 10 Jahren gekoppelt mit Polyethylenglykol (PEG) als pegyliertes IFN α , welches aufgrund einer höheren Halbwertszeit nur noch einmal wöchentlich appliziert werden muss und für die Patienten besser verträglich ist. Heute ist rekombinantes pegyliertes Interferon (Interferon alpha 2a oder Interferon alpha 2b), teilweise kombiniert mit einem Nukleosid-/Nukleotidanalogen, die Standardbehandlung der chronischen Hepatitis B, akuter und chronischer Hepatitis C, mit höheren Ansprechraten als die Anfangspräparate (Heim, 2012). Gründe für die zum Teil hohen Raten an Interferon *Non-Respondern* sind bis heute nicht ausreichend geklärt (Heim, 2012). Hauptziel der Interferontherapie bei Hepatitiden ist die Prävention von Zirrhose und HCC durch Eliminierung des bestehenden Virus (Asselah et al., 2008). Zur Effektivität von IFN α bei der Behandlung des hepatozellulären Karzinoms muss auf verschiedene Studien zurückgegriffen werden. *In vitro* Versuche zeigen einen proliferationshemmenden Effekt von IFN α auf HCC-Zelllinien (Kusano et al., 2013; Murata et al., 2006; Yano et al., 2006). In klinischen Studien kommen die Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen. Lai et al. (1993) zeigen, dass bei Patienten mit nicht mehr resezierbar fortgeschrittenem hepatozellulärem Karzinom durch IFN α eine signifikant lebensverlängernde Wirkung und bei 31 % der Patienten eine Tumorregression

von mehr als 50 % eintritt (Lai et al., 1993). Neuere Studien weisen *Response* Raten von IFN α als Mono- bzw. Kombinationspräparat von 25 % (Patt et al., 2003), 64 % (Yuen et al., 2003) und 63 % (Sakon et al., 2002) auf. Der postoperative Einsatz von IFN α nach chirurgischer HCC-Resektion soll einer Tumorrezidivbildung entgegenwirken und die Überlebenszeit verlängern.

Bei allem Fortschritt in der Erforschung der Interferone, seit ihrer Entdeckung Mitte des letzten Jahrhunderts, weist die IFN α Therapie beim HCC jedoch noch sehr viele Fragen auf, unter anderem wie die *Non-Response* Raten zukünftig gesenkt werden können. Ein Ansatzpunkt hierfür ist sicherlich die Klärung, wie Interferone auf den Tumor einwirken und wie die Tumorumgebung diese Wirksamkeit verändert.

Durch das allgemein niedrige Therapieansprechen und die belastenden Nebenwirkungen der Interferon Therapie wäre es wünschenswert, einen Ansatz zu finden, um Patienten prätherapeutisch in *Responder* und *Non-Responder* unterteilen zu können.

Da Interferone über Interferon Rezeptoren ihre Wirkung entfachen, könnte ein Prognosekriterium für den Interferon Therapieerfolg das Expressionsverhalten des Interferon Rezeptors der Tumorzellen sein (Kondo et al., 2000).

1.3.3 Interferon alpha Rezeptor (IFNAR) und Signaltransduktion

Damit eine Zelle auf eine veränderte Umgebung reagieren kann, müssen Informationen in den Zellkern gelangen, um dort auf transkriptioneller Ebene Veränderungen der Genexpression zu bewirken. Dies geschieht bei IFN α folgendermaßen: IFN α bindet an den aus zwei Untereinheiten, IFNAR1 und IFNAR2, bestehenden transmembranösen IFN α Rezeptor (IFNAR) (Pestka et al., 2004). Zuerst interagiert IFN α mit IFNAR2. Durch die anschließende Dimerisation von IFNAR2 und IFNAR1 kommt es zur Rezeptoraktivierung (Kumaran et al., 2007). Dadurch werden die Rezeptor assoziierten Januskinasen, JAK1

(*Januskinase 1*) und TYK2 (*Tyrosinkinase 2*) aktiviert, welche im Folgenden STAT1 und STAT2 (*signal transducers and activators of transcription*) am Tyrosinrest phosphorylieren. Durch Heterodimerisation von STAT1 und STAT2 und Anhängen von IRF9 (*interferon regulatory factor 9*) bildet sich der Transskriptionsfaktorkomplex ISGF3 (*interferon stimulated gene factor 3*) aus (Heim, 2012). Dieser transloziert in den Nukleus und fördert nach Bindung an die DNA die Expression mehrerer hundert Interferon-stimulierter Gene (ISGs), welche für die antiviralen, proapoptischen und immunmodulatorischen Effekte verantwortlich sind (Khodarev et al., 2009). Die Aktivierung des Interferon-Signalweges erfährt seine maximale Aktivierung innerhalb der ersten beiden Stunden (Heim, 2012). Danach nimmt die Aktivierung ab und die Zelle verweilt in einem refraktären Zustand, wobei die Zelle dem Interferon alpha desensibel ist und es zu keiner Transkriptions-Induktion Interferon-stimulierter Gene kommt (Heim, 2012).

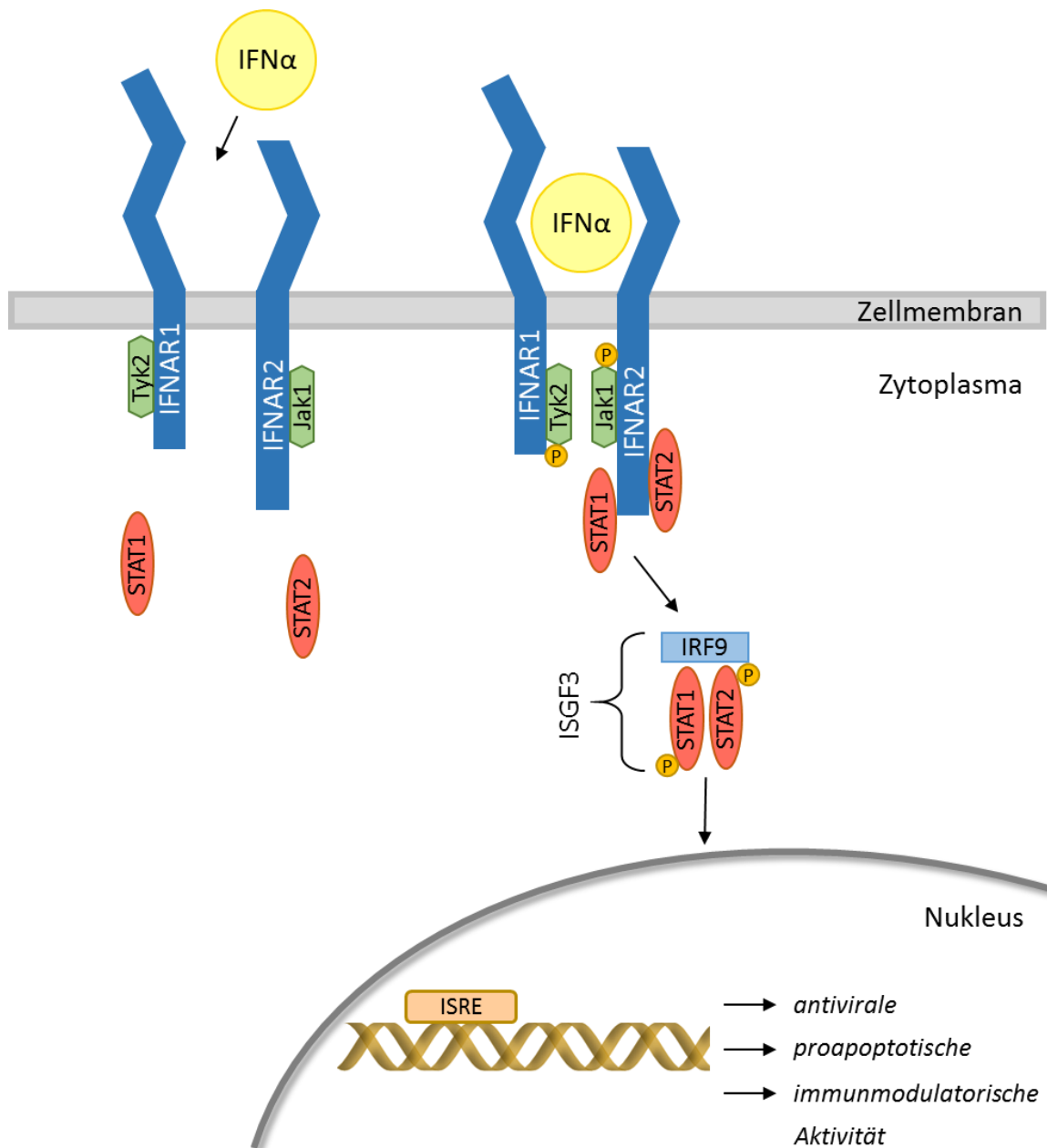


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der IFN α Signaltransduktion. IFN α bindet an den transmembranösen IFN α Rezeptor (IFNAR) bestehend aus zwei Untereinheiten, IFNAR1 und IFNAR2. Zuerst interagiert IFN α mit IFNAR2. Durch Dimerisation von IFNAR2 und IFNAR1 kommt es zur Rezeptoraktivierung und folgender Aktivierung von JAK1 (*Januskinase 1*) und TYK2 (*Tyrosinkinase 2*), welche darauf STAT1 und STAT2 (*signal transducers and activators of transcription*) am Tyrosinrest phosphorylieren. Durch Heterodimerisation von STAT1 und STAT2 und Anhängen von IRF9 (*interferon regulatory factor 9*) bildet sich der Transkriptionsfaktorkomplex ISGF3 (*interferon stimulated gene factor 3*) aus. Dieser transloziert in den Nucleus, bindet an die DNA und stimuliert die Expression Interferon-stimulierter Gene (ISGs), welche für die antiviralen, proapoptischen und immunmodulatorischen Effekte verantwortlich sind.

2 Ziel der Arbeit

Das hepatozelluläre Karzinom ist eine Tumorentität mit steigender Inzidenz und nach wie vor sehr schlechter Prognose für die betroffenen Patienten. Da bei einem Großteil der Patienten chirurgische Therapieoptionen nicht möglich sind, kommt der nicht-invasiven Therapie ein hoher Stellenwert zu. Die IFN α Therapie ist ein Ansatz hierfür. Interferone können jedoch nur auf Zellen einwirken, wenn der dazugehörige Rezeptor vorhanden ist. Die Höhe der Rezeptorexpression könnte somit als ein wichtiges Vorhersagekriterium zur Einteilung der Patienten in Interferon alpha Therapie *Responder* und *Non-Responder* dienen.

Da ca. 90 % der HCC aufgrund einer zirrhotischen Leber entstehen, deren Tumorstroma zum überwiegenden Anteil aus Fibroblastenzellen besteht, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Fibroblasten, als Hauptvertreter der Tumor-Mikroumgebung, auf den Tumor untersucht. Dabei soll gezeigt werden, inwieweit Fibroblasten Einfluss auf die Interferon Rezeptorexpression, den STAT1-Signalweg und damit auf die Wirksamkeit der Zytokine nehmen.

Im Einzelnen wird der Einfluss von Interferon alpha 2a auf zwei Leberzellkarzinom-Zelllinien, HUH7 und HepG2, untersucht. Hierbei soll die Auswirkung von Fibroblasten-Tumor-Zellkulturen auf die Effektivität der IFN α Behandlung analysiert werden. Dementsprechend wurden die HCC-Zelllinien nach der Kultivierung funktionell auf ihr Wachstumsverhalten unter Interferon Behandlung, Signalwegsaktivierung und IFNAR Expression untersucht.

Zusätzlich wird humanes Tumorgewebe mit normaler bzw. zirrhotischer Leber, hinsichtlich der IFNA/IFNAR1/IFNAR2 Protein Expression, verglichen.

An histologischen Leberschnitten von HCC-Patienten wird mittels immunhistochemischer Färbungen dargelegt, inwieweit Fibrosegrad und IFNAR1 Expression in Zusammenhang stehen.

3 Material

3.1 Laborgeräte

Brutschrank HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brutschrank Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, D
Geldokumentationssystem	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Kamera Power Shot A 640	Canon, Tokio, JPN
Kühlzentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
MACS Multistand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Midi MACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Mikroskop DME	Leica, Wetzlar, D
Mikroskopsoftware Axiovision	Zeiss, Jena, D
Mikrotom RM 2255	Leica, Wetzlar, D
Multifuge Haereus 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
PCR Gerät 1732-1210	VWR International GmbH, Darmstadt, D
pH-Meter InoLab	WTW, Weilheim, D
Röntgenfilm Entwicklergerät	Protec, Oberstenfeld, D
Shredder TissueLyser LT	Qiagen, Hilden, D
Spektrophotometer Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spektrophotometer Multiscan EX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge SN 0901 1162	Labnet, Ried im Innkreis, D
Vortexmixer	Neolab, Heidelberg, D
Western-Blot Generator Power Pack P25	Biometra, Göttingen, D
Western-Blot Kammer Protean	Bio Rad, München, D
Zellkulturbank HERA safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.2 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe, D
Deckglas (24 x 24, 24 x 40 mm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gewebekulturflasche (75 m ²)	Greiner, Frickenhausen, D
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
MACS Separation LS Column	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Mikrotom-Messer 819	Leica, Wetzlar, D
Nitrozellulose-Membran Whatman	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB

Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Petrischale (Ø 6 cm, Ø 10 cm)	Greiner, Frickenhausen, D
Röntgenfilme	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Separationssäulenhalter	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
6-Wellplatte	Greiner, Frickenhausen, D
96-Wellplatte (PCR)	Starlab, Ahrensburg, D
96-Wellplatte (Zellkultur)	Greiner, Frickenhausen, D

3.3 Chemikalien und Reagenzien

APS	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
BSA	Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
DMEM	PAA Laboratories, Pasching, A
EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Eosin	Roth, Karlsruhe, D
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
FBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glycerol	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Merck, Darmstadt, D
Hämalaun	Merck, Darmstadt, D
HCL	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Feeder Removal MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Mounting Medium	Biozol, Eching, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
PBS (1 x)	PAA Laboratories, Pasching, A
Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics, Penzberg, D
Phosphataseinhibitor	Roche Diagnostics, Penzberg, D
Roticlear	Roth, Karlsruhe, D
Temed	Roth, Karlsruhe, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Trypan blau 0,4 %	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween 20	Roth, Karlsruhe, D
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, D

3.4 Zelllinien

HUH7	Mensch	Hepatozelluläres Karzinom
HepG2	Mensch	Hepatozelluläres Karzinom
3T3	Maus	Embryo-Fibroblast

Tabelle 1: In Zellkultur-Versuchen verwendete Zelllinien

HUH7, HepG2: Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Roland Kappler,
Dr. v. Haunersches Kinderspital LMU, München.

3T3: Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Florian Lang,
Institut für Physiologie, Eberhard Karls Universität, Tübingen.

3.5 Zellkultur-Medien

DMEM-Standardmedium 4,5 g/l Glucose
 300 µg/ml L-Glutamin
Zusätze:
 10 % FCS
 1 % Penicillin (10.000 U/ml)-Streptomycin (10 mg/ml)

DMEM-Hungermedium 4,5 g/l Glucose
 300 µg/ml L-Glutamin
Zusätze:
 0,5 % FCS
 1 % Penicillin (10.000 U/ml)-Streptomycin (10 mg/ml)

3.6 Antikörper

3.6.1 primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Anwendungsgebiet und Verdünnung (Lösungsreagenz)	Hersteller mit Produktdaten
Anti-IFNAR1	Kaninchen	IHC 1:100 (5 % Ziegen Serum/1 % BSA/PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D (HPA018015)
Anti- α -SMA	Maus	IHC 1:1000 (5 % Ziegen Serum/1 % BSA/PBS)	Dako Cytomation, Glostrup, DK (M0851)
Anti-p-STAT1 (Tyr701)	Kaninchen	WB 1:1000 (5 % BSA/PBS-T)	Cell Signaling, Beverly, MA, USA (#9167)
Anti-STAT1	Kaninchen	WB 1:1000 (5 % Milch/PBS-T)	Cell Signaling, Beverly, MA, USA (#9172s)
Anti- β -Aktin	Maus	WB 1:5000 (5 % Milch/PBS-T)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA (sc-69879)
Anti-IFNAR1	Kaninchen	WB 1:2000 (5 % Milch/PBS-T)	Abcam, Cambridge, GB (ab 45172)

Tabelle 2: Primäre Antikörper mit Angabe von Spezies, Anwendungsgebiet, Verdünnung, Lösungsreagenz und Hersteller mit Produktdaten. ICH: Immunhistochemie, WB: Western Blot.

