

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I**

**der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Einfluss von TGF- $\beta$ - Antikörpern auf die strahlen-  
induzierte Kollagensynthese durch Lungenfibroblasten,  
Alveolarmakrophagen und HUVEC-Zellen**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Sandra Irma Schröter**

**aus Köln**

**Würzburg, Januar 2009**

Referent: Prof. Dr. med. M. Schmidt

Korefent: Prof. Dr. habil. Dr. med. M. Flentje

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Oktober 2009

Die Promovendin ist Ärztin.

Für meine Eltern



# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis .....	V
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das dynamische Gleichgewicht der Lungenmatrix</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Folgen einer Dysbalance</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Von der Strahlenpneumonie zur Strahlenfibrose</b>	<b>3</b>
<b>1.4 TGF- <math>\beta</math> als Schlüsselzytokin für die Entwicklung einer Strahlenfibrose</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Einflussbereiche von TGF- <math>\beta</math></b>	<b>7</b>
<b>2 Ziel der Untersuchung .....</b>	<b>11</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Gewinnung des Zellmaterials:</b>	<b>12</b>
3.1.1 Fibroblasten	12
3.1.2 Alveolarmakrophagen	12
3.1.3 HUVEC-Zellen	13
<b>3.2 Zellkultivierung</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Gewinnung konditionierter Medien</b>	<b>13</b>
<b>3.4 Herstellung der einzelnen Lösungen und Puffer</b>	<b>14</b>
3.4.1 Wachstumsmedium	14
3.4.2 Hungermedium	14
3.4.3 Labeling-Medium	14
3.4.4 TCP-Puffer	15
3.4.5 25mM NH <sub>2</sub> OH	15
3.4.6 NEM-Lösung	15
<b>3.5 Versuchsablauf:</b>	<b>15</b>
3.5.1 Versuchstag 1	15
3.5.2 Versuchstag 2	16

3.5.3	Versuchstag 3	16
3.5.4	Versuchstag 4	16
<b>4</b>	<b>Ergebnisse:</b>	<b>18</b>
4.1	<i>Fibroblasten:</i>	18
4.2	<i>Alveolarmakrophagen:</i>	20
4.3	<i>Huvec:</i>	22
<b>5</b>	<b>Diskussion:</b>	<b>25</b>
5.1	<i>Fazit:</i>	25
5.2	<i>Beziehung von TGF- <math>\beta</math> vor und nach Bestrahlung bezüglich der Ausprägung einer Lungenfibrose</i>	26
5.3	<i>TGF- <math>\beta</math>-Antikörper</i>	28
5.4	<i>Strahleninduzierte Zytokinproduktion durch den Tumor</i>	29
5.5	<i>Versuch der Modifikation der Zytokinexpression</i>	29
5.6	<i>Liposom Cu/Zn Superoxyd Dismutase (SOD) und Relevanz von ICAM-1</i>	30
5.7	<i>Zytoprotektive Substanzen</i>	31
5.8	<i>Therapie mit Kortikosteroiden</i>	31
5.9	<i>Transiente transgene Expression von Decorin zur Neutralisierung der Wirkung von TGF- <math>\beta</math></i>	32
5.10	<i>Diverse TGF-<math>\beta</math>- Inhibitoren</i>	33
5.11	<i>Huvec- Zellen als neuer Therapieansatz</i>	37
5.11.1	Hemmung der Gefäßneubildung	37
5.11.2	ZD6126 mit antivaskulärer- und antitumor- Aktivität	38
5.11.3	Einfluß von Lipoproteinen, VEGF, Plasminogen Aktivator- Inhibitor	39
5.11.4	TGF- $\beta$ und das Zytoskelett von Huvec- Zellen	40
5.11.5	Beobachtungen	41
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung:</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Anhang:</b>	<b>44</b>

<b>7.1 Daten:</b>	<b>44</b>
7.1.1 Fibroblasten:	44
7.1.2 Alveolarmakrophagen:	47
7.1.3 Huvec-Zellen:	50
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>





## 1 Einleitung

Die Lunge ist ein Organ, dessen Einschränkung oder Fehlfunktion zu einer lebensbedrohlichen Situation führen kann. Daher ist die Behandlung im Falle eines Lungentumors oder eines Tumors im thorakalen Bereich mit einer Strahlentherapie eine Gratwanderung. Einerseits muss dem Tumor Einhalt geboten werden, andererseits darf eine Schädigung der Lunge im möglichst geringem Maße riskiert werden, um zum Beispiel eine strahleninduzierte Fibrosebildung zu vermeiden (45, 54). Die Wahl der Strahlendosis und der Erfolg der Behandlung werden damit vom umliegenden gesunden Lungenparenchym limitiert. Die Lunge ist ein sehr strahlensensibles Organ. Das Risiko von Strahlenschaden wird beeinflusst von der Größe des bestrahlten Lungenvolumens, der Gesamtdosis, der Fraktionierung, vorbestehenden Lungenerkrankungen und gegebenenfalls simultan oder sequentiell applizierter Chemotherapie. Je nachdem kann die Lunge mit einer Entzündungs- bzw. Fibrosierungsreaktion unterschiedlichen Ausmaßes reagieren (54, 59).

### 1.1 Das dynamische Gleichgewicht der Lungenmatrix

Das dynamische Gleichgewicht in der Lunge zwischen Synthese und Degradation der Extrazellulärmatrix stellt eine physiologische Balance dar (19). Diese Balance wird durch drei Mechanismen kontrolliert und reguliert:

- 1) De novo Synthese und Ablagerung von Extrazellulärmatrix,
- 2) Proteolytische Degradation der existierenden Extrazellulärmatrix durch MMPs (matrix metalloproteinases) und
- 3) Hemmung der MMP-Aktivität durch spezifische endogene Antiproteasen, wie der TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinase) (19, 34, 39, 40).

Der physiologische Umsatz von Extrazellulärmatrix wird pro Tag auf etwa >10% geschätzt (19, 41).

## 1.2 Folgen einer Dysbalance

Nach einer Bestrahlungstherapie kommt es häufig zu einer chronischen Schädigung der Lunge durch eine Störung des oben genannten Gleichgewichts, welches hauptsächlich ab dem 6. Monat durch einen Anstieg der Extrazellulärmatrix und deren Hauptkomponenten Kollagen I und Kollagen II charakterisiert ist (1, 2, 4, 11, 14, 19, 23, 27, 34, 37, 41, 45); neben diesen Komponenten zählen auch Elastin und Proteoglykane zu wichtigen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (19). Die Störung des Gleichgewichtes kann sowohl nach akuten als auch nach chronischen Ereignissen auftreten (41), wie zum Beispiel dem „acute respiratory distress syndrom“ (ARDS) oder einer hypersensitiven Pneumonie (41). Meist ist gleichzeitig ein Anstieg des Zytokins TGF- $\beta$  zu verzeichnen (17, 19, 21), das schon Stunden nach thorakaler Bestrahlung nachzuweisen ist (8, 40). TGF-  $\beta$  reguliert u.a. die MMP-1- Expression nach unten und TIMP-1-Expression nach oben, was die Degradation der Extrazellulärmatrix negativ beeinflusst (41, 45). Der Höhepunkt liegt oft in der 3. Woche (8). Die mRNA-Expression von TGF-  $\beta$ 1 kann auf das 200-fache im Vergleich zur Kontrolle ansteigen (45). Man kann folglich spekulieren, dass die Fibrose schwerwiegender bzw. progressiv ist, je höher der TGF- $\beta$  –Spiegel ist (8). Zu Recht wird dieses Zytokin deshalb als Schlüsselmediator in der Pathogenese der Lungenfibrose bezeichnet (19, 27). Zytokine sind lösliche Proteine und Peptide, die als hochspezifische Mediatorssubstanzen bereits in nano- bis pikomolaren Konzentrationen biologisch wirksam werden und die Interaktionen zwischen unterschiedlichen Zellen vermitteln und regulieren (54). TGF-  $\beta$ , welches eigentlich in der Wundheilung sowie in der Kontrolle des Immunsystems eine wichtige Rolle spielt, vermittelt in diesem Fall eine schlecht zu behandelnde Lungenerkrankung (39, 42, 47). Neben der Strahlenfibrose der Lunge hat dieses Zytokin in der Entwicklung der Leberzirrhose und der interstitiellen Fibrose der Nieren eine zentrale Stellung (39, 42).

### **1.3 Von der Strahlenpneumonie zur Strahlenfibrose**

Entscheidend für die Effektivität der Atmung ist die Funktion der alveolokapillären Membran, zusammengesetzt aus Ausläufern der Typ I- und Typ II- Pneumozyten, welche dem Alveolarepithel und dem Kapillarendothel entsprechen. Dabei nehmen die Typ- I –Pneumozyten etwa 90% der Alveolaroberfläche ein, während die Typ- II- Pneumozyten als Replikatoren für die Typ- I- Zellen dienen. Bei normalen Verhältnissen dauert der Turnover des Alveolarepithels ungefähr 4-5 Wochen. Nach einer toxischen Schädigung sind die meisten Zellen aufgrund der hohen Vulnerabilität zerstört. In diesen Fällen kann die Proliferation der Typ- II Pneumozyten bis auf das 10-fache ansteigen. Dieser Prozess wird von einer großen Anzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Cyclinen reguliert (56). Infolge einer strahleninduzierten Schädigung kann die Separierungsfunktion dieser alveolokapillären Membranen beeinträchtigt und durch Exsudation in den Alveolarraum der Gasaustausch gestört werden (54). Man unterscheidet eine frühe akute Phase, die mit einer Schädigung der Typ-I Pneumozyten einhergeht und in eine Strahlenpneumonitis mündet, die zwischen der 4.- 30. Woche auftritt, von einer späten Phase, die mit einer Strahlenfibrose einhergeht (31, 56). Das ausgeprägte Bild einer Lungenfibrose zeigt sich nie vor der 8. Woche nach Radiotherapie (7) und manifestiert sich meist erst nach Monaten (9, 14) oder sogar Jahren (9). Die Strahlenfibrose selbst ist charakterisiert durch kontraktes, dichtes Gewebe, welches ein kleineres Volumen einnimmt als das ursprüngliche Lungengewebe (56). Umgeben ist die Veränderung von hypodensen Strukturen, die das kompensatorische Emphysem darstellen (56). Man könnte Fibrose auch als einen dynamischen Prozess bezeichnen, der durch permanentes Remodeling und eine längerfristige Aktivierung von Fibroblasten charakterisiert ist (47).

Die Entwicklung von Pneumonie und Lungenfibrose wird durch eine Dysbalance zwischen zahlreichen Zellpopulationen des Lungenparenchyms verursacht. Die interstitiellen Myofibroblasten werden dabei als die Zellen betrachtet, die die Hauptaktivität in fibrotischen Prozessen zeigen. Die

Pneumozyten Typ I, Endothelzellen und Alveolarmakrophagen spiegeln die Zellgruppen wieder, die am ehesten geschädigt werden. Durch die Produkte der geschädigten Typ- I Epithelzellen und Endothelzellen sowie durch die von Makrophagen freigesetzten Signale der gestörten interzellulären Aktionen, werden die Typ- II Pneumozyten stimuliert schneller zu proliferieren und sezernieren verschiedenste Zytokine parakrin und autokrin sowie metabolische Produkte. Auch die Existenz freier Radikale erzielt diesen Effekt (59). Das alles resultiert in einer gesteigerten Proliferation und einer Aktivierung von Fibroblasten, aber auch in einer schnelleren Transformation von Typ II in Typ I Pneumozyten. Aus dieser Transformation ergibt sich eine Intermediärzelle, die eine charakteristische kuboidale Form und einen Mangel an lamellären Körperchen hat. Diese Zellen sind beim Prozess einer radiotherapiebedingten Fibrose verbreitet und zeugen von einer verspäteten oder beeinträchtigten Transformation (59).

Durch die Radiotherapie werden die Stammzellen sterilisiert und die Zellproduktion durch Transitzellen gestört. Klinische Zeichen und Symptome eines akuten Strahlenschadens sind schließlich auf eine Hypoplasie der funktionalen Zellen zurückzuführen (59).

Auf molekularer Ebene kommt es aber schon wesentlich früher zu strahlenbedingten Veränderungen (31). Zum Beispiel zeigte sich eine erniedrigte Expression der mRNA für TGF-  $\beta$  und Extrazellulärmatrix am ersten Tag nach Radiotherapie in Mäuselungen (47, 55). Die Ursache könnte eine durch TGF-  $\beta$  induzierte Zellwachstumshemmung sein, um Zeit für Reparaturvorgänge oder die Induktion der Apoptose in stark geschädigten Zellen zu geben (47). Die genaue Pathogenese von der Fibrose ist allerdings immer noch nicht ganz geklärt (35). Generell kann man sagen, dass die strahleninduzierte Fibrose hauptsächlich durch eine massive Ablagerung von Extrazellulärmatrix und exzessiver Fibroblastenproliferation gekennzeichnet ist (47). Dabei scheint es vor allem eine Überexpression von TGF-  $\beta$  in Pneumozyten Typ-II und Makrophagen zu geben, während es in kontrakten Geweben hauptsächlich Fibroblasten sind (47, 55). Es gibt zudem Beweise für die Annahme, dass chronische Entzündungen über die Freisetzung von

Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu einer Fibrosebildung führen (35). Dabei scheinen inflammatorische, epitheliale und fibroblastische Zellen eine bedeutende Rolle in der Fibrogenese zu spielen (36, 42, 47).

Als Schlüsselzytokin für eine erhöhte Kollagenproduktion ist- wie oben schon beschrieben- das TGF-  $\beta$  bekannt. Eine Erhöhung dieses Faktors korreliert mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung einer Strahlenpneumonie mit evtl. konsekutiver Entwicklung einer Fibrose (47). Während der Entwicklung einer Lungenfibrose wird die interzelluläre Kommunikation einerseits durch über Zytokine gestört (42), andererseits werden profibrotische Zytokine überexprimiert, die das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau stören. Dabei wird aufgrund einer übermäßigen Reparatur vermehrt Kollagen gebildet und angehäuft (37). Die Hauptproduzenten von Kollagen sind die Fibroblasten (27). Es wurde auch beobachtet, dass sich die Fibroblasten nach Stimulation durch Zytokine verselbständigen können, was für das schlechte Ansprechen auf Immunsuppressiva sprechen könnte (39). Neben den Fibroblasten produzieren auch endotheliale und epitheliale Zellen, Alveolarzellen Typ II und glatte Muskelzellen Kollagen (2, 11). Neben dem erhöhten Kollagengehalt zeigen sich ein Verlust der Kapillaren, zunehmende Verdickung der Alveolarsepten und Obliteration der Alveolarhöhlräume (1, 35). Dies alles führt zu einer Lungenfibrose, die sich nie vor der 8. Woche nach Radiotherapie zeigt (7) und sich meist erst nach Monaten (9,14) oder sogar Jahren manifestiert (9).

Überraschenderweise gibt es nur wenige Studien, die einen Anstieg von TGF-  $\beta$  nach Bestrahlung von Zellkulturen zeigen. Die dreidimensionale Struktur des Gewebes, die Zellinteraktionen und die Zelldifferenzierung sind allem Anschein nach sehr wichtige Parameter in der Entwicklung einer Fibrose bzw. in der Expression von TGF-  $\beta$ . In Monolayer-Zellkulturen sind die TGF-  $\beta$ - Level erniedrigt, da sowohl die epithelialen und mesenchymalen Zellinterkommunikation als auch die Interaktionen mit der Extrazellulärmatrix nicht gegeben sind (47).

