

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor Professor Dr. med. G. Ertl**

**Wachstums- und Sekretionsverhalten humaner fetaler  
Lungenfibroblasten  
nach Applikation von Gamma-Strahlung in vitro.**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der Julius- Maximilians - Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Robert Wruck  
aus  
Baden -Baden**

**Würzburg, Januar 2011**

Referent: Prof. Dr. med. Michael Schmidt

Korreferent: Prof. Dr. med. Michael Flentje

Dekan : Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.7.2011

Der Promovend ist Arzt.

**Meinen Eltern und Geschwistern gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition und klinische Bedeutung der radiogenen Fibrose	1
1.1.2	Histopathologische Veränderungen des Lungengewebes nach Bestrahlung	1
1.1.3	Klinische und radiologische Befunde nach Anwendung ionisierender Strahlen	2
1.1.4	Postulat einer chronischen Inflammation als pathogenetisches Erklärungsmodell der Fibrogenese	3
1.1.5	Bedeutung der Cytokine im Rahmen der Fibrogenese	4
1.1.6	Das Cytokin TGF- $\beta$	4
1.1.7	Rolle der Fibroblasten und Extrazellulärmatrixproteine	6
1.2	Fragestellungen	7
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1	Material	8
2.2	Anlage der Zellkultur, Bestrahlung der Zellen und weiterer Versuchsablauf	9
2.3	Zellzählung	10
2.4	Sandwich-ELISA	12
2.4.1	Testprinzip	12
2.4.2	Procollagen-I-Peptid-Assay	13

2.4.2.1	Reagenzien	13
2.4.2.2	Versuchsdurchführung	13
2.4.2.3	Auswertung der Messergebnisse	14
2.4.3	TGF- $\beta$ 1-Assay	14
2.4.3.1	Reagenzien	14
2.4.3.2	Versuchsdurchführung	14
2.4.3.3	Auswertung der Messergebnisse	15
2.4.4	Fibronectin - Assay	15
2.4.4.1	Reagenzien	15
2.4.4.2	Versuchsdurchführung	15
2.4.4.3	Auswertung der Messergebnisse	16
2.5	LDH-Messung der Proben	16
2.5.1	Messprinzip	16
2.5.2	Reagenzien	16
2.5.3	Versuchsdurchführung	17
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Statistik</b>	<b>18</b>
3.1	Statistische Analyse	18
3.2	Messwerttabellen/ -grafiken	18
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	23
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>25</b>

4.1	Einleitung	25
4.2	Proliferationsverhalten fetaler Fibroblasten in Zellkultur nach Anwendung ionisierender Strahlung	26
4.2.1	Subpopulationen pulmonaler Fibroblasten	27
4.2.2	Terminale Differenzierung von Fibroblasten nach Applikation ionisierender Strahlung	29
4.3	Sekretion von TGF- $\beta$ pulmonaler fetaler Lungenfibroblasten nach Anwendung ionisierender Strahlung	31
4.4	Fibronectin und Prokollagen-Sekretion fetaler humaner Lungenfibroblasten nach Anwendung ionisierender Strahlung	34
4.4.1	Signalkaskaden unterhalb der membranständigen TGF- $\beta$ Rezeptoren	38
4.5	Aussichten zukünftiger Prävention und Therapie	41
5.	Zusammenfassung	42
6 .	Literaturverzeichnis	44
7.	Abbildungverzeichnis	51
8.	Tabellenverzeichnis	52
9.	Abkürzungsverzeichnis	52
10.	Danksagung	
11.	Curriculum vitae	

## **1. Einleitung und Fragestellung**

### **1.1 Einleitung**

#### **1.1.1 Definition und klinische Bedeutung der radiogenen Fibrose**

Der fibrotische Gewebsumbau nach Anwendung ionisierender Strahlen wurde für verschiedene Gewebe einschließlich der Haut, der Leber, des Herzens, der Niere und insbesondere der Lunge beschrieben (Rodemann et al., 1995, Lorenz et al., 1999, Shepard et al., 2001, Sime et al., 2001, Selman et al., 2001, Gauldie et al., 2002). Ein im klinischen Alltag im Bereich der Onkologie etabliertes Therapie-Prinzip ist die strahlentherapeutische Behandlung thorakaler Malignome. Beispiele hierfür sind die Therapie von Mamma-Karzinomen, Bronchialkarzinomen, oder malignen Lymphomen (Pickrell et al., 1995, Vujaskovic et al., 2000). Dabei werden ionisierende Strahlen, meist in Kombination mit operativen Verfahren oder einer Chemotherapie unter kurativer, adjuvanter oder palliativer Zielsetzung angewandt. Der wichtigste dieser Behandlungsform limitierende Faktor stellt dabei die Strahlensensibilität des Lungengewebes dar (Burger et al., 1998, Kolb et al., 1999).

#### **1.1.2 Histopathologische Veränderungen des Lungengewebes nach Bestrahlung**

Zu den frühen strahleninduzierten histopathologischen Veränderungen gehört die Alteration der Gefäße. Durch den direkt strahlenbedingten Endothelschaden und die hieraus resultierende Endothelnekrose wird eine gesteigerte Kapillarpermeabilität bedingt. Dies führt zu Exsudation nicht nur von Blutplasma sondern auch von zellulären Bestandteilen in den interstitiellen Raum und zum Einstrom eines entzündlichen Exsudates, bestehend aus Alveolarmakrophagen, Mastzellen, Granulozyten, Lymphozyten in den Alveolarraum. Das entstandene alveoläre wie interstitielle Ödem wird als fluide Phase einer akuten Entzündung aufgefasst. Durch diese Prozesse wird eine Exfoliation von Alveolarepithelzellen befördert und eine Proliferation von Pneumozyten Typ II generiert. Die dabei erforderlichen vielfältigen Zellinteraktionen werden über den Einfluß eines komplexen Netzwerkes verschiedener Cytokine bewirkt. Unter diesen Einflüssen werden von den ortständigen

Bindegewebszellen vermehrt Extrazellulärmatrixproteine (EZM-Proteine) produziert (Pickrell et al., 1995, Movsas et al., 1997, Burger et al., 1998, Knittel et al., 1998, Bentzen et al., 2000, Martin et al., 2000, Gaudie et al., 2002). In der Endstrecke kommt es zu einer massiven Deposition von Extrazellulärmatrix-Proteinen im Lungeninterstitium, dem kennzeichnenden Merkmal des fibrotischen Gewebsumbaues. Es resultiert eine deutliche Einschränkung der Lungenfunktion, im Wesentlichen bedingt durch die herabgesetzte O<sub>2</sub>-Diffusionskapazität. Letztendlich resultiert ein irreversibler Verlust funktionellen Gewebes.

### **1.1.3 Klinische und radiologische Befunde nach Anwendung ionisierender Strahlen**

Den histopathologischen Befunden nach Einwirkung ionisierender Strahlen auf das Lungengewebe lassen sich nach (Roswit et al., 1977) drei klinische Verlaufsstadien gegenüberstellen. Zu Beginn entwickelt sich die sogenannte pneumonitische Phase im Mittel 48h bis ca. 1 Woche nach Bestrahlung auftretend, dem histopathologischen Befund einer Alveolitis entsprechend. Der Patient kann entweder klinisch asymptomatisch erscheinen oder Befunde, die einer atypischen Pneumonie gleichkommen, bieten. Häufige Symptome sind produktiver Husten, Dyspnoe und häufig die Ausbildung subfebriler Temperaturen. Im thorakalen Röntgenbild kann sich diese als retikuläre Zeichnungsvermehrung darstellen. Untersuchungen von Patientinnen, die an Brustkrebs erkrankt waren und nachfolgend einer thorakalen kumulierten Strahlendosis von 40-65 Gy ausgesetzt waren zeigten, daß in 76 % der Fälle röntgenologisch eine Pneumonitis diagnostiziert worden war (Jordana et al., 1988). Nachfolgend kann sich ein zeitlich variabler Abschnitt im Mittel zwischen 2 bis 16 Wochen angeben, die sogenannte Latenzphase anschliessen (Roswit et al., 1977). Diese ist durch eine, klinisch meist blande Symptomatik gekennzeichnet, in der die interstitielle Pneumopathie voranschreiten kann. In 5-15(-39)% der Fälle kam es zur Entwicklung einer chronischen Pneumonitis oder Fibrose, die meist etwa 2-6(-24) Monate nach Beendigung der Bestrahlung auftraten (Jordana et al., 1988, Pickrell et al., 1995, Movsas et al., 1997, Rube et al., 2000, F.van Buuren et al., 2001).



#### **1.1.4 Postulat einer chronischen Inflammation als pathogenetisches Erklärungsmodell der Fibrogenese**

Die aus den histopathologischen Befunden abgeleitete pathogenetische Vorstellung einer etwaig überschießenden akuten Entzündung, die in einen chronischen inflammatorischen Prozess übergeht, kann viele klinische Phänome nicht zwanglos erklären. Beispielsweise zeigt sich in einigen Fällen eine progrediente Lungenfibrose nach Anwendung ionisierender Strahlung ohne klinische oder radiologische Hinweise auf eine vorangegangene akute Pneumonitis (Pickrell et al., 1995, Movsas et al., 1997, Gauldie et al., 2002). Ähnliche Beobachtungen finden sich im Rahmen histologischer Untersuchungen von Patienten, die an einer idiopathischen Lungenfibrose (IPF) erkrankt waren. Demnach waren entzündliche Infiltrationen keine prominenten Stigmata des IPF-typischen histopathologischen Befundes. Darüberhinausgehend war die Messung der Entzündungsparameter kein prädiktiver Parameter hinsichtlich der Einschätzung des Fibrosegrades (Selman et al., 2001). Zudem zeigte sich, daß durch den Einsatz von Immunsuppressiva, die vor allem auf die Eindämmung einer akuten Entzündungsreaktion zielen, das Fortschreiten des Fibroseprozesses oftmals nicht verhindert werden konnte (Franklin et al., 1994).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß eine strahleninduzierte akute Entzündungsreaktion und deren vermuteter Übergang in einen chronisch entzündlichen Prozess die Entstehung einer Fibrose nicht vollständig erklären kann. Um ein besseres Verständnis der, der Fibropathogenese zu Grunde liegenden Prozesse zu erreichen, ist eine Betrachtung auf Ebene der Zellen und des Zusammenwirkens beteiligter Cytokine essentiell.

### **1.1.5 Bedeutung der Cytokine im Rahmen der Fibrogenese**

Die inter- und intrazelluläre Kommunikation beruht auf einem vielfältigen Zusammenspiel verschiedenster Botenstoffe. Zu ihnen gehören u.a. die Cytokine. Komplexe Abläufe wie beispielsweise das Individualwachstum, die Wundheilung, der Ablauf von Entzündungsprozessen oder, im negativen Sinne, das Wachstum von Tumoren, vollzieht sich unter Ablauf hochkomplexer Cytokinkaskaden und ermöglicht die erforderlichen tiefgreifenden Strukturveränderungen der beteiligten Gewebe. Auf vielfältigen Wegen sind fördernde und hemmende Einflüsse je nach Situation und Erfordernis miteinander verwoben. Neben parakrinen spielen auch autokrine „Feedback“-Schleifen in der „Dosierung“ der erzielten Effekte eine wichtige Rolle (Kolb et al., 1998-99). Je nach vorrangiger Beteiligung bestimmter Cytokine erfolgt eine formale Gruppenzuordnung, wobei die Grenzen zwischen ihnen fließend sind.

Als wichtige Gruppen werden sogenannte proinflammatorische Cytokine (u.a. die Interleukine Il-1, Il-2, Il6, Il-8 und „Tumor – Necrosis -Factor alpha“ [TNF alpha] gelten als „klassische“ proinflammatorische Cytokine. Davon werden sogenannte profibrotische Cytokine, zu denen eine Reihe von Wachstumsfaktoren gehören, unterschieden. Wichtige Vertreter sind TGF- $\beta$ , „platelet derived growth factor“ [PDGF] und „fibroblast growth factors“ [FGF's] ( Kolb et al., 2003) . Während das Wirkspektrum der proinflammatorischen Cytokine Entzündungsprozesse in der Summe unterstützt, werden diese durch die Wirkung profibrotischer Cytokine begrenzt. Cytokine fasst man als Vermittler zwischen Immunantwort und Wundheilung auf. Nach neueren pathogenetischen Konzepten wird die Fibrogenese als „Dysbalance“ der Aktivitäten profibrotischer und proinflammatorischer Cytokine im Sinne einer gestörten Wundheilung interpretiert ( Kolb et al., 2003).

### **1.1.6 Das Cytokin TGF- $\beta$**

Transforming growth factor-  $\beta$  gehört zu einer Gruppe von Cytokinen deren Bezeichnung sich von deren Fähigkeit ableitet, das Proliferationsverhalten von Zellen so zu transformieren, daß sie anheftungsfrei wachsen. 5 Subtypen sind bekannt, wobei

nur 3 in den Geweben von Säugern existieren. Unter diesen ist TGF- $\beta$ 1 der prädominante Subtyp ( Gauldie et al., 1993). Strukturelle Analysen beschreiben aktiven humanen Transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF $\beta$  1) als ein 25 kDa schweres, über Disulfid-Brücken gebundenes, nicht glycolisiertes Homodimer (Gauldie et al., 1993, Lawrence et al., 1996, Alevizopoulos et al., 1997, Cox et al., 1997), mit im Vergleich zu anderen Cytokinen außergewöhnlich großer Funktionsvielfalt (Kelley et al., 1993, Border et al., 1994). Das weite Wirkspektrum kommt insbesondere im Rahmen von Prozessen zum Tragen, die mit einem erhöhten Gewebsumsatz verbunden sind. So werden die Embryonalentwicklung, das Individualwachstum oder die Tumorgenese, daneben der Ablauf von Entzündungsreaktionen maßgeblich durch TGF- $\beta$  beeinflusst (Kelley et al., 1993, Border et al., 1994, Finkelstein et al., 1994). Die differenzierten Wirkungen von TGF- $\beta$  werden dabei vom jeweilig vorherrschenden Milieu bestimmt (Finkelstein et al.,1994). Hinsichtlich der Fibrogenese könnten drei Funktionen des TGF- $\beta$  eine potentielle Bedeutung haben:

- 1.) TGF- $\beta$  beeinflusst direkt die Gen-Expression von EZM-Proteinen in Stromazellen, sodaß eine vermehrte Kollagen-Synthese einerseits und andererseits eine verringerte Kollagenase-Produktion resultiert; 2.) kann die Proliferation von Fibroblasten meist durch Induktion anderer Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF induziert werden ; 3.) TGF- $\beta$  kann einen latenten Status einer autokrinen Stimulation struktureller Zellen einschließlich der Fibroblasten bewirken. Hieraus resultiert eine chronische Aktivierung und möglicherweise zielgerichtete Differenzierung in Richtung eines "fibrösen Phänotypes" ( Gauldie et al., 1993). Aus diesen und weiteren Beobachtungen resultiert die Annahme einer Schlüsselrolle des Cytokines TGF- $\beta$  im Rahmen der Fibrogenese ( Anscher et al., 1994/97, Border et al., 1994, Finkelstein et al., 1994, Gauldie et al., 1993, Gressner et al., 1996, Herskind et al., 1998, Knittel et al., 1998, Rubin et al.,1992, Kolb et al., 1999, Gauldie et al., 2002 ). Hinsichtlich des eigenen Versuchsansatzes war es eine interessante Frage zu überprüfen, wann und in welcher Quantität bestrahlte Fibroblasten unter in vitro Bedingungen in Abwesenheit von Entzündungszellen TGF- $\beta$  freisetzen.

### **1.1.7 Rolle der Fibroblasten und Extrazellulärmatrixproteine**

Wie bereits oben angedeutet haben in neuerer Zeit verschiedene Beobachtungen dazu geführt, dem Fibroblasten gegenüber den Entzündungszellen einen größeren Stellenwert im Rahmen der Fibrogenese einzuräumen ( Bayreuther et al., 1988, Burger et al.,1998, Jordana et al.,1988 /94, Elias et al.,1992, Gaudie et al.,1992/2002, Kelley et al.,1995, Kolb et al.,1998, Tremblay et al.,1995, Rodemann et al.,1995/96, Rube et al.,2000). Zum einen scheinen Fibroblasten nicht nur als bloße Effektorzellen zu agieren, sondern über autokrine und parakrine Prozesse ihre Aktivität selbst zu beeinflussen (Kolb et al.,1998-99). Zum Anderen sind diese ortsständigen Bindegewebszellen Hauptproduzenten der Extrazellulärmatrix-Proteine [EZM-Proteine] (Akamine et al.,1992, Movsas et al.,1997, Jordana et al.,1994), zu deren Mehrsekretion sie im Verlauf der Fibrogenese in der Lage sind und hierdurch zu einer massiven Akkumulation von EZM-Proteinen im Lungeninterstitium hauptsächlich beitragen. Die Hauptstrukturkomponente der Extrazellulärmatrix bilden die Kollagene mit einem Anteil von ca. 60-65% der azellulären Masse (Jordana et al.,1988; Akamine et al., 1992).

