

**Etablierung eines In-vitro-Fibrose-Modells und dessen Auswirkung  
auf Hepatom- und Endothelzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Christina Joy Van Cayzeele**

aus Wiesbaden-Dotzheim

2016

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. E. Raskopf
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ch. Kurts

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.09.2016

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

*Für meine Eltern*



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>11</b>
1.1	Leberfibrose.....	11
1.1.1	Molekulare Pathogenese der Fibrose .....	11
1.1.2	Das Hepatozelluläre Karzinom .....	15
1.2	Angiogenese.....	15
1.3	Therapie der Leberfibrose.....	18
1.4	Leberfibrose-Modelle .....	20
1.4.1	In-vivo-Leberfibrose-Modelle .....	20
1.4.2	In-vitro-Leberfibrose-Modelle .....	21
1.4.2.1	Schädigung durch Thioacetamid und Ethanol .....	21
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	23
<b>2.</b>	<b>Material .....</b>	<b>24</b>
2.1	Geräte.....	24
2.2	Sonstiges Material .....	24
2.3	Kits .....	25
2.4	Zelllinien.....	26
2.4.1	Hepa129.....	26
2.4.2	SVEC4-10.....	26
2.5	Reagenzien für die Zellbiologie.....	26
2.6	Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	27
2.7	Lösungen für die In-vitro-Experimente .....	27
<b>3.</b>	<b>Methodik.....</b>	<b>30</b>
3.1	Zellkultur .....	30
3.1.1	Allgemeine Zellkultur.....	30
3.1.2	Bestimmung der Lebendzellzahl nach Neubauer .....	30
3.2	Untersuchung der Zellviabilität.....	31
3.2.1	MTT-Test .....	31
3.2.2	BrdU-Proliferations-Assay.....	32
3.2.3	Cell Death Detection-Assay .....	33

3.2.4	CytoTox-Homogeneous Membrane Integrity-Assay .....	34
3.2.5	ApoONE Homogenous Caspase-3/7-Assay .....	35
3.3	Untersuchung der Funktionalität <i>in vitro</i> .....	35
3.3.1	Migrations-Assay .....	35
3.3.2	Matrigel-Tube Formation-Assay.....	36
3.3.3	In-vitro-Tumor-Assay .....	36
3.3.4	Zelladhäsions-Assay.....	37
3.4	Untersuchung profibrotischer Faktoren.....	38
3.4.1	Aussäen von Zellen .....	38
3.4.2	Proteinisolierung durch chemische Lyse.....	39
3.4.3	Proteinisolierung mithilfe der „freeze-thaw“-Methode.....	39
3.4.4	Proteinbestimmung.....	40
3.4.5	ELISA.....	41
3.5	Statistik .....	42
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
4.1	Untersuchung der Zellviabilität.....	44
4.1.1	Die Zellviabilität der Hepatom- und Endothelzellen wird durch TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst.....	44
4.1.2	Die Proliferationsrate von Hepatom- und Endothelzellen wird durch TAA und Ethanol gesteigert.....	46
4.1.3	Die Nekrose- und die Apoptoserate von Hepatom- und Endothelzellen werden durch TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst .....	47
4.1.4	Die zytotoxische Wirkungen von TAA und Ethanol auf Hepatom- und Endothelzellen ist verschieden .....	49
4.1.5	Die Caspase-3/-7-Aktivität der Hepatom- und Endothelzellen wird von TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst.....	50
4.2	Untersuchung der Funktionalität <i>in vitro</i> .....	51
4.2.1	Die Migrationsfähigkeit der Endothelzellen wird durch TAA und Ethanol vermindert.....	51
4.2.2	Die Bildung endothel-ähnlicher Strukturen wird durch TAA und Ethanol gesteigert.....	55

4.2.3	Die Bildung klonaler Zellkolonien der Hepatomzellen wird durch Ethanol gesteigert .....	56
4.2.4	Das Adhäsionspotential der Tumor- und Endothelzellen wird durch TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst.....	59
4.3	Untersuchung profibrotischer Faktoren.....	60
4.3.1	Untersuchung der Phosphorylierung von Signaltransduktionsmolekülen .....	61
4.3.1.1	Die Phosphorylierung von AKT in Hepatom- und Endothelzellen wird durch TAA und Ethanol gesteigert .....	61
4.3.1.2	TAA und Ethanol führen in Hepatomzellen zu einer verminderten- und in Endothelzellen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von JNK.....	62
4.3.1.3	Die Phosphorylierung von ERK1/ERK2 wird durch TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst.....	63
4.3.1.4	TAA und Ethanol steigern die Phosphorylierung von P38 MAPK deutlich .....	64
4.3.2	Untersuchung Hypoxie-induzierter Faktoren.....	64
4.3.2.1	Die Konzentration an HIF-1 $\alpha$ wird von TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst.....	65
4.3.2.2	TAA und Ethanol haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Konzentration an intrazellulärem und sezernierten VEGF .....	66
4.3.3	Untersuchung von Zelladhäsionsmolekülen .....	67
4.3.3.1	TAA und Ethanol führen in Hepa129-Zellen zu einer gesteigerten- und in SVEC4-10-Zellen zu einer verminderten VCAM-Konzentration.....	68
4.3.3.2	TAA und Ethanol steigern die ICAM-Konzentration fast ausnahmslos .....	69
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>70</b>
5.1	Zellviabilität und Zellumsatz.....	71
5.2	Funktionelle Untersuchungen .....	75
5.3	Analyse von profibrotischen Faktoren.....	78
5.4	Schlussfolgerung .....	86
5.5	Ausblick .....	87
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	doppelt destilliertes Wasser
Ang	Angiopoetin
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
BFA	Brefeldin A
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Rinder-Serumalbumin
CCL <sub>4</sub>	Tetrachlormethan
DENA	Diethylnitrosamin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDA	Extra Domäne A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ERK	Extrazelluläre Signal-Regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
g	Erdbeschleunigung (9,81 Nm)
GI	Gastrointestinal
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
HRE	HIF-empfindliches Element
HSC	Hepatische Sternzellen
HUVE	Endothelzellen humaner Umbilikalvenen

ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
LSEC	Sinusoidale Leberendothelzellen
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
<i>n</i>	Anzahl
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NCAM	Nervenzell-Adhäsionsmolekül
NRP	Neuropilin
<i>p</i>	Signifikanz
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCAM	Thrombozyten-Endothelzellen- Adhäsionsmolekül
PDGF	Thrombozytärer Wachstumsfaktor
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
POD	Peroxidase
Ras	Rat sarcoma (G-Protein)
RFU	Relative Fluoreszenz-Einheit
RG	Reaktionsgefäß
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur (23 °C)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	kleine interferierende Ribonukleinsäure
TAA	Thioacetamid
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor

TIMP	Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen
TKI	Tyrosin-Kinase Inhibitor
ü. N.	über Nacht
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	VEGF-Rezeptor

## **1. Einleitung**

### **1.1 Leberfibrose**

Als Leberfibrose bezeichnet man eine Erkrankung, die auf eine Schädigung des Organs durch Toxine (z. B. Alkohol), Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder biliäre Obstruktion zurückzuführen ist.

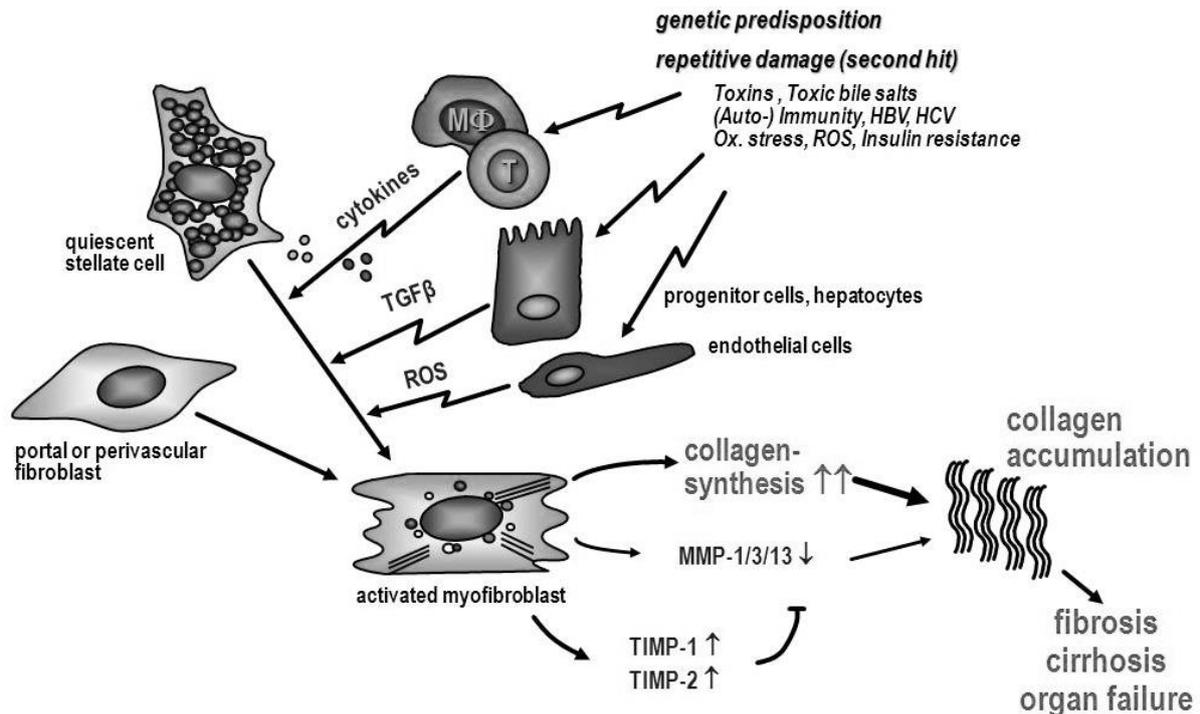
Der Prozess der Fibrogenese führt zu einem Umbau des Gewebes, welcher in einer veränderten Leberarchitektur mit verminderter Organfunktion resultiert. Fibrogenese ähnelt dem Wundheilungsprozess: Ein schädigender Stimulus löst eine Entzündungsreaktion aus. Dadurch werden Zytokine ausgeschüttet, Entzündungszellen rekrutiert, Kollagene und Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) synthetisiert. Abschließend wird eine Narbenbildung initiiert, was zu einem erhöhten Bindegewebsanteil in der fibrotischen Leber führt. Es bildet sich eine neue intrahepatische Gefäßstruktur mit neu entstehenden porto-systemischen Kollateralen und einer erhöhten vaskulären Resistenz aus, die mit der Zeit zu einer portalen Hypertension führt (Wallace et al., 2008). Durch den andauernden Stimulus der chronischen Entzündung und Regeneration in der fibrotischen Leber kommt es im weiteren Verlauf zu Gewebsumwandlungen mit knotiger Struktur und fibrotischen Septen, wie sie für die funktionsschwache, zirrhotische Leber charakteristisch sind (Lotersztajn et al., 2005).

Zu den Hauptkomplikationen der aus der Leberfibrose resultierenden Zirrhose zählen neben der portalen Hypertension die hepatische Enzephalopathie, das hepatorenale Syndrom, der durch die portale Hypertension verursachte Aszites, die spontane bakterielle Peritonitis und die Varizenblutung (Heidelbaugh und Sherbondy, 2006).

Darüber hinaus gilt die Leberzirrhose als Präkanzerose: Der größte Risikofaktor ist dabei die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) (Bataller und Brenner, 2005).

#### **1.1.1 Molekulare Pathogenese der Fibrose**

Die Fibrogenese wird durch eine Schädigung der Hepatozyten initiiert, welche daraufhin fibrogene Mediatoren freisetzen. Dies führt zu einer Aktivierung von Entzündungszellen und Kupferzellen (leberspezifische Leukozyten). Die Kupferzellen wiederum reagieren mit der Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und aktivieren hepatische Sternzellen (HSC), wie in Abbildung 1 dargestellt (Neubauer et al., 2001).



**Abb. 1:** Vereinfachte schematische Darstellung der zellulären Mechanismen der hepatischen Fibrogenese (Schuppan und Popov, 2009). Als Folge einer chronischen Schädigung der Leber kommt es zu einer Ausschüttung von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Hepatozyten, Entzündungszellen, Gallengangsepithelzellen und Endothelzellen. Es kommt zu einer Aktivierung von Fibroblasten und HSC, welche daraufhin vermehrt Kollagene der extrazellulären Matrix synthetisieren. Durch eine verminderte Expression an Matrix Metalloproteinasen (MMPs), die die ECM-Proteine proteolytisch abbauen und einer gesteigerten Expression der Gewebehinhibitoren von Metalloproteinasen (TIMP-1/-2), wird die Fibrinolyse inhibiert. Es kommt zu einer Akkumulation von ECM, die im weiteren Verlauf zum Organversagen führen kann.

HSC gelten als Hauptverursacher der Fibrogenese: Werden die inaktiven Zellen aktiviert, kommt es durch morphologische Transformation zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Stadium der Zellen. HSC synthetisieren neben Proteinen der vornehmlich im Interstitium lokalisierten ECM auch Chemokine und Adhäsionsmoleküle (unter anderem Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM), Nervenzell-Adhäsionsmolekül (NCAM), sowie Vasculäres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM)). Diese helfen bei der Migration inflammatorischer Zellen (Knittel et al., 1999).

Die ECM trägt im physiologischen Zustand unter anderem zur mechanischen Stabilisierung, zur Modulation von Diffusion und zur Regulation von Zellmigration bei. Sie kann in der fibrotischen Leber um das Zehnfache erhöht sein und ist in ihrer Zusammensetzung verändert. Dabei kommt es aufgrund einer gesteigerten Kapillarisation in fibrotischem

Gewebe zu einer Vermehrung an Basalmembranproteinen und fibrillären Kollagenen (Schuppan et al., 2001; Wells, 2008). Dieses Wachstum der ECM kommt durch ein Ungleichgewicht an ECM-Synthese und -Abbau zustande (Hemmann et al., 2007). ECM-Proteine selbst tragen wiederum zur Aktivierung von HSC- und durch die daraus resultierende erhöhte Expression von MMP-2, zur Fibrogenese bei (Gressner et al., 2002; Westermarck und Kahari, 1999).

Neben HSC sind auch andere Zellen für die Produktion der ECM-Proteine verantwortlich. Dabei synthetisieren neben sinusoidalen Endothelzellen und portalen Fibroblasten auch aus dem Knochenmark stammende mesenchymale Zellen und Hepatozyten Matrix Proteine (Novo et al., 2009). Hepatozyten sind die dominante Zellpopulation in der Leber und es wird postuliert, dass es im Rahmen einer chronischen Leberentzündung zu einer durch den Transformierenden Wachstumsfaktor (TGF- $\beta$ ) induzierten epithelialen-mesenchymalen Transition von Hepatozyten kommt. Diese synthetisieren dann, mit myofibroblastischen Eigenschaften ausgestattet, ebenfalls ECM-Proteine (Kaimori et al., 2007).

Die mit zunehmender Fibrosierung einhergehende Steifheit des Lebergewebes begünstigt zusätzlich Zellproliferation und -differenzierung (Wells, 2008).

Des Weiteren kommt es im Rahmen der Fibrogenese zu einer Defenestrierung der Sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) und zu der Entstehung einer Basalmembran im Disse-Raum. Die Lebersinusoide tragen als Kapillaren mit fenestriertem Endothel zum kontrollierten Austausch zwischen Blut aus Leberarterien und Portalvene und dem Disse-Raum bei und regulieren den hepatischen Widerstand (Braet und Wisse, 2002; Tugues et al., 2005). Im physiologischen Zustand limitieren LSEC die Aktivierung von HSC und begünstigen die Rückkehr aktivierter HSC in ihren inaktiven, Vitamin-A-speichernden Zustand. LSEC mit Basalmembran und ohne Fenestrae hingegen verlieren diesen Effekt auf hepatische Sternzellen (Deleve et al., 2008).

Es wurde gezeigt, dass LSEC vermehrt Fibronectin Extra Domäne A (EDA), eine splice-Variante des zellulären Fibronectins, exprimieren. Dieses wird im Anfangsstadium des Wundheilungsprozesses synthetisiert und setzt zusammen mit TGF- $\beta$  die Fibroblastendifferenzierung in der fibrotischen Leber in Gang (Serini et al., 1998). Dies stützt die Hypothese, dass sinusoidale Endothelzellen eine entscheidende Rolle in der anfänglichen Fibroseentstehung spielen.

Die chronische Entzündung des Organs führt zu einem verkürzten Lebenszyklus der Hepatozyten. Die normale Lebensdauer eines Hepatozyten liegt bei ca. 30 Tagen, in einer fibrotischen Leber nur bei ca. 4 Tagen. Der Zellzyklus der Hepatozyten wird durch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und Zytokinen moduliert und durch den Entzündungsprozess angeregt. Tabelle 1 gibt einen exemplarischen Überblick über den Zellzyklus regulierende intrazelluläre Signalmoleküle.

**Tab. 1:** Exemplarische Auswahl über den Zellzyklus regulierende intrazelluläre Signalmoleküle

AKT	Reguliert den Zellzyklus	(Alexia et al., 2006; Kunter et al., 2014)
c-Jun N-terminal Kinase (JNK)	Reguliert Apoptose und die Sekretion inflammatorischer Zytokine	(Bataller und Brenner, 2005; Schwabe et al., 2001, 2004)
Extrazelluläre Signal-Regulierte Kinase (ERK1/ERK2)	Reguliert Zellproliferation, -wachstum und Zelldifferenzierung	(Marra et al., 1999)
P38 Mitogen aktivierte Proteinkinase (P38 MAPK)	Reguliert Zellzyklus und Apoptose	(Koul et al., 2013; Tsukada et al., 2006)

Es kommt zu einem erhöhten Zellumsatz mit ebenfalls erhöhter Proliferationsrate der Hepatozyten. Die damit einhergehende gesteigerte Mitoserate und eine Kürzung der Telomere mit jeder Zellteilung führen zu einer genetischen Instabilität. Es können gehäuft Mutationen auftreten, welche genetische Defekte akkumulieren und das Risiko einer malignen Transformation steigern (El-Serag und Rudolph, 2007). Auch eine durch die Entzündung ausgelöste Fehlregulation der Wachstumsfaktoren kann zur Entartung beisteuern. So kann die vermehrte Apoptoserate von Hepatozyten zu einem allgemein zellwachstumsfördernden Makromilieu führen (El-Serag und Rudolph, 2007).

### 1.1.2 Das Hepatozelluläre Karzinom

Das HCC ist eine bösartige Erkrankung der Leber und der fünfthäufigste Tumor weltweit (El-Serag und Rudolph, 2007). Die Inzidenz der Erkrankung ist mit ca. 748.000 Neuerkrankungen weltweit pro Jahr (im Jahr 2008) steigend und die Mortalität steht unter den Malignomen an dritter Stelle (Ferlay et al., 2010).

Achtzig Prozent der Tumore entwickeln sich auf der Basis geschädigten Lebergewebes. Diese Schädigung kommt vor allem durch eine Infektion mit den Viren Hepatitis B (HBV) und/oder Hepatitis C (HCV), durch die Exposition mit Aflatoxinen, durch die hereditäre Hämochromatose, durch Autoimmunerkrankungen und durch vermehrten Alkoholkonsum zustande (Fattovich et al., 2004; Kountouras und Lygidakis, 2000; Okuda, 2000; Trichopoulos et al., 2011). Besonders in der westlichen Welt ist exzessiver Alkoholkonsum die Hauptursache für Leberzirrhose und somit ein entscheidender Kofaktor bei der Hepatokarzinogenese (Tilg und Day, 2007).

Die Therapieoptionen des hepatozellulären Karzinoms sind nach wie vor unzureichend. Um der Entstehung eines HCC vorzubeugen, ist daher die Therapie der geschädigten Leber bereits im Fibrose-Stadium notwendig.

## 1.2 Angiogenese

Angiogenese und Fibrogenese sind zwei in der toxisch geschädigten Leber eng miteinander verknüpfte Prozesse. Medina et al. konnten zeigen, dass Angiogenese signifikant zur Fibrogenese in der Leber beiträgt: Eine vermehrte Fibrosierung der Leber führt durch vermehrte Ablagerung von ECM-Bestandteilen zu einer Obstruktion der Gefäße, was in einer verschlechterten Mikrozirkulation resultiert. Das dadurch bedingte hypoxische Milieu wiederum induziert die Angiogenese (Medina et al., 2004).

Im Gegensatz zur Vaskulogenese, der Bildung von *de novo* Blutgefäßen während der Embryogenese, bezeichnet die Angiogenese einen durch Hypoxie stimulierten und durch Wachstumsfaktoren modulierten Prozess, der zur Bildung neuer Gefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen führt (Valfre di Bonzo et al., 2009). Angiogenese kommt im physiologischen Zustand im Rahmen der Wundheilung und Leberregeneration vor. Der hauptsächlich pathologische Prozess tritt bei chronischen Entzündungen der Leber, Tumorangiogenese, Karzinogenese und Metastasenbildung auf (Lee et al., 2007).

Der Wissensstand der Forschung zur Angiogenese in einer fibrotischen Leber beruht momentan hauptsächlich auf der Untersuchung physiologischer Angiogenese im Rahmen der Leberregeneration nach hepatischer Teilresektion: Der Regenerationsprozess beginnt mit einer gesteigerten Proliferation der Hepatozyten. Es bildet sich ein avaskulärer Zellhaufen, dessen im Inneren lokalisierte Hepatozyten ab einem Durchmesser der Zellansammlung von 1-2 mm nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden können. Der oxidative Stress in den Zellen aktiviert den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), welcher in normoxischen Zellen direkt nach Synthese durch proteolytische Spaltung wieder abgebaut wird. Unter hypoxischen Bedingungen hingegen wird diese Spaltung inhibiert, was zu einem Anstieg von HIF-1 $\alpha$  in der Zelle führt (Cash et al., 2007; Salceda und Caro, 1997). HIF-1 $\alpha$  steigert unter anderem die Expression profibrotischer (Thrombozytärer Wachstumsfaktor (PDGF)) und angiogener (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)) Gene im Zellkern (Maeno et al., 2005; Valfre di Bonzo et al., 2009). Es gibt mehrere Studien die belegen, dass eine chronische Schädigung der Leber zu einem hypoxischen Milieu führt. Hypoxische Hepatozyten überexprimieren und sezernieren dann VEGF (Corpechot et al., 2002; Ji et al., 1982). Moon et al. zeigten den Zusammenhang von Angiogenese, Inflammation und Fibrogenese in der Leber, der auf eine vermehrte HIF-1 $\alpha$ -Expression zurückzuführen ist (Moon et al., 2009).

Beim sogenannten „sprouting“ bewirkt der hypoxische Reiz in bestehenden Gefäßen eine durch Stickstoffmonoxid (NO) induzierte Vasodilatation und eine durch VEGF stimulierte erhöhte Gefäßpermeabilität (Corpechot et al., 2002). Sezernierte Plasmaproteine (Fibrin, Fibrinogen) führen nun zu einem Umbau der extrazellulären Matrix. Der Abbau von ECM-Proteinen durch Proteinase (z. B. MMPs) wird vorangetrieben und eine Migration von Endothelzellen somit erleichtert (Hiraoka et al., 1998). Die Proliferation und Migration der Endothelzellen wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren (VEGF, Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF), Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF), TGF- $\alpha$ , - $\beta$ ) stimuliert, wobei besonders die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 von Bedeutung ist. VEGFR-1 und -2 werden unter hypoxischen Bedingungen in der fibrotischen Leber und in HSC kurzfristig vermehrt exprimiert (Corpechot et al., 2002; Yoshiji et al., 2003, 2004). Die Effekte des VEGF-A/VEGFR-2-Komplexes sind hauptverantwortlich für die Korrelation von Angiogenese und Fibrogenese in der Leber. VEGF wirkt dabei

hauptsächlich über Aktivierung des Ras/ERK-Signalweges (Medina et al., 2004; Novo et al., 2007; Shimizu et al., 2001; Yoshiji et al., 2003). VEGF induziert außerdem die Expression von MMPs, was die Migration und Invasion der Endothelzellen erleichtert (Zucker et al., 1998). Diese migrieren, proliferieren und bilden neue, gefäßähnliche Strukturen aus. Die Bildung eines dreidimensionalen endothelialen Netzwerkes wird durch viele Faktoren reguliert, zu denen neben VEGF und MMPs auch Angiopoetin-1 (Ang-1), Integrine, Neuropilin-1 (NRP-1) und PDGF gehören. Durch die Sekretion von PDGF durch Endothelzellen und Hepatozyten werden Perizyten (HSC) rekrutiert und aktiviert. Die durch PDGF induzierte Proliferation von Zellen erfolgt dabei über AKT- und ERK-Signalwege (Pinzani et al., 1996; Pinzani und Marra, 2001). HSC wiederum tragen durch die Sekretion von Ang-1 zum Aufbau stabiler interzellulärer Kontakte bei und sorgen durch vermehrte Produktion von ECM-Proteinen für eine mechanische Stabilisierung der neu gebildeten Gefäße (Medina et al., 2004).

Hepatische Angiogenese weist einige Besonderheiten im Vergleich zu anderen Organen auf: Zum einen gibt es in der Leber zwei verschiedene Endothelarten (größere Gefäße mit durchgängigem Endothel und Basalmembran sowie Lebersinusoiden). Zum anderen gibt es HSC, welche, wie bereits beschrieben, als leberspezifische Perizyten von Endothelzellen rekrutiert werden, um mit diesen bei der vaskulären Umstrukturierung zu interagieren (Lee et al., 2007). Des Weiteren wurde herausgefunden, dass VEGF durch Bindung an VEGFR-1 die autokrine Proliferation von Hepatozyten induziert (Schoeffner et al., 2005; Taniguchi et al., 2001).

Neben dem beschriebenen „sprouting“-Prozess der Angiogenese ist die „intussusceptive“ Angiogenese (Gefäßteilung, -einstülpung) von Bedeutung, bei der es durch mikrovaskulären Umbau (und weniger durch endotheliale Proliferation) zur Bildung neuer Gefäße kommt. Es wird postuliert, dass auch dieser Prozess eine wichtige Rolle in der fibrotischen Leber spielt. Eine Studie von Chen et al. zeigte, dass es unter chronischer Hypoxie in der Leber zu einer Herabregulierung von VEGFR-2 kommt, was gegen die Angiogenese mittels „sprouting“ spricht (Chen et al., 2010).

Die Mechanismen der Angiogenese beim hepatozellulären Karzinom sind ähnlich denen der Leberregeneration: Es lässt sich ebenfalls eine erhöhte VEGF-Expression nachweisen, die zu vermehrter Kapillarisation der Endothelzellen führt (Park et al., 2000). Dabei

wird die durch Hypoxie stimulierte Hochregulierung von VEGF sowohl durch eine Aktivierung der Gen-Expression-, als auch durch eine vermehrte Stabilisierung der VEGF-„messenger“-Ribonukleinsäure (mRNA) ausgelöst (von Marschall et al., 2001).

### **1.3 Therapie der Leberfibrose**

Die Therapie der fortgeschrittenen Leberfibrose beschränkt sich momentan hauptsächlich auf die Therapie der mit ihr einhergehenden Komplikationen.

Fibrose ist bis zu einem gewissen Grad reversibel, wenn die schädliche Noxe ausbleibt (Iredale et al., 1998). Wird der schädigende Reiz, zum Beispiel Alkohol, entzogen, werden HSC durch Apoptose zerstört und die Produktion an Matrix-Molekülen somit gestoppt. Es kommt außerdem zu einer Aktivitätssteigerung der MMPs sowie einer Herabregulierung von TIMPs, wodurch der Abbau an überflüssiger extrazellulärer Matrix beschleunigt wird. Ist eine Elimination der Noxe nicht möglich, muss mithilfe von Medikamenten therapiert werden. Bislang gibt es keine Standardtherapie für die hepatische Fibrose und es wird bei der Behandlung der Patienten auf bereits für andere Krankheiten zugelassene Medikamente zurückgegriffen. Hier sind z. B. der PDGF $\beta$ -Rezeptor-Antagonist Imatinib, Immunsuppressiva wie Rapamycin, Antidiabetika aus der Gruppe der Glitazone, Renin-Angiotensin-Blocker sowie das Antiparasitikum und MMP-Aktivierer Halofuginone zu nennen (Popov und Schuppan, 2009).

Medikamente zur direkten Fibrosebehandlung sind bislang für die Therapie am Menschen nicht zugelassen, werden aber in Tierversuchen getestet: So zeigte der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Sunitinib bei Ratten eine Verbesserung von Fibrorestadium und Inflammation (Tugues et al., 2007). Auch die Blockierung des PDGF-Rezeptors inhibierte das Fortschreiten der hepatischen Fibrogenese im Rattenmodell (Beljaars et al., 2003).