3.6.2 sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Anwendungsgebiet und Verdünnung (Lösungsreagenz)	Hersteller mit Produktdaten
Anti-Rabbit, HRP-labelled	Ziege	IHC ready to use	DAKO Cytomation, Glostrup, DK (K4003)
Anti-Mouse, HRP-labelled	Ziege	IHC ready to use	DAKO Cytomation, Glostrup, DK (K4001)
Anti-Rabbit		WB 1:5000 (5 % Milch/PBS-T)	GE Healthcare, Buckinghamshire GB (NA934V)
Anti-Mouse		WB 1:5000 (5 % Milch/PBS-T)	GE Healthcare, Buckinghamshire GB (NA931V)

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper mit Angabe von Spezies, Anwendungsgebiet, Verdünnung, Lösungsreagenz und Hersteller mit Produktdaten. ICH: Immunhistochemie, WB: Western Blot.

3.7 Expressionsprimer

Alle Primerpaare wurden von Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen.

Primer	Sequenz (5'-3')	Sequenz (3'-5')
<i>IFNA</i>	GATTTCCCCAGGAGGAGTTTG	GGATGGTTTCAGCCTTTTGG
<i>IFNARI</i>	ACACCATTTTCGCAAAGCTCAG	TTAAACCATCCAAAGCCCACA
<i>IFNAR2</i>	AAGCACACACGAGGCCTATGT	CGTTGTGTTCCCGCTGAAT

Tabelle 4: Primer für die Genexpressionsanalysen verschiedener Gene mit Angabe der Basensequenz. Alle Primer wurden zu einem 10 µM Stock verdünnt.

3.8 Rekombinantes Zytokin

Humanes Interferon alpha 2a

Pbl Interferon Source, Piscataway, USA
Konzentrationen: 500 U/ml, 1000 U/ml

3.9 Antibiotika

Mitomycin C	Stammlösung: 4 µg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Penicillin	Stammlösung: 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Streptomycin	Stammlösung: 10.000 U/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

3.10 Enzyme

Trypsin-EDTA (1 x)

PAA Laboratories, Pasching, A

3.11 Größenmarker

PageRuler Prestained Protein Ladder

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.12 Kits

Cell Proliferation Assay Kit (BrdU)	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche-Diagnostics, Mannheim, D
DAB Kit	DakoCytomation, Glostrup, DK
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe, D
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

RNeasy Plus Mini Kit
Verso cDNA Kit

Qiagen, Hilden, D
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.13 Statistik

Für statistische Auswertungen wurde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) verwendet.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden in einem Gefrierschrank bei -80 °C gelagert, bei Raumtemperatur aufgetaut, in 5 ml DMEM Standardmedium, PAA Laboratories (Pasching, A) überführt und 5 min bei $350 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Zellpellet in 12 ml Standardmedium resuspendiert und in eine Gewebekulturflasche gegeben.

4.1.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellkulturarbeiten fanden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank *HERA safe*, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) statt. Alle Zellen wurden in 75 cm^2 Kulturflaschen im Brutschrank *HERA cell 150*, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bei 37 °C und 5% CO_2 aufbewahrt. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Medium gewechselt.

4.1.3 Lösen, Passagieren und Aussäen der Zellen

Bei einem Konfluenzgrad von ca. 80% wurden die Zellen passagiert. Um die adhärennten Zellen in Lösung zu bringen, wurde das Medium entfernt, mit 6 ml PBS, PAA Laboratories (Pasching, A) gewaschen, 2 ml Trypsin hinzugegeben und ca. 6 min im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde mit 8 ml Standardmedium gestoppt und die Zellen gut resuspendiert. Im Folgenden wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet oder für Versuche gezählt und ausgesät. Zellen wurden nur von der 3. bis zur maximal 25. Passage für Versuche verwendet.

4.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Zählung der Zellen erfolgte mittels Neubauer Zählkammer, Marienfeld (Lauda-Königshofen, D), wobei 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypan blau 0,4 %, Invitrogen (Karlsruhe, D) vermischt wurden und davon 10 µl zwischen Basis und Deckglas durch Kapillarkwirkung verteilt wurden. Es wurden nur lebende Zellen gezählt. Tote Zellen konnten unterschieden werden, da sie sich dunkelblau färbten. Ausgezählt wurden 4 Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten.

Berechnung der Gesamtzellzahl

Summe der Zellen aller 4 Großquadrate : 4 = Mittelwert der Zellzahl/Großquadrat

Mittelwert der Zellzahl/Großquadrat x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10^4 = Zellen/ml

Zellen/ml x Volumen der Zellsuspension = Gesamtzellzahl

4.1.5 Kokultivierung

3T3 Fibroblasten wurden in Petrischalen (Ø 10 cm) ausgesät. Am folgenden Tag, bei einem Konfluenzgrad von 60 %, wurden diese mit 4 µg/ml Mitomycin C, Sigma-Aldrich (Steinheim, D) 1 h behandelt. Diese Konzentration wird in der Literatur als niedrigste zu einer Proliferationsinhibition führende Konzentration beschrieben, ohne signifikanten Anstieg toter Zellen (Sandhya et al., 2011). Daraufhin wurde mit 3 x 10 ml PBS gewaschen und 50.000 Zellen, HUH7 bzw. HepG2, zu den Fibroblasten gesät. Nach 14 Tagen in Kokultur wurden die Zellen magnetisch sortiert.

4.1.6 Magnetische Zellsortierung

Für die Versuchsabläufe waren aus der Kokultur nur die Karzinom-Zelllinien von Bedeutung. Die Fibroblasten mussten der Kokultur entzogen werden, um die Karzinomzellen isoliert zu erhalten. Hierfür wurde das magnetische Zelltrennverfahren *Magnetic Activated Cell Sorting*

(MACS) des Herstellers Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, D) nach Standardprotokoll verwendet.

MACS Puffer 2 mM EDTA
 0,5 % BSA
 in PBS

Die adhärennten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, dann mit 1 % Trypsin-EDTA, PAA Laboratories (Pasching, A) lysiert, im Standardmedium resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer, Marienfeld (Lauda-Königshofen, D) bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4). Die maximale Gesamtzellzahl im Zellgemisch durfte bei der verwendeten *MACS Separation LS Column* die Kapazität von 4×10^7 nicht überschreiten. Nach 5 min Zentrifugieren bei $300 \times g$ wurde der Überstand abgenommen. Pro 10^7 Zellen wurden 80 μ l *MACS Puffer* und 20 μ l *Feeder Removal Micro Bead mouse* hinzugefügt, suspendiert und 15 min im Kühlschrank inkubiert.

Da die magnetischen *Micro Beads* Antikörper gegen bestimmte Zelloberflächenantigene haben, findet während der Inkubationszeit eine selektive Bindung an die Fibroblastenzellen statt.

Um nun die Fibroblasten zu entziehen, wurde das Zellgemisch mit 500 μ l *MACS Puffer* verdünnt. Eine mit ferromagnetischen Kügelchen gefüllte Kunststoffsäule *MACS Separation LS Column* wurde in einen magnetischen Separationssäulenhalter *Midi MACS Separator* gesteckt und an einer Halterung *MACS Multistand* angebracht. Durch die Säule ließ man zunächst zur Befeuchtung 3 ml *MACS Puffer* laufen und verwarf den Durchfluss. Dann gab man die Zellsuspension und 2 x 1 L *MACS Puffer* auf die Säule. Beim Durchfließen verblieben die mit Magnetpartikeln konjugierten Fibroblasten in der im magnetischen Feld

stehenden Säule. Die nicht-konjugierten HUH7 oder HepG2 durchflossen die Säule und wurden für die weiteren Versuche aufgefangen.

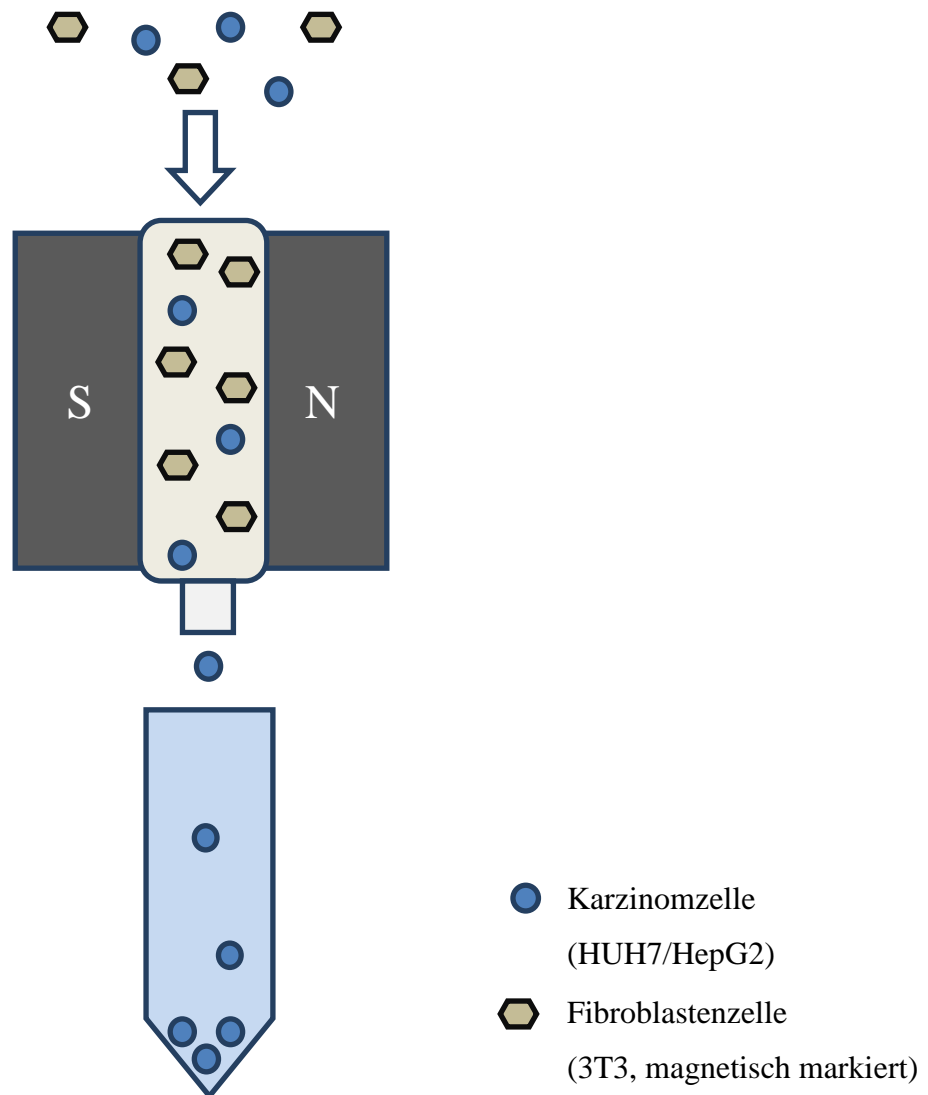


Abbildung 3: Schematische Darstellung des magnetischen Zelltrennverfahrens *MACS*. Auf eine im Magnetfeld stehende Säule wird die Kokultur-Zellsuspension aus Karzinomzellen und Fibroblastenzellen gegeben. Die Fibroblasten sind über Antigen-Antikörper-Verbindungen mit kleinen Magnetpartikeln versehen. Dies ermöglicht, dass die Fibroblasten der Zellsuspension beim Durchfließen der Säule an den ferromagnetischen Kügelchen haften und nur die Karzinomzellen (HUH7 bzw. HepG2) unterhalb der Säule aufgefangen werden können.

4.1.7 Interferon Behandlung

Die Interferon Behandlung der Zellen wurde mit humanem, rekombinantem Interferon alpha 2a, Pbl Interferon Source (Picataway, NJ, USA) in Konzentrationen von 500 U/ml und 1000 U/ml vorgenommen. Zunächst wurden die Monokulturen trypsinisiert und mit Standardmedium resuspendiert. Die unbehandelten Zellen wurden bei den Monokulturversuchen gleich nach dem Trypsinieren entnommen. Bei den Kokulturen wurde ein Teil des nach Abschnitt 4.1.6 sortierten Säulendurchflusses als unbehandelte Zellen für die Versuche verwendet. Der größere Anteil der Zellen (Mono- und Kokultur) wurde ausgesät, in Hungermedium 48 h gehalten, dann mit IFN α (500 U/ml, 1000 U/ml) in Standardmedium behandelt. Die unbehandelten Zellen wurden nur mit Standardmedium versehen. Nach 30 min sowie 24 h wurde für die Protein-Isolierung gestoppt, für die RNA-Isolierung nur nach 24 h. Die Interferon Behandlung der Zelllinien beim MTT-Vitalitätstest wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.1.8 MTT-Vitalitätstest

Mit dem MTT-Vitalitätstest können Vitalitäts- und Proliferationsraten von Zellen bestimmt werden. Verwendet wurde das *Cell Proliferation Kit I* (MTT), Roche-Diagnostics (Mannheim, D) nach Herstellerangaben. Hierbei kommt es zu einer Umwandlung von Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) (MTT) in ein Formazanderivat durch Dehydrogenase in den Mitochondrien lebender Zellen (Mosmann, 1983). Diese Reaktion zeigt, je nach Menge lebender Zellen, einen mehr oder weniger deutlichen Farbumschlag des MTT Reagenz von gelb nach violett. Im Spektrophotometer *Multiscan EX*, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) wird die optische Dichte gemessen, welche direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist. Die Zellen wurden trypsinisiert, im Standardmedium resuspendiert, gezählt und so verdünnt, dass 5000 Zellen in

100 µl Medium enthalten waren und pro Well einer 96-Wellplatte ausgesät werden konnten. Nun hefteten sich die Zellen an der Petrischale an, am nächsten Tag begann die Messung des Tages 0 und die übrigen Zellen wurden mit IFN α behandelt. Fortgeführt wurden die Messungen bis Tag 5. Den unbehandelten Zellen wurde täglich frisches Standardmedium gegeben. Die behandelten Zellen bekamen täglich Standardmedium, versetzt mit IFN α (500 U/ml, 1000 U/ml). Für die tägliche Messung wurde 10 µl/Well *labeling reagent* einpipettiert und nach 4 h mit 100 µl/Well *solubilization solution* gestoppt. Am folgenden Tag fand die Messung bei 570 nm Wellenlänge und bei 620 nm als Referenzwellenlänge statt.

4.1.9 BrdU-Proliferationstest

Ziel des BrdU-Assays ist die Messung proliferierender Zellen. Vor der Zellteilung verdoppelt die Zelle ihre DNA. Anstelle des Nukleotids Thymidin wird 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Mit einem Anti-BrdU Antikörper kann das eingebaute BrdU detektiert werden.

Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend den Herstellervorgaben des verwendeten Kits *BrdU Cell Proliferation Assay*, Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Für den BrdU-Test wurden 2000 3T3 Zellen/Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie für 1 h mit 4 µg/ml Mitomycin C, Sigma-Aldrich (Steinheim, D) behandelt, mit 3 x 10 ml PBS gewaschen und 2000 Zellen der Linien HUH7 oder HepG2 zu den 3T3 dazugegeben. Parallel wurden HUH7 und HepG2 als Monokultur ausgesät, ebenso 2000 Zellen/Well. Für den Versuch wurden die Zellen mit Interferon alpha 2a, Pbl Interferon Source (Picataway, NJ, USA) in Konzentrationen von 500 U/ml und 1000 U/ml in Standardmedium über einen Zeitraum von 72 h behandelt. *BrdU* (1000 x) wurde zunächst mit Medium auf eine einfache Lösung verdünnt. Zu dem gewählten Testzeitpunkt, 72 h unter Interferon Behandlung, wurde den behandelten und unbehandelten Zellen in den 96-Wellplatten das Medium abgenommen und

BrdU (1 x) einpipettiert. Nach 4 h im Inkubator wurden 100 µl der *Fixing/Denaturing Solution* zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur belassen. Nachdem die Lösung entfernt wurde, pipettierte man 100 µl der auf eine 1 x Konzentration vorbereiteten *Detection Antibody Solution* ein und wartete 1 h bei Raumtemperatur. Nach 3 Waschschritten mit dem *Wash Buffer* wurden 100 µl verdünnte 1 x konzentrierte *HRP-linked secondary Antibody Solution* für 30 min bei Raumtemperatur den Zellen zugegeben und wieder dreimal mit *Wash Buffer* gewaschen. 100 µl *TMB Substrat* wurden hinzugefügt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl *Stop Solution* beendet. Innerhalb von 30 min wurden die Extinktionswerte bei 450 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt.