#### **1.4 TGF- $\beta$ als Schlüsselzytokin für die Entwicklung einer Strahlenfibrose**

TGF- $\beta$  wird in drei Isoformen ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3) synthetisiert (8, 34, 47), die zur TGF- $\beta$  Superfamilie der Polypeptide gehören (19) und den Metabolismus der Extrazellulärmatrix und die Stromazell- Aktivität beeinflussen (42). Die Halbwertszeit beträgt nur wenige Minuten (22). Alle Isoformen sind überlebenswichtig und führen schon bei Ausfall einer Form zur Letalität des Embryos oder zum perinatalen Tod (47).

Schon bei der Lungenreifung spielt daher TGF- $\beta$  eine wichtige Rolle. So trägt TGF- $\beta$  zur Zelldifferenzierung bei und fördert vor allem die frühe Lungenreifung. Bei beatmungs- und sauerstoffpflichtigen Neugeborenen kann es aufgrund Sauerstofftoxizität und Beatmungstraumata zur bronchopulmonalen Dysplasie kommen, die mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht. In diesen Fällen wird ein erhöhter Spiegel von TGF- $\beta$  nachgewiesen. Die Anwendung von neutralisierenden TGF-  $\beta$ -Antikörpern verbessert die Entwicklung der Lungen in der Endphase, die Größe der Lungenoberfläche und der distalen Luftwege und fördert die Ausbildung der distalen Luftwege und somit die Alveolenbildung (49).

Alle drei Isoformen sind Homodimere und haben jeweils ein Gewicht von 25kDa (19). TGF- $\beta$ 1 scheint bei erhöhten Werten predominant zu sein und wird ubiquitär produziert (47). Es muss beachtet werden, dass alle drei Isoformen erhöht sind (8). Die Untersuchungen von Eickelberg et al. (19) besagen, dass sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch TGF- $\beta$ 3 die gleiche Potenz haben, die Kollagensynthese und die Ablagerung von Extrazellulärmatrix durch Lungenfibroblasten zu steigern. Auch in anderen Bereichen ist kein Unterschied bezüglich der Effektivität der beiden Isoformen zu verzeichnen (19).

Das Zytokin wird gewöhnlich als latenter, an ein Latenz- assoziiertes- Peptid (LAP) non- kovalent gebundener Komplex synthetisiert, der keinen biologischen Effekt hat (5, 14, 22, 29, 42, 47). Dieser kann an  $\alpha$ 2-Makroglobulin gebunden werden (4). Ein bekannter Rezeptor für TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 ist das CD105, ein sogenanntes Endoglin bzw. ein homodimeres Glycoprotein, welches hauptsächlich in Gefäßendothelzellen vorkommt. Die Funktion der Endothelzellen hat man aber bislang noch nicht ganz verstanden. Eine erhöhte

Rezeptorexpression wurde bei einigen Tumoren und Geweben festgestellt, bei denen Neovaskularisationen nachgewiesen werden konnten (45). So werden bei Erkrankung zwar erhöhte Werte gemessen, die aber nicht in einer Fibrose resultieren müssen (4, 5, 22). Die Aktivierung kann unter anderem durch folgende Mechanismen oder Substanzen erfolgen:

durch Bindung an den Mannose-6-Phosphat/ insulin-like-growth- Faktor, durch proteolytische Enzyme wie Plasmin oder durch freie Radikale, die bei Radiotherapie entstehen (22), aber auch durch DNA- schädigende Substanzen, wie Cisplatin oder Alkylantien (4, 5, 14). Die aktive Form bindet schließlich an den Typ II Rezeptor, einen Serin/ Threonin- Kinase- Rezeptor, der den Komplex an den Typ I Rezeptor präsentiert (8, 21, 47). Diese zwei Rezeptoren bilden zusammen wiederum einen heterotetramerschen Rezeptorkomplex, der die aktive Form darstellt (47). Die intrazelluläre Signalübertragung erfolgt über Smad- Proteine (8). Hier können das Smad- Protein 1 und 8 sowohl die Transduktions- als auch die Transkriptionsfaktoren induzieren. Durch Phosphorylierung können Smad- Proteine auch selbst als Transkriptionsfaktoren fungieren (47).

### **1.5 Einflussbereiche von TGF- $\beta$**

Die drei biologischen Hauptaktivitäten des Schlüsselzytokins TGF- $\beta$  liegen in der Regulation und generellen Inhibierung von Zellwachstum, in der immunsuppressiven Wirkung und in der Regulierung der Ablagerung von Komponenten der Extrazellulärmatrix (47, 55).

TGF- $\beta$  ist bekannt dafür, eine Vielzahl von Zellvorgängen zu beeinflussen (8, 14, 29). Dazu gehören unter anderem die Zellproliferation, Differenzierung (vor allem progenitor Fibroblasten zu post- mitotischen Fibrozyten) und Apoptose (8, 11, 17, 27, 29, 39, 41, 42, 47, 55). Darüber hinaus kann TGF-  $\beta$  einen reversiblen Zellzyklusarrest in der G1-Phase durch Rezeptorsignale induzieren und hat außerdem einen direkten Einfluss auf Zellzyklus- regulierende Gene (47). Die Progenitor- Fibroblasten haben die Fähigkeit zu proliferieren und sich in Fibrozyten zu teilen, aber auch in neue Progenitor- Zellen, um deren Pool zu

regenerieren (27, 55). Die post- mitotischen Fibrozyten produzieren mehr Kollagen als Fibroblasten (17, 21, 27, 29, 34, 41, 55); aber auch die Synthese von anderen Wachstumsfaktoren und Zytokinen ist erhöht (27). Zu erwähnen sind hier die profibrotischen Zytokine wie FGF, PDGF und CTGF (42). Zudem ist TGF- $\beta$  chemotaktisch für Fibroblasten (37, 55) sowie autoinduktiv und chemotaktisch für Monozyten und Makrophagen (55).

Für die normale pulmonale Morphogenese und Funktion und in der Pathogenese ist TGF- $\beta$  damit von essentieller Bedeutung (8). Die Hauptproduktionsorte scheinen epitheliale Zellen, Makrophagen und subepitheliale Regionen mit dichten fibroconnectiven Ablagerungen zu sein (8, 19, 35). Bei chronischen Erkrankungen mit maximalen TGF-  $\beta$ - Spiegel sind vor allem die Makrophagen zu nennen (8). Interessanterweise moduliert TGF-  $\beta$  die Zytotoxizität von Makrophagen (47, 55), indem es die Produktion von Nitritoxid unterdrückt (47) wobei aber die Fähigkeit zur Phagozytose erhalten bleibt (55). Die Monozytensynthese wird ebenfalls inhibiert (55).

Gegensätzliche Ergebnisse wurden allerdings von Rube et al. und Trott et al. (54, 59) veröffentlicht. Bei Mäusen mit strahleninduzierter Fibrose ließen sich zu Beginn eine erhöhte TGF-  $\beta$ - Syntheserate durch Makrophagen messen, während Fibroblasten (8, 19, 55) und Typ- II Pneumozyten (8, 55) diese Rolle erst in der späten Phase übernahmen. Fibroblasten sind aber dennoch als Hauptproduktionsort und wichtige Quelle anzusehen, da sie 40% der Gesamtzellzahl der Lunge ausmachen (19, 35). Der Peak der TGF-  $\beta$  Expression wird hauptsächlich von inflammatorischen Zellen ca. zwei bis vier Wochen nach Radiotherapie getriggert (55).

TGF- $\beta$  stimuliert die Neutrophilen-, Monozyten- (5), Lymphozyten- und Fibroblastenmigration zum Ort der Schädigung, die Fibroblastenproliferation und die Produktion von Kollagen und Fibronectin (4, 8, 34, 35). Weiterhin führt TGF- $\beta$  zu einem Anstieg von inflammatorischen Zytokinen (5, 7, 11) sowie der Plasminogenaktivator- Inhibitoren (4, 8, 10, 11, 34) und TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinase) (10, 11, 19, 34). Gleichzeitig kommt es zur Minderung der Produktion von Plasminogenaktivator in Fibroblasten sowie der Induktion von



Metalloproteinasen, Kollagenasen und Stromelysin (4, 8, 10, 11, 19). Letztere Punkte sprechen für die Inhibierung der Matrixdegradation (8, 10).

Es existiert die Hypothese, dass TGF- $\beta$  eine inhibierende Wirkung auf die Epithelzellproliferation hat (4). Maligne Zellen epithelialen Ursprungs reagieren allerdings nicht auf diesen Effekt (4). Vielleicht liegt hier eine Reduktion oder ein Verlust des TGF- $\beta$ 1 als Ursache zugrunde (4).

Nach Radiotherapie wird TGF-  $\beta$  auch vom Tumor selbst in erhöhtem Maße freigesetzt (4, 14, 17). Hier sind vor allem die Tumor- assoziierten-Stromazellen für den Anstieg verantwortlich (22, 45) Zum Beispiel wurde in Fibrose sensitiven C57/Bl6 Mäusen (59) und in Ratten (7) ein akuter und lang andauernder Anstieg von TGF- $\beta$  verzeichnet. Bei den Mäusen konnte eine starke Korrelation zwischen der TGF- $\beta$  mRNA Expression und der Höhe der Bestrahlungsdosis nachgewiesen werden (59).

Veränderungen von TGF- $\beta$  werden auch zur Vorhersage eines möglichen Risikos von Lungenschäden nach Radiotherapie herangezogen (3, 4, 5, 7, 14, 17, 22). Beispielsweise werden die TGF- $\beta$ - Level genutzt, um Patienten mit NSCLC (non small cell lung cancer) zu selektieren, die mit höheren Dosen behandelt werden können (3, 7, 14).

IL 1- $\beta$ , -6, -8	Interleukine
MCP-1	Macrophage Chemotactic Protein
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor
TGF- $\beta$ / - $\alpha$	Transforming Growth Factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
FGF-1 und -2	Fibroblast Growth Factor
KGF	Keratinocyte Growth Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

*Abbildung 1: Tabelle aus Referenz 42: Übersicht über Zytokine und Wachstumsfaktoren, denen in der Pathogenese fibrosierender Lungenerkrankungen eine gewisse Rolle zugeordnet wird.*

Ungefähr ein Drittel der Patienten mit NSCLC haben bei Diagnosestellung zwar keine Metastasen, sind dafür aber schon im fortgeschrittenen Stadium oder inoperabel (4). Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt bei einem inoperablen Patienten nach Radiotherapie mit oder ohne Chemotherapie ungefähr 5-20% (48). Die durchschnittliche Überlebensdauer liegt bei circa 51 Monaten (3).

Gerade deshalb ist die Radiotherapie für diese Patienten so wichtig (4). Man versucht eine lokale Tumorkontrolle zu erreichen (4, 5) und damit eine bessere Überlebensrate (7).

Es existiert eine Studie, die zeigt, dass 18% der Patienten Komplikationen entwickeln (3). Die pulmonalen Komplikationen wurden durch die progressive Fibrose und respiratorisches Versagen bestimmt und traten bei 58% auf. Die restlichen Prozentanteile entfielen unter anderem mit 10% auf ösophageale und mit 8% auf kardiale Symptome (3).

Höhere Dosen versprechen aber dabei keine Verbesserung der Überlebensrate oder der lokalen Tumorkontrolle (3).

## **2 Ziel der Untersuchung**

In diesem Projekt wurde untersucht, ob Bestrahlung die Synthese profibrogener Faktoren, wie TGF- $\beta$ , durch pulmonale Fibroblasten, Alveolarmakrophagen und Endothelzellen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) beeinflusst wird. Es wurde folgende Arbeitshypothese formuliert. Durch Bestrahlung der o.g. Zellreihen sollte es zu einer gesteigerten Kollagensynthese in vitro kommen. Diese Steigerung wird durch eine durch die Bestrahlung erhöhte Produktion von TGF- $\beta$  vermittelt. Um die Hypothese und die gesteigerte Kollagensynthese in Abhängigkeit von TGF- $\beta$  zu beweisen wurde die Kollagensyntheserate in Anwesenheit und Abwesenheit von TGF- $\beta$ - Antikörpern überprüft.

Die C57/Bl6 Mäuse sind strahlensensibel und ihre Lungen eignen sich daher als Modell für die strahleninduzierte Lungenfibrose (55).

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Gewinnung des Zellmaterials:**

##### 3.1.1 Fibroblasten

Die C57/Bl6 Mäuse werden mittels einer intraabdominellen Injektion mit Insulin getötet. Direkt im Anschluss daran wird die Lunge herauspräpariert, in kleine Stücke aufgeteilt und in Petrischalen mit Zugabe von Nährmedium kultiviert. Dieses Nährmedium setzt sich zusammen aus: Dulbecco's Mod Eagle Medium (Gibco, Cat. No. 31885-023), welches mit Fetal Bovine Serum (Gibco, Cat. No.: 12478-020) in 10%iger Konzentration und den vier Antibiotika L-Glutamine 200mM ((100X), Gibco, REF: 25030-024), Amphotericin B 250UG/ML (Gibco, Cat. No.: 15290-026), Penicillin G (Sigma, P3414) und Gentamicin 50MG/ML (Gibco, Cat. No. 15750-045) in jeweils 1%iger Konzentration versetzt wird. Die Zellkultur erfolgt bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 100%. Sobald einzelne Fibroblasten auf den Boden der Petrischale übergewachsen sind, können die Lungenfragmente entfernt werden. Die Zellen werden mit wenigen ml Trypsin ((1X), Gibco, Cat. No.: 25300-062) abgelöst und in Kulturflaschen übergesetzt.

##### 3.1.2 Alveolarmakrophagen

Die Mäuse werden nach obigem Schema getötet und die Lungen ebenfalls frei präpariert. Bevor man sie allerdings in toto herausnimmt, wird durch einen kleinen Einschnitt in der Trachea ein kleiner Plastikschlauch eingeführt und mit einem Faden fixiert. Dieser Schlauch dient als Tubusersatz. Über diesen Tubus werden je nach Größe der Lunge wenige ml 0,9%iger NaCl- Lösung injiziert und unter leichter Massage der Lunge wieder aspiriert. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt. Die gewonnene, leicht schaumige und trübe Flüssigkeit enthält die Alveolarmakrophagen. Mit diesen Zellen wird anschließend genauso

verfahren, wie mit den Fibroblasten. Da die Zellen sehr empfindlich sind, werden sie umgehend kultiviert und in den Versuchsreihen eingesetzt.

### 3.1.3 HUVEC-Zellen

Die Huvec- Zellreihe wurden uns freundlicherweise von der gynäkologischen Abteilung überlassen. Die Kultivierung erfolgt ähnlich wie bei den anderen Zellreihen. Allerdings wird Dulbecco's Mod Eagle Medium durch Clonetics® EBM® (Cambrex, Cat. No.: CC-312) ersetzt (Clonetics® EBM®, 1% Fetal Bovine Serum, 1% L-Glutamine 200mM, 1% Amphotericin B 250UG/ML, 1% Penicillin G und 1%Gentamicin 50MG/ML). Diese Zellen müssen relativ schnell bei Versuchen eingesetzt werden, da sie sehr anfällig sind und unterschiedlich in den Versuchen reagieren können.

## 3.2 Zellkultivierung

Die Zellen werden mit Nährmedium versorgt, welches alle zwei bis drei Tage gewechselt werden sollte. Es setzt sich zusammen aus: Dulbecco's Mod Eagle Medium, welches mit Fetal Bovine Serum in 10%iger Konzentration und vier Antibiotika (L-Glutamine 200mM, Amphotericin B 250UG/ML, Penicillin G und Gentamicin 50MG/ML) in jeweils 1%iger Konzentration versetzt wird. Die Zellkulturflaschen werden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit gelagert. Das angesetzte Medium kann für circa vier bis fünf Tage gelagert werden. Anschließend muss es verworfen und neu angesetzt werden.