Es existieren verschiedene Kollagensubtypen, die in den verschiedenen Bindegeweben in unterschiedlichen Anteilen vorliegen. Dabei konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, daß in fibrotisch transformierten Bindegeweben bestimmte Kollagensubtypen überwiegen. So war an Hand histologischer Untersuchungen fibrotisch transformierter Gewebe unterschiedlicher Organsysteme (z.B. der Leberzirrhose aus unterschiedlicher Genese, bestimmte zur Knochenmarksfibrose führende Grunderkrankungen) signifikant erhöhte P-I-P- [Prokollagen-I-Peptid] Spiegel nachzuweisen (Low et al.,1992). Hiermit übereinstimmend wurden analoge Beobachtungen bei Betrachtung fibrosierender Lungenerkrankungen gewonnen. So war der Anstieg der P-I-P/P-III-P-Ratio (klinische Untersuchungen von an Sarkoidose oder der idiopathischen Lungenfibrose erkrankten Patienten) mit einer vergleichsweise schlechteren Prognose verbunden (Low et al.,1992 ). Kollagen Typ I wird als „klassisches Fibroseprotein“ bezeichnet (Knittel et al.,1998).

Ein weiterer prominenter Vertreter der Extracellulärmatrixproteine ist das Fibronectin (FN). Bereits unter physiologischen Bedingungen sind Fibronectine im adulten Organismus hauptsächlich im interstitiellen Bindegewebe zu finden, assoziiert an Kollagenfasern sowie weiteren Interzellularproteinen (Limper et al., 1992, Roman 1997, Tremblay et al., 1995 ). Das aus zwei Polypeptidketten (a` 220 kDA) bestehende, über eine Disulfidbrücke in der Nähe des C-terminalen Endes verbundene, multimeres Glykoprotein trägt verschiedene Bindungsstellen u.a. für Zelloberflächenrezeptoren, Integrine, Matrixproteine z.B. Kollagen. Vielfältige Funktionen des Fibronectins werden über diese Bindungsstellen vermittelt (Tremblay et al., 1995). So wird beispielsweise durch Fibronectin die Adhäsion verschiedener Zellen aneinander und an umgebendes Gewebe unterstützt. Lösliches Fibronectin fördert neben anderen Entzündungs- und ortsständigen Zellen die Migration von Fibroblasten (Limper et al., 1992; Roman et al., 1997; Tremblay et al., 1995 ). Stellvertretend für das EZM-Sekretionsvermögen kultivierter bestrahlter Fibroblasten wurde in der vorliegenden Arbeit der Gehalt an P-I-P und FN in den täglich erneuerten Zellkulturüberständen bestimmt. Dabei war insbesondere von Interesse wie sich der zeitliche Verlauf in Bezug auf das TGF- $\beta$  -Sekretionsprofil gestaltete.

## **1.2 Fragestellung**

Um das eigenständige Verhalten von Fibroblasten nach Bestrahlung in Abwesenheit von Entzündungszellen zu überprüfen, untersuchten wir das Wachstums,- und Sekretionsverhalten dieser Zellen in Kultur nach Applikation ionisierender Strahlen (Gamma-Strahlen, Cobalt 60) verschiedener Dosisstufen.

Insbesondere wurde versucht auf folgende Fragen Antworten zu finden:

1. Wie wird das Zellwachstum durch die Applikation ionisierender Strahlung beeinflusst ?
2. Wie wird die Synthese von TGF- $\beta$  durch die Bestrahlung beeinflusst ?
3. Welche Auswirkungen ergeben sich hinsichtlich der Sekretion von EZM- Proteinen

( Procollagen-I-Peptid und Fibronectin Messungen )

4. Lassen sich Schlussfolgerungen hinsichtlich einer Früh-Diagnostik und einer möglichen Therapie einer strahleninduzierten Lungenfibrose ableiten ?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

Für die Durchführung der Experimente wurden folgende Materialien benötigt:

- Humane fetale Lungenfibroblasten (Zelllinie MRC-5, 18. Passage), ICN-BIOMEDICALS GmbH (Eschwege, Deutschland)
- 90 mm<sup>2</sup> Kulturflaschen, Nunc (Wiesbaden, Deutschland)
- 6-well-Kulturplatten, Beckton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
- DMEM (Dulbeccos modified eagle Medium), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Kulturmedium : zu 90 ml DME Medium wird hinzugegeben:
  - 10 ml FCS (Fetal calf serum, Fetales Kälberserum ), Serva (Heidelberg, Deutschland)
  - 1 ml L-Glutamin 200 mM,  
( obgleich im DMEM bereits enthalten, war die zusätzliche Gabe notwendig, da unter unten genannten Kulturbedingungen L- Glutamin schneller denaturiert wird als die übrigen Aminosäuren )
  - 1 ml Penicillin G 100 U/ml,
  - 1 ml Amphotericin B 250 µg/ml,
  - 1 ml Gentamycin 100mg/ml, sämtlich Life Technologies/Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- Trypsin versene EDTA 0,25 %, LifeTechnologies/Gibco (Eggenstein ,Deutschland)
- DNase Life Technologies/Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland)
- Fibronectin ELISA ( TAKARA, Japan über Boehringer Ingelheim )
- Prokollagen –I-Peptid ELISA ( TAKARA, Japan )
- TGF-β ELISA (DPC-Biermann, Deutschland)

- LDH Kinetischer Assay , Sigma (Deisenhofen , Deutschland)

Arbeitsschritte, die sterile Umgebungsbedingungen erforderten, um die Gefahr einer bakteriellen Kontamination möglichst gering zu halten, wurden unter Nutzung einer Laminar-Flow Sterilbank durchgeführt. Zusätzlich wurde das eingesetzte FCS vor Verwendung steril filtriert .

## **2.2 Anlage der Zellkultur, Bestrahlung der Zellen und weiterer Versuchsablauf**

Die Aufzucht der Zellen erfolgte in speziellen Zellkultur-Inkubatoren unter Einhaltung einer Temperatur von 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 %, sowie einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % zunächst in 90mm<sup>2</sup> Kulturflaschen bis zur Ausbildung einer geschlossenen einlagigen Zellschicht. Die Medienwechsel erfolgten zweimal in der Woche. Zwei Tage vor der geplanten Bestrahlung wurde der Zellüberstand je Kulturflasche verworfen und 1ml 0.25 % Trypsin EDTA aufgebracht und für ca. 1 Minute inkubiert, um den Zellrasen von der Unterlage zu lösen. Um die Fibroblasten zu vereinzeln wurde nachfolgend 4ml DNase haltiges DME -Medium hinzugegeben (5 mg DNase /100 ml) und die erhaltene Suspension mit Hilfe einer geeigneten Pipette homogenisiert. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit reinem DME Medium, um die Trypsin und DNase Restaktivitäten möglichst vollständig zu beseitigen. Nach erneutem Zentrifugieren, erfolgte die Resuspension in oben genannten Zellkulturmedium in der Art, daß eine Zellsuspension in einer Konzentration von 10<sup>4</sup>000 Zellen /ml vorlag. 2,5 ml dieser Fibroblastenzellsuspension wurden in die Vertiefungen von 6-well Kulturplatten eingebracht. Die Kulturplatten wurden im Brutschrank unter oben genannten Bedingungen bis zum Tag der Bestrahlung gelagert, um ein Anhaften der Zellen an die Unterlage zu ermöglichen. Am Tag 0 wurde das Kulturmedium unmittelbar vor Bestrahlung durch CO<sub>2</sub>-unabhängiges Medium (PBS-Puffer) ersetzt, um das pH- Milieu während des Transportes der Zellen, ausserhalb der 5%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre des Inkubators, möglichst stabil zu halten. Auf diesem Wege sollten nicht strahlenbedingte Zellschädigungen weitestgehend vermieden werden. Es wurden 4 Bestrahlungsdosen

eingesetzt (0,0 Gy, 4,5 Gy, 7,5 Gy, 10,5 Gy; ( Applikator: Cobalt 60 Kanone [Co 60], Gammatron Philips)). Für jede Versuchsbedingung wurde ein zweifacher Ansatz geführt. Nach Bestrahlung der Zellkulturen, wurde der verwandte PBS-Puffer ohne Zeitverzug gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht, wobei die Kulturplatten in einem Zwischenschritt zweimalig mit DME- Medium gewaschen wurden.

24 Stunden vor den Messzeitpunkten lagen die Medienwechsel. Somit beziehen sich die Messungen der Zellprodukte auf diesen Zeitraum. Da das im Nährmedium enthaltene FCS in wechselnder Zusammensetzung auch die von uns zu messenden Zellprodukte enthielt, wurde zum einen während des Versuchszeitraumes die selbe Charge benützt, zum zweiten, während der Medienwechsel, ein Probenröhrchen des frischen Mediums zur Leerwertbestimmung asserviert.

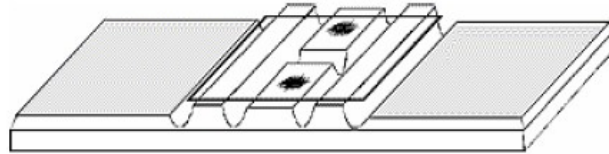
An den Tagen 3, 6, 9, 12 und 15 wurde für jede Bedingung zweifach (Probenreihen A und B) der gesamte Zellkulturüberstand aliquotiert und in geeigneten Probenröhrchen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert bis zum Zeitpunkt der ELISA-Messungen (nähere Beschreibung siehe nächster Abschnitt). In den Vertiefungen der Kulturplatten, den sogenannten Wells, verblieb somit die anhaftende Zellschicht. Diese wurde mit je 0,5 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lsg. für ca. eine Minute inkubiert. Nach Zugabe von 2,0 ml DNase haltigen Mediums (5 mg DNase /100 ml) wurde, unter zu Hilfenahme einer Pipette, eine nahezu vollständige Homogenisierung der Zellsuspension erreicht. Die verbliebene Trypsin- und DNase- Aktivitäten wurden anschließend unter Zugabe von 2ml DME-Nährmedium neutralisiert. Die vorliegende Zellsuspension wurde in eine Pipette aufgenommen und nach Befüllen eines eines entsprechenden Behältnisses anschließend zentrifugiert ( 1250 U/min, 6 min,  $27^{\circ}\text{C}$  ). Nach Abnahme des Überstandes wurde der verbleibende Zellkuchen in einer definierten Menge DME-Medium resuspendiert. Hiernach erfolgte die Ermittlung der Zellzahlen. Dieser Ablauf wurde für jede der Versuchsbedingungen, für jeweils beide Probenreihen wiederholt .

### **2.3 Zellzählung**

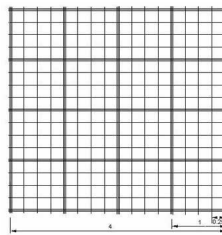
Für die Zellzählung wurde eine Fuchs-Rosenthal-Kammer verwandt. Ihre Form ist einem Objektträger nachempfunden. Auf Ihrem Boden sind zwei Zählgitter, bestehend



aus jeweils 16 Großquadraten, die sich wiederum in sechszehn kleinere Quadrate gliedern, eingeprägt.



**Abb.1** Fuchs-Rosenthal Zählkammer ( Quelle : URL: <http://www.marienfeldsuperior.com/2007/information-zaehlkammern.html> Stand 25.12.2009)



**Abb 2.** Vergrößerte Aufsicht auf ein Zählgitter einer Fuchs-Rosenthal- Zählkammer (Quelle :URL:<http://www.marienfeldsuperior.com/2007/informationzaehlkammern.html> Stand 25.12.2009)

Die Zählkammern konnten nach Auflegen eines Abdeckgläschens über eine Pipette beschickt werden, wobei ein vollständiges Befüllen notwendig war, um gültige Bestimmungen zu gewährleisten. Unter Verwendung eines Aufsicht-Mikroskopes (ca. 40 fache Vergrößerung) und eines von Hand zu bedienenden elektrischen Zählgerätes wurden je 4 Großquadrate einer Zählkammer mäanderförmig ausgezählt. Aus dem Zählwert wurde die Zellzahl pro ml Nährmedium nach folgender Formel berechnet

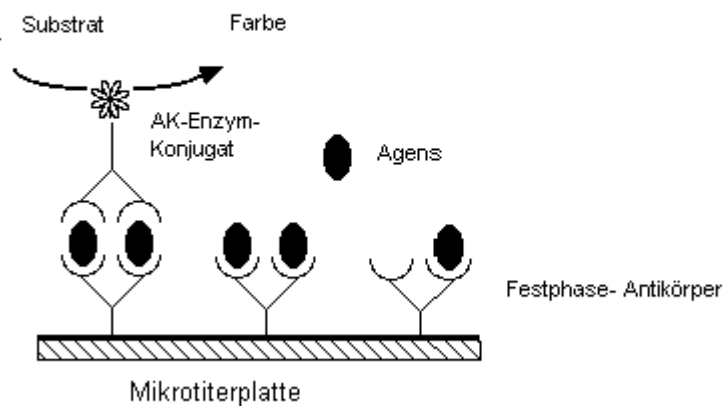
$$\frac{\text{Zellzahl} \times 4 \times 1000}{3,2 \mu\text{l}} = \text{Zellen/ml}$$

*Erklärung : Gesamtfläche einer Zählkammer beträgt 16mm<sup>2</sup>, Kammertiefe entspricht 0,2mm Rauminhalt ergibt sich aus der Berechnung 16 mm<sup>2</sup> x 0,2 mm = 3,2 µl . Umrechnungsfaktor 1000 : ( Umrechnung der ermittelten Zellzahl / µl in Zellzahl / ml ) Faktor 4 : Bezug auf die Gesamtheit aller Zählquadrate und somit der Gesamtfläche entsprechend.*

Um die Gesamt-Zellzahl zu erhalten, war jeweils die Bestimmung des zugehörigen definierten Suspensionsvolumens erforderlich (Mit diesem wurde die ermittelte Zellzahl/ml multipliziert). Nach jeder Messung war eine gründliche Spülung und Reinigung der Zählkammern erforderlich.

## 2.4 Sandwich- ELISA

### 2.4.1 Testprinzip



**Abb.3** Prinzip eines Sandwich-Elisa (modifiziert nach Firmenprospekt Fa. TAKARA Biomedicals Japan; Erklärung siehe Text)

Die Enzymimmunoassays zur Bestimmung des Gehaltes von P-I-P, TGF- $\beta$  und Fibronectin beruhen auf dem Prinzip eines sogenannten Sandwich-Elisa. Im Folgenden wird das Verfahren kurz skizziert. In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, welche mit spezifischen Antikörpern gegen das jeweils nachzuweisende Agens vorbeschichtet sind, werden Proben und Standardlösungen hinzugegeben. Nachfolgend wird gelöstes Antikörper-Enzym-Konjugat, bestehend aus Antikörpern spezifisch für das jeweilige Agens und daran gekoppelte Peroxidase zugesetzt. An das an die Festphase- Antikörper gebundene Agens aus Proben und Standards bindet sich gelöstes AK-Enzymkonjugat. Nicht gebundene Bestandteile werden durch Waschen entfernt. Hinzugegebenes

Substrat wird enzymkatalysiert in einer Farbreaktion umgesetzt. (Abb.3). Der Gehalt des vorliegenden Agens wird quantitativ über eine Absorptionsmessung mittels Fotometer bestimmt, wobei die Probenkonzentrationen durch Vergleich ihrer Absorptionswerte mit denen der bekannten Standardkonzentrationen ermittelt werden.

## **2.4.2 Procollagen-I-Peptid-Assay**

### **2.4.2.1 Reagenzien**

Im Testprotokoll der Firma Takara, Japan finden sich folgende Komponenten : Mikrotiterplatte (vorbeschichtet mit Anti-P-I-P-AK), Antikörper-Peroxidase-Konjugat, Standard, Substrat und Diluent. Zusätzlich werden folgende Reagenzien benötigt: Waschpuffer (PBS) und Stopplösung ( 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

### **2.4.2.2 Versuchsdurchführung**

Die bei - 70°C gelagerten Proben werden langsam auf Zimmertemperatur gebracht (20-30°C) und vorsichtig aufgeschüttelt. Die Standardverdünnungsreihe unter Verwendung des Diluent wird angelegt (0; 40; 80; 160; 320; 640 ng/ml). Da einige Probenkonzentrationen höher als 640 ng/ml lagen, wurden die Proben entsprechend mit Diluent verdünnt und dies später bei der Berechnung der Messwerte mit einem Umrechnungsfaktor berücksichtigt. Es wurden Doppelbestimmungen von Proben und Standardwerten ermittelt. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 µl Antikörper-Peroxidase-Konjugatlösung und 20 µl Standard,- bzw. Probenlösung für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte viermal mit ca. 400 µl Waschpuffer gewaschen. 100 µl Substratlösung wurde in jede Vertiefung gegeben und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Stopplösung und vorsichtigem Durchmischen (350 RPM) erfolgte ohne Zeitverzug die Absorptionsmessung bei 450 nm mittels Fotometer.

