

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hepatozelluläres Karzinom	1
1.1.1	Behandlungsmöglichkeiten des HCC	2
1.2	Nrf2	3
1.2.1	Nrf2 – Sensor für oxidativen Stress	4
1.2.2	Nicht-kanonische Signalwege	5
1.2.3	Die Rolle von Nrf2 bei der Inflammation	5
1.2.4	Nrf2 und Tumore	7
1.3	TME – Tumor Microenvironment	7
1.3.1	Tumor-assoziierte Makrophagen	9
1.4	Nrf2 in Makrophagen	10
2	Zielsetzung	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Chemikalien	13
3.2	Geräte	13
3.3	Primer	14
3.4	Mauslinien	16
3.5	Zellkultur	16
3.5.1	Kulturbedingungen	16
3.5.2	ASV-B-Zellen	17
3.5.3	RAW 264.7	18
3.5.4	L929	19
3.5.5	BMDMs	20
3.5.6	Erzeugung von Lentiviren	21
3.5.7	Transduktion der BMDMs	22
3.5.8	Pilotstudie: Etablierung des Überstands der ASV-B-Zellen als Stimulans	22
3.5.9	Stimulationsprotokoll 1 der BMDMs	24
3.5.10	Stimulationsprotokoll 2 der BMDMs	25
3.5.11	Beobachtung morphologischer Veränderungen der BMDMs	26
3.5.12	Stimulationsprotokoll der ASV-B-Zellen	27
3.5.13	xCelligence	28
3.6	Assays	28

3.6.1	Firefly Luciferase Reporter Assay	28
3.6.2	Nano-Glo® Luciferase Assay	29
3.6.3	Cell Titer Blue Assay	29
3.7	Zymographie.....	30
3.7.1	Pufferlösungen	30
3.7.2	Herstellung Trenn- und Sammelgel.....	31
3.7.3	Durchführung Zymographie.....	32
3.7.4	Färbung des Gels.....	32
3.8	Nukleinsäureanalytik.....	33
3.8.1	RNA Isolation	33
3.8.2	Quantifizierung und Qualitätskontrolle der RNA	34
3.8.3	cDNA Synthese.....	34
3.8.4	qRT-PCR.....	35
3.9	Statistik	36
3.10	Software	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Pilotstudie: HCC-konditioniertes Medium induzierte Nrf2-Aktivität in Makrophagen-Zelllinie	38
4.2	Stimulation der BMDMs mit HCC-konditioniertem Medium	40
4.2.1	HCC-konditioniertes Medium induzierte Nrf2-Aktivität auch in Primärzellen und senkte deren NF- κ B-Aktivität.....	41
4.2.2	Makrophagen-Morphologie in Abhängigkeit von Nrf2-Aktivität	43
4.2.3	HCC-konditioniertes Medium induzierte gesteigerte HO-1-Expression	46
4.3	Kein Nachweis von MMPs in MPh-konditioniertem Medium	47
4.4	MPh-konditioniertes Medium hemmte Wachstum der Tumorzellen.....	48
4.4.1	MPh-konditioniertes Medium von BMDMs aus Nrf2-KO-Mäusen hemmte Zellproliferation der ASV-B-Zellen	48
4.4.2	Zellviabilität blieb auch nach Nährstoffverbrauch in konditionierten Medien erhalten	52
5	Diskussion	54
5.1	HCC-konditioniertes Medium aktiviert Nrf2 in Makrophagen.....	54
5.2	Antiinflammatorische Eigenschaften der HCC-konditionierten Medien	56
5.3	Nrf2-Beteiligung bei Immunevasion von Tumoren.....	57
5.4	Beeinflussung des Tumorwachstums durch die Nrf2-Aktivität in TAMs58	

5.5	Bewertung der Nrf2-Inhibition in TAMs als neuen Therapieansatz zur Behandlung des HCC	60
6	Zusammenfassung	62
7	Literatur	65
8	Anhang	74
8.1	Fotos Auszählung BMDMs	74
8.1.1	Keap1-KO.....	74
8.1.2	WT.....	78
8.1.3	Nrf2-KO.....	82
8.2	Plasmidkarten.....	86
8.2.1	SIN-lenti-ARE/-NFkB	86
8.2.2	SIN-lenti(NL1.1)-ARE/-NFkB.....	87
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	88
8.4	Tabellenverzeichnis.....	90