## 3.3 Gewinnung konditionierter Medien

Fibroblasten und Huvec- Zellen werden in 12-well-Platten kultiviert und nach Zellkonfluenz bzw. Alveolarmakrophagen nach sechs Stunden Adhärenz in zwei Reihen geteilt. Die eine Hälfte wird nicht bestrahlt, die andere wird mit 10 Gy bestrahlt. Die Sammelzeitpunkte waren nach 0, 6, 24 und 48 Stunden

festgelegt. Zu diesen Zeitpunkten wurden konditionierte und Fetal Bovine Serum- freie Überstände gewonnen. Die Sammelzeit betrug jeweils 6 Stunden.

### **3.4 Herstellung der einzelnen Lösungen und Puffer**

#### 3.4.1 Wachstumsmedium

10% FCS-Medium wird mit 50 $\mu$ l/ml Ascorbinsäure (L-Ascorbic Acid, Sigma, A-4544) angereichert. Die Ascorbinsäure wird in 10mg Portionen abgewogen und in 1ml Medium gelöst. Die Ascorbinsäure muss bei jedem Gebrauch frisch gelöst und zugegeben werden, da sonst die Wirkung verloren geht. Bevor das Medium verwendet werden kann, muss das Medium wegen der Ascorbinsäure erneut gefiltert werden.

#### 3.4.2 Hungermedium

0% FCS-Medium wird nach dem gleichen Verfahren, wie oben beschrieben, mit Ascorbinsäure versetzt.

#### 3.4.3 Labeling-Medium

Für die Herstellung müssen die Bestimmungen zum Schutz gegen die radioaktive Substanz 3H-Prolin beachtet werden.

Zu 20 ml 1% FCS-Medium werden folgende Substanzen zugegeben: 26,7 $\mu$ l 3H-Prolin und 133,3 $\mu$ l gefilterte Ascorbinsäure.

Bei jedem Versuch läuft eine Kontrolle mit TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 rhTGF- $\beta$ 1, R&D Systems, Cat. No.: 240-B) mit, um die Kollagensynthese durch von den Zellen freigesetztes TGF- $\beta$  mit der durch künstlich zugesetztem TGF- $\beta$  zu vergleichen.

Das TGF- $\beta$ 1-Lyophilisat wird 40 $\mu$ l 1 N HCL + 10 mg BSA in 9,96ml sterilem destilliertem Wasser gelöst. Von dieser Lösung werden 2 ml zu 2 $\mu$ g TGF- $\beta$ 1 gegeben und man erhält so eine Stammlösung von 1 $\mu$ g/ml Stammlösung.

Die zu testende 10 $\eta$ g TGF- $\beta$ - Dosis wird zum Labeling- Medium zugegeben, welches in der Menge von 750 $\mu$ l/well, aufgeteilt wird.

#### 3.4.4 TCP-Puffer

Für 1 Liter Puffer müssen 7,88g Tris-Cl (Molekulargewicht: 157,6), 0,14702g CaCl<sub>2</sub> (Molekulargewicht: 147,02) und 0,1151g Prolin (Molekulargewicht: 115,1) in genannter Reihenfolge in 800ml mit einem Rührfisch gelöst werden. Der pH-Wert wird auf circa 7,5 titriert. Mit destilliertem Wasser wird bis auf 1 Liter aufgefüllt. Für eine bessere Haltbarkeit empfiehlt sich die Filterung durch einen Sterilfilter.

#### 3.4.5 25mM NH<sub>2</sub>OH

169 $\mu$ l des 14,8 M NH<sub>2</sub>OH werden in 100ml destilliertem Wasser gelöst.

#### 3.4.6 NEM-Lösung

3,13g des 500mM N-Ethylmaleimide werden in 50ml Methanol gelöst und dunkel gelagert.

### 3.5 Versuchsablauf:

#### 3.5.1 Versuchstag 1

Es werden konfluente Fibroblasten der Passage 4-10 von C57BL/6 Mäusen mittels 4ml Trypsin (Trypsin-EDTA (1X), Gibco, Cat. No.: 25300-062) vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst.

Mit Hilfe einer Zählkammer werden die Zellen in Bezug auf die Trypsinmenge ausgezählt.

Die Zellsuspension wird bei 900 Umdrehungen und 20°C ungefähr 5 min. zentrifugiert, Trypsin wird abgesaugt und die Zellen werden sofort in 1ml Wachstumsmedium gelöst.

Da pro well eine Zellzahl von 70.000 erwünscht ist, werden die Zellen entsprechend im Wachstumsmedium verdünnt.

Schließlich wird jeweils 1ml der Zellsuspension unter ständigem Resuspendieren auf jedes well verteilt.

### 3.5.2 Versuchstag 2

Nach ungefähr 24 Stunden wird das Wachstumsmedium durch Hungermedium ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt sollten die Zellen zu 80-90% konfluent sein.

### 3.5.3 Versuchstag 3

Nachdem das Hungermedium entfernt wurde, werden die wells mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend fügt man zu jedem well 750 $\mu$ l des Labeling-Mediums.

Im nächsten Schritt wurden nun die konditionierten Medien der bestrahlten Zellen und die unbestrahlten Überstände auf die einzelnen wells verteilt. Es wurde immer eine Zellreihe innerhalb eines Versuches getestet.

### 3.5.4 Versuchstag 4

Die Arbeitsfläche und die Arbeitskleidung müssen den Richtlinien für Arbeit mit radioaktiven Stoffen entsprechen.

Die einzelnen wells werden zuerst jeweils mit 500 $\mu$ l TCP- Puffer und 500 $\mu$ l destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wird die Zellmatrix mit 500 $\mu$ l 25mM NH<sub>4</sub>OH bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 5-10min. bei



Raumtemperatur wird der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Matrix mit 500 $\mu$ l 70% Ethanol fixiert. Nach 15 min. bei Raumtemperatur wird die Matrix abermals mit frischem 70%igen Ethanol bedeckt und diesmal etwa 10 min. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wird zwei Mal mit 500 $\mu$ l TCP- Puffer gewaschen. Schließlich wird der Platte A pro well 400 $\mu$ l Kollagenase-Puffer mit Kollagenase (Collagenase, Sigma, C-0255) zugeordnet und der Platte B pro well 400 $\mu$ l Kollagenase-Puffer ohne Kollagenase. Dabei ist zu beachten, dass der Boden der wells vollständig bedeckt sein muss. Die Inkubationszeit beträgt nun 4 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

Nach dieser Zeit werden die Überstände in die entsprechenden Szintillationsgefäße pipettiert. Die wells werden nun mit 500 $\mu$ l TCP- Puffer gewaschen und die Überstände wiederum in die gleichen Gefäße gegeben.

Die verbleibende Matrix wird mit 500 $\mu$ l SDS-NaOH gelöst und verbleibt für 2 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Allerdings werden die Platten während dessen alle 30 min. auf dem Vortexer für circa 2min. gemischt. Im Anschluss an die Inkubationszeit kommt es zum Transfer der Überstände in neue Szintillationsgefäße.

Gleichermaßen wird mit jeweils 500 $\mu$ l SDS- NaOH verfahren, mit denen die wells noch einmal gewaschen wurden.

Am Ende des Versuchs wird zu allen Szintillationsgefäßen 4ml Standard-Szintillationsflüssigkeit der Firma GOLD ® gegeben und die cpm im  $\beta$ - Counter bestimmt.

Die Versuche mit dem TGF- $\beta$ - Antikörper laufen nach dem gleichen Muster ab. Lediglich dem Medium, welches jeweils 6 Stunden auf den Zellen verbleibt, wird der Antikörper zugegeben.

## 4 Ergebnisse:

### 4.1 Fibroblasten:

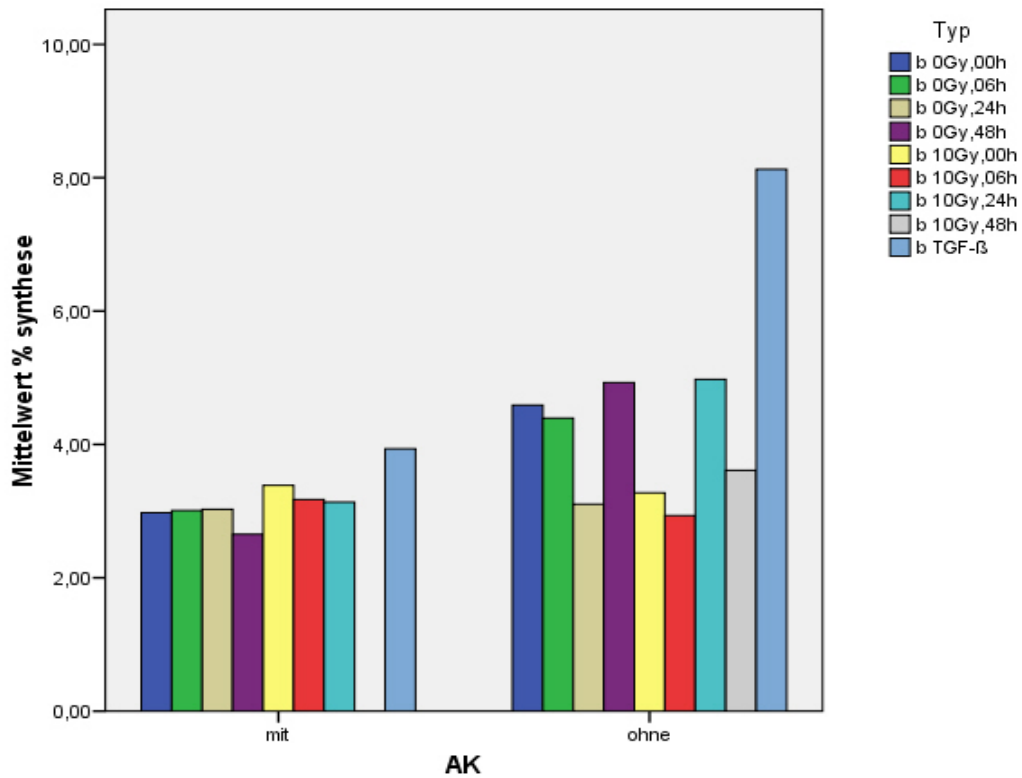


Abbildung 2: Grafik 1: Vergleich der Syntheserate in % von Überständen bestrahlter und nicht bestrahlter Fibroblasten mit und ohne TGF- $\beta$ - Antikörper

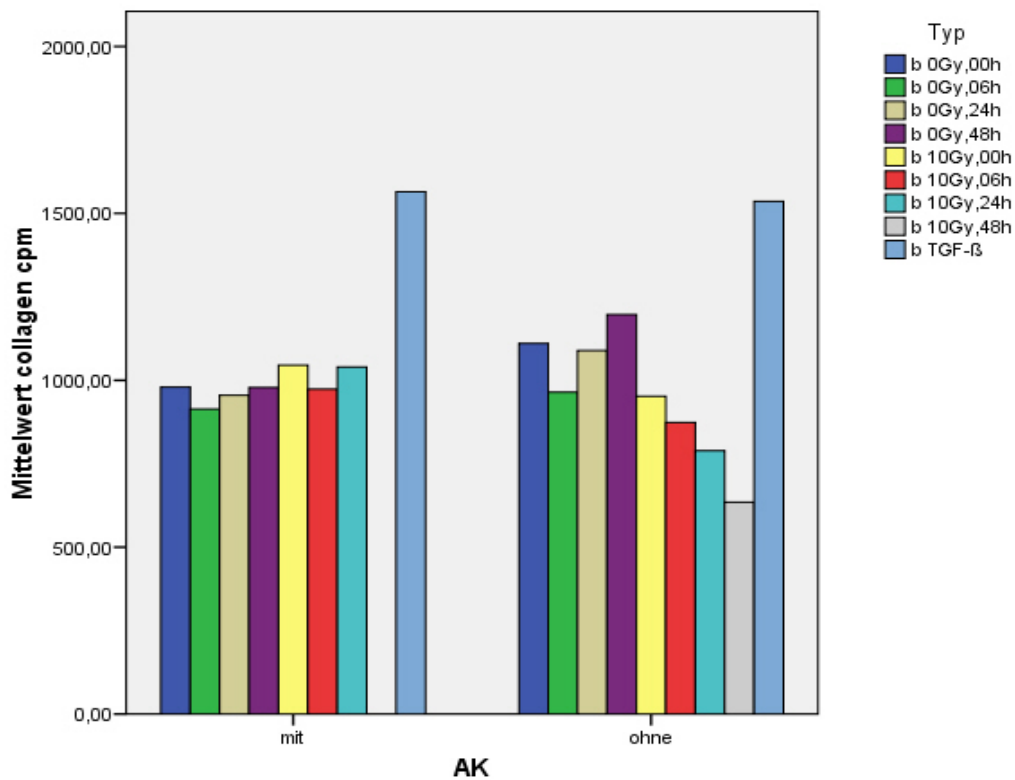


Abbildung 3: Grafik 2: Vergleich der cpm von Überständen bestrahlter und nicht bestrahlter Fibroblasten mit und ohne TGF- $\beta$ - Antikörper

Im Vergleich der Gruppen mit TGF- $\beta$ - Antikörper und ohne TGF- $\beta$ - Antikörper zeigten sich sowohl bei der Syntheserate als auch bei den cpm keine signifikanten Unterschiede. In der Gruppe mit Antikörpern waren die Ergebnisse sowohl mit als auch ohne Bestrahlung nahezu gleich. Ohne Antikörper kam es bei der Syntheserate zu einem Einbruch bei 0Gy 24h. Auf diesem Niveau hielten sich auch die Ergebnisse der Messzeitpunkte 10Gy 0h, 10Gy 6h und 10Gy 48h. Lediglich bei 10 Gy 24h kam es in der Synthese zu einem Anstieg. Im Vergleich mit 10 Gy 0h kam es zu keinem signifikantem Ergebnis ( $p= 0,293$  cpm,  $p= 0,357$  Synthese in %). Auffällig in der Grafik mit den Mittelwerten der cpm ist, dass es in der Gruppe ohne Antikörper mit Bestrahlung zu einem Abfall der Werte kam, die allerdings ebenfalls nicht signifikant waren. Beim Vergleich zwischen 10Gy oh und 10Gy 48h ohne Antikörper lagen die p-Werte nicht innerhalb der signifikanten Grenze.