### **2.4.2.3 Auswertung der Messergebnisse**

Aus den Messergebnissen der Standardwerte wurde eine Eichkurve erstellt. Auf der Abszisse waren die Konzentrationen, auf der Ordinate die zugehörigen Absorptionswerte aufgetragen. Somit ließen sich die Probenkonzentrationen mit Hilfe der Absorptionsmesswerte der bekannten Standardkonzentrationen ermitteln.

### **2.4.3 TGF-β1-Assay**

#### **2.4.3.1 Reagenzien**

Folgende Komponenten sind im Testprotokoll der Firma DPC Biermann, Deutschland aufgeführt: Waschpuffer, Stopplösung, Diluent, Antikörper-Enzym-Konjugat (spezifisch für TGF-β1; Enzym: Peroxidase), Farbreagenz A und B, Standard, Mikrotiterplatte. Weiterhin werden 1 N HCl und 1,2 N NaOH / 0,5 M HEPES benötigt.

#### **2.4.3.2 Versuchsdurchführung**

Die bei -70°C gelagerten Proben werden langsam auf etwa Zimmertemperatur (20-30°C) gebracht, vorsichtig aufgeschüttelt und die Standardverdünnungsreihe unter Verwendung des Diluent angelegt (31,2; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000 pg/ml). Vor Verwendung der Proben im TGF-β1-Test müssen diese aktiviert, das heißt in eine immunreaktive Form gebracht werden, die von spezifischen Antikörpern erkannt werden kann. Hierzu wurden 0,25 ml Probenlösung mit 0,5 ml 1 N HCl unter Schütteln (350 RPM) für 10 Minuten inkubiert. Der Aktivierungsschritt wird durch Zugabe von 0,5 ml 1,2 N NaOH / 0,5 M HEPES beendet. Die später ermittelten Messwerte müssen nach Angabe des Herstellers mit dem Faktor 1,4 multipliziert werden. Zu Beginn wird nun in jede der Vertiefungen der Mikrotiterplatte 200 µl Standard,- sowie aktivierte Probenlösung eingebracht und drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden im nächsten Schritt alle Vertiefungen mit 200 µl TGF-β1-Antikörper-Konjugat befüllt und bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden inkubiert. Nach abermaligem dreimaligen Waschen wird in alle Vertiefungen 200 µl Substrat gegeben und für 20 Minuten bei

Raumtemperatur dort belassen. 50 µl Stopplösung werden nach Ablauf dieser Zeit in alle Vertiefungen eingebracht. Nach vorsichtigem Durchmischen erfolgt ohne Zeitverzug die Absorptionswertbestimmung bei 450 nm.

### **2.4.3.3 Auswertung der Messergebnisse**

Aus den Messergebnissen der Standardwerte wurde eine Eichkurve erstellt. Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen, auf der Ordinate die zugehörigen Absorptionswerte aufgetragen. Somit ließen sich die Probenkonzentrationen mit Hilfe der Absorptionmesswerte der bekannten Standardkonzentrationen ermitteln.

## **2.4.4 Fibronectin - Assay**

### **2.4.4.1 Reagenzien**

Im Testprotokoll der Firma Takara, Japan finden sich folgende Komponenten : Mikrotiterplatte (vorbeschichtet mit Anti-FN-AK), Antikörper-Peroxidase-Konjugat, Standard, Substrat und Diluent. Zusätzlich werden folgende Reagenzien benötigt: Waschpuffer (PBS) und Stopplösung ( 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

### **2.4.4.2 Versuchsdurchführung**

Die bei - 70°C gelagerten Proben werden langsam auf Zimmertemperatur gebracht und vorsichtig aufgeschüttelt. Die Standardverdünnungsreihe unter Verwendung des Diluent wird angelegt (0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 ng/ml). Da einige Probenkonzentrationen höher als 800 ng/ml lagen, wurden die Proben entsprechend mit Diluent verdünnt und dies später in der Ergebnisberechnung berücksichtigt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen von Proben und Standardwerten durchgeführt. Zunächst erfolgte die Beschichtung der Mikrotiterplatte durch Zugabe von 200 µl Anti-FN-Antikörperlösung und deren Inkubation für ca. 24 Stunden. Am nächsten Tag wurden, nach mehrmaligem Waschen in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 100 µl Standard,- bzw. Probenlösung gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur (20-30°C) inkubiert. Danach folgte dreimaliges Waschen mit ca. 400 µl PBS. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Antikörper-POD-Konjugat in alle Vertiefungen gegeben und eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Mikrotiterplatte (wiederum mit 400 µl PBS) wurden alle Vertiefungen mit 100 µl Substratlösung beschickt. Es schloss sich eine Inkubationszeit von 15 Minuten an. Der Substratumsatz wurde durch Zugabe von 100 µl der Stopplösung in jede Vertiefung beendet und umgehend die Absorptionsmessung bei 492 nm durchgeführt.

#### **2.4.4.3 Auswertung der Messergebnisse**

Aus den Messergebnissen der Standardwerte wurde eine Eichkurve erstellt. Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen, auf der Ordinate die zugehörigen Absorptionswerte aufgetragen. Somit ließen sich die Probenkonzentrationen mit Hilfe der Absorptionsmesswerte der bekannten Standardkonzentrationen ermitteln.

### **2.5 LDH-Messung der Proben**

#### **2.5.1 Messprinzip**

Das Verfahren zur Bestimmung der Lactatdehydrogenaseaktivität der Firma Sigma Diagnostics entspricht der Meßmethode nach Amador et al. (laut Testbeschreibung). Mit Hilfe des LDH-Reagenz wird die durch Oxidation von Lactat entstandene Enzymaktivität gemessen. Die Lactatdehydrogenase katalysiert folgende Reaktion:



Die Bildung von reduziertem Substrat (NADH) führt zu einem Absorptionsanstieg bei 340 nm, welcher der LDH-LAktivität der gemessenen Probe direkt proportional ist.

#### **2.5.2 Reagenzien**

Folgende Reagenzien sind in der Testbeschreibung aufgeführt:

Lactat, NAD und Puffer.

### **2.5.3 Versuchsdurchführung**

Das folgende Bestimmungsverfahren gilt für die Messtemperatur 30°C (des Reaktionsgemisches). Zunächst wird das LDH-L Reagens mit Aqua dest. nach Vorschrift resuspendiert. Proben und LDH-L Reagens werden bei 30°C im Inkubator gelagert. Zu Beginn wird 1 ml Aqua. dest. in eine auf 30°C erwärmte Küvette gegeben und mit dieser der Nullabgleich des Fotometers vorgenommen. Nun werden 50 µl Probe hinzugegeben und durch vorsichtiges Kippen der Küvetteninhalt durchmischt. 30 Sekunden nach der Probenzugabe erfolgt die erste Absorptionsmessung. Nach weiteren 60 Sekunden wird der zweite Wert gemessen. Die Absorptionsänderung pro Minute erhält man durch Subtraktion des zweiten vom ersten Messwert. Die Berechnung der LDH- Enzymaktivität wird nach folgender Formel durchgeführt.

$$\mathbf{LDH\ Aktivität\ (U/l) = dA/min * 3376}$$

*Erklärung: U/l: Einheit der Enzymaktivität pro Liter, dA pro Min Absorptionsänderung pro Minute , 3376: konstanter Umrechnungsfaktor für die Reaktinstemperatur (30°C)*

### **3. Ergebnisse und Statistik**

#### **3.1 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe eines Personal Computers unter Anwendung einer Tabellenkalkulationssoftware „Calc“ ( Open Office Softwarepaket Fa. Sun Microsystems ) unter Anwendung der statistischen Zusatzsoftware „dmaths“ (Version 2.8de, Autor G. Friege, Bezugsquelle online im Internet: <http://dmaths.projects.oodev.org/Stand:> 26.12.2009). Da eine Normalverteilung der Rohdaten nicht vorausgesetzt werden konnte, kam ein nicht-parametrischer Test (U-Test nach Mann-Whitney) zur Anwendung. Die Signifikanzniveaus wurden bei zweiseitiger Prüfung folgendermaßen festgelegt:  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $P \leq 0.001$  (\*\*\*) .

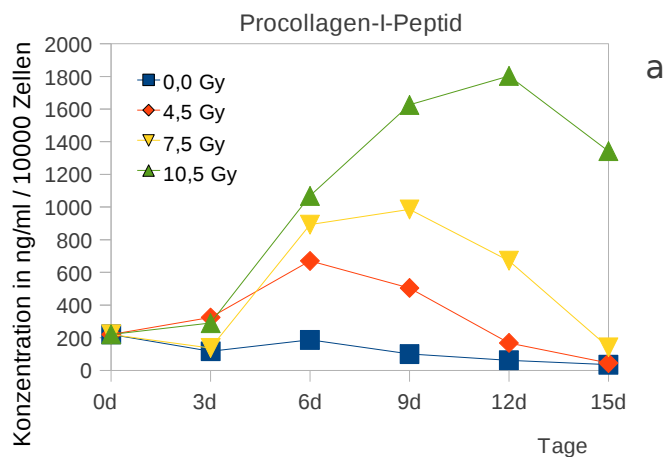
#### **3.2 Messwerttabellen/ -grafiken**

Im nächsten Abschnitt erfolgt - aus Gründen der Übersichtlichkeit - die zusammenfassende Ergebnisdarstellung der Sekretion von TGF- $\beta$ , PIP, Fibronectin bestrahlter Fibroblasten der Zelllinie MRC-5 sowie der Entwicklung der Zellzahlen zunächst in Form einer Wertetabelle, nachfolgend die grafische Darstellung der Messwertreihen und abschließend Darstellung der Ergebnisse der deskriptiven Statistik in Form sogenannter „Boxplot“-Diagramme auf jeweils einem Blatt. Dabei repräsentiert der sogenannte „Balken“ die 25-75 Perzentile, die „Antennen“ umfassen die 10-90 Perzentile. Die Mittellinie markiert den zugehörigen Median. Die Resultate der explorativen statistischen Testverfahren sind an entsprechender Stelle aufgetragen.

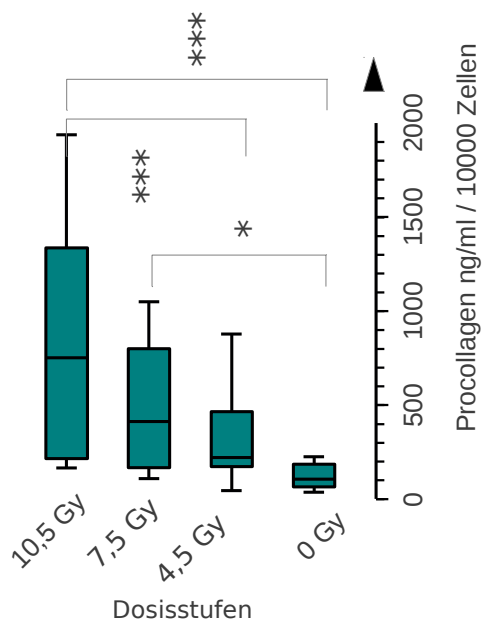


Strahlendosis		N	P-I-P					
Tag			0	3	6	9	12	15
0 Gy	2	850,4 ± 30,83	514,66 ± 0,58	255,22 ± 6,07	157,51 ± 11,56	71,07 ± 7,88	37 ± 0,02	
4,5 Gy	2	850,4 ± 30,83	969,19 ± 270,36	958,99 ± 432,52	767,49 ± 307,6	205,6 ± 14,03	50,78 ± 1,49	
7,5 Gy	2	850,4 ± 30,83	824,69 ± 86,68	1210,27 ± 223,16	1592,56 ± 141,24	808,37 ± 108,16	162,1 ± 34,53	
10,5 Gy	2	850,4 ± 30,83	1061,76 ± 187,33	1409,73 ± 280,14	2420,9 ± 337,13	2196,41 ± 217,54	1527,91 ± 554,37	

**Tabelle 1.** Procollagen-I-Peptid-Sekretspiegel (P-I-P) in ng/ml; N= Anzahl der Versuchsreihen; aufgeführt Mittelwerte mit jeweiliger Angabe der Standardabweichung



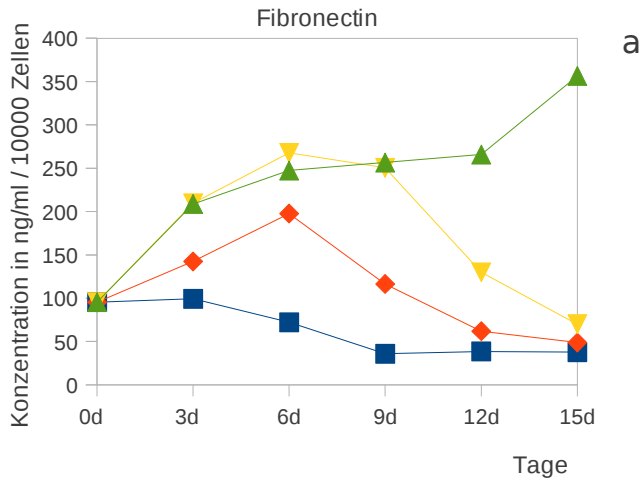
**Abb.4a**  
Grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der P-I-P-Sekretionsraten nach Bestrahlung kultivierter Fibroblastenpopulationen (angewandte Dosisstufen 0; 4,5; 7,5; 10,5 Gy, Beobachtungszeitraum 15 Tage), bezogen auf je 10000 Zellen (nach Abzug des jeweiligen Medium-Leerwertes, Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte)



**Abb.4b**  
Boxplot Diagramm auf getragene Ergebnisse des (U-Test nach Mann-Whitney ergibt für den Vergleich 0 Gy vs 7,5 Gy  $p=0,045$  (\*); 0 Gy vs. 10,5 Gy  $p=0,0049$  (\*\*\*) ; 4,5 Gy vs. 10,5 Gy  $p=0,013$  (\*\*\*)

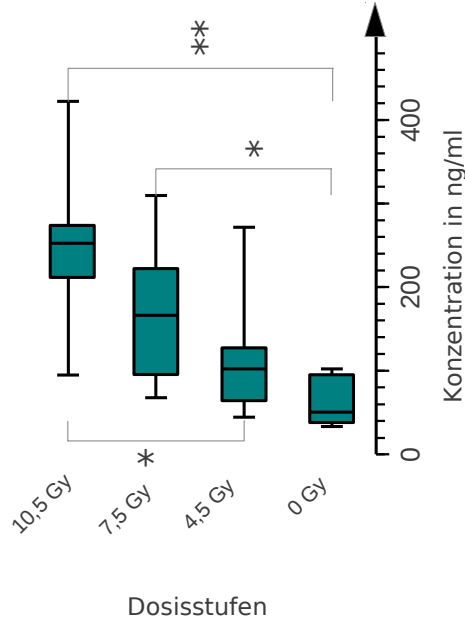
Strahlendosis		N	FN					
Tag			0	3	6	9	12	15
	0 Gy	2	95,2 ± 0,99	99,33 ± 3,72	72,31 ± 16,81	35,9 ± 3,68	38,5 ± 2,26	37,75 ± 2,19
	4,5 Gy	2	95,44 ± 0,65	142,4 ± 11,46	197,65 ± 105,29	116,45 ± 11,81	61,96 ± 6,99	48,85 ± 6,43
	7,5 Gy	2	95,44 ± 0,65	209,5 ± 15,98	267,7 ± 59,4	250,4 ± 63,22	129,85 ± 7	69,95 ± 2,62
	10,5 Gy	2	95,44 ± 0,65	208,8 ± 29,84	247,25 ± 38,68	256,65 ± 13,79	265,75 ± 11,24	356,45 ± 93,27

**Tabelle 2.** Fibronectin-Sekretionspiegel (FN) in ng/ml; N= Anzahl der Versuchsreihen; Mittelwerte mit jeweiliger Angabe der Standardabweichung



**Abb. 5a**

Grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Fibronectin Sekretionsraten nach Bestrahlung kultivierter Fibroblastenpopulationen (angewandte Dosisstufen 0; 4,5 ; 7,5 ; 10,5 Gy, Beobachtungszeitraum 15 Tage ), bezogen auf je 10000 Zellen nach Abzug des jeweiligen Medium Leerwertes ); Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte

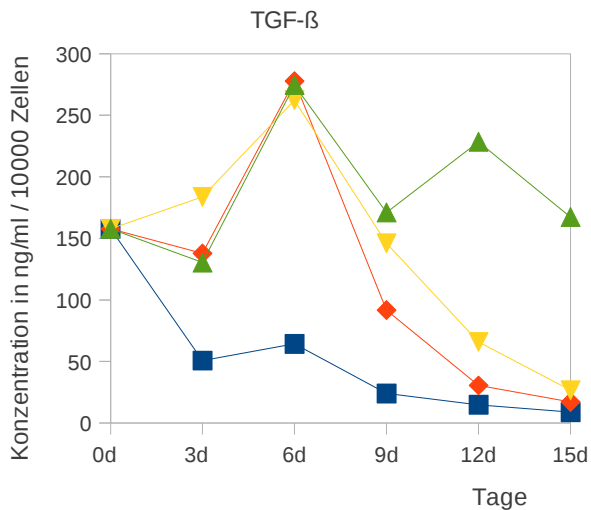


**Abb. 5b**

Grafische Darstellung der Ergebnisse der deskriptiven Statistik im Boxplot Diagramm (aufgetragene Ergebnisse des U- Test nach Mann Whitney ergibt für den Vergleich 0 Gy vs 4,5 Gy  $p = 0,09$ ; 0 Gy vs. 7,5 Gy  $p=0,03$  (\*); 0 Gy vs. 10,5 Gy  $p= 0,008$  (\*\*); 4,5 Gy vs. 10,5 Gy  $p= 0,02$  (\*), 7,5 Gy vs. 10,5 Gy  $p=0,29$

