

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

Proliferation von Lungenfibroblasten in vitro unter dem Einfluss von ionisierender Strahlung
bzw. von TGF- β 1

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von

Antje Möller
aus Ludwigsburg

Würzburg, im November 2004

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. M. Kolb
Koreferent: Professor Dr. med. M. Flentje
Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 11.März 2005

Die Promovendin ist Ärztin

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methodik	4
2.1 Zellkultur.....	4
2.2 Zellen lösen/passagieren/zählen.....	4
2.3 Messmethoden.....	5
2.4 Zellzyklus.....	6
2.5 Aufbau der Versuche zur Zellproliferation und FBS-Wirkung.....	8
2.6 Aufbau der Versuche zur Wirkung bestrahlter Überstände.....	10
2.7 Entwicklung der Methodik für Kokulturversuche/exogene Gabe von TGF- β 1.....	13
2.8 Aufbau der Kokulturversuche.....	15
2.9 Aufbau der Versuche zur exogenen Gabe von TGF- β 1.....	19
3. Ergebnisse	20
3.1 Zellproliferation und Einfluss von FBS.....	20
3.2 Wirkung bestrahlter Überstände.....	23
3.3 Kokulturversuche.....	24
3.4 exogene Gabe von TGF- β 1.....	29
4. Diskussion	30
4.1 Pathogenese der Lungenfibrose.....	31
4.2 Therapieansätze.....	38
5. Zusammenfassung	40
6. Literatur	42
7. Abkürzungen	51

1. Einleitung

Die Strahlentherapie stellt, neben operativen Verfahren und systemischer Chemotherapie, eines der wichtigsten Therapieverfahren bei der Behandlung maligner Erkrankungen dar. Im Gegensatz zur zytostatischen Therapie ist das Ziel der Radiotherapie die lokale und regionäre Tumorkontrolle. Sie kann alleinig oder in Kombination mit anderen Therapieverfahren, mit kurativem oder palliativem Ziel eingesetzt werden. Aufgabe der Bestrahlung in kurativer Intention ist es, eine hohe Dosis im Zielvolumen zu erreichen, möglichst ohne akute oder längerfristige Nebenwirkungen an Risikoorganen zu verursachen.

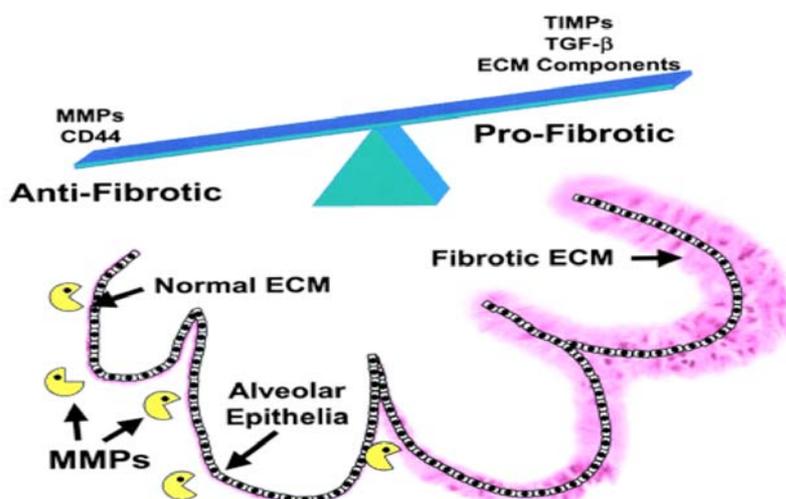
Die Lunge wird häufig im Rahmen der Behandlung maligner Tumoren im Thorax bestrahlt und stellt aufgrund ihrer hohen Radiosensitivität das dosislimitierende Organ dar. Trotz erheblicher Verbesserungen in der Bestrahlungsplanung- und -technik, lassen sich Nebenwirkungen oft nicht völlig vermeiden. Bei der Lunge handelt es sich hierbei um die subakute Strahlenpneumonitis, die bis zur chronischen Lungenfibrose fortschreiten kann. Verschiedene Faktoren beeinflussen das Ausmaß des pulmonalen Strahlenschadens, darunter die Einzel- und Gesamtdosis, das Fraktionierungsschema, die Größe des bestrahlten Volumens und vorbestehende Begleiterkrankungen des Patienten (65, 70).

Unerwünschte Lungenschäden treten zu typischen Zeitpunkten nach Bestrahlung auf, man kann sie in drei Abschnitte gliedern (66). Während der ersten Stunden bis Tage sind weder klinische noch lichtmikroskopische Zeichen radiogener Zellschäden zu erfassen, diese Zeitspanne nennt man Latenzphase (84). Zwei Wochen bis mehrere Monate nach Bestrahlung kommt es zur akuten Pneumonitis, die klinisch durch Dyspnoe, Husten und Fieber auffallen kann (70). Histopathologisch sieht man Alveolarschaden mit interstitiellem Ödem, Infiltration von Entzündungszellen, Kapillarveränderungen und Verdickung der Alveolarsepten (84). Diese Entzündungsreaktion kann völlig ausheilen oder später in Lungenfibrose übergehen. Je nach Ausmaß der Lungenreaktion sind verschiedene Erscheinungsbilder möglich, die von völlig asymptomatischem Verlauf bis hin zu schwerer respiratorischer Insuffizienz reichen können (70). Histologisch beobachtet man Fibrosierung von Alveolarsepten, Obliteration übrig gebliebener Alveolen und Kapillarverschluss durch kollagene Fasern (84).

Unter den Mesenchymzellen kann man u.a. proliferierende Vorläuferfibroblasten und postmitotische Fibrozyten unterscheiden. Beim Menschen existieren drei Formen von Vorläuferfibroblasten, MF-1, MF-2 und MF-3 (mitotically active progenitor fibroblasts), die für die Eigenregeneration und die Regeneration der postmitotischen Zellen verantwortlich sind. Diese werden ebenfalls in drei Ausdifferenzierungsstufen unterteilt, in PMF-4, PMF-5 und PMF-6 (post-mitotic fibroblasts), und produzieren Kollagen, Zytokine, extrazelluläre Matrixproteine und Wachstumsfaktoren. PMF-6-Fibrozyten sind terminal differenzierte Zellen (37).

Normalerweise liegt das zahlenmäßige Verhältnis von Vorläuferfibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten bei 2:1. Mit dem Alter findet auf natürliche Weise eine Verschiebung zugunsten der ausdifferenzierten Zellen statt. Als exogener Faktor kann ionisierende Strahlung sowohl zu einer Verschiebung innerhalb der Vorläuferfibroblasten hin zu mehr späten Ausdifferenzierungsformen, als auch zu einem Shift hin zu insgesamt mehr postmitotischen Fibrozyten führen (15, 58, 80, 37, 30, 58, 81). Diese „terminale Differenzierung“ läuft über den Mechanismus einer dosisabhängig gesteigerten TGF- β - und Kollagenproduktion (79, 83, 82, 42).

TGF- β gilt als Schlüsselenzym der zytokin-vermittelten interzellulären Vorgänge (86, 48, 77, 90, 75) und kann u.a. durch ionisierende Strahlung aktiviert werden (71, 8). Vermehrte TGF- β -Produktion hemmt über die p21-Signalkaskade zyklinabhängige Kinasen, welche über die Phosphorylierung von Rb-Protein den Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus bewirken. Somit resultiert ein irreversibler Zellzyklusarrest in der G1-Phase, der zu terminaler Differenzierung der Fibrozyten und einem Anstieg der Rate postmitotischer Zellen führt (79, 83). Diese produzieren extrazelluläre Matrixproteine und Wachstumsfaktoren, weshalb es zu übermäßiger Kollagenablagerung kommt.



Ein weiterer Mechanismus, über dem TGF- β 1 die Kollagensynthese steigert, ist die Aktivierung von Proteaseinhibitoren (TIMP = tissue inhibitors of metalloproteinases) und die Hemmung von MMPs (matrix metalloproteinases) (34, 59, 44). Die Folge dieser Vorgänge ist die Zunahme von Bindegewebe und schließlich Fibrose.

Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, Zellinteraktionen nach Bestrahlung darzustellen. Wir untersuchten, ob in einem Ko-Kultur-Modell zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen Wechselwirkungen hinsichtlich der Proliferationskinetik bestehen, die eventuell TGF- β vermittelt sind. Es wurde versucht, die Hemmung der Fibroblastenproliferation, nach Zellbestrahlung einerseits und nach Zugabe von exogenem TGF- β 1 andererseits, in vitro darzustellen. Mittels Zellzyklusanalyse untersuchten wir, ob die Proliferationshemmung durch Zellzyklusarrest und terminale Differenzierung der Fibrozyten bedingt ist.

2. Material und Methodik

Die Entstehung der radiogenen Pneumonitis und Lungenfibrose im Tiermodell der Sprague-Dawley Ratte ist bereits vielfach beschrieben (98).

2.1 Zellkultur

Lungenfibroblasten von Ratten (männliche Ratten, Stamm Sprague Dawley, 150g) wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Dem Kulturmedium (Dulbecco's mod eagle medium, Cat-Nr.31885023, Gibco Invitrogen) wurden 10% FBS, 1% Penicillin, 1% Gentamycin (50µg/ml), 1% L-Glutamin und 1% Amphotericin (Fungizone) zugefügt.

Zweimal pro Woche fand ein Mediumwechsel statt, hierbei wurde frisches Medium gefiltert und 25ml auf jede Zellkulturflasche gegeben.

2.2 Zellen lösen/passagieren/auszählen

Um Zellen zur Durchführung der Versuche aus den Kulturflaschen zu lösen, wurde zunächst das Medium abgesaugt, 10ml/Kulturflasche PBS (Dulbecco's w/o calcium and magnesium and sodium bicarbonate) aufpipettiert und nach 2 min. abgesaugt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit 3ml Trypsin (0,5%EDTA) pro Kulturflasche, danach die mikroskopische Kontrolle, um zu sehen, ob bereits Zellen gelöst sind, und die anschließende Neutralisation mit 17ml Kulturmedium.

Um eine neue Passage auszusäen, wurden die von einer Kulturflasche gelösten Zellen zentrifugiert (Hettich, universal 30 RT; bei 4°C,1350n,5min.), der Überstand abgesaugt, die Zellen mit frischem Kulturmedium resuspendiert und auf vier neue Kulturflaschen verteilt.

Sollte eine bestimmte Zellzahl ausgesät werden, mußten die Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (blaue Linse, 40/0, 64) unter dem Mikroskop gezählt werden.

2.3 Messmethoden

Zur Analyse der Versuche kamen zwei verschiedene Messmethoden zum Einsatz:

1) BrdU-ELISA-KIT (BrdU colorimetric, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany):

Das Prinzip dieser Messmethode besteht darin, dass die zu analysierenden Zellen für einen Zeitraum von 24h mit BrdU inkubiert werden, welches anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Nach 24h wird das Kulturmedium abgesaugt und, in einem Arbeitsschritt werden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Dies ist notwendig, damit der anschließend zugegebene Anti-BrdU-Antikörper besser binden kann. Die entstandenen Antikörper-BrdU-Immunkomplexe werden durch eine darauffolgende Substratreaktion kenntlich gemacht und das Reaktionsprodukt durch Absorptionsmessung bei der jeweiligen Wellenlänge im Spektrophotometer „ELISA-reader“ (Dynatech MR5000) quantifiziert. Die Absorptionswerte sowie der Farbumschlag korrelieren mit der Menge an DNA-Synthese und somit mit der Anzahl proliferierender Zellen.

2) Messung am Durchflusszytometer nach Durchführung eines Standardprotokolls (101):

Hierbei wird die Zellproliferation ebenfalls durch BrdU-labeling und BrdU-Antikörpergabe sichtbar gemacht. Im Unterschied zur oben beschriebenen Methode wurde hierbei ein sogenanntes „pulse-labeling“ durchgeführt, wobei nur während eines kurzen Zeitintervalls BrdU in proliferierende Zellen eingebaut wird. Zusätzlich ist die Verwendung eines zweiten Antikörpers nötig, der an den BrdU-Antikörper bindet. Die Fluoreszenz des Antikörpers wird im Durchflusszytometer (FACS-Calibur) erkannt. Die erhaltenen Messwerte können bildlich dargestellt werden, so dass in einem Diagramm der BrdU-Einbau in Richtung der y-Achse sichtbar wird. Zusätzlich zu BrdU wird Propidiumjodid zu den Proben gegeben, was im Diagramm auf der x-Achse dargestellt wird. Somit können die analysierten Zellen den Zellzyklusphasen zugeordnet werden.

Vorteil dieser Methode gegenüber der Verwendung des BrdU-ELISA-KITS ist die Möglichkeit der genauen Darstellung einzelner Zellzyklusphasen, nicht nur der Gesamtproliferation. Außerdem besteht die Möglichkeit der Verfolgung und zeitlichen Messung der Proliferationskinetik der markierten Zellen.

Während der Messung kann auf dem Bildschirm die Anzahl der Messereignisse verfolgt werden, die als einzelne Punkte, sogenannte „Plots“ erscheinen. In einem weiteren Schritt

können mit Hilfe des WinMDI-Programms einzelne Regionen markiert, und der Anteil der sich darin befindenden Zellen an der Gesamtzellzahl errechnet werden. Diese Prozentanteile wurden für die Anfertigung der Diagramme im Ergebnisteil eingesetzt.

2.4 Zellzyklus

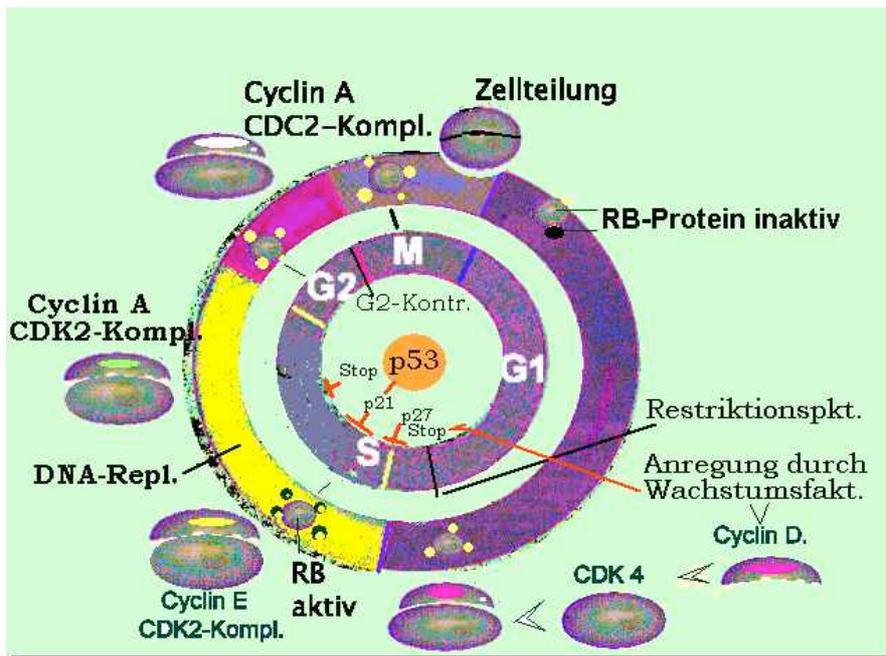


Abb.1

G1-Phase (gap = Lücke): Synthese von Bausteinen für die nächste Phase, z.B. Enzyme, die für die Verdoppelung des Genoms erforderlich sind

S-Phase (Synthese): Kopie der DNA

G2-Phase: Kontrolle der DNA-Synthese

M-Phase (Mitose): Verteilung der Chromosomen und Zellteilung

Diese Vorgänge werden durch Regulationsmechanismen bewerkstelligt, die durch Enzyme, zum großen Teil Proteinkinasen, gesteuert werden. Das Signal zum Beginn des Zellzyklus wird durch den Restriktionspunkt = „Start“ in der späten G1-Phase gegeben. Der zweite Kontrollpunkt liegt in der G2-Phase, hier werden fehlerhafte Zellen eliminiert.