4.2 Molekularbiologische RNA-Methoden

4.2.1 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Die Isolierung der RNA wurde nach Herstellerangaben mit dem *RNeasy Plus Mini Kit* der Firma Qiagen (Hilden, D) durchgeführt. Die RNA-Pipettiervorgänge wurden mit sterilen Pipettenspitzen mit Filter, *tip one* der Firma Starlab (Ahrensburg, D) vorgenommen. Nach Waschen der adhärenen Zellen mit PBS, wurden 350 µl *RLT Plus Buffer* mit 10 % zugesetztem β-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich (Steinheim, D) von der Schale gekratzt und das Zell-Puffer-Gemisch auf eine *gDNA Eliminator Spin Column* gegeben. Nach 30 sec Zentrifugieren bei 8000 x g wurde die Säule entsorgt. Der Durchfluss wurde mit 350 µl Ethanol (50 %) vermischt, dann auf eine *RNeasy Mini Spin Column* in einem Zentrifugenröhrchen stehend gegeben und 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Die Gesamt-RNA war nun an eine Silica-Membran gebunden, so dass Kontaminanten durch Waschschriffe entfernt werden konnten. Der Durchfluss wurde nach dem Zentrifugieren jeweils verworfen. Im Einzelnen wurden 700 µl *RWI Buffer* und 2 x 500 µl *RPE Buffer* auf

die Säule gegeben. Am Ende wurde die Membran durch 2 min Zentrifugieren getrocknet und die RNA mit 30 µl RNase freiem Wasser nach 1 min Einwirkzeit von der Säule eluiert. Der Durchfluss wurde nochmals auf die Membran gegeben um eine höhere RNA-Ausbeute zu erreichen. Gemessen wurden die RNA-Konzentrationen mit dem Spektrophotometer. Die Aufbewahrung fand bei -80 °C im Gefrierschrank statt.

4.2.2 RNA-Isolierung aus Patientengewebe

Für die RNA-Isolierung aus der Patientenleber wurden ca. 0,03 cm³ große Gewebestücke verwendet. Diesen wurden 600 µl *RLT Plus Buffer* mit 10 % β-Mercaptoethanol und eine Metallkugel, zum besseren Zerkleinern der Gewebe, hinzugefügt. Es wurden 2 ml Gefäße gewählt, die in der vorgekühlten Halterung positioniert wurden. Anschließend wurde das Gewebe für 3 min mit 50 Oszillationen/sec im *QiaShredder Homogenizer* der Firma Qiagen (Hilden, D) zerkleinert, dann 3 min mit der Kugel zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nochmals 3 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde dann mit dem *RNeasy Mini Kit*, Qiagen (Hilden, D), nach Angaben des Herstellers, weiter verarbeitet (siehe Kapitel 4.2.1).

4.2.3 RNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration und Reinheit der Proben wurde mit dem Extinktionsmessgerät *Nanodrop 2000*, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Hierbei wurde 1 µl der isolierten RNA auf den Messpunkt des Gerätes gegeben und gemessen. Der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der RNA-Proben, wobei dieser einen Wert zwischen 1,7 und 2,0 haben sollte.

4.2.4 cDNA-Synthese

Um cDNA zu gewinnen muss die vorhandene RNA mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierzu wurde das *Verso cDNA Kit* von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

cDNA-Synthese Mix

Reagenz	Volumen
5 x cDNA Synthesis Buffer	4 µl
dNTP Mix	2 µl
RNA-Primer	1 µl
RT Enhancer	1 µl
Verso Enzyme Mix	1 µl
RNA (2 µg)	11 µl
Total	20 µl

Tabelle 5: Zusammenstellung der cDNA-Synthese Proben.

Programm

cDNA Synthese	42 °C	60 min
Inaktivierung	95 °C	2 min
bis Entnahme	4 °C	

Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

4.2.5 Quantitative Real-Time-PCR

Die Analyse der Genexpressionslevel wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der PCR, ermöglicht aber zusätzlich eine Quantifizierung der Nukleinsäuren. Dies geschieht durch Messung der Fluoreszenzintensität des in DNA-Doppelstränge interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green*, wobei sich die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge verhält. Die Proben wurden als Dubletten in 96-Wellplatten, Starlab (Ahrensburg, D) pipettiert. Für jede Probe wurde das Haushaltsgen *β-2-Mikroglobulin (B2M)* mitbestimmt. Das Haushaltsgen sollte in den zu untersuchenden Proben unabhängig von der Behandlung reguliert sein, so dass sich dessen Genexpression in den Kontrollen und den behandelten Proben nicht unterscheidet, um somit als endogene Kontrolle zu dienen. Die zu untersuchenden Gene wurden zuerst auf die endogene Kontrolle normiert:

$$\Delta Ct = Ct\text{-Gen} - Ct\text{-B2M}$$

Cycle threshold (CT) steht für den Schwellenwert bei der Echtzeit PCR. Anschließend erfolgte die Berechnung des *Fold change (FC)*, wobei die relative Genexpression der behandelten Probe auf die Kontrolle normiert wird. Werte unter 1 bedeuten eine verminderte Expression, Werte über 1 eine verstärkte Expression (Pfaffl, 2001):

$$\Delta\Delta Ct = 2^{- (\Delta Ct\text{-Gen Probe} - \Delta Ct\text{-Gen Kontrolle})}$$

qRT-PCR Mix

Reagenz	Volumen
Primer-fw (10 μM)	1 μl
Primer-rev (10 μM)	1 μl
Mastermix Polymerase SYBR-green	10 μl
dH ₂ O	6 μl
cDNA (20 ng/μl)	2 μl
Total	20 μl

Tabelle 6: Zusammenstellung der qRT-PCR Proben.

qRT-PCR Programm

	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	5 min	94 °C
2. Denaturierung	15 sec	94 °C
3. Annealing	15 sec	55 °C
4. Extension	15 sec	72 °C
5. Finale Verlängerung	5 min	72 °C
6. Kühlung	bis Entnahme	4 °C

} 40 Zyklen

Tabelle 7: qRT-PCR Programm. Aufgeführt sind die einzelnen Schritte mit Zeit- und Temperaturangabe.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Herstellung des Proteinlysates

Bei der Proteingewinnung wurden die Zellen auf Eis gestellt, das Medium entfernt, mit kaltem PBS gewaschen, 250 µl Protein-Lysepuffer zugefügt und mit dem Zellschaber vom Boden abgekratzt.

Protein-Lysepuffer 50 mM Tris-HCL
 2 % SDS
 pH 8,0
 auf 10 ml Puffer:
 1 Tablette Proteaseinhibitor
 1 Tablette Phosphataseinhibitor

Mit der Pipette wurde das Zell-Puffer-Gemisch in ein 2 ml Eppendorf Gefäß gegeben und mittels Sonicator 10 sec lysiert. Bei 4 °C und 10.000 x g wurde 10 min zentrifugiert und danach der Überstand in ein neues 2 ml Gefäß transferiert.

4.3.2 Proteinkonzentrationsmessung

Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte mit dem *Pierce BCA-Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) in einer 96-Wellplatte. Die BCA-Arbeitslösung wurde im Verhältnis 50:1 aus Reagenz A und B zusammengesetzt. 200 µl BCA-Arbeitslösung und 10 µl der Proteinprobe wurden zusammen 30 min bei 37 °C inkubiert. Es bildete sich ein Farbkomplex, dessen Intensität proportional zur Proteinkonzentration war. Photometrisch wurden die Extinktionswerte im Spektrophotometer *Multiscan EX*, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bei 560 nm mit dem Verdünnungsfaktor 20 gemessen. Mit den im Kit enthaltenen Albumin-Ampullen wurde eine Protein-Standardreihe mit aufsteigenden Konzentrationen (0, 125, 250, 500, 1000, 2000 µg/ml) hergestellt. Die gemessenen Extinktionswerte ergaben eine Standardkurve, welche für die Messung der Probenkonzentration verwendet wurde.

4.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zuerst mussten die SDS Gele hergestellt werden. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 8 aufgelistet. Sobald APS und TEMED zugegeben wurden, musste das Gel zügig zwischen die Glasscheiben gegossen werden. Nachdem das Trenngel bis ca. 3 cm unter den Glasrand aufgetragen war, wurde eine dünne Schicht Isopropanol aufpipettiert. Diese wurde nach Abbinden des Trenngels entfernt und es lag eine glatte, horizontale Trennline zum nachfolgenden Sammelgel vor. Zuletzt wurden die Probenkämme in das noch flüssige Sammelgel gesteckt, unter Vermeidung von Blasenbildung.

Pipettierschema zur Herstellung von 2 SDS Gelen

Reagenz	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
dH ₂ O	4,1 ml	3 ml
Acrylamid (30 %)	3,3 ml	750 µl
Tris HCL 1,5 M, pH 8,8	2,6 ml	–
Tris HCL 0,5 M, pH 6,8	–	1,3 ml
SDS (10 %)	100 µl	50 µl
APS (10 %)	50 µl	25 µl
TEMED	15 µl	10 µl
Total	ca. 10 ml	ca. 5 ml

Tabelle 8: Pipettierschema zur Herstellung von 2 SDS Gelen.

Nach vollständiger Polymerisation wurden die beiden Gele in die Elektrophorese Kammer *PROTEAN[®] Tetra Cell*, Bio Rad (München, D) gesteckt und bis zum Glasrand mit Lauf-Puffer befüllt.

Lauf-Puffer
 14,4 g Glycin
 3 g Tris Base
 10 ml SDS (10 %)
 ad 1 L dH₂O

In die Taschen des Gels wurden jeweils 25 µl des zu untersuchenden Proteinlysates gefüllt. Dieses bestand aus 20 µl Proteinlösung (enthalten 20 µg Protein) und 5 µl Laemmli-Puffer (5 x). Vor dem Befüllen wurde diese Mischung 5 min bei 95 °C erhitzt.

Laemmli-Puffer (5 x)
 250 mM Tris, pH 6,8
 50 % Glycerol
 10 % SDS
 5 % β-Mercaptoethanol
 0,01 % Bromphenolblau

Bei jedem Blot kam in die erste Vertiefung 7 µl Proteinmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA), der farblich die verschiedenen Proteingrößen visualisierte. Nun wurde für den ca. 1,5 h andauernden Laufvorgang 25-35 mA Stromstärke an den Western-Blot Generator *Power Pack P25 T*, Biometra (Göttingen, D) angelegt. Zuerst durchschreiten die Proteine das Sammelgel, dann erst trennen sie sich im Trenngel anhand ihrer Größe auf, wobei die kleineren Proteine im Gel weiter voranschreiten als die größeren Proteine.

Die blau gefärbte Laufbande zeigt die Lauffront der Proteine an. Mittels Protein-Marker konnte man die Proteingrößen erkennen, so dass die Elektrophorese zum richtigen Zeitpunkt beendet werden konnte und die Gele aus den Glasscheiben entnommen wurden.

4.3.4 Western-Blot Analyse

Für den Transfervorgang wurde auf das Gel eine Nitrozellulose Membran *Whatman*, GE Healthcare (Buckinghamshire, GB) blasenfrei gelegt. Darüber und darunter wurden je drei Filterpapiere und ein Schwamm gelegt. Alle Schichten wurden gut in Transfer-Puffer getränkt und in einer Kassette befestigt. Durch Anlegen des elektrischen Feldes mit 100 V Spannung für 1 h im Western-Blot Generator *Power Pack P25 T*, Biometra (Göttingen, D) wurden die Proteine senkrecht zum Gel auf die Membran übertragen.

Transfer-Puffer	14,4 g Glycin
	3 g Tris Base
	200 ml Methanol
	ad 1 L dH ₂ O

Nach dem Transfer wurden die Membranen zum Blocken in 5 % Milch/PBS-T (PBS mit 1 % Tween) gelegt. Nur der Antikörper p-STAT1 musste, statt mit Milch, mit 5 % BSA/PBS-T

blockiert werden, da sonst starke Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindungen auftreten. Die Inkubationszeit betrug 1 h.

Die Membranen wurden mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie 3 x 15 min mit PBS-T gewaschen und dann der zweite Antikörper für 1 h hinzugefügt. Es folgten wiederum drei Waschschrte mit 15 min PBS-T. An den ersten Antikörper hat ein zweiter Antikörper gebunden, an welchem das Enzym Peroxidase gekoppelt ist. Dieses katalysierte die Reaktion der auf die Membran pipettierten und zu gleichen Teilen gemischten *Pierce ECL Western Blotting Substrate* Lösungen 1 und 2, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Das entstandene Produkt konnte durch seine Chemielumineszenz auf dem Röntgenfilm, GE Healthcare (Buckinghamshire, GB) mittels Röntgenfilmentwicklergerät, Protec (Oberstenfeld, D) detektiert werden.

4.4 Histologie der Patientengewebe

4.4.1 Schneiden der Paraffinblöcke

Die in Paraffin eingebetteten Gewebestücke wurden mit dem Mikrotom RM2255, Leica (Wetzlar, D) geschnitten. Als Schnittdicke wurden 3 µm gewählt. Mit einem Pinsel wurden die Schnitte für einige Sekunden in ein 38 °C warmes Wasserbad zur Entfaltung und Glättung gelegt, dann auf einen gläsernen Objektträger, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) aufgezogen und über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschrank *Haereus Funktion Line*, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) getrocknet.

4.4.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung wurde zur morphologischen Beurteilung und Diagnostik der Lebergewebe angefertigt. Zellkerne werden durch Hämatoxylin blau und Bindegewebe durch Eosin rot eingefärbt.

Zunächst wurden die Schnitte in Xylol 3 x 10 min entparaffiniert, in der absteigenden Alkoholreihe (3 x 100 %, 96 %, 70 %, 50 %) jeweils 2 min rehydriert und in destilliertem Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte 30 sec in Hämalaun gefärbt und in Leitungswasser 5 min gebläut. Als Nächstes wurden sie 3 sec in Eosinlösung gefärbt und anschließend kurz mit Leitungswasser gespült.

Eosin-Lösung	5 g Eosin
	1000 ml Ethanol
	10 Tropfen Eisessig

Die Dehydrierung fand in der aufsteigenden Alkoholreihe jeweils 2 min statt (50 %, 70 %, 96 %, 3 x 100 %). Nach 3 x 10 min in Roticlear wurde auf das Gewebe ein Tropfen *Mounting Medium*, Biozol (Eching, D) gegeben und mit einem Deckgläschen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) eingedeckt.

4.4.3 Immunhistochemische Darstellung von IFNAR1 und α -SMA

Um IFNAR1 immunhistochemisch darzustellen wurde der Antikörper nach Angaben des Herstellers Sigma-Aldrich (Steinheim, D) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Um Fibrose zu markieren wurde α -SMA des Herstellers DAKO Cytomation (Glostrup, DK) in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Beide Antikörper wurden in 5 % Ziegenserum in 1 % BSA/PBS verdünnt.

Die immunhistochemische Färbung lief bei beiden Antikörpern nach dem gleichen Protokoll ab, nur der primäre (IFNAR1, α -SMA) und sekundäre Antikörper (Anti-Rabbit bei IFNAR1, Anti-Mouse bei α -SMA) waren verschieden.