## 4.2 Alveolarmakrophagen:

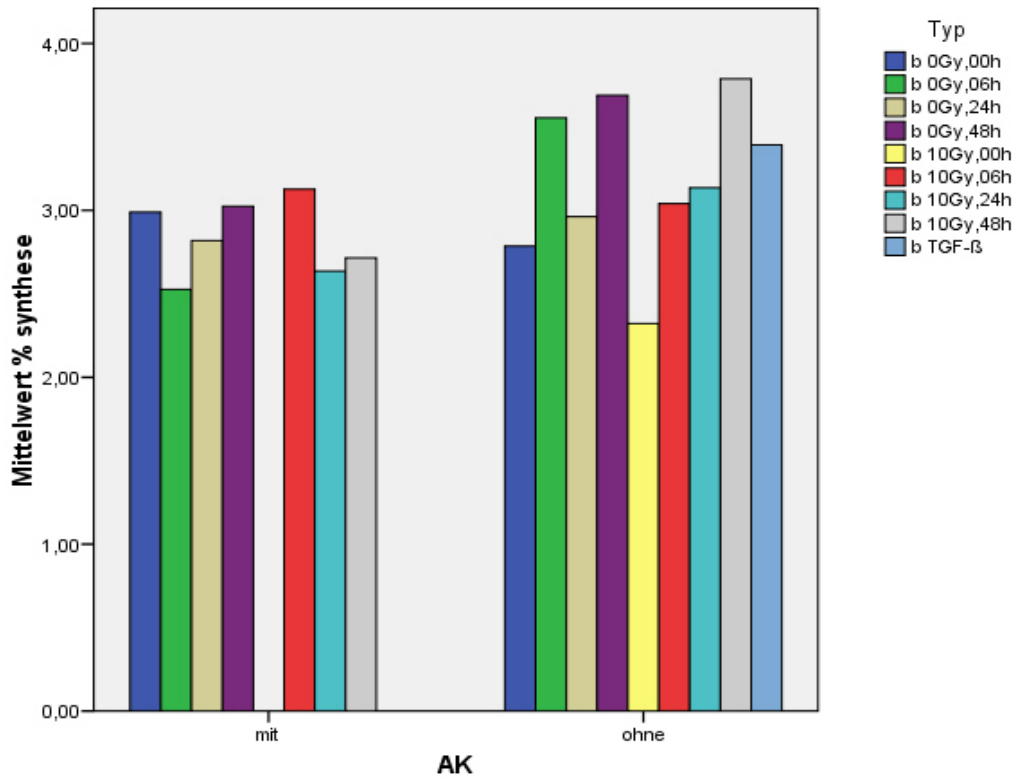


Abbildung 4: Grafik 3: Vergleich der Syntheserate in % von Überständen bestrahlter und nicht bestrahlter Alveolarmakrophagen mit und ohne TGF- $\beta$ - Antikörper

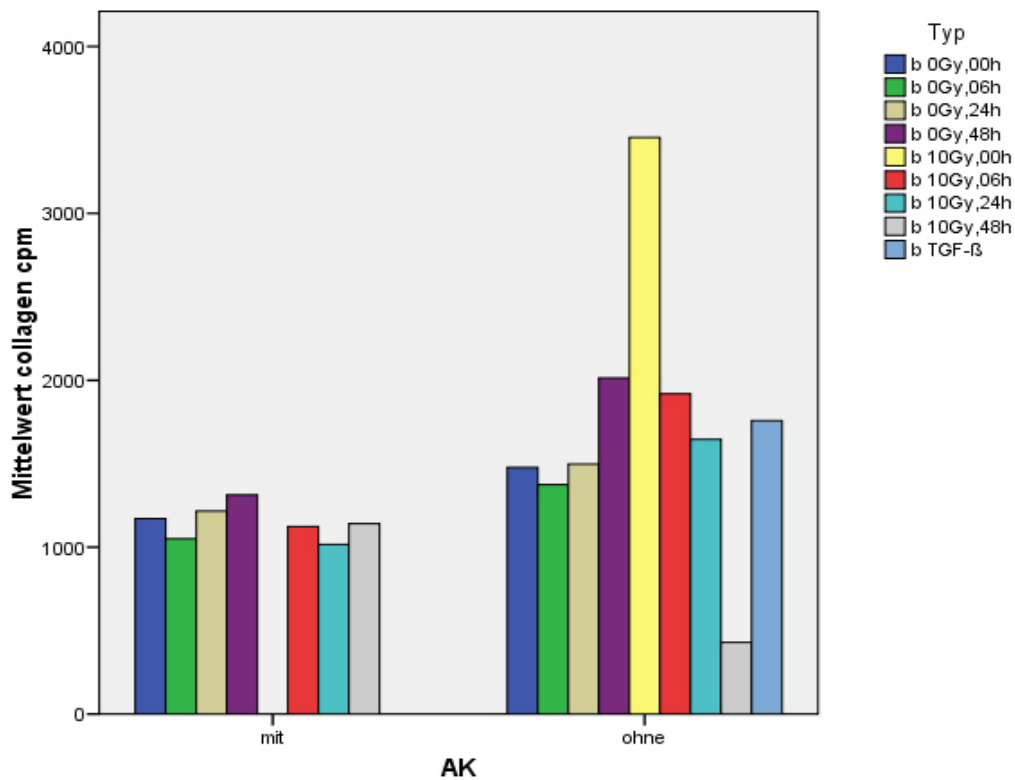


Abbildung 5: Grafik 4: Vergleich der cpm von Überständen bestrahlter und nicht bestrahlter Alveolarmakrophagen mit und ohne TGF- $\beta$ - Antikörper

Bei den Alveolarmakrophagen kam es, wie schon aus den Grafiken ersichtlich, zu sehr schwankenden Werten, die im direkten Vergleich keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Auffällige Veränderungen wurden nun geprüft. In der Gruppe von 0Gy 6h kam es in der Gegenüberstellung mit und ohne Antikörper zu signifikanten Messwerten in der Syntheserate mit  $p= 0,001$ . Die cpm waren nicht signifikant. Im Vergleich für 0Gy 48h zeigten sich bezüglich der cpm keine signifikanten Unterschiede. Bei der Syntheserate in % hingegen zeigte sich im Test mit und ohne Antikörper eine signifikante Hemmung durch den Antikörper mit  $p= 0,030$  bzw.  $0,033$  gleicher und nicht gleicher Varianz. Beim Messzeitpunkt 10Gy 48h waren die cpm hochsignifikant mit  $p= 0,02$  und die Syntheserate knapp nicht mehr signifikant. Die Ergebnisse in der Gruppe mit Antikörper wiesen keine großen Schwankungen auf. In der Gegengruppe ohne Antikörper hingegen gab es auffällige Veränderungen. Knapp signifikante Werte erhielt ich im Test in den Gruppen 10Gy 0h und 10Gy 24h hinsichtlich der cpm mit  $p= 0,26$  und

0,063 bei gleicher Varianz bzw. nicht gleicher Varianz. Die Syntheserate war nicht signifikant. Im Vergleich der Gruppen 10Gy 0h und 10Gy 48h waren die cpm signifikant mit  $p= 0,002$  gleicher Varianz und  $p= 0,010$  nicht gleicher Varianz. Die Syntheserate hingegen war nicht signifikant.

### 4.3 Huvec:

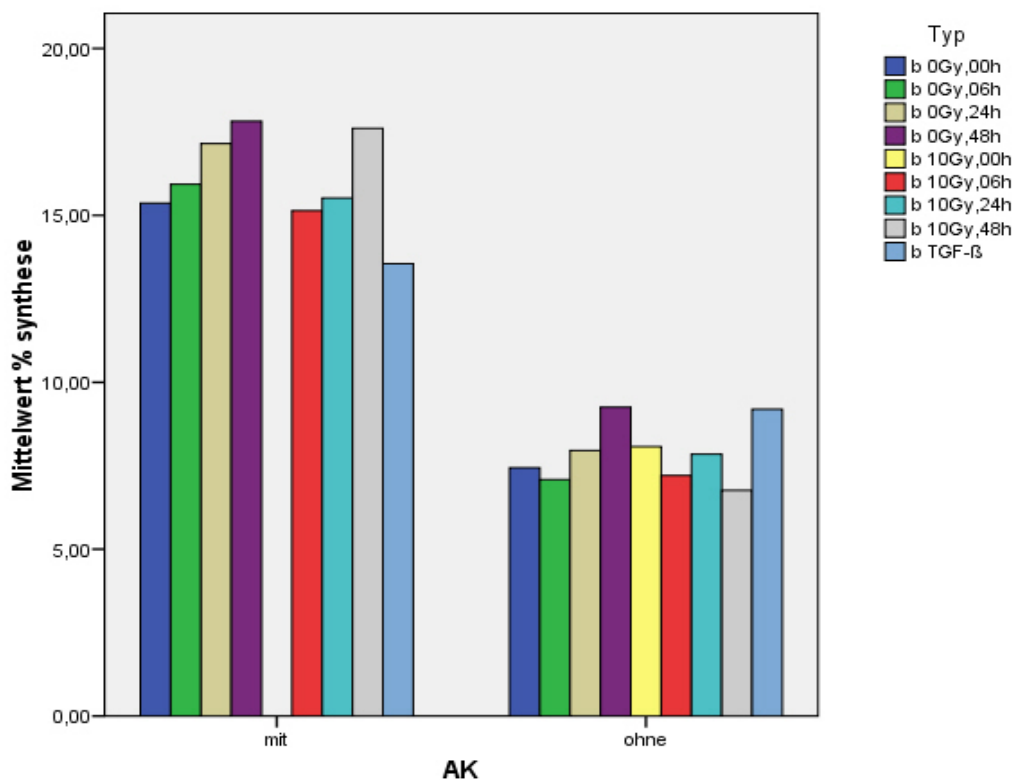


Abbildung 6: Grafik 5: Vergleich der Syntheserate in % von Überständen bestrahlter und nicht bestrahlter Huvec- Zellen mit und ohne TGF- $\beta$ - Antikörper

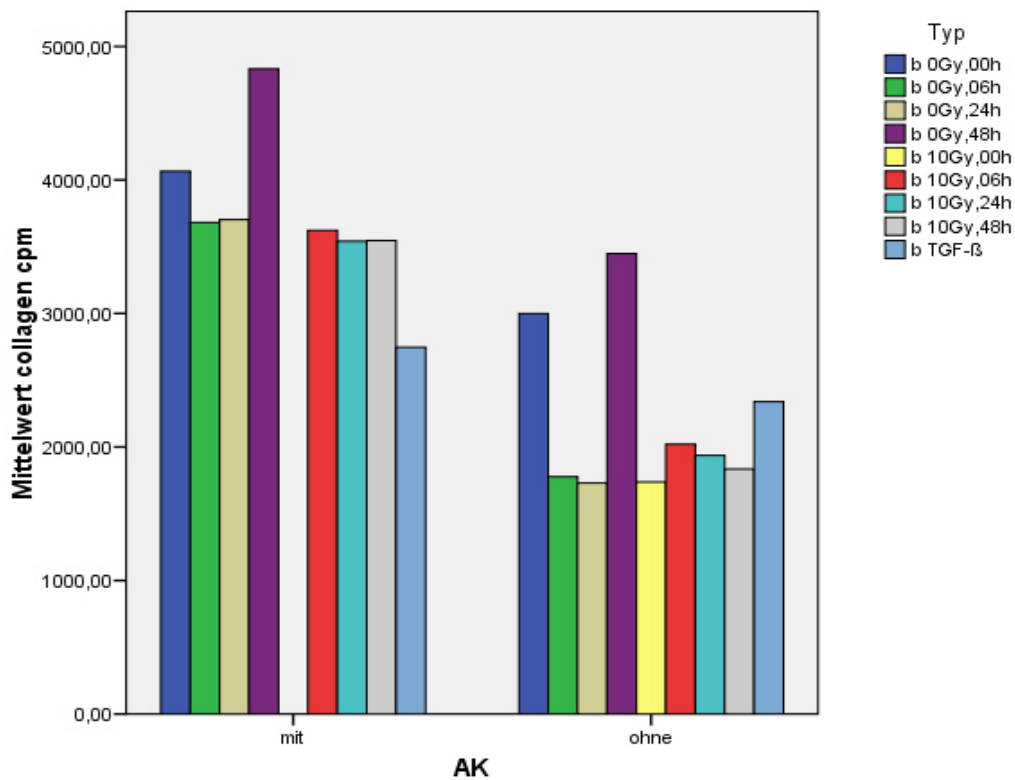


Abbildung 7: Grafik 6: Vergleich der cpm von Überständen bestrahlter und nicht bestrahlter Huvec- Zellen mit und ohne TGF- $\beta$ - Antikörper

Bei den Huvec- Zellen kam es insgesamt zu sehr inhomogenen Ergebnissen während der Versuche, die sich in den Grafiken widerspiegeln: Der TGF- $\beta$ -Antikörper scheint keinen Einfluss auf die cpm oder die Syntheserate zu haben. Es sieht so aus, als wenn der TGF- $\beta$ - Antikörper die cpm und die Syntheserate steigern würde. Im Vergleich zeigen sich aufgrund der hohen Schwankungen und hohen Standardabweichungen keine signifikanten Ergebnisse.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es durch Zugabe von TGF- $\beta$ -Antikörpern zu keiner signifikanten Hemmung der Kollagensynthese bei den Fibroblasten kam. Lediglich bei 0Gy 48h hätte man eine signifikante Hemmung erwarten können, die sich aber in den Tests nicht bestätigt hat. Bei den Alveolarmakrophagen ist aus den Grafiken eine leichte Hemmung durch die TGF- $\beta$ - Antikörper ersichtlich: hier verhält es sich so, dass entweder die Syntheserate oder die cpm signifikante Werte zeigen. Zu keinem Zeitpunkt sind beide Werte signifikant.

Bei den Huvec- Zellen kam es zu einem überraschenden Ergebnis: der Antikörper scheint hier die cpm und die Syntheserate zu steigern. Die Ergebnisse verhalten sich gegenteilig zu den Erwartungen. Hier wäre somit die Ausbildung einer Strahlenfibrose eher negativ beeinflusst.



## 5 Diskussion:

### 5.1 Fazit:

Meine Ergebnisse haben bei allen Zellreihen keinen stimulierenden Effekt von TGF- $\beta$  auf die Kollagensynthese gezeigt. Insgesamt waren meine Werte sehr inhomogen und es kam zu großen Schwankungen bezüglich der Radioaktivität. So zeigten einzelne Versuche völlig unterschiedliche Ergebnisse. Zum Beispiel war in einem Versuch ein stimulierender Effekt nachweisbar. Im folgenden Versuch zeigten sich dann gegenteilige Ergebnisse. Dies könnte daran gelegen haben, dass unterschiedliche Zellpassagen verwendet wurden. Es wäre hier in Zukunft zu untersuchen, ob Versuche mit Zellen der gleichen Passage im Vergleich zu höheren bzw. niedrigeren Passagen ein unterschiedliches Verhalten zeigen. Hierbei könnten Zellen durch häufigeres Passagieren vermehrt äußeren Einflüssen ausgesetzt sein, als die von niedrigeren Passagen. Zudem ist es schwierig, Ergebnisse von Einzelzellkulturen auf die Realität zu übertragen. Eine besondere Zellreihe in den Versuchen waren die Huvec- Zellen, die sehr anfällig waren. Die Anzucht war immer sehr schwierig und die Zellen sind mehrmals ohne erkennbaren Grund eingegangen. Auffällig war auch, dass vor allem die älteren Zellpassagen anfälliger waren und als die jüngeren. Dies spiegelte sich auch in größeren Schwankungen bei den Ergebnissen der einzelnen Versuche wieder. Retrospektiv war das Pipettieren der sehr kleinen Mengen unter anderem die extrem kleinen Mengen von Radioaktivität in die einzelnen wells schwierig und nicht nachzukontrollieren. Vielleicht wäre es bei künftigen Versuchen zu überlegen, ob es eine genauere Dosierungsmöglichkeit für solche kleinen Mengen gibt.

Insgesamt lässt sich nun festhalten, dass eine Hemmung der Kollagensynthese nur in geringem Masse bei den Alveolarmakrophagen zu verzeichnen war. Die Hemmung bei den Fibroblasten war noch geringer und zeigte überhaupt keine signifikanten Veränderungen. Die Huvec- Zellen zeigten eher gegenteiliges Verhalten. Wie bereits oben angemerkt, wäre es interessant weitere Versuche hinsichtlich unserer Hypothese durchzuführen, die wir leider nicht bestätigen

konnten. Eventuell könnten Versuch mit gleichen Zellpassagen durchgeführt werden und die Ergebnisse mit Versuchen anderer Zellpassagen verglichen werden. Zudem wären Ko- Kulturen zu überlegen

Es gibt diverse Ansätze zur Bekämpfung der Strahlenfibrose. Es gibt Möglichkeiten auf den verschiedenen Stufen der TGF- $\beta$ - Wirkung zu intervenieren (8) oder diese durch Interaktionen mittels verschiedenen Inhibitoren oder anderer Zytokine zu vermindern.