Abb.2: Darstellung des Zellzyklus mittels FACS-Methode:

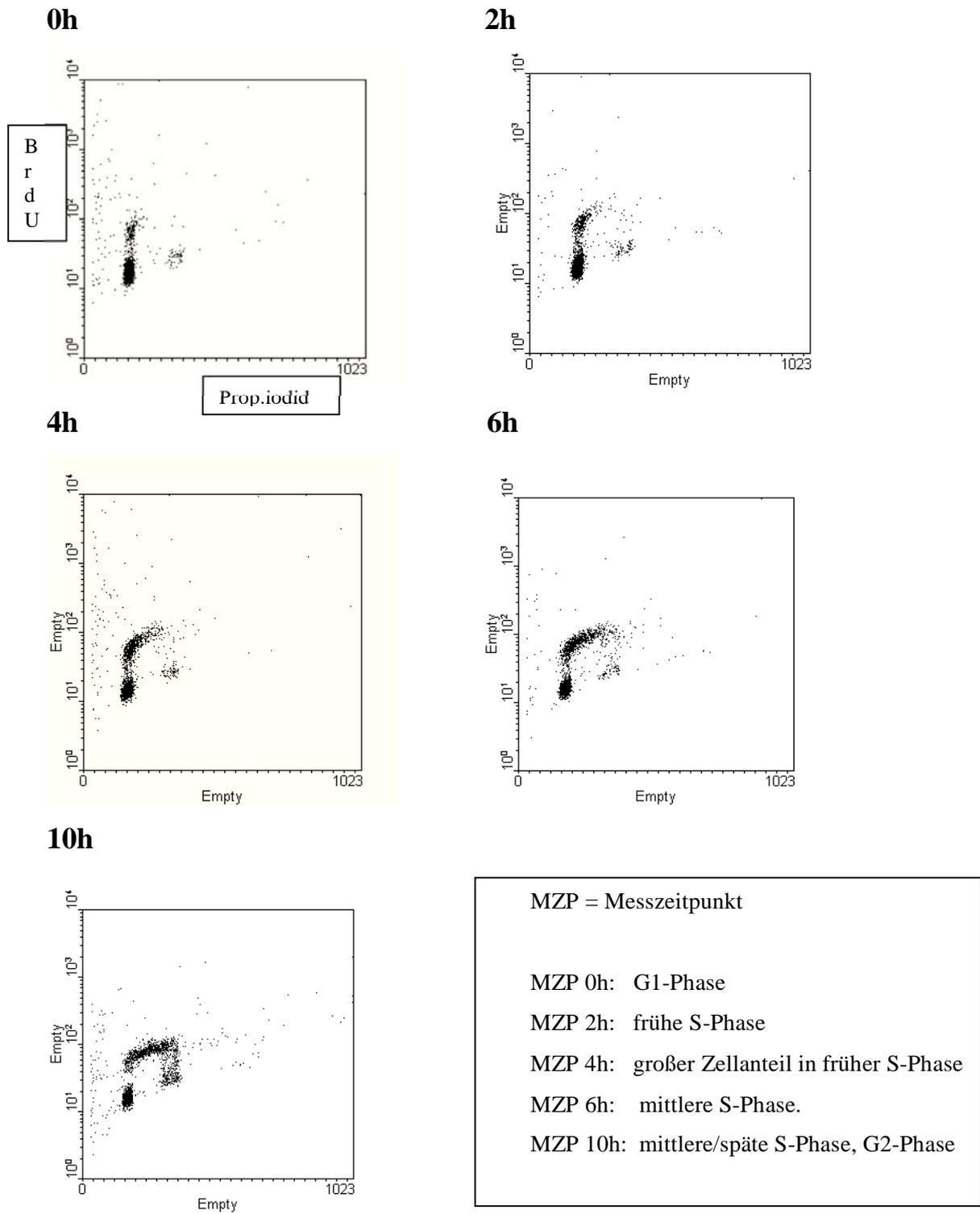
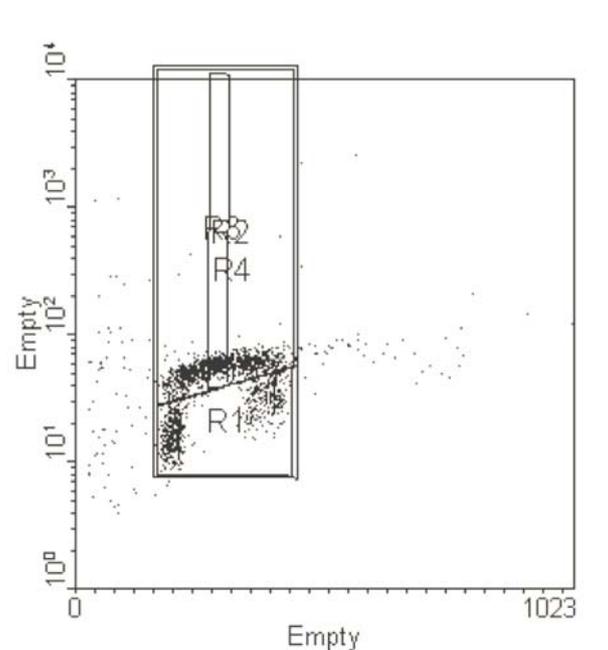


Abb.3: Regionen der einzelnen Zellzyklusphasen:

Um zu errechnen, wieviel Prozent der Zellen sich zu verschiedenen Messzeitpunkten in der Proliferationsphase (BrdU-labeling-Index) bzw. speziell in der mittleren S-Phase befanden, wurden Rahmen („gates“) um einzelne Regionen gesetzt.



R1 : untere Region = zum Zeitpunkt der BrdU-Markierung nicht proliferierende Zellen
R2 : gesamte obere Region (=BrdU-labeling-Index) = proliferierende Zellen
R3 : mittlerer Anteil der oberen Region = mittlere S-Phase
R4 : Rahmen, der alle Regionen umfaßt (=100%)

2.5 Aufbau der Versuche zur Zellproliferation und FBS-Wirkung

a) Proliferation von Rattenfibroblasten:

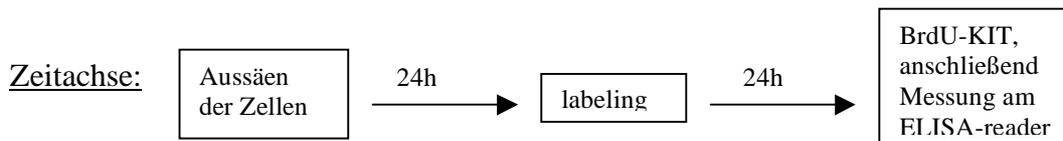
Um für den Versuch in Teil 2 eine geeignete Ausgangszellzahl zu ermitteln, wurden auf einer 96-well-Mikrotiterplatte verschiedene Zellzahlen ausgesät: 2.000, 5.000, 10.000, 20.000 Zellen in je 100µl Medium, auf je 22 wells die gleiche Zellzahl, außerdem 8 „blanks“, d.h. wells ohne Zellen, zur Kontrolle.

Hierzu wurde eine Zellsuspension hergestellt, die die höchstbenötigte Zellzahl von 20.000 Zellen/100µl enthielt = Lösung A.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden 10µl BrdU-labeling solution/well aus dem „Cell Proliferation ELISA-KIT“ (BrdU colorimetric, Roche Molecular Biochemicals) aufpipettiert und anschließend für 24h inkubiert.

Danach erfolgten die weiteren Schritte der BrdU-ELISA-KIT-Prozedur:

- Medium absaugen, 200µl FixDenat solution/well aufpipettieren → 30min. bei RT
- FixDenat solution absaugen, 100µl anti-BrdU-POD working solution/well aufpipettieren (bestehend aus: 100µl anti-BrdU-POD stock solution, darin BrdU-Antikörper der Maus, der mit Peroxidase (=POD) konjugiert ist, und 10ml antibody dilutionsolution) → 90min. bei RT inkubieren
- dreimal waschen mit jeweils 200µl washing solution/well
- 100µl substrate solution/well aufpipettieren → 30min. bei RT inkubieren
- 25µl 1M H₂SO₄/well stoppt die Substratreaktion des vorherigen Schrittes
- Messung am ELISA-reader mit folgenden Einstellungen:
module: advanced applications; blank mode: air; w/l mode: dual; Test Nr.33;
test filter: 450nm; ref. filter: 650nm



b) Proliferation humaner Lungenfibroblasten:

Derselbe Versuchsaufbau wurde mit menschlichen Lungenfibroblasten der Linie ICN, ATCC CCL-201, CCD-8 lung, diploid, human fibroblast, 48-jähriger Kaukasier, durchgeführt. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen mit MEM (ATCC's Minimum Essential Medium) + 10% FBS + 1% Penicillin G + 1% Gentamycin + 1% L-Glutamin +1% Amphotericin inkubiert.

Es mußten einige Veränderungen am Versuchsablauf vorgenommen werden:

- höhere Zellzahlen: 1.000, 5.000, 8.000, 15.000, 20.000, 35.000, 50.000
- doppelte Konzentration der anti-BrdU-POD-Stammlösung
- längere Inkubationszeiten: 48h labeling, 60 min. Fix-Denat-Lösung (fixiert und denaturiert die Zellen, 2h anti-BrdU-POD-working solution (enthält Antikörper), 30min. substrate solution (macht Immunkomplexe sichtbar).

c) Proliferation in Medium unterschiedlichen FBS-Gehaltes:

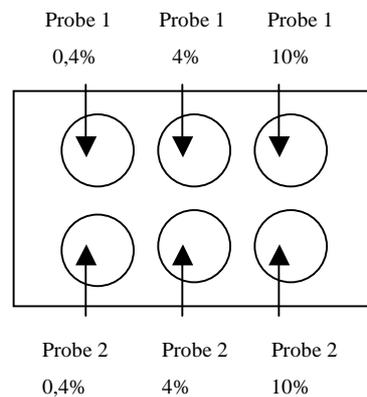
Hier wurde der mögliche Einfluss von FBS auf die Zellproliferation untersucht.

Dazu wurden auf einer 6-well-Platte jeweils 100.000 Zellen/well in 2ml Medium unterschiedlichen FBS-Gehaltes (0,4%; 4% und 10%) kultiviert, an drei Messzeitpunkten gelöst und in der Zählkammer ausgezählt.

MZP 1 = 3 Tage nach Aussäen der Zellen

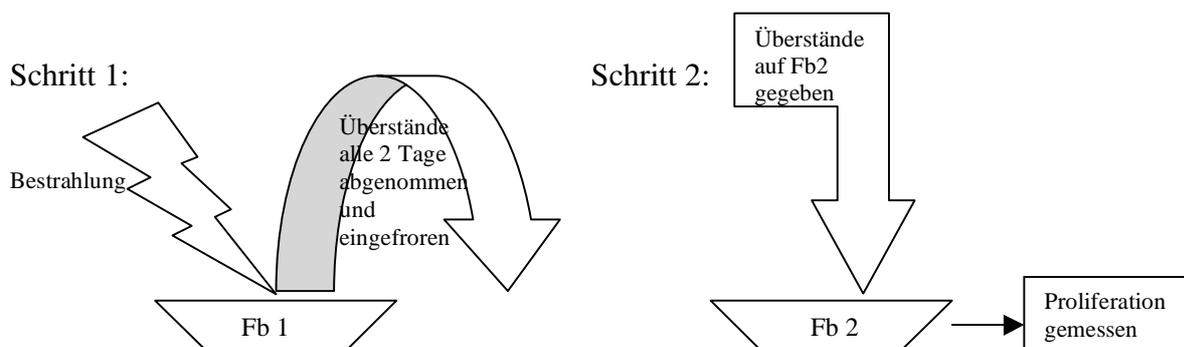
MZP 2 = 5 Tage nach Aussäen und

MZP 3 = 7 Tage nach Aussäen.



2.6 Aufbau der Versuche zur Wirkung bestrahlter Überstände

In diesem Versuch wurde geprüft, ob die Überstände bestrahlter Fibroblasten proliferationshemmende Substanzen enthalten, die das Wachstum unbestrahlter Fibroblasten beeinflussen. Der Versuch bestand aus zwei Schritten:



Schritt 1 des Versuchs erstreckte sich über 14 Tage:

1.Tag: Aussäen der Zellen

Auf acht kleine Kulturflaschen (25cm²) wurden jeweils 40.000 Zellen ausgesät.

2.Tag: Bestrahlung

Jeweils zwei Kulturflaschen wurden mit 0,5Gy, 5Gy und 10Gy bestrahlt, die übrigen zwei Flaschen waren zur Kontrolle („0Gy“) vorgesehen und wurden während der Bestrahlungszeit aus dem Inkubator gestellt, um gleiche Bedingungen zu schaffen.

Anschließend wurden alle Flaschen, einschließlich der nicht bestrahlten, einmal mit 2ml PBS (Phosphat buffered saline) gewaschen und mit 5ml frischem Medium versorgt.

3.Tag: Hungermedium

Um den in Versuch 1c gesehenen proliferationsfördernden Effekt von FBS auszuschliessen, wurden die Zellen für 24h in FBS-freiem Hungermedium inkubiert.

4.Tag: MZP 1

Die Überstände der bestrahlten Fibroblasten wurden abgenommen und in 15ml-tubes gefüllt, anschließend zentrifugiert (bei 21°C, 1350n, 5min), in 3ml-Kryoröhrchen abgefüllt und bei -80°C eingefroren. Nach Abnahme der Überstände wurden die Zellen wieder mit frischem 10% FBS-haltigem Medium versorgt, um das Wachstum nicht völlig zu blockieren.

5.Tag: Hungermedium

6.Tag: MZP 2

weiter wird genauso verfahren bis zum MZP 6 am 14.Tag.

Schritt 2 erstreckte sich über 7 Tage:

Auf 96-well-Mikrotiterplatten wurden jeweils 2.000 unbestrahlte Fibroblasten (P11) in 100µl Medium pro well ausgesät. Diese Zellzahl hatte sich im Versuch 1a als optimal erwiesen.

Die Überstände der bestrahlten Fibroblasten wurden auf die frisch ausgesäten Zellen pipettiert, jeweils 10 wells bekamen dabei Überstände der gleichen Bedingung. Ausserdem waren „blanks“ und Fibroblasten, die „nicht konditioniertes“ Medium erhielten, zur Kontrolle vorhanden. Insgesamt lagen 24 Bedingungen vor: Zellüberstände nach Bestrahlung mit 0Gy, 0,5Gy, 5Gy und 10Gy, abgenommen an 6 MZPs, nämlich 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Tage p.r.

Zur Darstellung der Zellproliferation wurde abschließend ein BrdU-ELISA-KIT durchgeführt.

1.Tag: Aussäen der unbestrahlten Zellen → 24h bei 37°C inkubieren

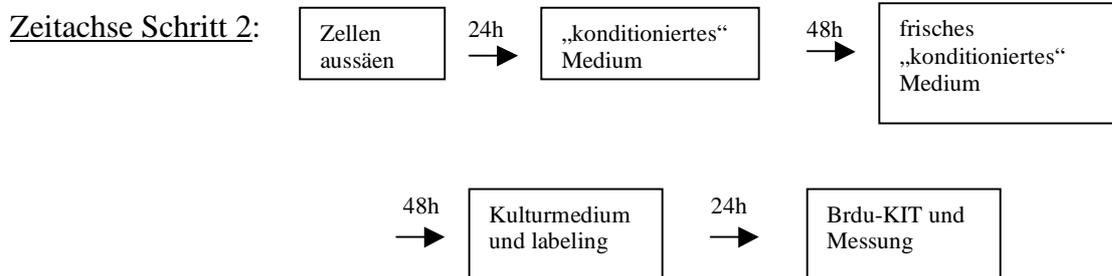
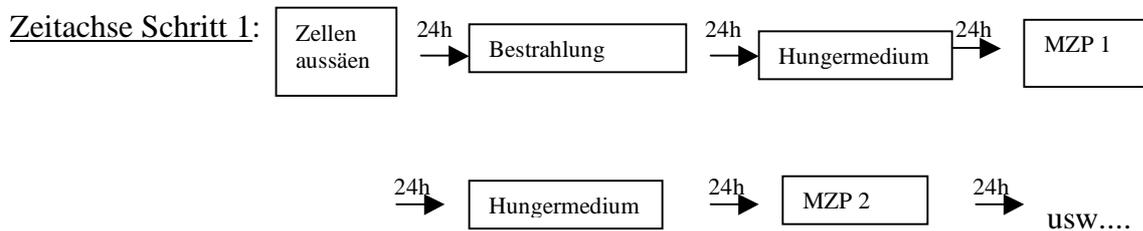
2.Tag: Kulturmedium absaugen und durch jeweils 100µl/well der eingefrorenen Überstände = „konditioniertes Medium“ ersetzen → 48h inkubieren

4.Tag: Mediumwechsel: nochmals „konditioniertes Medium“ → 48h inkubieren

6.Tag: Mediumwechsel: normales Kulturmedium

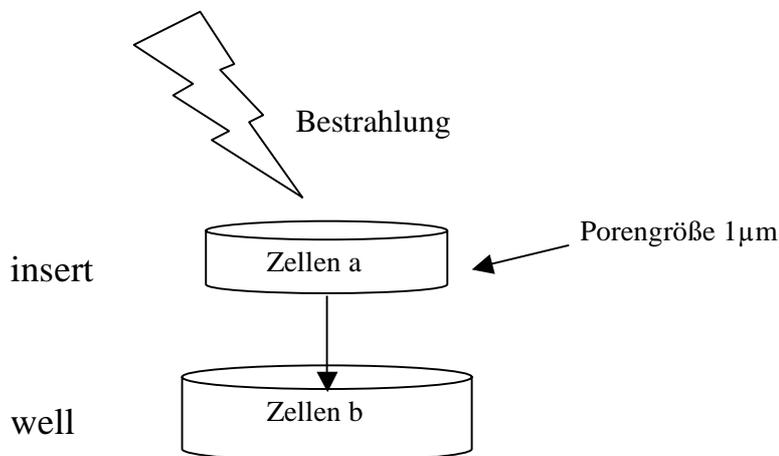
anschließend 10µl BrdU labeling solution/well zugeben → 24h inkubieren

7.Tag: BrdU-ELISA-KIT



2.7 Entwicklung der Methodik für Kokulturversuche / exogene Gabe von TGF- β 1

Wir führten Kokulturversuche durch, um zu zeigen, ob bestrahlte Fibroblasten Stoffe produzieren, die durch eine Membran zur Zellkultur unbestrahlter Fibroblasten diffundieren und deren Wachstum hemmen. Im Weiteren wurde unter den gleichen Rahmenbedingungen einer Fibroblastenmonokultur exogenes TGF- β zugefügt, um festzustellen, ob dies eine Wachstumshemmung bewirkt, und somit indirekte Rückschlüsse auf den Inhalt des Mediums bestrahlter Fibroblasten ziehen zu können. Die Ergebnisse wurden mittels Durchflusszytometer analysiert.



Hier ist der Aufbau eines Kokulturmodells dargestellt. Die Basis bilden Kammern, sogenannte „wells“, in denen Zellen (=b) kultiviert werden. In speziellen Einsätzen, den „inserts“, werden ebenfalls Zellen (=a) gezüchtet. Der Boden dieser inserts besteht aus einer Membran, die keine größeren Zellbestandteile, aber z.B. Botenstoffe passieren lässt. Nach Bestrahlung der inserts mit den darin wachsenden Zellen werden diese auf die wells gesetzt. So können Zytokine aus dem Medium der „Zellen a“ durch die Membran diffundieren und das Wachstum der „Zellen b“ in den wells beeinflussen.

Zunächst mußte die Methodik zur Durchführung der Kokulturversuche und zur Darstellung der Zellzyklusanalysen am Durchfluscytometer entwickelt werden. In Vorversuchen wurden die Bedingungen optimiert, weshalb Bestandteile des Versuchsaufbaus modifiziert wurden:

1) Ein Vergleich der Zellkultivierung auf 6-well-Platten im Gegensatz zu 275ml Kulturflaschen zeigte ein wesentlich besseres Zellwachstum auf den größeren Kulturflaschen, die jedoch in den Kokulturversuchen nicht eingesetzt werden können. Nachdem die Ausgangszellzahl erhöht worden war, konnte auf den 6-well-Platten ein ebenso gutes Wachstum erzielt werden.

2) Bei zu hohen Zellzahlen ($>25.0000/\text{well}$) fand kein Einbau von BrdU statt, da das Wachstum durch Konfluenz blockiert war, zu wenige Zellen ($<100.000/\text{well}$) machten die Messung am FACS-Gerät unmöglich, da der BrdU-Einbau nicht deutlich genug zu erkennen war. Optimal war schließlich das Aussäen von 50.000 Zellen/well und die anschließende Zusammenfassung dreier wells der gleichen Bedingung in einem FACS-tube für die Messung am Durchfluscytometer.