Unter Therapie mit Sorafenib wurde eine deutliche Verminderung der Neovaskularisation und Inflammation und ein um 25 % reduzierter Portalvenendruck in zirrhotischen Ratten gemessen (Mejias et al., 2009). Die Therapie mit diesem Tyrosin-Kinase-Inhibitor ist allerdings durch ihre starken Nebenwirkungen (Varizenblutungen, u. a.) limitiert: 40 % der HCC-Patienten mussten die Therapie vorzeitig abbrechen (Llovet et al., 2008).

Bei allen genannten Therapieaussichten muss berücksichtigt werden, dass sie teilweise schwere Nebenwirkungen auf andere Organe haben können. Solange keine leber-

spezifischen Wirkstoffe gefunden sind, wird daher eine Kombinationstherapie von Medikamenten angeraten, die über verschiedene Mechanismen antifibrotisch wirken. Auf diese Weise können die einzelnen Dosierungen möglichst gering gehalten werden.

Die Therapie von hepatischen Tumoren wird durch eine zugrundeliegende Fibrose ebenfalls erschwert. Durch neue molekulare Therapiestrategien und das wachsende Wissen auf dem Gebiet der Fibrose, eröffnen sich jedoch neue vielversprechende Therapieansätze: Im Gegensatz zur systemischen Chemotherapie, die die Zellteilung und somit auch das Tumorwachstum blockiert, wird durch die Entwicklung von zielgerichteten Therapien ein ausgewähltes Signalmolekül blockiert. Durch das Eingreifen in die intrazelluläre Signalkaskade sollen Zellproliferation und Angiogenese spezifisch blockiert werden bei gleichzeitig geringeren Nebenwirkungen.

Ein Ansatz zur Therapie der Leberfibrose ist die Inaktivierung der hepatischen Sternzellen und die Blockierung der ECM-Synthese beziehungsweise deren beschleunigter Abbau. Eine Möglichkeit hierfür ist die Blockierung von TIMPs oder die Hochregulierung von MMPs (Hemmann et al., 2007; Roderfeld et al., 2006).

Auch die Inhibition von TGF- $\beta$  ist ein vielversprechender antifibrotischer Ansatz, da das Zytokin neben den bereits erläuterten Effekten die Fibrogenese auch durch eine vermehrte Expression von TIMP-1 fördert (Gressner et al., 2002).

Die Blockierung des VEGF-Rezeptors NRP-1 durch monoklonale Antikörper ist eine ebenfalls aussichtsreiche Therapieoption, da NRP-1 beim Regenerationsprozess der Leber hochreguliert wird. Das Protein fördert über VEGF, PDGF und TGF- $\beta$  sowohl Angiogenese als auch Fibrogenese (Bataller und Brenner, 2005; Cao et al., 2010). NRP-1 bildet dabei heterodimere Komplexe und begünstigt somit die Bindung von VEGF an seinen Rezeptor (Neufeld et al., 2002).

Die Hemmung von VEGF und die Blockierung der Angiogenese sind umstritten. Die Therapie mit Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper, der die Bindung von VEGF-A an die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 blockiert, führt zu erhöhter Apoptose- und reduzierter Proliferationsrate in Endothelzellen und hemmt somit die pathologische Angiogenese (Costa et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass eine durch diese anti-VEGF-Therapie inhibierte Tumorangiogenese die Tumorgröße im HCC-Mausmodell verringert (Raskopf et al., 2012). Es muss daher in Betracht gezogen werden, dass eine anti-VEGF-(Gen)therapie auch für die Behandlung der Leberfibrose von

Bedeutung sein kann. Die Tatsache, dass VEGF die Bildung von Fenestrae induziert und somit zur verbesserten Versorgung der Hepatozyten mit sinusoidalem Blut beiträgt, spricht hingegen für eine pro-VEGF-(Gen)therapie. Xu et al. zeigten in einer Studie die mögliche Therapieoption der hepatischen Fibrose durch Injektion von VEGF-kodierenden Plasmiden in die Portalvene von Ratten. VEGF induzierte dabei die Bildung neuer Fenestrae und erhöhte die Gefäßpermeabilität, wodurch der portale Venendruck gesenkt werden konnte (Xu et al., 2008).

Es wird deutlich, dass es zwar viele potentielle Ansätze, aber noch keine ausgereifte Therapieoption für die Behandlung der Leberfibrose gibt. Es bedarf daher noch umfangreicher Forschungsarbeit auf diesem Gebiet, um die molekularen Pathomechanismen der Fibrose besser zu verstehen und als therapeutische Angriffspunkte nutzen zu können.

#### **1.4 Leberfibrose-Modelle**

Die meisten Erkenntnisse über die Mechanismen der hepatischen Fibrose erlangten Wissenschaftler am Modell. Dabei unterscheidet man zwischen In-vivo- und In-vitro-Modellen.

##### **1.4.1 In-vivo-Leberfibrose-Modelle**

In-vivo-Modelle von Maus und Ratte haben den Vorteil, dass sie die komplexen Zusammenspiele aller intrahepatischen und extrahepatischen Zellen, Zell-Zell-Kommunikation, Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrix und andere Komponenten des komplexen Organismus wiedergeben. Vor allem bei der Testung von Medikamenten spielt die Beurteilung von Absorption, Distribution und Metabolismus im komplexen Organismus eine wichtige Rolle. Dennoch handelt es sich auch hierbei nur um ein Modell mit Unterschieden zum Milieu einer humanen Leber. So kommt es z. B. in der humanen, fibrotischen Leber sehr viel häufiger zu sekundär hypoxischen Ereignissen und einem damit einhergehenden Parenchymverlust als in den Tiermodellen (Wallace et al., 2008). Auch muss damit gerechnet werden, dass der humane Organismus anders auf die an Tiermodellen getesteten Substanzen reagiert.

### 1.4.2 In-vitro-Leberfibrose-Modelle

In-vitro-Modelle haben den Vorteil, schneller, kostengünstiger und reproduzierbarer erstellt werden zu können als Tiermodelle. Sie erlauben eine Aussage darüber, ob sich In-vivo-Untersuchungen überhaupt rentieren. In-vitro-Modelle bieten zudem die Möglichkeit einer konkreteren Analyse der intrazellulären, molekularen Pathogenese der Leberfibrose und des Metabolismus einzelner Zelltypen. Sie ermöglichen die Testung einer großen Anzahl an Substanzen und deren direkte Auswirkungen auf die Zellen. Allerdings sind sowohl das Fehlen von Wechselwirkungen mit anderen Zellen als auch die mechanischen Kraftverhältnisse in Kultur unphysiologisch (Wells, 2008). Es muss daher angenommen werden, dass grundlegende Eigenschaften der Zellen *in vitro*, wie Proliferations- und Differenzierungsstatus, nur eine geringe Aussage über die Eigenschaften der Zellen im komplexen Organismus erlauben.

Bisherige In-vitro-Fibrose-Modelle befassen sich hauptsächlich mit der Kultivierung von HSC. Diese können aus der Leber isoliert werden und differenzieren in Kultur zu aktivierten Myofibroblasten, was die Analyse der ECM im Modell vereinfacht. Ein weiteres In-vitro-Modell ist die Kultivierung von dünnen Leberscheiben, die durch die Dreidimensionalität der Zellkontakte einige Vorteile gegenüber einfachen Zellkulturen aufweisen. Da die Hepatozyten allerdings nach 24 h absterben, eignen sich die Modelle bislang nur für toxikologische Kurzzeitstudien (Wright und Paine, 1992). Erfahrungen mit etablierten In-vitro-Fibrose-Modellen anderer hepatischer Zelllinien liegen bisher kaum vor.

Zukünftige Modelle könnten eine Kokultivierung von Hepatozyten, HSC, Kupferzellen, Endothelzellen und Cholangiozyten darstellen, um eine möglichst physiologische Mikroumgebung zu erzeugen (Popov und Schuppan, 2009).

#### 1.4.2.1 Schädigung durch Thioacetamid und Ethanol

Zur Simulation und Induktion der Fibrose *in vitro* können verschiedene Toxine eingesetzt werden.

Das Hepatotoxin Thioacetamid (TAA) induziert panlobuläre, parenchymatöse Fibrose, wie sie bei den meisten Patienten mit chronischer Lebererkrankung vorliegt (Popov und Schuppan, 2009). TAA führt zu einer Defenestrierung der LSEC und zur Ausbildung einer Basalmembran (Xu et al., 2008).

Der Konsum von Alkohol ist eine der Hauptursachen für Leberfibrose und -zirrhose und letztere eine der häufigsten Todesursachen in den Industrienationen (Tilg und Day, 2007). Ethanol kann die Leber auf viele verschiedene Arten schädigen. Die Fibrosierung entsteht dabei zunächst perizentral und perisinusoidal. Ein Mechanismus der Schädigung ist unter anderem die durch Ethanol induzierte erhöhte Permeabilität der Darmmukosa des oberen GI-Traktes. Die dadurch bedingt vermehrt im Blut vorhandenen bakteriellen Endotoxine werden über die Portalvene direkt in die Leber geschwemmt, wo sie durch die Immunantwort der Kupfferzellen zu einer Inflammation des Organs führen (Bode, C. und Bode, J.C., 2005). Ein weiterer Mechanismus der Alkohol-induzierten Leberschädigung kommt durch den Ethanol-Metaboliten Acetaldehyd zustande, der einen aktivierenden Einfluss auf HSC hat. Acetaldehyd wirkt profibrotisch und karzinogen (Setshedi et al., 2010). Sarphie et al. zeigten, dass es in murinen sinusoidalen Endothelzellen unter Alkoholeinfluss zu einer Schädigung kommt, bevor die umliegenden Hepatozyten betroffen sind. Ethanol zerstört die physiologische Fenestrae-Anordnung und trägt damit zur Fibroseinduktion bei (Sarphie et al., 1997). Es wird weitergehend angenommen, dass Ethanol durch Zerstörung der endothelialen Integration im Gewebe eine Migration von Tumorzellen erleichtert und so den Metastasierungsprozess begünstigt (Xu et al., 2012). Die beiden Toxine TAA und Ethanol können kombiniert werden, um eine vermehrte Fibrosierung der Leber zu erreichen (Kornek et al., 2006). In Analogie zum In-vivo-Fibrose-Modell (Kornek et al., 2006) wird in der vorliegenden Arbeit ein In-vitro-Modell getestet.

## **1.5 Ziel dieser Arbeit**

Die steigende Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms und die mangelnden Therapiemöglichkeiten für HCC und Leberfibrose zeigen den noch sehr großen Forschungsbedarf auf diesem Gebiet. Die meisten Experimente zur HCC-Therapieentwicklung wurden auf der Basis gesunder Leberzellen durchgeführt. Therapiewirkung und -nebenwirkung von Medikamenten stellen sich in einer fibrotischen Leber aufgrund veränderter Zellmetabolismen jedoch anders dar als im gesunden Gewebe. Da die Mehrheit der Tumore in geschädigtem Lebergewebe entsteht, soll in dieser Arbeit der Einfluss der Fibrose auf Karzinogenese und Angiogenese weiter untersucht werden, um ein realistisches Bild der molekularen Pathogenese des hepatischen Malignoms zu erlangen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein In-vitro-Leberfibrose-Modell zu entwickeln. Anhand dessen sollen Endothel- und Hepatomzellen auf veränderte Aktivitätsniveaus von ausgewählten Signalmolekülen sowie auf funktionelle Eigenschaften während der Fibroseentwicklung getestet werden. Die Fibrogenese soll durch die Behandlung der Zellen mit den Toxinen TAA und Ethanol induziert werden.

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollen dann den Grundstein legen, um neue, molekulare Therapiestrategien zur Behandlung der Leberfibrose und des HCC zu entwickeln.

## 2. Material

### 2.1 Geräte

Autoklav	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Begasungsinubator	Hereaus Sepatech (Osterode)
ELISA-Fluoreszenz-Reader	GloMax Multi, Promega (Mannheim)
ELISA-Reader	Dynatech Laboratories (Frankfurt)
Fluoreszenzmikroskop	Apotome Zeiss (Jena)
Gefrierschrank	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe)
Kühlzentrifuge	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Mikroskop, DM IL	Leica (Wetzlar)
Mikrowellengerät	Panasonic (Hamburg)
Minishaker	IKA, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pipetten	Gilson (Bad Camberg)
Pipettierhilfe, Accu-Jet	Baacklab (Schwerin)
Sicherheitswerkbank	Hereaus Sepatech (Osterode)
Tiefkühlschrank, Colora E80	Colora Messtechnik GmbH (Lorch)
Tischzentrifuge	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Ultrazentrifuge	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
UV-Tisch	Berthold (Pforzheim)
Wasserbad	Köttermann (Uetze-Hänningen)

### 2.2 Sonstiges Material

Deckgläser (18 x 18 mm)	Menzel Gläser (Braunschweig)
ELISA-Platten	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Glaswaren (Kolben, Pipetten, Standzylinder, Reagenzgläser usw)	Schott (Mitterteich)
Latex-Handschuhe	Ansell (Brüssel, Belgien)
Mikrotiterplatten schwarz	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)

Mikrotiterplatten transparent	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Neubauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
Objektträger	Engelbrecht (Edermünde)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
6-, 12-, 96-Well-Zellkulturplatten	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (25 mm <sup>2</sup> , 75 mm <sup>2</sup> , 175 mm <sup>2</sup> )	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturplatten (Ø 100 mm, 145 mm)	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)

### 2.3 Kits

BrdU-Proliferation-Assay (colorimetric)	Roche (Mannheim)
Cell Death Detection-Assay	Roche (Mannheim)
CytoTox-ONE	Promega (Madison, WI, USA)
Apo-ONE Homogenous	Promega (Madison, WI, USA)
Caspase-3/7-Assay	
Bio-Rad DC Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Total HIF-1α ELISA DuoSet IC	R&D Systems (Wiesbaden)
Phospho-JNK ELISA DuoSet IC	R&D Systems (Wiesbaden)
Phospho-ERK1 (T202/Y204)/ ERK2 (T185/Y187) ELISA DuoSet IC	R&D Systems (Wiesbaden)
Phospho-AKT ELISA DuoSet IC	R&D Systems (Wiesbaden)
Mouse VEGF ELISA DuoSet IC	R&D Systems (Wiesbaden)

Mouse VCAM-1/CD106 ELISA DuoSet IC	R&D Systems (Wiesbaden)
Mouse ICAM-1/CD54 ELISA DuoSet IC	R&D Systems (Wiesbaden)
Total P38 $\alpha$ ELISA DuoSet IC	R&D Systems (Wiesbaden)

## 2.4 Zelllinien

### 2.4.1 Hepa129

Die murine Zelllinie Hepa129 stammt aus einem HCC-Tumorfragment, welches aus einer C3H-Maus isoliert wurde. Das Tumorfragment wurden vom *NCI-Frederick Cancer Research and Development Center*, USA bezogen und die Hepatomzellen wurden isoliert. Es handelt sich um Suspensionszellen, die in RPMI1640 mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert werden.

### 2.4.2 SVEC4-10

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine durch den Virus SV40 (strain 4A) stabil transformierte endotheliale, murine Zelllinie. Die Zellen stammen aus Gefäßen der axillären Lymphknoten der Maus. SVEC4-10-Zellen wachsen adhärent, werden in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst.

## 2.5 Reagenzien für die Zellbiologie

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (mit 4,5 g Glucose, L-Glutamin)	PAA Laboratories (Cölbe)
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (mit L-Glutamin)	PAA Laboratories (Cölbe)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories (Cölbe)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep: Penicillin (100 IE/ml), Streptomycin (100 $\mu$ g/ml))	Sigma (Taufkirchen)

Trypsin-EDTA Lösung (0,5 g/l Trypsin (1:250) und 0,2 g/l Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma (Taufkirchen)
Trypanblau (0,4 %)	Sigma (Taufkirchen)
Matrigel	Gibco/BRL (Karlsruhe)
rekombinantes murines VEGF	Sigma (Taufkirchen)

## 2.6 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	20,0 mM
NaCl .....	50,0 mM
pH 7,4	

## 2.7 Lösungen für die In-vitro-Experimente

Agarose Typ VII, 1,5 %	Serva (Heidelberg)
Dimethylsulfoxide (DMSO)	AppliChem (Darmstadt)
Proteaseinhibitor, complete	Roche Diagnostics (Mannheim)
1 Tablette in PBS .....	50 ml
BSA- Stock (Rinder-Serumalbumin)	
BSA .....	0,6 g
In Puffer .....	10 ml
(entsprechend ELISA-Herstellerangaben)	

## Lysepuffer #6

EDTA.....	1 mM
Triton X-100.....	0,5 %
NaF.....	5 mM
Urea.....	6 M
Aktiviertes Natrium Orthovanadate .....	1 mM
Natrium Pyrophosphate .....	2,5 mM
Leupeptin.....	10 µg/ml
Pepstatin .....	10 µg/ml
PMSF .....	100 µM
Aprotinin in PBS .....	3 µg/ml

## Lysepuffer #11

Tris (pH 7,4) .....	50 mM
NaCl .....	300 mM
Glycerol .....	10 %
EDTA.....	3 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	1 mM
β- Glycerophosphate .....	20 mM
NaF.....	25 mM
Triton X-100.....	1 %
Leupeptin.....	25 µg/ml
Pepstatin .....	25 µg/ml
Aprotinin .....	3 µg/ml

## IC Diluent #3

EDTA.....	1 mM
Triton X-100.....	0,5 %
NaF.....	5 mM
Urea in PBS.....	1 M

## Waschpuffer

Tween 20..... 0,05 %

In PBS

## Reagent Diluent

BSA..... 5 %

In Waschpuffer

## Blockpuffer

BSA in PBS ..... 1 %

NaN<sub>3</sub>..... 0,05 %

## Substrat Lösung

1:1 Gemisch aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Tetramethylbenzidine

## Stopp Lösung

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>..... 1 M

In A. bidest

## Brefeldin A Stammlösung

Brefeldin A..... 10 mM

In Methanol

### **3. Methodik**

#### **3.1 Zellkultur**

##### **3.1.1 Allgemeine Zellkultur**

Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Hepa129-Zellen wurden in 175 mm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in 120 ml RPMI1640 (+10 % FCS, + 1 % Penicillin/Streptomycin) kultiviert und das Wachstum der Zellen täglich unter dem Durchlichtmikroskop kontrolliert. Bei hoher Zelldichte oder azidem Medium (gelbliche Verfärbung) wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 (1 Teil Zellen, 10 Teile Medium) gesplittet. Hierzu wurde Zellsuspension abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

SVEC4-10-Zellen wurden auf 145 mm<sup>2</sup>-Zellkulturplatten in 30 ml DMEM (+10 % FCS, + 1 % Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70 – 100 % wurden die Zellen gesplittet, indem zunächst vorsichtig mit 12 ml PBS gewaschen wurde um eine Inhibierung von Trypsin durch FCS zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, vereinzelt, in frischem Medium aufgenommen und auf neue Platten ausgesät. Die Zellen wurden in der Regel zwei- bis dreimal pro Woche umgesetzt.

##### **3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl nach Neubauer**

Um für nachfolgende Versuche eine Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten, musste jede Gruppe eine gleiche Anzahl lebender Zellen beinhalten. Dazu musste zunächst die Lebendzellzahl einer Zellsuspension ermittelt werden: Die Zellen wurden hierfür mit Trypanblau angefärbt. Trypanblau färbt tote Zellen dunkelblau, indem es durch defekte Zellmembranen dringt und im Zytosol an Zellproteine bindet. Lebende Zellen nehmen keinen Farbstoff auf und erscheinen hellblau. Anschließend konnte die Lebendzellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt werden: Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau (0,2 %) gemischt, an den Rand der Zählkammer pipettiert und durch Kapillarkräfte in den Hohlraum zwischen Deckglas und Objektträger gesogen. Das Zählgitter (A-Feld) besteht aus vier Quadranten (B-Felder) zu je sechzehn C-Feldern (à 0,1 mm), in welchen die vitalen, hellblauen Zellen unter dem Mikroskop

(40x Vergrößerung) ausgezählt wurden. Die Zellzahl pro ml Ausgangssuspension ergab sich aus dem arithmetischen Mittel der vier B-Felder, multipliziert mit zwei (resultierend aus der 1:1 Verdünnung mit Trypanblau) und  $10^4$  (Konstante der Zählkammer):

(ausgezählte Zellzahl)/  $4 \times 2 \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$

## **3.2 Untersuchung der Zellviabilität**

### **3.2.1 MTT-Test**

Zunächst sollte mit diesem Test der allgemeine Effekt der Behandlung mit TAA und Ethanol auf die Zellviabilität untersucht werden. Dabei korreliert die Viabilität der Zellen in etwa mit deren Metabolismus. Der Test beruht auf dem Prinzip der NADH/NADPH-abhängigen Reduktion des Tetrazoliumsalses MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) zum violetten Farbstoff Formazan durch stoffwechselaktive Zellen. Die Messung der optischen Dichten dieser Farbkomplexe lässt Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der untersuchten Zellpopulation zu. Es wurden dafür am Vortag  $1 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen pro Well- und am Versuchstag  $1,5 \times 10^4$  Hepa129-Zellen pro Well in je 200  $\mu\text{l}$  Medium in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät.

Das Zellkultur-Medium (Mediumswechsel für die adhärennten Zellen) wurde wie folgt ergänzt und auf die Zellen gegeben:

4 Proben mit unbehandeltem Medium als Negativkontrolle

4 Proben mit 2,5 mg/ml TAA (Thioacetamid)

4 Proben mit 50 mmol Ethanol

4 Proben mit 2,5 mg/ml TAA und 50 mmol Ethanol

Die Zellen wurden anschließend für 48 h bei 37 °C inkubiert.

Um Effekte von TAA und Ethanol auf die Zellviabilität im Zeitverlauf beurteilen zu können, wurde alle 24 h ein MTT-Test durchgeführt. Hierfür wurden die Suspensionszellen (Hepa129) zunächst für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände beider Zelllinien abgesaugt und die Wells mit je 100  $\mu\text{l}$  MTT befüllt. Es wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspensionszellen wurden abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Zellen anschließend in 100  $\mu\text{l}$ /Well DMSO (Dimethylsulfoxid) re-suspendiert. Damit wurde die Reaktion abgestoppt und die Farbkristalle lösten sich aus den Zellen heraus. Die verbleibenden Zelltrümmer wurden 5 min bei 300 g abzentrifugiert

und die Überstände in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Es wurden 100 µl DMSO zur Leerwertbestimmung in ein freies Well pipettiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 550 nm im ELISA-Reader. DMSO besitzt eine eigene optische Dichte und wurde als Blank von den Messwerten abgezogen.

Der Versuch wurde an Tag 1 und Tag 2 mit beiden Zelllinien wiederholt, sodass die Einflüsse der Noxen auf die Zellviabilität im Verlauf miteinander verglichen werden konnten.

### **3.2.2 BrdU-Proliferations-Assay**

Das BrdU-Proliferations-Assay sollte Aufschluss über die Auswirkungen der Behandlung mit TAA und Ethanol auf die Proliferationsraten der Hepatom- und Endothelzellen geben. BrdU ist ein Thymidin-Analogon und wird bei diesem Assay während der Replikation in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Ein Farbstoff wird anschließend über Antikörperbindung an BrdU gekoppelt. Durch die Absorptionsmessung des Farbstoffes lassen sich Rückschlüsse auf die Proliferationsrate der Zellen machen.

Dazu wurden  $1 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen und am Folgetag  $1,5 \times 10^4$  Hepa129-Zellen in eine 96-Well-Platte ausgesät. Dem Medium wurde in Vierfachbestimmung wie in 3.2.1 beschrieben TAA (2,5 mg/ml) und Ethanol (50 mmol) zugesetzt und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden am folgenden Tag mit 20 µl/Well BrdU Markierungslösung entsprechend den Herstellerangaben versetzt und ü. N. inkubiert.

Achtundvierzig Stunden nach Zugabe von TAA und Ethanol wurde der Überstand entfernt: Dafür wurden die Suspensionszellen (Hepa129) zunächst 10 min bei 300 g abzentrifugiert. Das Medium der adhären Zellen (SVEC4-10) wurde ohne Zentrifugation vollständig abgesaugt. Die Zellen wurden für 15 min bei RT getrocknet. Um die Zellen zu fixieren, wurden anschließend 200 µl/Well Fix Denat hinzu pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Nach Absaugen der Lösung wurden nun 100 µl/Well Anti-BrdU-POD Arbeitslösung zu den Zellen pipettiert und 90 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 200 µl/Well PBS gewaschen. Damit die Immunkomplexe detektiert werden konnten, wurden nun 100 µl/Well Substratlösung hinzu pipettiert und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl/Well H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) abgestoppt und im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Auswertung erfolgte durch Bildung der Mittelwerte der jeweils 4 gemessenen Werte

pro Gruppe und der Umrechnung der optischen Dichten in prozentuale Anteile im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (100 %).

### 3.2.3 Cell Death Detection-Assay

Die Auswirkungen der Behandlung mit TAA und Ethanol auf die Apoptose- sowie die Nekroseraten der Hepatom- und Endothelzellen wurden anhand eines Cell Death Detection-Assays untersucht. Bei diesem Test handelt es sich um einen quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay, der auf der Bindung muriner monoklonaler Antikörper (AK) an die Histon-Komponente von Mono- und Oligonukleosomen beruht. Diese entstehen bei der Spaltung von DNA-Doppelsträngen durch Endonukleasen beim programmierten Zelltod und sind im Zytoplasma lokalisiert. Eine Lyse der apoptotischen Zellen war notwendig, um die Histon-Komponente im ELISA-Assay zu detektieren. Nekrotische Zellen hingegen sind durch eine zerstörte Zellmembran gekennzeichnet, Mono- und Oligonukleosomen gelangen frei in das umgebende Medium und es konnte daher auf eine vorherige Lyse der Zellen verzichtet werden. Der Test wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt:

Es wurden zunächst SVEC4-10-Zellen zu  $1 \times 10^4$  Zellen/Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden Hepa129-Zellen zu  $1,5 \times 10^4$  Zellen/Well ausgesät und beide Zelllinien mit frischem, wie in 3.2.1 mit TAA und Ethanol ergänztem Medium in Vierfachbestimmung versehen. Die Zellen wurden für 48 h im Inkubator kultiviert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Zur Analyse der Nekrose wurden nun jeweils 20 µl des Überstandes in die Streptavidin-beschichteten Wells pipettiert und mit 80 µl Immunoreagenz ergänzt. Der Ansatz wurde nun lichtgeschützt bei RT für 2,5 h auf einem Schüttler bei 300 rpm inkubiert.

Zur Analyse der Apoptoserate wurden die Zellen lysiert. Hierzu wurde das verbliebene Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen in je 200 µl Lysepuffer pro Well resuspendiert. Die Zellen wurden für 30 min bei RT inkubiert und anschließend erneut für 10 min bei 200 g abzentrifugiert. Es wurden je 20 µl des Überstandes in die Streptavidin-beschichteten Wells überführt und mit je 80 µl Immunoreagenz aufgefüllt. Der Ansatz wurde nun lichtgeschützt für 2 h bei RT und 300 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

Anschließend wurde dreimal mit je 250 µl Inkubationspuffer gewaschen und es wurden 100 µl/Well ABTS-Lösung (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)) in die Wells pipettiert. Die Platte wurde bis zur Phosphatase-vermittelten Farbentwicklung vorsichtig geschüttelt und die Reaktion nach 10 min mit 100 µl/Well ABTS-Stopp-Lösung abgestoppt. Die Absorption wurde im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen.

Zur Auswertung wurde der Mittelwert der pro Gruppe in Vierfachbestimmung gemessenen optischen Dichten gebildet. Anschließend erfolgte die Umrechnung der Mittelwerte in prozentuale Anteile im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (100 %).

### **3.2.4 CytoTox-Homogeneous Membrane Integrity-Assay**

Mit diesem Assay wurde die Anzahl der toten Zellen anhand photometrischer Bestimmung von Resorufin ermittelt. Dies beruht auf der Freisetzung von LDH durch zerstörte Zellmembranen in das umliegende Kulturmedium und der durch LDH getriggerten Umwandlung von Resazurin in Resorufin. Das Assay diente der Bestimmung der Zytotoxizität von TAA und Ethanol und sollte weitere Erkenntnisse über die Auswirkungen der Behandlung von Hepatom- und Endothelzellen mit den Noxen liefern.

Für den Versuch wurden zunächst  $2,5 \times 10^3$  SVEC4-10-Zellen/Well in eine sterile, schwarze 96-Well-Platte ausgesät ( $n = 20$ ) und für zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Am Versuchstag wurden  $5 \times 10^3$  Hepa129-Zellen/Well auf die gleiche Platte gesät und zu beiden Zelllinien je 50 µl Medium (DMEM für SVEC4-10, RPMI1640 für Hepa129) gegeben. Das Medium wurde dabei wie in 3.2.1 beschrieben ergänzt. Es wurden außerdem jeweils 4 Proben mit 50 µl Medium mit 1 µl Lysepuffer versetzt (als Positivkontrolle der maximalen LDH-Freisetzung). Jeweils weitere 4 Wells wurden zur Messung der Autofluoreszenz des Mediums als Leerwert mit RPMI1640 und DMEM befüllt. Die Zellen wurden für 48 h bei 37 °C im Begasungsininkubator kultiviert.