Zuerst mussten die Schnitte 3 x 10 min in Roticlear vom Paraffin befreit werden. Rehydriert wurde jeweils 2 min in der absteigenden Alkoholreihe (3 x 100 %, 96 %, 70 %, 50 %) und

abschließend wurden die Schnitte in destilliertes Wasser getaucht. In kochsicheren Plastikgefäßen wurden die Schnitte dann in Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0) in der Mikrowelle bei 600 W für 10 min gekocht, um eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung zu bewirken. Die Schnitte mussten 30 min bei Raumtemperatur abkühlen. Daraufhin wurden sie 3 x 10 min in PBS gereinigt und 10 min mit 3 % Wasserstoffperoxid in PBS inkubiert, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu inaktivieren. Dann folgten nochmals drei Waschschrirte mit 10 min in PBS. Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu reduzieren wurden die Schnitte mit Blockierungspuffer inkubiert. Dieser setzte sich zusammen aus 5 % Ziegenserum (Spezies in der der Zweitantikörper hergestellt wurde) in 1 % BSA/PBS und wirkte 1 h bei Raumtemperatur ein. Nach Abschütten der Blockierungslösung wurde der Antikörper aufgetragen und darauf ein Paraffinfilin gelegt, um ein Austrocknen sicher zu vermeiden. Inkubiert wurde in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 x 5 min gewaschen und der sekundäre Antikörper (*HRP-labelled*) aufpipettiert: *Anti-rabbit* für IFNAR1, *Anti-mouse* für α -SMA. Dieser entspricht der Spezies in der der Erstantikörper hergestellt wurde. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Schnitte in PBS 3 x 10 min gereinigt und dann mit 150 μ l DAB Lösung (2 % DAB Chromogen in DAB Substratpuffer), DakoCytomation (Glostrup, DK) gefärbt. Wichtig ist hierbei, dass die Schnitte eines Antikörpers die exakt gleichen Einwirkzeiten aufweisen müssen, um vergleichbar zu sein. Die DAB Reaktion wird gestoppt durch Eintauchen in Wasser. Gegengefärbt wurde in Hämatoxilin für 3 sec und gebläut in fließendem Leitungswasser für 5 min. Die Dehydrierung erfolgte jeweils 2 min in der aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 3 x 100 %). Nach 3 x 10 min in Roticlear wurde ein Tropfen *Mounting Medium*, Biozol (Eching) auf den Objektträger, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) gegeben und mit einem Deckgläschen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) eingedeckt.

5 Ergebnisse

Um den Einfluss von mesenchymalen Fibroblasten auf hepatische Tumorzellen zu testen, wurden Kokulturen mit den beiden Zellspezies analysiert. Exemplarisch sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der HCC-Zelllinien HUH7 und HepG2 jeweils in Kokultur mit 3T3-Fibroblasten dargestellt (Abb. 4). Die Tumor-Zelllinien HUH7 und HepG2 zeigen in Kokultur keine homogene Vermischung mit den Fibroblasten, sondern eine Sortierung in Clustern mit zirkulär angeordneten Fibroblasten.

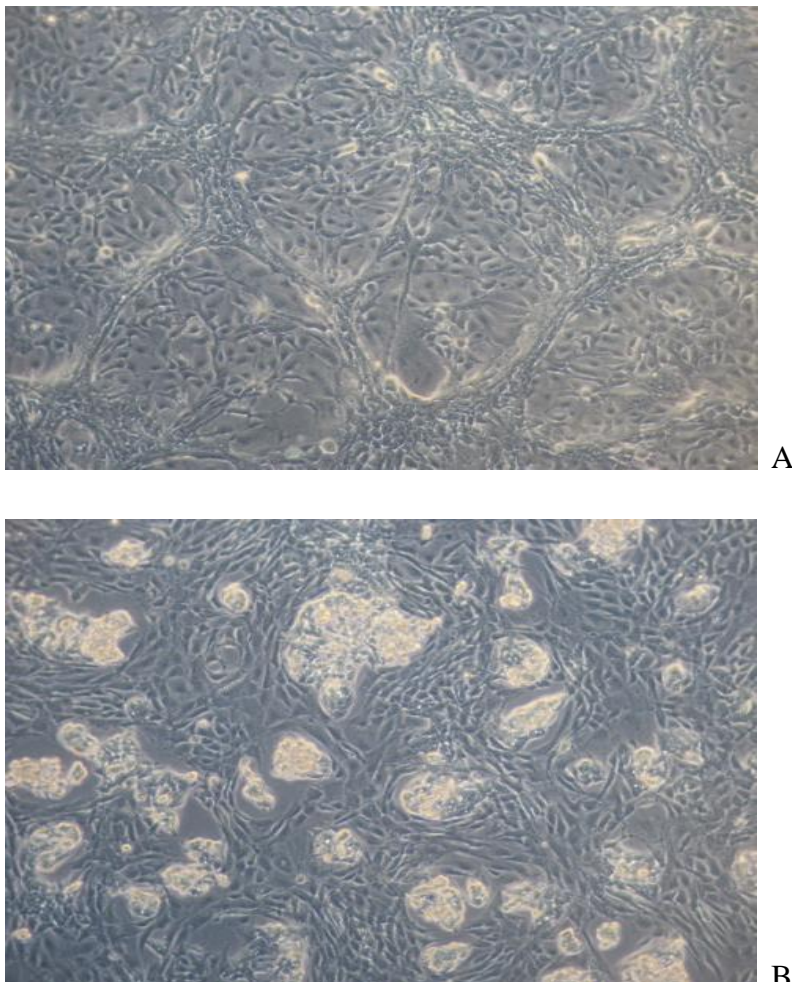


Abbildung 4: Exemplarische lichtmikroskopische Darstellung der untersuchten Kokulturen in vitro. HepG2 (A) und HUH7 (B) nach 14 Tagen in Kokultur mit den 3T3-Fibroblasten.

5.1 MTT-Vitalitätstest von IFN α behandelten Zelllinien

Um einen Einblick in die Wirkung von IFN α auf Tumorzellen zu bekommen, wurden die Tumor-Zelllinien HUH7 und HepG2 kultiviert. Für die Analyse der Tumorzellvitalität unter verschiedenen IFN α Konzentrationen wurde ein MTT-Assay (siehe Kapitel 4.1.8) durchgeführt. Dabei war das Verhalten der Zellen nach der Kokultivierung mit Fibroblasten von besonderem Interesse. Wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben, wurden die Tumorzellen über einen Zeitraum von zwei Wochen mit 3T3 Fibroblasten kultiviert, anschließend mittels magnetischem Zelltrennverfahren (MACS) (siehe Kapitel 4.1.6) getrennt und das Verhalten der Tumorzellen bei IFN α Behandlung gemessen. Somit wurden sowohl mono- als auch kokultivierte HUH7 und HepG2 Zellen analysiert und verglichen. Beide Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 120 h mit IFN α (500 U/ml und 1000 U/ml) behandelt. Mit dem MTT-Vitalitätstest wurde zu 6 Zeitpunkten die Menge vitaler Zellen gemessen.

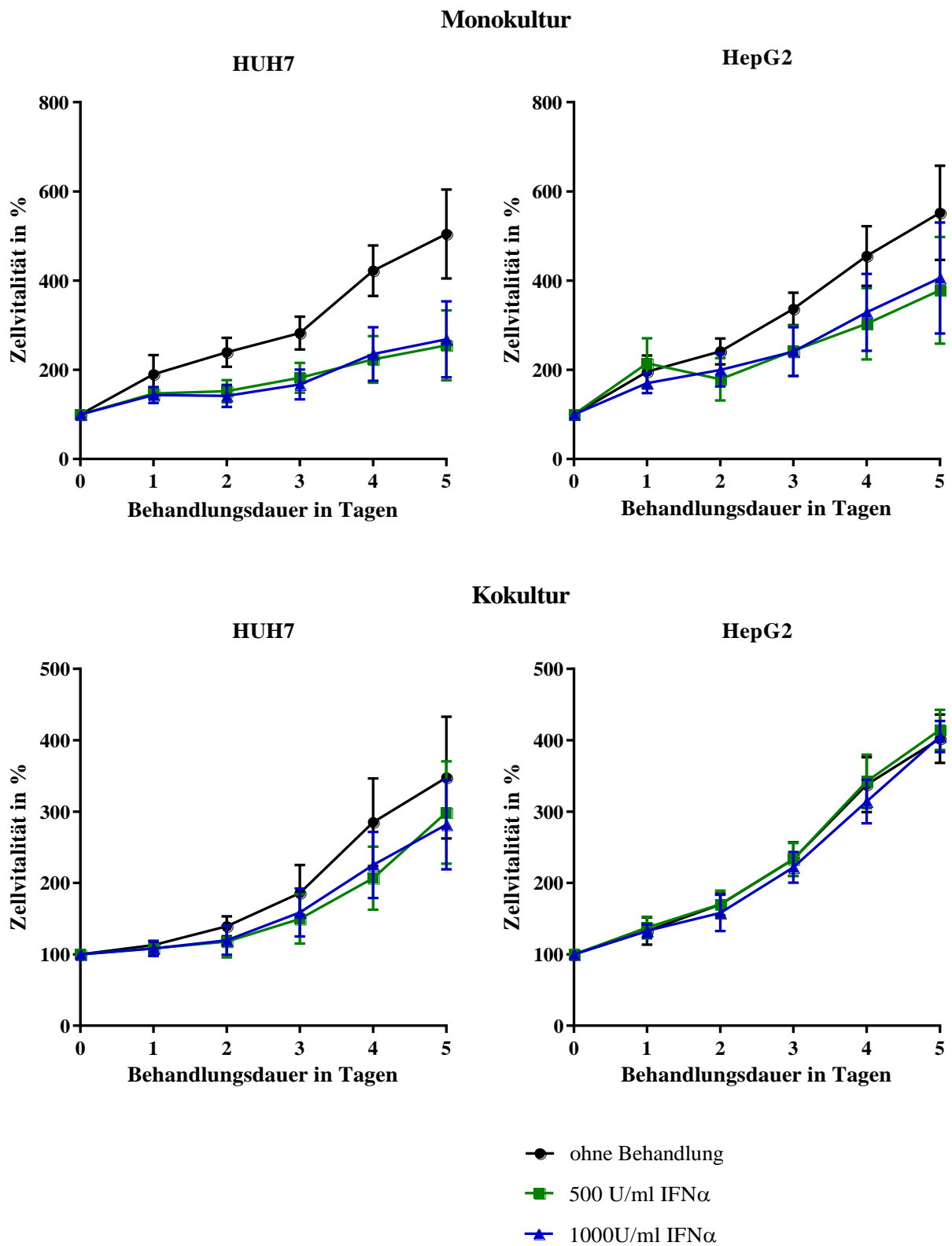


Abbildung 5: Proliferationskurven der Zelllinien HUH7 und HepG2 in Mono- und Kokultur mit 0, 500 und 1000 U/ml IFN α bei einem Zeitverlauf von 120 h.

Bei beiden Monokultur-Zelllinien kommt es durch $IFN\alpha$ zu einer Proliferationshemmung im zeitlichen Verlauf. Beim Vergleich der 500 U/ml und 1000 U/ml Interferon Kurven liegt kein wesentlicher Proliferationsunterschied und somit keine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibierung vor. Die Kokulturen zeigen ein abweichendes Ergebnis. Nach der Kokultivierung mit den Fibroblasten findet bei HUH7 gegenüber den Monokulturen eine verminderte Proliferationshemmung durch $IFN\alpha$ statt. Die HUH7 Zellen reagieren somit nur noch vermindert auf die $IFN\alpha$ Behandlung. Der Effekt ist umso deutlicher bei den kokultivierten HepG2 Zellen zu erkennen, deren Proliferation überhaupt nicht mehr gehemmt wird und die Zellen keine Reaktion auf die Behandlung mit $IFN\alpha$ zeigen. An diesem Versuch ist deutlich zu sehen, dass die kokultivierten HCC-Zellen ihr Ansprechen auf die $IFN\alpha$ -Therapie verlieren.

5.2 Expression von *IFNAR1* und *IFNAR2* in den Zelllinien

Wie im vorangegangenen Kapitel 5.1 beschrieben, zeigen die $IFN\alpha$ behandelten mono- und kokultivierten Zellen im MTT-Assay ein unterschiedliches Proliferationsverhalten, wobei die Kokulturen eine geringere bis keine Proliferationshemmung durch die Behandlung mit $IFN\alpha$ aufweisen. Um mögliche Gründe hierfür zu finden, wurden Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.5). Mit diesen konnte auf mRNA Ebene der Interferon Rezeptor mit seinen Untereinheiten *IFNAR1* und *IFNAR2*, als Ausgangspunkt der Interferon induzierten Signalkaskade, näher untersucht werden.

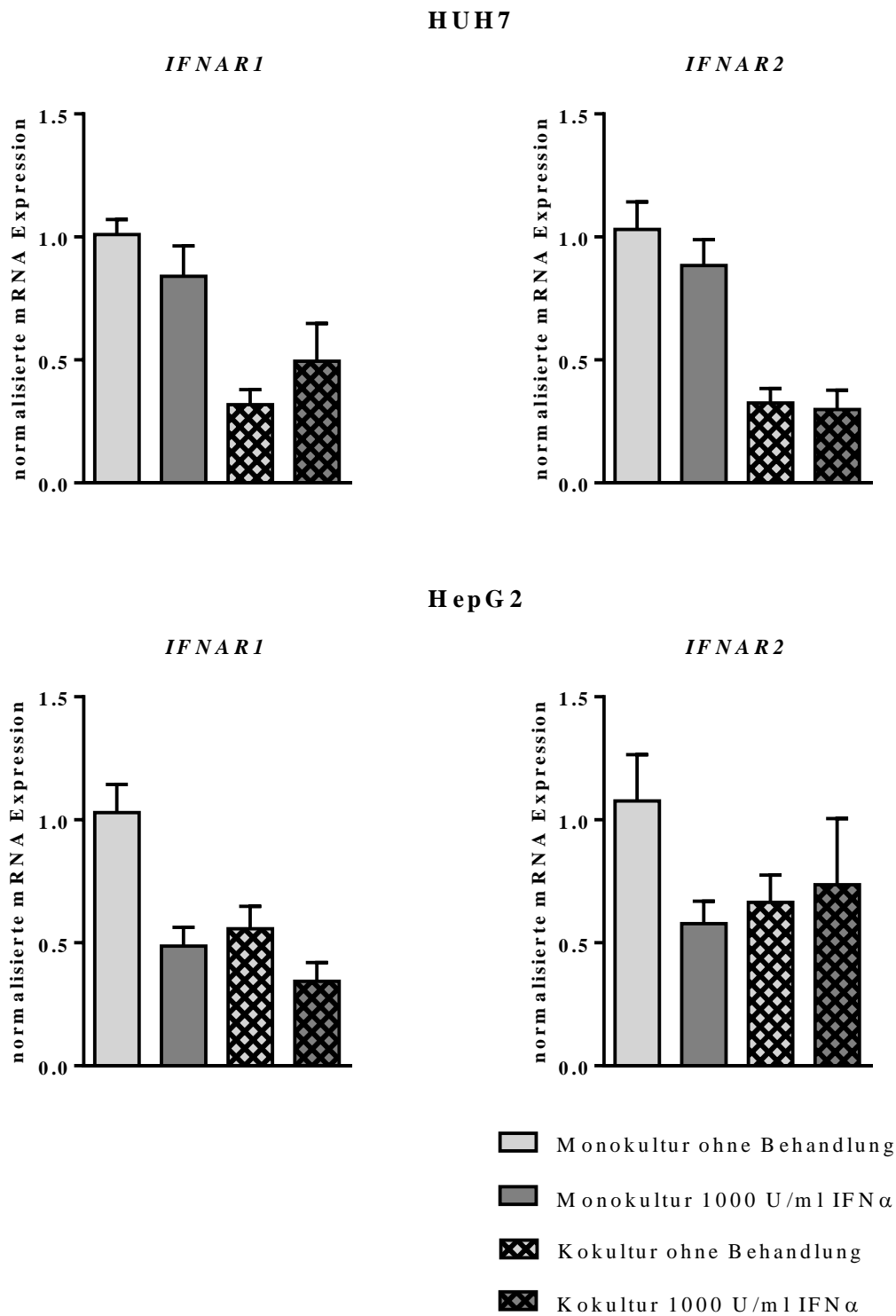


Abbildung 6: Expression von *IFNAR1* und *IFNAR2* in den Zelllinien HUH7 und HepG2. Mono- und Kokulturen wurden für 24 h mit 1000 U/ml IFN α behandelt.