3) Bei der ursprünglich vorgesehenen Konzentration von 20mM BrdU konnte überhaupt kein BrdU-Einbau festgestellt werden. Nach Vergleich mit anderen Protokollen wurden verschiedene höhere Konzentrationen ausprobiert, eine Konzentration von 300 μM zeigte in unseren Versuchen schließlich den besten Effekt. Die BrdU-Inkubationszeit beim pulse-labeling betrug 1h, denn bei gringerer Inkubationszeit von nur 30min. konnte kein BrdU-Einbau festgestellt werden.

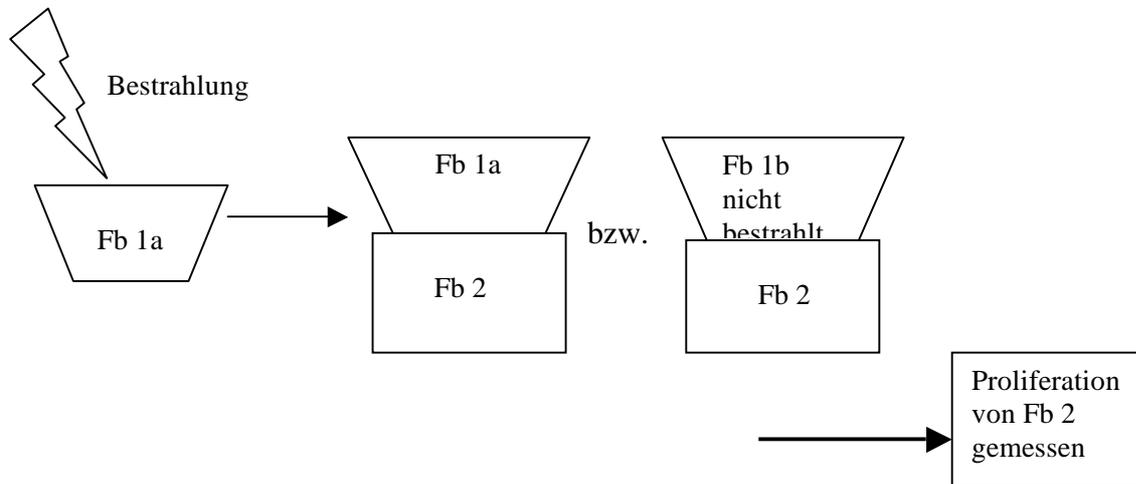
4) Laut dem Protokoll der Arbeitsgruppe von Overton (101) kann mit stärker konzentrierter Salzsäure eine bessere DNA-Denaturierung erreicht werden, doch beim Einsatz von 4N HCl statt 2N HCL wurden unsere Zellen zerstört. Auch beim Versuch einer Hitze-Denaturierung bei 90° für 10min. nach dem Protokoll von Wilson (102) wurden die Zellen geschädigt.

5) Der unserem Protokoll von Begg et al. (100) vorgesehene gekoppelte Antikörper (anti-human-BrdU-FITC von Pharmingen) wurde durch zwei getrennte Antikörper ersetzt:

Zunächst wurden 30 μl eines BrdU-Aks in der Konzentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, anschließend 20 μl eines FITC-konjugierten Antikörpers auf jede Probe gegeben. Dieser wurde vorher in 800 μl aqua dest. aufgelöst, bei +4°C im Dunkeln gelagert und für den Versuch 1:40 verdünnt.

2.8 Aufbau der Kokulturversuche

Fibroblasten (Fb 2) wurden in Kokultur mit bestrahlten (Fb 1a) bzw. unbestrahlten (Fb 1b) Fibroblasten gebracht.

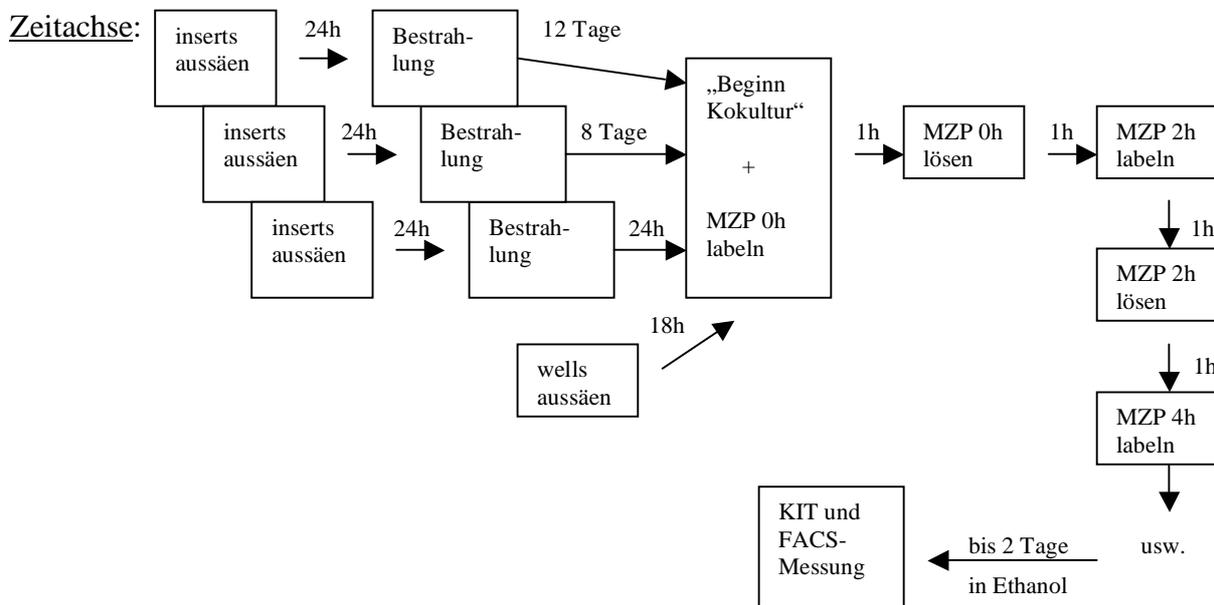


Um festzustellen, ob möglicherweise durch Bestrahlung oder alleine durch die Kokultursituation Einfluß auf die Proliferation der zu untersuchenden Fibroblasten in den wells ausgeübt wird, wurde nach verschiedenen Zeitspannen in Kokultur ein „pulse-labeling“ mit BrdU durchgeführt. Das bedeutet, dass BrdU für höchstens 1h den Zellen zugefügt wird und somit eine Impuls auslöst. Der proliferierende Zellanteil baute dieses BrdU in seine DNA ein, welches nach Lösen der Zellen und Durchlaufen einer KIT-Prozedur am Durchflusszytometer bildlich dargestellt werden konnte. Mit dieser Methode konnte demonstriert werden, welcher Anteil der Zellen sich zu verschiedenen Messzeitpunkten gerade in der Proliferationsphase (=BrdU-labeling-Index), und speziell, welcher Anteil sich in der mittleren S-Phase befand.

Im ersten Versuchsdurchgang wurden die Messzeitpunkte „Beginn der Kokultur“ = 0h, 2h, 4h, 6h, 10h in Kokultur gewählt. Beim zweiten Versuchsdurchgang sollten noch spätere Messzeitpunkte untersucht werden, man wählte 0h, 4h, 6h, 10h, 24h und 56h in Kokultur.

Die Messung der Kokultur mit bestrahlten Fibroblasten an Tag 1, Tag 8 und Tag 12 nach Bestrahlung der inserts mit 10Gy durchgeführt. Ausserdem lagen drei Kokulturbedingungen vor: Bestrahlung mit 10Gy, keine Bestrahlung = „0Gy“ und Kontrollen ohne inserts. Im ersten Durchgang wurde außerdem zu jeder Messung eine „ungelabelte“ Kontrolle mitgemessen. An einem Messtag wurden jeweils alle Proben der Bedingung Tag 1 bzw. Tag 8

oder Tag 12 nach Bestrahlung untersucht. Daraus ergaben sich für den ersten Messdurchgang pro Messtag 30 Bedingungen (5 MZPs, 3 Kokulturbedingungen, label/nolabel). Im zweiten Durchgang waren es pro Messtag 18 Bedingungen (6 MZPs, 3 Kokulturbedingungen).



Das Aussäen von jeweils 50.000 Zellen/well in 5ml Kulturmedium auf 6-well-Platten fand 18h vor Beginn der Kokultur statt, das Aussäen der jeweils 20.000 zu bestrahlenden Zellen/insert in 3ml Medium 24h vor der Bestrahlung. Die Kokultur begann also 18h nach Aussäen der wells, d.h. hier wurden die inserts, die entweder 1 Tag, 8 Tage oder 12 Tage vorher bestrahlt worden waren, auf die wells gesetzt.

Bei den inserts, die 8 oder 12 Tage vor der Kokultur bestrahlt wurden, waren alle zwei Tage Mediumwechsel nötig, wobei der letzte Mediumwechsel einen Tag vor Beginn der Kokultur stattfinden mußte, um gleiche Bedingungen zu den Zellen zu schaffen, die einen Tag vor der Kokultur bestrahlt wurden.

Die Kontrollgruppe der unbestrahlten inserts wurde unter weitgehend identischen Bedingungen einer Scheinbestrahlung unterzogen. Anschließend wurden alle inserts und wells einmal mit PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) gewaschen (2ml insert/2ml well) und mit frischem Medium (3ml insert/1ml well) versorgt.

Zum Zeitpunkt „Beginn der Kokultur“ wurde bei den Fibroblasten des ersten MZPs = 0h das BrdU-pulse-labeling gestartet. Nach 1h wurden diese Zellen gelöst und in 70% Ethanol bei 4°C im Dunkeln konserviert. 2h nach Beginn der Kokultur wurde den Zellen des nächsten MZPs BrdU zugesetzt, 1h später wurden sie gelöst, u.s.w. bis zum letzten MZP.

BrdU wurde in einer stock solution von 30mM gelagert und für die Versuche 1:100 auf eine Konz. von 300µM verdünnt, d.h. 30µl der stock solution in 3ml Medium/well gegeben.

Nachdem die Zellen aller MZPs gelöst und in Ethanol fixiert waren, wurden sie nach folgendem Protokoll behandelt, die Mengenangaben beziehen sich auf jeweils eine Probe:

- 1.) Zentrifugieren (1350rpm, 10min., 4°C)
- 2.) Überstand absaugen und pellet gründlich resuspendieren
- 3.) Auf dem Vortex 1,5ml Pepsin zufügen → 20min. bei RT inkubieren
- 4.) Nach 20min. auf dem Vortex stellen 4ml diluting buffer hinzufügen
- 5.) Zentrifugieren (1350rpm, 10min., 4°C).
- 6.) Überstand absaugen und pellet gründlich resuspendieren
- 7.) Auf dem Vortex stellen 1,5ml 2N HCl hinzufügen → 20min. in CO²-Inkubator
- 8.) Auf dem Vortex 4ml 0,1M Borate (=Na₂B₄O₇ * 10H₂O) hinzufügen
- 10.) Zentrifugieren (1350rpm, 10min., 4°C)
- 11.) Überstand absaugen und pellet gründlich resuspendieren
- 12.) Auf dem Vortex 4ml diluting buffer hinzufügen
- 13.) Zentrifugieren (1350rpm, 10min., 4°C)
- 14.) Überstand absaugen und pellet gründlich resuspendieren
- 15.) Auf dem Vortex 30µl anti-BrdU-Antikörper hinzufügen → 30 min. bei RT inkubieren
- 16.) Auf dem Vortex 4ml diluting buffer hinzufügen
- 17.) Zentrifugieren (1350rpm, 10min., 4°C)
- 18.) Überstand absaugen und pellet gründlich resuspendieren
- 19.) Auf dem Vortex 20µl FITC-Antikörper hinzufügen → 30 min. bei RT inkubieren
- 20.) Auf dem Vortex stellen 4ml diluting buffer hinzufügen
- 21.) Zentrifugieren (1350rpm, 10min., 4°C)
- 22.) Überstand absaugen und pellet gründlich resuspendieren
- 23.) 500µl Propidiumiodid-RNase-Suspension hinzufügen
- 24.) Zellsuspension in FACS-tubes pipettieren → Messung am FACS-Gerät

Checkliste Substanzen:

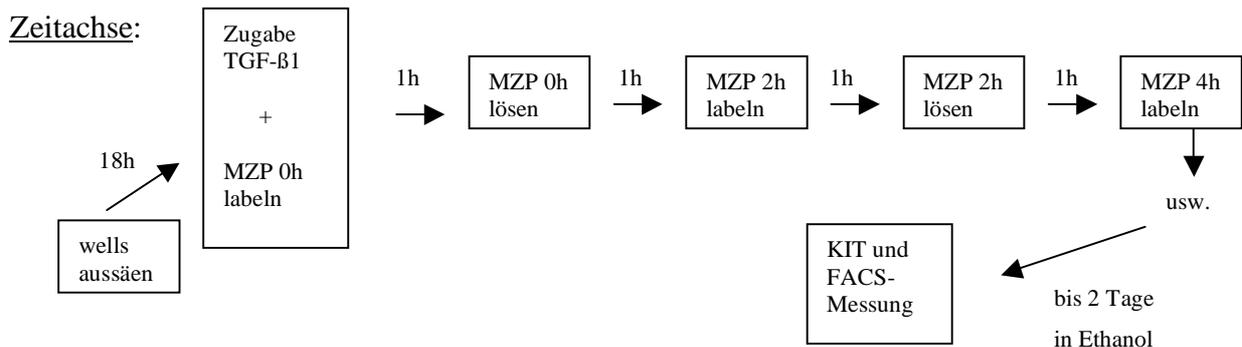
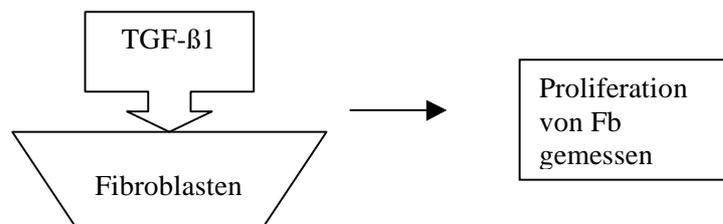
- 1.) BrdU: Serva 15240, 250µg
- 2.) BrdU-Ak : Immunotech Cat.-Nr.1517, IgG1 mouse, 100µg
- 3.) FITC-Ak : Immunotech Cat.-Nr.0819, Goat Anti-Mouse IgG, 1mg
- 4.) TGF-β1 : R&D Systems, Nr.240-B-002 recombinant, 2µg
- 5.) Rinderserumalbumin (BSA) : Sigma A-9418, 10g
- 6.) Tween 20 : Sigma P-7949, 100ml
- 7.) Pepsin : Sigma R-7012, 1g
- 8.) Borat : Sodium tetraborate, Decahydrat, Sigma B-9876
- 9.) Propidium iodide : Sigma P-4170, 10mg
- 10.) Ribonuklease A : Typ1-AS from Bovine Pan, Sigma R-5503, 500mg
- 11.) Ethanol 70% : aus 100% Ethanol J.T.Baker, Nr.8006
- 12.) HCl 2N : Merck, hn1789, 1l

Lösungen :

- 1.) Diluting buffer: 500ml PBS + 0,5g BSA (= Albumin, FractionV) + 0,25ml Tween 20
Anmerkung: erst Tween 20 zum PBS geben, dann BSA dazu
- 2.) Pepsin (2500 FIP-U/g, 35000 E/g) der Konzentration 0,4mg/ml in 0,1 N HCl auflösen
- 3.) 1,905g Borate in 50ml Aquadest auflösen → 0,1 M Borate
Anmerkung: schwer löslich, Magnetfisch benutzen, jedesmal frisch ansetzen
- 4.) AK- Mischung: 0,01µg/µl-stock solution in 100µl aliquot (Lagerung bei -20°C) wird aufgetaut und 1:10 mit dem diluting buffer verdünnt → Konz. 1µg/ml
- 5.) FITC- Mischung: 1µl der stock solution (Lagerung bei +4°C) wird 1:40, d.h. mit 39µl diluting buffer, verdünnt
- 6.) Propidiumjodid-RNase-Mischung: 500 µl Propidiumjodid (Konz. 10µg/ml), darin 0,2mg/ml RNase, pro Probe

2.9 Aufbau der Versuche zur exogenen Gabe von TGF-β1

Es wurden FACS-Messungen mit Fibroblasten (Fb) durchgeführt, deren Medium 1ng bzw. 10ng TGF-β1 zugesetzt wurde. Hierbei entsprach der Zeitpunkt „Zugabe von TGF-β“ dem vorigen „Beginn der Kokultur“. Es wurden die gleichen Messzeitpunkte eingesetzt.



Das Aussäen der wells erfolgte 18h vor Zugabe von TGF-β1, so dass der Zeitpunkt „Zugabe von TGF-β1“ dem Zeitpunkt „Beginn der Kokultur“ in Teil 3a entsprach.

2μg TGF-β1 (R&D Systems, Nr.240-B-002 recombinant) wurden zunächst in 2ml einer Mischung aus 10ml 4mM HCl und 10mg BSA aufgelöst → Konzentration von 1μg/ml.

Für den Versuch wurden folgende Verdünnungen hergestellt:

Konz. von 1ng/ml: 50μl der 1μg/ml-Lösung + 450μl PBS, davon 30μl/ 3ml Medium im well.

Konz. von 10ng/ml: 30μl der 1μg/ml-Lösung auf 3ml Medium im well.

Der Versuchsablauf und die Durchführung der KIT-Prozedur entsprachen Versuch 3a.