Zur Durchführung des Versuchs wurde die 96-Well-Platte zunächst lichtgeschützt für 20 min auf RT gebracht. Anschließend wurden 50 µl CytoTox-ONE Reagenz pro Well hinzu pipettiert und für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 25 µl/Well Stopplösung abgestoppt und die Fluoreszenz im Fluoreszenz-ELISA-Reader bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm gemessen. Der Mittelwert der Absorption der Medium-Kontrollen wurde als Blank abgezogen.

### 3.2.5 ApoONE Homogenous Caspase-3/7-Assay

Das ApoONE Homogenous Caspase-3/7-Assay sollte zusätzliche Erkenntnisse über den Einfluss von TAA und Ethanol auf die Apoptosrate von Hepatom- und Endothelzellen liefern. Dabei diene der Test der Aktivitätsmessung der Caspasen-3 und -7, welche als proteolytische Enzyme eine entscheidende Rolle bei der Apoptoseinduktion spielen. Durch die Umwandlung des Substrates Z-DEVD-R110 durch die Caspasen-3/-7 zu Rhodamin 110 und dessen photometrische Fluoreszenzmessung, konnte die Aktivität der Proteasen bestimmt werden.

Hierzu wurden  $2,5 \times 10^3$  SVEC4-10-Zellen/Well für 48 h bei 37 °C auf einer schwarzen, sterilen 96-Well-Mikrotiterplatte kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit 50 µl/Well frischen Mediums versehen, welches in Vierfachbestimmung wie in 3.2.1 mit TAA und Ethanol versetzt wurde. Des Weiteren wurden 4 Proben mit je 2,5 µM BFA als Positivkontrolle ergänzt und 4 Wells zur Messung der Autofluoreszenz als Leerwert mit DMEM befüllt.

Es wurden Hepa129-Zellen zu je  $5 \times 10^3$  Zellen pro Well ( $n = 20$ ) auf die gleiche Platte in je 50 µl Medium ausgesät. In Vierfachbestimmung wurden ebenfalls TAA und Ethanol (wie in 3.2.1), 2,5 µM BFA und RPMI1640 als Leerwert hinzu pipettiert.

Nach 48 Stunden Inkubationszeit im Inkubator bei 37 °C wurden je 50 µl Apo-ONE-Reagenz in die Wells gegeben und die Mikrotiterplatte wurde anschließend für 4 h bei 400 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit dem Fluoreszenz-ELISA-Reader bei einer Exzitationswellenlänge von 499 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm. Der Leerwert wurde im Anschluss von den Messwerten subtrahiert.

## 3.3 Untersuchung der Funktionalität *in vitro*

Anhand der folgenden Versuche wurden die Auswirkungen von TAA und Ethanol auf die Funktionalität der Hepa129-, und SVEC4-10-Zellen getestet.

### 3.3.1 Migrations-Assay

Dieses Assay diene der Untersuchung der Migrationsfähigkeit von Endothelzellen, einer entscheidenden Eigenschaft im Prozess der Angiogenese. Es wurde getestet, inwiefern TAA und Ethanol die Fähigkeit der adhärennten SVEC4-10-Zellen zur Migration

beeinflussen.

Hierzu wurden  $5 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen/Well in eine 12-Well-Platte in Dreifachbestimmung in 800  $\mu$ l Medium/Well ausgesät, ü. N. bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und am Folgetag durch 800  $\mu$ l/Well frisches, mit Toxinen ergänztes Medium (3.2.1) ersetzt. Nun wurde mit einer Pipettenspitze vorsichtig eine Wunde in den Zellrasen gekratzt und die Spaltbreite daraufhin im Durchlichtmikroskop gemessen. Die Fotodokumentation erfolgte mittels einer PC-gesteuerten Videokamera mit angeschlossener Bildverarbeitungssoftware (Axiovision). Die Zellen wurden anschließend weiter kultiviert und die Messung der Spaltbreite an den Tagen 1 und 2 wiederholt. Es wurde jeder Spalt fotografiert und vermessen. Dabei wurden je 4 Messwerte/Gesichtsfeld ( $n = 12$ ) erhoben und ausgewertet.

### **3.3.2 Matrigel-Tube Formation-Assay**

Mit dem sogenannten „tube-formation-Assay“ wurde die Auswirkung von Ethanol und TAA auf die Fähigkeit der Endothelzellen, gefäßähnliche Strukturen auszubilden, untersucht. Dafür wurden zunächst SVEC4-10-Zellen für 48 h bei 37 °C mit 2,5 mg/ml TAA und 50 mmol Ethanol inkubiert. Am Versuchstag wurden 300  $\mu$ l/Well Matrigel (mit 10 ng/ml VEGF versetzt) in eine 24-Well-Platte gegeben und zur Polymerisation für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden  $2,5 \times 10^4$  der präinkubierten SVEC4-10-Zellen in 250  $\mu$ l Medium pro Well auf die mit Matrigel beschichtete Platte pipettiert und in Dreifachbestimmung mit Toxinen ergänzt (3.2.1). Nach einer Inkubationszeit von 5 h bei 37 °C wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 250  $\mu$ l/Well Glutaraldehyd (0,05 % in PBS) fixiert. Im Durchlichtmikroskop wurden die ringförmigen, vollständig geschlossenen Strukturen („tubes“) in 5 Gesichtsfeldern/Probe ( $n = 15$ ) ausgezählt. Die Wirkung der zugesetzten Toxine wurde durch die Anzahl der gebildeten interzellulären Verbindungen der Endothelzellen bewertet.

### **3.3.3 In-vitro-Tumor-Assay**

Dieses In-vitro-Tumor-Assay diente der Ermittlung der zellulären, klonalen Expansion unter dem Einfluss von TAA und Ethanol. Die eingesetzten Hepatomzellen (Hepa129) sind in der Lage substratunabhängig zu wachsen und im Soft-Agar dreidimensionale,

klonale Kolonien zu bilden. Hiermit wurden Tumorwachstum und Metastasierungspotential der Zellen untersucht.

Es wurde zunächst eine 6-Well-Platte mit einem Unterboden aus 0,75 ml Agarose Typ VII (2,4 % in PBS, in einem Mikrowellengerät verflüssigt) und 2,25 ml RPMI1640 (+ 10 % FCS, + 1 % Pen/Strep) pro Well beschichtet und zur Aushärtung für 20 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurde ein Gemisch aus 300 µl Agarose Typ VII (2,4 % in PBS) und 1,7 ml Zellsuspension ( $1 \times 10^3$  Hepa129-Zellen, Zugabe von Ethanol und TAA zum Nährmedium (3.2.1)) in jedes Well pipettiert und zur Aushärtung erneut für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in den Inkubator überführt und für 11 Tage bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Bildung klonaler Kolonien im Durchlichtmikroskop bestimmt. Mithilfe einer PC-gesteuerten Videokamera mit angeschlossener Bildverarbeitungssoftware (Axiovision) wurden die detektierten Zellkolonien fotografiert und deren Durchmesser vermessen. Die Größe der Zellkolonien gab Aufschluss über die karzinogene Wirkung von Ethanol und TAA auf Hepa129-Zellen.

### **3.3.4 Zelladhäsions-Assay**

Um eine weitere Aussage über das Metastasierungspotential der Tumorzellen unter Einfluss von TAA und Ethanol treffen zu können, wurde die Fähigkeit der Hepa129-Zellen untersucht, an SVEC4-10-Zellen zu adhären. Hierzu wurden die beiden Zelllinien kokultiviert. Damit die Zellen in Kultur unter dem Mikroskop voneinander unterschieden werden konnten, wurden die Suspensionszellen (Hepa129-Zellen) mit einem grünen Fluoreszenzmarker (CellTracker Probes von Invitrogen) gefärbt.

Zuerst wurden am Vortag SVEC4-10-Zellen zu  $5 \times 10^4$  Zellen/Well in eine 12-Well-Zellkulturplatte ausgesät und am Folgetag mit 600 µl/Well frischem, wie in 3.2.1 bearbeiteten Medium versehen. Hepa129-Zellen wurden zu  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 1,5 ml Medium/Well in eine 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und wie in 3.2.1 mit 2,5 mg/ml TAA und 50 mmol Ethanol ergänzt. Nach der Inkubationsphase von 2 Tagen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit wurden die Hepa129-Zellen nun für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und durch 1 ml/Well eines Gemisches (Verhältnis 1:10) aus Cell Tracker GREEN (5-Chloromethylfluorescein Diacetat, 2,5 µM) und Medium (RPMI1640 ohne Zusatz von FCS und Pen/Strep) ersetzt. Die Zellen wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, in denen der Farbstoff von den Zellen aufgenommen- und

durch die intrazelluläre Glutathion-S-Transferase aktiviert wurde. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und bei beiden Zelllinien durch frisches, wie in 3.2.1 bearbeitetes Medium (RPMI1640 + 10 % FCS, + 1 % Pen/Strep für Hepa129-Zellen und DMEM + 10 % FCS, + 1 % Pen/Strep für SVEC4-10-Zellen) ausgetauscht. Die Hepa129-Zellen wurden resuspendiert und mithilfe der Neubauer Zählkammer gezählt (3.1.2). Es wurden je  $1 \times 10^5$  Suspensionszellen (Hepa129-Zellen) zu den korrespondierenden SVEC4-10-Zellen pipettiert und die Kokultur anschließend für 5 h im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml PBS pro Well vorsichtig gewaschen, mit 600 µl/Well Formalin (3,7 %) fixiert, 15 min inkubiert, und abschließend mit 600 µl/Well PBS versehen. Die Zahl der an die Endothelzellen adhärenen Tumorzellen wurde im Durchlichtmikroskop bestimmt ( $n = 5$ ). Dazu wurden sowohl Auflicht-, als auch Fluoreszenzaufnahmen angefertigt und miteinander fusioniert, um die Anheftung der fluoreszierenden Hepa129-Zellen an die SVEC4-10-Zellen zu detektieren.

### **3.4 Untersuchung profibrotischer Faktoren**

Mittels spezifischer ELISA wurden die Auswirkungen von TAA und Ethanol auf profibrotische Faktoren untersucht. Dabei sollte zum einen getestet werden, ob die Behandlung mit den Noxen zu einer Veränderung der den Zellzyklus regulierenden Faktoren führte. Dazu wurden Assays zur Quantifizierung der Phosphorylierung von AKT, JNK, ERK1/ERK2 und P38 MAPK durchgeführt. Zum anderen sollten Erkenntnisse über die Auswirkung der Behandlung auf Hypoxie-induzierte Faktoren gewonnen werden. Zur Bestimmung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$ , sowie der Konzentration an intrazellulärem- und sezerniertem VEGF, wurden zu diesem Zweck ebenfalls spezifische ELISA angewandt. Des Weiteren wurde mittels ELISA untersucht, ob eine veränderte Konzentration der Zelladhäsionsmoleküle ICAM und VCAM nach Schädigung der Hepatom- und Endothelzellen verzeichnet werden konnte. Dies sollte weitere Erkenntnisse u. a. über das Metastasierungspotential der Tumorzellen liefern.

#### **3.4.1 Aussäen von Zellen**

Für alle nachfolgenden ELISA wurden im Voraus 100 mm- Zellkulturplatten zu je  $1 \times 10^6$  Zellen (Hepa129-, und SVEC4-10-Zellen) ausgesät und in Vierfachbestimmung mit Zell-

kultur-Medium als Kontrolle sowie mit TAA und Ethanol versehen (3.2.1). Nach der Inkubationsphase von 48 h bei 37 °C wurden die Zellen geerntet und in 15 ml-RGs überführt. Die adhärennten SVEC4-10-Zellen wurden hierfür zunächst wie vorbeschrieben trypsinisiert. Die Zellen beider Zellreihen wurden anschließend für 5 min bei 200 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in jeweils 700 µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in 1,5 ml-RGs überführt und bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

### 3.4.2 Proteinisolierung durch chemische Lyse

Um in einem nächsten Schritt die Konzentration von Proteinen bestimmen zu können, mussten diese zunächst aus den Zellen isoliert und von anderen Zellbestandteilen separiert werden. Hierzu wurden die Zellpellets in je 100 µl Lysepuffer resuspendiert. Die Auswahl des Puffers erfolgte entsprechend den Herstellerangaben der durchgeführten ELISAs:

**Tab. 2:** Lysepuffer für ELISA- Assays

pAKT, pJNK, pERK1/2, pP38 MAPK	Lysepuffer #6
HIF-1α	Lysepuffer #11

Die Proben wurden für 1 min mithilfe eines Schüttelgerätes durchmischt und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Das Zelllysat wurde nun für 7 min bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert und in neue 1,5 ml-RGs auf Eis überführt. Die Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C asserviert.

### 3.4.3 Proteinisolierung mithilfe der „freeze-thaw“-Methode

Die mechanische Lyse der Zellen erfolgte in mehreren Einfrier- und Auftau-Schritten und wurde für die Proteinisolierung der VEGF-, ICAM- und VCAM-ELISA angewandt.

Zu den Zellpellets wurden hierfür zunächst je 100 µl PBS versetzt mit Proteaseinhibitor (complete, Roche Diagnostics) pipettiert. Die Proben wurden anschließend dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter ständigem Schütteln bei 37 °C aufgetaut.

Danach wurden die Proben für 5 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in neue 1,5 ml-RGs überführt. Die Proben konnten nun für die Proteinbestimmung eingesetzt oder bei – 20 °C gelagert werden.

#### 3.4.4 Proteinbestimmung

Um für alle Proben im nachfolgenden ELISA die gleiche Ausgangsmenge Protein einsetzen zu können, musste zunächst der Proteingehalt der vorhandenen Proben bestimmt werden. Es wurde zunächst eine Standardreihe mit BSA nach folgendem Schema angefertigt:

**Tab. 3:** Pipettierschema für die Proteinbestimmung: Verdünnungsreihe mit entsprechenden BSA- Konzentrationen. BSA wurde in zu den ELISA korrespondierenden Puffern gelöst.

Verdünnungsstufe	Konzentration BSA	Stock (0,6 g BSA in 10 ml Puffer gelöst)	Puffer (s.o.: #6/#11/PBS + complete)
1	6 g/l	10 µl Stock	90 µl
2	3 g/l	50 µl (aus 1)	50 µl
3	1,2 g/l	50 µl (aus 2)	75 µl
4	0,8 g/l	60 µl (aus 3)	30 µl
5	0,6 g/l	45 µl (aus 4)	15 µl
6	0,3 g/l	30 µl (aus 5)	30 µl
7	0,15 g/l	30 µl (aus 6)	30 µl
8	0 g/l	0 µl	100 µl

Nun wurden 5 µl der Verdünnungsreihe und je 5 µl Zelllysate/Probe in die Vertiefungen der 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Es wurden 25 µl eines Reagenziengemischs (Reagenz A + Reagenz S im Verhältnis 50:1, entsprechend den Herstellerangaben) in alle Wells pipettiert und mit je 200 µl Reagenz B ergänzt.

Bei der Verwendung von PBS als Puffer (VEGF-ELISA Zelllysate, VCAM-, ICAM-ELISA) wurde kein Reagenz S hinzu pipettiert, es wurden ausschließlich 25 µl Reagenz A und

200 µl Reagenz B eingesetzt.

Die Mikrotiter-Platte wurde anschließend lichtgeschützt für 15 min inkubiert. Die Extinktionsbestimmung erfolgte im ELISA-Reader bei 700 nm und der Proteingehalt wurde anhand der aus der Standardreihe erstellten Eichkurve ermittelt.

### **3.4.5 ELISA**

Es handelt sich hierbei um immungekoppelte Assays, die auf dem Prinzip der Sandwich-Methode mit zwei AKs beruhen. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Substrat wird von dem Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt und dessen Absorption photospektrometrisch gemessen. Die Konzentration der entstandenen Farbkomplexe ist dabei proportional zur Konzentration des zu ermittelnden Antigens.

Es wurden ELISA zur Bestimmung folgender profibrotischer Faktoren durchgeführt: pAKT, pJNK, pERK1/ERK2, pP38, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, VCAM und ICAM. Dazu wurden Kits von R&D Systems verwendet und die Protokolle jeweils nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Dabei wurde am Vortag die 96-Well-ELISA-Platte mit 100 µl/Well des verdünnten Primärantikörpers beschichtet und ü. N bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde die AK-Lösung dreimal mit 175 µl/Well Waschpuffer gewaschen und anschließend wurden 150 µl des entsprechenden Blockpuffers in alle Wells gegeben um freie Bindungsstellen am Plattenboden zu sättigen. Nach 2 h Inkubationszeit bei RT wurde dreimal gewaschen. Es wurde eine Standardreihe mit 8 Verdünnungsstufen angelegt (Verdünnung jeweils 1:1), die Ausgangskonzentration des gesuchten Antigens ist als Standard im Protokoll des Herstellers aufgeführt. Es wurde pro Probe die in Tabelle 4 angegebene Proteinmenge eingesetzt.

**Tab. 4:** Tabellarische Übersicht über die bei den ELISAs eingesetzten Proteinmengen.

Zu bestimmender Faktor	Eingesetzte Proteinmenge	
	Hepa129-Zellen	SVEC4-10-Zellen
pAKT	50 µg	100 µg
pJNK	100 µg	100 µg
pERK1/ERK2	100 µg	100 µg
pP38 MAPK	100 µg	100 µg
HIF-1 $\alpha$	200 µg	200 µg
VEGF	100 µg	100 µg
VCAM	100 µg	100 µg
ICAM	100 µg	100 µg
VEGF	100 µl Zellüberstand	

Es wurden 100 µl der verdünnten Proben und je 100 µl der angelegten Standardreihe in die Vertiefungen pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde erneut dreimal gewaschen um alle nicht gebundenen Proteine rauszuwaschen. Nun wurden 100 µl/Well des verdünnten biotinylierten Sekundärantikörpers eingesetzt, womit ein AK-Antigen-AK-Komplex entstand. Nach 2 h Inkubationszeit wurde dreimal gewaschen, anschließend wurden 100 µl/Well einer verdünnten Streptavidin-HRP-Lösung in die Wells pipettiert und für 20 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 100 µl/Well Substrat-Lösung auf die Platte pipettiert und weiterhin lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde nach 5 min entsprechend der Farbintensität mit 50 µl Stopp-Lösung pro Well abgestoppt und die Absorption photospektrometrisch bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Konzentration des gesuchten Faktors konnte anhand der angefertigten Kalibrierungskurve ermittelt werden.

### 3.5 Statistik

Alle Statistik-Berechnungen, sowie die graphischen Darstellungen, wurden mithilfe der Computerprogramme InStat und Origin durchgeführt.

Dabei wurden für alle Daten jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Unterschiede zwischen Kontrollen und behandelten Proben wurden mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney-Test für ungepaarte Strichproben ermittelt. Als signifikant wurden  $p$ -Werte  $< 0,05$  gewertet.

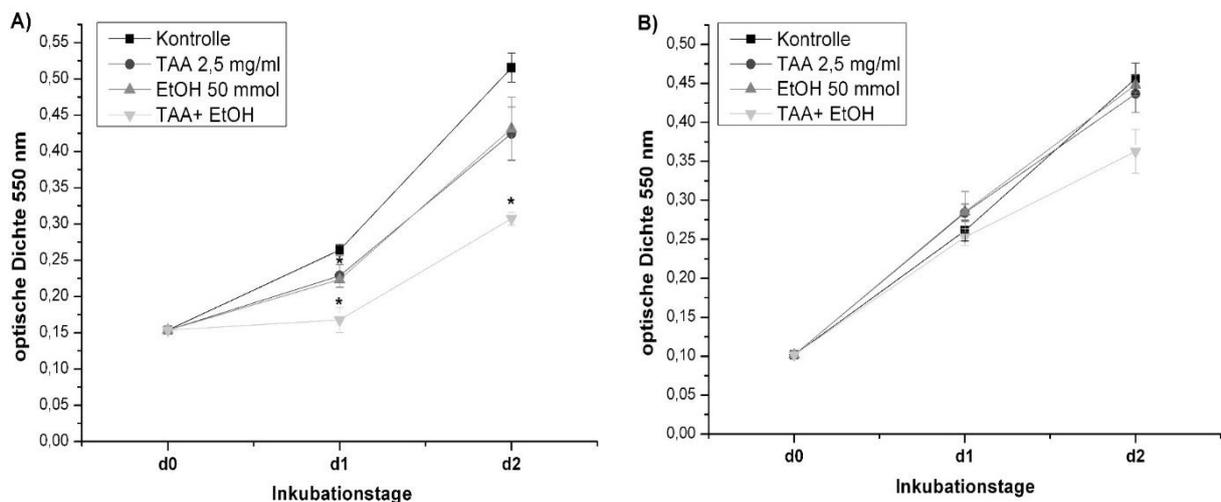
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung der Zellviabilität

#### 4.1.1 Die Zellviabilität der Hepatom- und Endothelzellen wird durch TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst

Bei der Etablierung eines In-vitro-Fibrose-Modells sollte eine maximale Schädigung der Zellen durch die Toxine TAA und Ethanol erfolgen, die noch mit dem Überleben der Zellen vereinbar war. Um die gewünschte Wirkung zu erzielen, konnte die benötigte Konzentration der Noxen austitriert und durch den Einsatz von MTT-Tests der Grad der Schädigung überprüft werden. Es wurde eine Dosierung von 50 mmol Ethanol und von 2,5 mg/ml TAA sowie eine Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C als geeignet ermittelt (eigene nicht gezeigte Daten).

Mittels weiterer MTT-Tests wurde nun der Einfluss von Ethanol und TAA auf die Zellviabilität von Endothel- und Hepatomzellen im Zeitverlauf geprüft. Dazu wurde alle 24 h ein MTT-Test durchgeführt.



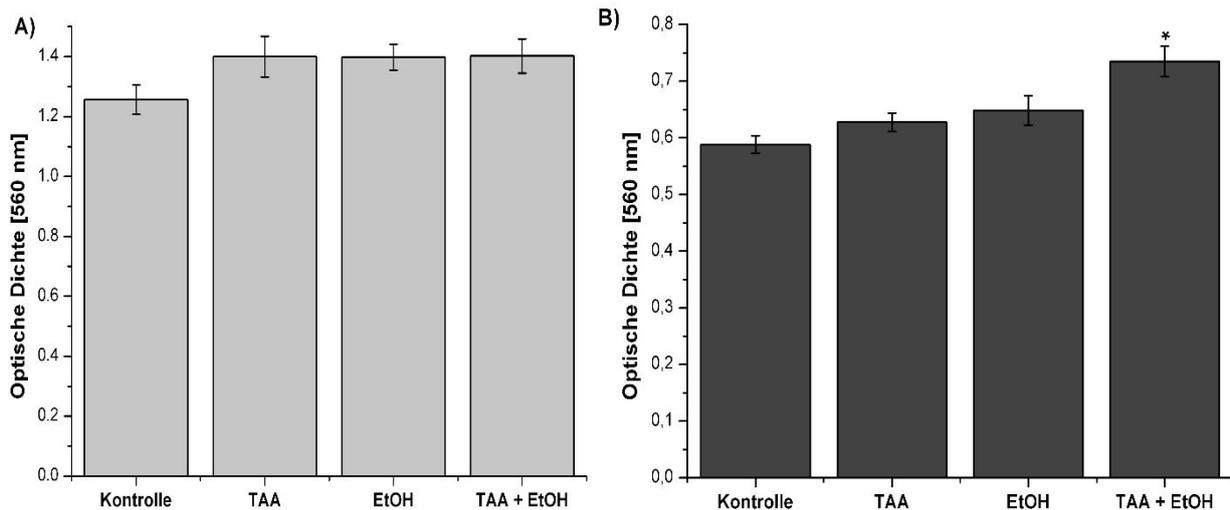
**Abb. 2:** Graphische Darstellung der Zellviabilität nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden je  $1 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen und  $1,5 \times 10^4$  Hepa129-Zellen pro Ansatz ausgesät und mit TAA und/oder Ethanol für 48 h inkubiert. Es wurde alle 24 h ein MTT-Test durchgeführt und die Absorption bei 550 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Mittelwerte der optischen Dichten ( $n = 4$ ) wurden gegen die Zeit aufgetragen, die SEM-Werte wurden dargestellt. \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Der schädliche Einfluss der Noxen spiegelte sich deutlich in der reduzierten Zellviabilität der Hepatomzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe wider. Die Zellviabilität der Hepa129-Zellen sank unter Zugabe von 2,5 mg/ml TAA an Tag 1 um 13 % und um 18 % an Tag 2 verglichen mit der Kontrollgruppe. Unter Einfluss von 50 mmol Ethanol sank die Zellviabilität an Tag 1 um 15 % im Vergleich zur Kontrolle. An Tag 2 war sie, verglichen mit der Kontrolle, um 16 % vermindert. Die Kombination beider Toxine führte zu einer verminderten Zellviabilität der Hepatomzellen (um 36 % an Tag 1 und um 40 % an Tag 2) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 2A).

Durch TAA und Ethanol wurde die Zellviabilität der Endothelzelllinie SVEC4-10 kaum beeinflusst. Die Zugabe von TAA führte an Tag 1 zu einem Anstieg der Zellviabilität der SVEC4-10-Zellen um 9 % im Vergleich zur Kontrolle. An Tag 2 sank die Zellviabilität um 4 % im Vergleich zur Kontrolle ab. Ethanol hatte eine ähnliche Wirkung auf die Endothelzellen: An Tag 1 war die Zellviabilität im Vergleich zu der Kontrollgruppe um 9 % gesteigert. An Tag 2 hingegen war sie um 2 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die Zellviabilität der SVEC4-10-Zellen unter Behandlung mit TAA und Ethanol sank etwas deutlicher ab. Sie war an Tag 1 im Vergleich zur Kontrolle zunächst nicht verändert. An Tag 2 der Messung sank die Zellviabilität um 20 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 2B).

### 4.1.2 Die Proliferationsrate von Hepatom- und Endothelzellen wird durch TAA und Ethanol gesteigert

Leberfibrose wird entscheidend durch Proliferation und Wachstum verschiedener Zelltypen bestimmt. Um die Auswirkung von Ethanol und TAA auf die Proliferationsrate von Hepatom- und Endothelzellen zu untersuchen, wurde das BrdU-Proliferations-Assay durchgeführt.



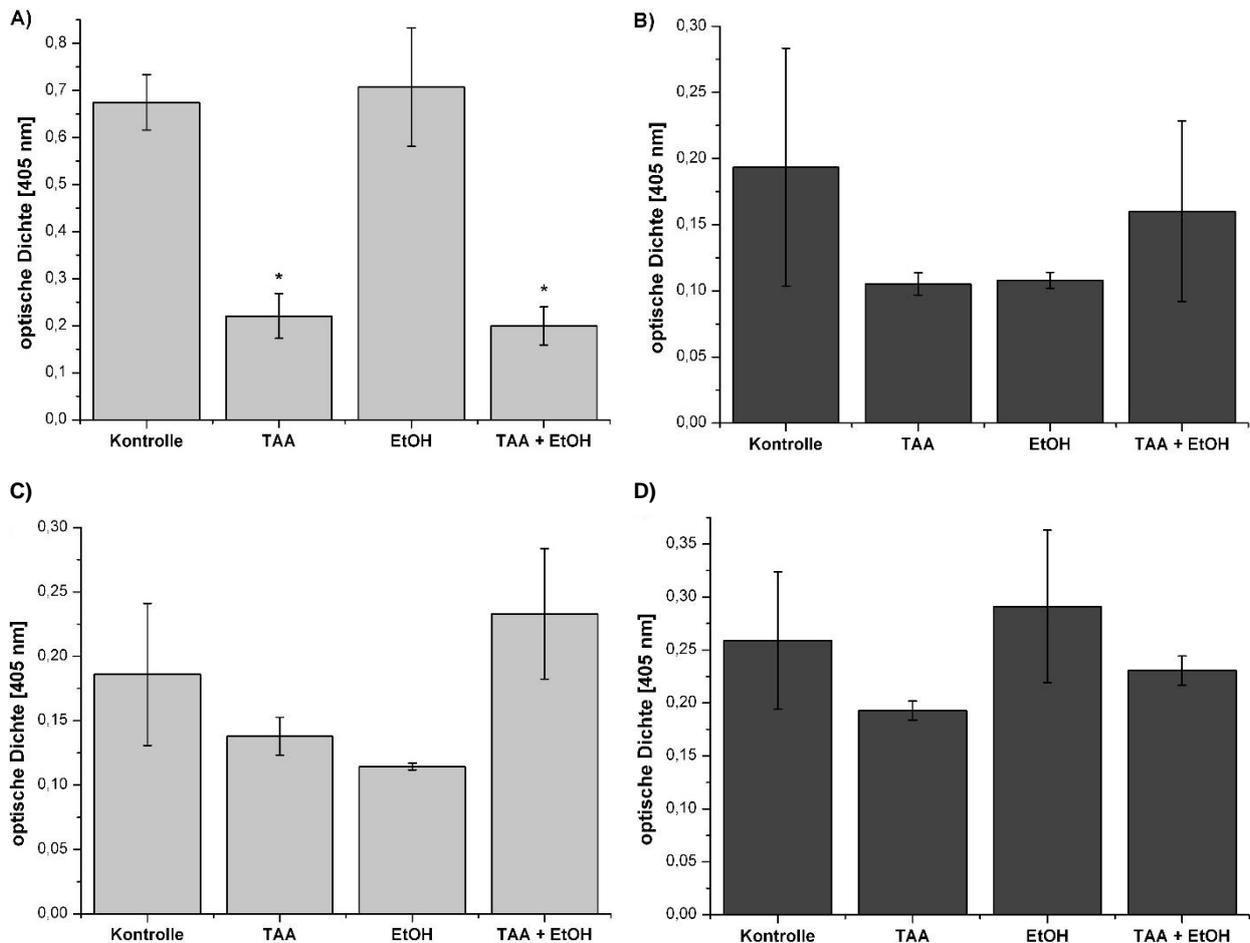
**Abb. 3:** Graphische Darstellung der Proliferationsrate nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden je  $1 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen und  $1,5 \times 10^4$  Hepa129-Zellen pro Ansatz ausgesät und mit TAA und/oder Ethanol für 48 h inkubiert. Nach 24 h wurde BrdU hinzugefügt, dessen Inkorporation abschließend bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen wurde. Dargestellt ist die optische Dichte im Mittel,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Inkubation mit den Toxinen führte zu einer erhöhten Proliferationsrate bei Tumorzellen: TAA führte zu einem Anstieg der Proliferation von Hepa129-Zellen um 12 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Proliferationsrate stieg unter dem Einfluss von Ethanol um 11 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen an. Die Kombination von TAA und Ethanol führte zu einem Anstieg der Proliferation der Tumorzellen um 12 % verglichen mit der Kontrolle (Abb. 3A).