Im Diagramm sieht man bei den über einen Zeitraum von 14 Tagen mit murinen 3T3 Fibroblasten kokultivierten Zelllinien HUH7 und HepG2 eine deutlich verminderte *IFNAR1* Expression (HUH7: $0,318 \pm 0,061$ Fold change (FC); HepG2: $0,556 \pm 0,092$ FC) gegenüber der Monokultur (HUH7: $1,009 \pm 0,061$ FC; HepG2: $1,030 \pm 0,113$ FC). Ebenso zeigt sich für *IFNAR2* bei beiden Zelllinien HUH7 und HepG2 in der 14-tägigen Kokultur eine deutlich verminderte Expression (HUH7: $0,325 \pm 0,059$ FC; HepG2: $0,665 \pm 0,111$ FC) gegenüber der Monokultur (HUH7: $1,030 \pm 0,112$ FC; HepG2: $1,077 \pm 0,188$ FC).

Auf 24 h IFN α Behandlung mit einer Konzentration von 1000 U/ml reagieren alle Monokulturen mit einer geringeren *IFNAR1* Expression (HUH7: $0,840 \pm 0,123$ FC; HepG2: $0,487 \pm 0,077$ FC) gegenüber den unbehandelten Zellen (HUH7: $1,009 \pm 0,061$ FC; HepG2: $1,030 \pm 0,113$ FC).

Ebenso zeigen beide Monokulturen für *IFNAR2* bei 24 h IFN α Behandlung mit einer Konzentration von 1000 U/ml eine geringere *IFNAR2* Expression (HUH7: $0,884 \pm 0,105$ FC; HepG2: $0,578 \pm 0,090$ FC) gegenüber den unbehandelten Zellen (HUH7: $1,030 \pm 0,112$ FC; HepG2: $1,077 \pm 0,188$ FC).

Durch die bereits verminderte Rezeptorexpression der beiden Zelllinien in der Kokultur kommt es nach der Behandlung mit IFN α nur bei den HepG2 Zellen zu einer minimalen Verringerung von *IFNAR1*. Bei den kokultivierten HUH7 verbleibt die *IFNAR1* Expression auf einem niedrigen leicht angestiegenen Niveau.

Beim Hinzuziehen der Ergebnisse des MTT-Assays (siehe Kapitel 4.1.8) zeigt sich eine Korrelation zwischen Rezeptorexpression und Proliferationsverhalten. Eine verminderte Rezeptorexpressionsrate der Kokulturen, im Vergleich zu den Monokulturen, geht mit einer geringeren Proliferationshemmung durch IFN α einher.

5.3 BrdU-Proliferationstest von IFN α behandelten Zelllinien

Eine weitere Möglichkeit, um die Wirkung von IFN α auf Zelllinien zu bestimmen, ist die Proliferationsmessung mittels BrdU-Assay. Hierbei wurde, wie in Kapitel 4.1.9 beschrieben, die Menge proliferierender Zellen nach 72 h Inkubation mit 0, 500 und 1000 U/ml IFN α gemessen.

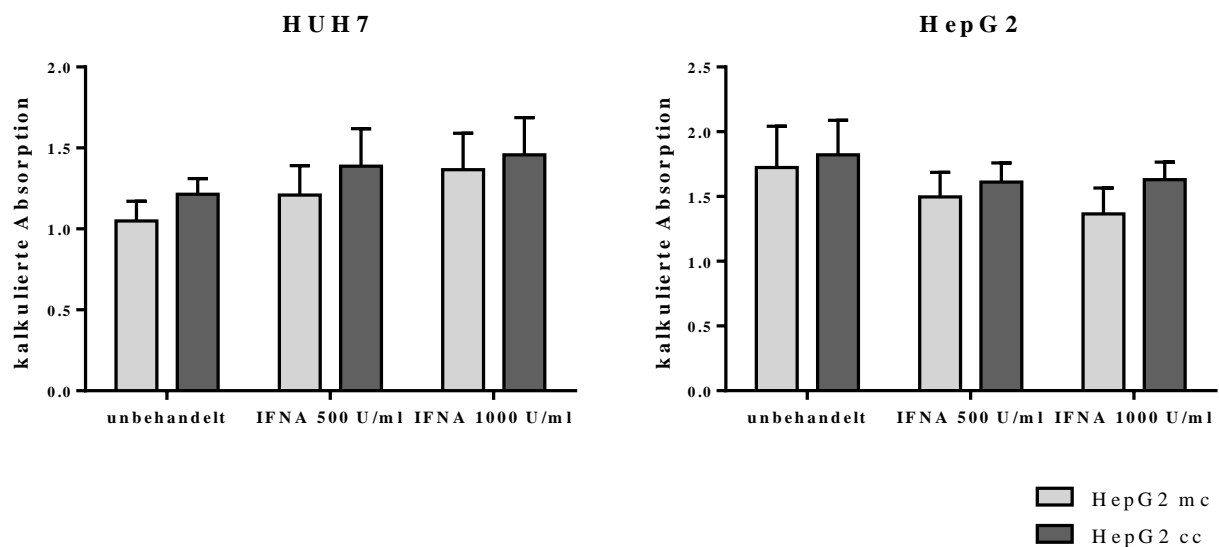


Abbildung 7: BrdU-Proliferationstest. HUH7 und HepG2 wurden als Monokulturen (mc) und Kokulturen (cc) mit den angegebenen Konzentrationen IFN α über einen Zeitraum von 72 h behandelt.

Im direkten Vergleich der mono- und kokultivierten Zellen sind keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten der Zellen erkennbar. Ebenso ist bei der Behandlung mit IFN α in den angegebenen Konzentrationen (500 U/ml, 1000 U/ml), sowohl bei mono- als auch kokultivierten Zellen, keine signifikante Änderung der Zellproliferation gegenüber den unbehandelten Zellen messbar. Im Gegensatz zum MTT-Assay kann somit im BrdU-Assay kein unterschiedliches Verhalten der Zellkulturen hinsichtlich ihrer Ansprechens auf IFN α nachgewiesen werden.

5.4 Western-Blot-Analyse des STAT1/p-STAT1-Signalweges

5.4.1 STAT1/p-STAT1-Signalweg der Monokultur

Nachdem Versuche auf transkriptioneller Ebene mittels qRT-PCR durchgeführt worden sind, wurden die Zelllinien auf Protein-Ebene mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

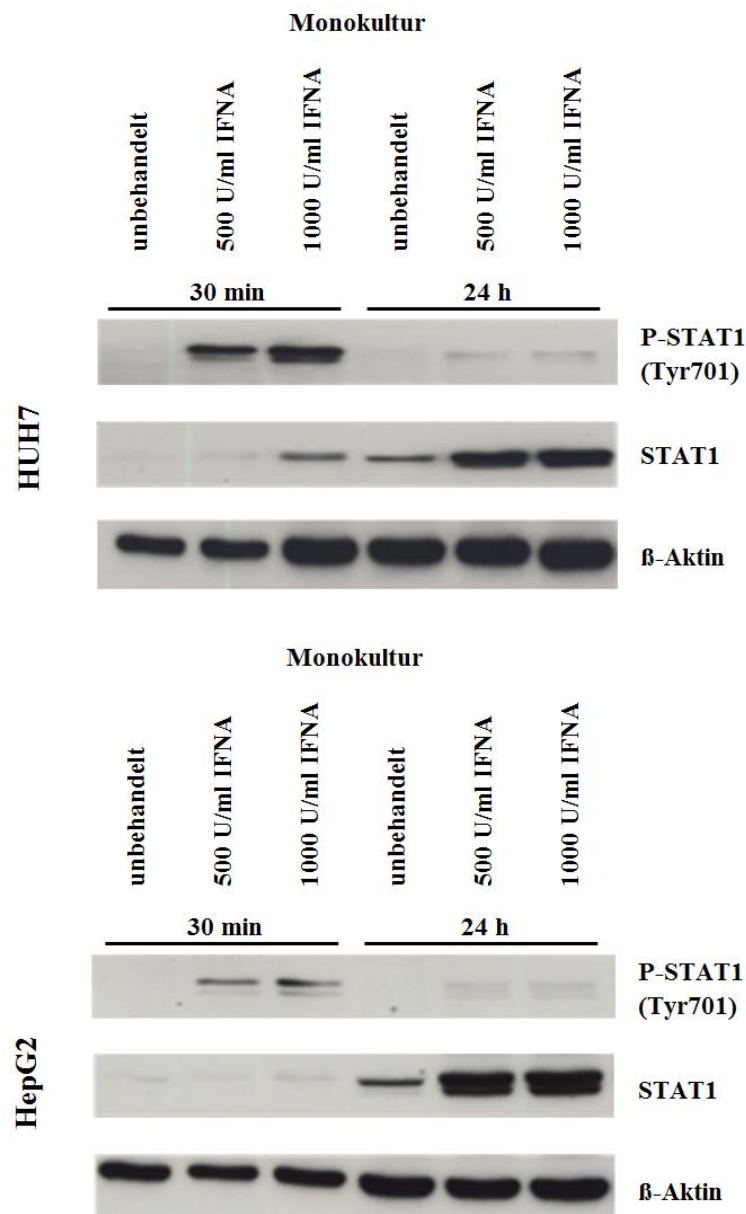


Abbildung 8: Western-Blot-Analyse von p-STAT1 und STAT1. HUH7 und HepG2 Zellen wurden mit IFN α Konzentrationen von 500 U/ml und 1000 U/ml über einen Zeitraum von 30 min und 24 h behandelt. β -Aktin dient der internen Proteinladekontrolle.

Um Informationen zur Aktivierung des intrazellulären Interferon-Signalweges zu bekommen, wurden die Western-Blot-Analysen, wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben, angefertigt. Hierfür wurden die Zellen ausgesät, 48 h in Hungermedium gehalten, dann mit 500 oder 1000 U/ml IFN α behandelt bzw. die unbehandelten Zellen mit Standardmedium versehen und nach 30 min sowie 24 h lysiert. Zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Proteinbeladung wurde β -Aktin als Ladekontrolle mitgeführt.

p-STAT1 zeigt bei HUH7 und HepG2 eine Aktivierung durch die IFN α Behandlung. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, die keine Bande darstellen, ist ein deutlicher Anstieg bei der Behandlung mit 500 U/ml IFN α und noch ausgeprägter mit 1000 U/ml IFN α zu sehen. Bei einer längeren Inkubation von 24 h kann man wesentlich schwächer sichtbare Banden bei beiden IFN α Konzentrationen erkennen, was auf eine zeitabhängig nachlassende Aktivierung von p-STAT1 hinweist. STAT1 zeigt bei ansteigender IFN α Dosis und längerer Inkubationszeit eine stärkere Proteinexpression bei beiden Zelllinien. Zu beachten ist bei den 24 h Werten die Überführung von den anfänglichen 48 h in Hungermedium auf Standardmedium (siehe Kapitel 3.5) während IFN α Behandlung, wodurch STAT1 auch bei den nicht behandelten Zellen hochreguliert wird.

5.4.2 STAT1/p-STAT1-Signalweg der Kokultur

Nachdem das Verhalten der Monokulturen bei IFN α Behandlung untersucht worden ist, sollten als nächstes mögliche Unterschiede zur Kokultur dargestellt werden. Der Versuchsaufbau entspricht dem der Monokultur (Kapitel 5.4.1); nur auf die Messgröße 500 U/ml IFN α Wert wurde an dieser Stelle verzichtet.

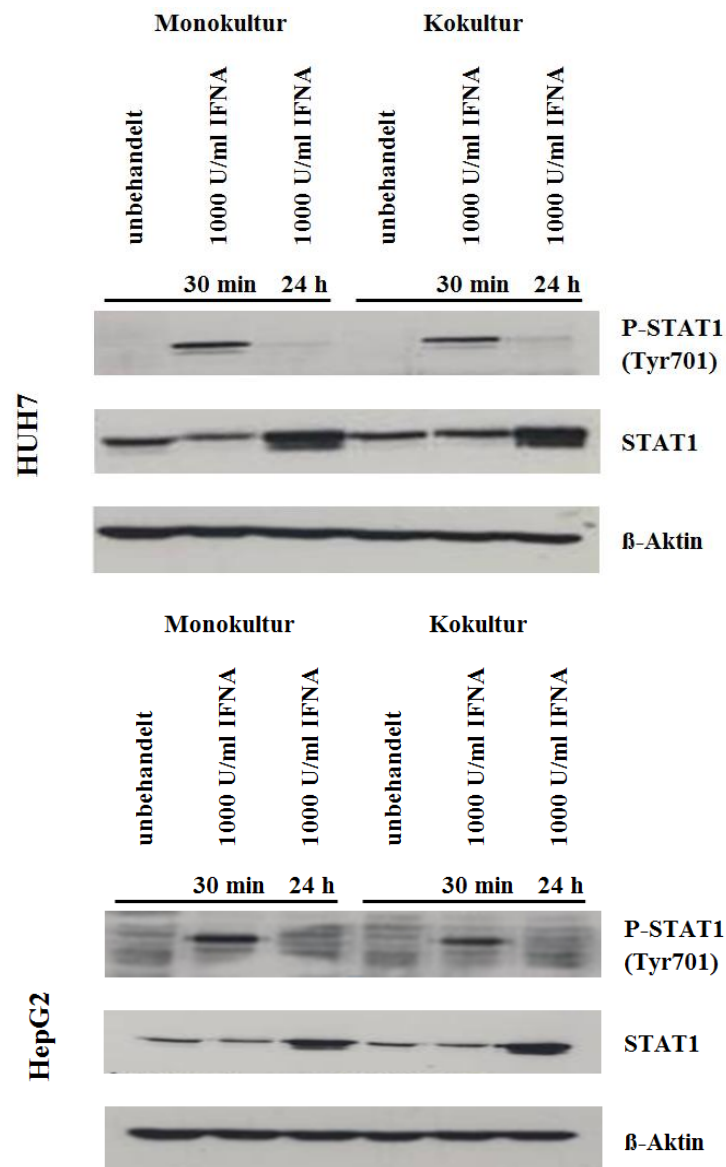


Abbildung 9: Western-Blot-Analyse von p-STAT1 und STAT1. HUH7 und HepG2 Zellen wurden mit einer IFN α Konzentration von 1000 U/ml über einen Zeitraum von 30 min sowie 24 h behandelt. Die Analysen wurden mit der Mono- und der Kokultur durchgeführt. β -Aktin dient der internen Proteinladungskontrolle.

Bei der Gegenüberstellung von Monokultur und Kokultur konnten für STAT1 und p-STAT1 keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Bei beiden Kulturen ist bei p-STAT1 eine Aktivierung der Zellen bei 30 min IFN α Behandlung, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, zu sehen. Eine von 30 min auf 24 h steigende Behandlungsdauer führt zu einer Abnahme der p-STAT1 Aktivierung. STAT1 zeigt eine stärkere Aktivierung bei längerer Behandlungsdauer von 30 min auf 24 h.

5.5 Expression von *IFNA*, *IFNAR1* und *IFNAR2* im Patientengewebe

Nach den Versuchen an den Zelllinien wurden als nächstes Gewebe von HCC-Patienten untersucht. Um einen Eindruck über die Expression von *IFNA*, *IFNAR1* und *IFNAR2* im humanen Primärgewebe zu erhalten, sollten Expressionsanalysen von Tumor und korrespondierendem umliegendem Normalgewebe des gleichen Patienten durchgeführt werden. Das korrespondierende Normalgewebe bei HCC-Patienten ist häufig fibrotisch, wodurch ein Vergleich zu gesundem Gewebe kaum möglich ist. Trotzdem wurde die Expression der Gene *IFNA*, *IFNAR1* und *IFNAR2* mittels qRT-PCR, im Vergleich zum umliegenden Nicht-Tumorgewebe, gemessen und normalisiert. Für die qRT-PCR wurden 6 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom ausgewählt und jeweils Tumorgewebe und Normalgewebe untersucht.