3. Ergebnisse

3.1 Zellproliferation und Einfluss von FBS

a) Zellproliferation von Rattenfibroblasten:

	Blanks	2000	5000	10000	20000
Mittelwert	0,181	1,397	1,664	1,869	1,988
Standardabw.	0,020	0,151	0,171	0,119	0,124

Tab.1

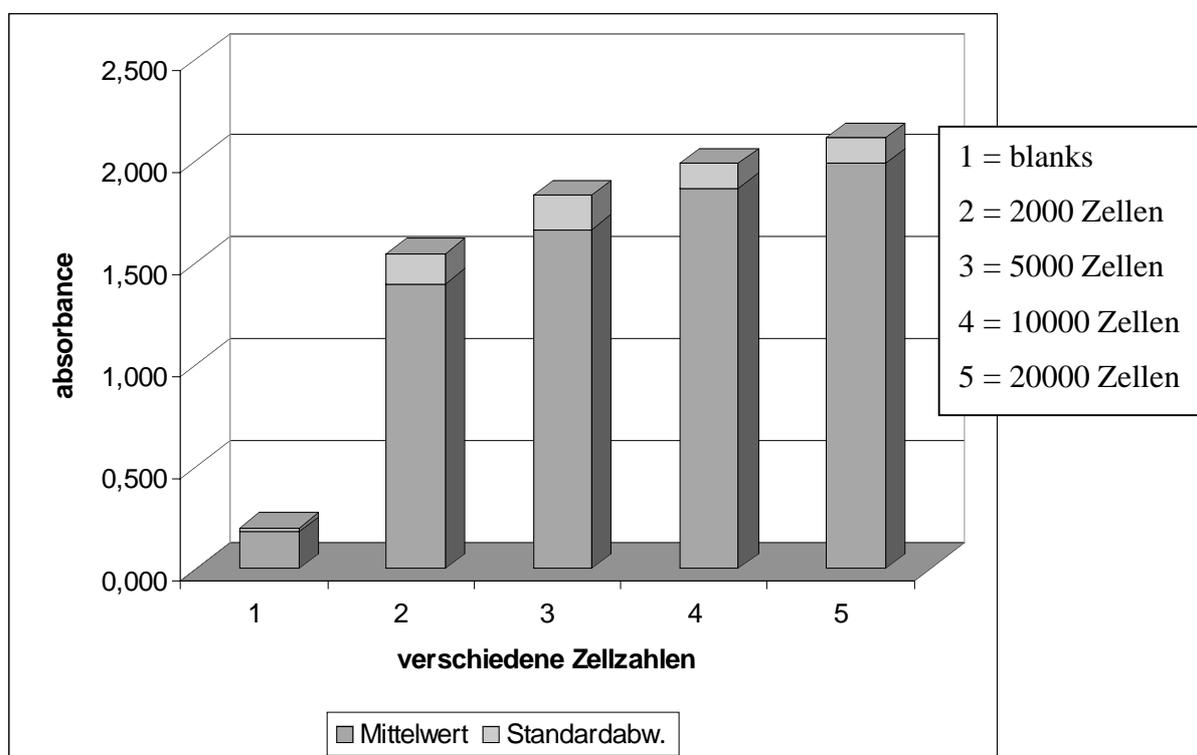


Abb. 4: Proliferationskurve von Rattenfibroblasten

Größere Zellzahlen ergeben höhere absorbance-Werte, die mit der Zellproliferation korrelieren. Die Extinktionskurve zeigt keine lineare Abhängigkeit zwischen Zellzahl und Proliferation, sondern läuft bei höheren Zellzahlen auf eine Sättigung zu. Es ist anzunehmen, dass die Zellen zunehmend „konfluent“ wuchsen, was eine Stagnation des Wachstums zur Folge hatte. Da die Zellzahl 2000/well die beste Proliferationsrate zeigte und der Mittelwert der absorbance mit 1,397 in einem günstigen Messbereich lag, wurde sie als Ausgangszellzahl für die Versuche in Teil 2 eingesetzt.

b) Zellproliferation humaner Lungenfibroblasten:

	Blanks	1000	5000	8000	15000	20000	35000	50000
Mittelwert	0,463	0,782	0,799	1,023	1,201	1,337	1,432	1,427
Stabw.	0,069	0,113	0,077	0,103	0,097	0,132	0,171	0,184

Tab.2

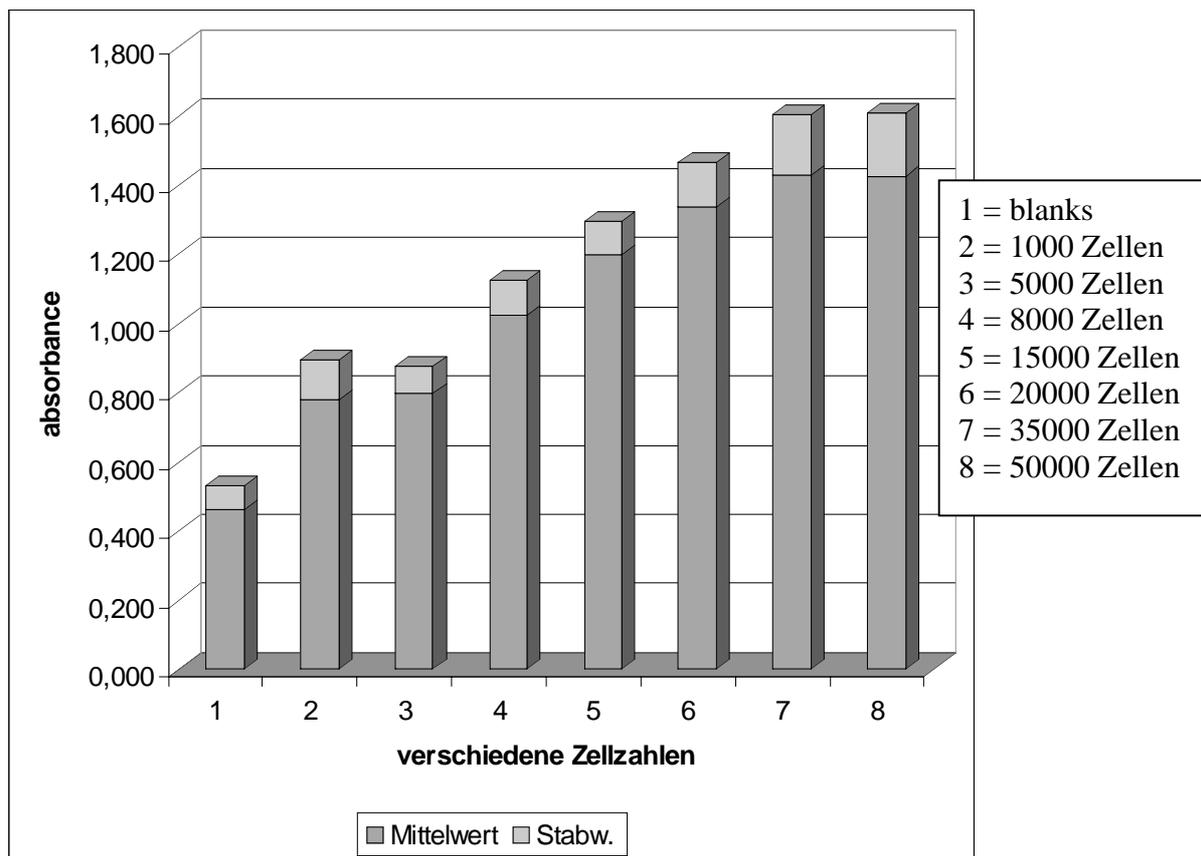


Abb.5: Proliferationskurve menschlicher Lungenfibroblasten

Im Vergleich zu Versuch 1a mit Rattenfibroblasten fällt auf, dass trotz längerer Inkubationszeit geringere Extinktionswerte bei menschlichen Lungenfibroblasten gemessen wurden. Ungeachtet dieser geringeren Proliferationsraten wurde aber ein ähnlicher Extinktionskurvenverlauf gefunden: größere Zellzahlen ergeben höhere absorbance-Werte, im oberen Bereich liegt eine Wachstumsättigung aufgrund konfluenten Wachstums vor.

c) Zellproliferation in Medium unterschiedlichen FBS-Gehaltes:

	MZP 1	MZP 2	MZP 3
0,4% Probe 1	320000	129000	90000
0,4% Probe 2	350000	126000	99000
4% Probe 1	200000	228750	213000
4% Probe 2	135000	232500	219000
10% Probe 1	160000	397500	333000
10% Probe 2	177000	367500	324000

Tab.3

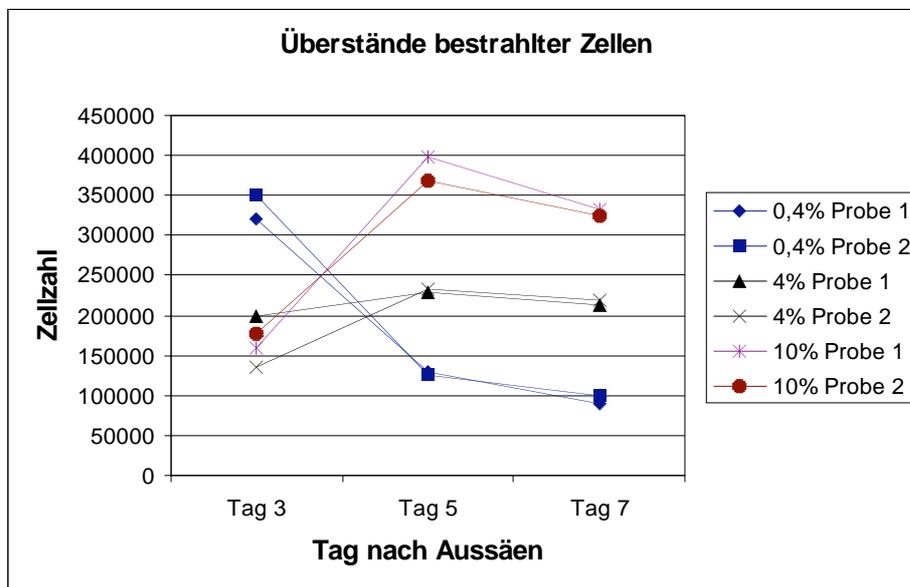


Abb.6: Zusammenhang zwischen FBS-Gehalt des Mediums und Fibroblastenwachstum

Bis zu MZP 1 = Tag 3 zeigen die Zellen zunächst ein besseres Wachstum in fast FBS-freiem Medium. An MZP 2 = Tag 5 ist der Einfluss von FBS auf die Zellproliferation zu sehen: die Proben in 0,4%-FBS-haltigem Medium wachsen langsamer, während die Zellen der anderen Proben abhängig vom FBS-Gehalt stärker proliferieren.

MZP 3 = Tag 7 zeigt noch einmal dasselbe Verhältnis der Proben zueinander: 10% FBS im Medium hat zur stärksten Proliferation geführt, 0,4% FBS im Medium zur geringsten.

Bei allen Proben ist an Tag 7 ein leichter Wachstumsrückgang zu erkennen, der bei 10%FBS auf eine Proliferationshemmung durch Kontaktinhibition bei konfluentem „Zellrasen“ schließen läßt, bei den niedrigen FBS-Konzentrationen Ausdruck von Zellverlust ist.

3.2 Wirkung bestrahlter Überstände

Einfluss von Überständen bestrahlter Fibroblasten auf die Zellproliferation:

Mittelwerte	MZP 1	MZP 2	MZP 3	MZP 4	MZP 5	MZP 6	
blanks							0,09
Zellen in Normalmedium							1,49
0 Gy	1,66	1,9	1,85	1,95	1,7	1,6	
0,5 Gy	1,3	1,5	1,45	1,26	1,1	0,9	
5 Gy	1,1	1,2	0,95	0,89	1	0,89	
10 Gy	0,46	0,6	0,6	0,2	0,52	0,13	

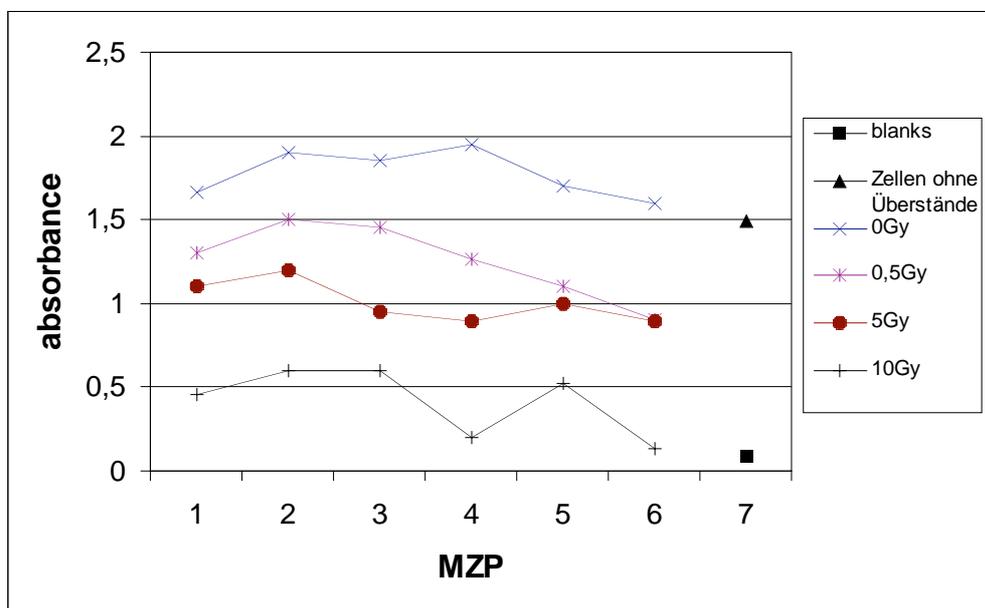


Abb.7: Proliferationskurve „Überstände“ I

Diejenigen Zellen, die vier Tage lang in Überständen unbestrahlter Zellen wuchsen, zeigten keinerlei Wachstumseinschränkung und waren vergleichbar mit dem Wachstum der Kontrollgruppe „Zellen in Normalmedium“.

Die Zellen, welche in Überständen bestrahlter Zellen wuchsen, zeigten eine Wachstumshemmung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis: je höher die Strahlendosis war, desto schlechter proliferierten die Zellen. Die Überstände der mit 0,5Gy bestrahlten Zellen bremsen das Wachstum im Vergleich zu den unbestrahlten Proben geringfügig, die Überständen der mit 5Gy bestrahlten Zellen noch deutlicher, und die Überstände der Zellen, die mit einer 10Gy-Dosis bestrahlt wurden, hemmten das Zellwachstum am meisten.

3.3 Kokulturversuche

Kokultur mit bestrahlten (=10Gy) bzw. unbestrahlten (=0Gy) Fibroblasten:

Tag 1 nach Bestrahlung:

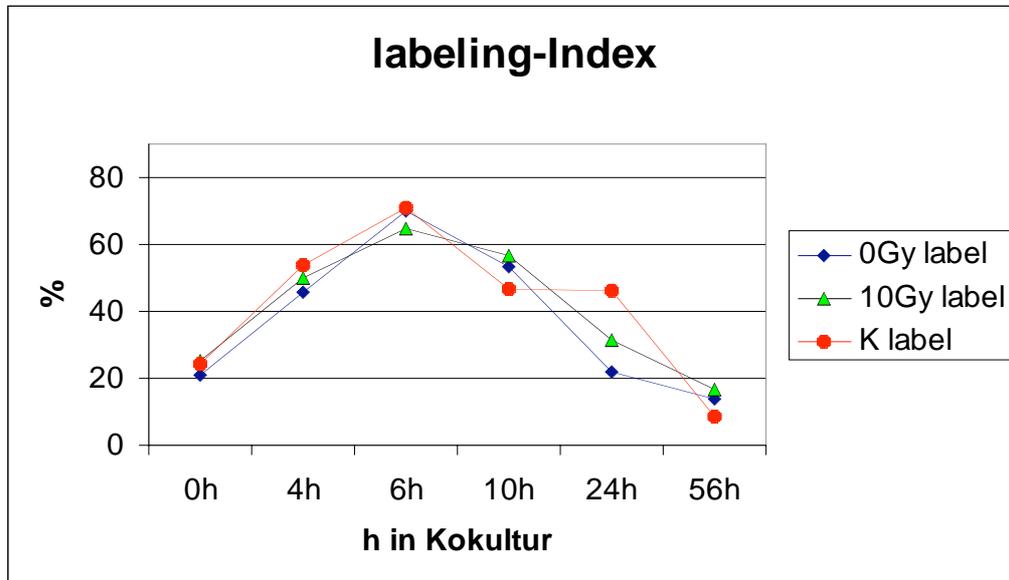


Abb.8

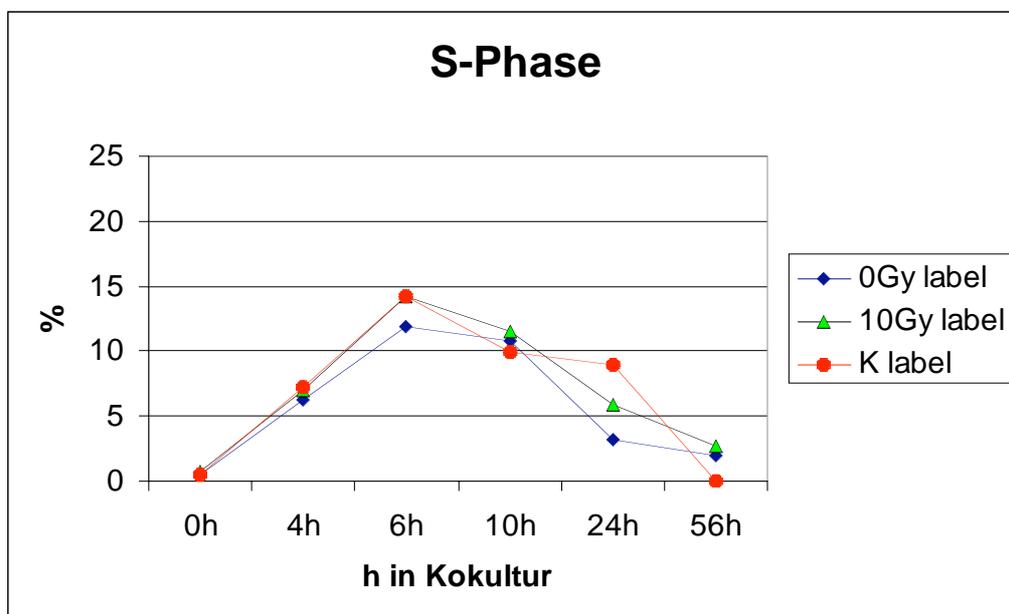


Abb.9

Tag 8 nach Bestrahlung:

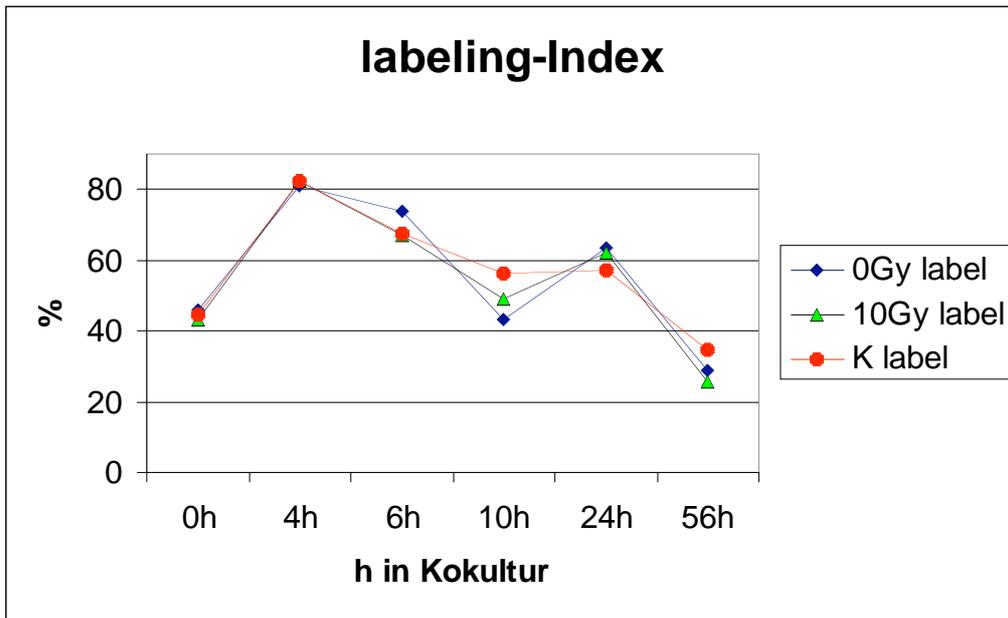


Abb.10

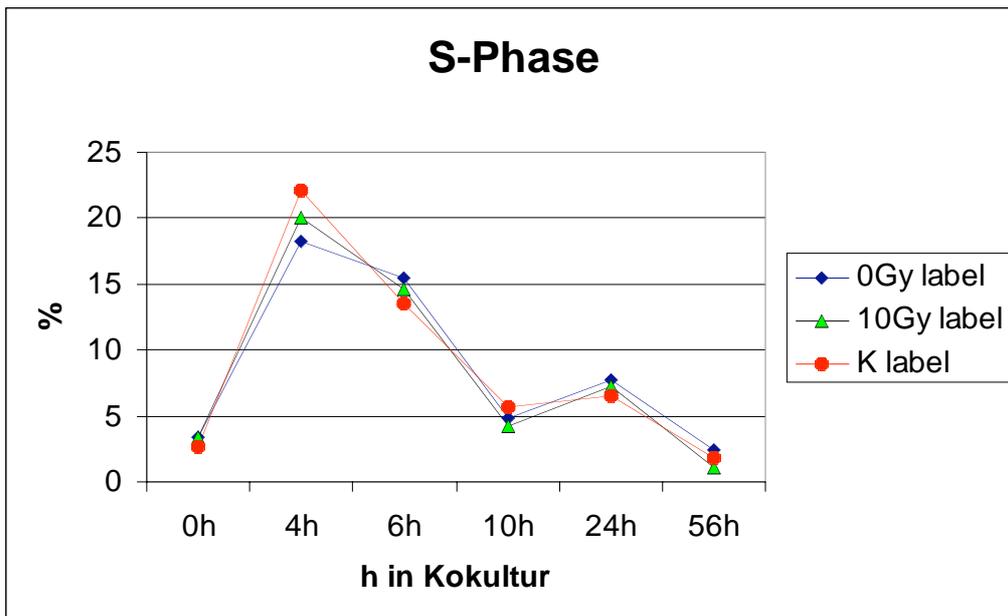


Abb.11

Tag 12 nach Bestrahlung:

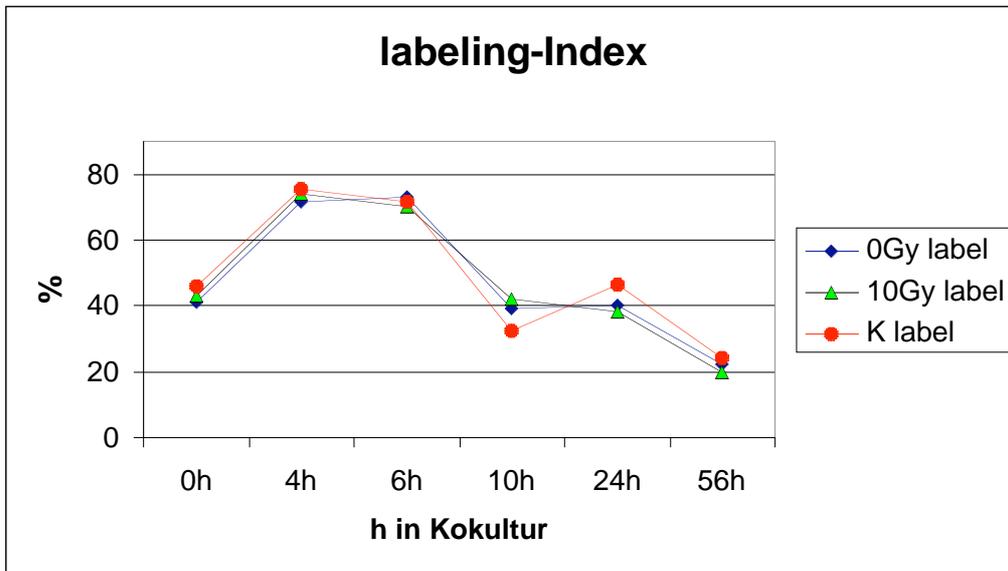


Abb.12

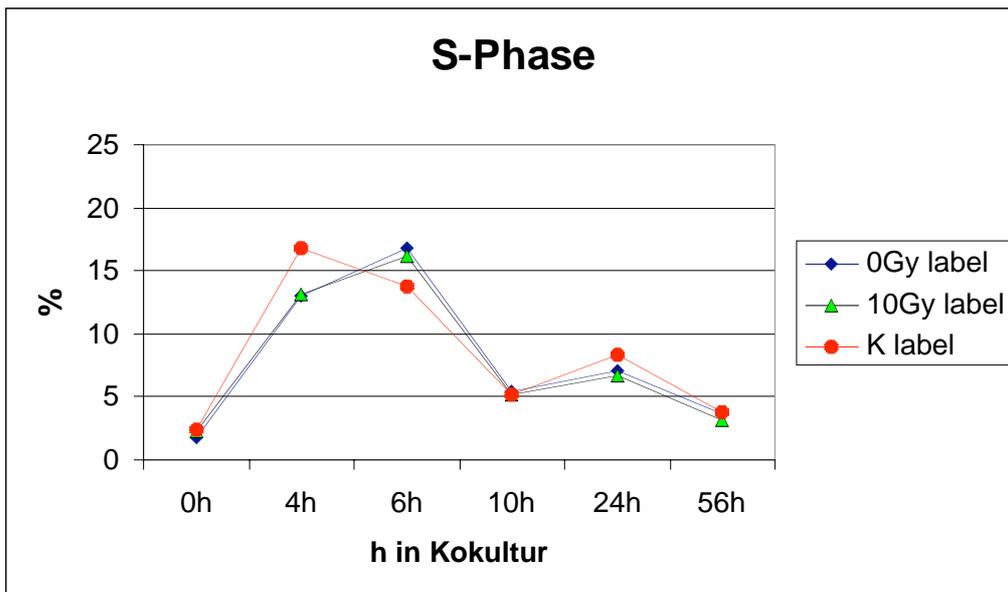
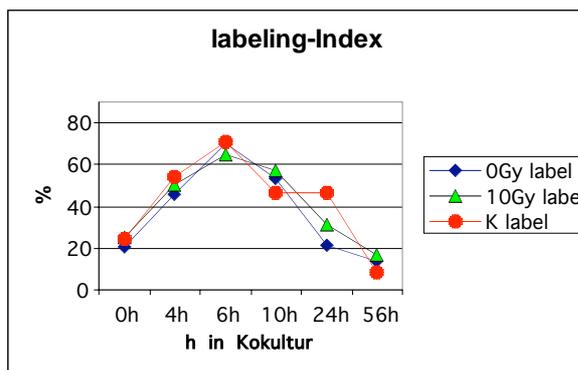


Abb.13

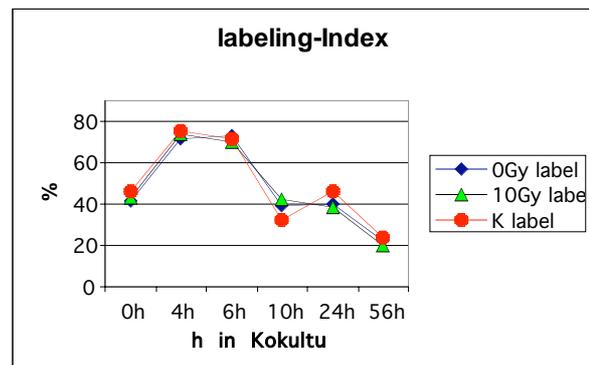
Die Diagramme Abb. 8-13 zeigen keinen signifikanten wachstumshemmenden Effekt einer Kokultur zwischen bestrahlten und unbestrahlten Fibroblasten während einer „frühen“ Kokulturzeitspanne bis zu 56h. Auch im Vergleich der Versuchstage 1, 8 und 12 nach Bestrahlung fielen keine bedeutenden Unterschiede in den Diagrammverläufen auf, lediglich das Erreichen des Kurvengipfels schwankte zwischen MZP 4h und MZP 6h.

Dies läßt auf unterschiedliche Zellzyklusgeschwindigkeiten schließen, wobei kein Unterschied zwischen Kokulturen mit bestrahlten oder unbestrahlten Zellen zu sehen ist. Unsere Vermutung aus Versuch 2, dass die Proliferation durch die Überstände bestrahlter Zellen gebremst wird, konnte durch diesen Versuch nicht bestätigt werden.

Dennoch war eine Tendenz zu beobachten: die Kokulturproben waren in ihrer Proliferationsgeschwindigkeit gegenüber den Kontrollproben der Monokultur etwas verlangsamt. In allen Diagrammen fällt auf, dass die Kurven ab dem Messzeitpunkt 6h von ihrem einheitlichen Verlauf abweichen und sich unterschiedlich weiterentwickeln. Bei der Messung Tag 1 (siehe linkes Diagramm) nach Bestrahlung beispielsweise findet sich zum MZP 6h der höchste absorbance-Wert bei der Kontrollgruppe, zum MZP 10h liegt diese Kurve unterhalb der anderen Kurven, bei 24h darüber und bei 56h wieder unterhalb.



Tag 1 nach Bestrahlung

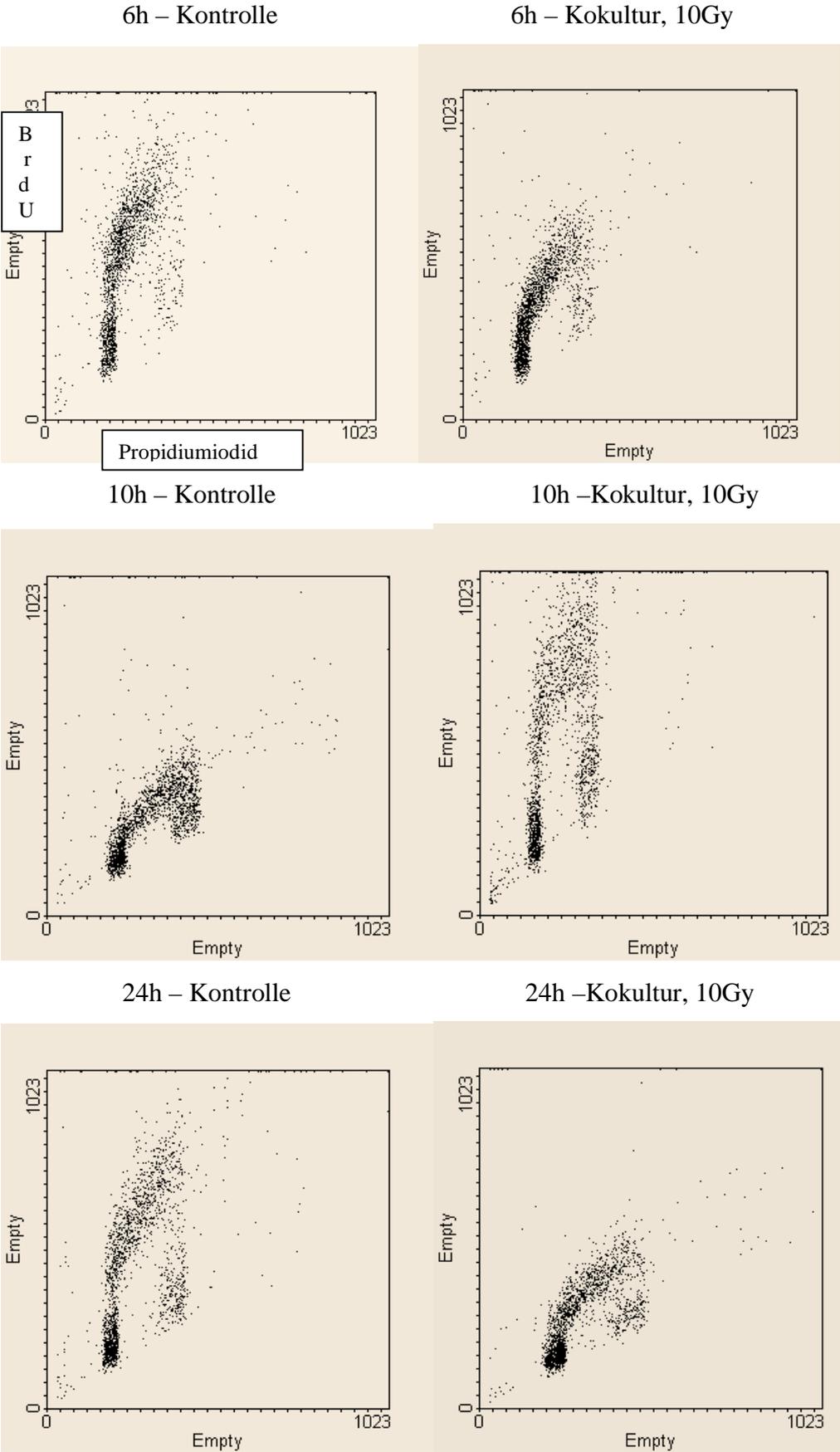


Tag 12 nach Bestrahlung

Auch bei den Messungen Tag 8 bzw. Tag 12 (siehe rechtes Diagramm) nach Bestrahlung sieht man einen ähnlichen Kurvenverlauf, bei dem die Kontrollgruppe den Zellzyklus scheinbar schneller durchläuft als die Kokulturproben. Man könnte also vermuten, dass eine Kokultur unbestrahlter Fibroblasten sowohl mit bestrahlten als auch mit unbestrahlten Fibroblasten zu einem langsameren Durchlaufen des Zellzyklus führt.

Die Plotdarstellung des Zellzyklus, welche man am Bildschirm des Durchflusszytometers sieht, zeigt einen ähnlichen Verlauf. Auf der y-Achse ist der BrdU-Einbau der Zellen dargestellt, der mit dem Anteil proliferierender Zellen korreliert. Die x-Achse zeigt die Menge an Propidiumiodid, was den zeitlichen Ablauf von der G1-Phase über die S-Phase bis zur G2-Phase demonstriert.

Abb.14: Plotdarstellung Tag 1



3.4 exogene Gabe von TGF- β 1

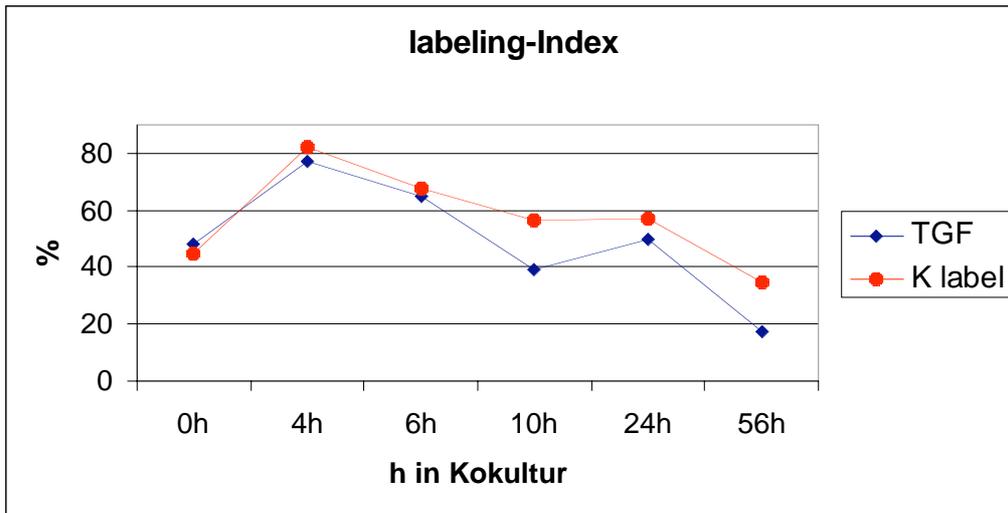


Abb.15

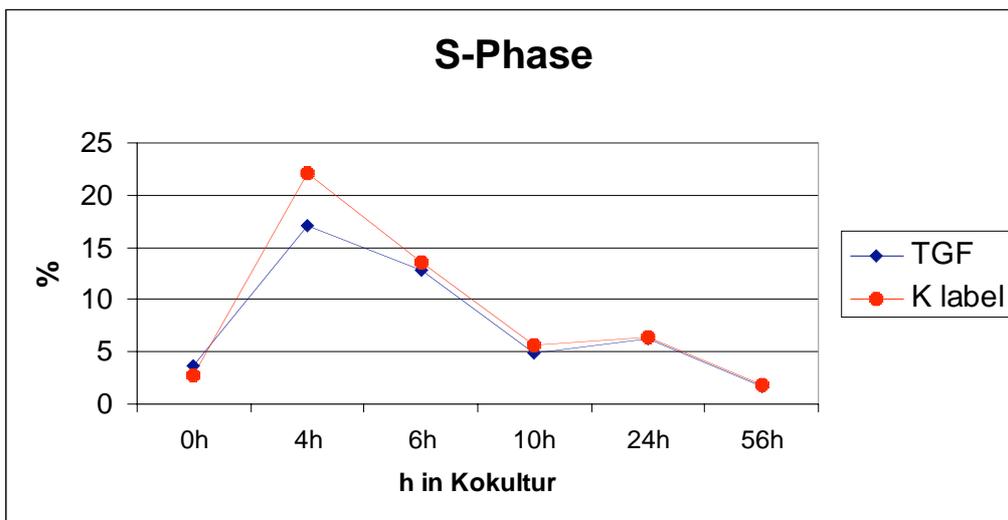


Abb.16

Die Zugabe von TGF- β 1 bewirkte bis zu einer Inkubationszeit von 56h eine leichte Wachstumshemmung der Zellen. Die Entwicklung der Kurven in Abb.15 läßt vermuten, dass zu noch späteren Messzeitpunkten eventuell ein stärker hemmender Effekt zu erwarten wäre.