TAA und Ethanol induzierten auch bei SVEC4-10-Zellen eine erhöhte Proliferationsrate: Die Behandlung der Endothelzellen mit TAA führte zu einem Anstieg der Proliferation um 7 % im Vergleich zur Kontrolle. Ethanol steigerte die Proliferationsrate um 10 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Kombination aus TAA und Ethanol erhöhte die Proliferationsrate der SVEC4-10-Zellen um signifikante 25 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3B).

### 4.1.3 Die Nekrose- und die Apoptoserate von Hepatom- und Endothelzellen werden durch TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst

Die vorangegangenen Assays zeigten eine verminderte Zellviabilität und eine gesteigerte Proliferationsrate der Zellen unter Inkubation mit TAA und Ethanol. Daher wurde des Weiteren untersucht, ob die Nekroserate und die Apoptoserate der Zellen durch TAA und Ethanol beeinflusst werden.



**Abb. 4:** Graphische Darstellung von Nekroserate und Apoptoserate nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in Hepa129-Zellen und SVEC4-10-Zellen. A) Nekrose-Assay, Hepa129, B) Nekrose-Assay, SVEC4-10, C) Apoptose-Assay, Hepa129 und D) Apoptose-Assay, SVEC4-10. Es wurden je  $1 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen und  $1,5 \times 10^4$  Hepa129-Zellen pro Ansatz ausgesät, mit TAA und/oder Ethanol für 48 h inkubiert und das Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Absorption wurde im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen. Dargestellt sind die gemittelten optischen Dichten,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Nekroserate der mit TAA behandelten Hepa129-Zellen war um 67 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Ethanol zeigte keinen relevanten Effekt auf die Nekroserate der

Hepatomzellen. Die Behandlung mit TAA und Ethanol führte zu einer Inhibition der Nekroserate um signifikante 70 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4A).

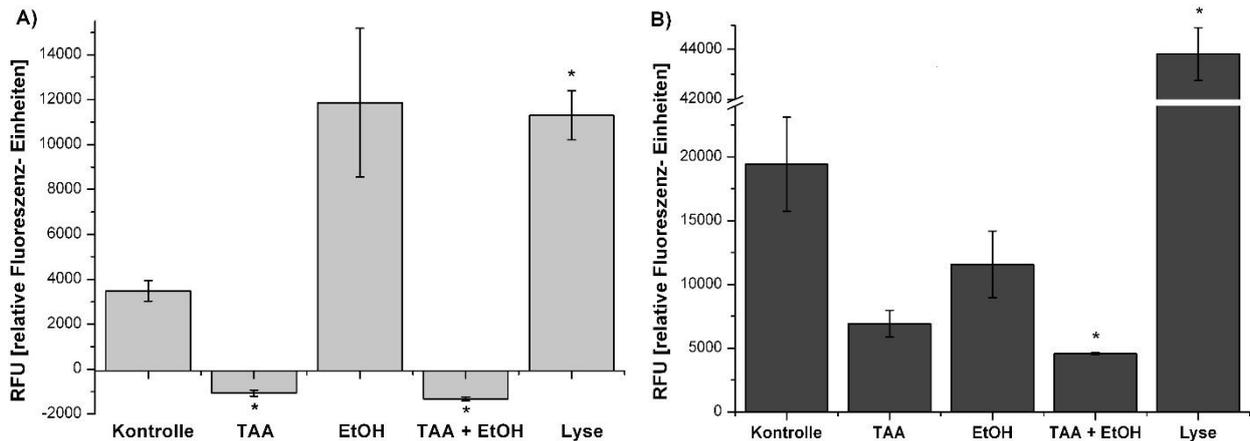
Die Toxine TAA und Ethanol führten zu einer verminderten Nekroserate bei SVEC4-10-Zellen: TAA reduzierte Nekrose in Endothelzellen um 46 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach Inkubation mit Ethanol war die Nekroserate im Vergleich zur Kontrollgruppe um 44 % vermindert. Die Kombination von TAA und Ethanol führte zu einem Absinken der Nekroserate um 17 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4B).

TAA und Ethanol reduzierten die Apoptoserate von Hepa129-Zellen: Die Behandlung der Zellen mit TAA verminderte die Apoptoserate um 26 % im Vergleich zur Kontrolle. Ethanol führte dazu, dass die Apoptoserate in Hepatomzellen um 38 % im Vergleich zur Kontrolle gesenkt wurde. Die Kombination von TAA und Ethanol hingegen ließ die Apoptoserate der Hepa129-Zellen um 25 % im Vergleich zur Kontrolle steigen (Abb. 4C).

Die Apoptoserate der SVEC4-10-Zellen wurde durch TAA um 26 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen reduziert. Während Ethanol zu einer gesteigerten Apoptoserate der Endothelzellen (um 12 %) führte, wurde diese durch TAA und Ethanol um 11 % im Vergleich zur Kontrolle gesenkt (Abb. 4D).

#### 4.1.4 Die zytotoxische Wirkungen von TAA und Ethanol auf Hepatom- und Endothelzellen ist verschieden

Mit diesem Assay wurde die Toxizität der Substanzen TAA und Ethanol auf Hepatom- und Endothelzellen untersucht. Durch die Messung von LDH, welches beim Zelltod aus defekten Zellmembranen austritt, konnte eine relative Quantifizierung toter Zellen im Vergleich zu einer Positivkontrolle durchgeführt werden.



**Abb. 5:** Graphische Darstellung der Toxizität von TAA und Ethanol auf A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden je  $2,5 \times 10^3$  SVEC4-10-Zellen und  $5 \times 10^3$  Hepa129-Zellen pro Ansatz ausgesät und für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol, sowie mit Lysepuffer als Positivkontrolle inkubiert. Die Proben wurden mit Cytotox-Reagenz entsprechend den Herstellerangaben ergänzt und bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emmissionswellenlänge von 590 nm im Fluoreszenz-ELISA-Reader gemessen. Dargestellt ist die gemittelte Fluoreszenz in relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU),  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

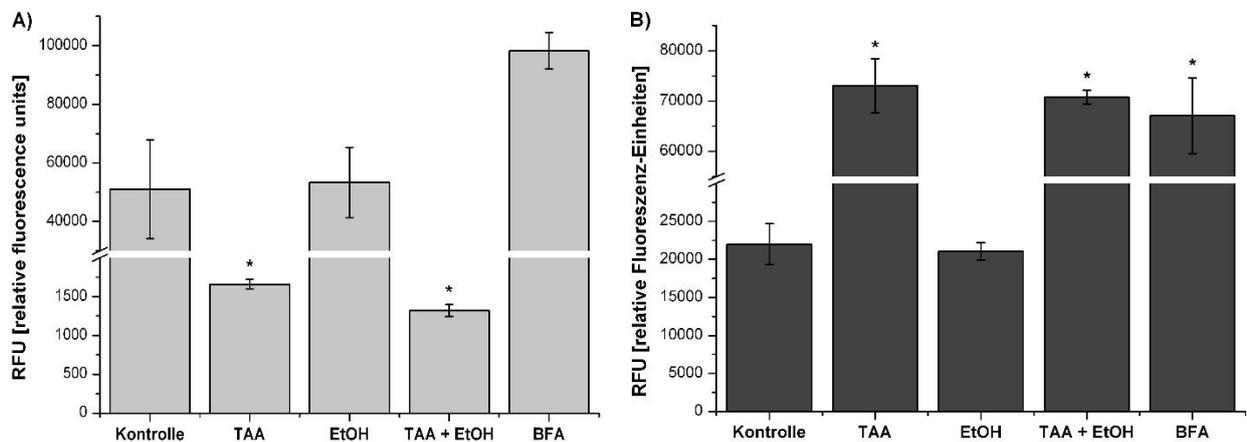
Der für die Behandlung der Hepa129-Zellen mit TAA in RFU gemessene Wert war um das 1,3-fache im Vergleich zur Kontrollprobe gesenkt. Auch die Kombination von TAA und Ethanol führte zu einem um das 1,4-fache im Vergleich zur Kontrolle verminderten Wert. Die Werte lagen im negativen Bereich. Für Ethanol hingegen konnte eine um das 3,4-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigerte Zytotoxizität gemessen werden. Dass es zu einer signifikanten LDH-Freisetzung kam, wurde durch die Lyse-Positivkontrolle gezeigt (Abb. 5A).

Die Behandlung der SVEC4-10-Zellen mit TAA verminderte den gemessenen Wert um 64 % im Vergleich zur Kontrolle. Ethanol senkte den Wert um 40 % verglichen mit den unbehandelten Zellen. Das Fluoreszenzsignal der mit TAA und Ethanol behandelten Endothelzellen war um 76 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Das starke Signal der

Lyse-Positivkontrolle zeigte, dass es zu einer maximalen LDH-Freisetzung kam (Abb. 5B).

#### 4.1.5 Die Caspase-3/-7-Aktivität der Hepatom- und Endothelzellen wird von TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst

TAA und Ethanol förderten zum Teil die Apoptoseinduktion in Hepa129-Zellen und in SVEC4-10-Zellen. Apoptose kann in der Zelle über verschiedene Signalkaskaden induziert werden. Um herauszufinden, über welchen Signalweg die Toxine Apoptose induzierten, wurde das ApoONE Caspase-3/-7-Assay durchgeführt. Dabei wurden die Aktivitäten der Proteasen Caspase-3 und Caspase-7 gemessen, welche eine wichtige Funktion bei der Apoptoseinduktion in der Zelle übernehmen.



**Abb. 6:** Graphische Darstellung der Caspase-3 und Caspase-7 Aktivitäten nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in A) Hepa129 und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden je  $2,5 \times 10^3$  SVEC4-10-Zellen und  $5 \times 10^3$  Hepa129-Zellen pro Ansatz eingesetzt und mit TAA und/oder Ethanol sowie mit  $2,5 \mu\text{M}$  BFA als Positivkontrolle behandelt. Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 48 h mit ApoONE-Reagenz versetzt, für 4 h inkubiert und anschließend im Fluoreszenz-ELISA-Reader bei einer Exzitationswellenlänge von 499 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm gemessen. Dargestellt ist das gemittelte Fluoreszenzsignal in RFU,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

Die Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung mit TAA die Aktivität der Caspase-3 und der Caspase-7 in Hepa129-Zellen um 77 % im Vergleich zur Kontrolle verminderte. Ethanol steigerte die Caspasen-Kaskade um 4 % im Vergleich zu den unbehandelten Hepatomzellen. Das Fluoreszenzsignal der mit TAA und Ethanol behandelten Hepa129-Zellen war um 97 % im Vergleich zur Kontrolle gesenkt. Die Positivkontrolle bestätigte, dass es zu einer maximalen Zellschädigung durch BFA kam (Abb. 6A).

Die Behandlung von SVEC4-10-Zellen mit TAA führte zu einem signifikanten Anstieg (um das 3,3-fache) der Caspasen-3/-7-Aktivität verglichen mit der Kontrollgruppe. Auch die Kombination der Toxine TAA und Ethanol steigerte die Caspasen-Kaskade um das 3,2-fache im Vergleich zur Kontrolle. Die Inkubation mit Ethanol führte zu einer Inhibition (um 4 %) der Caspase-3/-7-Aktivität in den Endothelzellen im Vergleich zur Kontrolle. Das starke Signal der Positivkontrolle zeigte eine signifikante Zellschädigung durch BFA an (Abb. 6B).

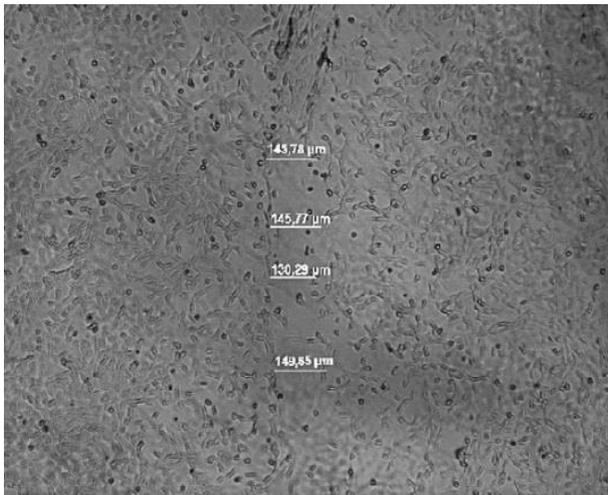
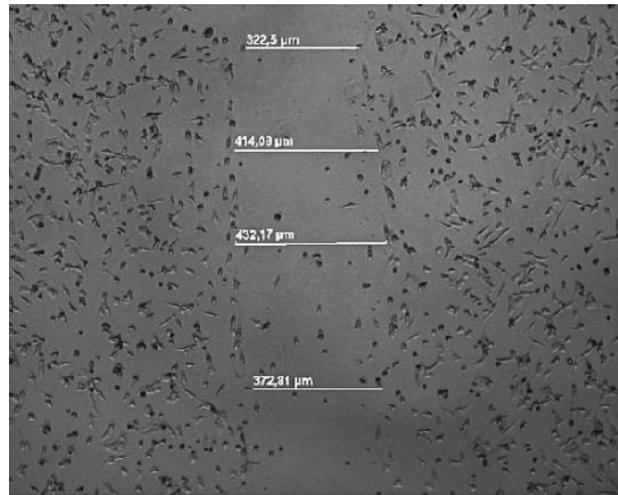
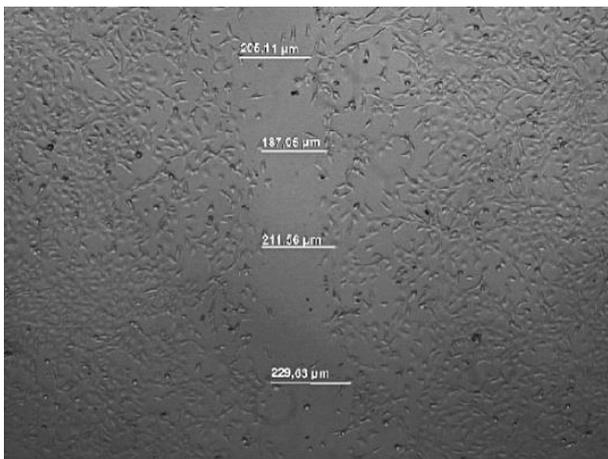
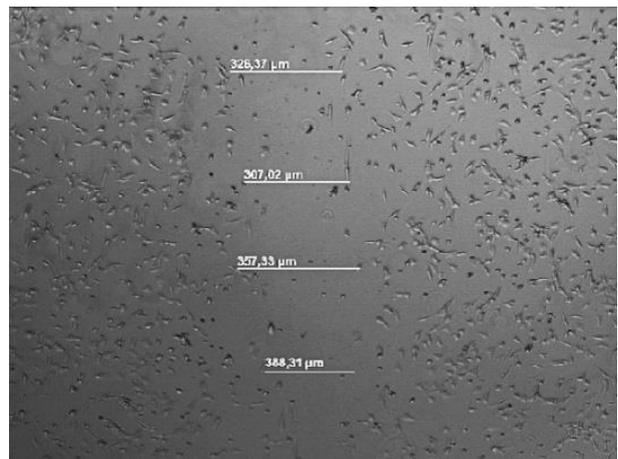
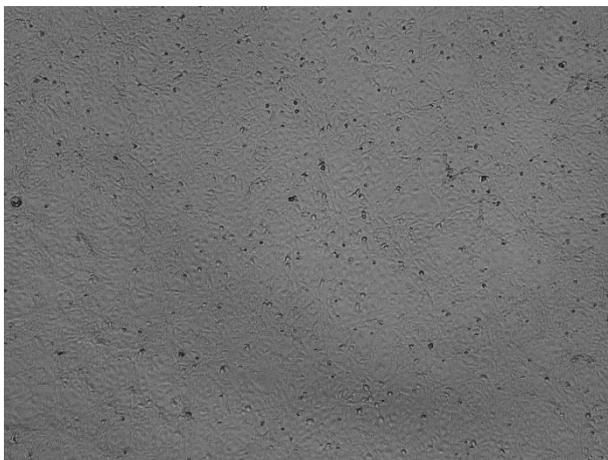
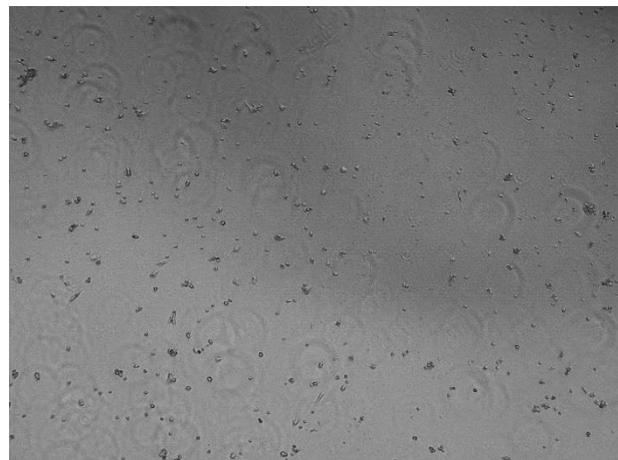
## **4.2 Untersuchung der Funktionalität *in vitro***

Da sich in den vorhergehenden Untersuchungen gezeigt hat, dass TAA und Ethanol Zellviabilität, Proliferation und Apoptose in den untersuchten Endothel- und Tumorzellen beeinflussten, wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob auch zelltypspezifische Eigenschaften, wie z. B. Endothelzellmigration oder klonale Expansion von Tumorzellen durch die Noxen beeinflusst werden.

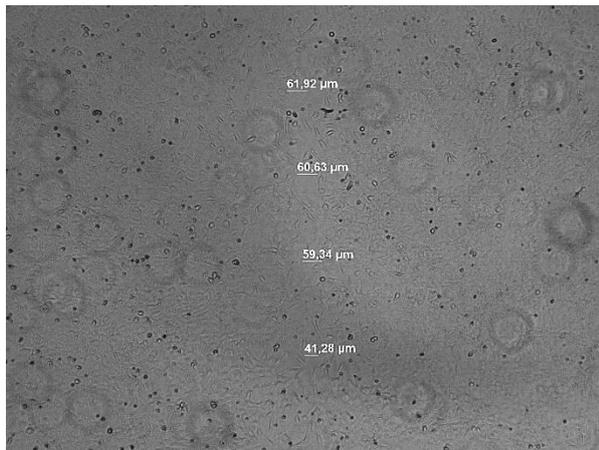
Bei der Etablierung eines In-vitro-Modells ist die Funktionalität der Zellen von besonderer Bedeutung. Die vorangegangenen Versuche zeigten, dass TAA und Ethanol den Zellmetabolismus von Hepa129-, und SVEC4-10-Zellen beeinflussten. Daher wurde im weiteren Verlauf untersucht, inwieweit diese Veränderungen Einfluss auf funktionelle Eigenschaften der Zellen haben.

### **4.2.1 Die Migrationsfähigkeit der Endothelzellen wird durch TAA und Ethanol vermindert**

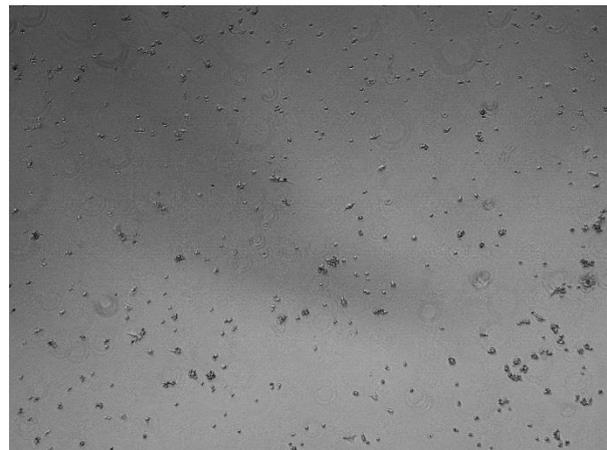
Mithilfe des Migrations-Assays wurde untersucht, welchen Einfluss TAA und Ethanol auf das Migrationsverhalten von SVEC4-10-Zellen haben.

**A) Kontrolle, d 1****B) TAA, d 1****C) EtOH, d 1****D) TAA + EtOH, d 1****E) Kontrolle, d 2****F) TAA, d 2**

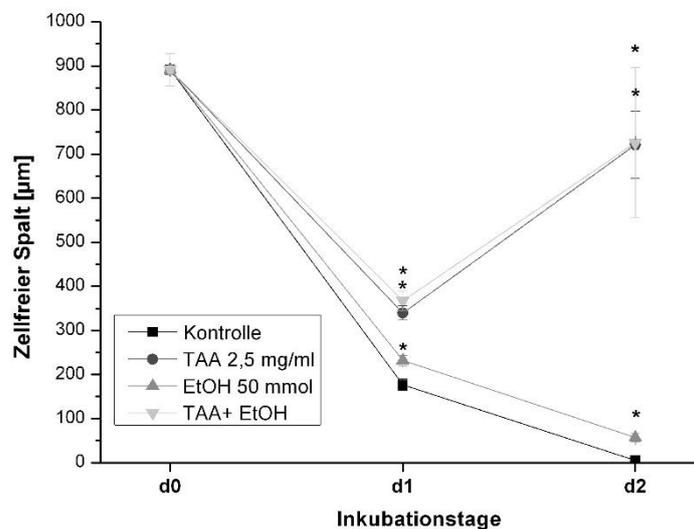
## G) EtOH, d 2



## H) TAA + EtOH, d 2



**Abb. 7:** Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen von SVEC4-10-Zellen und der veränderten Spaltbreite an Tag 1 (d1) und Tag 2 (d2). Es wurden  $5 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen/Ansatz in 12-Well-Platten ausgesät und ü. N. im Inkubator kultiviert. Sie wurden am Folgetag mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol versehen und es wurde ein Spalt in den Zellrasen gekratzt. Die Messung der Spaltbreite erfolgte mithilfe eines Durchlichtmikroskops und angeschlossener Bildverarbeitungssoftware direkt im Anschluss, sowie nach 24 h und nach 48 h.



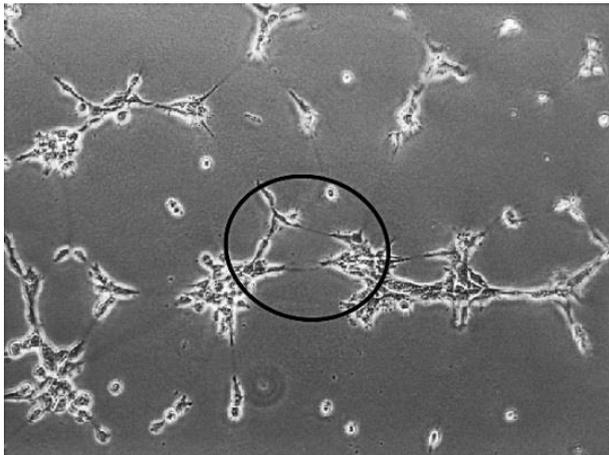
**Abb. 8:** Graphische Darstellung der Migrationsfähigkeit von SVEC4-10-Zellen nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH. Es wurden  $5 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen/Ansatz in 12-Well-Platten ausgesät und ü. N. im Inkubator kultiviert. Sie wurden am Folgetag mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol versehen und es wurde ein Spalt in den Zellrasen gekratzt. Die Messung der Spaltbreite erfolgte mithilfe eines Durchlichtmikroskops nach 0 h, 24 h und 48 h. Dargestellt sind die gemessenen Spaltbreiten in  $\mu\text{m}$ . Deren Mittelwerte,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ) wurden gegen die Zeit aufgetragen. \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle

Die Migrationsfähigkeit von SVEC4-10-Zellen war nach Behandlung mit TAA signifikant vermindert: Der zellfreie Spalt war an Tag 1 um 92 % im Vergleich zur Kontrolle vergrößert. An Tag 2 konnte die Migrationsfähigkeit der Zellen nicht mehr verlässlich bestimmt werden, da fast alle Zellen abgestorben waren. Der gemessene zellfreie Spalt war nach Behandlung mit Ethanol an Tag 1 um 32 % im Vergleich zur Kontrolle verbreitert. An Tag 2 war der Spalt um das 10-fache im Vergleich zur Spaltbreite der ungeschädigten Zellen erweitert. Die Schädigung der Zellen mit TAA und Ethanol führte zu einer Reduktion der Migrationsfähigkeit der Zellen: Der zellfreie Spalt war an Tag 1 um mehr als das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle erweitert und an Tag 2 um mehr als das 135-fache im Vergleich zur Kontrolle. Die Aussage über die Migrationsfähigkeit der SVEC4-10-Zellen an Tag 2 muss jedoch ebenfalls unter Vorbehalt gesehen werden, da sich fast ausschließlich tote Zellen in der Kultur befanden (Abb. 7, Abb. 8).

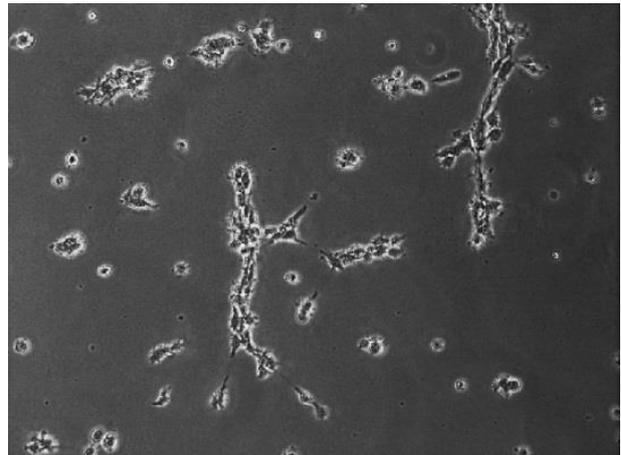
#### 4.2.2 Die Bildung endothel-ähnlicher Strukturen wird durch TAA und Ethanol gesteigert

Die Auswirkung von Ethanol und TAA auf die Bildung endothel-ähnlicher Strukturen wurde im Matrigel-Tube Formation-Assay getestet. Dazu wurden SVEC4-10-Zellen auf Matrigel ausgesät und mit TAA, Ethanol sowie der Kombination beider Toxine inkubiert. Es bildeten sich gefäßähnliche, ringförmige Strukturen aus, die im Lichtmikroskop quantifiziert wurden.