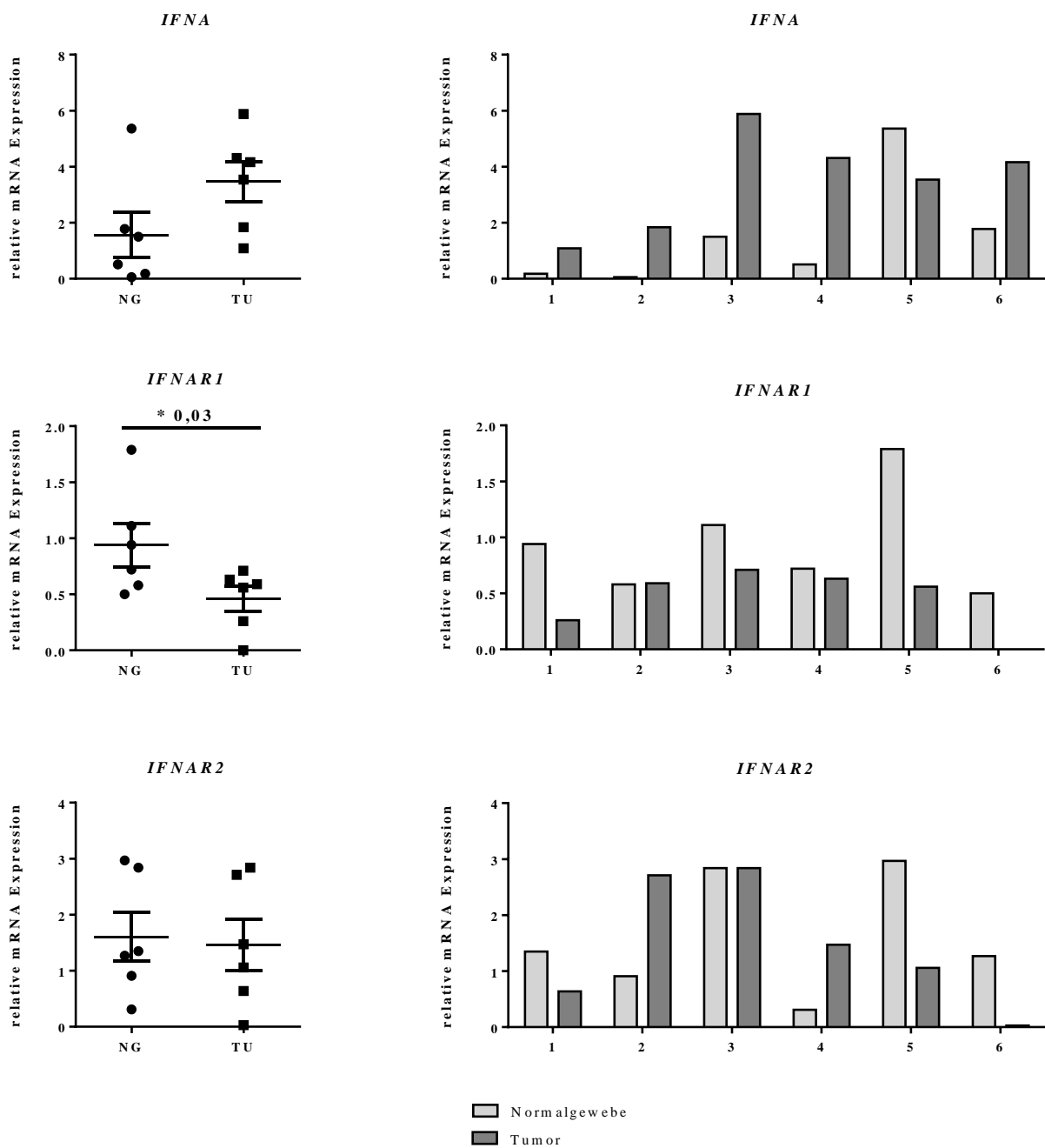


Abbildung 10: Darstellung der Expression von *IFNA*, *IFNAR1* und *IFNAR2* im Patientengewebe (Tumor (TU)/Normalgewebe (NG)). *Signifikante Veränderung der Expression im Vergleich zum Normalgewebe.

Im direkten Vergleich des Tumorgewebes mit dem korrespondierenden Normalgewebe (Balkendiagramm) zeigen die Tumor-Proben für *IFNA* eine Hochregulation in 5 von 6 Proben gegenüber dem Normalgewebe. *IFNAR1* ist in 5 von 6 Proben runterreguliert, wobei in Probe 6 die stärkste Runterregulation gemessen werden konnte. Bei *IFNAR2* weisen die Hälfte der Tumorproben eine verringerte Expression im Vergleich zum Normalgewebe auf, eine ist gleichbleibend und zwei hochreguliert. Probe 6 hat hierbei, wie bei *IFNAR1* auch, den stärksten runterregulierten Wert.

Trotz niedriger Probenanzahl kann im Vergleich aller Tumor- versus Nichttumorgewebe (*Dot Blot*) eine signifikant niedrigere Expression ($p < 0,03$) von *IFNAR1* im Tumorgewebe festgestellt werden.

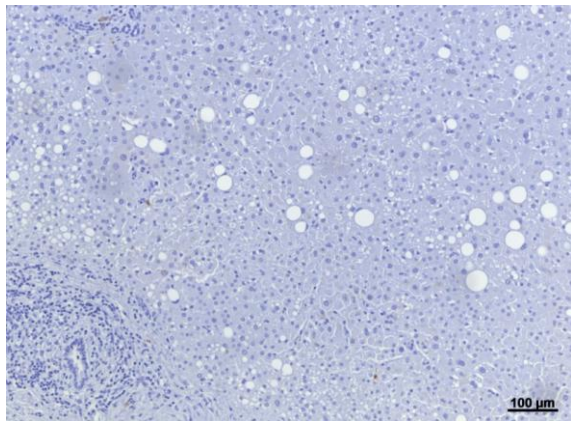
5.6 Histologische Untersuchung der Patientengewebe

Nachdem die Karzinomzellen auf Proliferations-, RNA- und Proteinebene analysiert worden sind, sollte im Folgenden das Gewebe histologisch untersucht werden. Das Patientenmaterial stammt von 16 an einem hepatozellulären Karzinom erkrankten Patienten des Klinikums rechts der Isar, München. Von den Patienten wurden jeweils HCC- und Nicht-HCC-Proben verwendet. Damit wird Tumorgewebe mit dem korrespondierenden umliegenden Gewebe verglichen, im Folgenden als Normalgewebe bezeichnet. Vorab wurden von allen Gewebeproben Hämatoxilin-Eosin-Färbungen zur histologischen Diagnosesicherung durchgeführt.

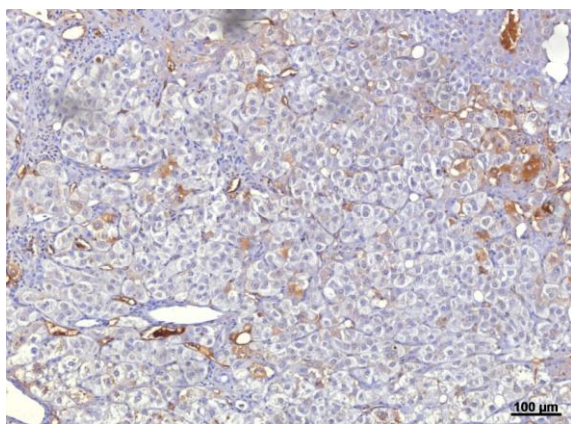
5.6.1 Immunhistochemische Darstellung von IFNAR1

Der Interferon Rezeptor Typ 1 besteht aus zwei Transmembranproteinen IFNAR1 und IFNAR2. Die Patientenschnitte wurden auf die immunhistochemische Expression von IFNAR1 untersucht. Dazu wurde die Färbung nach dem Protokoll in Kapitel 4.4.3

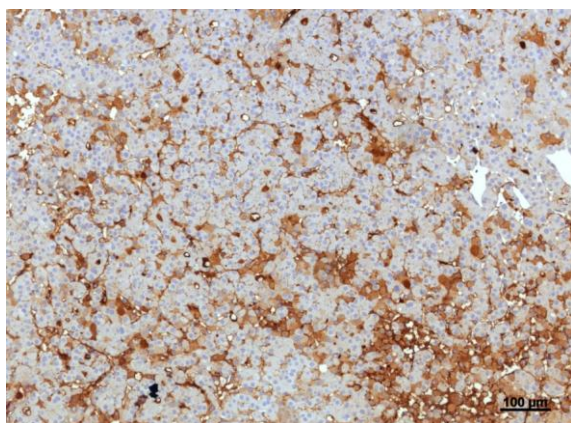
durchgeführt und die Färbeintensität in drei Grade unterteilt. 0 steht für eine fehlende oder schwache Färbung, 1 für eine moderate und 2 für eine starke Färbung. Angefärbte Zellbestandteile waren Zellmembran und Zytoplasma der Hepatozyten bzw. Tumorzellen.



A



B



C

Abbildung 11: Immunhistochemische Darstellung der IFNAR1 Expression im HCC. Bild A zeigt Intensität 0, Bild B Intensität 1 und Bild C Intensität 2.

5.6.2 Zusammenhang von IFNAR1 und der Leberhistologie

Um Einblick in die Rezeptorexpression im Normalgewebe und Tumor zu gewinnen, wurden die vorliegenden 32 Gewebe (16 x Normalgewebe, 16 x Tumorgewebe) auf die IFNAR1 Expression immunhistochemisch untersucht und miteinander verglichen.

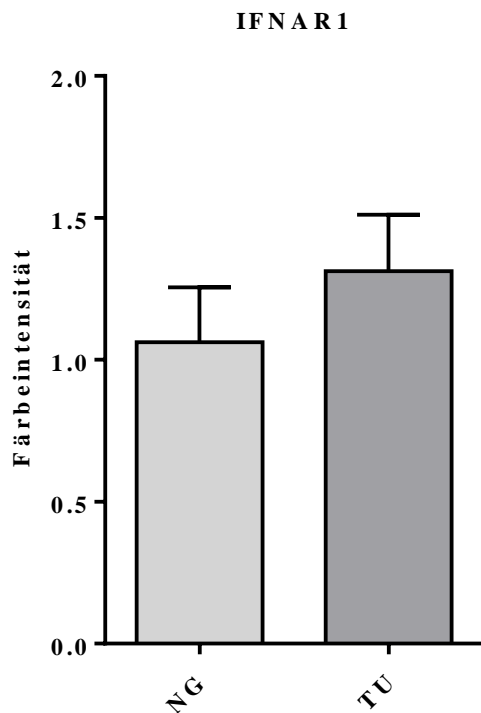
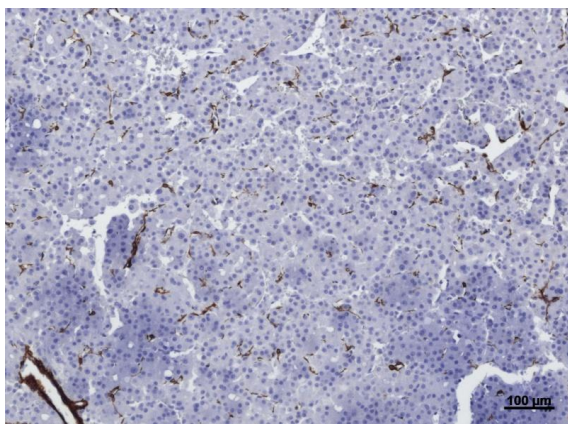


Abbildung 12: IFNAR1 Verteilung im Normalgewebe (NG) und Tumor (TU).

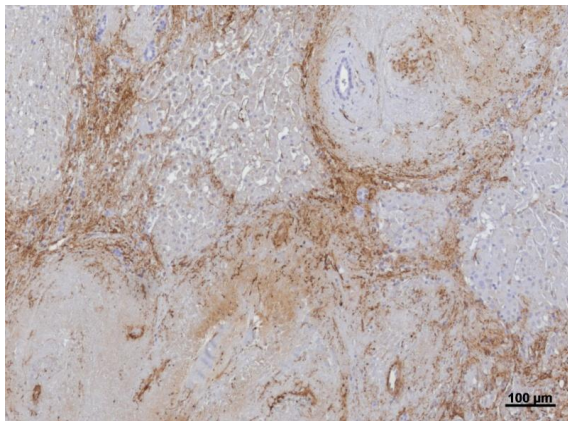
Bei der Analyse der Tumorgewebe von 16 Patienten wurden 3 Patienten mit einer IFNAR1 Intensität von 0 beurteilt, 5 Patienten mit einer Intensität von 1 und 8 Patienten mit einer Intensität von 2. Bei den 16 untersuchten Normalgeweben hatten ebenso 3 Patienten eine Intensität von 0, 8 Patienten eine Intensität von 1 und 5 Patienten die höchste Intensitätsstufe 2. Bei der Gegenüberstellung von Normalgewebe und Tumor konnte somit hinsichtlich IFNAR1 keine signifikante Verteilung festgestellt werden.

5.6.3 Immunhistochemische Darstellung von α -SMA

Das Protein *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) ist ein Marker für aktivierte Stellatumzellen, welche als α -SMA produzierende Myofibroblasten charakterisiert wurden. Die Zellen sind hauptsächlich für das Ausmaß der Leberfibrose verantwortlich. Die Schnitte wurden, wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben, immunhistochemisch gefärbt und in Gewebe mit Fibrose und ohne Fibrose eingeteilt.



A



B

Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung der α -SMA Färbung im HCC.

Bild A: keine Fibrose. Bild B: Fibrose.

5.6.4 Zusammenhang von α -SMA und der Leberhistologie

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen α -SMA und der Leberhistologie zu erkennen, wurde α -SMA im Normalgewebe und Tumor untersucht.

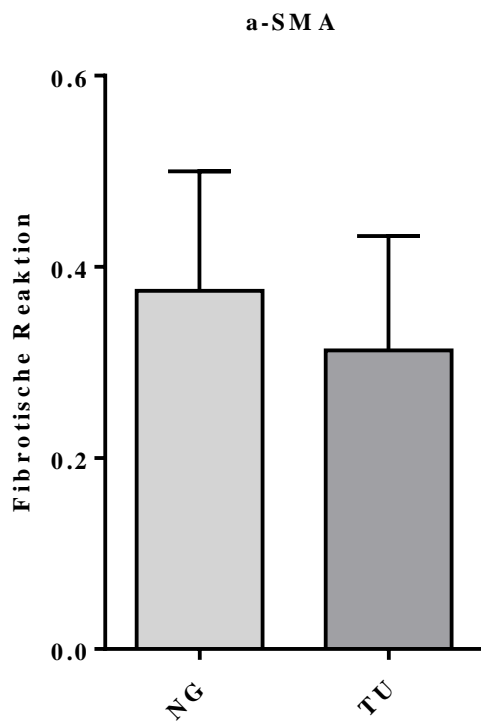


Abbildung 14: α -SMA Verteilung im Normalgewebe (NG) und Tumor (TU).

Im Normalgewebe lag eine Fibrose in 38 % (6/16) der Fälle, im Tumor in 31 % (5/16) der Fälle vor. Für α -SMA kann man somit keine signifikante Verteilung hinsichtlich Normalgewebe und Tumor feststellen.

5.6.5 Zusammenhang von IFNAR1 und Fibrose

Von folglich großem Interesse war nun, inwieweit die Rezeptorexpression und der Fibrosegrad des Lebergewebes in Zusammenhang stehen. Hierbei wurden die vorliegenden 32 Gewebeproben in Gewebe mit und ohne Fibrose eingeteilt, unabhängig davon, ob es sich um Tumor- oder Normalgewebe handelte. In diesen Geweben wurde dann die IFNAR1 Expression nach Färbeintensität bestimmt.

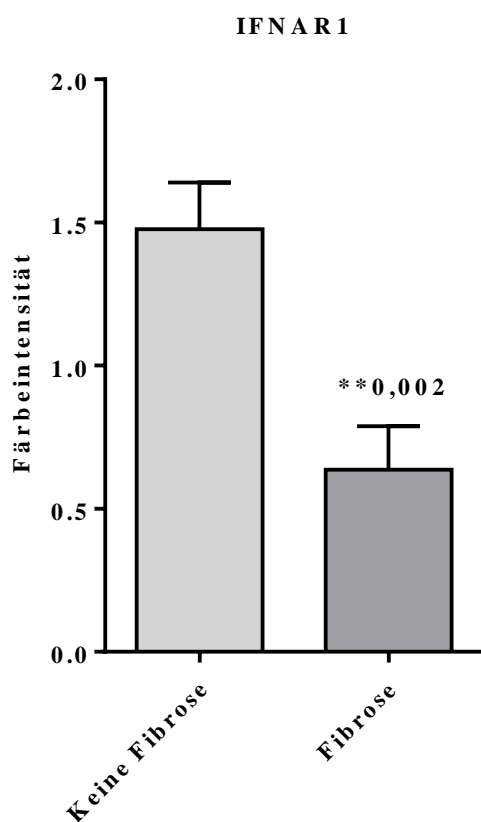


Abbildung 15: IFNAR1 Verteilung im fibrotischen und nicht-fibrotischen Gewebe.