Tag	Strahlendosis	N	TGF- $\beta$					
			0	3	6	9	12	15
	0 Gy	2	157,82 $\pm$ 56,96	50,71 $\pm$ 8,32	64,35 $\pm$ 10,95	24,03 $\pm$ 3,54	14,81 $\pm$ 0,91	8,81 $\pm$ 0,07
	4,5 Gy	2	157,82 $\pm$ 56,96	137,84 $\pm$ 22,09	277,84 $\pm$ 139,42	91,76 $\pm$ 4,37	30,55 $\pm$ 2,09	17,09 $\pm$ 1,55
	7,5 Gy	2	157,82 $\pm$ 56,96	183,81 $\pm$ 28,53	262,32 $\pm$ 38,87	146,06 $\pm$ 52,3	65,89 $\pm$ 9,73	26,59 $\pm$ 4,53
	10,5 Gy	2	157,82 $\pm$ 56,96	130,49 $\pm$ 14,46	274,71 $\pm$ 43,66	171,1 $\pm$ 1,31	228,5 $\pm$ 33,38	167,37 $\pm$ 75,32

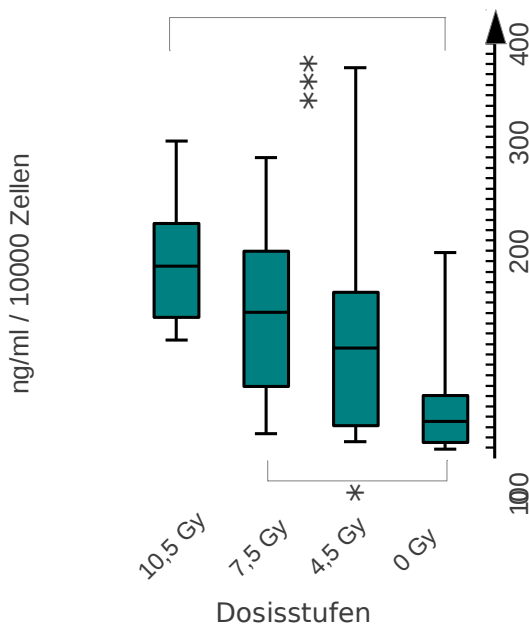
**Tabelle 3.** TGF- $\beta$ -Sekretspiegel in ng/ml; N= Anzahl der Versuchsreihen; aufgeführt Mittelwerte mit jeweiliger Angabe der Standardabweichung



a

**Abb. 6a**

Grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der TGF- $\beta$ -Sekretionsraten nach Bestrahlung kultivierter Fibroblastenpopulationen (angewandte Dosisstufen 0; 4,5 ;7,5 ; 10,5 Gy, Beobachtungszeitraum 15 Tage, bezogen auf je 10000 Zellen (nach Abzug des jeweiligen Medium Leerwertes) ; Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte



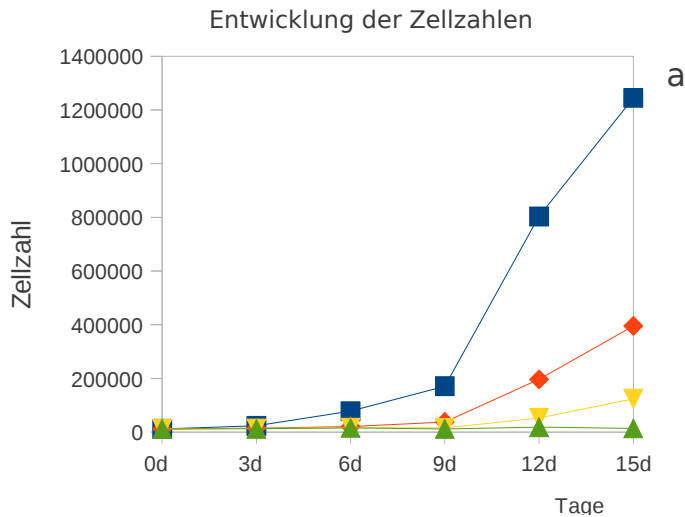
b

**Abb. 6b**

Grafische Darstellung der Ergebnisse der deskriptiven Statistik im Boxplot-Diagramm Ergebnisse des U-Testes nach Mann Whitney ergab für den Vergleich 0 Gy vs. 4,5 Gy  $p= 0,17$  ; 0 Gy vs. 7,5 Gy  $p= 0,044$  (\*) ; 0 Gy vs. 10,5Gy  $p=0,008$  (\*\*\*) ; 4,5 Gy vs. 7,5 Gy  $p= 0,57$  ; 7,5 Gy vs. 10,5 Gy  $p= 0,297$

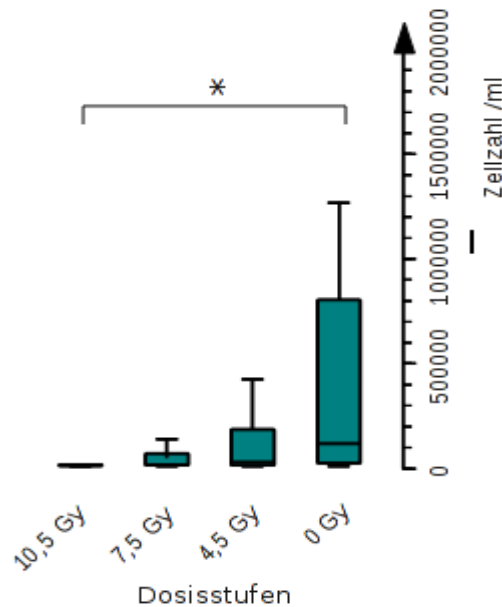
Tag	Strahlendosis	N	Zellzahlen					
			0	3	6	9	12	15
	0 Gy	2	12187,5 ± 441,94	23750 ± 883,88	78125 ± 2651,65	170937,5 ± 21655,15	803437,5 ± 441,94	1244687,5 ± 34029,51
	4,5 Gy	2	12187,5 ± 441,94	14687,5 ± 1325,83	20937,5 ± 10164,66	37812,5 ± 9280,78	196750 ± 30228,81	395625 ± 40658,64
	7,5 Gy	2	12187,5 ± 441,94	13750 ± 883,88	16875 ± 1767,77	15937,5 ± 1325,83	52812,5 ± 2209,71	124375 ± 21213,2
	10,5 Gy	2	12187,5 ± 441,94	12500 ± 2651,65	15937,5 ± 3093,59	12187,5 ± 1325,83	18437,5 ± 1325,83	14062,5 ± 4861,36

**Tabelle 4.** Entwicklung der Zellzahlen; aufgeführt Mittelwerte mit jeweiliger Angabe der Standardabweichung



**Abb. 7a**

Grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Zellzahlen nach Bestrahlung kultivierter Fibroblastenpopulationen (angewandte Dosisstufen 0; 4,5; 7,5; 10,5 Gy, Beobachtungszeitraum 15 Tage); Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte



**b**

**Abb. 7b**

Grafische Darstellung der Ergebnisse der deskriptiven Statistik im Boxplot des U-Testes nach Mann Whitney ergab für den Vergleich 0 Gy vs. 4,5 Gy  $p= 0,37$ ; 0 Gy vs. 7,5 Gy  $p= 0,13$ ; 0 Gy vs. 10,5 Gy  $p= 0,036$  (\*); 4,5 Gy vs. 7,5 Gy  $p= 0,47$ ; 4,5 Gy vs. 10,5 Gy,  $p= 0,076$ ; 7,5 Gy vs. 10,5 Gy  $p= 0,23$

### **3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Das Zellwachstum wurde dosisabhängig gehemmt. Im Einzelnen lag, repräsentativ für den Untersuchungszeitraum, am Tag 9 die Zellzahl der mit 4,5 Gy behandelten Zellen um den Faktor 4-5 niedriger, bei den mit 7,5 Gy bestrahlten Zellen bereits um Faktor 10 niedriger und bei 10,5 Gy um den Faktor 14 niedriger. Analoge Verhältnisse fanden sich zu allen Meßzeitpunkten, wobei sich der dosisabhängige Effekt im Zeitverlauf verstärkte. Eine Ausnahme bildete der 15. Tag: der, bei erhaltener "Dosistaffelung" eine im Vergleich zum 12. Tag wiederum ansteigende Proliferationsrate bei 4,5 Gy um Faktor 3 niedriger (vs. Faktor 4 am Tag 12) und 7,5 Gy um Faktor 10 niedriger (vs. Faktor 15 am 12. Tag) bei demgegenüber weiterhin abfallender Proliferationsrate der mit 10,5 Gy behandelten Zellen um Faktor > 80 niedriger ( vs. Faktor 40 am 12. Tag; Abb. 7a,b; Tab.4/S.22).

Im Rahmen der statistischen Analyse war eine Diskriminierung über den Versuchszeitraum lediglich im Vergleich zwischen den unbehandelten Zellen und den mit der Höchstdosis von 10,5 Gy behandelten Zellen möglich. Dies lag vermutlich an der insgesamt weiten Spannbreite der Ergebnisse der Zellzählung der unbehandelten Zellen am Ende des Untersuchungszeitraumes bei ungehindertem Wachstum und den demgegenüber im Vergleich geringen Unterschieden der Proliferationsraten der bestrahlten Populationen.

Die TGF- $\beta$  Sekretionsraten der einzelnen Dosisstufen zeigten am 3. Tag nach Bestrahlung noch ein uneinheitliches Verhalten, wobei sich ein Trend in Richtung einer unter erhöhter Strahlendosis gesteigerten Sekretionsrate abzeichnete. Am 6.Tag zeigten sich Sekretionsmaxima aller Dosisstufen mit etwa jeweils 4-fach über dem Niveau der unbehandelten Zellen gesteigerten Werten (Abb. 6a,b; Tab.3). Zwischen dem 9.-15. Tag waren die TGF- $\beta$ -Sekretionsraten rückläufig (Dosisstufen 0-7,5 Gy). Demgegenüber nahm die basale Sekretionsrate der unbehandelten Zellen im Versuchszeitraum stetig ab. Eine bemerkenswerte Ausnahme bilden die mit der Höchstdosis von 10,5 Gy behandelten Zellen. Bei diesen zeigte sich nach vorgangehend bereits wieder rückläufiger Sekretionsrate am Tag 9 ein zweites Sekretionsmaximum am 12 Tag ( um den Faktor 15 höherliegend im Vergleich zu den unbehandelten Zellen). In der

statistischen Analyse fanden sich signifikante Unterschiede bei Vergleich der höchsten Strahlendosen 10,5 Gy und 7,5 Gy jeweils mit den unbehandelten Zellen. Hinsichtlich der P-I-P-Sekretionsraten ergab sich während des ersten Messzeitpunktes nach Bestrahlung am Tag 3 ein noch uneinheitliches Bild aller Versuchsbedingungen. Ab Tag 6 war eine dosisabhängig gesteigerte P-I-P-Sekretion beobachtbar. Im Einzelnen fanden sich unter Anwendung von 4,5 Gy 3-4 fach höhere Werte, unter 7,5 Gy eine Steigerung um das 4-5 fache, sowie eine Steigerung um den Faktor 5-6 bei den mit 10,5 Gy bestrahlten Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Dosisabhängig gestaffelte Unterschiede der P-I-P-Sekretion fanden sich analog an den übrigen Messtagen (Abb. 4a,b; Tab.1). Auffällig war daß, obgleich die Sekretionsraten der Dosisstufen 0-7,5 Gy am Tag 9 bereits wieder rückläufig waren, die P-I-P-Sekretion der mit 10,5 Gy behandelten Zellen nochmalig auf ein Maximum am Tag 12 (um das 30- fache erhöhter Wert) anstieg. Darüberhinaus kehrte das Sekretionsniveau der mit der Höchstdosis bestrahlten Zellen im Beobachtungszeitraum nicht auf die Basalwerte zurück, obgleich ebenso eine Rückläufigkeit der P-I-P-Medienspiegel zu verzeichnen war. In der statistischen Auswertung waren die dosisabhängig gestaffelten Effekte mit Ausnahme der mit 4,5 Gy behandelten Zellen signifikant. FN Sekretionssteigerungen aller Dosisstufen zeigten sich gegenüber den unbehandelten Zellen ab dem 3. Tag nach Bestrahlung. Im Einzelnen fand sich unter Anwendung von 4,5 Gy eine um das 1,4- fache sowie auf den Dosisstufen 7,5 Gy und 10,5 Gy eine jeweils um den Faktor 2 gesteigerte Sekretionsrate gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 5a,b; Tab.2).

Die Sekretionsmaxima aller Dosisstufen lagen um den 6. Tag bei im Mittel um etwa Faktor 3 erhöhten Sekretionsraten. Zwischen dem 12.-15. Tag waren die Sekretionsraten der Dosisstufen 4,5 -7,5 Gy rückläufig. Hingegen blieb die Fibronectinsyntheserate der mit 10,5 Gy behandelten Zellen weiterhin erhöht. Auffällig war, daß die Sekretionsrate der mit der Höchstdosis behandelten Zellen bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes weiter anstieg ( 9. und 12. Tag jeweils um den Faktor 7 höher, am 15. Tag Steigerung um Faktor 9 im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe).

In der Zusammenschau der Daten war bei Betrachtung der Sekretionsmaxima von Fibronectin und TGF- $\beta$  bemerkenswert, daß diese dem Sekretionsmaximum des Procollagens in der zeitlichen Abfolge vorausgingen. Des weiteren war auffällig, daß die Sekretionsraten der untersuchten Sekretionsprodukte der höchsten Dosisstufe im Gegensatz zu den übrigen Versuchsbedingungen permanent gesteigert blieben, bei demgegenüber permanent inhibierter Proliferationsrate.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Einleitung**

Ein im Bereich der Onkologie unverzichtbares Therapie-Prinzip ist die strahlentherapeutische Behandlung thorakaler Malignome. Prominente Beispiele hierfür sind die Behandlungen von Mamma-Karzinomen, Bronchialkarzinomen, oder malignen Lymphomen ( Pickrell et al., 1995, Vujaskovic et al., 2000). Den Therapie-limitierenden Faktor stellt die Strahlensensibilität des gesunden Gewebes dar.

Ogleich durch ständig optimierte Bestrahlungsplanungen versucht wird die hervorgerufenen unerwünschten Wirkungen zu minimieren, können begleitende Parenchymschäden und darüberhinausgehend die Entwicklung einer Fibrose nicht gänzlich verhindert werden. Ebenso sind die Ergebnisse antiinflammatorischer Behandlungsstrategien, die auf eine zeitliche und lokale Begrenzung einer strahleninduzierten Entzündungsreaktion abzielen, hinsichtlich der Verhinderung einer Fibrose enttäuschend. Diese Beobachtungen haben dazugeführt von einer bloßen "Effektorzellfunktion" des Fibroblasten, des Hauptproduzenten der EZM-Matrixproteine zunehmend in Frage zu stellen.

Die vorliegende Arbeit nimmt sich zum Ziel, die angenommene eigenständigere Rolle von Lungenfibroblasten nach Einwirkung ionisierender Strahlung zu überprüfen. Zu diesem Zweck untersuchten wir, gemäß der in den Abschnitten 1.1.9 und 1.10 formulierten Zielsetzung und Fragestellung der vorliegenden Arbeit, das Proliferations- und Sekretionsverhalten von humanen fetalen Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 in Zellmonokulturen nach Einwirkung ionisierender Strahlung ( Strahlendosen 0 /4,5/

7,5/10,5 Gy ) in Abwesenheit von Entzündungszellen. Die eingesetzten Strahlendosen entsprachen größenordnungsgemäß den im Gewebe erzielten Ortsdosen während therapeutischer Strahlenanwendungen. Stellvertretend für die Produktion von EZM-Proteinen durch Fibroblasten wurde in unserem Versuchsansatz der Gehalt von Procollagen-I-Peptid sowie Fibronectin im Zellkulturüberstand bestimmt. Hierbei fungiert Procollagen-I-Peptid, als Marker der Kollagensynthese (Roman et al.,1997). Zudem ist bekannt, daß Fibronectin in fibrotischem Gewebe vermehrt synthetisiert wird ( Rodemann et al.,1995). Beide Strukturproteine eignen sich als Indikatoren einer generell gesteigerten EZM-Matrixproteinproduktion. Des weiteren werden Fibroblasten nicht nur einseitig durch Cytokine aktiviert, sondern können diese auch selbst produzieren ( Gauldie et al.,1992). Interessant im Rahmen der Aufklärung der zur Fibrose führenden Prozesse ist die Fähigkeit von Fibroblasten zur Sekretion des profibrotischen Cytokines TGF- $\beta$ , welches wir in unserem Versuchsansatz in den Zellkulturüberständen post radiatio bestimmten. In den folgenden Abschnitten werden die Resultate unserer Untersuchungen bezogen auf die vorgenannten Fragestellungen vorgestellt.