Auf diesem Gebiet ist die Forschung noch lange nicht abgeschlossen. In der Literatur finden sich zahlreiche Arbeiten, die sich ebenfalls mit diesem Thema befassen.

## **5.2 Beziehung von TGF- $\beta$ vor und nach Bestrahlung bezüglich der Ausprägung einer Lungenfibrose**

Es konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte TGF- $\beta$ - Plasmawerte vor Bestrahlung mit einem vermehrten Auftreten von Strahlenfibrose korrelieren (45, 51). Gemäß Li et al. (45) entwickelten die meisten Patienten mit erhöhten TGF- $\beta$  Werten vor der Radiotherapie eine Lungenfibrose, während diejenigen, die keine Fibrose entwickelten, signifikant niedrigere TGF-  $\beta$ -Spiegel hatten. Dabei spielen die großen Unterschiede bei den Ausgangsspiegeln aufgrund der individuellen, genetisch bedingten Unterschiede in Produktion, Aktivierung und/ oder Degradierung von TGF- $\beta$  eine bedeutende Rolle (45).

Anscher et al. (4) berichtet von Ergebnissen aus Versuchen mit Makrophagen aus bestrahlten Hasenlungen. Diese zeigten ebenfalls eine erhöhte Produktion und Freisetzung von TGF- $\beta$  im Vergleich zu unbestrahlten Makrophagen (4).

Unter anderem bewiesen Anscher et al. (5), dass erhöhte TGF- $\beta$ - Werte am Ende der Radiotherapie mit einem erhöhtem Risiko korreliert eine Strahlenpneumonitis zu entwickeln. Es ist allerdings noch nicht genau geklärt in wieweit die strahleninduzierte Neusynthese von latentem TGF- $\beta$  (LTGF-  $\beta$  1) und / oder die nachgewiesene, durch Strahlung aktivierte Umwandlung von extrazellulärem LTGF- $\beta$  1 zu aktivem TGF- $\beta$  1 verantwortlich für die TGF- $\beta$  1-

abhängige Regulation der Zellzykluskontrolle und Differenzierung von Fibroblasten sind (54).

Erstmalig wurde eine Korrelation zwischen TGF- $\beta$  -Spiegeln im Blut und pulmonalen Komplikationen in der Klinik bei Patientinnen festgestellt, die aufgrund eines Mammakarzinoms im fortgeschrittenen Stadium mit einer Hochdosischemotherapie und folgender autologer Knochenmarkstransplantation behandelt wurden. Die gleiche Forschergruppe untersuchte später den Zusammenhang von erhöhten TGF-  $\beta$  1-Spiegeln und das Auftreten von Pneumonitiden bei Patienten mit Bronchialkarzinom nach Radiotherapie (39, 42, 54). Bei Auftreten von Pneumonitiden ist interessant, dass das Areal der Pneumonie meist größer ist, als das ursprünglich bestrahlte Lungenvolumen. Dies ist wahrscheinlich auf die Motilität mancher Zellgruppen, wie zum Beispiel Makrophagen und Lymphozyten, zurückzuführen (59).

Rübe C. et al. (55) spricht auch von einer Dosis abhängigen Freisetzung von TG-  $\beta$  nach Radiotherapie. Die zeit- und dosisabhängige Expression von TGF-  $\beta$  mRNA korreliert mit der Immunhistochemie des korrespondierenden Lungengewebes (55). Allerdings kann in der Immunhistochemie der Unterschied zwischen aktivem und inaktivem TGF-  $\beta$  nicht gewährleistet werden (55).

Dem widersprechen allerdings die Ergebnisse von De Jaeger et al. (14): Bei dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen hohen TGF-  $\beta$ - Werten und der Entwicklung symptomatischer Strahlenpneumonitiden nachgewiesen werden. Ähnliche Schlüsse wurden von Nockova- Jiresova A. et al. gezogen (51). Diese Gruppe betont, dass Änderungen im TGF-  $\beta$ - Plasmalevel unterschiedliche Ursachen haben kann. Zum einen kann der Spiegel durch den Untergang der produzierenden Tumorstromazellen sinken, zum anderen kann der Spiegel durch eine erhöhte TGF-  $\beta$ - Bildung von den durch Radiotherapie geschädigten Zellen und durch Leckage in die Blutzirkulation ansteigen (51). Dennoch könnten die Erkenntnis über eine bestehende Beziehung zwischen Fibroseentwicklung und TGF-  $\beta$  eine guter Ansatz zur Bekämpfung der Strahlenfibrose und einer Anpassung der Dosis sein (45).

### 5.3 TGF- $\beta$ -Antikörper

In meinen Studien konnte ich nicht zeigen, dass die Produktion von Kollagen von TGF- $\beta$  abhängig ist. Ergebnisse, welche doch eine Abhängigkeit beweisen, wurden von anderen Forschergruppen erzielt. In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass TGF-  $\beta$ - Antikörper die Lungenfibrose in- vivo und in- vitro und die Fibrogenese in Fibroblasten in- vitro mindert (8, 11, 19, 27, 47). Hier kommen sowohl neutralisierende TGF-  $\beta$  -Antikörper, als auch lösliche Typ II Rezeptoren für TGF-  $\beta$  in Frage (38). TGF-  $\beta$  hemmt nicht nur die strahleninduzierte terminale Differenzierung, sondern auch die normale Differenzierung unbestrahlter Fibroblasten (27).

Es gibt eine Studie mit C57/Bl6- Mäusen, die vor einer Thoraxbestrahlung mit 15 Gy einen monoklonalen anti- CD40L- Antikörper erhielten, der die Interaktion von CD40 und CD40L stört. Die Kontrollgruppe erhielt Hamster Immunglobulin G. Die Tiere wurden nach der Bestrahlung über 26 Wochen mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Es stellte sich dabei heraus, dass die Tiere mit dem Antikörper weder an einer Strahlenpneumonie und noch an einer Strahlenfibrose starben. Die Lungenveränderungen waren durch den reduzierten Einfluss von inflammatorischen Zellen, minimaler Kollagendeposition und Verdickung der Alveolarsepten reduziert. Der Antikörper war ebenso für die verminderte Mastozytose und die eingeschränkte Expression von Cyclooxygenase-2, einem proinflammatorischen Enzym zur Induktion der Prostaglandin-Synthese, verantwortlich (50). Frau Teicher (58) fasst in ihrem Expose die Auswirkungen von TGF-  $\beta$  auf das Immunsystem sehr gut zusammen. Durch die hohe Konzentration von TGF-  $\beta$  wird eine Art Immuntoleranz geschaffen und die Immunreaktion auf den Tumor vermindert.

Die Anwesenheit von Antikörpern kann all diese Effekte reduzieren. Bei allen Tumorerkrankungen, bei denen ja das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt, ist die Anwesenheit von Antikörpern für die Prognose beträchtlich, was die unerwünschten Nebenwirkungen betrifft (58).

#### **5.4 Strahleninduzierte Zytokinproduktion durch den Tumor**

Die Möglichkeit, dass der Tumor selbst für eine erhöhte TGF-  $\beta$ 1- Produktion verantwortlich ist, ist ein nicht zu vernachlässigender Tatbestand. Insbesondere Tumorzellen von Bronchialkarzinomen sezernieren häufig große Mengen an TGF-  $\beta$ 1 sowohl in vitro als auch in vivo (51, 54).

Bei Patientinnen mit Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass sich erhöhte TGF-  $\beta$  1- Werte nach Resektion des Primärtumors normalisierten. Dieser Effekt trat aber erst bei einem fortgeschrittenen Karzinom ab Stadium 3 ein. In den Stadien 1 und 2 konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden (54).

#### **5.5 Versuch der Modifikation der Zytokinexpression**

Vergleicht man aber nun die Zytokinexpression in fibroseresistenten (CBA- und C3H- Mäuserassen) und fibrosesensiblen (C57- Mäusestämmen) Mäusen, so fallen gewisse Unterschiede auf, mit denen Hypothesen bezüglich der Pathogenese der radiogenen Pneumonitis und Fibroseentwicklung überprüft werden können. Das Ergebnis zeigt, dass TGF-  $\beta$ , TNF-  $\alpha$  und IL-1a zur Fibrosebildung beitragen, während IL-1a allen Anschein nach auch eine protektive Wirkung haben könnte (40, 54). Nun stellt sich die Frage, ob man die Entwicklung einer strahleninduzierten Fibrose mit Hilfe der Zytokine bzw. deren Beeinflussung reduzieren und/ oder aufhalten kann. Bisher gab es schon einige Forschergruppen, die an dieser Idee gearbeitet haben.

Bei einem Versuch mit C57/Bl6 –Mäusen kam man zu dem Ergebnis, dass die TNF-  $\alpha$ - Expression auf mRNA- und Proteinebene und auch die Infiltration von inflammatorischen Zellen in das Lungenparenchym reduziert ist (54).

## **5.6 Liposom Cu/Zn Superoxyd Dismutase (SOD) und Relevanz von ICAM-1**

Bei der strahlensiblen Mäuserasse C57/Bl6 konnte eine leicht reduzierte TNF- $\alpha$ , TGF-  $\beta$  1- und IL-1- mRNA Expression nachgewiesen werden, die durch eine intratracheale Injektion eines „magnesium superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposome“- Komplexes induziert wurde (54).

Nach dreiwöchiger Applikation zeigte sich bei Patienten eine deutliche Besserung des Befundes nach längerer Radiotherapie. In dieser Zeit wurden zwei Mal pro Woche 5mg i.m. injiziert, was von den Patienten gut toleriert wurde. Die Ergebnisse konnten sowohl in verschiedenen Tierversuchen als auch bei Menschen reproduziert werden (47, 50). Der genaue Mechanismus ist noch unklar. Nieder C. et al (50) berichtet von Ergebnissen, bei denen die Wirkung folgendermaßen erklärt wird. Die Behandlung mit SOD verzögert die Expression vom vaskulären Zelladhäsions- Molekül- 1 sowie vom intrazellulären Adhäsionsmolekül- 1 (ICAM-1) (50). Diese Ergebnisse zeugen von der Möglichkeit der Fibrosehemmung auf dieser Ebene. Weitere Studien in dieser Richtung bewiesen, dass bei Mäuse mit einer Null-Mutation von ICAM-1 weniger Anzeichen einer Lungenfibrose als bei ICAM-1(+/-)-Mäusen festzustellen waren (50). In- vitro konnte nach einer einwöchigen Inkubation eine verringerte TGF-  $\beta$ - Expression sowohl auf RNA, als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die mRNA für die  $\alpha$ 1(I) Kollagenkette wurde ebenfalls herunter reguliert. Die Ergebnisse mit Schweine-Myofibroblasten glichen denen mit menschlichen Myofibroblasten.

Letztendlich kann festgehalten werden, dass SOD innerhalb der Zelle TGF-  $\beta$ 1 die „tissue inhibitor of metalloproteinase“ (TIMP) inhibiert und somit eine antifibrotische Wirkung hat (47). Aber auch in der inflammatorischen Phase sinkt die Expression von ICAM-1 extrem, in fibrotischen Läsionen sogar auf Null. Als mögliche Ursache wird ein Versagen der natürlichen Auflösung des inflammatorischen Exsudates durch Alveolarmakrophagen und Leukozyten genannt, da diese von den geschädigten Pneumozyten nicht mehr

herangezogen werden können. Dieses Ergebnis steht aber widersprüchlich oben genanntem Resultat gegenüber (59).

## 5.7 Zytoprotektive Substanzen

Als zytoprotektive Substanz wird Ethylol{Amifostin; Ethanthiol, 2-[(3-Amino. Propyl)- amino] dihydrogenphosphat(ester)} erwähnt. Der Einsatz erfolgte bei der Einzelbestrahlung einer Thoraxhälfte bei Ratten und bewirkte sowohl eine verminderte Expression als auch eine Aktivierung von TGF-  $\beta$  1 im Lungengewebe mit daraus resultierendem niedrigen TGF-  $\beta$  1 Spiegel im Plasma. Die reduzierten TGF-  $\beta$  1 Werte im Blut korrelierten sowohl mit den histologischen als auch funktionellen Veränderungen nach strahleninduzierter Lungenschädigung (54).

## 5.8 Therapie mit Kortikosteroiden

In der Klinik werden üblicherweise Kortikosteroide zur Minderung der Strahlenpneumonitis verabreicht (31, 47). In Tierstudien wurde gezeigt, dass hierdurch die Entwicklung einer Strahlenpneumonitis verzögert wurde. Dieser Effekt konnte bezüglich der Lungenfibrose nicht bestätigt werden (31, 50). Für das schlechte Ansprechen auf diese Therapie könnte eine Beobachtung sein, die zeigt, dass sich Fibroblasten nach Zytokin- Stimulation verselbständigen können (39).

Sechs Stunden nach der Bestrahlung steigt die strahleninduzierte pro-inflammatorische Zytokin mRNA Expression in der Lunge (32). Dexamethason hemmt sowohl die basalen Zytokin mRNA- Level, als auch die frühe Antwort, wenn es direkt nach der Bestrahlung verabreicht wird (32, 54). Allerdings kam es nach 24 Stunden zu einem starken Rebound- Effekt, der bis zu drei Tage anhielt (32). Obwohl Glukokortikoide die Produktion der inflammatorischen Zytokine über transkriptionale und post- transkriptionale Mechanismen regulieren, ist der Rebound- Effekt nach Absetzen von Dexamethason unklar

(32). So wird die Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten mit einer Erfolgsrate von ca. 20-30% nur als bedingt erfolgreich angesehen (38)

### **5.9 Transiente transgene Expression von Decorin zur Neutralisierung der Wirkung von TGF- $\beta$**

Bestandteile der Extrazellulärmatrix können durch ihren Einfluss auf die Proteonsynthese sowohl hinsichtlich stimulierender als auch hemmender Effekte in die Kollagensynthese intervenieren. Hierbei spielen besonders die kleinen Proteoglycane eine Rolle, die bei Gewebsremodeling und bei der Fibroseentwicklung nicht außer Acht zu lassen sind. Das Proteoglykan Decorin, ein Leucin- reiches kleines Proteoglycan mit einem Gewicht von 100kD und einem Coreprotein von etwa 45kD und zwei Bindungsstellen für alle TGF-  $\beta$  - Isoformen, ist ein natürlicher Gegenspieler von TGF- $\beta$ . Es neutralisiert TGF-  $\beta$  und hemmt somit seine Wirkung in- vitro. Ein anderes Proteoglycan, Biglycan kann seine in- vitro nachgewiesene Wirkung in- vivo nicht beweisen (37, 38) Um die Wirksamkeit von Decorin zu verlängern bzw. die im Gegensatz zu TGF-  $\beta$  niedrige Konzentration zu erhöhen, versucht man mittels eines Adenovirus, welches als Vektor dient, das Decorin- Gen in die Lungen von Mäusen zu bringen, die durch Bleomycin- induziert fibrotisch wurden. Die transgene Expression von Decorin wird durch eine einmalige intranasale Applikation induziert (38). Man erhofft sich davon, den inflammatorischen Prozess zu vermindern und die natürlichen Regenerationsvorgänge zu unterstützen. Die mit Decorin- Gentransfer behandelten Tiere zeigen einen signifikant niedrigeren Fibrosegrad mit weniger dichten Narben (38). Zu beachten ist aber trotzdem, dass die Expression transient ist und je nach Vektor nur zwei bis drei Wochen andauern kann (38). Das bedeutet, dass für den Patienten wiederholte Anwendungen unausweichlich sind. Dabei stellt die Immunogenität der Vektoren zur Zeit noch ein Problem dar (38). Darüber hinaus ist das Vorkommen von Decorin von Spezies zu Spezies unterschiedlich, was in verschiedenen vorangegangenen Studien zu diversen Ergebnissen führte. Festzuhalten ist aber die Tatsache, dass in menschlichen Lungen eine erhöhte



Konzentration von Decorin im Narbengewebe extrazellulär und in Myofibroblasten intrazellulär nachgewiesen werden konnte.