**hoch signifikant geringere IFNAR1 Färbeintensität bei den fibrotischen Geweben im Vergleich zu den nicht fibrotischen.

Von 11 Geweben mit Fibrose hatten 4 die IFNAR1 Intensitätsstufe 0, 7 die Intensität 1. Bei keinem fibrotischen Gewebe lag die stärkste IFNAR1 Intensität von 2 vor. Von 21 Schnitten ohne Fibrose hatten 3 die Intensität 0, 5 die Intensität 1 und 13 (62 %) die Intensität 2. Das

Auftreten einer Fibrose korreliert somit hoch signifikant mit einer geringeren IFNAR1 Expression ($p < 0,002$) im Vergleich zum nicht-fibrotischen Gewebe.

6 Diskussion

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre Lebertumor. Es entsteht zu einem hohen Prozentsatz in einer chronisch hepatischen und zirrhotischen Leber. Um die Entwicklung eines Tumors in der chronisch vorgeschädigten Leber zu verhindern, werden Patienten häufig mit Interferon alpha ($\text{IFN}\alpha$) behandelt. Bei HCC-Patienten kommt $\text{IFN}\alpha$ als adjuvantes Chemotherapeutikum nach einer Tumorresektion zum Einsatz. Die Ansprechraten sind jedoch unbefriedigend und der zugrunde liegende Mechanismus ist noch unzureichend erforscht. Diese Arbeit untersuchte das Ansprechen von Tumorzellen auf die Behandlung mit $\text{IFN}\alpha$, wobei der Einfluss durch Fibroblasten, als ein wichtiger Zelltyp des Tumorstromas, besonders beleuchtet wurde.

Ziel war zunächst die Darstellung der Wirkung von rekombinantem $\text{IFN}\alpha$ auf zwei humane HCC-Zelllinien, HUH7 und HepG2. Parallel wurden die Versuche mit Fibroblasten kokultivierten HUH7 und HepG2 Zellen durchgeführt. Die Aussagekraft der Kokulturversuche wird dadurch erhöht, dass die Karzinomzellen, wie in der Patientenleber, in direktem Kontakt mit den sie umgebenden Fibroblasten stehen. Dies ermöglicht eine direkte Tumor-Fibroblasten-Zellinteraktion, wie sie in der erkrankten Leber auch vorgefunden wird. Durch die Auswahl aus der Maus stammender 3T3 Fibroblasten konnte sichergestellt werden, dass bei der magnetischen Zellsortierung Spezies spezifisch die murinen Fibroblasten selektiert und in der qRT-PCR ausschließlich die cDNA der menschlichen Karzinomzelle vervielfältigt wurde.

Durch Verwendung von rekombinantem $\text{IFN}\alpha$ wurde ein geeignetes Interferon ausgewählt, das durch seinen klinischen Einsatz bei HBV, HCV und einigen Krebsarten (Ferrantini et al., 2007) ein praxisnahes Therapeutikum darstellt. Die *in vitro* verwendeten

Zelllinien, HUH7 und HepG2, sind in der HCC-Forschung allgemein anerkannte Zelllinien, wodurch ein Vergleich mit anderen Arbeiten möglich war.

Mit unterschiedlichen Interferondosen (0, 500, 1000 U/ml) und verschiedenen Inkubationszeiten (0, 30 min, 24 h) konnte die IFN α Wirkung auf Mono- und Kokulturen dosis- und zeitabhängig charakterisiert werden.

Neben Zelllinien wurden auch Patientengewebe in qRT-PCR Analysen und mittels histologischer Färbungen untersucht, um einen Einblick in die Expression des Interferon alpha Rezeptors 1 (IFNAR1) bei Normalgewebe, Zirrhose und im Tumor zu bekommen.

6.1 Zusammenhang zwischen Rezeptorexpression (*IFNAR1* und *IFNAR2*) und Proliferation der Zellkultur unter Interferon Behandlung

Damit IFN α seinen antiproliferativen Effekt auf HCC-Zellen ausüben kann, muss der dazugehörige Zellmembranrezeptor, als Ausgangspunkt des intrazellulären Signalweges, vorhanden sein. In den Zellkulturversuchen zeigen HUH7 und HepG2 in der Monokultur bei IFN α Behandlung gegenüber den unbehandelten Zellen geringere *IFNAR1* und *IFNAR2* mRNA Expressionsraten. Die Kokulturen exprimieren im Vergleich zu den Monokulturen generell weniger *IFNAR1* und *IFNAR2*.

Durch MTT Versuche konnte unter IFN α Behandlung eine Proliferationshemmung der behandelten Monokulturen gezeigt werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen vieler veröffentlichter Arbeiten: Murata et al. haben beide hier untersuchten Zelllinien, HUH7 und HepG2, ebenso mit 1000 U/ml IFN α und IFN β über 96 Stunden behandelt, mit dem Ergebnis eines signifikanten antiproliferativen Effekts auf beide behandelten Zelllinien (Murata et al., 2006). Deren Ergebnisse zeigen, dass HUH7, wie in der vorliegenden Arbeit, stärker

gehemmt wird als HepG2. Darüber hinaus kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass IFN β eine stärkere Hemmung auf die Proliferation von HUH7 und HepG2 bewirkt als IFN α (Murata et al., 2006).

Ein interessanter Aspekt in meiner Arbeit ist, dass sich zwei wesentliche Unterschiede zwischen den Karzinomzellen der Monokultur und Kokultur zeigen: (1) Die Interferon-induzierte Proliferationshemmung ist bei der Kokultur im Vergleich zur Monokultur nahezu aufgehoben. (2) Die qRT-PCR Expressionsuntersuchungen des Interferon Rezeptors zeigen bei den Kokulturen ein geringeres *IFNAR1* und *IFNAR2* Expressionsniveau. Somit korreliert die verminderte Rezeptorexpression mit einer geringeren Interferon-induzierten Wachstumsinhibition. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es aufgrund der Kultur mit Fibroblasten in den HCC-Zellen zu einer Veränderung der Ansprechrate auf die Interferon Behandlung kommt. Die Tumorzellen adaptieren aufgrund der Kokultivierung mit den Fibroblasten einen *Non-Responder* Phänotyp. Für diesen Effekt ist wahrscheinlich eine Kokultur-induzierte verminderte Expression des Interferon Rezeptors in den Tumorzellen verantwortlich, woraus eine geringere antiproliferative Interferonwirkung folgt. Ein ähnlicher Versuchsaufbau mit kokultivierten Fibroblasten und HCC-Zelllinien wurde bisher noch nicht beschrieben.

Damdinsuren et al. (2007) untersuchten nur für Monokulturen den Zusammenhang zwischen Rezeptorexpression und Interferonwirkung. In Versuchen mit sechs HCC-Zelllinien fanden sie heraus, dass Zellen mit höherer *IFNAR2c* Expression sensitiver gegenüber der Wachstumsinhibition durch IFN α sind. Ihre Ergebnisse zeigen, dass die Expressionsstärke von *IFNAR1* und *IFNAR2c* den antiproliferativen Effekt maßgeblich beeinflusst. Oie et al. untersuchten 6 HCC-Zelllinien auf ihr Proliferationsverhalten und *IFNAR1* mRNA-Expressionsverhalten unter verschiedenen IFN α Konzentrationen in Kombination mit

5-Fluorouracil (5-FU). Hierbei sehen die Autoren in der Hochregulierung von *IFNAR1* eine Schlüsselrolle für den antiproliferativen Effekt von $IFN\alpha$ auf die Karzinom-Zelllinien. Folglich erörterten sie die Möglichkeit, durch Messung des *IFNAR1* Expressionslevels, eine Selektion von Interferontherapie *Respondern* vornehmen zu können (Oie et al., 2006). Die Literatur kommt jedoch zu gegensätzlichen Ergebnissen hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Rezeptorexpression und dem Ansprechverhalten auf $IFN\alpha$. Yano et al. untersuchten 13 Leberkarzinom-Zelllinien mittels qRT-PCR und sahen keine Korrelation zwischen der *IFNAR2* Expression und der Interferon Wirkung (Yano et al., 1999). Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen jedoch den positiven Zusammenhang zwischen der Interferon Rezeptor Expression und dem Ansprechen auf die Interferon Behandlung.

6.2 STAT1-Signalweg in den Zelllinien

Nachdem das Expressionsverhalten des Interferon Rezeptors in den Zelllinien betrachtet worden ist, wurde der für die Interferonwirkung nötige intrazelluläre STAT1/p-STAT1-Signalweg mit Western-Blot-Analysen näher untersucht.

Mono- und Kokulturen unterscheiden sich in der Signalwegsaktivierung nicht und zeigen Ergebnisse auf, wie sie für HCC-Zelllinien in Monokulturversuchen auch in anderen Arbeiten überwiegend gefunden werden. Die analogen Kokulturversuche wurden in dieser Weise erstmals untersucht.

Zhao et al. (2011) kommen hinsichtlich der zeit- und dosisabhängigen $IFN\alpha$ Wirkung auf HUH7 und HepG2 zu ähnlichen Ergebnissen. Als $IFN\alpha$ Behandlungsdauer wählten sie bei den Western-Blot-Analysen 15, 30 und 60 min, wobei die Phosphorylierung von 30 min zu 60 min abnahm (Zhao et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit verringerte sich die Signalstärke von 30 min zu 24 h stark. Dieser Effekt kommt nach Heim (2012)

folgendermaßen zustande: Die Aktivierung des Interferon-Signalweges erfährt seine maximale Aktivierung innerhalb der ersten beiden Stunden, dann nimmt die Aktivierung ab und die Zelle verweilt in einem refraktären Zustand, dabei ist die Zelle dem IFN α desensibel und es kommt zu keiner Transkriptionsinduktion Interferon-stimulierter Gene (Heim, 2012). Diese Abschwächung ist in der vorliegenden Arbeit bei der Monokultur und der Kokultur zu sehen.

Chen et al. zeigen, dass eine Überexpression von STAT1 in HepG2 Zellen die Proliferation hemmt und Apoptose induziert, verbunden mit einer erhöhten p53 und p-STAT1 Expression. Weiter verglichen sie in Western-Blot-Analysen die STAT1 Expression in 36 HCC-Geweben mit 12 Nicht-HCC-Geweben und fanden im Tumor signifikant weniger STAT1, wobei STAT1 positiv mit dem Differenzierungsgrad korrelierte. Chen et al. folgerten daraus, dass STAT1 die Zellproliferation im hepatozellulären Karzinom negativ reguliert, und somit als Tumorsuppressor fungieren könnte (Chen et al., 2013).

6.3 *IFNA* und *IFNARI* mRNA-Expression im Patientengewebe

Nach den Zellkultur Versuchen wurden im Folgenden Patientengewebe auf ihre Rezeptorexpression im HCC- und Normalgewebe untersucht. Die ausgewählten Gewebeprobe stammen aus dem Jahr 2011 von HCC-Patienten des Klinikums rechts der Isar, München. Die Patientengewebeprobe für die Analyse der Genexpression wurden in 6 HCC-Gewebe und 6 Normalgewebe eingeteilt, wobei jeweils Tumor und Nicht-Tumor von einem Patienten stammen und miteinander verglichen wurden.

Der Tumor besaß in der qRT-PCR erhöhte *IFNA* Expressionsraten. Hochreguliertes Interferon alpha findet man allgemein, wie in der Einleitung erläutert, bei virusinfizierten Zellen und auch bei Tumorzellen. *IFNARI* zeigte im Tumor signifikant runterregulierte Werte gegenüber

dem Normalgewebe. Eine geringere Menge an *IFNAR1* hat generell zur Folge, dass körpereigenes oder therapeutisch eingesetztes IFN α seinen intrazellulären Signalweg und damit seine Wirkung nicht entfalten kann. Somit liegt in der runterregulierten *IFNAR1* Expression ein möglicher Grund für eine mangelnde Interferonwirkung in den Tumorzellen.

6.4 Immunhistologie von IFNAR1 im Patientengewebe

Die Patientengewebe für die histologische Untersuchung stammen von 16 HCC-Patienten, die in den Jahren 2011 und 2012 im Klinikum rechts der Isar in München operiert wurden. Von jedem Patienten wurde Tumorgewebe und umliegendes Normalgewebe verwendet. Unter Normalgewebe wird hierbei das Nicht-Tumorgewebe verstanden, welches bei HCC-Patienten häufig fibrotisch ist. Zunächst interessierte die Verteilung von IFNAR1 auf die drei Intensitätsstufen 0, 1 und 2 im Tumor- und Normalgewebe, wobei sich hier keine klare Tendenz abzeichnete. Nachfolgend wurden alle 32 Gewebeprobe, unabhängig ob Tumor oder Normalgewebe, als fibrotisch oder nicht-fibrotisch eingeteilt. Das Auftreten einer Fibrose korrelierte hierbei hoch signifikant mit einer geringeren IFNAR1 Expression ($p < 0,002$) im Vergleich zum nicht-fibrotischen Gewebe. Die histologischen Färbungen zeigten somit im fibrotischen Gewebe signifikant weniger IFNAR1 als im nicht-fibrotischen Gewebe.

Kondo et al. haben die Färbintensität von IFNAR1, wie in der vorliegenden Arbeit, in die Intensitätsstufen 0, 1 und 2 eingeteilt und fanden eine signifikant negative Korrelation zwischen IFNAR1 und dem Differenzierungsgrad des Tumors (Kondo et al., 2000). Ota et al. verglichen die IFNAR2 Expression, eingeteilt ebenso in die Intensitätsstufen 0, 1 und 2, in verschiedenen gastrointestinalen Tumoren, wobei die Expressionsraten bei Ösophagus-, Magen-, Colorektalen-, Pankreas- und Cholangiokarzinomen niedriger waren (20-45 %) als

beim hepatozellulären Karzinom (65 %) (Ota et al., 2006). Weiter verglichen sie klinische Studienergebnisse hinsichtlich der *Response*-Raten auf IFN α in Kombinationstherapie. Hierbei wiesen die genannten gastrointestinalen Tumoren ein durchschnittlich geringeres Therapieansprechen auf als das hepatozelluläre Karzinom. Für Ota et al. stellt somit die IFNAR2 Expression ein mögliches Vorhersagekriterium für eine erfolgreiche Therapie dar (Ota et al., 2006). Für den Rezeptor Subtyp IFNAR2 kam eine andere Studie von Ota et al. zu klaren Ergebnissen hinsichtlich einer positiven Korrelation zwischen Rezeptor Expression und *Respondern*. Bei 69 % der hepatozellulären Karzinome war IFNAR2 exprimiert. Die Überlebenszeit der Patienten, die mit einem Kombinationspräparat aus IFN α /5-Fluorouracil behandelt wurden betrug für die IFNAR2-negativen 3,4 Monate und für die IFNAR2-positiven Patienten 24,4 Monate (Ota et al., 2005).

In meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass der antiproliferative Effekt von IFN α mit der *IFNAR1* mRNA Rezeptorexpression in den HCC-Zelllinien, HUH7 und HepG2, korreliert und, dass die Kokultivierung von Tumorzellen mit Fibroblasten eine Reduktion der Interferon Rezeptorexpression bewirkt.

Die fibrotische Tumorumgebung spielt auch bei der IFNAR1 Expression im Patientengewebe eine wichtige Rolle. Hierbei zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass weniger IFNAR1 im fibrotischen als im nicht-fibrotischen Gewebe vorhanden ist. Somit legt diese Arbeit nahe, dass die Fibrose-Tumor-Zellinteraktion das Ansprechen von hepatozellulären Karzinomzellen auf die IFN α Behandlung negativ beeinflusst. Für die Zukunft ist es wichtig, das hepatozelluläre Karzinom mit seiner Umgebung zu erforschen, um weitere Erkenntnisse über den Einfluss der Tumorumgebung auf den Tumor selbst und dessen Therapieansprechen zu gewinnen.