#### **4.2 Proliferationsverhalten fetaler Fibroblasten in Zellkultur nach Anwendung ionisierender Strahlung**

Das Wachstum der kultivierten Fibroblastzellen nach Bestrahlung wurde durch ionisierende Strahlung gehemmt. An jedem der Messzeitpunkte ( 0/3/6/9/12/15 Tag post radiatio), zeigte sich tendenziell eine verminderte Zellproliferationsrate der bestrahlten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (siehe Abschnitt 3.2 Tab 4., Abb. 7a). Es war eine Dosisabhängigkeit des Effektes beobachtbar. Repräsentativ für den gesamten Untersuchungszeitraum lagen die Zellzahlen der mit 4,5 Gy behandelten Zellen am Tag 9 um den Faktor 4,5 niedriger, (7,5 Gy / Faktor 10 niedriger, 10,5 Gy /Faktor 14 niedriger). Analoge Verhältnisse fanden sich zu allen Meßzeitpunkten, wobei sich der dosisabhängige Effekt im Zeitverlauf verstärkte. Ab dem 15. Tag war zu beobachten, daß sich die Proliferationsraten der behandelten Zellen „erholten“. Eine Ausnahme bildeten die mit der Höchstdosis von 10,5 Gy bestrahlten Zellen . Hier persistierte die



Wachstumshemmung. Der Rückgang der Wachstumsrate konnte nicht als Folge eines direkten akuten strahleninduzierten Zelltodes gewertet werden, da die Messung der Lactatdehydrogenaseaktivität (LDH) in den Zellkulturüberständen aller Versuchsbedingungen vor und nach Radiatio dokumentiert, konstant niedrig blieb (<23IU/ml). Die LDH ist ein cytosolisches Enzym. Bei Verlust der zellulären Integrität wird diese in das umgebende Medium freigesetzt. Für den Fall eines strahleninduzierten Zelltodes wäre auf Grund der resultierenden Desintegration der Zellwand und der hierdurch resultierenden Freisetzung cytosolischer Enzyme in das umgebende Zellkulturmedium ein Konzentrationsanstieg der LDH in den Zellkulturüberständen zu erwarten. Für den beobachteten Rückgang der Wachstumsrate sind demnach andere Mechanismen maßgeblich, welche ohne die Voraussetzung einer strahleninduzierten Apoptose auskommen. Vermutet wurde, daß sich unter Bestrahlung ein bestimmter „fibrogener Zellphänotyp“ herausgebildet haben könnte. Verschiedene Arbeitsgruppen haben postuliert, daß der Rückgang der Wachstumsrate aus einer strahleninduzierten oder auch einer aus dem extrazellulären Reaktionssubstrat vermittelten Änderung der Differenzierungsrichtung der teilungsfähigen Fibroblasten zu postmitotischen Fibrocyten resultieren könnte ( Jordana et al.,1988; Burger et al.,1998; Herskind et al.,1998). Die Zusammenhänge im Einzelnen sollen nachfolgend skizziert werden.

#### **4.2.1 Subpopulationen pulmonaler Fibroblasten**

Zellzyklusanalysen konnten zeigen, daß sich in verschiedenen Bindegeweben ( der Haut, der Niere und der Lunge) verschiedener Säugetierarten und des Menschen verschieden differenzierte Fibroblasten finden (Bayreuther et al.,1989, Rodemann et al.,1989, 1993, Akamine et al.,1992). An Hand verschiedener Phänotypischer Merkmale lassen sich insgesamt 6 Subpopulationen unterscheiden. Diese differieren hinsichtlich vieler biologischer Parameter. Neben der Expression von spezifischen Zelloberflächenmarkern und zellvermittelten Antworten, spielen insbesondere Unterschiede in ihrem Sekretions- und Proliferationsverhalten eine bedeutende Rolle (Anscher et al.,1994 ; Gaudie et al.,1993; Kolb et al., 1998). Unter den beiden letztgenannten Gesichtspunkten werden die Subpopulationen zwei Gruppen

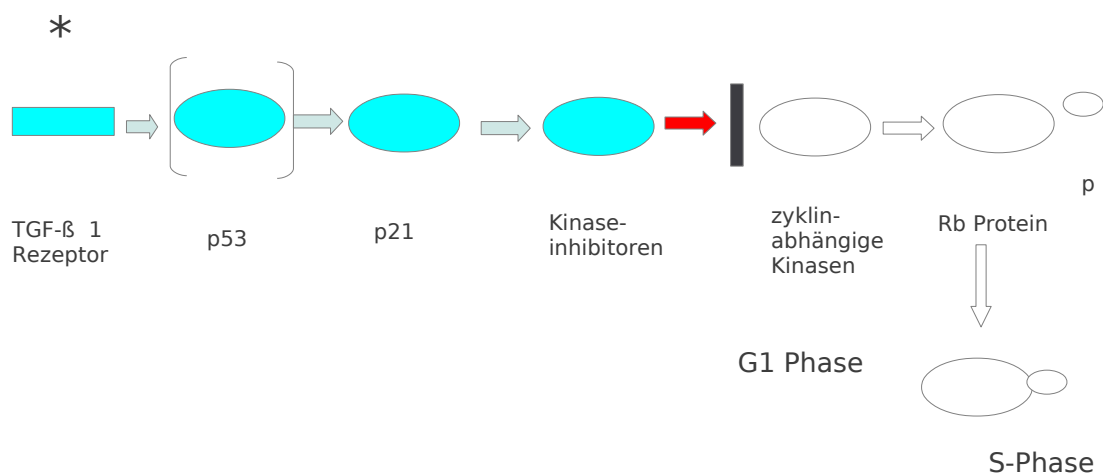
zugeordnet Zu der ersten Gruppe gehören die sogenannten Vorläuferfibroblasten MF-I, MF-II und MF-II (mitotically active progenitor fibroblasts). Die Zellteilungsraten der MF-I-Zellen liegen bei ca. 20-30, die der MF-II-Zellen etwa bei 20 Zyklen, die der MF-III-Zellen bei etwa >15 Zyklen. Aus diesem Grunde werden diese Zellen dem sogenannten „Regenerationspool“ zugeordnet ( Bayreuther et al.,1988, Rodemann et al.,1988,1995).

Die zweite unterscheidbare Zell-Gruppe repräsentieren die postmitotischen Fibrocyten (PMF-IV, PMF-V, PMF-VI [post-mitotic fibrocytes]). Die PMF-VI-Zellen sind terminal differenziert ( Rodemann et al., 1989). Dies bedeutet, daß die Fähigkeit zur Zellteilung zu Gunsten einer erhöhten Sekretionsrate aufgehoben ist. Die postmitotischen Fibrocyten produzieren in erster Linie extrazelluläre Matrixproteine, Wachstumsfaktoren, Zytokine. Sie wurden daher dem „funktionellen Kompartiment“ zugeordnet (Bayreuther et al.,1988, Rodemann et al.,1988,1995). Unter physiologischen Bedingungen, war zwischen beiden Gruppen des Fibroblasten/Fibrocyten-Zell-Systems im Bindegewebe ein konstantes Verhältnis von etwa 2:1 zu finden (Anscher et al.,1997, Bitterman et al.,1982, Jordana et al.,1988, Rodemann et al.,1995). Hierdurch war die Regenerationsfähigkeit des funktionellen Kompartimentes sichergestellt. Allerdings zeigte sich, daß dieses Verhältnis durch verschiedene Faktoren und Umstände verändert werden konnte. So war mit höherem Lebensalter eine Verschiebung dieses Verhältnisses zu Gunsten der postmitotischen Zellen zu beobachten. In gleicher Art können individuelle Unterschiede auf Grund genetischer Variabilitäten wirken ( Lara et al.,1996). Davon unabhängig ist bekannt, daß eine Reihe unspezifischer Gewebsreize, dem das Lungenparenchym im Laufe des Lebens ausgesetzt sein kann, zu einem relativen Überwiegen postmitotischer Fibrocyten führt. Entsprechende Beobachtungen fanden sich bei einer Reihe chronischer Erkrankungen mit Beteiligung des dermalen und pulmonalen Bindegewebes wie der Sklerodermie oder der Keloidbildung. Für die klinisch bedeutsame Anwendung von Zytostatika, wie beispielsweise des Mitomycin C, konnte ebenso gezeigt werden, daß sich gleichsinnige Veränderungen das Fibroblasten/Fibrocyten Zell-Systemes betreffend ergaben (Jordana et al.,1988; Tremblay et al.,1995; Gaudie et al.,1992).

#### **4.2.2 Terminale Differenzierung von Fibroblasten nach Applikation ionisierender Strahlung**

Die weiterführende Frage war, ob die Anwendung ionisierender Strahlung in Analogie zu den oben genannten Einflüssen zu einer terminalen Differenzierung innerhalb des Fibroblasten -Fibrozyten Zellsystemes führen konnte. Dieses wurde in einem Experiment einer Arbeitsgruppe um Hakenjos näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden in Zellkultur gezüchtete Ratten-Fibroblasten entweder unbehandelt belassen oder demgegenüber mit einer Dosis von 4 Gy bestrahlt. Zu Beginn und Ende des Experimentes wurde mit Hilfe von „Colony Formation Assays“, welche es möglich machten die Zellsubpopulationen quantitativ zu unterscheiden, das Verhältnis von mitotisch aktiven Zellen (MF) zu postmitotischen Zellen (PMF) bestimmt. Dabei ergab das Verhältnis gebildet aus der Anzahl der teilungsfähigen Fibroblasten gegenüber den postmitotischen Fibrocyten (MF:PMF) der unbehandelten Kulturen einen Nominalwert von 3,0. Demgegenüber wurde nach Bestrahlung (4 Gy) ein entsprechender Quotient von 0,8 ermittelt (Hakenjos et al., 2000). Das relative Überwiegen der postmitotischen Fibrocyten legte den gerichteten Einfluß ionisierender Strahlung auf das Differenzierungsverhalten von Fibroblastensubpopulationen nahe. Die Änderung der Differenzierungsrichtung in Richtung des postmitotischen Fibrozyten, dem Hauptproduzenten der Extracellulärmatrrixproteine, wurde auf Grund der damit verbundenen gesteigerten Sekretionsleistung als Schlüsselereigniss für die Induktion und Manifestation des fibrotischen Gewebsremodelling angesehen ( Jordana et al., 1988 ,Rodemann et al., 1996, Burger et al., 1998, Hakenjos et al., 2000; Herskind et al.,1998 /2000). Hinsichtlich der Mechanismen der radiogen induzierten terminalen Differenzierung von Fibroblasten, konnten molekularbiologische in-vitro-Studien eine Schlüsselstellung des Cytokines TGF- $\beta$  aufzeigen. Erste Hinweis darauf gaben Zellkulturuntersuchungen an Rattenfibroblasten, mit Hilfe von „Colony Formation Assays“, die durch Bestrahlung induzierte terminale Fibroblastendifferenzierung durch die Hinzugabe von TGF- $\beta$ -spezifischen Antikörpern verhindern (Burger et al.,1998). Im Gegenzug zeigten ansonsten gleichartige Zellkulturen ohne Zusatz entsprechender

Antikörper eine terminale Differenzierung. Diese Beobachtungen wurden durch Arbeiten weiterer Autoren gestützt (Hakenjos et al., 2000; Haase et al., 2000; Fournier et al., 2001). Zellzyklus-Analysen konnten belegen, daß die TGF- $\beta$ -abhängige intrazelluläre Signaltransduktion auf den Ablauf des Zellzyklus direkt Einfluß nahmen, da es strahleninduziert zu einer Blockade des Überganges zwischen der G1-Phase und der S-Phase des Zellzyklus kam (Rubin et al., 1992). Im Detail kam es nach Stimulation des TGF- $\beta$ -1-Rezeptors und der intrazellulären Reizweiterleitung über eine P21-abhängige Signal-Kaskade zu einer weiterführenden Signalvermittlung entweder in Abhängigkeit von einem weiteren Signalprotein p53 oder zur Signalfortpflanzung ohne dessen Einfluß. Interessant war, daß die p53-abhängige Aktivierung des P21-Proteines nur passager erfolgte. Unter TGF- $\beta$ -Einwirkung kam es im Verlauf zu einer P53-unabhängigen, permanenten Aktivierung von P21. Aktiviertes P21 führte zu einer Hemmung der Aktivität zyklinabhängiger Kinasen, welche die Phosphorylierung des Rb-Proteines bewirken. Phosphoryliertes Rb-Protein ist für den Übergang der Zellen aus der G1-Phase des Zellzyklus in die Synthese-Phase notwendig. (siehe Abb. 8).



**Abb. 8** Darstellung der intrazellulären p21-abhängigen Signalkaskade des TGF- $\beta$ , die durch ihre Abfolge Einfluß auf den Zellzyklus von Fibroblastenzellen nimmt. Die Aktivierung des P21 kann P53-assoziiert (passager) erfolgen oder durch direkte (permanente) Aktivierung durch den TGF- $\beta$ -Rezeptor-Komplex. Unter der Einwirkung des Proteinkomplexes p21 werden zyclinabhängige Kinasen gehemmt, wodurch die Phosphorylierung des Rb-Proteines gestört wird. Letzteres wird benötigt um den Eintritt der Zelle aus der G1-Phase in die S-Phase zu gewährleisten. (\*) symbolisiert eine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Rezeptor-Komplexes, die Klammersymbole deuten auf die Möglichkeit der (passageren) p53-abhängigen Signaltransduktion, aktivierte beteiligte Enzyme sind „türkis“, gehemmte Enzymkomplexe „leer“ dargestellt.

### **4.3 Sekretion von TGF- $\beta$ pulmonaler fetaler Lungenfibroblasten nach Anwendung ionisierender Strahlung**

Obgleich sich im menschlichen Gewebe 3 Isoformen des Cytokines finden, bezogen sich die Messungen in unserer Arbeit auf die Isoform TGF- $\beta$ 1, da diese quantitativ in fibrotischen Geweben vorherrscht ( Rebecca G. Wells et al., 2000 ).

In unseren Versuchen fanden sich ab dem 6. Tag TGF- $\beta$ -Sekretionsmaxima aller Dosisstufen mit etwa jeweils 4-fach über dem Niveau der unbehandelten Zellen gesteigerten Werten (Abb. 6a,b; Tab.3 / S.21). Bereits ab dem 9.-15. Tag waren die TGF- $\beta$ -Sekretionsraten beginnend rückläufig ( Dosisstufen 0-7,5 Gy). Eine bemerkenswerte Ausnahme bilden die mit der Höchstdosis von 10,5 Gy behandelten Zellen. Bei diesen zeigte sich nach vorgangehend bereits wieder rückläufiger Sekretionsrate am Tag 9 ein zweites Sekretionsmaximum am 12. Tag ( um den Faktor 15 höherliegend im Vergleich zu den unbehandelten Zellen). Vergleichbare Beobachtungen wurden in der Literatur im Rahmen verschiedener Tierexperimente beschrieben. Mehrere Arbeitsgruppen, die die Messungen des TGF- $\beta$  Gehaltes in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von Rattenlungen nach thorakaler Bestrahlung untersuchten, zeigten signifikant erhöhte TGF- $\beta$ -Spiegel innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 2 Wochen (5 Gy / 12,5 Gy), die über 2 Monate (12,5 Gy), permanent erhöht blieben (Rubin et al.,1992, Yi et al.,1996). In Übereinstimmung mit den eigenen Befunden zeigten weitere Arbeiten eine in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis abweichendes Verhalten. Während sich nach Applikation von 6 Gy eine lediglich passager über wenige Tage gesteigerte Genexpression nachweisen ließ, fanden sich demgegenüber, unter Anwendung von 12 Gy mehrwöchige persistent erhöhte m-RNA-TGF- $\beta$ -Spiegel nach Bestrahlung von Mauslungen (Rubin et al.,1992, Rube et al., 2000).

Die persistierenden angedeutet zweigipfligen Erhöhungen des TGF- $\beta$ -Spiegel bei 10,5 Gy, könnten Ausdruck einer Dekompensation kontrollierender Mechanismen der TGF- $\beta$ -Aktivierung bzw. Genexpression sein. Hierbei könnte es durch die resultierende

„ungebremste“ Cytokinwirkung zu einem Überwiegen der profibrotischen Wirkungen von TGF- $\beta$  gegenüber den gegensätzlichen Mechanismen kommen und somit einem fibrotischen Gewebsumbau befördern. Betrachtungen über die Art und Ablauf der Aktivierungsmechanismen des latenten TGF- $\beta$  sind für ein besseres Verständnis der zu Grunde liegenden Zusammenhänge nützlich. In der Literatur finden sich Mutmaßungen über die mögliche Bedeutung eines differenzierten Aktivierungsmodell des TGF- $\beta$  (Annes et al., 2003). Demnach wird der in der Extracellulärmatrix verankerte latente TGF- $\beta$ -Protein-Komplex als „Sensor“ aufgefasst, deren Sinn in einer „Schadensmeldung“ im Falle einer Desintegration der Extracellulärmatrix aus verschiedener Ursache liegt. Weiterführend wird die Organisation einer „Antwort“ im Sinne einer hierdurch vermehrten EZM-Produktion vermittelt. Die Speicherung latenten TGF- $\beta$  in der Extracellulärmatrix gewährleistet einen räumlichen und quantitativen Bezug zwischen Schädigung und der daraufhin folgenden notwendigen Restrukturierung der extrazellulären Matrix. Nachfolgend werden die bekannten Mechanismen näher dargestellt.