### **5.10 Diverse TGF- $\beta$ - Inhibitoren**

Neben den bereits erwähnten TGF-  $\beta$  -Antikörpern gibt es Substanzen, die auf die Expression, Synthese und/ oder Freisetzung von TGF-  $\beta$  Einfluss haben.

Eine erhöhte Bindung von TGF-  $\beta$  an den löslichen CD105 Rezeptor führt zu einem niedrigeren Risiko an Lungenfibrose zu erkranken(45).

Zum Beispiel spielt das Glycoprotein Fibronectin in der Pathogenese der Lungenfibrose eine Rolle. Fibronectine sind eine Familie von Glycoproteinen mit breitem Wirkungsspektrum. Sie haben eine tragende Rolle bei der Organogenese und der Wundheilung: es kommt zu Interaktionen mit diversen Interzellulärmolekülen, fördern die Proliferation und Adhäsion verschiedener Zellen und sind für inflammatorische Zellen und Fibroblasten chemotaktisch. Ein Anstieg von Fibronectin konnte in der BAL unter anderem nach Applikation ionisierender Strahlen gemessen werden (39). Dieser Faktor bietet also einen weiteren Angriffspunkt in der Therapie der Lungenfibrose.

Daneben schützt der Keratinozyten- Wachstumsfaktor, der ein potenter Wachstumsfaktor für Pneumozyten Typ II ist (49, 55), vor einem Anstieg von TGF-  $\beta$  (49).

Rekombinantes LAP, das Latenz assoziierte Peptid von TGF-  $\beta$ , zeigte sich als potenter Inhibitor von bioaktivem TGF-  $\beta$  in- vitro und in- vivo in transgenen Mäusen (47).

Cyclosporin A inhibiert die durch TGF- $\beta$  vermittelte Stimulation der Lungenfibroblasten in- vitro durch die direkte Hemmung der TGF- $\beta$ - induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors JunD (36).

Interleukin- 10 senkt signifikant die TGF- $\beta$  stimulierte Typ I Kollagen Expression in humanen Lungenfibroblasten in- vitro (60). Die mit Interleukin- 11 behandelten Mäuse hatten eine bessere Überlebensrate nach einer

Bestrahlung von 25 Gy als die Kontrollgruppe, bei der 50% innerhalb der ersten zwei Wochen verstarben (50). 89% der mit Interleukin- 11 behandelten Gruppe überlebten die Radiotherapie. Die Ursache wird in einer durch Interleukin-11 induzierten inhibierten Expression von TNF mRNA in vivo gesehen. Weiter Faktoren sind die in Makrophagen produzierten TNF Proteine sowie eine mRNA Akkumulation (50).

Weiterhin gehören zu dieser Gruppe der TGF-  $\beta$ - Inhibitoren unter anderem ACE- Hemmer, deren kardio- und renoprotektive Wirkung auf einen antifibrotischen Effekt zurückzuführen ist. Zumindest ist Angiotensin- II in- vitro ein potentes Mitogen für Fibroblasten. In Untersuchungen bei strahleninduzierter Nieren- und Lungenfibrose reduzierten sowohl die ACE- Hemmer Captopril und Enalapril als auch die Angiotensin- II- Rezeptor- Antagonisten die Fibroseentwicklung (42, 56). Bei mit Butylaminiperindoperil behandelten Mäusen zeigte sich eine verminderte Transkription von TGF-  $\beta$ 1. Bei einer Studie mit Patienten, die mit 50-80 Gy bestrahlt wurden, zeigte sich zwischen der Gruppe, die mit ACE- Inhibitoren behandelt wurde, und der Kontrollgruppe allerdings kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Auftreten von Strahlen induzierter Pneumonie (50).

Interferon-  $\gamma$ , Pirfenidon und Relaxin sind neuere antifibrotisch wirkende Substanzen:

Eickelberg et al. (20) kam in seiner in- vitro Studie mit menschlichen Lungenfibroblasten zu dem Ergebnis, dass Interferon- $\gamma$  über die Aktivierung eines Signalübermittlers und des Aktivator der Transduktion STAT- 1 einen inhibitorischen Effekt auf die TGF-  $\beta$ - induzierte Fibrose ausübt. Darüber hinaus hemmt Interferon- $\gamma$  die Matrixproduktion und die Fibroblastenproduktion (23, 56).

Interferon-  $\gamma$  hemmt die Proliferation der Fibroblasten und ihre Proteinbiosynthese (42) durch die Expression des inhibitorischen Smad 7- Proteins, welches der Zellantwort von TGF-  $\beta$  vorbeugt (47). In einem Vergleich einer Interferon –  $\gamma$  –Therapie gegen eine Prednisolon- Therapie schnitten die Patienten mit Interferon-  $\gamma$  besser ab (42). Die Kombination von Interferon-  $\gamma$ 1b

mit oralen Glukokortikoiden führte zu einer Verbesserung oder Stabilisierung bei der idiopathischen Lungenfibrose (56). Bei der Anwendung von Interferon  $\alpha$ -2b bei hypertrophen Narben, kam es zu einer Verminderung der Narbenbildung und einer Normalisierung der TGF-  $\beta$ -Level im Patientenserum (47). Bei deutlicher klinischer Besserung sind aber leider erheblich unerwünschte Nebenwirkungen sowie Toxizität bekannt (47).

Pirfenidon hemmt die in- vitro- Proliferation, also die Kollagensynthese.

Colchicin vermindert die Kollagenproduktion durch Fibroblasten und könnte die Kollagendegradation verstärken (56). Allerdings konnte in klinischen Studien keine höhere Effektivität als die Therapie mit Glukokortikoiden nachgewiesen werden (56).

D- Penicillamin vermindert die Kollagensynthese durch Störung der Kollagenquerverbindungen und Matrixsekretion von Fibroblasten (42). Es kommt darüber hinaus zu einer Blockade des mitogenen Effekts von profibrotischen Zytokinen (56). In- vivo wird die Genexpression von TGF-  $\beta$  und dem platelet- derived growth factor gehemmt (56). In einer Phase –II-Studie wurde die Substanz gut vertragen. Die Lungenfunktionsparameter blieben stabil (42, 56).

Relaxin ist eigentlich eine vom Corpus luteum produzierte Substanz, die bei der Geburtsvorbereitung die Symphyse und die Zervix erweicht. Diese Substanz hemmt die TGF-  $\beta$  - induzierte Kollagensynthese in vitro (42, 56). Zudem stimuliert sie die Expression von Kollagenase-1 von humanen Lungenfibroblasten in- vitro (56). In vivo wirkt sie antifibrotisch und beeinflusst das Protease- Antiprotease- Gleichgewicht zugunsten des Matrixabbaus. Bei Sklerodermiepatienten konnte hinsichtlich der Hautveränderungen und der Lungenfunktion positive Erfolge nachgewiesen werden (42). Klinisch reduzierte sie die Strahlen- und Bleomycin- induzierte Fibrosebildung (56). Im Hinblick auf die idiopathische Fibrose konnte keine Wirkung gezeigt werden (56).

<b>Molekül, Verfügbarkeit</b>	<b>Therapeut. Einsatz</b>	<b>Begünstigender Effekt auf</b>	<b>Inhibierung der Matrix- synthese</b>	<b>Reduktion d. Entzündung</b>	<b>Wachstums- faktor, Antagonis- mus</b>
Colchicin, verfügbar	experimentell	Fibrose	+		
Interferon- $\gamma$ , nicht verfügbar	experimentell klinisch	Fibrose Fibrose	+	+	
Interferon- $\alpha$ , verfügbar	experimentell klinisch klinisch	Fibrose Hypertroph. Narben Fibrose	+	TGF- $\beta$	
Gluko- kortikoide, verfügbar	experimentell	Fibrose	+	+	
Ess. Fett- Säuren, nicht verfügbar	experimentell	Fibrose	+	+	
SOD, nicht verfügbar	Klinisch Klinisch experimentell	Fibrose Fibrose Fibrose	+	+	
Pentoxifyllin, verfügbar	Klinisch Klinisch experimentell	Schmerz Schmerz Kein Effekt auf Fibrose	+	+	
Vit. E, verfügbar	Klinisch	Fibrose			
Pentoxifyllin+	Klinisch	Fibrose	+	+	
Vit. E, verfügbar	experimentell	Fibrose	+	+	TGF- $\beta$

Direkte TNF- $\alpha$ - Antagonisten	experimentell	Fibrose	+		TNFR- $\beta$ Rezeptor
Antikörper von Integrinen	experimentell	Fibrose	+	+	

*Abbildung 8: Aus Referenz 47: Molecules used in vivo in therapeutic strategies against established fibrotic disorders of various etiology*

### 5.11 Huvec- Zellen als neuer Therapieansatz

Als wir für unseren Versuch die Huvec- Zellreihe aussuchten, erhoffte ich mir weitere neue, aussagekräftige Ergebnisse. Es gab bisher keine vergleichbaren Studien mit diesen Zellen in Bezug auf die Strahlenfibrose. Ohne ausreichende Neubildung von Gefäßen kann kein Tumor wachsen. Dies muss bei der Tumorbekämpfung berücksichtigt werden. Bei einer Strahlentherapie werden natürlich auch die Gefäße betroffen. So ist die Blutkoagulation und Thrombosebildung durch die Freisetzung des von Willebrandt- Faktors durch die Endothelzellen von Bedeutung. Die Synthese und Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den Endothelzellen ist dabei ebenfalls erhöht. Die Reaktion der Endothelzellen auf Bestrahlung ist durch Extrazellulärmatrix beeinflusst (60). Nach Radiotherapie ist nachgewiesen, dass die Proliferation von Gefäßendothelzellen vom 20-fachem auf das 200-fache erhöht ist im Vergleich zu unbestrahlten Gefäßen (60).

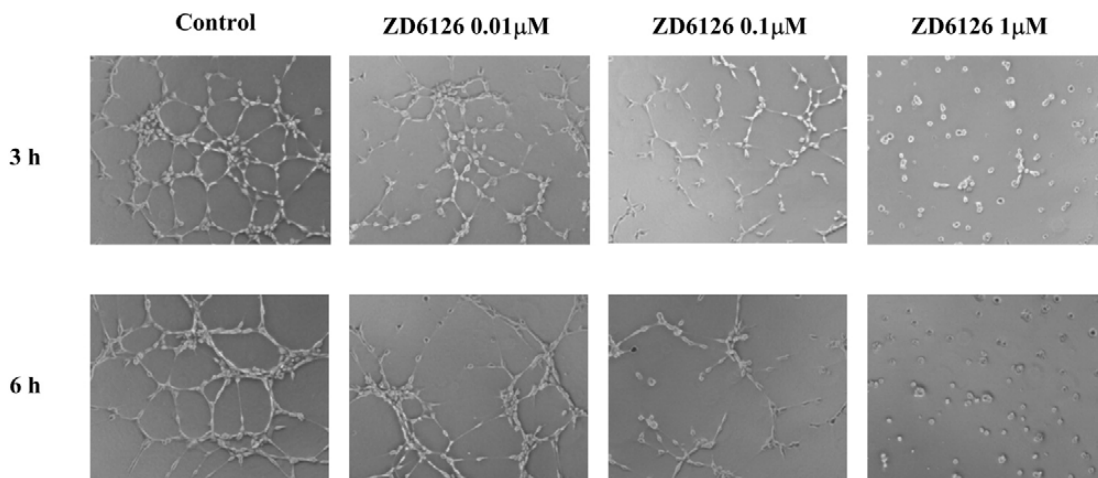
#### 5.11.1 Hemmung der Gefäßneubildung

Es wird die Möglichkeit beschrieben, zytotoxische Medikamente an ein PEG (polyethylene glycole) modifiziertes kationisches Lipid zu hängen und so an den Ort des Geschehens zu transportieren. Dort wird eine erhöhte Aufnahme in die Zielzelle bei höherer kationischer Ladung beobachtet, wobei das Ursprungsgewebe der Endothelzellen keine Rolle zu spielen scheint (13). Die Aufnahme wird durch das retikuloendotheliale System limitiert. Die Affinität ist

für Tumorzellendothelien erhöht (13). Dies ist ein therapeutischer Ansatz, die den Tumor versorgende Gefäßneubildung zu stören.

### 5.11.2 ZD6126 mit antivaskulärer- und antitumor- Aktivität

Eine andere Studie hat ebenfalls die These aufgestellt, dass ein Tumor neue Blutgefäße benötigt, um zu wachsen und zu metastasieren. Basierend auf dieser Idee wurden Versuche mit ZD6126 durchgeführt. Diesem Agens wird eine antivaskuläre- und antitumor- Aktivität sowie eine besondere Affinität zu Tumorgefäßen nachgesagt. Es bindet zelluläres Tubulin und führt zu einer Destabilisierung des Tubulinzytoskeletts. So konnte bei Patienten mit Lungentumoren eine erhöhte Tumorzellvernichtungsrate in Kombination mit Radiotherapie erzielt werden. In- vitro konnte bei Huvec- Zellen ein antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden- und dies sogar dosisabhängig (30).



*Abbildung 9: aus Referenz 30: Inhibitory effect of ZD6126 on capillary-like network formation in human umbilical vein endothelial cells. Human umbilical vein endothelial cells were seeded and exposed to ZD6126 in a 24-well tissue culture plate coated with Matrigel, as described in Methods and Materials. Wells were examined for tube formation at different time points. Photographs show representative images from the control and treatment groups. ZD6126 inhibits the tube formation process in human umbilical vein endothelial cells in a dose-dependent manner after 3, 6, and 24 h of incubation (data at 24-h time point not shown). Similar results were obtained in replicate experiments.*

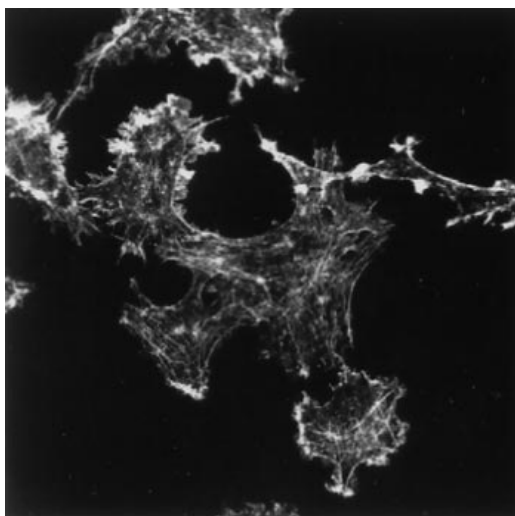
### 5.11.3 Einfluß von Lipoproteinen, VEGF, Plasminogen Aktivator- Inhibitor

Takami et al. (57) befasste sich unter anderem mit dem Zusammenhang von Lipoprotein (a) und TGF- $\beta$  nach Radiotherapie. Er fand heraus, dass Lipoprotein (a) den Spiegel von aktivem TGF-  $\beta$  verringerte. Rekombinantes TGF- $\beta$  wiederum senkte die Lipoprotein induzierte Expression von ICAM-1 signifikant. Diese Ergebnisse ließen ihn auf die Möglichkeit schließen, dass Lipoprotein (a) die ICAM-1 Expression verstärkt, indem der Level von aktivem TGF- $\beta$  gesenkt wird (13).