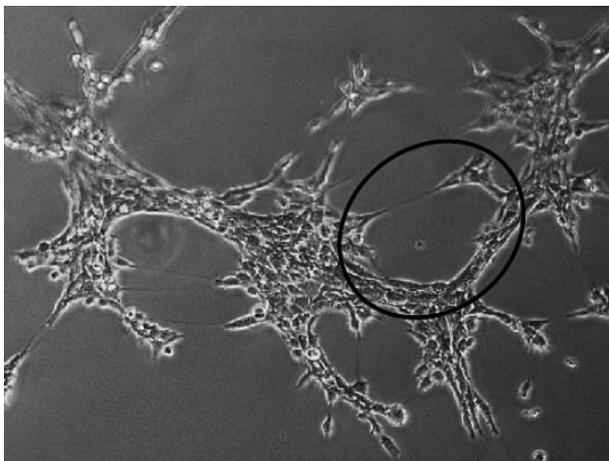
A) Kontrolle



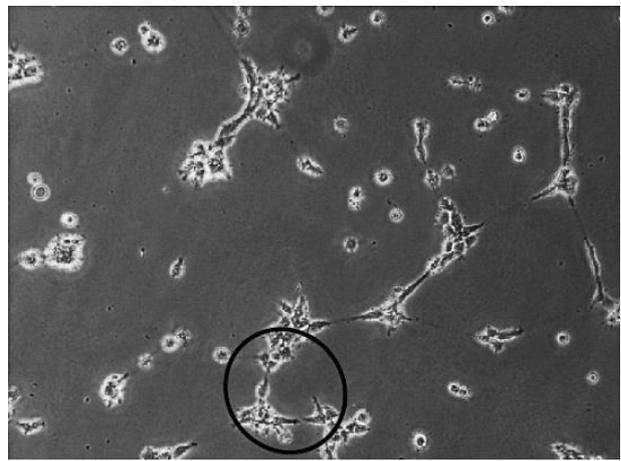
B) TAA



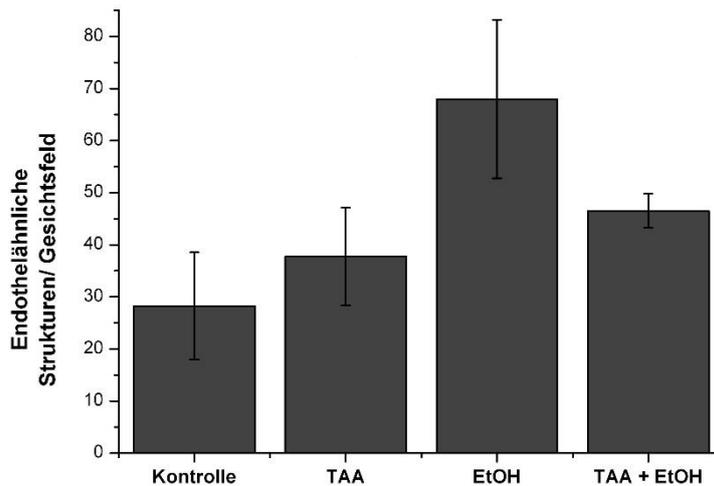
C) EtOH



D) TAA + EtOH



**Abb. 9:** Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen von SVEC4-10-Zellen auf Matrigel. Es wurden  $2,5 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen/Ansatz auf Matrigel (versetzt mit 10 ng/ml VEGF) ausgesät, mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol versehen und für 5 h im Inkubator inkubiert. Die Anzahl gebildeter ringförmiger, geschlossener Strukturen („tubes“) wurde unter dem Lichtmikroskop bestimmt.



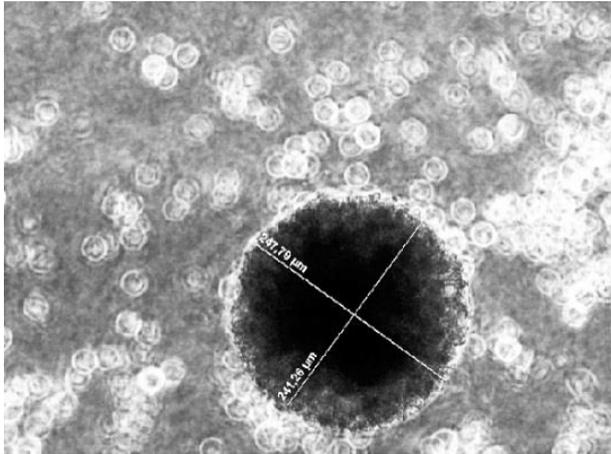
**Abb. 10:** Graphische Darstellung der Anzahl ringförmig geschlossener Strukturen („tubes“) im Matrigel-Assay nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH. Das Assay wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und es wurden je 5 Gesichtsfelder ausgezählt ( $n = 15$ ). Dargestellt ist die gemittelte Anzahl an tubes/Gesichtsfeld  $\pm$  SEM.

SVEC4-10-Zellen bildeten in allen Gruppen deutlich erkennbare, ringförmig geschlossene Strukturen aus (Abb. 9): TAA förderte die Bildung geschlossener, ringförmiger Strukturen um 34 % im Vergleich zu den unbehandelten SVEC4-10-Zellen. Die Anzahl vollständig geschlossener, endothel-ähnlicher Strukturen pro Gesichtsfeld war nach Inkubation mit Ethanol um das 2,4-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die Kombination von TAA und Ethanol steigerte die Bildung von „tubes“ im Vergleich zur Kontrollgruppe um 65 % (Abb. 10).

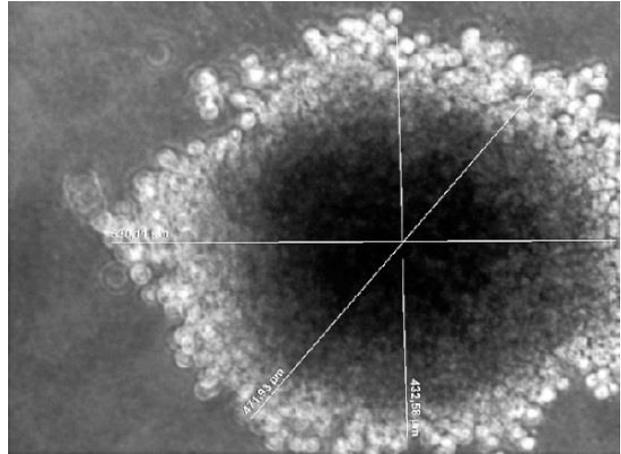
#### 4.2.3 Die Bildung klonaler Zellkolonien der Hepatomzellen wird durch Ethanol gesteigert

Dieses Assay diente der Analyse der Tumorigenität von Hepa129-Zellen unter Einfluss von TAA und Ethanol.

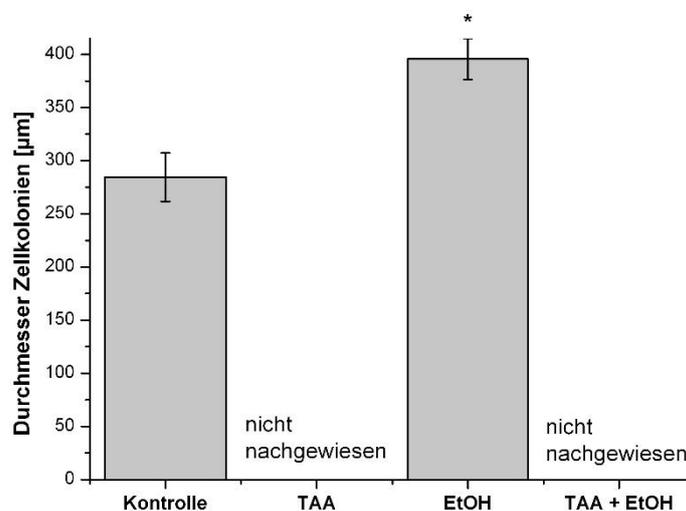
## A) Kontrolle



## B) EtOH



**Abb. 11:** Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen von Hepa129-Zellen im Soft-Agar. Es wurden  $1 \times 10^3$  Hepa129-Zellen/Ansatz in eine 6-Well-Platte auf Agaroseboden ausgesät und mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol und Agarose versehen. Die Zellen wurden zur Aushärtung der Agarose für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Nach 11 Tagen wurden die gebildeten klonalen Zellkolonien im Durchlichtmikroskop detektiert und mittels angeschlossener Bildverarbeitungssoftware vermessen.



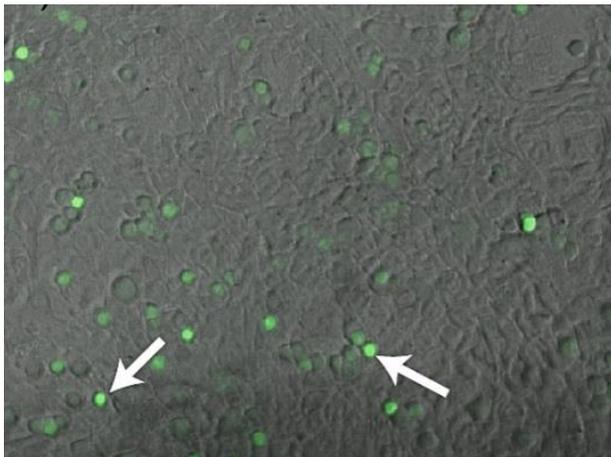
**Abb. 12:** Graphische Darstellung der Bildung klonaler Zellkolonien von Hepa129-Zellen nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH. Es wurden  $1 \times 10^3$  Hepa129-Zellen/Ansatz in eine 6-Well-Platte ausgesät und mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol und Agarose versehen. Die Zellen wurden zur Aushärtung der Agarose für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Nach 11 Tagen wurden die gebildeten klonalen Zellkolonien im Durchlichtmikroskop ausgemessen. Dargestellt sind die gemittelten Durchmesser der klonalen Zellkolonien in µm,  $\pm$  SEM, ( $n = 15$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Schädigung von Hepa129-Zellen mit Ethanol führte zu einem Anstieg der Bildung klonaler Zellkolonien um 39 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach Behandlung der Hepatomzellen mit TAA und der Kombination aus TAA und Ethanol blieb die Bildung klonaler Zellkolonien aus (Abb. 11, Abb. 12).

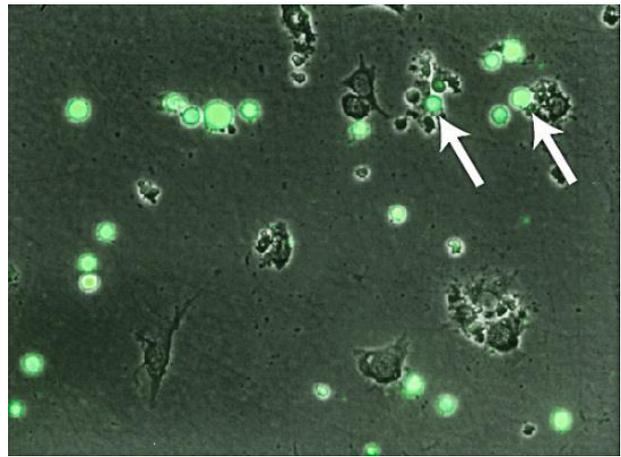
#### 4.2.4 Das Adhäsionspotential der Tumor- und Endothelzellen wird durch TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst

Nachdem gezeigt wurde, dass Ethanol zu einer vermehrten Bildung klonaler Zellkolonien von Hepa129-Zellen führte, wurde das Metastasierungspotential der Hepatomzellen weiter analysiert. Es sollte hierzu mithilfe der Kokultivierung in einem nächsten Schritt eine Wechselwirkung von Hepa129- und SVEC4-10-Zellen untersucht werden.

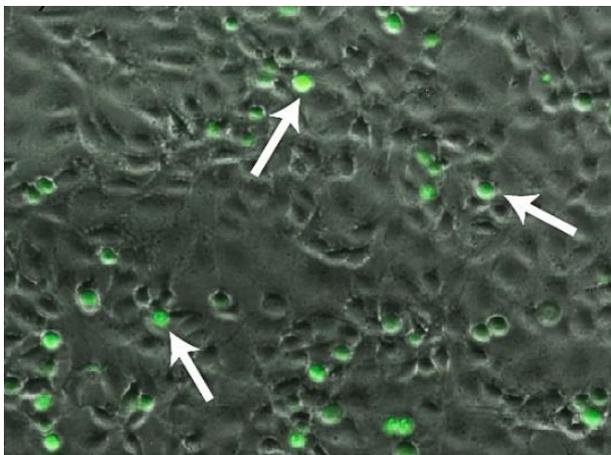
**A) Kontrolle**



**B) TAA**



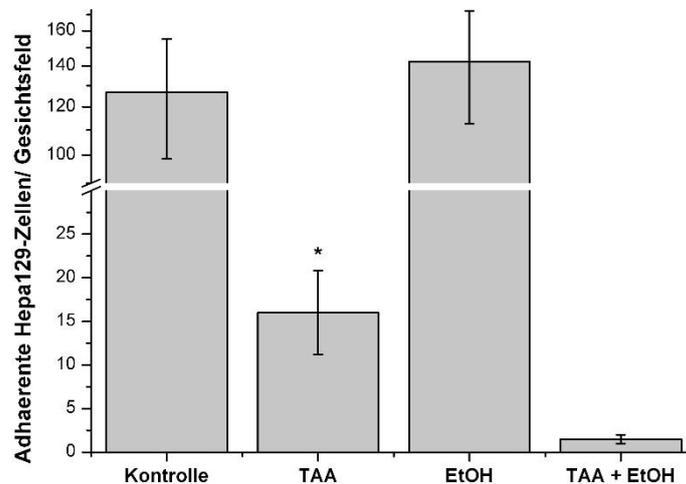
**C) EtOH**



**D) TAA + EtOH**



**Abb. 13:** Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen von Hepa129-Zellen und SVEC4-10-Zellen in Kokultur. Es wurden  $5 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen/Ansatz auf 12-Well-Platten- und  $2,5 \times 10^5$  Hepa129-Zellen/Ansatz auf 6-Well-Platten ausgesät und für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol inkubiert. Die Hepa129-Zellen wurden anschließend mit Cell Tracker GREEN gefärbt und gezählt. Es wurden je  $1 \times 10^5$  Hepa129-Zellen zu den SVEC4-10-Zellen hinzupipettiert. Die Zellen wurden für 5 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend mit Formalin (3,7%) fixiert. Die Zahl der an die Endothelzellen adhärenierten Tumorzellen wurde im Fluoreszenzmikroskop bestimmt.



**Abb. 14:** Graphische Darstellung des Adhäsionspotentials von Hepa129-Zellen an SVEC4-10-Zellen nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH. Es wurden je  $5 \times 10^4$  SVEC4-10-Zellen und  $2,5 \times 10^5$  Hepa129-Zellen pro Ansatz ausgesät und für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol inkubiert. Die Hepa129-Zellen wurden anschließend mit Cell Tracker GREEN gefärbt und gezählt. Es wurden je  $1 \times 10^5$  Hepa129-Zellen zu den SVEC4-10-Zellen hinzupipettiert. Die Zellen wurden nun für 5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Formalin (3,7 %) fixiert. Die Zahl der an die Endothelzellen adhärenen Tumorzellen wurde im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Dargestellt sind die gemittelte Anzahl adhärenter Hepa129-Zellen pro Gesichtsfeld ( $n = 5$ ) in 20er-Vergößerung  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Adhäsionsfähigkeit der Hepa129-Zellen an SVEC4-10-Zellen wurde durch TAA um 87 % im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert. Die Adhärenz der Tumorzellen an die Endothelzellen war nach Behandlung beider Zelllinien mit Ethanol um 12 % im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. TAA und Ethanol blockierten die Zell-Zell-Adhäsion fast vollständig (um 99 %) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 14). Die mikroskopischen Aufnahmen dieser mit TAA und Ethanol behandelten Kokultur zeigten jedoch kaum überlebende Zellen (Abb. 13)

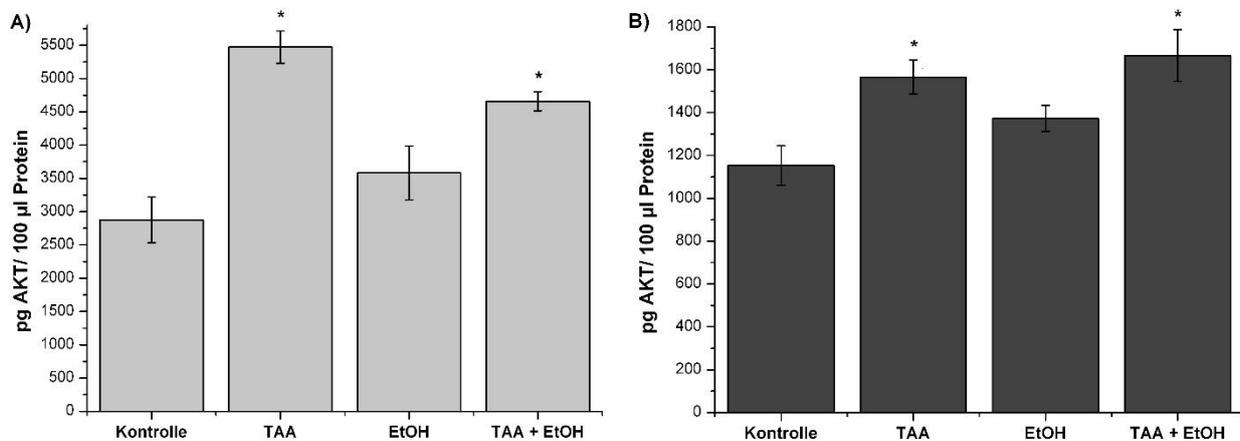
### 4.3 Untersuchung profibrotischer Faktoren

Da sich in den vorangegangenen Versuchen gezeigt hat, dass TAA und Ethanol die Funktionalität der Zellen beeinflussen, wurde im weiteren Verlauf untersucht, welche Faktoren diese Effekte auf molekularer Ebene vermitteln.

### 4.3.1 Untersuchung der Phosphorylierung von Signaltransduktionsmolekülen

Zunächst wurde getestet, ob TAA und Ethanol zu einer gesteigerten Phosphorylierung und somit Aktivierung der intrazellulären Signalmoleküle AKT, ERK1/ERK2, JNK und P38 MAPK führen. Die Aktivierung der an der Proliferation und Apoptose beteiligten Signalkaskaden spielen bei der Fibrose eine entscheidende Rolle und sind daher auch für das In-vitro-Modell relevant.

#### 4.3.1.1 Die Phosphorylierung von AKT in Hepatom- und Endothelzellen wird durch TAA und Ethanol gesteigert



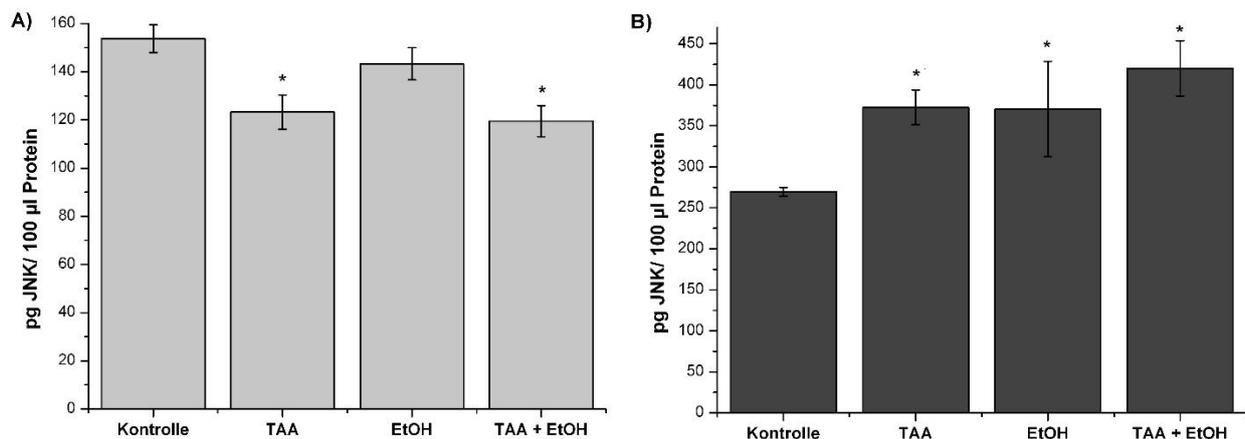
**Abb. 15:** Graphische Darstellung der Phosphorylierung von AKT nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen (beider Zelllinien)/Ansatz ausgesät, für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol inkubiert und anschließend geerntet und lysiert. Die Proteine wurden isoliert und ihre Konzentration in den Proben bestimmt. Es wurden für Hepa129-Zellen 50 µg Protein/Probe- und für SVEC4-10-Zellen 100 µg Protein/Probe eingesetzt. Das ELISA-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Extinktionsbestimmung erfolgte im ELISA-Reader bei 450 nm. Dargestellt sind die gemittelten Konzentrationen pAKT in pg/eingesetzte Proteinmenge,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Ergebnisse zeigten deutlich den Einfluss der Noxen TAA und Ethanol auf die Phosphorylierung und Aktivierung von AKT in beiden Zelllinien: Die Behandlung von Hepa129-Zellen mit TAA steigerte die Phosphorylierung von AKT signifikant um das 1,9-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Inkubation mit Ethanol führte zu einem Anstieg der Phosphorylierung von AKT um 25 % verglichen mit der Kontrolle. TAA und Ethanol steigerten pAKT um 62 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15A).

Die Zugabe von TAA zu SVEC4-10-Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg der AKT-

Phosphorylierung um 36 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach Inkubation mit Ethanol war pAKT verglichen mit den unbehandelten Endothelzellen um 19 % erhöht. TAA und Ethanol steigerten die Phosphorylierung von AKT signifikant um 45 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 15B).

#### 4.3.1.2 TAA und Ethanol führen in Hepatomzellen zu einer verminderten- und in Endothelzellen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von JNK

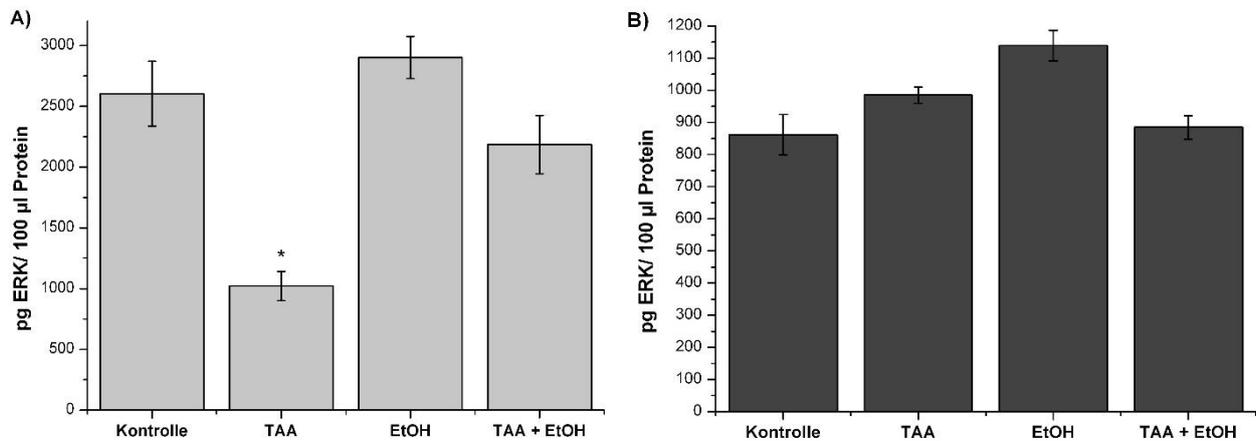


**Abb. 16:** Graphische Darstellung der Phosphorylierung von JNK nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen (beider Zelllinien)/Ansatz ausgesät, für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol inkubiert und anschließend geerntet und lysiert. Die Proteine wurden isoliert und ihre Konzentration in den Proben bestimmt. Das ELISA-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Extinktionsbestimmung erfolgte im ELISA-Reader bei 450 nm. Dargestellt sind die gemittelten Konzentrationen pJNK in pg/100 µg Protein,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Phosphorylierung von JNK in mit TAA behandelten Hepa129-Zellen war um signifikante 20 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Ethanol beeinflusste die Phosphorylierung von JNK im Vergleich zur Kontrollgruppe kaum. Die Behandlung der Hepatomzellen mit der Kombination aus TAA und Ethanol führte zu einer Reduzierung von pJNK um 22 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 16A).

Die vermehrte JNK-Phosphorylierung in den mit Toxinen behandelten SVEC4-10-Proben war signifikant: Im Vergleich zur Kontrolle stieg die Phosphorylierung von JNK nach Inkubation mit TAA, bzw. mit Ethanol um je 38 %. Auch kam es nach Behandlung mit TAA und Ethanol zu einer Steigerung (um 56 %) der Phosphorylierung von JNK im Vergleich zu den unbehandelten Endothelzellen (Abb. 16B).

### 4.3.1.3 Die Phosphorylierung von ERK1/ ERK2 wird durch TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst

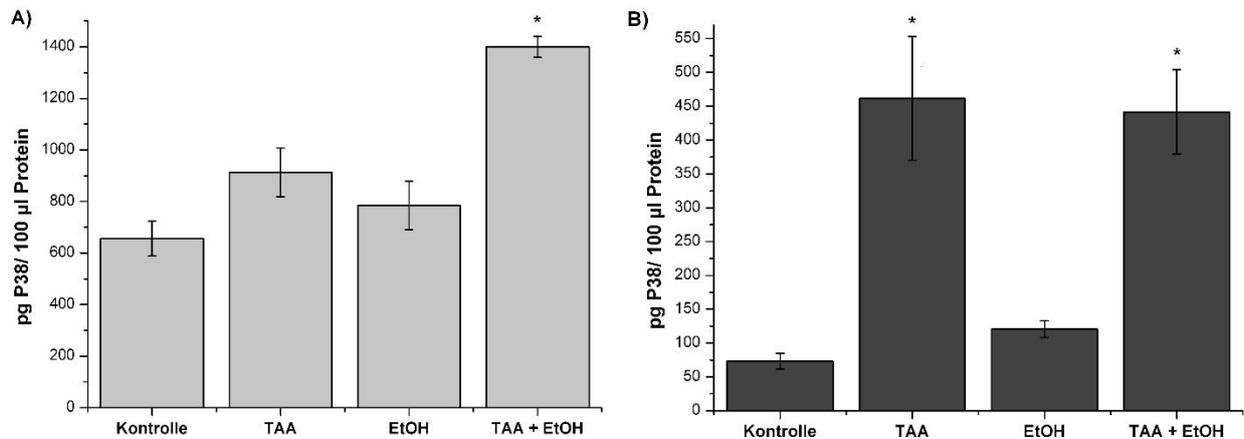


**Abb. 17:** Graphische Darstellung der Phosphorylierung von ERK1/ ERK2 nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen (beider Zelllinien)/Ansatz ausgesät, für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol inkubiert und anschließend geerntet und lysiert. Die Proteine wurden isoliert und ihre Konzentration in den Proben bestimmt. Das ELISA-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Extinktionsbestimmung erfolgte im ELISA-Reader bei 450 nm. Dargestellt sind die gemittelten Konzentrationen pERK1/pERK2 in pg/100 µg Protein,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Phosphorylierung von ERK1/ERK2 war nach Behandlung der Hepa129-Zellen mit TAA um 61 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Während die Inkubation mit Ethanol pERK1/pERK2 im Vergleich zur Kontrolle steigerte (um 11 %), reduzierten TAA und Ethanol die ERK-Phosphorylierung um 16 % im Vergleich zu den unbehandelten Hepatomzellen (Abb. 17A).

Die Phosphorylierung von ERK1/ERK2 war nach Inkubation der SVEC4-10-Zellen mit TAA um 14 % im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Ethanol erhöhte die Phosphorylierung von ERK1/ERK2 um 32 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationsbehandlung der Endothelzellen mit TAA und Ethanol hatte keinen Einfluss auf die ERK-Phosphorylierung (Abb. 17B).

#### 4.3.1.4 TAA und Ethanol steigern die Phosphorylierung von P38 MAPK deutlich



**Abb. 18:** Graphische Darstellung der Phosphorylierung von P38 MAPK nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen (beider Zelllinien)/Ansatz ausgesät, für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol inkubiert und anschließend geerntet und lysiert. Die Proteine wurden isoliert und ihre Konzentration in den Proben bestimmt. Das ELISA-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Extinktionsbestimmung erfolgte im ELISA-Reader bei 450 nm. Dargestellt sind die gemittelten Konzentrationen P38 MAPK in pg/100 µg Protein,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Ergebnisse zeigten, dass es nach Inkubation von Hepa129-Zellen mit TAA im Vergleich zur Kontrolle zu einer um 39 % vermehrten P38 MAPK-Phosphorylierung kam. Ethanol steigerte pP38 um 20 % im Vergleich zur Kontrolle. TAA und Ethanol steigerten die Phosphorylierung von P38 MAPK um das 2,1-fache im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 18A).