Den bekannten 3 Hauptkomponenten des latenten TGF- $\beta$ -Protein-Komplexes, dem „Latent TGF- $\beta$  Binding Protein“ (LTBP), dem „latency associated peptide“ (LAP) und dem TGF- $\beta$ -Molekül selbst, kommen hierbei wichtige Teilaufgaben im Aktivierungsprozess des TGF- $\beta$  zu. Demnach übernimmt das LTBP-Bindungsprotein die Funktion eines „Lokalisierers“. Da hierüber die Bindung an die Extrazellulärproteine erfolgt, wird auf diesem Weg die Anordnung und Verteilung des latenten TGF- $\beta$  in dem dreidimensionalen „Gitternetzwerk“ der Extracellulärmatrix bestimmt. Das LAP fungiert im Sinne eines „Detektors“ (einer stattgehabten Gewebsschädigung). Dies wird möglich, da die im Gefolge eines gesetzten Gewebsschadens ablaufenden oxidativen, proteolytischen und darüberhinausgehend auch integrinvermittelte Prozesse (im Rahmen der sich entwickelnden Entzündungsreaktion) zu einer Abspaltung des „latency associated peptide“ (LAP) vom latenten TGF- $\beta$ -Komplex führen, wodurch die Aktivierung des profibrotischen Cytokines erfolgt (Letterio et al., 1997, Kolb et al., 2003). Für die strahleninduzierte Aktivierung des latenten TGF- $\beta$  wird ein oxidativer Mechanismus, über freie Radikale

vermittelt, angenommen, die sich unter Einwirkung ionisierter Bestrahlung bilden (Barcellos-Hoff et al., 1994). Durch diese „kontrollierte“ Cytokinaktivierung wird eine dem Ausmaß des gesetzten Gewebsschadens adäquate Cytokinwirkung generiert. Letztlich erfüllt das aktivierte TGF- $\beta$  die Rolle eines „Effektors“, welcher auf verschiedenen Ebenen in den EZM-Metabolismus mit dem Ergebnis einer gesteigerten EZM- Matrixproduktion eingreift. Zum einen bewirkt TGF- $\beta$  eine verstärkte Genexpression der Matrixproteine (Tremblay et al., 1995). Weiterhin wird die Aktivität spezieller Enzymkomplexe, sogenannter Matrix-Metalloproteinasen, die für den Abbau der Matrixproteine verantwortlich sind, gemindert. Zudem wird die Produktion von Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen, sogenannter „Tissue inhibitors of Matrixmetalloproteinasen“ (TIMP) gesteigert (Shi et al., 1990, Lafuma et al., 1994, Knittel et al., 1998). Zudem kann TGF- $\beta$  weitere fibrotische Faktoren wie FGF, PDGF, CTGF induzieren (Kolb et al., 2003).

Einige pathophysiologische Abläufe können - möglicherweise dosisabhängig - zu einer Entkoppelung des räumlichen und zeitlichen Zusammenhanges zwischen gewebsschädigendem Reiz und TGF- $\beta$ -Aktivierung und der hierdurch vermittelten vermehrten Sekretion der Extrazellulärmatrixproteine führen. Zum einen ist bekannt, daß Fibroblasten durch die direkte Wirkung von TGF- $\beta$  zur Selbstinduktion dieses Cytokines veranlaßt werden können. Dieser Mechanismus ist als Autoinduktion der Fibroblasten bekannt (Kelley et al., 1993, Kolb et al., 1999).

Darüberhinausgehend ist bekannt, daß nach Einwirkung ionisierender Strahlung bereits aktiviertes TGF- $\beta$  freigesetzt werden kann (Barcellos-Hoff et al., 1994). Des weiteren könnte durch den bereits dargestellten permanenten Mechanismus einer durch TGF- $\beta$  in Gang gesetzten terminalen Differenzierung von Fibroblasten und der damit einhergehenden relativ gesteigerten Sekretionsleistung eine Amplifizierung der oben genannten Effekte ergeben (Rodemann et al., 1995/96, Lara et al., 1996).

In der Summe könnten diese Abläufe, unter Umgehung einer lokal und zeitlich begrenzten Aktivierung des TGF- $\beta$  gemäß des beschriebenen Sensormodells zu einer permanent erhöhten Sekretionsrate führen. Hierdurch könnten lange nach Wegfall des auslösenden Stimulus profibrotische Prozesse dauerhaft etabliert werden.

#### **4.4 Fibronectin- und Prokollagen-Sekretion fetaler humaner Lungenfibroblasten nach Anwendung ionisierender Strahlung**

Ein weiteres Untersuchungsziel dieser Arbeit war es zu bestimmen, inwieweit die ECM-Sekretion bestrahlter kultivierter Fibroblasten isoliert von Einflüssen fremder Zellgruppen (z.B. von Entzündungszellen) beeinflusst wurde. Zu diesem Zweck wurden die Konzentrationen von Procollagen-I-Peptid und Fibronectin als „repräsentative“ Vertreter der Extrazellulärmatrixproteine im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Kollagene stellen den Hauptanteil der EZM des interstitiellen Raumes und bilden gewissermassen ein „Grundgerüst“, welches zu einem wesentlichen Anteil die Elastizität und Stabilität dieses Kompartimentes bedingt und darüberhinausgehend die Anbindung vieler Struktur- und Funktionsproteine ermöglicht. Wichtige Beispiele sind die Anbindung des latenten TGF- $\beta$ -Proteinkomplexes an die Kollagenmatrix oder an das Fibronectin (Prockop et al.,1979). Das letztgenannte Matrixprotein ist ein hochmodulares, multimeres Glykoprotein, welches ubiquitär im Interstitium zu finden ist. Es verfügt auf Grund seiner Struktur über ein weites Funktionsspektrum und ist u.a. für eine suffiziente Zell-Adhäsion bedeutsam (Roman et al., 1997). Da sich zum einen eine erhöhte m-RNA-Synthese der von uns untersuchten Sekretionsprodukte Procollagen-I-Peptid und des Fibronectin nicht in nennenswertem Maß in normalem Lungengewebe finden lässt ( Broekelmann et al.,1991 ) und sich zum Anderen in fibrosierten pulmonalen Geweben signifikant gesteigerte P-I-P und FN Syntheseraten nachweisen lassen (Prockop et al.,1979, Bateman et al.,1981), können diese gewissermassen als „Fibrosemarker“ gelten.

In unserem Versuchsaufbau zeigte sich unter der Anwendung verschiedener Strahlendosen ( 0 [unbehandelte Kontrollgruppe ] ; 4,5; 7,5 ; 10,5 Gy) eine dosisabhängig gesteigerte Sekretionsrate des P-I-P. Dabei war auffällig, daß das jeweilige Sekretionsmaximum mit steigender angewandter Dosis jeweils zu einem späteren Meßzeitpunkt auftrat (siehe Abb. 4a und Tab.1 /S.19). So fand sich für die mit 4,5 Gy behandelten Zellen ein Maximum der Sekretionsrate am 6. Tag mit einem etwa 4-fach erhöhten Wert im Vergleich zur basalen Sekretionsrate der unbehandelten



Zellen. Bei Betrachtung der mit 7,5 Gy bestrahlten Zellen lag das Sekretionsmaximum am 9. Tag etwa um den Faktor 5 höher und für die mit der Dosis von 10,5 Gy behandelten Zellen lag das Sekretionsmaximum am 12. Tag etwa 9-fach höher als die basale Sekretionsrate. ( Als Bezugswert wurde die Sekretionsrate der unbehandelten Zellen am Tag 0 gewählt, da im Verlauf des Untersuchungszeitraumes eine kontinuierlich abfallende Tendenz aller Sekretionsraten zu beobachten war, die vermutlich auf eine Kontaktinhibition und eine vermehrte „ Konkurrenz“ der Zellen um die zur Verfügung stehenden Nährstoffe in der relativen räumlichen Enge der Kulturschale begründet war, sodaß hierdurch sekundär das Sekretionsvermögen der Zellen eingeschränkt gewesen sein könnte). Darüberhinausgehend zeigte ebenso ein tageweiser Vergleich der Versuchsbedingungen eine Dosisabhängigkeit der Sekretionsrate, wobei die Unterschiede hierbei nicht für alle Versuchsbedingungen statistisch signifikant waren ( siehe Abb. 4b., der U-Test nach Mann Whitney ergab für den Vergleich 0 Gy vs. 7,5 Gy  $p=0,045$  (\*); 0 Gy vs. 10,5 Gy  $p=0,0049$  (\*\*\*) ; 4,5 Gy vs. 10,5 Gy  $p=0,013$  (\*\*\*)). An den Tagen 12-15 fielen die Werte wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Interessanterweise bildeten die mit der Höchstdosis von 10,5 Gy bestrahlten Zellen eine Ausnahme, da ihre Kollagensyntheserate dauerhaft über dem Ausgangsniveau gesteigert blieb. Bei Betrachtung der FN -Sekretionsraten ergaben sich interessante Parallelen (siehe Abb. 5a und Tab. 2). So offenbarten die statistischen Analysen, daß mit Ausnahme des Vergleiches der Dosisstufen 7,5 Gy und 10,5 Gy, dosisabhängig signifikant gesteigerte FN- Sekretionsraten auftraten. (siehe Abb. 5a.b., der durchgeführte U- Test Mann Whitney ergab für den Vergleich 0 Gy vs 4,5 Gy  $p=0,09$  0 Gy vs. 7,5 Gy  $p=0,03$  (\*) ; 0 Gy vs. 10,5 Gy  $p=0,008$  (\*\*) ; 4,5 Gy vs. 10,5 Gy  $p=0,02$  (\*), 7,5 Gy vs. 10,5 Gy  $p=0,29$ ). Das Sekretionsmaximum aller Dosisstufen (mit Ausnahme der unbehandelten und der mit der Höchstdosis bestrahlten Zellen) lag um den 6. Tag. Für die Dosisstufen 0-7,5 Gy wurde das Niveau der Basalwerte zwischen dem 12.-15. Tag wieder erreicht. Bemerkenswert war, daß analog zum P-I-P-Sekretionsverhalten, die Fibronectinsyntheserate der mit 10,5 Gy behandelten Zellen ebenfalls weiterhin erhöht blieb, ohne (innerhalb des Untersuchungszeitraumes) auf das Ausgangsniveau zurückzukehren ( siehe Abb. 5a).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen werden durch die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen unterstützt. Im Tierversuch war zu beobachten, daß bereits wenige Stunden nach akuter Lungenschädigung durch verschiedenste auslösende Agenzien insbesondere der Exposition von Rattenlungen gegenüber ionisierender Strahlung die m-RNA- Genexpression für Fibronectine signifikant gesteigert war (Finkelstein et al., 1994, Rubin et al., 1992, Bjermer et al., 1992, Lafuma et al., 1987, Maasilta et al., 1991, Rhagow et al., 1985 ). Analog ließ sich im Tierversuch nach thorakaler Bestrahlung von Ratten während der ersten 14 Tage erhöhte m-RNA- Synthese von P-I-P nachweisen (Finkelstein et al., 1994, Rubin et al., 1995). Dies ist insofern interessant, da histopathologisch eine Deposition von Extrazellulärprotein im Lungeninterstitium nach Bestrahlung erst nach ca. 6 Monaten nachweisbar war (Finkelstein et al., 1994). Diese Daten weisen darauf hin, daß vermutlich auch während der - klinisch stummen - Latenzphase kontinuierlich Veränderungen des Kollagenumsatzes stattfinden, die prädisponierend für die Fibrose sein könnten.

Interessant in Hinblick auf den vorliegenden Versuchsaufbau war, daß ebenso wie in den genannten tierexperimentellen Arbeiten eine gesteigerte EZM-Matrixsekretion beobachtbar war, ohne daß diese durch z.B Entzündungszellen beeinflusst wurden. Daher mussten strahleninduzierte Veränderungen der Fibroblasten selbst hierfür verantwortlich sein. Da bereits, wie oben erwähnt, binnen Stunden und Tagen, signifikante Sekretionssteigerung beobachtet wurden, vermuten wir, daß neben dem mit einer größeren zeitlichen Latenz verbundenen Vorgang der strahleninduzierten terminalen Differenzierung und der hierdurch bedingten Sekretionssteigerung weitere gleichsinnige, mit geringer oder fehlender Latenz ablaufende Prozesse eine Rolle spielen.

Beobachtungen im Rahmen von Zellkulturexperimenten boten Hinweise in diese Richtung. Sie zeigten, daß der Zusatz von TGF- $\beta$  zu Fibroblasten die Synthese von P-I-P steigerte (Griffin et al., 1993). Ähnliche Resultate berichteten weitere Arbeitsgruppen wonach die Stimulation von Fibroblasten durch TGF- $\beta$  neben einer verstärkten Produktion von Kollagen auch zu einer gesteigerten Fibronectinsekretion führte (Raghu et al., 1989, Varga et al., 1987). In weiterführenden Untersuchungen

konnte nachgewiesen werden, daß hohe TGF- $\beta$ -Spiegel zu einer erhöhten Genexpression der EZM-Proteine führten ( Shi et al., 1990, Lafuma et al., 1994, Knittel et al., 1998). Weitergehend wurde vermutet, daß die beobachteten Anstiege der EZM-Matrixproduktion der Fibroblasten nach Bestrahlung durch die Freisetzung/Aktivierung von TGF- $\beta$  zu erklären waren, da man beobachtete, daß erhöhte TGF- $\beta$ -Spiegel in engem zeitlichen Aufeinadertreffen mit EZM nach Bestrahlung auftraten. So konnte in Tierversuchen gezeigt werden, daß nach thorakaler Bestrahlung von Mäusen ( Populationslinie C57 BL/6 ;angewandte Strahlendosen 5 und 12,5 Gy) parallelgehend zu der bereits am ersten Tag gesteigerten m-RNA von Kollagen, auch signifikante Anstiege der m-RNA von TGF- $\beta$  beobachtet werden konnten ( Finkelstein et al.,1994, Border et al., 1994).

Zusammenfassend lassen diese Beobachtungen vermuten, daß die EZM-Sekretion humaner Lungenfibroblasten nach Bestrahlung in erster Linie durch TGF- $\beta$  vermittelt wird.

Bezogen auf die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit fanden sich interessante Parallelen. Auffallend war das jeweils abweichende Verhalten der mit der Höchstdosis von 10,5 Gy behandelten Zellen, deren FN und P-I-P Sekretionsraten ( in Analogie zu dem TGF- $\beta$ -Sekretionsverhalten der Dosisstufe 10,5 Gy ) während des Untersuchungszeitraumes jeweilig permanent erhöht blieben. Dieses Verhalten könnte Folge der oben beschriebenen Prozesse sein, die vermutlich dosisabhängig in ihrer gemeinsamen Endstrecke, mutmaßlich über eine gesteigerte TGF- $\beta$ -Expression und Aktivierung, zu einer Perpetuierung der Extracellulärproteinsekretion führten. Die Funktionen der genannten Extracellulärproteine beschränken sich allerdings nicht auf die bloßer „passiver“ Endprodukte. Vielmehr scheinen sie in ein Netzwerk bisher nur zum Teil verstandener komplexer Rückkopplungsmechanismen eingebunden zu sein. Beispielsweise war bekannt, daß Fibronectine auf Fibroblasten direkt sekretionssteigernd wirken konnten (Roman et al., 1997). Des weiteren wirken PIP- und FN-Fragmente chemotaktisch auf Fibroblasten (Movsas et al.,1997; Kolb et al., 2001 ).