7 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom ist der häufigste primäre Lebertumor. Es verzeichnet eine weltweit steigende Inzidenz. Charakteristisch für diesen hochmalignen Tumor ist sein Auftreten bei Hepatitiden und Leberzirrhose. Um die Entwicklung eines HCC oder die Rezidivbildung nach chirurgischer HCC-Resektion zu vermeiden, werden Patienten mit rekombinantem Interferon alpha ($IFN\alpha$) als adjuvantes Chemotherapeutikum behandelt. Diese Therapieform weist jedoch niedrige *Response*-Raten auf und der zugrundeliegende Mechanismus ist noch unzureichend geklärt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Fibrose den Interferon alpha Signalweg in der Leber verändert und damit auch die Wirkung von therapeutisch eingesetztem Interferon alpha auf Tumorzellen. Um Antworten zu finden, wurden *in vitro* Kokultur Versuche mit HCC-Zelllinien (HUH7, HepG2) und Fibroblasten (3T3) durchgeführt. Die Kokulturen zeigten in Proliferationsversuchen ein geringeres Ansprechen auf die $IFN\alpha$ Behandlung verglichen mit den Monokulturen. Die Interferon Rezeptoruntereinheiten 1 und 2 (*IFNAR1*, *IFNAR2*) zeigten als Ausgangspunkt des Interferon-Signalweges hierbei für die Kokulturen geringere mRNA-Expressionsraten. Western-Blot-Analysen ergaben keinen Unterschied in der generellen Signalwegsaktivierung von p-STAT1 auf die $IFN\alpha$ Behandlung. Somit korreliert nur die Interferon Rezeptorexpression mit dem Ansprechen auf $IFN\alpha$. Patientengewebe wurden in mRNA und histologischen Analysen auf die Interferon Rezeptorexpression untersucht. Die Genanalyse ergab signifikant geringere *IFNAR1* Werte im Tumor als im Normalgewebe. Histologisch fand sich eine negative Korrelation der *IFNAR1* Expression mit dem Fibrosegrad des Gewebes. Somit legt diese Arbeit nahe, dass ein geringeres Therapieansprechen mit einer verminderten *IFNAR1* Expression im weniger differenzierten Gewebe in Zusammenhang steht.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BrdU	5-bromo-2'deoxyuridine
BSA	Bovines Serum Albumin
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epitelial-mesenchymale Transformation
FBS	Fetales Rinder Serum
g	Gramm
x g	Gravitation
h	Stunden
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCL	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HRP	Horseradish peroxidase
HSC	hepatische Stellatumzellen
IFN	Interferon
IFN α	Interferon alpha
IFN β	Interferon beta
IFNAR	Interferon alpha Rezeptor
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferon stimulated gene
ISGF3	Interferon stimulated gene factor 3
ISRE	Interferon stimulated response element
Jak	Januskinase
L	Liter
M	Mol
MACS	Magnetic activated cell sorting
MHC	Major histocompatibility complex
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAFLD	Non alcoholic fatty liver disease
NASH	Non alcoholic steatohepatitis
PBS	Phosphatpufferlösung

PCR	Polymerase chain reaction
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMA	Smooth muscle actin
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tab	Tabelle
U	Unit
V	Volt
W	Watt
µl	Mikroliter

9 Literaturverzeichnis

Asselah, T., Bieche, I., Narguet, S., Sabbagh, A., Laurendeau, I., Ripault, M.-P., Boyer, N., Martinot-Peignoux, M., Valla, D., Vidaud, M., Marcellin, P.

Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C

Gut (2008) 57:516-524

Blum, H. E., Hopt, U. T.

Hepatozelluläres Karzinom, Pathogenese und das Problem der Multizentrität

Chirurg (2003) 74:709-716

Borden, E. C., Sen, G. C., Uze, G., Silverman, R. H., Ransohoff, R. M., Foster, G. R., Stark, G. R.

Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine

Nature Reviews (2007) 6:975-990

Chen, G., Wang, H., Xie, S., Ma, J., Wang, G.

Stat1 negatively regulates hepatocellular carcinoma cell proliferation

Oncology Reports (2013) 29:2303-2310

Damdinsuren, B., Nagano, H., Wada, H., Noda, T., Natsag, J., Marubashi, S., Miyamoto, A., Yutaka, T., Umeshita, K., Doki, Y., Dono, K., Monden, M.

Interferon alpha receptors are important for antiproliferative effect of interferon- α against human hepatocellular carcinoma cells

Hepatology Research (2007) 37:77-83

Denzer, U. Guthoff, A. Wege, H., Hillert, C. Krupski-Berdien, G.

Leberkrankheiten Teil II – Das hepatozelluläre Karzinom

Hamburger Ärzteblatt (2006) 4:207-213

El-Serag, H. B.

Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA

Hepatology Research (2007) 37:88-94

El-Serag, H. B.

Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma

Gastroenterology (2012) 142:1264-1273

Essers, M. A. G., Offner, S., Blanco-Bose, W. E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M. A.

IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo
Nature (2009) 458:904-909

Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., Donato, F.

Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors
Gastroenterology (2004) 127:35-50

Ferrantini, M., Capone, I., Belardelli, F.

Interferon- α and cancer: Mechanism of action and new perspectives of clinical use
Biochimie (2007) 89:884-893

Forner, A., Miovet, J. M., Bruix, J.

Hepatocellular carcinoma
Lancet (2012) 379:1245-1255

Friedman, S. L.

Mechanism of hepatic fibrogenesis
Gastroenerology (2008) 134(6):1655-1669

Friedman, S. L.

Evolving challenges in hepatic fibrosis
Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. (2010) Figure 2

Heim, M. H.

Interferons and hepatitis C virus
Swiss Medical Weekly (2012) 142:w135861

Jemal A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D.

Global cancer statistics
Cancer Journal for Clinicians (2011) 61:69-90

Khodarev, N. N., Roach, P., Sean, P. P., Daniel, W. G., Mihir, B., Shao, M. Y., Darga, T. E., Beveridge, M. G., Sood, R. F., Sutton, H. G., Beckett, M. A., Mauceri, H. J., Posner, M. C., Weichselbaum, R. R.

Stat1 pathway mediates amplifikation of metastatic potential and resistance to therapy
PloS ONE (2009) 4(6):e5821

Kondo, M., Nagano, H., Sakon, M., Yamamoto, H., Morimoto, O., Arai, I., Amoto, A. M., Eguchi, H., Dono, K., Nakamori, S., Umeshita, K., Wasaka, K. I., Ohmoto, Y., Monden, M.

Expression of interferon α/β receptor in human hepatocellular carcinoma
International Journal of Oncology (2000) 17:83-88

Kumaran, J., Wei, L., Kotra, L. P., Fish, E. N.

A structural basis for interferon- α -receptor interactions
The FASEB Journal (2007) 21:3288-3296

Kusano, H., Akiba, J., Ogasawara, S., Sanada, S., Yasumoto, M., Nakayama, M., Ueda, K., Kurita, T., Keita, T., Umeno, Y., Nakashima, O., Yano, H.

Pagylated interferon- α 2a inhibits proliferation of human liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*
PloS ONE (2013) 8(12):e83195

Lai, C. L., Lau, J. Y., Wu, P. C., Ngan, H., Chung, H. T., Mitchell, S. J., Corbett, T. J., Chow, A. W., Lin, H. J.

Recombinant interferon alpha in inoperable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial.
Hepatology (1993) 17:389-394

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF)

Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Langversion 1.0,
AWMF Registrierungsnummer: 032-053 OL (2013) 1-153
<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (1.10.2014)

Li, T., Yang, Y., Hua, X., Wang, G., Liu, W., Liu, W., Jia, C., Tai, Y., Zhang, Q., Chen, G.

Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO
Cancer Letters (2012) 318:154-161

Mosmann, T.

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays
Journal of Immunological Methods (1983) 65:55-63

Murata, M., Nabeshima, S., Kikuchi, K., Yamaji, K., Furusyo, N., Hayashi, J.

A comparison of the antitumor effects of interferon- α and β on human hepatocellular carcinoma cell lines

Cytokine (2006) 33:121-128

Oie, S., Ono, M., Yano, H., Maruyama, Y., Terada, T., Yamada, Y., Ueno, T., Kojiro, M., Hirano, K., Kuwano, M.

The up-regulation of type 1 interferon receptor gene plays a key role in hepatocellular carcinoma cells in the synergistic antiproliferative effect by 5-fluorouracil and interferon- α .

International Journal of Oncology (2006) 29:1469-1478

Ota, H., Nagano, H., Sakon, M., Eguchi, H., Kondo, M., Yamamoto, T., Nakamura, M., Damdinsuren, B., Wada, H., Marubashi, S., Miyamoto, A., Dono, K., Umeshita, K., Nakamori, S., Wakasa, K., Monden, M.

Treatment of hepatocellular carcinoma with major portal vein thrombosis by combined therapy with subcutaneous interferon- α and intra-arterial 5-fluorouracil; role of type 1 interferon receptor expression

British Journal of Cancer (2005) 93:557-564

Ota, H., Nagano, H., Doki, Y., Sekimoto, M., Kondo, M., Wada, H., Nakamura, M., Noda, T., Damdinsuren, B., Marubashi, S., Miyamoto, A., Takeda, Y., Dono, K., Umeshita, K., Nakamori, S., Wakasa, K., Sakon, M., Monden, M.

Expression of type I interferon receptor as a predictor of clinical response to interferon- α therapy of gastrointestinal cancers

Oncology Reports (2006) 16:249-255

Patt, Y. Z., Hassan, M. M., Lozano, R. D., Brown, T. D., Vauthey, J. N., Curley, S. A., Ellis, L. M.

Phase II trial of systemic continuous fluorouracil and subcutaneous recombinant Interferon alfa-2b for treatment of hepatocellular carcinoma

Journal of Clinical Oncology (2003) 21(3):421-427

Pestka, S.

The human interferon α species and receptors

Biopolymers (Peptide Science) (2000) 55:254-287

Pestka, S., Krause, C. D., Walter, M. R.

Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors
Immunological Reviews (2004) 202:8-32

Pestka, S.

The Interferons: 50 Years after their discovery, there is much more to learn
Journal of biological chemistry (2007) 282(28):20047-20051

Pfaffl, M. W.

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR
Nucleic Acids Research (2001) 29(9):2002-2007

Pietras, K., Östman, A.

Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma
Experimental cell research (2010) 316:1324-1331

Raphael, S. W., Yangde, Z., YuXiang C.

Hepatocellular carcinoma: Focus on different aspects of management
ISRN Oncology (2012) 421673:1-12

Sakon, M., Nagano, H., Dono, K., Nakamori, S., Umeshita, K., Yamada, A., Kawata, S., Imai, Y., Iijima, S., Monden, M.

Combined intraarterial 5 fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches
Cancer (2002) 94(2):435-442

Samuel, C. E.

Antiviral actions of interferons
Clinical Microbiology Reviews (2001) 14(4):778-800

Sandhya, M. S., Thomas, F., Sajjad, A., Kishore, R. K., Myriam, A., Reza, D., Ula, V. J.

Comparative analysis of human-derived feeder layers with 3T3 fibroblasts for the ex vivo expansion of human limbal and oral epithelium
Stem Cell Rev (2011) 8(3):696-705

Schuppan, D., Afdhal, N. H.

Liver cirrhosis
Lancet (2008) 371(9615):838-851

Yano, H., Iemura, A., Haramaki, M., Ogasawara, S., Takayama, A., Akiba, J. Kojiro, M.

Interferon alfa receptor expression and growth inhibition by interferon alfa in human liver cancer cell lines

Hepatology (1999) 29(6):1708-1717

Yano, H., Ogasawara, S., Momosaki, S., Akiba, J., Kojiro, S., Fukahori, S., Ishizaki, H., Kuratomi, K., Basaki, Y., Oie, S., Kuwano, M., Kojiro, M.

Growth inhibitory effects of pegylated IFN alpha-2b on human liver cancer cells in vitro and in vivo.

Liver International (2006) 26:964-975

Yuen, M. F., Ooi, C. G., Hui, C. K., Wong, W. M., Wong, B. C. Y., Chan, A. O. O., Lai, C. L.

A pilot study of transcatheter arterial interferon embolization for patients with hepatocellular carcinoma

Cancer (2003) 97(11):2776-27782

Zhao, L. J., Hua, X., He, S. F., Ren, H., Qi, Z. T.

Interferon alpha regulates MAPK and Stat1 pathways in human hepatoma cells

Virology Journal (2011) 8:157 1-7

Zhu, A. X.

Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: How hopeful should we be?

The Oncologist (2006) 11:790-800

10 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Darstellung der Herkunft Fibrose bildender Myofibroblasten
- Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Interferon alpha Signalweges
- Abbildung 3: Schematische Darstellung des magnetischen Zelltrennverfahrens *MACS*
- Abbildung 4: Lichtmikroskopische Darstellung der untersuchten Kokulturen
- Abbildung 5: MTT-Proliferationskurven der Zelllinien mit Interferon Behandlung
- Abbildung 6: Genexpression von *IFNAR1* und *IFNAR2* in den Zelllinien
- Abbildung 7: BrdU-Proliferationstest der Zelllinien mit Interferon Behandlung
- Abbildung 8: Western-Blot-Analyse des (p-)STAT1-Signalweges in der Monokultur
- Abbildung 9: Western-Blot-Analyse des (p-)STAT1-Signalweges in der Kokultur
- Abbildung 10: Genexpression von *IFNA*, *IFNAR1* und *IFNAR2* im Patientengewebe
- Abbildung 11: Immunhistochemische Darstellung von IFNAR1 im Patientengewebe
- Abbildung 12: Diagramm zur IFNAR1 Verteilung im Normalgewebe und Tumor
- Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung von α -SMA im Patientengewebe
- Abbildung 14: Diagramm zur α -SMA Verteilung im Normalgewebe und Tumor
- Abbildung 15: Diagramm zur IFNAR1 Verteilung im fibrotischen und nicht-fibrotischen Gewebe

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien

Tabelle 2: Primäre Antikörper

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

Tabelle 4: Expressionsprimer

Tabelle 5: Zusammenstellung der cDNA Synthese Proben

Tabelle 6: Zusammenstellung der qRT-PCR Proben

Tabelle 7: qRT-PCR Programm

Tabelle 8: SDS-Gel Pipettierschema

12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jörg Kleeff danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Forschungsgruppe und für die Möglichkeit der Promotion an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar.

Bei Herrn Dr. Christoph Michalski möchte ich mich recht herzlich für seine Unterstützung bedanken.

Mein größter Dank gilt der Betreuerin meiner Doktorarbeit Frau Dr. Ivonne Regel für die persönliche Einführung in die Laborarbeiten und die zuverlässige und sehr gute Betreuung.

Dem gesamten Laborteam danke ich für das nette Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Meiner lieben Mutter, meinem lieben Vater, meiner lieben Schwester Larissa und meinem lieben Matthias möchte ich von ganzem Herzen danken!

13 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Saphira Virginia Böhm
Geburtsname: Saphira Virginia Singer
Geburtsdatum: 20. 10. 1987
Geburtsort: Augsburg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

SCHULE

1994 - 1998 Grundschule, Gessertshausen
1998 - 2007 Maria-Ward-Gymnasium, Augsburg

STUDIUM

10/2007 - 01/2013 Studium der Zahnheilkunde,
Ludwig-Maximilians-Universität, München
27/2/2013 Approbation als Zahnärztin

BERUF

3/2013 - 4/2013 Assistenz Zahnärztin, Zahnarztpraxis Lichter, München
5/2013 - 2/2015 Assistenz Zahnärztin, Zahnarztpraxis Dr. Müller, Nördlingen
2/2015 - 7/2015 Angestellte Zahnärztin, Zahnarztpraxis Dr. Müller, Nördlingen
8/2015 - heute Angestellte Zahnärztin, Zahnarztpraxis Leue, Nördlingen

Promotion

seit 06/2011 Forschungslabor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
am Klinikum rechts der Isar
Doktorvater: Prof. Dr. Jörg Kleeff

14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die hier vorgeliegende Dissertation mit dem Titel „Einfluss der Fibroblasten-Tumor-Zellinteraktion bei Interferon alpha Behandlung von HCC-Zelllinien“ zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt habe. Aus Quellen direkt oder indirekt übernommene Inhalte sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde noch nicht veröffentlicht oder einer anderen Prüfbehörde vorgelegt.

München,

Saphira Virginia Böhm