Es fanden sich bei den primären Huvec- Zellen Wachstumsfaktorrezeptoren (VEGF), die bei der Angioneogenese eine große Rolle spielen. Nach Zugabe von rh VEGF 165 konnte eine erhöhte Proliferationsrate beobachtet werden. Dennoch bestand wider früheren Studien kein oder nur sehr wenig Schutz vor Strahlenschäden bei Huvec- Zellreihe, außer der Huvec- C- Linie (18).

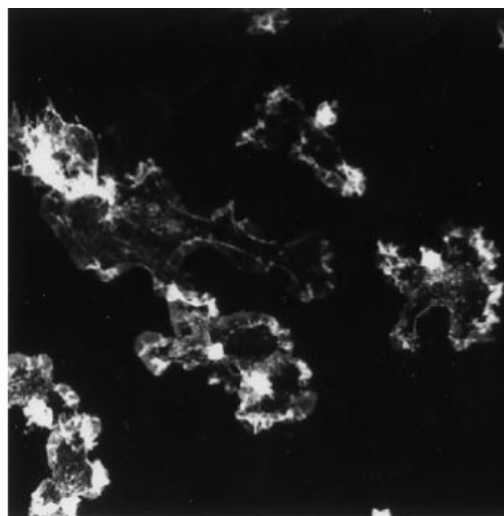
TGF- $\beta$  stimuliert die Produktion von Plasminogen Aktivator- Inhibitor (PAI-1) durch Huvec- Zellen. VEGF selbst hat keinen Einfluss auf die PAI-1-Produktion. Hingegen hat die Zugabe von VEGF einen inhibierenden Effekt auf die TGF- $\beta$  stimulierte PAI-1-Produktion. (62). Dieser Effekt soll auf Transkriptionsebene begründet liegen (62).

A



Control

B



TGF- $\beta$  5 min

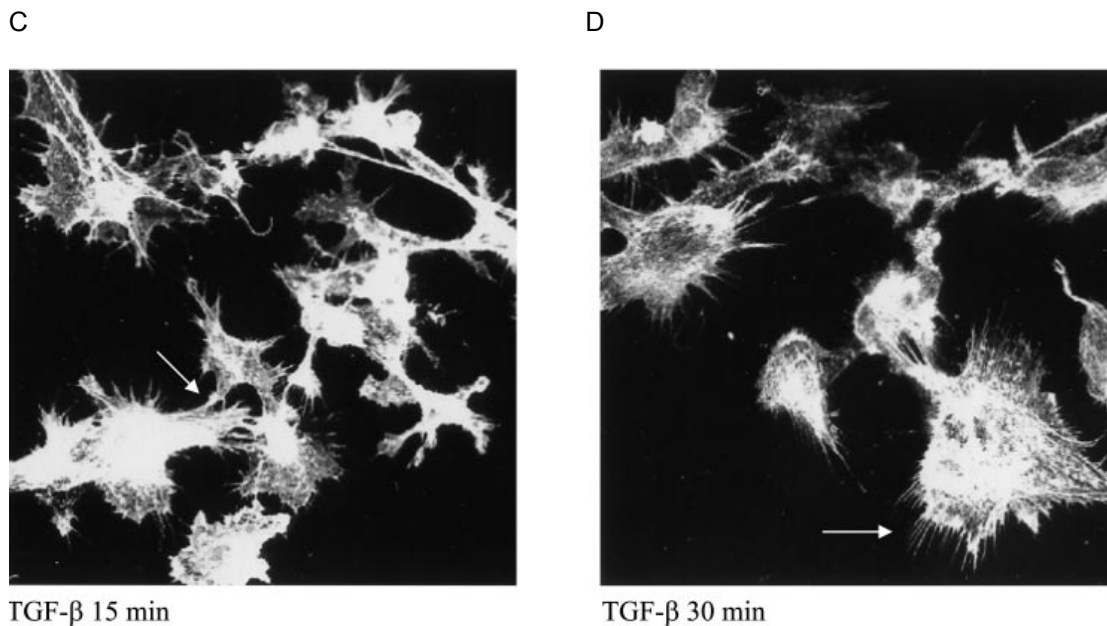


Abbildung 10: aus Referenz 33: Induction of filipodia formation by transforming growth factor (TGF)- $\beta$  in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). HUVEC were treated with vehicle or TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) for various time points and cells were fixed and stained with rhodamine-phalloidin. (A-D). Confocal microscopy was used to visualize cells and representative photographs were obtained. There is a dramatic increase in F-actin following TGF- $\beta$  treatment at 15 and 30 min. Filipodia formation was noted in between cells as well (C) as away from neighboring cells (arrows; D).

#### 5.11.4 TGF- $\beta$ und das Zytoskelett von Huvec- Zellen

In der Studie von Hu et al. (30) zeigte sich, dass es aufgrund der Anwesenheit von TGF- $\beta$  zu Alterationen im Zytoskelett der Huvec-Zellen kam. Es bildete sich eine so genannte „filipodia formation“ und eine Ansammlung von F- Actin.

Die Ansammlung von F- Actin konnte durch Blockierung des TGF- $\beta$  -Rezeptors aufgehoben werden.

Darüber hinaus konnte eine Stimulation bei der Produktion von ROS (reactive oxygen species) nachgewiesen werden, die für 60 min. anhielt und über NOX4, eine Isoform der NADPH Oxidase, läuft (33). Allerdings können die TGF- $\beta$  bedingten Veränderungen durch die dominant-negative Nox4 geblockt werden (33).



Obwohl ich in meinen Versuchen keine signifikante Kollagenproduktionsrate nachweisen konnte, sind die Endothelzellen nicht unbedeutend für den weiteren Verlauf nach Radiotherapie. Wie in den Studien beschrieben wurde, setzen diese Zellen auch vermehrt TGF-  $\beta$  frei. Deshalb ist es wichtig, auch an diesen Zellen weiter zu forschen, um die TGF- $\beta$ - Sekretion nach Bestrahlung so niedrig wie möglich zu halten.

#### 5.11.5 Beobachtungen

Zum Abschluss sei noch erwähnt, dass kurioserweise das Auftreten von Strahlenpneumonitiden unter Rauchern geringer sei (28, 59, 61).

Bei bekannter COPD und der Anwendung von Mitomycin in der Chemotherapie ist das Risiko an einer Strahlenpneumonie zu erkranken wiederum erhöht (53).

Eine adjuvante Chemotherapie hat keinen Einfluss auf die Inzidenz von Strahlenpneumonien, aber verdoppelt fast die Rate der Fibroseinzidenzen (59).

Patienten höheren Alters erkrankten häufiger an Strahlenpneumonitiden mit Übergang in eine Strahlenfibrose als jüngere Patienten (59).

## 6 Zusammenfassung:

In der Behandlung von Tumoren im thorakalen Bereich sind die Möglichkeiten einer Therapie mittels Radiatio durch das Risiko einer strahlen- induzierten Lungenfibrose limitiert. Durch frühere Arbeiten und gemäß der Literatur spielt bei diesem Vorgang TGF-  $\beta$  als profibrotisches Schlüsselzytokin eine bedeutende Rolle. Ich habe untersucht, ob sich die Synthese von Kollagen, welches für die Ausbildung einer Fibrose steht, durch einen TGF-  $\beta$ - Antikörper reduzieren lässt. Dies wäre ein Therapieansatz zur Prävention oder Minderung der Strahlenfibrose. In meinen Versuchen arbeitete ich mit Lungenfibroblasten und Alveolarmakrophagen des strahlensensiblen Mäusestammes C57/Bl6 sowie mit Huvec- Zellen (human umbilical vein endothelial cells), da die Angiogeneese beim Tumorwachstum eine große Rolle spielt. Jede Zellgruppe wurde mit 10Gy bestrahlt und die Überstände, die nach 0h, 6h, 24h und 48h gesammelt wurden, sowie die Zellüberstände von nicht bestrahlten Zellen gleicher Zeitpunkte mit Lungenfibroblasten inkubiert. Im Medium befand sich radioaktiv markiertes  $^3\text{H}$ -Prolin, welches in Kollagen eingebaut wird. So konnte die Kollagensynthese durch Messung der cpm im  $\beta$ - Counter gemessen werden. Diesen Effekt hoffte ich durch Wiederholung der gleichen Versuche mit Zugabe eines TGF- $\beta$ - Antikörpers zu inhibieren oder zu mindern.

Nach Auswertung der Daten zeigt sich, dass es bei den Fibroblasten und Alveolarmakrophagen zu einer verminderten Synthese kam, die aber nicht bezüglich der cpm und der Synthese signifikant waren. Lediglich bei den Alveolarmakrophagen kam es zu signifikanten Veränderungen entweder in der Gruppe cpm oder in der Gruppe Synthese. Bei den Huvec- Zellen konnte keine Hemmung der Synthese gezeigt werden. Entgegen meinen Erwartungen stiegen die cpm und die Synthese durch die Zugabe des Antikörpers. Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden und bleibt zukünftigen Arbeiten vorbehalten.

Letztendlich kann festgehalten werden, dass es zu einer gewissen Hemmung der Kollagensynthese bei den Fibroblasten und Alveolarmakrophagen kam. Die Huvec- Zellen verhielten sich gegenteilig zu den Erwartungen.

Unsere Ergebnisse konnten leider in- vitro keinen hemmenden Effekt durch Zugabe von TGF- $\beta$ - Antikörpern auf die Kollagensynthese liefern. Hiermit hätte in Bezug auf die Ausbildung einer strahlen- induzierten Fibrose in- vivo keine Verbesserung erzielt werden können, obwohl dies in der Literatur nachgewiesen wurde. Es besteht in dieser Hinsicht also weiterhin noch viel Forschungsbedarf.

## 7 Anhang:

### 7.1 Daten:

#### 7.1.1 Fibroblasten:

AK	Typ		% synthese	collagen cpm
mit	b 0Gy,00h	Mittelwert	2,9753	979,3356
		N	9	9
		Standardabweichung	1,09112	577,35323
	b 0Gy,06h	Mittelwert	3,0092	913,7779
		N	9	9
		Standardabweichung	,69343	531,69829
	b 0Gy,24h	Mittelwert	3,0270	955,2687
		N	9	9
		Standardabweichung	,51732	563,27060
	b 0Gy,48h	Mittelwert	2,6528	978,2057
		N	9	9
		Standardabweichung	,57380	510,19077
	b 10Gy,00h	Mittelwert	3,3871	1045,1887
		N	9	9
		Standardabweichung	1,31974	707,79464
	b 10Gy,06h	Mittelwert	3,1725	973,2070
		N	9	9
		Standardabweichung	,78476	468,50326
b 10Gy,24h	Mittelwert	3,1358	1039,6465	
	N	9	9	
	Standardabweichung	,99387	586,44093	
b TGF- $\beta$	Mittelwert	3,9355	1564,4742	
	N	9	9	
	Standardabweichung	1,97318	1342,64488	

ohne	Insgesamt	Mittelwert	3,1619	1056,1380
		N	72	72
		Standardabweichung	1,09368	704,69525
	b 0Gy,00h	Mittelwert	4,5891	1110,3766
		N	9	9
		Standardabweichung	2,96475	481,74896
	b 0Gy,06h	Mittelwert	4,3941	964,1378
		N	9	9
		Standardabweichung	2,35881	201,75844
	b 0Gy,24h	Mittelwert	3,1042	1088,8475
		N	6	6
		Standardabweichung	,49734	313,44907
	b 0Gy,48h	Mittelwert	4,9278	1196,8104
		N	9	9
		Standardabweichung	2,66353	612,73363
	b 10Gy,00h	Mittelwert	3,2735	952,2754
		N	9	9
		Standardabweichung	,65968	295,68002
	b 10Gy,06h	Mittelwert	2,9332	873,1978
		N	9	9
		Standardabweichung	,61689	329,35605
b 10Gy,24h	Mittelwert	4,9748	789,1116	
	N	9	9	
	Standardabweichung	5,33690	339,44793	
b 10Gy,48h	Mittelwert	3,6134	634,4996	
	N	3	3	
	Standardabweichung	,13204	202,16880	
b TGF- $\beta$	Mittelwert	8,1265	1535,9944	
	N	9	9	
	Standardabweichung	9,46225	478,75208	
Insgesamt	Mittelwert	4,5616	1044,9128	

		N	72	72
		Standardabweichung	4,27099	444,13711
Insgesamt	b 0Gy,00h	Mittelwert	3,7822	1044,8561
		N	18	18
		Standardabweichung	2,32078	520,21620
	b 0Gy,06h	Mittelwert	3,7017	938,9579
		N	18	18
		Standardabweichung	1,83093	390,97832
	b 0Gy,24h	Mittelwert	3,0579	1008,7002
		N	15	15
		Standardabweichung	,49274	470,08188
	b 0Gy,48h	Mittelwert	3,7903	1087,5081
		N	18	18
		Standardabweichung	2,20533	558,40862
	b 10Gy,00h	Mittelwert	3,3303	998,7320
		N	18	18
		Standardabweichung	1,01382	528,37416
	b 10Gy,06h	Mittelwert	3,0528	923,2024
		N	18	18
		Standardabweichung	,69574	396,21548
	b 10Gy,24h	Mittelwert	4,0553	914,3790
		N	18	18
		Standardabweichung	3,84234	482,36900
	b 10Gy,48h	Mittelwert	3,6134	634,4996
		N	3	3
		Standardabweichung	,13204	202,16880
	b TGF- $\beta$	Mittelwert	6,0310	1550,2343
		N	18	18
		Standardabweichung	6,97248	977,95827
	Insgesamt	Mittelwert	3,8618	1050,5254
		N	144	144

Standardabweichung	3,18497	586,96869
--------------------	---------	-----------

### 7.1.2 Alveolarmakrophagen:

AK	Typ		collagen cpm	% synthese
mit	b 0Gy,00h	Mittelwert	1170,86	2,9888
		N	12	12
		Standardabweichung	356,405	,40147
	b 0Gy,06h	Mittelwert	1050,76	2,5265
		N	12	12
		Standardabweichung	245,269	,42197
	b 0Gy,24h	Mittelwert	1215,47	2,8184
		N	12	12
		Standardabweichung	322,372	,42670
	b 0Gy,48h	Mittelwert	1312,85	3,0245
		N	12	12
		Standardabweichung	298,837	,45709
	b 10Gy,06h	Mittelwert	1123,78	3,1265
		N	12	12
		Standardabweichung	512,564	,70725
b 10Gy,24h	Mittelwert	1016,38	2,6360	
	N	12	12	
	Standardabweichung	394,290	,43099	
b 10Gy,48h	Mittelwert	1140,63	2,7155	
	N	12	12	
	Standardabweichung	458,505	,33964	
Insgesamt	Mittelwert	1147,25	2,8337	
	N	84	84	
	Standardabweichung	377,260	,49545	
ohne	b 0Gy,00h	Mittelwert	1477,59	2,7858
		N	12	12

Einfluss von TGF- $\beta$ - Antikörpern auf die strahlen- induzierte Kollagensynthese durch Lungenfibroblasten,  
Alveolarmakrophagen und HUVEC-Zellen