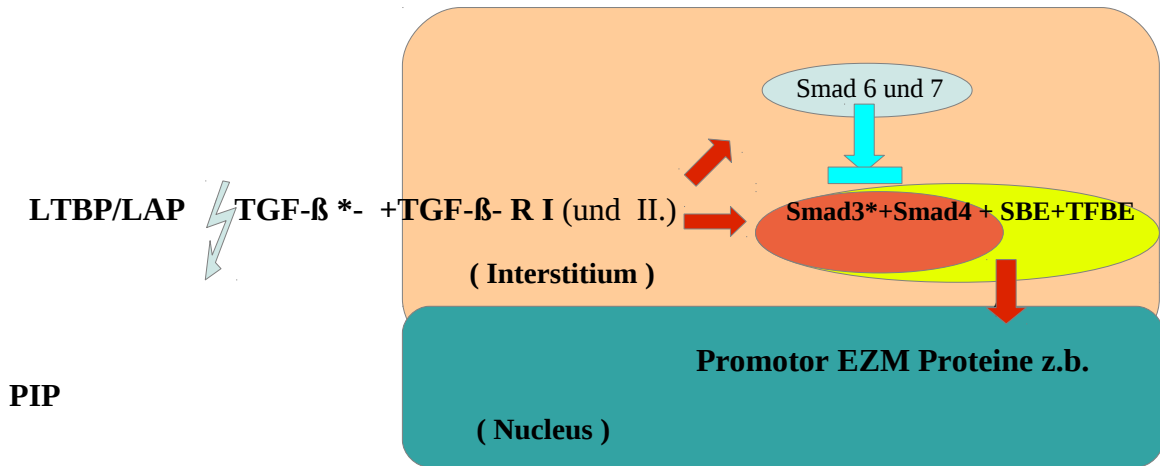
Zusammenfassend zeigten unsere Experimente, daß Fibroblasten nach Bestrahlung, auch ohne Aktivierung durch Entzündungszellen verstärkt Extracellulärmatrrixproteine bilden können.

#### **4.4.1 Signalkaskaden unterhalb der membranständigen TGF- $\beta$ -Rezeptoren**

Der Zusammenhang zwischen TGF- $\beta$ -Aktivierung, Ausschüttung und Sekretion der untersuchten EZM-Proteine wird durch die Betrachtung einiger der unterhalb des TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplexes ablaufenden Signalkaskaden deutlich. Bei der Vermittlung der Genexpression von Kollagen und Fibronectin werden unterschiedliche Signalwege beschrieben. Abbildung 9 zeigt beispielhaft den für die TGF- $\beta$ -abhängige Genexpression des u.a. für P-I-P gültigen Signalweg. Die TGF- $\beta$ -induzierte P-I-P-Genexpression wird intrazellulär über sogenannte smad- Proteinkaskaden befördert. Der hierin einbezogene integrale Smad 3/ Smad 4-Kinase-Komplex kann über weitere vermittelnde Proteine (Smad bindenes Element ( SBE ) sowie das Transkriptions- Faktor bindene Element (TFBE)) mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren und das „Ablesen“ der kodierenden Gensequenzen bewirken.

Dahingegen wird die TGF- $\beta$ -induzierte Fibronectinsynthese über einen sogenannten c-Jun N-terminal Kinase-abhängigen, Smad 4-unabhängigen Signalweg erreicht ( Hocevar et al., 1999 ). Die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) repräsentiert ein Mitglied aus der Familie der sogenannten mitogen- aktivierten Protein Kinasen (MAPK) ( Leask et al.,2004 ).

Die Signaltransduktion der verschiedenen Signalwege verläuft jedoch nicht isoliert voneinander ab. Vielmehr erfolgt eine Modulation der Signalweitergabe innerhalb der Signalkaskaden selbst und durch Einflussnahme benachbarter Signalwege. So wird beispielsweise der Ablauf des smad- abhängigen Signalweges eng durch die Aktivität der MAPK kontrolliert. Darüberhinausgehend ergeben sich vielfältige positive wie negative Rückkopplungsmechanismen.



**Abb. 9.** Schematische Darstellung des smad-abhängigen Signalweges der auch als profibrotische Cytokinkaskade bezeichnet wird nach Aktivierung der TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II ( Abtrennen des LTBP/LAP Proteinkomplexes) erfolgt die Phosphorylierung des Smad 3-Proteines, welches seinerseits mit Smad 4 interagiert. Nach Reaktion mit dem Smad-bindenden Protein (SBE) erfolgt die Translokation in den Nucleus der Zelle, die Aktivität des entstandenen Smad/ SBE-Komplexes wird durch andere Signalkaskaden in Abhängigkeit vom jeweiligen Promotor modifiziert. Im nächsten Schritt erfolgt die vermehrte Genexpression des Zielproteines nach Bindung an das sogenannte Transkriptionsfaktor bindende Element (TFBE) . Die ebenfalls TGF- $\beta$ -induzierten Smad 6 und 7 verhindern -im Sinne einer negativen Rückkopplung- die Smad 3-Phosphorylierung. Legende: Blitzsymbol; Proteinolyse des latenten TGF- $\beta$ -Komplexes ,rote Pfeile; smad-abhängige Aktivierungskaskade, blauer Pfeil Hemmung durch i-Smad-Proteine

Beispielsweise kommt eine negative Rückkopplung innerhalb der Smad- abhängigen Signalkaskade durch die Wirkung der sogenannten inhibitorischen Smad-Proteine ( Smad 6 und 7) zustande, welche die Aktivität des smad 3-Proteines verringern. Die Produktion dieser auch kurz „i- smads“ genannten Proteine wird ebenso direkt durch die TGF- $\beta$ -Rezeptoraktivierung bewirkt. Jenseits dessen kommt es durch direkte TGF- $\beta$ -Wirkung zu einer Prostacyclinaktivierung, welche seinerseits Signalkakaskaden in Gang setzt, die die Wirkung des Smad – abhängigen Signalweges abschwächen ( Leask et al.,2004 ).

Ein wichtiges Beispiel einer TGF- $\beta$ -induzierten positiven Rückkopplung ist die Genexpression des Connective tissue growth factor (CTGF), welche ebenfalls über den smad-abhängigen Signalweg vermittelt wird. Hierbei handelt es sich um ein Cytokin, welches die profibrotischen Wirkungen des TGF- $\beta$  verstärkt und prolongiert. So zeigte

sich in vivo Experimenten an Mäusen, daß nach s.c. Koinjektion von CTGF und TGF- $\beta$  eine persistente, über Wochen nachweisbare, fibrotische Gewebsreaktion zeigte, wohingegen dieser Effekt nach Applikation der Einzelsubstanzen nur transient beobachtbar war. Den Beleg für den direkten Zusammenhang erbrachten Experimente, daß in vitro unter Zugabe neutralisierender Antikörper spezifisch für recombinates CTGF ein signifikanter Rückgang der EZM-Produktion insbesondere der Kollagen- und FN-Produktion beobachtbar waren ( Kolb et al., 2003). CTGF kann demnach als nachgeordneten Mediator einiger der profibrotischen Wirkungen des TGF- $\beta$  betrachtet werden ( Kolb et al., 2003).

Ein weiteres Beispiel einer wichtigen positiven Rückkopplung hinsichtlich der profibrotischen Wirkungen des TGF- $\beta$  ist die Induktion von ED-A-Fibronectin, einem durch alternatives Splicing entstandenen FN-Isoform, welche via Induktion des alpha-SM-Aktin für die Expression von P-I-P-Kollagen obligat scheint, da gezeigt werden konnte, daß unter Inkubation von Fibroblasten mit Anti-ED-A-FN-Antikörpern die TGF- $\beta$ -induzierte P-I-P-Sekretion komplett erliegt ( Leask et al., 2004). Hierdurch wird deutlich, daß den entstandenen EZM-Proteinen mitunter nicht nur die Rolle „bloßer Endprodukte“ zukommt, sondern diese vielmehr in die komplexe Signalverarbeitung eingebunden sind. Darüberhinausgehend könnten sich in Zukunft aus der Kenntnis der diversifizierten Signaltransduktion des Cytokines TGF- $\beta$  kombinierte Angriffspunkte antifibrotischer Therapiestrategien ergeben, die es ggf. ermöglichen hochselektive und auf Grund dessen möglichst nebenwirkungsarme antifibrotische Behandlungsansätze zu entwickeln ( Leask et al., 2004).

#### **4.5. Aussichten zukünftiger Prävention und Therapie**

Da TGF- $\beta$ -Anstiege nach Bestrahlung im Gewebe zu den frühesten Erscheinungen gehören und insbesondere vor histologisch manifesten Veränderungen auftraten (Finkelstein et al., 1994), wurde vermutet, daß die Bestimmung von TGF- $\beta$ -Serumspiegeln möglicherweise ein Mittel sein könnte, die Gefahr des Auftretens eines fibrotischen Gewebsumbaues z.B. der Lunge zu erfassen (Gauldie et al., 1993, Kovacs et al., 1994, Langberg et al., 1994, Randell et al., 1995, Yi et al., 1996).

Klinische Arbeiten, die Serumspiegel von Patienten untersuchten, die an einem Lungen-Ca erkrankt waren und eine thorakale Strahlentherapie erhalten hatten konnten zeigen, daß initial erhöhte TGF- $\beta$ -Serumwerte sehr eng mit der Gefahr des Auftretens einer symptomatischen Strahlenpneumonitis korrelierten (Anscher et al., 1994, Rube et al., 2004).

Dies erlaubt möglicherweise die Entwicklung einer radiogenen Lungenschädigung vorherzusagen (Rube et al., 2004). Jenseits dessen sind mutmaßlich wesentliche Risikofaktoren die totale angewandte Strahlendosis, die Dosis-Fraktionierung, frühere Strahlenbehandlung, frühere Chemotherapien (z.B. Bleomycin-, Doxorubicin-, Adriamycinhaltige Behandlungsschemata), vorbestehende Lungenerkrankung (z.B. chronisch pulmonales Emphysem, Pneumokoniose, abgelaufene Lungentuberkulose), höheres Patientenalter (> 70 Jahre) (Movsas et al., 1997, Höller et al., 2007).

Zukünftige Therapiestrategien könnten sich aus der gezielten Antagonisierung relevanter extra- und intrazellulärer TGF- $\beta$ -Zielstrukturen ergeben. In diesem Zusammenhang wird in experimentellen Arbeiten der Effekt von TGF- $\beta$ 1-Antikörpern (Hakenjos et al., 2004), die Wirkung des natürlich im Gewebe vorhandenen TGF- $\beta$  Antagonisten Decorin untersucht (Kolb et al., 2001). So wurde in experimentellen Arbeiten die potentiell therapeutische Wertigkeit des Protease-Inhibitors Amifosine (Vujaskovic et al., 2002), von Anti-TGF- $\beta$ -Antikörpern (Hakenjos et al., 2000), des natürlicherweise im Gewebe vorkommenden Proteoglykans und TGF- $\beta$ -Inhibitors Decorin (Kolb et al., 2001), sowie Kinase-Inhibitoren, die die intrazelluläre Signalkaskade des TGF- $\beta$  über smad-Proteine antagonisieren (Wegman et al., 2007)

untersucht. Möglicherweise eröffnet sich hierdurch ein breites Feld zukünftiger therapeutischer Interventionsmöglichkeiten.

## **5. Zusammenfassung**

Die Entwicklung einer strahleninduzierten Lungenfibrose nach Strahlentherapie thorakaler Malignome bezeichnet unverändert ein sehr ernstes klinisches Problem. Die Entwicklung einer Lungenfibrose ist im Allgemeinen als Endstrecke einer Reihe verschiedener Erkrankungen anzusehen. Daraus ergibt sich ein starkes Interesse an der Aufklärung der pathogenetischen Zusammenhänge der pulmonalen Fibroseentstehung. Toxische, infektiöse oder immunologische Schädigungsmechanismen können eine Lungenfibrose auslösen. Die Noxen können inhalativ oder systemisch über die Blutbahn in die Lunge gelangen ( Costabel et al., 2003 ).

Im Rahmen unserer Experimente untersuchten wir das Wachstums- und Sekretionsverhalten fetaler humaner Lungenfibroblasten in Zellkultur nach Anwendung ionisierender Strahlung in Hinsicht auf deren Bildung der Extrazellulämatrixproteine Prokollagen-I-Peptid und Fibronectin und TGF- $\beta$  als wichtigem profibrotischem Cytokin.

Im Ergebnis fand sich, das Proliferationsverhalten betreffend, eine dosisabhängige Reduktion der Wachstumsrate, die nicht durch einen etwaigen strahleninduzierten Zelltod, sondern vermutlich durch die Induktion der terminalen Differenzierung von prämitotischen Fibroblasten hinzu postmitotischen Fibrozyten hervorgerufen worden war.

Dieser Mechanismus wurde von vielen Untersuchungsgruppen beschrieben und wird als ein wichtiges Schlüsselereignis im Verlauf der Fibroseentwicklung gewertet

Bedeutsam ist hierbei der resultierende relative Zuwachs teilungsunfähiger Zellen, welche zu einer verminderten Regenerationsrate der Gesamtzellpopulation führt.

Darüber hinausgehend kommt es durch eine im Vergleich deutlich höhere Sekretionsrate der postmitotischen Zellen auch zu einem Anstieg der Rate sezernierter EZM- Matrixproteine.



Hierzu passend zeigten sich in unseren Untersuchungen, dosisabhängig um ein mehrfaches gesteigerte Mediumspiegel sowohl des Procollagen-I-Peptides als auch des Fibronectin. Dies geht zum Teil auf den oben genannten Mechanismus zurück, zum anderen aber auf eine direkt strahleninduzierte Sekretionssteigerung. Beide strahlenbedingten Ereignisse werden durch TGF- $\beta$ -assoziierte Signalkaskaden bewirkt. Im Falle der kurzfristigen direkten Sekretion der Extracellulärmatrixproteine kommt es nach Aktivierung des membranständigen TGF- $\beta$ -Rezeptorenkomplexes zu einer Signalübermittlung über nachgeschaltete intrazelluläre Smad-Enzym-Komplexe. Eine hierdurch vermittelte gesteigerte m-RNA-Synthese der EZM-Matrixproteine bewirkt eine gesteigerte Proteinsekretion.

Hinsichtlich des Mechanismus der terminalen Differenzierung bewirkt TGF- $\beta$  auf Zellzyklus -Ebene einen Zellzyklus – Arrest welcher sowohl über eine P21-abhängige als auch unabhängige intrazelluläre Enzymkaskade vermittelt wird. Zudem wird über TGF- $\beta$  die Freisetzung weiterer profibrotischer Cytokine wie FGF, PDGF und CTGF bewirkt ( Kolb et al., 2003).

Darüber hinausgehend verhindert TGF- $\beta$  den Abbau der EZM-Matrixproteine durch Hemmung der dafür verantwortlichen Enzymkomplexe, sogenannter Matrix-Metallo-Proteinasen. Alle genannten Wirkungen des TGF- $\beta$  können in ihrer Endstrecke zu einer ungehinderten Akkumulation von Matrixproteinen im interstitiellem Raum führen. Daher kommt dem Aktivierungsmechanismus des Cytokines TGF- $\beta$  die Bedeutung eines wichtigen Regulatives zu, um ein unkontrolliertes Ablaufen dieser Prozesse verhindern. Der an die EZM-Matrixproteine gebundene latente TGF- $\beta$ -Komplex kann funktionell mit einem kombinierten Detektor/Effektor-System verglichen werden, dessen Aufgabe es ist, einen eingetretenen Gewebsschaden unabhängig von der zu Grunde liegenden Ursache zu „registrieren“ und nach resultierender Aktivierung des TGF- $\beta$  eine „ Antwort zu formulieren“ (Akkumulation von Matrixproteinen), um einer einsetzenden strukturellen Desintegration des Gewebes zu begegnen. Nach Eintritt eines strahleninduzierten Gewebsschadens wird die oben beschriebene „geordnete“ Cytokinaktivierung jedoch durch verschiedene Prozesse unterlaufen. Zum einen wird durch eine auto- und parakrine Selbstinduktion des TGF- $\beta$  zusätzlich dessen Sekretion

gesteigert. Zum anderen sezernieren die Fibroblasten in dieser Situation bereits aktiviertes TGF- $\beta$ , wodurch eine übermäßige Reaktion hervorgerufen werden kann.

Auf Grund der vermuteten Schlüsselstellung des Cytokines TGF- $\beta$  im Rahmen der Fibrogenese setzen viele experimentelle Therapiestrategien darauf, dessen Wirkungen zu antagonisieren. Möglicherweise könnten sich daraus in Zukunft einige gangbare Behandlungsoptionen entwickeln.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Akamine A, Raghu G, Narayanan AS. Human lung fibroblast Sub populations with different C1q Binding and functional properties Am. J. Respir Cell Mol. Biol (1992) Vol. 6. S. 382-389
2. Alevizopoulos A., Mermod N., Transforming growth factor-beta: the breaking open of a black box. Bioessays (1997) 19(7); S. 581-91.
3. Annes J.P., Munger J.S. , Rifkin D.B. , Making sense of latent TGF- $\beta$  activation; Journal of Cell Science (2003) 116, S. 217-224
4. Anscher MS, Kong FM, Andrews K, Clough R, Marks L, Bentel G, Jirtle RL. Plasma TGF $\beta$ 1 as a predictor of radiation pneumonitis (Abstract).: Int J Radiat Oncol Biol Phys (1997) 39 : S. 197
5. Anscher MS, Murase T, Prescott DM, Marks LB, Reisenbichler H, Bentel GC, Sherouse G, Jirtle RL. Changes in plasma TGF $\beta$  levels during pulmonary radiotherapy as a predictor of the risk of developing radiation pneumonitis. Int J Radiat Oncol Biol Phys (1994) 30 : S. 671-676
6. Anscher MS, Peters WP, Reisenbichler H, Petros WP, Jirtle RL. TGF- $\beta$  as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. N Engl J Med (1993) 328 : S.1592-1598
7. Barcellos-Hoff M. H., Derynck R., Tsang M. L. , Weatherbee J. A. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. J Clin Invest. (1994) February; 93(2): S. 892–899.