4. Diskussion

Bei der Behandlung maligner Erkrankungen nimmt die Strahlentherapie, neben operativen Verfahren und systemischer Chemotherapie, einen wichtigen Stellenwert ein. Durch Radiotherapie kann vor allem eine hohe Lokalkontrolle von Tumoren erreicht und die Rezidivrate deutlich gesenkt werden. Die Bestrahlungstechnik hat sich im Laufe der Zeit wesentlich verbessert, so dass Zielvolumina sehr präzise bestrahlt werden können. Dennoch lassen sich Nebenwirkungen nicht völlig vermeiden, die die Lebensqualität des Patienten beeinträchtigen. Es ist daher ein wichtiges Ziel, die Pathogenese radiogener Lungenschäden zu erforschen und neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

Pulmonale Strahlenschäden wurden von Rube et al. (84) in drei Abschnitte gegliedert. Der Latenzphase folgt nach zwei bis 16 Wochen die Phase der akuten Pneumonitis, ab der 24. Woche die Fibrosephase (84, 70).

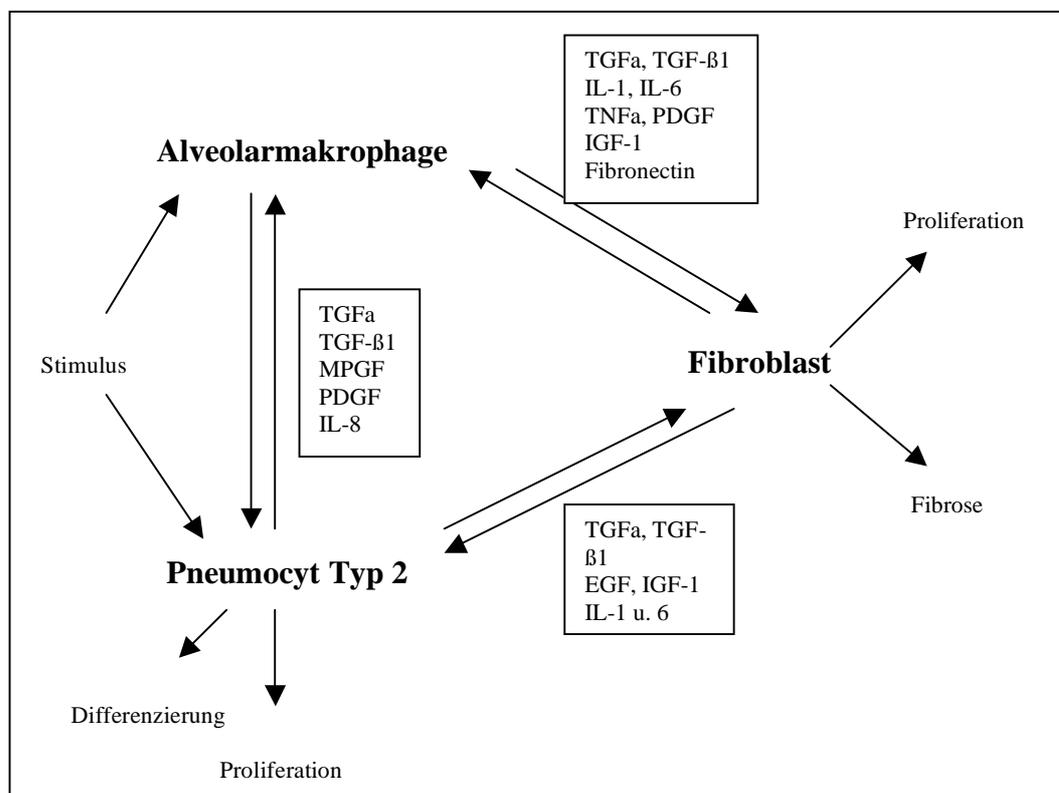
Während der Phase der akuten Strahlenpneumonitis können Symptome wie Husten, Dyspnoe, Fieber oder thorakale Schmerzen auftreten. Die späte Lungenfibrose kann klinisch unauffällig verlaufen, aber auch zu schweren Manifestationen wie massiver Dyspnoe, respiratorischer Insuffizienz, Cor pulmonale und Mediastinalverschiebung führen (70).

Das Ausmaß des Strahlenschadens wird durch Faktoren wie Einzel- und Gesamtdosis, Fraktionierungsschema, Größe des bestrahlten Lungenvolumens, bestehende Lungenschäden, Chemotherapeutika und chirurgische Eingriffe beeinflusst (65, 70, 17). Eine niedrige Gesamtdosis in kleinem Lungenvolumen wird relativ gut vertragen, nicht aber eine niedrige Dosis in der gesamten Lunge, wie z.B. im Rahmen einer gezielten Myelosuppression (64, 46). Tierexperimentell beeinflussten auch genetische Faktoren die Strahlenempfindlichkeit, z.B. zeigte sich bei Mangel an Adhäsionsmolekül ICAM-1 ein vermindertes Auftreten von Strahlenpneumonitis (38, 39). Bei Fibrose-resistenten Mausstämmen wurden auch nach exogenen Fibrose-Stimuli, wie Bestrahlung oder Bleomycin, niedrigere Spiegel bestimmter Zytokine und TGF- β 1 gemessen (53). Patienten mit erhöhten Konzentrationen von TGF- β , IL-1 oder IL-6 vor oder während Strahlentherapie schienen ein größeres Risiko für Pneumonitis zu haben (16). Erhöhte TGF- β -Spiegel am Ende der Strahlentherapie hatten ein häufigeres Auftreten von symptomatischer Lungenschäden sechs Monate bis zwei Jahre nach Behandlungsende zur Folge (31).

4.1 Die Pathogenese der Lungenfibrose

Die Entstehung der Lungenfibrose ist noch nicht völlig geklärt. Früher sah man eine Entzündungsreaktion als Ursache der Fibrose, bei der Gefäßschaden, proinflammatorische Zytokine und die Gerinnungskaskade eine Rolle spielen, und bestimmte Zielzellen als Angriffspunkt für die Strahlung existieren (32, 91, 98). Man stellte dies der idiopathischen Lungenfibrose gegenüber, bei der Mesenchymzellproliferation, abnorme Wundheilung und Ablagerung extrazellulärer Matrix beteiligt sind (87). Neuerdings wird diese These der Entzündungsreaktion angezweifelt, da das Fortschreiten der Krankheit nicht mit den typischen Merkmalen einer Entzündung einhergeht und wenig auf antiinflammatorische Medikamente anspricht. Eher scheint die extrazelluläre Matrix eine tragende Rolle zu spielen (19).

In der Lunge werden etwa 40 verschiedene Zelltypen unterschieden. Im Zusammenhang mit Lungenfibrose sind vor allem Makrophagen, Pneumozyten Typ II, Endothelzellen und Fibroblasten zu nennen (49, 50, 70). Das Modell von Aggarwal und Pocsik (2) zeigt dieses Zusammenspiel verschiedener Zellen und Faktoren, die für die Entstehung der Fibrose verantwortlich sind.



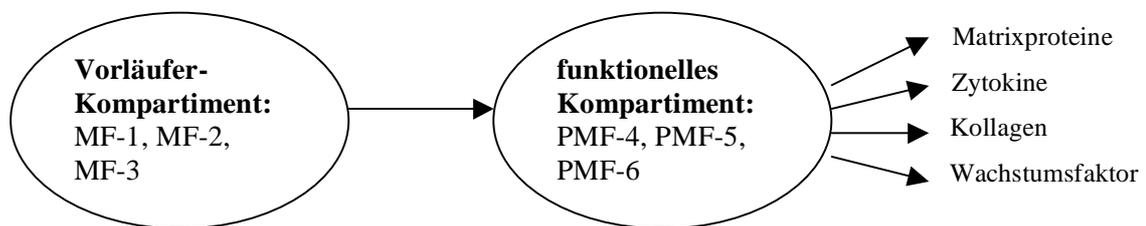
Bei der normalen Wundheilung werden Fibroblasten vorübergehend zu sogenannten Myofibroblasten aktiviert, die Proliferation und Ablagerung kollagener Matrix ermöglichen. Anschließend treten Rückkopplungsmechanismen in Kraft, welche die zellulären Aktivitäten bremsen. Myofibroblasten gelten als terminal differenzierte Zellen und verschwinden schließlich durch Apoptose. Im Falle der Fibrose funktionieren die Rückkopplungsmechanismen nicht, so dass es zur dauerhaften Myofibroblastenaktivierung kommt. Ein Grund dafür könnte die übermäßige Produktion wachstumsstimulierender Zytokine sein (62, 63, 45).

Zytokine sind Signalmoleküle, die kaskadenartig aktiviert werden und Entzündungsvorgänge steuern können. Man kann sie in Interferone, zytotoxische Faktoren, Interleukine, Hämatopoese stimulierende Faktoren, inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren einteilen (86). Zytokine und Wachstumsfaktoren werden bei verschiedenen Formen von Zellschädigungen, z.B. durch chirurgische Eingriffe, Chemotherapie oder ionisierende Strahlung, ausgeschüttet (4, 92, 91, 24). Bei der Lungenfibrose findet man eine Überexpression der profibrotischen Zytokine IL-1 β , TNF- α , GM-CSF und TGF- β 1, welches als Schlüsselenzym bei der Entstehung von Lungenfibrose gilt (51, 99, 75, 76, 85).

TGF- β gehört zur Familie der "transformierenden Wachstumsfaktoren", die Zellen so transformieren können, dass diese ortsunabhängig wachsen können (33). Es wird von verschiedenen Zelltypen, wie Thrombozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Epithel- und Endothelzellen und Fibroblasten gebildet. Drei Isoformen mit ähnlicher Wirkung, TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3, werden unterschieden (62). TGF- β 1 wird in inaktiver Form, gebunden an LAP (latency associated peptide), in den Extrazellularraum ausgeschüttet. Verschiedene Enzyme, Extrazellularproteasen oder physikalisch/chemische Faktoren, wie z.B. ionisierende Strahlung, aktivieren TGF- β 1 (71, 8, 28, 88). LAP kann an LTBP (TGF- β -binding protein), welches Verbindung zu extrazellulärer Matrix hat, andocken (61). TGF- β 1 reguliert andere Zytokine wie EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor), TNF und IL-1 (13). Bei der Entstehung von Lungenfibrose hat TGF- β 1 wichtige Aufgaben. Es fördert die Fibroblastenproliferation und schafft einen Zustand der autokrinen Stimulierung in Fibroblasten, der durch chronische Aktivierung und vorzeitige terminale Differenzierung charakterisiert ist (79, 33, 70, 78).

Zur Darstellung der zu Fibrose führenden Vorgänge muss zunächst das Stammzellsystems der Fibroblasten/Fibrozyten und die Wirkung von TGF- β 1 darauf betrachtet werden.

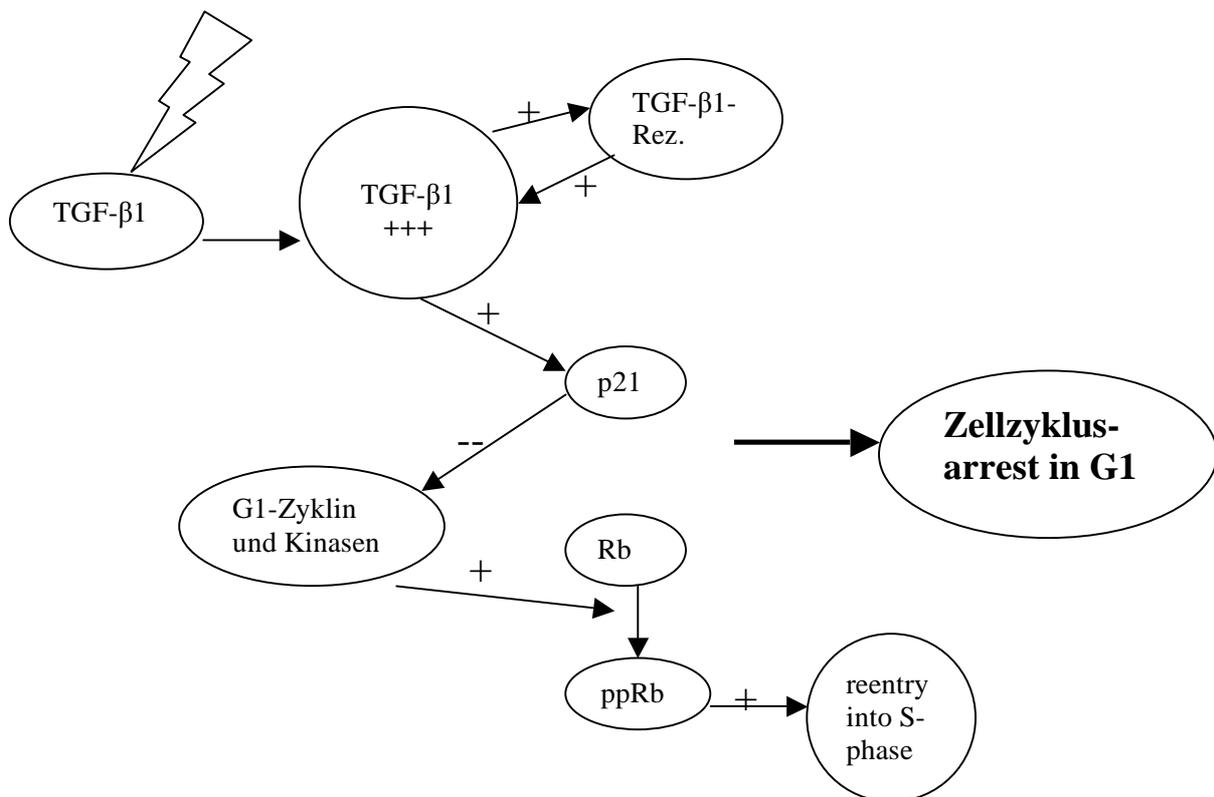
Dieses Stammzellsystem besteht aus zwei Kompartimenten, zum einen den Vorläuferfibroblasten, zum anderen den postmitotischen Fibrozyten (37). Beim Menschen existieren drei Formen von Vorläuferfibroblasten, MF-1, MF-2 und MF-3 (mitotically active progenitor fibroblasts), die verantwortlich für die Eigenregeneration und für die Regeneration postmitotischer Fibrozyten sind (79). Ebenso werden drei Formen postmitotischer Zellen, PMF-4, PMF-5 und PMF-6 (post-mitotic fibrocytes) im funktionellen Kompartiment unterschieden, welche extrazelluläre Matrixproteine, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Kollagen produzieren (83).



Diese sechs Zelltypen des Vorläufer- und des funktionellen Kompartiments konnten in verschiedenen untersuchten Geweben identifiziert werden (42).

MF-1-Vorläuferzellen teilen sich ca. 20-30mal, MF-2-Zellen wiederum 20mal, bevor sie zu MF-3-Zellen werden. Zellkolonien, die hauptsächlich aus MF-1/MF-2-Fibroblasten bestehen, stellen die Gruppe der frühen Vorläuferzellen, MF-2/MF-3-Fibroblasten die Gruppe der späten Vorläuferzellen dar (42). Insgesamt können also Zellkulturen von Vorläuferfibroblasten 50-55 Zellteilungen durchlaufen, bevor sie in den postmitotischen Zustand übergehen. Postmitotische Zellen wiederum können 55-60 Wochen lang kultiviert werden, bevor es zu Apoptose kommt (9, 80, 82, 83). Bei PMF-6-Fibrozyten handelt es sich um terminal differenzierte Zellen (80). Das Verhältnis von Vorläuferfibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten liegt normalerweise konstant bei 2:1 (9, 79, 83).

Unter normalen Umständen in vivo besteht durch die Kaskade von Zellteilung und -differenzierung immer genügend Nachschub postmitotischer Zellen aus dem Pool der Vorläuferzellen. Mit dem Alter verschiebt sich auf natürliche Weise das Verhältnis etwas zugunsten der ausdifferenzierten Zellen, ebenso spielen der Lebensstil des Einzelnen und genetische Faktoren eine Rolle (42). Als exogener Faktor kann ionisierende Strahlung, neben anderen Auslösern wie z.B. ultraviolette Strahlung oder Mitomycin C (58), über folgenden Mechanismus zur einer Verschiebung innerhalb des Fibroblasten/Fibrozyten-Stammzellsystems führen:



Bestrahlung bewirkt in Vorläuferfibroblasten sofort eine vermehrte Produktion von TGF- β 1. Es folgt eine autokrine Aktivierung über TGF- β 1-Rezeptor II und die Stimulierung der Signalkaskade über p21. Das Protein p21 kann entweder p53-abhängig, oder p53-unabhängig jedoch TGF- β -abhängig, aktiviert werden. Radiobiologische Experimente haben gezeigt, dass die p53-abhängige Induktion von p21 ein vorübergehender Prozess ist. Dagegen löst bestrahlungsinduzierte Überexpression von TGF- β über p53-unabhängige Aktivierung von p21 einen Langzeiteffekt aus. Als Kinaseinhibitor wirkt sich p21 hemmend auf die Aktivität zyclinabhängiger Kinasen aus, die für die Phosphorylierung von Rb-Protein zuständig sind, was für den Wiedereintritt der Zelle in die S-Phase notwendig ist. Die Folge davon ist ein

Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Wird die TGF- β -Produktion der Vorläuferfibroblasten längerfristig aufrecht erhalten, ist ein permanenter Zellzyklusarrest die Folge. Durch vorzeitige terminale Differenzierung entstehen vermehrt postmitotische Fibrozyten (3, 15, 22, 30, 37, 58, 73, 79, 80, 81, 82, 83). Diese sind verantwortlich für die Produktion extrazellulärer Matrixproteine und Wachstumsfaktoren. Die gesteigerte Rate postmitotischer Zellen hat somit eine übermäßige Ablagerung extrazellulärer Matrix, vor allem Kollagen, zur Folge. Zunahme von Bindegewebe und Gewebe-remodelling führen zu Fibrose (44).