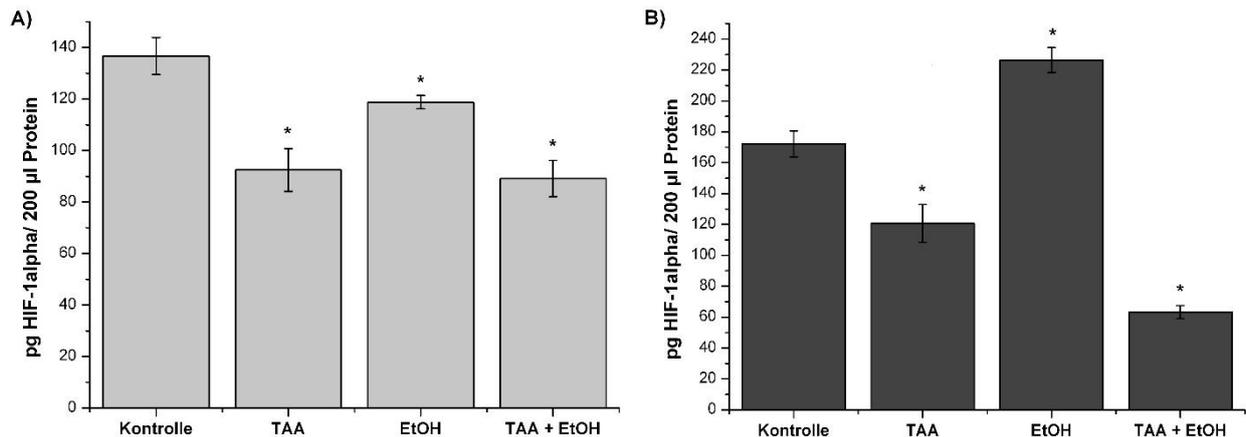
Der Einfluss von TAA auf SVEC4-10-Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von P38 MAPK um das 6,3-fache im Vergleich zur Kontrolle. Die P38 MAPK-Phosphorylierung war nach Inkubation mit Ethanol um 65 % im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Nach Behandlung mit TAA und Ethanol war sie um das 6-fache im Vergleich zu den unbehandelten Endothelzellen erhöht (Abb. 18B).

#### 4.3.2 Untersuchung Hypoxie-induzierter Faktoren

Nachdem sich gezeigt hatte, dass TAA und Ethanol intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen, wurde nun in weiteren Schritten getestet, ob die Noxen ebenfalls Einfluss auf Hypoxie-induzierte Faktoren haben. Eine chronische Schädigung der Leber führt zur Entstehung eines hypoxischen Milieus. Es kommt zu einer Hochregulierung von HIF-1 $\alpha$ ,

wordurch die VEGF-Expression gesteigert wird. Die Untersuchung dieser Faktoren mittels ELISA-Assays sollte weiteren Aufschluss über die Auswirkungen von TAA und Ethanol auf Hepatom- und Endothelzellen im In-vitro-Fibrose-Modell liefern.

#### 4.3.2.1 Die Konzentration an HIF-1 $\alpha$ wird von TAA und Ethanol unterschiedlich beeinflusst

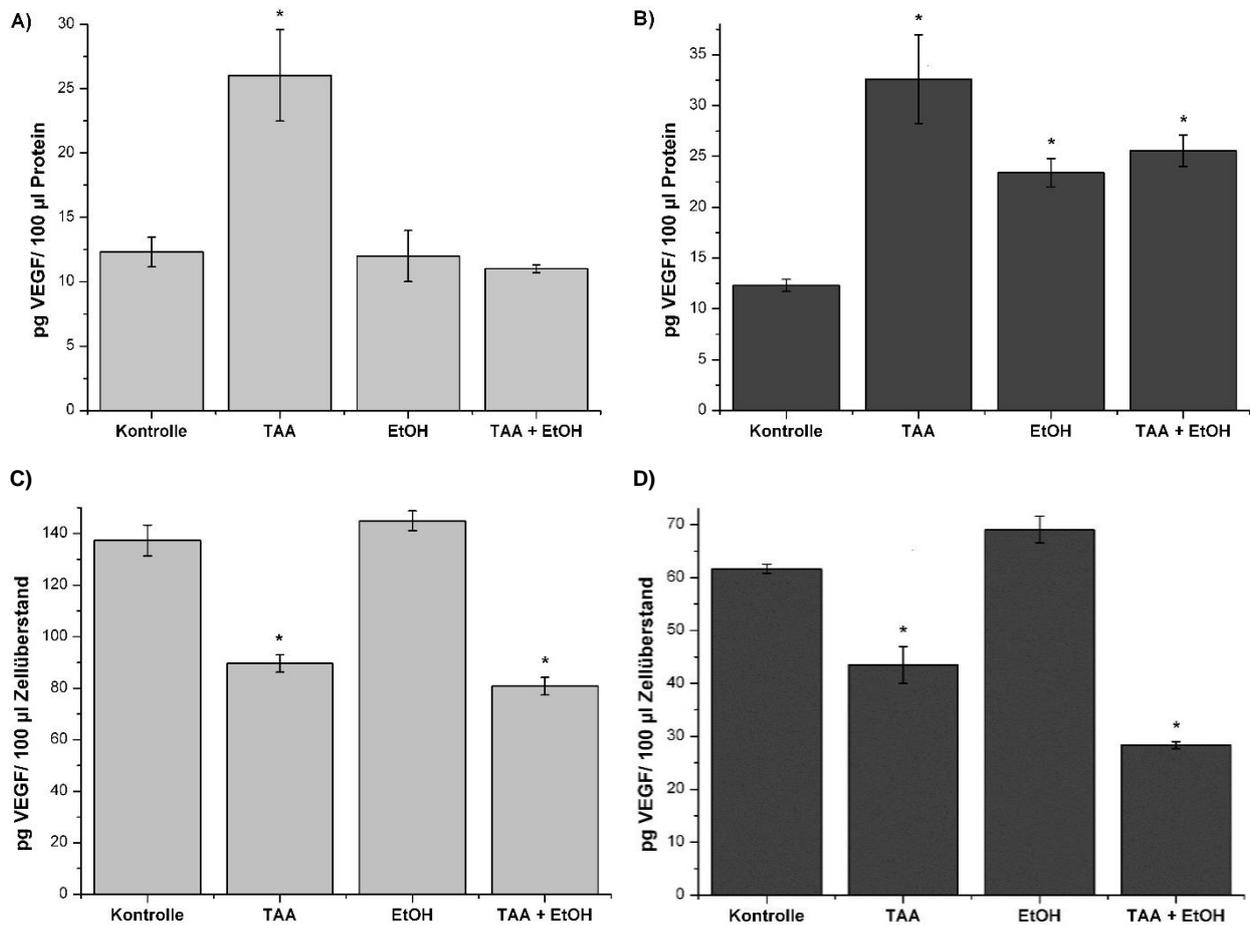


**Abb. 19:** Graphische Darstellung der HIF-1 $\alpha$ -Konzentration nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen (beider Zelllinien)/Ansatz ausgesät, für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol inkubiert und anschließend geerntet und lysiert. Die Proteine wurden isoliert und ihre Konzentration in den Proben bestimmt. Das ELISA-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Extinktionsbestimmung erfolgte im ELISA-Reader bei 450 nm. Dargestellt sind die gemittelten Konzentrationen HIF-1 $\alpha$  in pg/200  $\mu$ g Protein,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Nach Zugabe von TAA zu Hepa129-Zellen kam es zu einem vermehrten Abbau von HIF-1 $\alpha$  (um 32 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Inkubation der Hepatomzellen mit Ethanol führte zu einer um 13 % im Vergleich zur Kontrolle verminderten HIF-1 $\alpha$ -Konzentration. TAA und Ethanol senkten die HIF-1 $\alpha$ -Konzentration um 35 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 19A).

Das Karzinogen TAA führte auch bei SVEC4-10-Zellen zu einer Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Konzentration um 30 % verglichen mit der Kontrolle. Die Schädigung der Endothelzellen mit Ethanol führte hingegen zu einem Anstieg der Konzentration des Transkriptionsfaktors um 31 % im Vergleich zur Kontrolle. TAA und Ethanol verminderten die HIF-1 $\alpha$ -Konzentration um 63 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 19B).

### 4.3.2.2 TAA und Ethanol haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Konzentration an intrazellulärem und sezerniertem VEGF



**Abb. 20:** Graphische Darstellung der VEGF-Konzentration nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH im Zelllysat in A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen und im Zellüberstand in C) Hepa129-Zellen und D) SVEC4-10-Zellen. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen (beider Zelllinien)/Ansatz ausgesät, für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol inkubiert und geerntet. Die Proteinisolierung für die Versuche zur intrazellulären VEGF-Bestimmung erfolgte anschließend mit je 100 µl PBS + Proteaseinhibitor. Die Zellen wurden 3 x in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut und die Proteinkonzentration in den Proben wurde anschließend bestimmt. Für die Experimente mit Zellüberstand wurden je 100 µl Zellüberstand abgenommen und direkt im ELISA-Assay eingesetzt. Dieses wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Extinktionsbestimmung erfolgte im ELISA-Reader bei 450 nm. Dargestellt sind die gemittelten Konzentrationen VEGF in pg/100 µg Protein bzw. VEGF in pg/100 µl Zellüberstand,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

In Hepa129-Zellen wurde unter Zugabe von TAA ein deutlicher Anstieg der intrazellulären VEGF-Konzentration um das 2,1-fache im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Die VEGF-Konzentration blieb von der Behandlung mit Ethanol unbeeinflusst. TAA und Ethanol

reduzierten die VEGF-Konzentration in Hepatomzellen um 11 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20A).

Nach Zugabe von TAA zu SVEC4-10-Zellen kam es zu einem signifikanten Anstieg der VEGF-Konzentration um mehr als das 2,6-fache im Vergleich zu den ungeschädigten Zellen. Ethanol steigerte die VEGF-Konzentration um 90 % verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Kombination aus TAA und Ethanol führte im Vergleich zur Kontrolle zu einem Anstieg von VEGF im Zelllysate um das 2,1-fache (Abb. 20B).

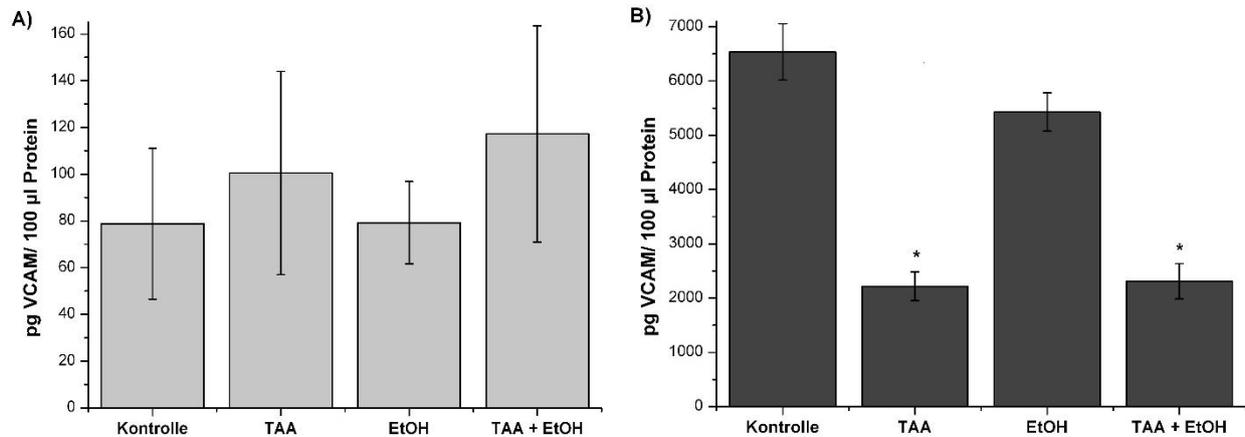
Um eine Aussage über die Sekretion von VEGF unter Einfluss von TAA und Ethanol treffen zu können, wurde für diesen ELISA-Assay Zellüberstand eingesetzt. TAA führte zu einer Blockierung der VEGF-Sekretion von Hepa129-Zellen um 35 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Schädigung der Hepatomzellen mit Ethanol hatte keinen Einfluss auf die VEGF-Konzentration im Kulturmedium. TAA und Ethanol verminderten die Konzentration im Vergleich zur Kontrolle um 41 % (Abb. 20C).

Ähnliche Beobachtungen konnten bei den Versuchen mit SVEC4-10-Zellen gemacht werden: TAA inhibierte die VEGF-Sekretion der Endothelzellen um 29 % im Vergleich zur Kontrolle. Während die Behandlung mit Ethanol die VEGF-Konzentration im Zellüberstand verglichen mit der Kontrollgruppe steigerte (um 12 %), war die Konzentration des Wachstumsfaktors im Kulturmedium nach Inkubation mit TAA und Ethanol um 54 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert (Abb. 20D).

#### **4.3.3 Untersuchung von Zelladhäsionsmolekülen**

In einer fibrotischen Leber kommt es zu einer gesteigerten Synthese von Zelladhäsionsmolekülen durch HSC. Es wurde daher untersucht, ob eine Schädigung mit TAA und Ethanol ebenfalls Auswirkungen auf diese Moleküle in Hepa129- und SVEC4-10-Zellen hat. In den vorangegangenen Versuchen konnte zudem ein gesteigertes Adhäsionspotential der Hepatomzellen an Endothelzellen sowie eine gesteigerte Bildung klonaler Zellkolonien unter Ethanol-Einfluss gezeigt werden, welche möglicherweise durch die Zelladhäsionsmoleküle ICAM und VCAM begünstigt wurden. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt in dem hier entwickelten Modell eine Rolle spielt, wurden VCAM- und ICAM-ELISA durchgeführt.

### 4.3.3.1 TAA und Ethanol führen in Hepa129-Zellen zu einer gesteigerten- und in SVEC4-10-Zellen zu einer verminderten VCAM-Konzentration

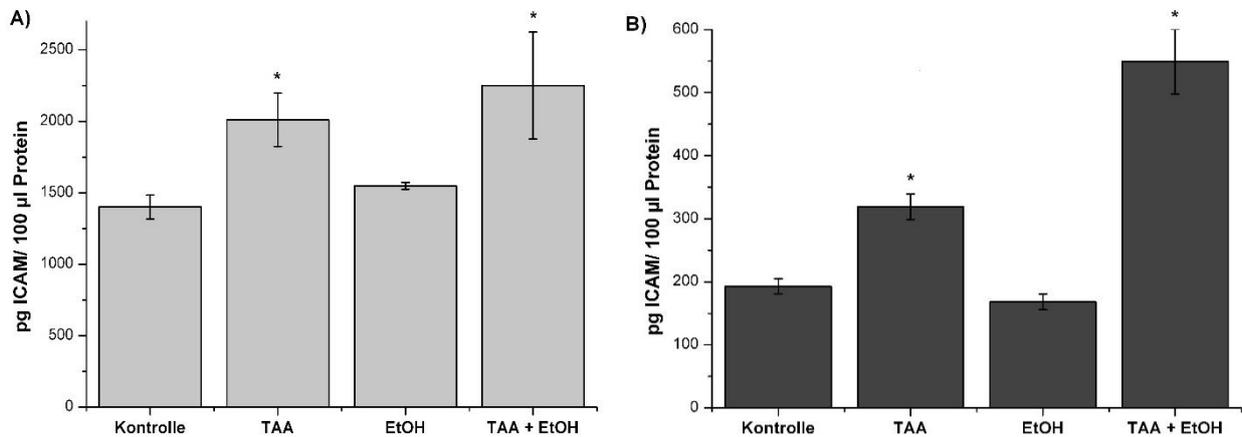


**Abb. 21:** Graphische Darstellung der VCAM-Konzentration nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen (beider Zelllinien)/Ansatz ausgesät, für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol inkubiert und geerntet. Die Proteinisolierung erfolgte anschließend mit je 100 µl PBS + Proteaseinhibitor, die Zellen wurden 3 x in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut und die Proteinkonzentration in den Proben wurde anschließend bestimmt. Das ELISA-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Extinktionsbestimmung erfolgte im ELISA-Reader bei 450 nm. Dargestellt sind die gemittelten Konzentrationen VCAM in pg/100 µg Protein,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Versuchsergebnisse zeigten eine um 28 % im Vergleich zur Kontrolle gesteigerte VCAM-Konzentration unter Schädigung der Hepa129-Zellen mit TAA. Die Behandlung mit Ethanol hatte keinen Einfluss auf die VCAM-Konzentration. Diese war in den mit TAA und Ethanol behandelten Proben um 49 % im Vergleich zur Kontrolle vermehrt (Abb. 21A).

In SVEC4-10-Zellen wurde nach Inkubation mit dem Karzinogen TAA ein signifikanter Abfall der VCAM-Konzentration um 66 % im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Die Konzentration dieses Moleküls war in den Ethanol-Proben um 17 % im Vergleich zu den unbehandelten SVEC4-10-Zellen vermindert. TAA und Ethanol führten zu einer Reduktion der VCAM-Konzentration um 65 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 21B).

#### 4.3.3.2 TAA und Ethanol steigern die ICAM-Konzentration fast ausnahmslos



**Abb. 22:** Graphische Darstellung der ICAM-Konzentration nach Behandlung mit TAA und/oder EtOH in A) Hepa129-Zellen und B) SVEC4-10-Zellen. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen (beider Zelllinien)/Ansatz ausgesät, für 48 h mit 2,5 mg/ml TAA und/oder 50 mmol Ethanol inkubiert und geerntet. Die Proteinisolierung erfolgte anschließend mit je 100 µl PBS + Proteaseinhibitor, die Zellen wurden 3 x in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut und die Proteinkonzentration in den Proben wurde anschließend bestimmt. Das ELISA-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Extinktionsbestimmung erfolgte im ELISA-Reader bei 450 nm. Dargestellt sind die gemittelten Konzentrationen ICAM in pg/100 µg Protein,  $\pm$  SEM, ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die ICAM-Konzentration war nach Behandlung von Hepa129-Zellen mit TAA um 44 % im Vergleich zu den unbehandelten Hepatomzellen gesteigert. Ethanol steigerte die ICAM-Konzentration um 11 % im Vergleich zur Kontrollgruppe und die Kombination mit TAA führte darüber hinaus zu einem weiteren Anstieg der ICAM-Konzentration um 61 % verglichen mit der Kontrolle (Abb. 22A).

Die Ergebnisse für SVEC4-10-Zellen zeigten nach Behandlung mit TAA einen Anstieg der ICAM-Konzentration um 65 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ethanol senkte die Konzentration um 13 % im Vergleich zu den unbehandelten Endothelzellen. TAA und Ethanol steigerten die Konzentration des Zelladhäsionsmoleküls im Vergleich zur Kontrolle um das 2,8-fache (Abb. 22B).

## 5. Diskussion

Leberfibrose, die daraus resultierende Leberzirrhose und die mit der Erkrankung einhergehenden Komplikationen gehören in der westlichen Welt zu den häufigsten Todesursachen. Dabei stellt die Leberzirrhose den Hauptrisikofaktor für die Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) dar. Trotz steigender Inzidenz sind die Therapieoptionen für Leberfibrose mangelhaft. Daher bedarf es weiterer Forschungsarbeit auf diesem Gebiet (Bosch et al., 2004; El-Serag und Rudolph, 2007; Okuda, 2000; Venook et al., 2010).

Obwohl über 80 % der Tumore auf der Basis fibrotischen Lebergewebes entstehen und ein fibrotisches Milieu das Tumorwachstum zusätzlich beschleunigt (El-Serag und Rudolph, 2007), wurden die meisten In-vitro-Untersuchungen bislang nur mit gesunden Leberzellen, bzw. mit „gesunden“ Tumorzellen, durchgeführt. Zellmetabolismen und Zell-Zell-Interaktionen stellen sich in einer fibrotischen Leber jedoch völlig anders dar und sollten in die Suche nach geeigneten Medikamenten miteinbezogen werden (Neubauer et al., 2001; Schuppan et al., 2001; Wells, 2008). Der Bedarf an Leberfibrose-Modellen liegt daher auf der Hand.

Des Weiteren ist eine genauere Erforschung der einzelnen, an der hepatischen Fibrogenese beteiligten Zelltypen erforderlich. Hepatische Sternzellen und Sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) waren jahrelang Schwerpunkt der internationalen Forschungsarbeit zur Leberfibrose (Deleve et al., 2008; Gutierrez-Ruiz und Gomez-Quiroz, 2007; Tugues et al., 2005; Van de Bovenkamp et al., 2007). Trotz ihrer großen Bedeutung für Fibrogenese, Angiogenese und Metastasierung sind die pathophysiologischen Interaktionen von Endothelzellen und hepatischen Karzinomzellen sowie die molekularen Veränderungen dieser Zelltypen in einer fibrotischen Leber hingegen kaum untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein einfach durchführbares und reproduzierbares In-vitro-Modell zu entwickeln, bei dem Tumor- und Endothelzellen durch Fibrose-induzierende Toxine geschädigt werden. Anhand des Modells sollte dann untersucht werden, ob und inwieweit der Prozess der Fibrogenese Auswirkungen auf Tumor- und Endothelzellen hat. Endothelzellen mit intakter Basalmembran kommen in einer gesunden Leber nur entlang der großen Gefäße vor (Medina et al., 2004). Im Rahmen der Fibrogenese mit ihrem intrahepatischen vaskulären Umbau gewinnen Endothelzellen an Bedeutung und tragen

vermutlich zum Fortschreiten der Erkrankung bei (Lee et al., 2007; Medina et al., 2004; Paternostro et al., 2010; Valfre di Bonzo et al., 2009).

Neben Endothelzellen werden auch Hepatomzellen durch die Noxen beeinflusst. Es wurde bereits gezeigt, dass ein fibrotisches Milieu eine schnellere Metastasierung von Tumorzellen in der Leber begünstigt (Kornek et al., 2008). Darüber hinaus wurde der Einfluss der Fibrogenese auf Tumorzellen bisher aber kaum untersucht.

Obwohl bekannt ist, dass exzessiver Alkoholkonsum eine der Hauptursachen der Leberfibrose darstellt (Tilg und Day, 2007), wurde die direkte Auswirkung von Ethanol auf Endothel- und Hepatomzellen *in vitro* bislang ebenfalls kaum untersucht.

Kornek et al. etablierten bereits ein Maus-Hepatom-Modell. Anhand dessen konnte die profibrotische und proangiogene Wirkung von Ethanol und dem Karzinogen TAA gezeigt werden (Kornek et al., 2006). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich das In-vivo-Modell ebenso auf ein In-vitro-Modell übertragen lässt.

## **5.1 Zellviabilität und Zellumsatz**

Um ein geeignetes In-vitro-Fibrose-Modell zu etablieren, wurde zunächst untersucht, inwieweit die eingesetzten Toxine die Zellen schädigen. Damit Langzeiteffekte der Toxine auf die Zellen untersucht werden konnten, sollten die Hepatom- und Endothelzellen durch Ethanol und TAA nur geschädigt, jedoch nicht abgetötet werden. Dies war die Voraussetzung für weitere Versuche.

Die zu erwartende verminderte Zellviabilität nach Mono-Gabe der Noxen TAA und Ethanol konnte für die hier verwendeten Hepatomzellen bestätigt werden. Diese Daten gehen einher mit der von Chen et al. bereits beschriebenen um 60 % verminderten Zellviabilität von hepatischen Epithelzellen im MTT-Test nach Gabe von TAA (Chen et al., 2006). Die Endothelzellen zeigten sich nach Mono-Behandlung mit den Toxinen hingegen unbeeinflusst hinsichtlich ihrer Viabilität. Es wurde anschließend in Analogie zum Maus-Modell auch die Auswirkung einer Kombination beider Noxen auf die Endothel- und Hepatomzellen untersucht. Dabei konnte eine stark verminderte Zellviabilität beider Zelllinien beobachtet werden, was zeigt, dass beide Noxen additiv schädigend wirken. Die Kombinationsbehandlung konnte demnach auch für weitere Untersuchungen auf die

Zellen angewandt werden.

Eine fibrotische Leber ist von einer erhöhten Proliferationsrate der verschiedenen Zellen gekennzeichnet (Gutierrez-Ruiz und Gomez-Quiroz, 2007). Es wurde daher untersucht, ob trotz verminderter Zellviabilität die Proliferationsrate der Hepatom- und Endothelzellen nach Behandlung mit TAA und Ethanol auch im In-vitro-Modell beeinflusst wurde.

Es konnte eine gesteigerte Proliferationsrate beider Zelllinien sowohl unter Mono- als auch unter Kombinationsbehandlung mit den Noxen gemessen werden. Eine gesteigerte Proliferationsrate von Hepatozyten nach Behandlung mit Ethanol im Maus-Modell wurde bereits von Ronis et al. beschrieben (Ronis et al., 2011). Die gesteigerte Proliferation von Endothelzellen nach Zugabe von Ethanol entsprach ebenfalls der erwarteten Reaktion: Das et al. zeigten im Maus-Modell eine gesteigerte pathologische Angiogenese in der fibrotischen Leber nach chronischem Alkoholkonsum (Das et al., 2012). Diese könnte auf eine gesteigerte Proliferation von Endothelzellen zurückzuführen sein.

Um Aufschluss über die nachgewiesene verminderte Zellviabilität bei gesteigerter Proliferationsrate zu geben, wurden in einem nächsten Schritt Nekrose- und Apoptoserate der Hepatom- und Endothelzellen untersucht. Nekrose beschreibt den Zelltod durch Destruktion der Zellmembran mit Austreten von Zellplasma aufgrund einer mechanischen, hypoxischen, thermischen oder toxischen Schädigung der Zelle und anschließend ausgelöster Inflammation (Golstein und Kroemer, 2007). Im Rahmen der Entwicklung einer Leberfibrose spielt der Zelltod von geschädigten Hepatozyten durch Nekrose oder Apoptose eine entscheidende Rolle (Bataller und Brenner, 2005; Neubauer et al., 2001). Dabei könnte ein durch die Behandlung mit den Noxen induzierter erhöhter Zellumsatz (gesteigerte Proliferations- und Nekroserate) im In-vitro-Modell Bedingungen analog zur fibrotischen Leber mit einer im Schnitt stark verkürzten Überlebenszeit der Hepatozyten simulieren (Mello et al., 2008). Wider Erwarten blieb die Nekroserate der Hepatomzellen nach Zugabe von Ethanol unbeeinflusst. Da es sich hierbei jedoch um ein Ergebnis mit großer Standardabweichung handelt, sollten die Untersuchungen wiederholt werden, um das Ergebnis zu bestätigen. Eine Behandlung mit TAA, sowie die Kombinationsgabe von TAA und Ethanol führten bei Tumor- und Endothelzellen sogar zu einer deutlich

verminderten Nekroserate. Es wird somit ein protektiver Effekt von TAA postuliert, der durch die gesteigerte Proliferationsrate der Zellen bekräftigt wird.

Um weitere Erkenntnisse darüber zu erlangen, wie TAA und Ethanol auf die Hepatom- und Endothelzellen wirken, wurde die Toxizität der Noxen auf die Zellen mithilfe des CytoTox-Assays untersucht. Dabei wurde, wie von Setshedi et al. beschrieben (Setshedi et al., 2010), ein zytotoxischer Effekt von Ethanol auf die Leberzellen erwartet. Dieser konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Wohingegen eine verminderte Zytotoxizität beider Zelltypen nach Zugabe von TAA in Mono- oder Kombinationstherapie gemessen wurde. Damit wurde gezeigt, dass das Karzinogen TAA keinen zytotoxischen Einfluss auf die Zellen hat. Die protektive Wirkung dieser Noxe auf die Hepatomzellen schützte diese unter Kombinationsbehandlung möglicherweise vor den zytotoxischen Effekten von Ethanol. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass die bei den Hepatomzellen gemessenen Werte der Zytotoxizität nach Zugabe von TAA im negativen Bereich lagen. Dies bestätigt entweder die postulierte protektive Wirkung von TAA oder ist darauf zurückzuführen, dass bereits vor der Messung alle Zellen abgetötet wurden. Da mit der gewählten Methode keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte und auch von anderen Forschungsgruppen bislang keine Daten über die mögliche protektive Wirkung von TAA vorliegen, sollte diese in weiterer Forschungsarbeit untersucht werden.

Da es in vorangegangenen Messungen zu einer verminderten Nekroserate der Hepatom- und Endothelzellen unter Einfluss von TAA und Ethanol kam, wurde nun in einem weiteren Schritt analysiert, ob die verminderte Viabilität der Zellen bei gleichzeitig gesteigerter Proliferationsrate durch eine erhöhte Apoptoserate verursacht wird. Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod und spielt eine wichtige Rolle in der Fibrogenese der Leber (Bataller und Brenner, 2005). Gesteigerte Apoptoseraten, wie sie in nahezu allen Arten von Fibrose zu finden sind (Johnson et al., 2013), konnten in dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden: Hepatomzellen verzeichneten nach Monogabe von TAA und Ethanol sogar verminderte Apoptoseraten. Es besteht die Möglichkeit, dass die hier verwendeten Tumorzellen nach Zugabe der Karzinogene eine Apoptoseresistenz entwickelten und das Tumorwachstum dadurch gefördert wurde. Dysregulationen von Apoptose sind charakteristisch für Karzinome (Hassan et al., 2014) und könnten daher auch hier eine Rolle

spielen. Aktivierte HSC können ebenfalls eine Apoptoseresistenz entfalten und somit ein profibrotisches Milieu in der geschädigten Leber aufrechterhalten (Novo et al., 2006). Eine gesteigerte Apoptoserate der Endothelzellen konnte nur unter Behandlung mit Ethanol nachgewiesen werden. Es wird postuliert, dass der Einfluss der Angiogenese auf die Fibrogenese durch eine vermehrte Apoptoserate der Endothelzellen und die damit induzierte Entzündungsreaktion ausgelöst wird (Johnson et al., 2013). Apoptose stellt jedoch nicht nur bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Fibrose, sondern auch bei der Regeneration der Leber im reversiblen Fibroestadium eine wichtige Rolle (Iredale et al., 1998). Somit widerspricht eine verminderte Apoptoserate nicht generell einem fibrotischen Milieu im In-vitro-Modell.