8. Bateman, E., M. Turner-Warwick, and B. C. Adelman-Grill..  
Immunohistochemical study of collagen types in human foetal lung and fibrotic lung disease. *Thorax* (1981) 36: S.645–653.
9. Bayreuther C, Rodemann HP, Francz PAL I, Maier K. Differentiation of fibroblast stem cells. In: *J. Cell Sci* (1988) Suppl 10 :S.115-130
10. Bégin R., Martel M., Desmarais Y., Drapeau G. , Boileau R. , Rola-Pleszczynski M. and Massé S. Fibronectin and pro collagen 3 levels in bronchoalveolar lavage of asbestos-exposed human subjects and sheep. *Chest* (1986) ; 89; S.237-243
11. Bentzen SM, Skoczylas JZ, Bernier J. Quantitative clinical radio-biology of early and late lung reactions. *Int J Radiat Biol* (2000) : 76(4) ; S.453-462
12. Bitterman PB, Rennard SI, Hunninghake GW, Crystal RG. Human alveolar macrophage growth factor for fibroblasts. Regulation and partial characterization. *J Clin Invest* (1982) 70 :S. 806-822
13. Bjermer L, Hällgren R, Nilson K, Franzen L, Sandström T, Särnstrand B, Henrikson R. Radiation-induced increase in hyaluran and fibronectin in BALF from breast cancer patients is suppressed by smoking. *Eur Respir J*(1992) 5 : S. 785-790
14. Border WA, Noble NA. Epstein F.H., Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N Engl J Med* (1994) 331 : S. 1286-1292
15. Burger A, Löffler H., Bamberg M., Rodemann H.P. Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int. J. Radiat. Biol.* (1998), Vol 73, No.4, S.401-408
16. Coker RK, Laurent GJ, Jeffery PK, du Bois RM, Black CM, McAnulty RJ. Localisation of transforming growth factor beta 1 and beta 3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax* (2001), 56 (7): S. 549-556
17. Costabel U., Guzman J. Lungenfibrosen Klassifikation, Diagnostik, Therapie; *Der Internist* (2003) [Suppl 1] 44: S35–S43
18. Cox, D. A., T. Maurer, Transforming growth factor- $\beta$ . *Clin. Immunol. Immunopathol.* (1997) 83 , S. 25-30
19. Elias JA, Zitnik RJ, Prabir R. Fibroblast immune effector function. In: Phibbs RB ed. *Pulmonary fibroblast heterogeneity*, CRC Press, Boca Raton, Florida (1992): S. 295-322

20. Finkelstein JN, Johnson CJ, Baggs R, Rubin P. Early alterations in extracellular matrix and TGF $\beta$  gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int J Radiat Oncol. Biol. Phys.* (1994) 28: S. 621-631
21. Gauldie J, Jordana M, Cox G. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Thorax* (1993) 48 : S. 931-935
22. Gauldie J, Jordana M, Cox G, Ohtoshi T, Dolorich J, Denburg J. Fibroblasts and other structural cells in airway inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* (1992) 145 : S. 14-17
23. Gauldie J, Kolb M, Sime PJ. A new direction in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir. Res.* (2002) 3(1):S. 1-9
24. Gressner AM. Mediators of hepatic fibrogenesis. *Hepatogastroenterology* (1996) 43(7) : S. 92-103
25. Griffin M, Bhandari R, Hamilton G, Chan YC, Powell JT. Alveolar type II cell-fibroblast interactions, synthesis and secretion of surfactant and type I collagen. *Journal of Cell Science* (1993) 105 : S. 423-432
26. Haase O., Rodemann H. P. Fibrosis and cytokine mechanisms: Relevant in hadron therapy? *Radiotherapy and Oncology Elsevier* (2004), Volume 73, Issue 0, S.144-S.147
27. Hakenjos, L.; Bamberg, M.; Rodemann, H.P.: TGF-beta 1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype, *International Journal of Radiation Biology* (2000), Vol. 76 Nr. 4, S. 503-509.
28. Herskind C, Bamberg M, Rodemann HP. The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* (1998 ), 174(3), S. 12-15
29. Hocevar, B.A. ; Brown T. L. ; Howe, P.H. ; TGF- $\beta$  induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway; *The EMBO Journal* (1999 ) Vol. 18 No.5 S.1345-1356,
30. Höller U.,Feyer P.: Pneumotoxizität unter Strahlentherapie; *Im Focus Onkologie* (2007) 9,S.61-67
31. Jordana M, Kirpalani H, Gauldie J. Heterogeneity of human lung fibroblast proliferation in relation to disease expression. *Am Rev Respir Dis* (1988) 137: S. 579-584

32. Jordana M, Särnstrand B, Sime PJ, Ramis I. Immune inflammatory function of fibroblast. *Eur Respir* (1994) J 7 : S. 2212-2222
33. Jordana M, Schulman J, McSharry C, Irving LB, Newhouse MT, Jordana G, Gauldie J. Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. *Am Rev Respir Dis* (1988) 137: S. 579-584
34. Kelley J, Shull S, Walsh JJ, Cutroneo KR, Absher M. Auto-induction of transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* (1993); 8: S. 417-424.
35. Knittel T, Saile B., Ramadori G. Fibrogenese. *Internist* (1998) 39 : S. 238-246
36. Kolb, Martin; Margetts, Peter J.; Galt, Tom u.a.: Transient transgene expression of Decorin in the lung reduces the fibrotic response to Bleomycin, *Am. J. Respir. Crit.Care Med.* (2001) Vol. 163,S.770-777.
37. Kolb M, Schmidt M. The role of cytokines and growth factors in fibroproliferative lung disease. *Pneumologie* (2003) 57 , S. 91-97
38. Kolb M, Willner J, Koberlein E, Hoffmann U, Kirschner J, Flentje M, Schmidt M. Autokrine Aktivierung von Fibroblasten nach Bestrahlung. *Pneumologie* (1999) 53 : S. 296-301
39. Kolb M, Wruck R, Rollin J, Kirschner J, Willner J & Schmidt M Lung fibroblasts produce high amounts of fibronectin after irradiation. *Am J Respir Crit Care Med*(1998) 157: A 846
40. Kolb M., Wruck R., Rollin J, Kirschner J, Willner J, Schmidt M. Wachstums und Sekretionsverhalten fetaler Lungenfibroblasten nach Bestrahlung. *Pneumologie* (1998) 52 : S. 35
41. Lafuma C, Wegrowski J, Labat-Robert J, Legendre N, Metivier H, Masse R. Parallel increase of plasma fibronectin and perchlorosoluble serum glykoproteins in radiation-induced lung damage. *Clin Physiol Biochem* (1987) 5 :S. 61-69
42. 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), S. 683-692

43. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. Eur Cytokine Netw. (1996):S. 363-374.
44. Leask A, Abraham D. J. ;TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response The FASEB Journal, (2004) Vol. 18,, S. 819-820
45. Letterio JJ, Roberts AB. TGF- $\beta$  : a critical modulator of immune. cell function. Clin. Immunol Immunopathol.(1997) 84 : S. 244-250
46. Limper AH, Roman J. Fibronectin: a versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection. Chest (1992)101 : S.1663-1673
47. Lorenz HM, Kalden JR. Zytokine und Mediatoren als therapeutische Ansatzpunkte. Internist (1999 ) 40:S. 945-950
48. Low RB, Michael S, Giancola, King TE,JR., Chapitis J, Vacek P, Davis GS. Serum and bronchoalveolar lavage of n-terminal type III procollagen peptides in idiopathic pulmonary fibrosis. In: Am Rev Respir Dis (1992), 146: S. 701-706
49. Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta-1 and radiation fibrosis: a master switch an a specific therapeutic target? Int J Radiat Oncol Biol Phys (2000 ); 47(2): S. 277-290
50. Movsas B, Raffin TA, Epstein AH, Link CJ, Pulmonary radiation injury. (1997) Chest 111 : S. 1061-1076
51. Pickrell JA, Abdel-Mageed AB: Radiation induced pulmonary fibrosis; In Pulmonary Fibrosis; Phan SH, Thrall RS eds. (Lenfant C, series ed; Lung Biology in Health and Disease), NY Marcel Dekker, Inc., New York,(1995); 80: S. 363-381.
52. Prockop, D., K. Kivirikko, L. Tuderman, and N. Guzman.. The biosynthesis of collagen and its disorders. N. Engl. J. Med. (1979) 301: S. 13–23.
53. Raghov R, Lurie S, Seyer JM, Kang AH. Profiles of steady state levels of messenger RNAs coding for type I procollagen, elastin and fibronectin in hamster lungs undergoing bleomycin- induced interstitial pulmonary fibrosis. J Clin Invest (1985) 76 : S. 1733-1739
54. Raghu G, Masta S, Meyers D, Sampath Narayanan A. Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor-beta. Am Rev Respir Dis.(1989)140 : S. 95-100.

55. Rodemann HP, Binder A, Bamberg M. Radiation-induced fibrosis: experimental studies. In: Dunst J ed. et al., Late sequelae in oncology. Springer NY (1995): S. 93-97
56. Rodemann HP, Binder A, Burger A, Güven N, Löffler H, Bamberg M. The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Int*(1996) 49 : S. 32-36
57. 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, S. 37-43
58. Roman J, McDonald JA. Fibronectins and fibronectin receptors in lung development, injury and repair. In: Crystal RG ed. et al., *The Lung: Scientific foundations*. Lippincott-Raven. Philadelphia (1997): S. 737-755
59. Roswit B, White DC. Severe radiation injuries of the lung. *Am J Roentgenol* (1977)129: S. 127-136.
60. Rubin P, Finkelstein J, Shapiro D. Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes: interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*(1992) 24 : S. 93-101
61. 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 : S. 99-109
62. Rube CE, Uthe D, Schmid KW, Richter KD, Wessel J, Schuck A, Willich N, Rube C. Dose-dependent induction of transforming growth factor beta (TGF-beta) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2000); 47(4): S.1033-1042
63. Rube CE, Rodemann HP, Rube C. The relevance of cytokines in the radiation-induced lung reaction. *Experimental basis and clinical significance Strahlenther Onkol.* (2004 Sep);180(9):S. 541-9.
64. Selman M, King TE, Pardo A; Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing an evolving hypotheses about ist pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* (2001 ); 134(2): S. 136-151
65. Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung an other tissues: new concepts in pathogenesis an treatment. *Clin Immunol* (2001); 99 (3): S. 308-319

66. Tremblay GM, Jordana M, Gauldie J, Särnstrand B. Fibroblasts as effector cells in fibrosis. In: Pulmonary fibrosis. Lung biology in health and disease. Volume 80. Marcel Dekker NY ; New York (1995) S. 541-577
67. Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) causes a persistent increase in steady state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human fibroblast. *Biochem J* (1987) ; 247: S. 597-604.
68. Vujaskovic, Z., Marks, L.B., Anscher, M.S. The physical parameters and molecular events associated with radiation-induced lung toxicity. *Semin. Radiat. Oncol.* 10 (2000) :S. 296-307.
69. Vujaskovic Z., Feng Q-F, Rabbani Z., Anscher M. S., Samulski T. V., Brizel D. M. Radioprotection of Lungs by Amifostine Is Associated with Reduction in Profibrogenic Cytokine Activity *Radiation Research*, Vol. 157, No. 6 (Jun., 2002), S. 656-660
70. Wells R.G. Fibrogenesis.V.TGF- $\beta$  signaling pathways *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*(2000) 279: S.845-850 .
71. Wiegman E.,Blaese M.,Loeffler H.,Coppes R.,Rodemann H. TGF $\beta$ -1 dependent fast stimulation of ATM and p53 phosphorylation following exposure to ionizing radiation does not involve TGF $\beta$ -receptor I signalling *Radiotherapy and Oncology*, Volume 83, Issue 3 (2007), S. 289-295  
Elsevier



## **7. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	11
Abb. 2	Vergrößerte Aufsicht auf ein Zählgitter einer Fuchs- Rosenthal-Zählkammer	11
Abb. 3	Prinzip eines Sandwich-Elisa	12
Abb. 4a	Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der P-I-P-Sekretionsraten	19
Abb. 4b	Boxplot-Diagramm P-I-P-Sekretion	19
Abb. 5a	Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Fibronectin-Sekretionsraten nach Bestrahlung	20
Abb. 5b	Boxplot-Diagramm Fibronectin-Sekretion	20
Abb. 6a	Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der TGF- $\beta$ -Sekretionsraten	21
Abb. 6b	Boxplot-Diagramm TGF- $\beta$ -Sekretion	21
Abb. 7a	Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Zellzahlen nach Bestrahlung	22
Abb. 7b	Boxplot-Diagramm Verlauf der Zellzahlen	22
Abb. 8	Darstellung der intrazellulären p21-abhängigen Signalkaskade des TGF- $\beta$	30
Abb. 9	Schematische Darstellung des smad-abhängigen Signalweges nach Aktivierung der TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II	39

## **8. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1. Procollagen-I-Peptid-Sekretspiegel	19
Tabelle 2. Fibronectin-Sekretspiegel	20
Tabelle 3. TGF- $\beta$ -Sekretspiegel	21
Tabelle 4. Zellzahlen	22

## **9. Abkürzungsverzeichnis**

alpha -SM- Aktin : Isoform alpha-1-Skelettmuskulatur-Aktin

Anti-FN- AK: Anti-Fibronectin-Antikörper

Anti-P-I-P- AK : Anti-Procollagen-I-Antikörper

Aqua dest. : destilliertes Wasser

BALF: Broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit

CO<sub>2</sub> : Kohlendioxid

CTGF: Connective tissue growth factor

DME(M): Dulbeccos modified Eagle`s medium

DNase: Desoxyribonuklease

EZM: Extrazellularmatrix

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA: enzyme-linked immuno sorbent assay

FCS: fetal calf serum

FGF: fibroblast growth factor

FN: Fibronectin  
G1 Phase: G(rowth)1 Phase des Zellzyklus  
Gy: Gray  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Schwefelsäure  
HCL: Salzsäure  
Hepes-Puffer: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure  
Il: Interleukin(z.B.1,2,6,8)  
IPF: idiopathische Lungenfibrose  
i-smad Proteine : inhibitorische smad ; siehe smad Proteine  
JNK: c-Jun N-terminale Kinase  
kDA: kilo Dalton  
LAP: latency associated peptide  
LDH : Laktatdehydrogenase  
Lsg. : Lösung  
MAPK : mitogen- aktivierte Protein Kinasen  
MF (I,II,III): mitosefähige Vorläuferfibroblasten  
ml: Milliliter  
M: molar (Lsg.)  
MMP: Matrixmetalloproteinasen  
MRC-5: Eigennahme der verwandten Fibroblasten Zell-linie  
m-RNA: messenger-Ribonukleinsäure  
NAD /NADH +H Nicotinamidadeninucleotid  
NaOH: Natronlauge  
ng : Nanogramm  
nm : Nanometer  
N : normale (Lsg)  
P21: CDK-Inhibitor 1 Inhibitor;cyclin-abhängiger Kinasen  
p53: TP53-Tumorsuppressor-Gen Transkriptionsfaktor  
PBS : Phosphatgepufferte Salzlösung  
PDGF: Plateled derived growth factor

pg: Picogramm

P-III-P Procollagen-III-Peptid

P-I-P: Procollagen-I-Peptid

PMF: postmitotische Fibrocyten

POD : Peroxidase

Rb Protein : Retinoblastom-Protein

RPM : Umdrehungen pro Minute

SBE : Smad bindenes Element

smad : Kombination der Abkürzungen MAD; Drosophila protein „mothers against decapentaplegic“ und des homologen Proteines SMA von *C. elegans*.

S-Phase: Synthese Phase des Zellzyklus

s : Standardabweichung

TFBE: Transcriptions-Faktor bindenes Element

TGF- $\beta$ : Tumor-growth-Factor  $\beta$

TIMP: Tissue Inhibitor der Metalloproteinasen

U/min: Umdrehungen pro Minute

u : Variationskoeffizient

vs.: versus

$\mu$ l : Mikroliter

## **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, das Korrekturlesen sowie die Übernahme des Referates.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Kolb, derzeit Associate Professor der McMaster University für Pathologie und molekulare Medizin Hamilton, danke ich für die Betreuung der Arbeit, für die stets große Hilfsbereitschaft und Unterstützung und Beratung bei der konzeptionellen Planung der Arbeit sowie allen sonstigen aufkommenden inhaltlichen und formalen Fragen .

Herrn Prof. Dr. med. M. Flentje, Direktor der Klinik für Strahlentherapie, danke ich für die Möglichkeit die Einrichtungen seiner Klinik für die Bestrahlung der Zellkulturen nutzen zu können 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 Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit in der Phase der experimentellen Laborarbeit.

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

Meinen Eltern und meiner Lebenspartnerin Eka möchte ich mich für die stete Aufmunterung die Arbeit fertigzustellen bedanken.