Die Theorie der terminalen Differenzierung von Fibroblasten konnte in unseren Zellkulturversuchen teilweise nachvollzogen werden. Nach viertägiger Inkubation unbestrahlter Lungenfibroblasten mit Überständen bestrahlter Fibroblasten kam es dosisabhängig zu einer Hemmung der Zellproliferation. Dies ist vermutlich auf den durch TGF- β verursachten Zellzyklusarrest zurückzuführen. Nach exogener Zugabe von TGF- β zeigte sich bei späteren Messzeitpunkten eine Proliferationshemmung der Fibroblasten. Während einer Kokulturzeit von 56h konnte noch kein wachstumshemmender Effekt festgestellt werden. Eventuell wäre dies nach längerer Inkubationszeit deutlich geworden. Zudem wurde in dieser Arbeit nur die Zellgruppe der proliferierenden Zellen untersucht. Die Analyse einzelner Zellzyklusphasen aller, auch der nicht proliferierenden, Zellen in unserem Labor hat gezeigt, dass TGF- β 1 auf manche Zellgruppen hemmend, auf andere aber stimulierend wirkt (103).

In früheren Versuchen unseres Labors wurden ähnliche Kokulturversuche mit humanen Lungenfibroblasten durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Proliferationshemmung der bestrahlten Zellen selbst und eine dosisabhängige Wachstumsstimulation der unbestrahlten Fibroblasten. Der TGF- β 1-Gehalt in den Überständen der bestrahlten Zellen war bis zu fünffach erhöht. Man zog den indirekten Schluß daraus, dass Bestrahlung TGF- β induziert und eine Art Selbstaktivierung der Zellen bewirkt (52).

Viele weitere Forschergruppen beschäftigten sich mit der Pathogenese der Lungenfibrose, wobei Rodemann et al. eine wichtige Rolle einnehmen. Sie konnten im Kokulturmodell aus Pneumozyten Typ 2 und Fibroblasten zeigen, dass Bestrahlung von Pneumozyten eine sofortige TGF- β 1-Synthese zur Folge hat, was die Proliferation von Vorläuferfibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten fördert (79). Diese vorzeitige terminale Differenzierung im Fibroblasten/Fibrozytensystem führte zur Senkung seiner Überlebensrate um ca. 40-45%. Zwischen Vorläuferfibroblasten und postmitotischen Fibrozyten bestehen Unterschiede in der basalen TGF- β 1-Sekretion und in der TGF- β 1-Sekretion nach Bestrahlung. Postmitotische Zellen produzieren selbsttätig 10-15mal mehr TGF- β als Vorläuferfibroblasten, nach Bestrahlung steigt die TGF- β -Synthese jedoch nicht weiter an. Ob die höhere basale TGF- β -Produktion postmitotischer Fibrozyten zur Aufrechterhaltung des Zustands der terminalen Differenzierung nötig ist, steht bislang noch nicht fest (82, 83).

Experimente verschiedener Arbeitsgruppen zeigten eine vermehrte TGF- β -Produktion direkt nach Bestrahlung, der Gipfel wurde nach 12h erreicht (28, 84, 86). Martin et al. (62) fanden eine TGF- β -Induktion in der Haut bereits sechs Stunden nach Bestrahlung. Ein solch schneller TGF- β -Anstieg könnte den Nutzen haben, während der ersten 24h das Zellwachstum zu verlangsamen, um entweder Reparaturvorgänge zu ermöglichen, oder bei irreparablen Zellschaden zu Apoptose zu führen. Der Verlauf eines zweigipfligen TGF- β -Anstiegs wurde zum Beispiel in bestrahlten Rattenherzen gefunden. Dies erklärt, warum TGF- β sowohl bei der akuten Bestrahlungsreaktion eine Rolle spielt, als auch bei der Entstehung der späten Lungenfibrose (57). Ein Mindestschwellenwert an TGF- β 1 ist erforderlich, um einen Einfluss auf die Zellproliferation zu sehen (93).

Mit unseren Versuchen vergleichbar waren Untersuchungen zur Zellzyklusanalyse von Murata et al. Unter Verwendung der double-staining-Methode mit BrdU und Propidiumiodid konnte 4-7h nach Bestrahlung ein Übergang von der G1 zur frühen S-Phase, nach 18h eine Zellhäufung in der G2 und M-Phase dargestellt werden. Eine Bestrahlungsdosis von 3Gy bzw. 6Gy bewirkte einen Anstieg der G2- und M-Fraktion von 10% auf 30%, eine Dosis von 9Gy sogar auf 60%. Nach drei bis fünf Tagen war immernoch eine Akkumulation in der G2 und M-Phase zu erkennen. (72). Rubin et al. hatten in ähnlichen Versuchen ebenfalls 4h nach Bestrahlung mit 10Gy eine verminderte Zellzahl in der G1 und S-Phase, nach 24h einen

Anstieg der G2- und M-Phase mit Blockade des Übergangs von der G1- zur S-Phase beschrieben (86). Auch Lara et al. verwendeten die Methode der doppelten Färbung und konnten am Durchflusscytometer einen deutlichen Anstieg postmitotischer Zellen 7 Tage nach Bestrahlung darstellen (58).

Zellkulturversuche mit Überständen bestrahlter Zellen wurden auch von Herskind et al. durchgeführt. Sie bestimmten die TGF- β 1-Menge in Zellüberständen, die in bestrahlten und in unbestrahlten Proben gleich groß war. Die Zellzahl der bestrahlten Proben war jedoch aufgrund der Wachstumsverzögerung um 25-35% niedriger, so dass diese Zellen mehr TGF- β 1 freigesetzt haben müssen als die unbestrahlten Zellen (42). Dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein, die eine Wachstumshemmung der mit bestrahlten Überständen inkubierten Zellen zeigten, was indirekt auf eine vermehrte TGF- β -Produktion schließen lässt.

Ähnlich wie in unseren Versuchen, wurde auch von Burger et al. gezeigt, dass exogene Zugabe von TGF- β 1 die Proliferation von Lungenfibroblasten signifikant senkt. Durch einen TGF- β 1-Antikörper konnte dieser Effekt antagonisiert werden. Die Zugabe von TGF- β 1 bewirkte eine Abnahme von Vorläuferzellen und eine Zunahme postmitotischer Zellen um über 40%. Die gleichzeitige Verabreichung eines TGF- β 1-Antikörpers stellte die ursprüngliche zelltypische Konstellation wieder her (15). Auch andere Arbeitsgruppen konnten vermehrte Kollagensynthese und Fibrosebildung nach exogener TGF- β 1-Gabe demonstrieren (6, 89).

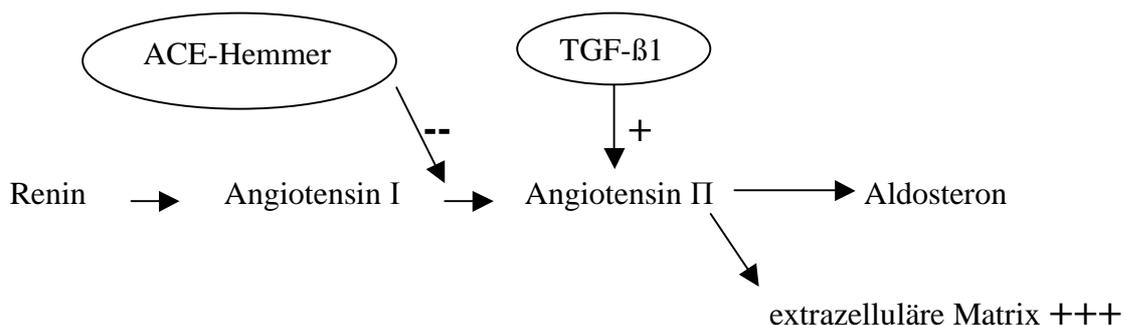
4.2 Therapieansätze

Da TGF- β 1 wesentlich an der Pathogenese der radiogenen Lungenfibrose beteiligt ist, stellt es einen interessanten Ansatzpunkt für neue Therapiestrategien dar (54, 43, 36).

Die Blockade von TGF- β 1 durch exogene oder endogene Inhibitoren ist ein vielversprechendes Therapiekonzept. Experimentell konnte im Mausmodell durch Transfer von Decorin, einem endogenem Proteoglycan, die Entwicklung einer durch Bleomycin induzierten Lungenfibrose blockiert und die Funktionalität der Lunge wiedererlangt werden. Da Decorin auf natürliche Weise vorhanden ist, stellt es ein geeigneteres Mittel dar als exogene Antikörper oder lösliche TGF- β 1-Rezeptoren (56).

Auch die Inhibierung von CTGF (connective tissue growth factor), einem Kofaktor von TGF- β 1, könnte die Fibroseentstehung verhindern (1, 20). CTGF wird nach Stimulierung durch TGF- β 1 von Fibroblasten sezerniert und kann in vitro die Kollagensynthese durch TGF- β 1 herbeiführen (69). Obwohl CTGF indirekt die Entwicklung einer Fibrose auslöst, kann es alleine keinen chronisch fortschreitenden Fibroseprozess unterhalten, da keine TIMP stimuliert werden, die für eine Wachstumsfaktor-reiche Umgebung sorgen (11, 12).

Beispiele für exogene TGF- β 1-Inhibitoren sind einige Medikamente, darunter die ACE-Hemmer, welche die Kette des Renin - Angiotensin I – Angiotensin II – Aldosteron - Kreislaufs unterbrechen. Angiotensin II erhöht die Synthese von extrazellulärer Matrix und unterstützt somit die Entwicklung einer Fibrose. Dieser Effekt wird durch TGF- β 1 vermittelt (47, 21). Obwohl ACE-Hemmer vor der Entstehung von Pneumonitis und Lungenfibrose in der Rattenlunge schützten (67), fand man bei Patienten, die dieses Medikament einnahmen, bislang keine reduzierte Inzidenz von Pneumonitis (96). Es wird jedoch weiter am Einsatz dieser Medikamente und auch der neueren AT II-Antagonisten geforscht (68).



Die Medikamentengruppe der Statine hat die Eigenschaft, Zytokinexpression und Entzündungszellaktivierung zu reduzieren. In Untersuchungen war durch Statine der Anteil der Makrophagen- und Lymphozytenpopulationen nach Bestrahlung verringert, die Überlebensrate besser und der Kollagengehalt geringer (97).

Schon vor einigen Jahren zeigten Epperly et al., dass die intratracheale Injektion von MnSOD-PL (manganese superoxide dismutase plasmid/liposome) vor Bestrahlung wesentlich das Ausmaß und den Schweregrad der Alveolitis reduzieren und das Überleben verlängern kann. Nach Injektion von MnSOD-PL war der TGF- β 1-peak deutlich reduziert (25, 26, 27).

In einem in-vitro-Model fanden Martin et al. eine Woche nach Inkubation mit Cu/Zn SOD eine reduzierte Exprimierung von TGF- β in Myofibroblasten (62).

Dalanian et al. demonstrierten bei Strahlentherapiepatienten die Reduktion einer lange bestehenden Strahlenfibrose durch SOD (23). In Tierversuchen konnte diese Wirkung ebenfalls beobachtet werden (60), und auch Studien über die Verwendung von SOD bei Brust-Fibrose-Patienten scheinen erfolgsversprechend zu sein (10).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde in Zellkulturexperimenten die Proliferation von Lungenfibroblasten der Ratte nach Bestrahlung untersucht. Hierbei wurden Zellen mit bestrahlten Überständen inkubiert, eine Kokultur aus bestrahlten und unbestrahlten gezüchtet und exogenes TGF- β 1 zugegeben. Anhand von Messungen am ELISA-reader bzw. am Durchflusszytometer wurden die Zellproliferation und einzelne Zellzyklusphasen dargestellt.

Bestrahlte Überstände bewirkten eine dosisabhängige Wachstumshemmung von Fibroblasten. Auch exogene Gabe von TGF- β 1 inhibierte die Zellproliferation. Da in der Literatur erhöhte TGF- β 1-Mengen im Medium bestrahlter Zellen beschrieben sind, kann der indirekte Rückschluss gezogen werden, dass in unseren Experimenten ebenfalls vermehrte TGF- β 1-Produktion zu Proliferationshemmung führte. Die Theorie der Pathogenese radiogener Lungenschäden konnte somit in unseren Untersuchungen nachvollzogen werden: Bestrahlung aktiviert TGF- β 1, welches als Schlüsselenzym die weiteren Vorgänge triggert. Durch autokrine Stimulierung von Fibroblasten kommt es schließlich zur Hemmung der Signalkaskade über p21. Zellzyklusarrest in der G1-Phase und terminale Differenzierung zu postmitotischen Fibrozyten sind die Folge. Die gesteigerte Kollagenproduktion dieser Zellen führt schließlich zur Entstehung von Lungenfibrose.

In der Praxis stellen diese Lungenschäden den limitierenden Faktor bei der strahlentherapeutischen Behandlung von Patienten dar. Um die Nebenwirkungen einer Strahlentherapie gering zu halten, müssen zunächst technische Faktoren, wie die Größe des Zielvolumens, die Einzel- und Gesamtdosis etc. beachtet und speziellen Lagerungstechniken angewandt werden (29). Neue zielgenauere Bestrahlungstechniken wie "intensity-modulated radiotherapy" tragen dazu bei, unter Schonung des gesunden Gewebes, eine höhere Dosis im Zielvolumen zu erreichen. Die Langzeitfolgen dieser intensitäts-modulierten Radiotherapie sind jedoch noch nicht bekannt (14).

Da TGF- β eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese radiogener Lungenschäden spielt, wird nach neuen Therapiestrategien auf molekularer Ebene gesucht. Vielversprechend erscheinen Ansätze auf dem Gebiete der Wachstumsfaktoren und Zytokine oder des Renin-Angiotensin-Systems. Bei Patienten mit hohen TGF- β 1-Spiegeln während der Strahlentherapie kam es vermehrt zu pulmonalen Schäden (4, 5, 6, 94). Auch im Mausmodell konnte eine erhöhte

Radiosensitivität bei TGF- β 1-Überexpression festgestellt werden (95). Allerdings scheiterten bislang die Versuche, anhand des TGF- β 1-Spiegels im Blut, Patienten mit erhöhtem Risiko zur Fibroseentwicklung herauszufinden (40, 41, 70, 7). Für die Zukunft scheint die Modifikation von Zytokinen oder die Applikation passender Antikörper erfolgsversprechend zu sein, um radiogenen Lungenschäden vorbeugen zu können (70).

6. Literatur

1. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* **2002**, 4, pp599-604
2. Aggarwal B, Pocsik E. Cytokines: from clone to clinic. *Arch Biochem Biophys* **1992**, 292, pp335-359
3. Anscher MS, Kong FM, Marks LB, Bentel GC, Jirtle RL. Changes in plasma transforming growth factor beta during radiotherapy and the risk of symptomatic radiation-induced fibrosis. *Int J Radiat Oncol Bio Phys* **1997**, 37, pp253-258
4. Anscher MS, Murase T, Prescott DM, Marks LB, Reisenbichler H, Bentel GC, Spencer D, Sherouse G, Jirtle RL. Changes in plasma TGF- β 1 levels during pulmonary radiotherapy as a predictor of the risk of developing radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1994**, 30, pp671-676
5. Anscher MS, Peters WP, Reisenbichler H, Petros WP, Jirtle RL. Transforming growth factor as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *N England J Med* **1993**, 328, pp1592-1598
6. Anscher MS, Crocker IR, Jirtle RL. Transforming growth factor β 1 expression in irradiated liver. *Radiation Research* **1990**, 122, pp77-85
7. Anscher MS, Marks TD, Shafman TD et al. Using plasma transforming growth factor beta-1 during radiotherapy to select patients for dose escalation. *J Clin Oncol* **2001**, 19, pp 3758-3765
8. Barcellos-Hoff MH. How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues. *Radiation Research* **1998**, 150, pp109-120
9. Bayreuther K, Francz PI, Rodemann HP. Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation. *Ontogenez* **1995**, 26(1), pp27-37
10. Benyana B, Campana F, Perderau B et al. Effects of dismutase topical treatment on human skin radiofibrosis: A pathological study. *Breast* **1996**, 5, pp75-81
11. Bonniaud Ph, Margetts PJ, Kolb M, Haberberger T, Kelly M, Robertson J, Gauldie J. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am J Respr Crit Care Med* **2003**, 168, pp770-778
12. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Kelly MM, Haberberger T, Gauldie J. Transient transgene expression of CTGF in the lung induces moderate and reversible fibrosis. *Eur Respr J* **2002**, 20 (suppl 38), 378S

13. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor-beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* **1994**, 10, pp1286-1292
14. Boyer AL, Butler EB, DiPetrillo TA et al. Intensity-modulated radiotherapy: current status and issues of interest. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2001**,51, pp880-914
15. Burger A, Loffler H, Bamberg M, Rodemann HP. Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int J Radiat Biol* **1998** Apr, 73(4), pp401-408
16. Chen Y, Williams I, Ding et al. Radiation pneumonitis and early circulatory cytokine markers. *Semin Radiat Oncol* **2002**, 12 suppl 1, pp26-33
17. Chon Bh, Loeffler JS. The effect of non-malignant systemic disease on tolerance to radiation therapy. *Oncologist* **2002**, 7, pp136-143
18. Coker RK, Laurent GJ, Jeffery PK, du Bois RM, Black CM, McAnulty RJ. Localisation of transforming growth factor β 1 and β 2 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax* **2001**, 56, pp549-556
19. Cook DN, Brass DM, Schwartz DA. A Matrix for new ideas in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2002**, 27, pp122-124
20. Crystal RG, Bittermann PB, Mossmann β , Schwarz MI, Sheppard D, Almasly L, Chapman HA, Friedman SL, King TE Jr, Leinwand LA et al. Future research directions in idiopathic pulmonary fibrosis: summary of a National Heart, Lung and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**, 166, pp236-246
21. Datta P, Moulder B, Fish. TGF- β 1 production in radiation nephropathy: Role of angiotensin II. *Int J Radiat Biol* **1999**, 75, pp473-479
22. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependant kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proceedings of the Nat. Acad. of Science USA* **1995**, 92, pp5545-5549
23. Dalanian S, Baillet F, Huart, J et al. Successful treatment of radiation- induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: Clinical trial. *Radiother Oncol* **1994**, 32, pp12-20
24. Dent P, Yacoub A, Contessa et al. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signalling pathways. *Radiat Research* **2003**, 159, pp283-300
25. Epperly MW, Travis EL, Sikora C, Greenberger JS. Manganese (correction of Magnesium) superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposome pulmonary radioprotective gene therapy: modulation of irradiation-induced mRNA for IL-1, TNF α and TGF β correlates with delay of organizing alveolitis/fibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant* **1999**, 5, pp204-214