Da die Resultate des Apoptose-Assays nicht eindeutig waren, wurde im Folgenden ein spezifischer Abschnitt der Apoptose-Kaskade untersucht, um die pro/anti-apoptotischen Mechanismen weiter aufzuschlüsseln. Dazu wurde die Aktivität der Proteasen Caspase-3 und Caspase-7 untersucht, welche eine Schlüsselrolle bei der Apoptose-induktion in der Zelle einnehmen. Sie können sowohl über den extrinsischen- als auch über den intrinsischen Apoptose-Signalweg aktiviert werden und leiten als Effektor-Caspasen den programmierten Zelltod ein (Johnson et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte, unabhängig von der Schädigung, keine gesteigerte Caspase-3/7-Aktivität in Hepatomzellen detektiert werden. Dies widerspricht einer Studie von Chen et al., in welcher eine vermehrte Caspase-3-Aktivität mit gesteigerter Apoptoserate von hepatischen Epithelzellen nach Behandlung mit TAA gezeigt wurde (Chen et al., 2006). Andere Studien zeigten, dass es auch nach Zugabe von Ethanol zu einer gesteigerten Apoptoserate von Hepatozyten bei gesteigerter Caspase-3-Aktivität kam (Das et al., 2011; Kurose et al., 1997). Aufgrund der über mehrere Wochen erweiterten Inkubationszeit mit Ethanol in den genannten Studien, lässt sich jedoch kein direkter Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen ziehen.

TAA löste bei den Endothelzellen in Mono- und Kombinationsgabe mit Ethanol hingegen eine signifikant gesteigerte Caspase-3/7-Aktivität aus. Dies steht zunächst im Widerspruch mit der gemessenen verminderten Apoptoserate. Die Hypothese, dass Caspase-3 und -7 die Zelle ohne direkte Apoptoseinduktion über einen noch unbekanntem Mechanismus beeinflussen können, wurde bereits von anderen Forschergruppen

gestellt (Algeciras-Schimnich et al., 2002): Paulsen et al. beschrieben, dass es in proliferierenden T-Lymphozyten zu einer vermehrten Aktivitätssteigerung von Caspase-3 kam. Im Gegensatz zur disseminierten Verteilung der Proteasen in apoptotischen Zellen kam es zu einer Anreicherung der Caspasen in einem limitierten Abschnitt des Zytoplasmas bei proliferierenden Zellen. Es wird postuliert, dass der apoptotische Effekt dadurch ausbleiben könnte, dass die Caspasen in dem limitierten Zellkompartiment weniger Zugang zu proapoptotischen Substraten haben (Paulsen et al., 2008). Dieser Mechanismus könnte auch hier zugrunde liegen. Es ist des Weiteren anzunehmen, dass Caspasen unabhängig von der Apoptose-Signalkaskade aktiviert werden können und durch Ausschüttung inflammatorischer Zytokine in der Lage sind, den Zellmetabolismus zu schädigen (Algeciras-Schimnich et al., 2002; Hassan et al., 2014; Paulsen et al., 2008). Dies könnte die verminderte Zellviabilität der Endothelzellen nach Kombinationsbehandlung bei gesteigerter Proliferations-, aber verminderter Nekrose- und Apoptoserate erklären.

## 5.2 Funktionelle Untersuchungen

In den vorangegangenen Versuchen stellten sich die Mono- und Kombinationsgaben von TAA und Ethanol als potentiell geeignet dar, Leberfibrose *in vitro* zu simulieren. Es sollte nun weiter untersucht werden, welchen Einfluss die Toxine auf das funktionelle Verhalten der Hepatom- und Endothelzellen haben. Da es in einer fibrotischen Leber vermehrt zu Angiogenese und Metastasierung kommt (Kornek et al., 2008; Medina et al., 2004), wurde der Fokus auf diese Eigenschaften der Zellen gerichtet.

Die Fähigkeit von Endothelzellen zur Migration und Adhäsion spielt eine entscheidende Rolle im Prozess der Angiogenese (Valfre di Bonzo et al., 2009). Daher wurde sie in der vorliegenden Arbeit untersucht: Das Migrationsverhalten der Endothelzellen nach Behandlung mit Ethanol war hier im Vergleich zur Kontrolle nur geringfügig vermindert, im Vergleich zu den anderen Behandlungen jedoch deutlich gesteigert. In weiteren, hier nicht gezeigten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, konnte allerdings eine gesteigerte Migrationsfähigkeit der Endothelzellen nach Behandlung mit Ethanol nachgewiesen werden (Raskopf et al., 2013). Diese Tendenz wurde bereits von der Arbeitsgruppe Morrow et al. beschrieben, die eine gesteigerte Migration von HUVE-Zellen

(Endothelzellen humaner Umbilikalvenen) nach Inkubation mit 25 mM Ethanol zeigen konnten (Morrow et al., 2008).

Die Mono- und Kombinationsgabe von TAA führte hingegen zu einer deutlich verminderten Migrationsfähigkeit der Endothelzellen. Dies kann sich darin begründen, dass die Endothelzellen nach Schädigung mit dem Karzinogen nicht mehr zur Migration fähig sind, da sie zunächst das eigene Zellüberleben sichern müssen. Außerdem legt die Beurteilung der Mikroskopie besonders an Tag 2 der Messung nahe, dass es zu einem verfrühten Absterben der Zellen unter der TAA-Behandlung kommt. Dies steht zwar im Widerspruch mit den gemessenen verminderten Nekrose- und Apoptoseraten, ist jedoch ein Indiz dafür, dass die postulierte protektive Wirkung von TAA zumindest in der angewandten Dosierung demnach nicht auf die Funktionalität der Endothelzellen übertragbar ist.

Um das Angiogenesepotential der Endothelzellen nach Behandlung mit TAA und Ethanol weiter zu analysieren, wurde die Fähigkeit der Zellen zur Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen untersucht. Es konnte eine gesteigerte Bildung sogenannter „tubes“ nach Mono- und Kombinationsgabe von TAA und Ethanol beobachtet werden. Da es in der fibrotischen Leber, wie bereits in einigen Studien beschrieben, zu einem vaskulären Umbau und zur vermehrten Angiogenese kommt (Medina et al., 2004; Paternostro et al., 2010; Valfre di Bonzo et al., 2009), spricht dieses Ergebnis für das Gelingen der Fibroseinduktion *in vitro*. Morro et al. beschreiben ebenfalls eine gesteigerte Bildung gefäßähnlicher Strukturen von Endothelzellen nach Behandlung mit Ethanol (Morrow et al., 2008).

Des Weiteren wurde nun die Tumorigenität der Hepatomzellen nach Schädigung mit den Toxinen untersucht. Diese lässt sich *in vitro* darstellen, da Tumorzellen in der Lage sind auf Soft-Agar substratunabhängig zu wachsen und dreidimensionale Kolonien auszubilden. Dabei spricht eine gesteigerte Koloniebildung für eine erhöhte Tumorigenität der Hepatomzellen. Es wurde eine stark vermehrte Bildung klonaler Kolonien nach Schädigung der Hepatomzellen mit Ethanol gemessen. Die für den Metastasierungsprozess entscheidende Eigenschaft der Tumorzellen zur Bildung klonaler Kolonien fehlte jedoch bei Mono- und Kombinationsgabe von TAA. Es ist davon auszugehen, dass die

durch das Karzinogen geschädigten Hepatomzellen im Laufe des hier durchgeführten In-vitro-Experimentes abstarben. Somit waren am Tag der Messung nicht mehr ausreichend Zellen vorhanden, um Kolonien zu bilden. Dies lässt sich in der bei diesem Versuch verlängerten Inkubationszeit begründen. Dasgupta et al. fanden heraus, dass die kontinuierliche Gabe des Fibrose-Induktors TAA im In-vivo-Rattenmodell zur Entstehung von HCC führt (Dasgupta et al., 1981). In wiederholten Untersuchungen sollte daher eine Anpassung der TAA-Konzentration und/oder eine Verkürzung der Inkubationszeit erfolgen, um eine bessere Aussagekraft der Ergebnisse zu erzielen.

Neben der Fähigkeit klonale Kolonien zu bilden, hat auch die Fähigkeit zur interzellulären Adhäsion eine bedeutende Rolle während der Metastasierung. Es ist bekannt, dass Tumorzellen durch die Blutbahn zirkulieren und somit an einen neuen Ort im Organismus gelangen können. Sie heften dann über Zelladhäsionsmoleküle an Endothelzellen an und können anschließend in das umliegende Gewebe migrieren (Weiss et al., 1988).

Die Adhäsion der Tumorzellen an die Endothelzellen stellt daher einen wichtigen Schritt bei der Metastasierung in fremdes Gewebe dar. Um zu untersuchen, ob TAA und Ethanol diesen Prozess induzieren können, wurde eine Kokultur der Hepatom- und Endothelzellen angelegt. Das gesteigerte Metastasierungspotential der Hepatomzellen nach Behandlung mit Ethanol, wie es im vorangegangenen Versuch demonstriert wurde, konnte auch hier bestätigt werden. Es kam nach Monogabe dieser Noxe zu einer vermehrten Adhäsion von Hepatomzellen an Endothelzellen. Dies konnte durch die Arbeit einer anderen Studie bekräftigt werden: Lu et al. zeigten anhand einer Kokultivierung von Brustkrebszellen mit Endothelzellen eine gesteigerte Tumorangiogenese und ein vermehrtes Tumorwachstum unter dem Einfluss von Ethanol (Lu et al., 2014).

Für die Mono- und Kombinationsgabe von TAA konnte dieser Effekt hingegen nicht bestätigt werden. Die verminderte Zellviabilität und die Beurteilung der Durchlichtmikroskopie legten erneut den Verdacht nahe, dass die Zellen im Verlauf des Experimentes abstarben und die Dosierung von TAA für die funktionellen Untersuchungen angepasst werden sollte.

### 5.3 Analyse von profibrotischen Faktoren

Die bisherige Analyse der Ergebnisse zeigte, dass eine Behandlung von Hepatom- und Endothelzellen mit Mono- und Kombinationsgabe von TAA und Ethanol Fibrose *in vitro* induzieren konnte. Es wurde nun in weiteren Experimenten überprüft, welche molekularen Mechanismen den gemessenen Veränderungen der Zellviabilität, des Zellzyklus und des funktionellen Verhaltens der Hepatom- und Endothelzellen zugrunde liegen. Dafür wurde mithilfe von ELISAs analysiert, inwiefern eine Schädigung mit TAA und Ethanol Auswirkungen auf die intrazelluläre Signaltransduktion und auf inflammatorische Zelladhäsionsmoleküle hat. Der Fokus wurde dabei auf Faktoren gelegt, die während der Fibrogenese von Bedeutung sind und zu einem protumoralen Milieu beitragen.

Da die vorhergehenden Untersuchungen gezeigt haben, dass TAA und Ethanol das Zellüberleben beeinflussen, wurde zunächst untersucht, ob dies durch eine veränderte Phosphorylierung des intrazellulären Signaltransduktionsproteins AKT induziert wird. AKT spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellzyklus und eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung des Proteins spricht für eine erhöhte Zellaktivität (Kunter et al., 2014).

TAA führte in Mono- und in Kombinationsgabe mit Ethanol zu einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung von AKT in den untersuchten Hepatom- und Endothelzellen. Dies spricht für eine gesteigerte Aktivität in den Zellen und unterstreicht eine Veränderung des Zellmetabolismus unter TAA-Behandlung. Auch wenn pleiotrope Effekte der Kinase in Hepatomzellen festgestellt wurden (Alexia et al., 2006), wird pAKT eine profibrotische Wirkung zugesprochen (Kattla et al., 2008; Qin et al., 2013). Dass die Konzentration der phosphorylierten, aktiven Form in HCC-Tumorzellen deutlich höher ist als in gesunden Zellen, unterstützt diese Theorie (Kunter et al., 2014).

Auch die Monogabe von Ethanol führte zu einer gesteigerten Phosphorylierung von AKT und somit zu einem erhöhten Aktivitätsniveau der Hepatom- und Endothelzellen. Eine vermehrte Phosphorylierung und somit Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle ist in einer fibrotischen Leber zu erwarten (Mello et al., 2008).

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, welche molekularen Mechanismen der gemessenen Veränderung im Zellumsatz durch gesteigerte Proliferations- und meist

verminderte Nekrose- und Apoptoseraten zugrunde liegen. Hierzu wurde zunächst untersucht, ob es zu einer veränderten Phosphorylierung von JNK kam. JNK spielt eine entscheidende Rolle in der proapoptotischen Signalkaskade (Bataller und Brenner, 2005; Schwabe et al., 2004).

Die gemessenen verminderten Phosphorylierungen von JNK nach Schädigung der Hepatomzellen mit TAA und Ethanol passen somit zu den in dieser Arbeit gemessenen verminderten Apoptoseraten. Dies ist ein weiteres Indiz für die postulierte Apoptose-resistenz der Tumorzellen. Zhao et al. beschreiben in ihrer Studie eine Herunterregulierung von JNK durch das zytoplasmatische Protein Stathmin, welches die Polymerisierung von Mikrotubuli reguliert. Die verminderte Phosphorylierung von JNK führt zu einer Apoptoseresistenz der Hepatozyten und kann somit Zellüberleben und Tumorwachstum potentiell fördern (Zhao et al., 2014).

Die Untersuchungen der Endothelzellen nach Schädigung mit den Toxinen zeigten jedoch, dass es zu vermehrter Phosphorylierung von JNK kam. Dabei korrelierte die gesteigerte Konzentration von pJNK mit der gesteigerten Apoptoserate der Endothelzellen nach Monogabe von Ethanol.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessene gesteigerte Phosphorylierung von JNK bei gleichzeitig geminderter Apoptoserate der Endothelzellen nach Mono- und Kombinationsgabe von TAA lässt annehmen, dass pJNK hier über einen anderen Mechanismus in der Zelle wirkt. Es wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben, dass JNK in HSC die Sekretion inflammatorischer Zytokine induziert (Schwabe et al., 2001). Eine vermehrte Aktivierung von JNK-2 und eine daraus resultierende vermehrte Expression proinflammatorischer Proteine wurde auch von Yeligar et al. nach Behandlung von humanen Endothelzellen mit 100 mM Ethanol gezeigt (Yeligar et al., 2009). Dieser Mechanismus könnte auch hier vorliegen.

Neben der gesteigerten Proliferationsrate der Hepatom- und Endothelzellen, wurde in den vorangegangenen Untersuchungen auch ein profibrotisches funktionelles Verhalten der Zellen detektiert. Um Aufschluss darüber zu gewinnen, welche Moleküle daran beteiligt waren, wurde zunächst die Aktivität von ERK1/ERK2 mithilfe eines ELISA-Assays analysiert. ERK1/ERK2 gehören zu den MAP-Kinasen und regulieren über intrazelluläre Signaltransduktionswege Zellproliferation, -wachstum und -differenzierung. Es konnte

gezeigt werden, dass ERK die Proliferation und Migration von HSC induziert, welche aus einer zuvor *in vivo* geschädigten murinen Leber isoliert wurden (Marra et al., 1999).

So ist die gesteigerte Proliferationsrate der Hepatomzellen nach Behandlung mit Ethanol durch die erhöhte Konzentration an phosphoryliertem ERK1/ERK2 zu erklären.

Unter Zugabe von TAA in Mono- und Kombinationsbehandlung zu den Hepatomzellen kam es hingegen zu einer verminderten Aktivierung von ERK1/ERK2. Dies bestätigt die Ergebnisse von Marra et al., die beschreiben, dass eine geringe Schädigung der Zellen die Konzentration an phosphoryliertem ERK erhöht, eine starke Schädigung diese jedoch vermindert. Es kam dabei zu einer vermehrten Aktivierung von ERK innerhalb der ersten 6 h nach toxischer Zellschädigung mit CCl<sub>4</sub> (Tetrachlormethan) und zu einer ebenfalls verminderten Phosphorylierung des Signalmoleküls nach 72 h (Marra et al., 1999). Die geringere Aktivierung von ERK1/ERK2 resultiert in einer verminderten Zelldifferenzierung und liegt bei der Behandlung von Tumorzellen mit einem Karzinogen nahe.

Die Untersuchung der Endothelzellen ergab, dass die Behandlung mit TAA oder Ethanol die Phosphorylierung von ERK1/ERK2 steigerte. Dies korreliert mit der vorbeschriebenen erhöhten Proliferationsrate und impliziert ein gesteigertes Angiogenesepotential der Endothelzellen im In-vitro-Fibrose-Modell. Die in den vorangegangenen Versuchen demonstrierte vermehrte Bildung gefäßähnlicher Strukturen nach Schädigung mit den Noxen konnte dabei ebenfalls auf die gesteigerte Phosphorylierung von AKT und ERK1/ERK2 zurückgeführt werden. Es ist bekannt, dass vermehrt aktivierte Signalmoleküle intrazelluläre Signalkaskaden induzieren und diese entscheidend zur Angiogenese beitragen (Valfre di Bonzo et al., 2009; Wang et al., 2014).

Neben ERK1/ERK2 wird auch P38 MAPK eine bedeutende Rolle bei zu profibrotischen Effekten führenden intrazellulären Signalkaskaden zugeschrieben. Die MAP-Kinase ist ein wichtiges Signaltransduktionsprotein in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose (Tsukada et al., 2006). Für die hier eingesetzten Hepatom- und Endothelzellen konnte im Zuge dieser Arbeit bereits ein zum Teil pro-apoptotischer Effekt von TAA und Ethanol nachgewiesen werden. Ob dies durch eine vermehrte Phosphorylierung von P38 MAPK induziert wurde, sollte daher im weiteren Verlauf untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass es zu einer gesteigerten Phosphorylierung von P38 MAPK in Hepatomzellen nach Monogabe von TAA und Ethanol kam. Die Toxine hatten in Kombination einen additiven

Effekt und führten zu einer stark gesteigerten Phosphorylierung von P38 MAPK. Das Ergebnis korreliert mit der gemessenen gesteigerten Apoptoserate der Hepatomzellen unter Kombinationsbehandlung und legt nahe, dass P38 MAPK in diesen Zellen Apoptose induziert.

Dies konnte ebenso für die hier verwendeten Endothelzellen gezeigt werden: Nach Behandlung mit Ethanol konnte sowohl eine gesteigerte Apoptoserate der Endothelzellen- als auch eine vermehrte Phosphorylierung von P38 MAPK nachgewiesen werden. Dass Ethanol zu einer gesteigerten Phosphorylierung von P38 MAPK führt, zeigte auch eine Studie von Yeligar et al.: Die Schädigung muriner LSEC mit Ethanol führte zu einer Aktivitätssteigerung des Signalmoleküls und zu einer daraus resultierenden vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Yeligar et al., 2009). Des Weiteren wird postuliert, dass die MAP-Kinase neben Apoptose auch Zellmigration und Invasion regulieren kann (Koul et al., 2013). Dies könnte die in Endothelzellen gemessene stark erhöhte Konzentration von pP38 MAPK nach Monogabe von TAA und Kombinationsgabe mit Ethanol trotz verminderter Apoptoserate erklären. Dass es trotz gesteigerter Phosphorylierung von P38 MAPK unter Behandlung mit TAA nicht zu einer erhöhten Migration von Endothelzellen kam, ist darauf zurückzuführen, dass sich TAA für die funktionellen Untersuchungen aufgrund einer zu starken Schädigung der Zellen als ungeeignet herausstellte. Ob eine vermehrte Phosphorylierung von P38 MAPK in durch TAA geschädigten Endothelzellen mit einem gesteigerten Angiogenesepotential einhergeht, muss daher in weiterer Forschungsarbeit geklärt werden.

Die gemessene gesteigerte Phosphorylierung intrazellulärer, an der Fibrogenese beteiligter Signalmoleküle nach toxischer Schädigung der Hepatom- und Endothelzellen spricht für eine gesteigerte Zellaktivität, wie sie für eine fibrotische Leber charakteristisch ist (Gutierrez-Ruiz und Gomez-Quiroz, 2007; Mello et al., 2008).

Neben einer gesteigerten Zellaktivität nach chronischer Schädigung, beeinflusst auch der Sauerstoffgehalt der Zellen deren Überleben. Im Rahmen der Fibrogenese entsteht dabei ein hypoxisches Milieu (Ji et al., 1982). Hypoxie ist zudem ein Hauptstimulationsfaktor für die Ausbildung neuer Gefäße (Paternostro et al., 2010).

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit TAA und Ethanol Hypoxie im In-vitro-Modell mit Hepatom- und Endothelzellen auslösen bzw. beeinflussen. Es wurde

durch die Analyse von Hypoxie-induzierten Faktoren untersucht, ob die vorbeschriebene gesteigerte Fähigkeit der Endothelzellen zur Migration und zur Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen auf ein durch die Schädigung induziertes hypoxisches Milieu zurückzuführen war.

Dazu wurde zunächst intrazelluläres HIF-1 $\alpha$  analysiert, da der Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle in der durch Hypoxie induzierten Angiogenese spielt. Eine vermehrte HIF-1 $\alpha$ -Expression stimuliert nicht nur die (Tumor-) Angiogenese, sondern auch Fibrogenese und Inflammation. Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor in der fibrotischen Leber unter oxidativem Stress hochreguliert wird (Moon et al., 2009; Salceda und Caro, 1997): Die Spaltung von HIF-1 $\alpha$  im Zytoplasma wird gehemmt und der Transkriptionsfaktor transloziert in den Zellkern (Cash et al., 2007; Salceda und Caro, 1997). Dort bindet HIF-1 $\alpha$  an HRE (HIF-responsive Element) und aktiviert die Transkription profibrotischer Gene (Cannito et al., 2014). Die Untersuchung des intrazellulären HIF-1 $\alpha$  zeigte, dass es nach Behandlung der Endothelzellen mit Ethanol zu einem verminderten Abbau des Transkriptionsfaktors kam. Dieses Ergebnis wurde in LSEC bereits von anderen Arbeitsgruppen nach Behandlung von Ratten mit Ethanol gezeigt (Yeligar et al., 2009a, 2009b). Da Ethanol in fibrotischen Lebern Hypoxie induziert (Das et al., 2012), konnte bestätigt werden, dass sich das Toxin gut zur Fibroseinduktion im In-vitro-Modell eignet.

Die Untersuchungen der Effekte von TAA in Mono- und Kombinationsgabe, sowie die Untersuchung der Hepatomzellen, ergaben hingegen eine verminderte Konzentration des Transkriptionsfaktors. Dies lässt einen gesteigerten intrazellulären Abbau von HIF-1 $\alpha$  vermuten. Die gemessenen Ergebnisse könnten sich allerdings auch dadurch erklären lassen, dass HIF-1 $\alpha$  nach der Zellschädigung zwar weniger abgebaut wird, sich jedoch nicht im Zytoplasma, sondern im Zellkern akkumuliert und sich somit der Detektierbarkeit des ELISA-Assays entzieht (Coppole et al., 2011). Auch vorstellbar ist, dass es in den hier untersuchten Zellen durch eine zu starke Schädigung zur Anoxie kam. Die Zellen wären unter dieser Bedingung dann nicht mehr in der Lage, den Abbau von Transkriptionsfaktoren zu inhibieren. Um eine bessere Aussagekraft der Ergebnisse zu erzielen, sollte in weiteren Versuchen durch Zellkernfraktionierung die Bindung von HIF-1 $\alpha$  an HRE gemessen werden.

Die Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  führt zur Transkription des proangiogenen Wachstumsfaktors VEGF. Dieser wird von hypoxischen Zellen sezerniert und aktiviert seinerseits Endothelzellen, neue Blutgefäße auszubilden. Es wird postuliert, dass eine HIF-1 $\alpha$  gesteuerte VEGF-Hochregulierung entscheidenden Einfluss auf Angiogenese, Fibrogenese und deren Korrelation in der Leber hat (Copple et al., 2011; Moon et al., 2009; Novo et al., 2007; Tang et al., 2004). Der Wachstumsfaktor gehört somit zu den Hauptfaktoren nicht nur der Angiogenese, sondern auch der Fibrogenese (Corpechot et al., 2002; Rosmorduc und Housset, 2010).

Um dies weiter zu beleuchten, wurde nun der Effekt von TAA und Ethanol auf den VEGF-Gehalt in Hepatom- und Endothelzellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass VEGF im Zelllysats nach Behandlung der Hepatomzellen mit TAA stark erhöht war. Dies weist auf ein durch das Karzinogen gefördertes hypoxisches Milieu hin. Der Anstieg steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine vermehrte VEGF-Expression im Rahmen der Hepatokarzinogenese beschreiben: Park et al. untersuchten die VEGF-Expression in von Patienten mit chronischer Lebererkrankung isolierten Tumoren. Dabei wurden niedrig- und hochgradig dysplastische Knoten sowie gut- und schlecht differenzierte HCC-Zellen miteinander verglichen. Es konnte eine deutliche Zunahme der VEGF-Expression mit jedem Schritt der Hepatokarzinogenese nachgewiesen werden (Park et al., 2000). Auch von Marschall et al. zeigten einen gesteigerten VEGF-Gehalt humaner HCC-Zellen im Vergleich zu gesundem Lebergewebe (von Marschall et al., 2001). Xu et al. hingegen beschreiben eine verminderte VEGF-Expression in durch TAA induzierter Zirrhose in Ratten (Xu et al., 2008). Ein Anstieg von VEGF ohne Aktivitätssteigerung von HIF-1 $\alpha$ , wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist vermutlich durch eine HIF-1 $\alpha$  unabhängige Induktion der VEGF-Expression zu erklären. Dabei könnte die Induktion der VEGF-Expression z. B. mittels HIF-2 $\alpha$  eine Rolle spielen (Copple et al., 2009).

Die verminderte Konzentration von VEGF im Zellüberstand lässt sich durch eine reduzierte Zellviabilität der Hepatomzellen unter TAA erklären: Weniger vitale Zellen sezernieren insgesamt weniger VEGF. Akiyoshi et al. fanden ebenfalls heraus, dass bei Patienten mit Leberzirrhose eine deutlich reduzierte VEGF-Konzentration im Serum vorliegt, was auf eine verminderte Sekretion der Zellen zurückgeführt werden kann (Akiyoshi et al., 1998).

Des Weiteren wurde von Lu et al. beschrieben, dass Ethanol die VEGF-Expression in Brustkrebszellen im Mausmodell und *in vitro* induziert (Lu et al., 2014). Eine gesteigerte VEGF-Konzentration nach Ethanolbehandlung der Hepatomzellen konnte jedoch weder im Zelllysat noch im Zellüberstand bestätigt werden. Dies lässt vermuten, dass TAA eine stärkere hypoxische Wirkung auf die Zellen hatte als das Toxin Ethanol.

Die Kombinationsbehandlung der Hepatomzellen mit TAA und Ethanol beeinflusste die intrazelluläre VEGF-Konzentration und Sekretion hingegen nicht. Es gibt deutlich mehr Studien, die einen Anstieg von VEGF und dessen profibrotische, proangiogene Wirkung belegen (Corpechot et al., 2002; Kornek et al., 2006; Yoshiji et al., 2004). Daher ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit unveränderte intrazelluläre Konzentration sowie die verminderte VEGF-Sekretion darauf zurückzuführen sind, dass die Viabilität der Hepatomzellen nach Inkubation mit den Toxinen stark abgenommen hat. Der reduzierte extrazelluläre VEGF-Gehalt bietet auch eine Erklärung für die vorbeschriebene verminderte Phosphorylierung von JNK und ERK1/ERK2, da die intrazellulären Signalkaskaden durch Bindung von VEGF an die korrespondierenden Rezeptoren induziert werden (Novo et al., 2007; Rosmorduc und Housset, 2010; Zachary, 2003).