26. Epperly MW, Gretton JA, DeFilippi SJ et al. Modulation of radiation-induced cytokine elevation associated with esophagitis and esophageal stricture by manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome (SOD-PL) gene therapy. *Radiat Research* **2001**, 155, pp2-14
27. Epperly MW, Sikora CA, DeFilippi SJ, Gretton JE, Bar-Sagi D, Archer H, Carlos T, Guo H, Greenberger JS. Pulmonary irradiation-induced expression of VCAM-I and ICAM- I is decreased by manganese superoxide dismutase-plasmide/liposome (MnSOD-PL) gene therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* **2002**, 8, pp175-187
28. Finkelstein JN, Johnston CJ, BaggsR, Rubin P. Early alterations in extracellular matrix and TGF- β 1 gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1994**, 28, pp621-631
29. Ford EC, Mageras GS, Yorke E et al. Evaluation of respiratory movement during gated radiotherapy using film and electronic portal imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2002**, 52, pp522-531
30. Fournier C, Scholz M, Weyrather WK, Rodemann HP, Kraft G. Changes of fibrosis-related parameters after high- and low-LET irradiation of fibroblasts. *Int J Radiat Biol* **2001**, 77(6), pp713-722
31. Fu XL, Huang G, Bentel et al. Predicting the risk of symptomatic radiation-induced lung injury using both the physical and biologic parameters V(30) and transforming growth factor beta. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2001**, 50, pp899-908
32. Gauldie J, Kolb M, Sime P. A new direction in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir Res* **2002**, 3(1), 1
33. Gauldie J, Jordana M, Cox G. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Thorax* **1993**, 48, pp931-935
34. Gauldie J, Sime PJ, Xing B, Marr B, Tremblay GM. Transforming growth factor-beta gene transfer induces myofibroblast presence and pulmonary fibrosis. *Curr Top Pathol* **1999**, 93, pp35-45
35. Greenberger JS, Sikora CA, DeFilippi SJ, Gretton JE, Epperly MW. Bone marrow stromal cell involvement in irradiation pulmonary fibrosis. *Exp Hematol* **2001**, 29 (suppl 1): 86
36. Gurujeyalakshmi G, Hollinger M, Giri S. Regulation of transforming growth factor β mRNA expression by taurine and niacin in the bleomycin hamster model of lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1998**, 18, pp334-342
37. Hakenjos L, Bamberg M, Rodemann HP. TGF- β 1 α 1-mediated alterations of rat lung fibroblasts differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. *Int J Radiat Biol* **2000** Apr, 76(4), pp503-509

38. Hallahan DE, Geng L, Shyr Y. Effects of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) null mutation on radiation-induced pulmonary fibrosis and respiratory insufficiency in mice. *J Nat Cancer Inst* **2002**, 94, pp733-741
39. Haston CK, Zhou X, Gumbiner-Russo et al. Universal and radiation-specific loci influence murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res* **2002**, 62, pp33782-3788
40. Herskind C, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M, Bamberg M, Rodemann HP. Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* **1998** Jun, 47(3), pp263-269
41. Herskind C, Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M, Bamberg M, Rodemann HP. Fibroblast differentiation in subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Acta Oncol* **2000**, 39(3), pp383-388
42. Herskind C, Rodemann HP. Spontaneous and radiation-induced differentiation of fibroblasts. *Experimental Gerontology*, **2000** Sep, 35(6-7), pp747-755
43. Herskind C, Bamberg M, Rodemann HP. The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy. *Strahlenther Onkol* **1998** Nov, 174(3), 12-15
44. Hill RP, Rodemann HP, Hendry JH, Roberts SA, Anscher MS. Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2001** Feb, 49(2), pp353-365
45. Hong JH, Jung SM, Tsao TC, Wu CJ, Lee CY, Chen FH, Hsu CH, McBride WH, Chiang. Bronchoalveolar lavage and interstitial cells have different roles in radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Biol* **2003**, 79, pp159-167
46. Hopewell JW, Trott KR. Volume effects in radiobiology as applied to radiotherapy. *Radiother Oncol* **2000**, 56, pp283-288
47. Iyer S, Gurujeyalakshmi G, Giri S. Effects of pirfenidone on transforming growth factor β gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of fibrosis. *J Pharmacol Exper Ther* **1999**, 291, pp367-373
48. Johnston CJ, Piedboeuf B, Rubin P, et al. Early and persistent alterations in the expression of interleukin 1 α , interleukin 1 β and tumor necrosis factor α mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation. *Radiat Res* **1996**, 145, pp762-767
49. Johnston CJ, Williams JP, Elder A, Hernady E, Finkelstein JN. Inflammatory cell recruitment following thoracic irradiation. *Exp Lung Res* **2004**, 30 (5), pp369-382

50. Johnston JP, Williams P, Okunieff P, Finkelstein JN. Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine receptor families. *Radiat Research* **2002**, 157, pp256-265
51. Kelly M, Kolb M, Bonniaud P, Gauldie J. Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis. *Curr Pharm Des* **2003**, 9, pp39-49
52. Kolb M, Willner J, Koeberlein E, Hoffmann U, Kirschner J, Flentje M, Schmidt M. Autokrine Aktivierung von Fibroblasten nach Bestrahlung. *Pneumologie* **1999**, 53, pp1-6
53. Kolb M, Bonniaud P, Galt T, Sime PJ, Kelly MM, Margetts PJ, Gauldie J. Differences in the fibrogenic response after transfer of active TGF- β 1 gene to lungs of a “fibrosis-prone” and a “resistant” mouse strain. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2002**, 27, pp141-150
54. Kolb M, Schmidt M. The role of cytokines and growth factors in fibroproliferative lung disease. *Pneumologie* **2003**, 57, pp91-97
55. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J. Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **2001**, 107, pp1529-1536
56. Kolb M, Margetts PJ, Galt T, Sime PJ, Xing Z, Schmidt M, Gauldie J. Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**, 163, pp770-777
57. Krüse JJ, Bart CI, Visser A, Wondergem J. Changes in transforming growth factor- β , procollagen types 1 and 2 mRNA in the rat heart after irradiation. *Int J Radiat Biol* **1999**, 75, pp1429-1436.
58. Lara PC, Russell NS, Smolders IJH, Bartelink H, Begg AC, Coco-Martin JM. Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: Relationship with cell survival and collagen production. *Int J Radiat Biol* **1996**, 70(6), pp683-692
59. Lasky JA, Brody AR. Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect* **2000**, 108, pp751-762
60. Lefaix JL, Delanian S, Leplat JJ et al. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using Cu/Zn-SOD and Mn-SOD: An experimental study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1996**, 35, pp305-312
61. Leitlein J, Aulwurm S, Waltereit R, Naumann Und, Wagenknecht B, Garten W, Weller M, Platten M. Processing of immunosuppressive pro-TGF- β 1, 2 by human glioblastoma cells involves cytoplasmic and secreted furin-like proteases. *Journal of Immunology* **2001**, 166, pp7238-7243

62. Martin M, Lefaix JL, Delanian S. TGF- β 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2000**, 47(2), pp277-290
63. Martin M, Lefaix JL, Pinton PH, Crechet F, Daburon F. Temporal modulation of TGF- β 1 and β -actin gene expression in pig skin and muscular fibrosis after ionizing radiation. *Radiat Research* **1993**, 134, pp 63-70
64. McBride WH, Vegesna V. The role of T-cells in radiation pneumonitis after bone marrow transplantation. *Int J Radiat Biol* **2000**, 76, pp517-521
65. McDonald S, Rubin P, Phillips TL. Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints and potential scoring systems. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1995**, 31, pp1187-1203
66. Molls M, van Beuningen D. Radiation injury of the lung: experimental studies, observations after radiotherapy and total body irradiation prior to bone marrow transplantation. In Scherer E, Streffer C, Trott KR. *Radiopathology organs and tissues*. Berlin Springer-Verlag **1991**, pp369-404
67. Molteni A, Moulder JE, Cohen et al. Control of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II type 1 receptor blocker. *Int J Radiat Biol* **2000**, 76, pp523-532
68. Molteni A, Moulder JE, Cohen EP, Fish BL, Taylor JM, Veno PA, Wolfe LF, Wards WF. Prevention of radiation-induced nephropathy and fibrosis in a model of bone marrow transplant by angiotensin II receptor blocker. *Exp Biol Med* **2001**, 226 (11), pp1016-1023
69. Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* **2000**, 71, pp276-292
70. Movsas B, Raffin TA, Epstein AH. Pulmonary radiation injury. *Chest* **1997**, 111, pp 1061-1076
71. Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Ritkin JS. Latent transforming growth factor- β : structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* **1997**, 51, pp1376-1382
72. Murata T, Akagi K, Uda M. Cell kinetic changes in cultured tumor cells after treatment with radiation and chemotherapy. *Int J Oncol* **1998**, 12(1), pp171-174
73. Namba H, Hara T, Tukazaki T, Migata K, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S, Yamashita S. Radiation-induced G1 arrest is selectively mediated by the p53-WAF1/CIP1 pathway in human thyroid cells. *Cancer Research* **1995**, 55, pp2075-2080

74. Ohneseit PA, Wildemann A, Herskind C, Bamberg M, Rodemann HP. Differential response of tumor cells and normal fibroblasts to fractionated combined treatment with topotecan and ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* **2002**, 78(2), pp125-132
75. Pelton RW, Moses HL. The beta-type transforming growth factor. *Am Rev Respir Dis* **1990**, 142, pp31-35
76. Piguet PF. Cytokines involved in pulmonary fibrosis. *Int Rev Exp Pathol* **1993**, 34, pp173-181
77. Richter KK, Langberg CW, Sung CC, et al. Association of TGF- β 1 immunoreactivity with specific histopathologic lesions in subacute and chronic experimental radiation enteropathy. *Radiat Oncol* **1996**, 39, pp243-251
78. Ritzenthaler JD, Goldstein RH, Fine A. Regulation of the alpha 1 collagen promoter via a transforming growth factor-beta activation element. *J Biol Chem* **1993**, 268, pp13625-13631
79. Rodemann HP, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* **1995**, 35, pp83-90
80. Rodemann HP. Differential degradation of intercellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C-induced postmitotic differentiation states in vitro. *Differentiation* **1989**, 42, pp37-43
81. Rodemann HP, Binder A, Bamberg M. Radiation-induced fibrosis: experimental studies. *Medical Radiology*. Eds.: Sauer K, Dunst J. Springer-Verlag HD, Berlin, New York **1994**
82. Rodemann HP, Peterson HP, Schwenke K, von Wangenheim KH. Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scanning Microsc* **1991**, 5(4), pp1135-1143
83. Rodemann HP, Binder A, Burger A, et al. The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Int* **1996**, 49, pp32-36
84. Rube CE, Uthe D, Schmid KW, Richter KD, Wessel J, Schuck A, Willich N, Rube C. Dose-dependent induction of transforming growth factor β in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2000**, 47, n0.4, pp1033-1042
85. Rube CE, Wilfert F, Uthe D, Schmid KW, Knoop R, Willich N, Schuck A, Rube C. Modulation of radiation-induced tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) expression in the lung tissue by pentoxifylline. *Radiother Oncol* **2002**, 64, pp177-187

86. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN.
A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1995**, 33, pp99-109
87. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypothesis about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* **2001**, 134, pp136-151
88. Sheppard D. Pulmonary fibrosis : a cellular overreaction or a failure of communication ?
J Clin Invest **2001**, 107, pp1501-1502
89. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of active transforming growth factor- β induces prolonged severe fibrosis in rat lungs. *J Clin Invest* **1997**, 100, pp768-776
90. Skwarchuk MW, Travis EL. Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1998**, 42, pp169-178
91. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *The Lancet Oncol* **2003** Sep, 4(9), pp529-536
92. Tokunaga A, Onda M, Fujita I, Okuda T, Mizutani T, Kiyama T, Matsukura N, Hunt T. Sequential changes in the cell mediators of peritoneal and wound fluids after surgery. *Jap J Surg* **1993**, 23, pp.841-844
93. v. Pfeil A, Hakenjos L, Herskind C, Dittmann K, Weller M, Rodemann HP. Irradiated homozygous TGF- β 1 knockout fibroblasts show enhanced clonogenic survival as compared with TGF β 1 wild-type fibroblasts. *Int J Radiat Biol* **2002**, 78, 5, pp331-339
94. Vujaskovic Z, Groen HJ. TGF- β , radiation-induced pulmonary injury and lung cancer. *Int J Radiat Biol* **2000**, 76, pp511-516
95. Vodovotz Y, Lucia MS, Delucca AM, Mitchell JB, Kopp JB. Reduced hematopoietic function and enhanced radiosensitivity of transforming growth factor β 1 transgenic mice. *Int J of Cancer*, **2000**, 90, pp13-21
96. Wang X, Fu R, Clough et al. Can angiotensin converting enzyme inhibitors protect against symptomatic radiation pneumonitis? *Radiat Research* **2000**, 153, pp405-410
97. Williams JP, Hernady E, Johnston CJ, Reed CM, Fenton B, Okunieff P, Finkelstein JN.
Effect of administration of Lovastatin on the development of late pulmonary affects after whole-lung irradiation in a murine model. *Radiat Research* **2004**, 161 (5), pp560-567
98. Willner J, Vordermark D, Schmidt M, Gassel A, Flentje M, Wirtz H. Secretory activity and cell cycle alteration of alveolar type II cells in the early and late phase after irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2003**, 55 (3), pp617-625

99. Xing Z, Jordana M, Gauldie J, Wang J. Cytokines and pulmonary inflammatory and immune diseases. *Histol Histopathol* **1999** Jan, 14(1), pp185-201
101. Begg et al., *Radiotherapy and Oncology*, **1988**; 11: 337-347
102. Overton PD, Cell cycle analysis using Propidium Iodide & Bromodeoxyuridine, *Cytometry* 9, **1988**, 627-630
103. Wilson GD, analysis of DNA-measurement of cell kinetics by the bromodeoxyuridine/anti-bromodeoxyuridine method
- 104: Dietz, N.: Dissertation über die Zellproliferation bestrahlter Lungenfibroblasten, **2004**

7. Abkürzungen

ACE	angiotensin converting enzyme
AT	angiotensin
BSA	bovine serum albumine
BrdU	bromodeoxyuridine
CTGF	connective tissue growth factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetracetic acid
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FBS	fetales bovines Serum
FGF	fibroblast growth factor
FITC	fluoroscein isothiocynate
ICAM	intracellular adhesion molecule
IL	Interleukin
IMRT	intensity-modulated radiotherapy
LAP	latency associated peptide
LTBP	TGF- β -binding protein
MEM	Minimum Essential Medium
MF	mitotically active progenitor fibroblasts
MMP	matrix metalloproteinases
MTP	Mikrotiterplatte
PBS	phosphate buffered saline
PI	Propidiumjodid
PMF	post-mitotic fibrocytes
PDGF	platelet derived growth factor
PTX	Pentoxifylline
RT	Raumtemperatur
SOD	liposomal Cu/Zn superoxide dismutase
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. G. Ertl, Direktor der Medizinischen Klinik, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. med. M. Schmidt, Leiter der Abteilung für Pneumologie, danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas zur Ausarbeitung im pneumologischen Labor.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Kolb, jetzt Assistant Professor der McMaster University Hamilton, danke ich für die Betreuung der Arbeit, für die stets große Hilfsbereitschaft bei allen inhaltlichen und formalen Fragen und für die freundliche Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. med. M. Flentje, Direktor der Klinik für Strahlentherapie, danke ich für die Möglichkeit an seiner Klinik arbeiten zu dürfen und für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Willner, jetzt Leitender Arzt der Strahlentherapie in Bayreuth, danke ich für die Betreuung und für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ein großer Dank gebührt auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des pneumologischen Labors, besonders der Leiterin Frau M. Wechner, die mit langjähriger Erfahrung immer hilfsbereit zur Seite stand.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Antje Möller
Adresse	Ernst-Reuter-Str.17 97080 Würzburg
Geburtsdatum	31.03.1977
Geburtsort	Ludwigsburg
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1983 – 06/1987	Grundschule Marbach
08/1987 – 06/1996	Friedrich-Schiller-Gymnasium Marbach
25.06.1996	Abitur

Sozialer Dienst

08/1996 – 04/1997	Freiwilliges Soziales Jahr im Pflegeheim Marbach
-------------------	--

Hochschulausbildung

05/1997 – 03/1999	Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
06.04.1999	Physikum
04/1999 – 09/2002	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
13.04.2000	1.Staatsexamen
19.09.2002	2.Staatsexamen
10/2002 – 09/2003	Praktisches Jahr
20.11.2003	3.Staatsexamen
01.10.2004	Approbation

Arbeitsstellen

10/2002 – 02/2003	PJ, Strahlentherapie, JMU Würzburg
02/2003 – 05/2003	PJ, Innere Medizin, Vevey, Französische Schweiz
06/2003 – 09/2003	PJ, Chirurgie, Ipswich Hospital, England
01.01.04 - 18.04.04	ÄiP, Abteilung für Pneumologie, JMU Würzburg
19.04.04 – 13.02.05	ÄiP / Assistenzärztin, Strahlentherapie, JMU Würzburg
seit 14.02.05	Assistenzärztin, Abteilung für Pneumologie, JMU Würzburg

Würzburg, im März 2005

Antje Möller