Im Gegensatz dazu führte die Schädigung der Endothelzellen mit TAA und Ethanol in Mono- und Kombinationsgabe zu erhöhten intrazellulären VEGF-Konzentrationen. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen u. a. von Yoshiji et al., die eine vermehrte VEGF-mRNA-Expression in fibrotischen Lebern nach Schädigung mit CCl<sub>4</sub> im In-vivo-Modell mit BALB/c-Mäusen beschreiben (Yoshiji et al., 2003). Das vorliegende In-vitro-Modell mit Schädigung der Endothelzellen durch Ethanol ist somit in sich schlüssig: Das erhöhte Angiogenesepotential ist auf die gesteigerten Konzentrationen von HIF-1 $\alpha$  und VEGF und auf die dadurch induzierten intrazellulären Signalkaskaden zurückzuführen (Corpechot et al., 2002; Medina et al., 2004; Moon et al., 2009; Rosmorduc und Housset, 2010).

Warum VEGF im Zellüberstand der Endothelzellen bei Monogabe von TAA trotz unveränderter Zellviabilität sank, ist unklar. Eine Schädigung des Zellmetabolismus der Endothelzellen durch TAA, die sich zwar noch nicht auf die Viabilität-, aber auf die Genexpression der Zellen auswirkt, liefert eine plausible Erklärung. Eine verminderte Expression der Wachstumsfaktoren resultiert letztlich in einer verminderten Sekretion der Faktoren.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TAA und Ethanol Einfluss auf proangiogene Faktoren in Hepatom- und Endothelzellen haben, wurde des Weiteren untersucht, ob an der Metastasierung beteiligte Faktoren ebenfalls durch die Toxine beeinflusst werden. Dazu wurden die proinflammatorischen Zelladhäsionsmoleküle VCAM und ICAM untersucht, die eine wichtige Rolle beim Metastasierungsprozess des HCC spielen (Zhu und Gong, 2013). Eine gesteigerte Konzentration von VCAM und ICAM konnte nach Schädigung der Hepatomzellen mit TAA und Ethanol auch in der vorliegenden Arbeit gemessen werden. Dabei wirkte sich die Kombinationsgabe der Toxine additiv schädigend auf die Zellen aus und führte zu einer stark erhöhten ICAM-Konzentration. Dies stimmt mit den Daten von Kornek et al. überein, die ebenfalls eine gesteigerte ICAM-Expression im Mausmodell nach Gabe von TAA und Ethanol messen konnten (Kornek et al., 2006). Das et al. beschreiben außerdem eine Hochregulierung von VCAM und ICAM in der Leber von Ratten nach chronischer Schädigung mit Ethanol (Das et al., 2010). Die Ergebnisse legen nahe, dass es nach Schädigung mit TAA und Ethanol zu einem erhöhten Metastasierungspotential der Hepatomzellen aufgrund einer gesteigerten ICAM-Aktivierung kommt. Somit werden die Ergebnisse der vorangegangenen funktionellen Versuche zur Tumorigenität der Hepatomzellen nach Zugabe von Ethanol bekräftigt.

Dass es trotz signifikant erhöhter ICAM-Konzentration nach Mono- und Kombinationsgabe von TAA nicht zu einer vermehrten Zell-Zell-Adhäsion während der Kokultivierung kam, bestätigt den Verdacht, in TAA nicht das geeignete Toxin für die funktionellen Untersuchungen gewählt zu haben.

Aufgrund des bestätigten pro-metastatischen Effekts auf Hepatomzellen, wurde in einem weiteren Schritt untersucht, inwieweit TAA und Ethanol Auswirkungen auf Zelladhäsionsmoleküle in Endothelzellen haben. In einer fibrotischen Leber kommt es durch proliferierende Endothelzellen zu einer vermehrten Expression der Zelladhäsionsmoleküle VCAM und ICAM (Tugues et al., 2007). TAA konnte in Mono- und Kombinationsgabe eine erhöhte ICAM-Expression in Endothelzellen induzieren, während die VCAM-Expression herunterreguliert wurde. Cook-Mills et al. beschreiben, dass das Zelladhäsionsmolekül VCAM im inflammatorischen Milieu vermehrt exprimiert wird und die Rekrutierung von Leukozyten fördert (Cook-Mills et al., 2011). Die verminderte VCAM-Konzentration steht im Gegensatz dazu und zeigt an, dass die Toxine keine klassische Entzündungsreaktion der Endothelzellen *in vitro* hervorrufen.

#### 5.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigte sich, dass die in dieser Arbeit getesteten Mono- und Kombinationsgaben von Thioacetamid und Ethanol im Prinzip gut dazu geeignet sind, Leberfibrose *in vitro* zu simulieren. Die verwendeten Toxine bewirkten eine gesteigerte Aktivierung von Endothelzellen analog zu einer fibrotischen Leber mit vaskulärem Umbau. Auch eine verstärkte Aktivierung von Hepatomzellen, die mit gesteigertem Wachstums- und Metastasierungspotential einhergeht, wurde nachgewiesen.

Der Einsatz von TAA sowie die Kombination aus TAA und Ethanol muss jedoch überdacht werden. Die Zellen wurden höchstwahrscheinlich zu stark geschädigt und es kam zu ihrem verfrühten Absterben. Da dieser Effekt in dem anfangs durchgeführten MTT-Test nicht detektiert wurde, ist die Anwendung dieses Assays zu überdenken. In weiteren Untersuchungen sollte die Zellviabilität daher mithilfe eines alternativen Assays gemessen werden, um eine genauere Aussage über den Effekt der Behandlung mit TAA und Ethanol auf das Überleben der Hepatom- und Endothelzellen erlangen zu können. Dadurch, dass die Zellen im Rahmen dieser Arbeit verfrüht abstarben, konnten darauffolgende Untersuchungen beeinflusst werden. Die geeignete Dosierung der Toxine wurde vor Beginn der Arbeit einzeln ausprobiert und sorgfältig gewählt. Sie sollte dabei so stark sein, eine gewünschte Aktivitätssteigerung der Zellen auslösen zu können, ohne ein verfrühtes Absterben der Zellen zu bewirken. Eine niedrigere Dosierung von TAA und/oder eine kürzere Inkubationszeit hatten dabei zu geringe Effekte auf die Zellen zur Folge (eigene nicht gezeigte Daten). Es ist daher anzunehmen, dass sich das für In-vivo-Fibrose-Modelle bewährte TAA nicht optimal auf ein In-vitro-Modell übertragen lässt. Zur Induktion der Leberfibrose *in vivo* sind neben TAA auch andere Toxine etabliert (Popov und Schuppan, 2009; Wallace et al., 2008). Eine Übertragung von beispielsweise CCl<sub>4</sub> oder DENA (Diethylnitrosamin) auf ein Modell mit Hepa129-, und SVEC4-10-Zellen *in vitro* könnte in weiteren Versuchen als Alternative zu dem vorliegenden TAA-induzierten In-vitro-Leberfibrose-Modell getestet werden.

Die Kombination von TAA und Ethanol hat sich in In-vivo-Modellen gegenüber der alleinigen TAA-Gabe zur Fibrose-Induktion durchgesetzt (Kornek et al., 2006).

Eine Übertragung dieses Modells in *in vitro* führte jedoch zu einer zu starken Schädigung

der Zellen. Zur Feinmodulation müssten die geeigneten Dosierungen von TAA und Ethanol in gemeinsamer Anwendung austitriert- und der Zellviabilität angepasst werden. Auch hier wäre eine Kombination von Ethanol mit CCl<sub>4</sub> oder DENA vorstellbar und könnte in weiteren Untersuchungen getestet werden. Da das vorliegende In-vitro-Modell in vielen Aspekten ein fibrotisches Milieu simulieren konnte, ist eine genauere Anpassung lohnenswert.

Die Etablierung des In-vitro-Fibrose-Modells unter Verwendung von Ethanol als Monogabe gelang einwandfrei. Ethanol förderte die Aktivierung der Hepa129- und SVEC4-10-Zellen und steigerte den Zellumsatz analog zu einer fibrotischen Leber.

Die proangiogene Wirkung von Ethanol auf humane Endothelzellen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Gu et al., 2001; Morrow et al., 2008). Die in dieser Arbeit gezeigten Daten bestätigen die proangiogene Wirkungsweise.

Das hiermit etablierte In-vitro-Fibrose-Modell wurde von unserer Arbeitsgruppe für weitere Experimente verwendet und fand Eingang in einer Veröffentlichung (Raskopf et al., 2014).

## **5.5 Ausblick**

Um eine Verbesserung des etablierten In-vitro-Fibrose-Modells zu erreichen, könnte CCl<sub>4</sub> oder DENA anstelle von TAA ergänzend zu Ethanol eingesetzt werden. Es sollte geprüft werden, ob sich diese Toxine ebenso zur Fibroseinduktion eignen, sich jedoch besser auf das Zellüberleben der Hepatom- und Endothelzellen auswirken als Thioacetamid und somit verlässlichere Ergebnisse erzielen können.

In einem weiteren Schritt könnten auf der Kokultivierung der beiden Zelllinien aufbauende Experimente durchgeführt werden: Anhand eines von Khodarev et al. bereits etablierten Modells für die Kokultivierung von Gliom-Tumorzellen mit humanen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Tumor-induzierten Aktivierung der Endothelzellen kam. Des Weiteren war die Bildung gefäßähnlicher Strukturen im Vergleich zur Kontrolle in der Kokultur deutlich gesteigert (Khodarev et al., 2003). Funktionelle Untersuchungen zum Verständnis der Wechselwirkung zwischen Hepa129- und SVEC4-10-Zellen könnten in Anlehnung dazu mittels Kokultivierung der Zellen durchgeführt werden. So könnten weitere Erkenntnisse über die Zusammenhänge

zwischen Fibrogenese und Angiogenese anhand des In-vitro-Leberfibrose-Modells gewonnen werden.

Unter Berücksichtigung der Publikationen zum Thema Leberfibrose-Modelle, stellen sich die in dieser Arbeit ermittelten Daten als geeignet heraus, Basis für weitere Untersuchungen zu sein. Dabei ist das in dieser Arbeit etablierte In-vitro-Fibrose-Modell mit Ethanol als Fibrose-Induktor zu bevorzugen.

So kann beispielsweise untersucht werden, inwieweit die Genexpression relevanter Faktoren in Hepatom- und Endothelzellen im Rahmen der Fibrogenese beeinflusst wird. In einem nächsten Schritt könnte dann die Blockade einzelner profibrotischer Faktoren anhand des etablierten Modells getestet werden. Für die Blockierung würde sich besonders eine Therapie mittels RNA-Interferenz mithilfe von „small interfering“-Ribonukleinsäure (siRNA) und/oder Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) anbieten, wie sie in unserer Arbeitsgruppe bereits an ungeschädigten Hepa129- und SVEC4-10-Zellen erfolgreich Anwendung fand (Raskopf et al., 2008).

Daraus resultierende Erkenntnisse könnten neue, gezielte und dringend notwendige Therapiemöglichkeiten der Leberfibrose, und somit auch des HCC, aufzeigen.

## 6. Zusammenfassung

Leberfibrose ist eine Krankheit mit hoher Inzidenz, die einen Hauptrisikofaktor für die Entwicklung des Hepatozellulären Karzinoms darstellt. Bislang stehen fast ausschließlich palliative Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung, sodass noch großer Forschungsbedarf auf diesem Gebiet besteht. Für die Entwicklung neuer Therapien müssen zunächst die molekularen Pathomechanismen der Fibrogenese und der damit assoziierten Angiogenese weiter aufgeschlüsselt werden. Untersuchungen dieser Art wurden bislang meist an gesunden Leber- und Gefäßzellen durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines In-vitro-Leberfibrose-Modells, um genauere Erkenntnisse über die Auswirkungen einer toxischen Schädigung auf Hepatom- und Endothelzellen zu gewinnen. Das In-vitro-Modell sollte weiterhin die Testung von Medikamenten im fibrotischen Milieu ermöglichen.

Die Schädigung der Zellen erfolgte in Anlehnung an ein bereits etabliertes In-vivo-Fibrose-Modell mit den Karzinogenen Thioacetamid und Ethanol.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass es zu einer verminderten Zellviabilität nach Behandlung mit den Toxinen kam. Erhöhte Proliferations- und Apoptoseraten sprachen außerdem für einen vermehrten Zellumsatz wie in einer fibrotischen Leber. Des Weiteren konnten durch funktionelle Untersuchungen deutliche Effekte der Noxen auf die funktionalen Eigenschaften der jeweiligen Zelltypen detektiert werden. Ethanol steigerte dabei die Bildung klonaler Zellkolonien der Tumorzellen und deren Fähigkeit an Endothelzellen zu adhären. Außerdem konnte eine vermehrte Bildung gefäßähnlicher Strukturen der Endothelzellen sowie deren gesteigertes Migrationsverhalten nach Schädigung mit Ethanol nachgewiesen werden. Die Untersuchung korrespondierender intrazellulärer Signalkaskaden sowie die Untersuchung von Hypoxie-induzierten Faktoren und von Zelladhäsionsmolekülen bestätigten die Etablierung eines proangiogenen und prometastatischen Milieus.

Insgesamt zeigten sich die Toxine zur Fibroseinduktion geeignet, wobei die Behandlung mit Ethanol derjenigen mit Thioacetamid vorzuziehen ist. Der im In-vivo-Modell gezeigte Vorteil einer Kombinationsbehandlung mit den Karzinogenen konnte in dieser Arbeit aufgrund eines gesteigerten Absterbens der Zellen nicht bestätigt werden. Vor allem aber die Schädigung mit Ethanol kann in weiterführenden Versuchen als Grundlage zur Optimierung von neuen Therapien genutzt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

Akiyoshi F, Sata M, Suzuki H, Uchimura Y, Mitsuyama K, Matsuo K, Tanikawa K. Serum vascular endothelial growth factor levels in various liver diseases. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 41-45

Alexia C, Bras M, Fallot G, Vadrot N, Daniel F, Lasfer M, Tamouza H, Groyer A. Pleiotropic effects of PI-3' kinase/Akt signaling in human hepatoma cell proliferation and drug-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1090: 1-17

Algeciras-Schimnich A, Barnhart BC, Peter ME. Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 721-726

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218

Beljaars L, Weert B, Geerts A, Meijer DK, Poelstra K. The preferential homing of a platelet derived growth factor receptor-recognizing macromolecule to fibroblast-like cells in fibrotic tissue. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1307-1317

Bode C, Bode JC. Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol? *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 166-171

Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127: 5-16

Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 2002; 1: 1-17

Cannito S, Paternostro C, Busletta C, Bocca C, Colombatto S, Miglietta A, Novo E, Parola M. Hypoxia, hypoxia-inducible factors and fibrogenesis in chronic liver diseases. *Histol Histopathol* 2014; 29: 33-44

Cao S, Yaqoob U, Das A, Shergill U, Jagavelu K, Huebert RC, Routray C, Abdelmoneim S, Vasdev M, Leof E, Charlton M, Watts RJ, Mukhopadhyay D, Shah VH. Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF-beta signaling in hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2010; 120: 2379-2394

Cash TP, Pan Y, Simon MC. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 1219-1225

Chen JA, Shi M, Li JQ, Qian CN. Angiogenesis: multiple masks in hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *Hepatol Int* 2010; 4: 537-547

Chen LH, Hsu CY, Weng CF. Involvement of P53 and Bax/Bad triggering apoptosis in thioacetamide-induced hepatic epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5175-5181

Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 1607-1638

Copple BL, Bai S, Burgoon LD, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates the expression of genes in hypoxic hepatic stellate cells important for collagen deposition and angiogenesis. *Liver Int* 2011; 31: 230-244

Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP, Kim ND, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int* 2009; 29: 1010-1021

Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35: 1010-1021

Costa R, Carneiro A, Rocha A, Pirraco A, Falcao M, Vasques L, Soares R. Bevacizumab and ranibizumab on microvascular endothelial cells: A comparative study. *J Cell Biochem* 2009; 108: 1410-1417

Das SK, Mukherjee S, Vasudevan DM. Effects of long-term ethanol consumption mediated oxidative stress on neovessel generation in liver. *Toxicol Mech Methods* 2012; 22: 375-382

Das SK, Mukherjee S, Vasudevan DM. Effects of long-term ethanol consumption on cell death in liver. *Indian J Clin Biochem* 2011; 26: 84-87

Das SK, Mukherjee S, Vasudevan DM. Effects of long-term ethanol consumption on adhesion molecules in liver. *Indian J Exp Biol* 2010; 48: 394-401

Dasgupta A, Chatterjee R, Chowdhury JR. Thioacetamide-induced hepatocarcinoma in rat. *Oncology* 1981; 38: 249-253

Deleve LD, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology* 2008; 48: 920-930

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127: 35-50

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917

Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 37-43

Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: 793-807

Gu JW, Elam J, Sartin A, Li W, Roach R, Adair TH. Moderate levels of ethanol induce expression of vascular endothelial growth factor and stimulate angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: 365-372

Gutierrez-Ruiz MC, Gomez-Quiroz LE. Liver fibrosis: searching for cell model answers. *Liver Int* 2007; 27: 434-439

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *Biomed Res Int* 2014; 2014: ID 150845

Heidelbaugh JJ, Sherbondy M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. *Am Fam Physician* 2006; 74: 767-776

Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007; 46: 955-975

Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; 95: 365-377

Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549

Ji S, Lemasters JJ, Christenson V, Thurman RG. Periportal and pericentral pyridine nucleotide fluorescence from the surface of the perfused liver: evaluation of the hypothesis that chronic treatment with ethanol produces pericentral hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 5415-5419

Johnson A, DiPietro LA. Apoptosis and angiogenesis: an evolving mechanism for fibrosis. *FASEB J* 2013; 27: 3893-3901

Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 2007; 282: 22089-22101

Kattla JJ, Carew RM, Heljic M, Godson C, Brazil DP. Protein kinase B/Akt activity is involved in renal TGF-beta1-driven epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: 215-225

Khodarev NN, Yu J, Labay E, Darga T, Brown CK, Mauceri HJ, Yassari R, Gupta N, Weichselbaum RR. Tumour-endothelium interactions in co-culture: coordinated changes of gene expression profiles and phenotypic properties of endothelial cells. *J Cell Sci* 2003; 116: 1013-1022

Knittel T, Dinter C, Kobold D, Neubauer K, Mehde M, Eichhorst S, Ramadori G. Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1999; 154: 153-167

Kornek M, Raskopf E, Guetgemann I, Ocker M, Gerceker S, Gonzalez-Carmona MA, Rabe C, Sauerbruch T, Schmitz V. Combination of systemic thioacetamide (TAA) injections and ethanol feeding accelerates hepatic fibrosis in C3H/He mice and is associated with intrahepatic up regulation of MMP-2, VEGF and ICAM-1. *J Hepatol* 2006; 45: 370-376

Kornek M, Raskopf E, Tolba R, Becker U, Klockner M, Sauerbruch T, Schmitz V. Accelerated orthotopic hepatocellular carcinomas growth is linked to increased expression of pro-angiogenic and prometastatic factors in murine liver fibrosis. *Liver Int* 2008; 28: 509-518

Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer* 2013; 4: 342-359

Kountouras J, Lygidakis NJ. New epidemiological data on liver oncogenesis. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 855-861

Kunter I, Erdal E, Nart D, Yilmaz F, Karademir S, Sagol O, Atabey N. Active form of AKT controls cell proliferation and response to apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2014; 31: 573-580

Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebinuma H, Kato S, Ishii H. Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 1997; 25: 368-378

Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology* 2007; 45: 817-825

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J, SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390

Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: Molecular mechanisms and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 606-628

Lu Y, Ni F, Xu M, Yang J, Chen J, Chen Z, Wang X, Luo J, Wang S. Alcohol promotes mammary tumor growth through activation of VEGF-dependent tumor angiogenesis. *Oncol Lett* 2014; 8: 673-678

Maeno H, Ono T, Dhar DK, Sato T, Yamanoi A, Nagasue N. Expression of hypoxia inducible factor-1alpha during liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Liver Int* 2005; 25: 1002-1009

Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology* 1999; 30: 951-958

Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 2004; 39: 1185-1195

Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Miquel R, Bosch J, Fernandez M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 2009; 49: 1245-1256

Mello T, Ceni E, Surrenti C, Galli A. Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 17-21

Moon JO, Welch TP, Gonzalez FJ, Coppole BL. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: 582-592

Morrow D, Cullen JP, Cahill PA, Redmond EM. Ethanol stimulates endothelial cell angiogenic activity via a Notch- and angiopoietin-1-dependent pathway. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 313-321

Neubauer K, Saile B, Ramadori G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 187-193

Neufeld G, Kessler O, Herzog Y. The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol* 2002; 515: 81-90

Novo E, Cannito S, Zamara E, Valfre di Bonzo L, Caligiuri A, Cravanzola C, Compagnone A, Colombatto S, Marra F, Pinzani M, Parola M. Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2007; 170: 1942-1953

Novo E, Marra F, Zamara E, Valfre di Bonzo L, Monitillo L, Cannito S, Petrai I, Mazzocca A, Bonacchi A, De Franco RS, Colombatto S, Autelli R, Pinzani M, Parola M. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut* 2006; 55: 1174-1182

Novo E, Valfre di Bonzo L, Cannito S, Colombatto S, Parola M. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 2089-2093

Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000; 32: 225-237

Park YN, Kim YB, Yang KM, Park C. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1061-1065

Paternostro C, David E, Novo E, Parola M. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 281-288

Paulsen M, Ussat S, Jakob M, Scherer G, Lepenies I, Schütze S, Kabelitz D, Adam-Klages S. Interaction with XIAP prevents full caspase-3/-7 activation in proliferating human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2008; 38: 1979-1987

Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-416

Pinzani M, Milani S, Herbst H, DeFranco R, Grappone C, Gentilini A, Caligiuri A, Pellegrini G, Ngo DV, Romanelli RG, Gentilini P. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol* 1996; 148: 785-800

Popov Y, Schuppan D. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies. *Hepatology* 2009; 50: 1294-1306

Qin D, Zheng XX, Jiang YR. Apelin-13 induces proliferation, migration, and collagen I mRNA expression in human RPE cells via PI3K/Akt and MEK/Erk signaling pathways. *Mol Vis* 2013; 19: 2227-2236

Raskopf E, Gonzalez Carmona MA, Van Cayzeele CJ, Strassburg C, Sauerbruch T, Schmitz V. Toxic Damage Increases Angiogenesis and Metastasis in Fibrotic Livers via PECAM-1. *Biomed Res Int* 2014; 2014: ID 712893

Raskopf E, Sauerbruch T, Schmitz V. Apoptotic potency of angiostatic compounds in the treatment of cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13: 2283-2289

Raskopf E, Vogt A, Sauerbruch T, Schmitz V. siRNA targeting VEGF inhibits hepatocellular carcinoma growth and tumor angiogenesis in vivo. *J Hepatol* 2008; 49: 977-984

Roderfeld M, Weiskirchen R, Wagner S, Berres ML, Henkel C, Grötzing J, Gressner AM, Matern S, Roeb E. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *FASEB J* 2006; 20: 444-454

Ronis MJ, Hennings L, Stewart B, Basnakian AG, Apostolov EO, Albano E, Badger TM, Petersen DR. Effects of long-term ethanol administration in a rat total enteral nutrition model of alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: 109-119

Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 258-270

Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-22647

Sarphie G, D'Souza NB, Van Thiel DH, Hill D, McClain CJ, Deaciuc IV. Dose- and time-dependent effects of ethanol on functional and structural aspects of the liver sinusoid in the mouse. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 1128-1136

Schoeffner DJ, Matheny SL, Akahane T, Factor V, Berry A, Merlino G, Thorgeirsson UP. VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms. *Lab Invest* 2005; 85: 608-623

Schuppan D, Popov Y. Rationale and targets for antifibrotic therapies. *Gastroenterol Clin Biol* 2009; 33: 949-957

Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 351-372

Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001; 166: 6812-6819

Schwabe RF, Uchinami H, Qian T, Bennett BL, Lemasters JJ, Brenner DA. Differential requirement for c-Jun NH2-terminal kinase in TNFalpha- and Fas-mediated apoptosis in hepatocytes. *FASEB J* 2004; 18: 720-722

Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 1998; 142: 873-881

Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3: 178-185

Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, Nakagawa K, Yoshidome H, Kataoka M, Nakajima N. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2001; 34: 683-689

Tang N, Wang L, Esko J, Giordano FJ, Huang Y, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS. Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004; 6: 485-495

Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K, Tanikawa K, Sata M. Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 121-130

Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 24-34

Trichopoulos D, Bamia C, Lagiou P, Fedirko V, Trepo E, Jenab M, Pischon T, Nöthlings U, Overved K, Tjønneland A, Outzen M, Clavel-Chapelon F, Kaaks R, Lukanova A, Boeing H, Aleksandrova K, Benetou V, Zylis D, Palli D, Pala V, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, Bueno-De-Mesquita HB, Van Kranen HJ, Peeters PH, Lund E, Quirós JR, González CA, Sanchez Perez MJ, Navarro C, Dorronsoro M, Barricarte A, Lindkvist B, Regnér S, Werner M, Hallmans G, Khaw KT, Wareham N, Key T, Romieu I, Chuang SC, Murphy N, Boffetta P, Trichopoulou A, Riboli E. Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 1686-1695

Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60

Tugues S, Fernandez-Varo G, Munoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodés J, Friedman SL, Carmeliet P, Jiménez W, Morales-Ruiz M. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007; 46: 1919-1926

Tugues S, Morales-Ruiz M, Fernandez-Varo G, Ros J, Arteta D, Munoz-Luque J, Arroyo V, Rodés J, Jiménez W. Microarray analysis of endothelial differentially expressed genes in liver of cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2005; 129: 1686-1695

Valfre di Bonzo L, Novo E, Cannito S, Busletta C, Paternostro C, Povero D, Parola M. Angiogenesis and liver fibrogenesis. *Histol Histopathol* 2009; 24: 1323-1341

Van de Bovenkamp M, Groothuis GM, Meijer DK, Olinga P. Liver fibrosis in vitro: cell culture models and precision-cut liver slices. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 545-557

Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist* 2010; 15: 5-13

von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2001; 48: 87-96

Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis. *Biochem J* 2008; 411: 1-18

Wang T, Liu J, Xiao XQ. Cantharidin inhibits angiogenesis by suppressing VEGF-induced JAK1/STAT3, ERK and AKT signaling pathways. *Arch Pharm Res* 2015; 38: 282-289

Weiss L, Orr FW, Honn KV. Interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *FASEB J* 1988; 2: 12-21

Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* 2008; 47: 1394-1400

Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13: 781-792

Wright MC, Paine AJ. Resistance of precision-cut liver slices to the toxic effects of menadione. *Toxicol In Vitro* 1992; 6: 475-481

Xu H, Shi BM, Lu XF, Liang F, Jin X, Wu TH, Xu J. Vascular endothelial growth factor attenuates hepatic sinusoidal capillarization in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2349-2357

Xu M, Chen G, Fu W, Liao M, Frank JA, Bower KA, Fang S, Zhang Z, Shi X, Luo J. Ethanol disrupts vascular endothelial barrier: implication in cancer metastasis. *Toxicol Sci* 2012; 127: 42-53

Yeligar S, Tsukamoto H, Kalra VK. Ethanol-induced expression of ET-1 and ET-BR in liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells involves hypoxia-inducible factor-1alpha and microrNA-199. *J Immunol* 2009; 183: 5232-5243

Yeligar SM, Machida K, Tsukamoto H, Kalra VK. Ethanol augments RANTES/CCL5 expression in rat liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells via activation of NF-kappa B, HIF-1 alpha, and AP-1. *J Immunol* 2009; 183: 5964-5976

Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Tsujinoue H, Masaki T, Fukui H. Halting the interaction between vascular endothelial growth factor and its receptors attenuates liver carcinogenesis in mice. *Hepatology* 2004; 39: 1517-1524

Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003; 52: 1347-1354

Zachary I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1171-1177

Zhao E, Amir M, Lin Y, Czaja MJ. Stathmin mediates hepatocyte resistance to death from oxidative stress by down regulating JNK. *PLoS One* 2014; 9: ID 109750

Zhu XW, Gong JP. Expression and role of icam-1 in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 1579-1583

Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, Jesty Y. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998; 75: 780-786

## **8. Danksagung**

Zunächst danke ich meiner Doktormutter PD Dr. rer. nat. Esther Raskopf dafür, dass ich diese Arbeit unter ihrer Leitung im Labor für molekulare Therapien der Medizinischen Klinik und Poliklinik I – Allgemeine Innere Medizin des Universitätsklinikums Bonn erstellen konnte.

Ganz besonders danke ich ihr herzlich für die hervorragende Betreuung meiner Promotionsarbeit, insbesondere für die geduldige Einarbeitung in die Labortechniken und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ich bedanke mich dafür, dass sie auch nach Verlassen des Universitätsklinikums Bonn weiter die Betreuung meiner Promotionsarbeit übernommen hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Annabelle Vogt und Ursula Becker danke ich für ihre Hilfe im Laboralltag und bei Fragen jeder Art.

Ferner gilt mein Dank allen anderen Mitarbeitern des Labors für molekulare Therapie, insbesondere Lea Koch, für ihre Unterstützung.

Abschließend danke ich meiner Mutter und Johanna Jagow für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden gilt mein herzlichster Dank für die moralische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.