		Standardabweichung	1050,821	,90940
	b 0Gy,06h	Mittelwert	1374,17	3,5540
		N	12	12
		Standardabweichung	1069,381	,85145
	b 0Gy,24h	Mittelwert	1497,48	2,9623
		N	12	12
		Standardabweichung	1096,417	,53046
	b 0Gy,48h	Mittelwert	2013,35	3,6895
		N	12	12
		Standardabweichung	1789,377	,88121
	b 10Gy,00h	Mittelwert	3454,87	2,3212
		N	6	6
		Standardabweichung	1824,455	1,27806
	b 10Gy,06h	Mittelwert	1919,05	3,0407
		N	12	12
		Standardabweichung	1759,080	1,73949
	b 10Gy,24h	Mittelwert	1646,22	3,1351
		N	12	12
		Standardabweichung	1285,773	,78539
	b 10Gy,48h	Mittelwert	429,13	3,7880
		N	6	6
		Standardabweichung	46,923	1,59629
	b TGF- $\beta$	Mittelwert	1758,08	3,3925
		N	24	24
		Standardabweichung	1150,400	,89388
	Insgesamt	Mittelwert	1709,56	3,2230
		N	108	108
		Standardabweichung	1383,730	1,07249
Insgesamt	b 0Gy,00h	Mittelwert	1324,22	2,8873
		N	24	24
		Standardabweichung	783,200	,69524



b 0Gy,06h	Mittelwert	1212,46	3,0402
	N	24	24
	Standardabweichung	776,519	,84100
b 0Gy,24h	Mittelwert	1356,48	2,8904
	N	24	24
	Standardabweichung	803,357	,47651
b 0Gy,48h	Mittelwert	1663,10	3,3570
	N	24	24
	Standardabweichung	1304,627	,76594
b 10Gy,00h	Mittelwert	3454,87	2,3212
	N	6	6
	Standardabweichung	1824,455	1,27806
b 10Gy,06h	Mittelwert	1521,42	3,0836
	N	24	24
	Standardabweichung	1330,620	1,29934
b 10Gy,24h	Mittelwert	1331,30	2,8855
	N	24	24
	Standardabweichung	984,128	,66996
b 10Gy,48h	Mittelwert	903,46	3,0730
	N	18	18
	Standardabweichung	505,760	1,04631
b TGF- $\beta$	Mittelwert	1758,08	3,3925
	N	24	24
	Standardabweichung	1150,400	,89388
Insgesamt	Mittelwert	1463,55	3,0527
	N	192	192
	Standardabweichung	1101,230	,88799

### 7.1.3 Huvec-Zellen:

AK	Typ		collagen cpm	% synthese
mit	b 0Gy,00h	Mittelwert	4064,8158	15,3639
		N	12	12
		Standardabweichung	1291,44773	4,85898
	b 0Gy,06h	Mittelwert	3681,5291	15,9315
		N	12	12
		Standardabweichung	1514,22906	3,62301
	b 0Gy,24h	Mittelwert	3702,7218	17,1508
		N	12	12
		Standardabweichung	1898,34518	4,21941
	b 0Gy,48h	Mittelwert	4832,6340	17,8191
		N	12	12
		Standardabweichung	2828,45921	8,86853
	b 10Gy,06h	Mittelwert	3621,7757	15,1380
		N	12	12
		Standardabweichung	899,43806	4,50415
	b 10Gy,24h	Mittelwert	3541,9918	15,5191
		N	12	12
		Standardabweichung	1294,28264	4,18222
b 10Gy,48h	Mittelwert	3546,2134	17,6053	
	N	12	12	
	Standardabweichung	1758,77647	6,52326	
b TGF- $\beta$	Mittelwert	2747,0672	13,5496	
	N	6	6	
	Standardabweichung	727,40749	3,53147	
Insgesamt	Mittelwert	3782,0287	16,1737	
	N	90	90	
	Standardabweichung	1701,63089	5,35013	
ohne	b 0Gy,00h	Mittelwert	2999,6385	7,4390
		N	18	18

		Standardabweichung	5500,34307	4,44455
	b 0Gy,06h	Mittelwert	1777,0266	7,0845
		N	18	18
		Standardabweichung	838,37540	4,12749
	b 0Gy,24h	Mittelwert	1730,0405	7,9535
		N	18	18
		Standardabweichung	603,18359	5,66504
	b 0Gy,48h	Mittelwert	3449,2417	9,2508
		N	18	18
		Standardabweichung	4176,97084	5,23006
	b 10Gy,00h	Mittelwert	1737,9708	8,0721
		N	3	3
		Standardabweichung	848,18236	1,31379
	b 10Gy,06h	Mittelwert	2021,0856	7,2086
		N	18	18
		Standardabweichung	1523,82434	4,43165
	b 10Gy,24h	Mittelwert	1937,2237	7,8460
		N	18	18
		Standardabweichung	1216,52913	5,56344
	b 10Gy,48h	Mittelwert	1834,8424	6,7629
		N	15	15
		Standardabweichung	919,21268	4,83738
	b TGF- $\beta$	Mittelwert	2339,3857	9,1910
		N	24	24
		Standardabweichung	1191,10504	7,03048
	Insgesamt	Mittelwert	2262,2562	7,9222
		N	150	150
		Standardabweichung	2578,59296	5,23329
Insgesamt	b 0Gy,00h	Mittelwert	3425,7094	10,6090
		N	30	30
		Standardabweichung	4318,48275	6,01068

Einfluss von TGF- $\beta$ - Antikörpern auf die strahlen- induzierte Kollagensynthese durch Lungenfibroblasten,  
Alveolarmakrophagen und HUVEC-Zellen

b 0Gy,06h	Mittelwert	2538,8276	10,6233
	N	30	30
	Standardabweichung	1477,25242	5,86498
b 0Gy,24h	Mittelwert	2519,1130	11,6324
	N	30	30
	Standardabweichung	1595,73323	6,82404
b 0Gy,48h	Mittelwert	4002,5987	12,6781
	N	30	30
	Standardabweichung	3706,38602	8,00594
b 10Gy,00h	Mittelwert	1737,9708	8,0721
	N	3	3
	Standardabweichung	848,18236	1,31379
b 10Gy,06h	Mittelwert	2661,3616	10,3804
	N	30	30
	Standardabweichung	1517,95544	5,90069
b 10Gy,24h	Mittelwert	2579,1309	10,9152
	N	30	30
	Standardabweichung	1463,67388	6,27666
b 10Gy,48h	Mittelwert	2595,4517	11,5817
	N	27	27
	Standardabweichung	1585,76407	7,79401
b TGF- $\beta$	Mittelwert	2420,9220	10,0627
	N	30	30
	Standardabweichung	1115,31975	6,67052
Insgesamt	Mittelwert	2832,1709	11,0165
	N	240	240
	Standardabweichung	2401,48747	6,61498

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1. Abbildung 1: Tabelle aus Referenz 42: Übersicht über Zytokine und Wachstumsfaktoren, denen in der Pathogenese fibrosierender Lungenerkrankungen eine gewisse Rolle zugeordnet wird
2. Abbildung 2: Grafik 1: Vergleich der Syntheserate in % mit Überständen bestrahlter und nicht bestrahlter Fibroblasten mit und ohne TGF- $\beta$ -Antikörper
3. Abbildung 3: Grafik 2: Vergleich der cpm der Überstände bestrahlter und nicht bestrahlter Fibroblasten mit und ohne TGF-  $\beta$ - Antikörper
4. Abbildung 4: Grafik 3: Vergleich der Syntheserate in % mit Überständen bestrahlter und nicht bestrahlter Alveolarmakrophagen mit und ohne TGF-  $\beta$ - Antikörper
5. Abbildung 5: Grafik 4: Vergleich der cpm der Überstände bestrahlter und nicht bestrahlter Alveolarmakrophagen mit und ohne TGF-  $\beta$ - Antikörper
6. Abbildung 6: Grafik 5: Vergleich der Syntheserate in % mit Überständen bestrahlter und nicht bestrahlter Huvec- Zellen mit und ohne TGF-  $\beta$ - Antikörper
7. Abbildung 7: Grafik 6: Vergleich der cpm der Überstände bestrahlter und nicht bestrahlter Huvec-Zellen mit und ohne TGF- $\beta$ - Antikörper
8. Abbildung 8: aus Referenz 47: Molecules used in vivo in therapeutic strategies against established fibrotic disorders of various etiology
9. Abbildung 9: aus Referenz 30: Inhibitory effect of ZD6126
10. Abbildung 10: aus Referenz 33: Induction of filipodia formation by transforming growth factor (TGF)- $\beta$  in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Abratt, R.P.; Morgan, G.W.: Lung toxicity following chest irradiation on patients with lung cancer. *Lung Cancer*, Vol. 35, pp. 103- 109, 2002
2. Alho, H.S.; Inkinen, K.A.; Salminen, U.-S.; Maasilta, P.K.; Taskinen, E.I.; Glumoff, V; Vuorio, E.I.; Ikonen, T.S.; Harjula, A.L.J.: Collagens I and II in a porcine bronchial model of obliterative bronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol. 165, pp. 1519- 1525, 2001
3. Anscher, M.S; Marks, L.B.; Shafman, T.D.; Clough, R.; Huang, H.; Tisch, A.; Munley, M.; Herndon II, J.E.; Garst, J.; Crawford, J.; Jirtle, R.L.: Risk of long-term complications after TGF- $\beta$ 1-guided very-high-dose thoracic radiotherapy. . *Int. J. Radiat. Oncol.Biol. Phys.*, Vol. 56/4, pp. 988- 995, 2003
4. Anscher, M.S; Kong, F.-M.; Jirtle, R.L.: The relevance of transforming growth factor  $\beta$ 1 in pulmonary injury after radiation therapy. *Lung Cancer*, Vol. 19, pp. 109- 120, 1998
5. Anscher, M.S; Kong, F.-M.; Marks, L.B.; Bentel, G.C.; Jirtle, R.L.: Changes in plasma transforming growth factor beta during radiotherapy and the risk of symptomatic radiation-induced pneumonitis. *Int. J. Radiat. Oncol.Biol. Phys.*, Vol. 37/2, pp. 253- 258, 1997
6. Arai, T.; Abe, K.; Matsuoka, H.; et al.: Introdution of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, Vol. 278, pp. L914- L922, 2000
7. Barthelemy-Brichant, N.; Bosquee. L.; Cataldo, D.; Corhay, J.-L.; Gustin, M.; Seidel, L. Thiry, A.; Gjhaye, B.; Nizet, M.; Albert, A.; Deneufbourg, J.-M.; Bartsch, P.; Nusgens, B.; Increased Il-6 and TGF- $\beta$ 1 concentrations in bronchoalveolar lavage fluid associated with thoracic radiotherapy. . *Int. J. Radiat. Oncol.Biol. Phys.*, Vol. 58/3, pp. 758- 767, 2004
8. Bartram U.; Speer, C.P.: The role of transforming growth factor  $\beta$  in lung development and disease. *Chest*, Vol. 125/2, pp. 754- 765, 2004

9. Baumann, M.; Appold, S.; Geyer, P.; Knorr, A.; Voigtmann, L.; Herrmann, Th.: Lack of effect of small high-dose volumes on the dose-response relationship for the development of fibrosis in distant parts of the ipsilateral lung in mini-pigs. *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 76/4, pp. 447- 485, 2000
10. Bonniaud, P.; Margetts, P.J.; Kolb, M.; Haberberger, T.; Kelly, M.; Robertson, J; Gauldie, J.: Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol. 168, pp. 770- 778, 2003
11. Burger, A.; Löffler, H.; Bamberg, M.; Rodemann, H.P.: Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol.73/4, pp. 401- 408, 1998
12. Claude, L.; Perol, D.; Ginestet, C.; Falchero, L.; Arpin, D.; Vincent, M; Martel, I.; Hominal, S.; Cordier, J.-F.; Carrie, C.: A prospective study on radiation pneumonitis following conformal radiation therapy in non-small-cell lung cancer: clinical and dosimetric factors analysis. *Radiotherapy and Oncology*, Vol. 71, pp. 175- 181, 2004
13. Dabbas, S.; Kaushik, R.R.; Dandamudi, S.; Kuesteres, G.M.; Campbell, R.B.: Importance of the Liposomal Cationic Vascular Targeting: Physiochemical Characterization and In Vitro Studies Using Human Primary and Transformed Endothelial Cells. *Endothelium*, 15: 189- 201, 2008
14. De Jaeger, K.; Seppenwoolde, Y.; Kampinga, H.H.; Boersma. L.J.; Belderbos, J.S.A.; Lebesque, J.V.: Significance of plasma transforming growth factor- $\beta$  levels in radiotherapy for non-small-cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol.Biol. Phys.*, Vol. 58/5, pp. 1378- 1387, 2004
15. De Jaeger, K.; Seppenwoolde, Y.; Boersma. L.J.; Muller, S.; Baas, P.; Belderbos, J.S.A.; Lebesque, J.V.: Pulmonary function following high-dose radiotherapy of non-small-cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol.Biol. Phys.*, Vol.55/5, pp. 1331- 1340, 2003
16. Dhanai, S.; Huang, M.; Wang, J.; et al.: Interferon-alpha inhibits murine macrophage transforming growth factor- $\beta$  mRNA expression. *Inflammation*, Vol. 18, pp. 301- 309, 1994

17. Dörr, W.; Baumann, M.; Herrmann, Th.: Radiation-induced lung damage: a challenge for radiation biology, experimental and clinical radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 76/4, pp.443- 446, 2000
18. Donker, M.; Van Furth, W.R.; Mulder-Van Der Kracht, S.; Hovinga, K.E.; Verhoeff, J.J.C.; Stalpers, L.J.A.; Van Bree, C.: Negligible radiation protection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor. *Oncology Reports*, 18: 709- 714, 2007
19. Eickelberg, O.; Köhler, E.; Reichenberger, F.; Bertschin, S.; Woodtli, T.; Erne, P.; Perruchoud, A.P.; Roth, M.: Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3. *The American Physiological Society*, pp. L814- L822, 1999
20. Eickelberg, O., Pansky, A.; Koehler, E.; et al.: Molecular mechanisms of TGF-( $\beta$ ) antagonism by interferon ( $\gamma$ ) and cyclosporine A in lung fibroblasts. *FASEB J.*, Vol. 15, pp. 797- 806, 2001
21. Evans, R.A.; Tian, Y.C.; Steadman, R.; Phillips, A.O.: TGF- $\beta$ 1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation- the role of Smad proteins. *Experimental Cell Research*, Vol. 282, pp. 90- 100, 2003
22. Fu, X.-L.; Huang, H.; Bentel, G.; Clough, R.; Jirtle, R.L.; Kong, F.-M.; Marks, L.B.; Anscher, M.S.: Predicting the risk of symptomatic radiation-induced lung injury using both the physical and biologic parameters V30 and transforming growth factor  $\beta$ . *Int. J. Radiation Oncology, Biol. Phys.*, Vol. 50/4, pp. 899- 908, 2001
23. Fujita, M.; Shannon, J.M.; Morikawa, O.; Gauldie, J.; Hara, N.; ,Mason, R.J.: Overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$  diminishes pulmonary fibrosis induced by bleomycin or transforming growth factor- $\beta$ . *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, Vol. 29, pp. 669- 676, 2003
24. Gauldie, J.; Kolb, M.; Sime, P.J.: A new direction in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir. Research*, Vol. 3/1, 2002
25. Goethals, I.; Dierckx, R.; De Meerleer, G.; De Sutter, J.; De Winter, O. ; De Neve, W. ; Van de Wiele, C. : The role of nuclear medicine in the prediction



- and detection of radiation-associated normal pulmonary and cardiac damage. *J. Nucl. Med.*, Vol. 44, pp. 1531- 1539, 2003
26. Gurujeyalakshmi, G.; Hollinger, M.A.; Giri, S.N.: Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1 mRNA expression by taurine and niacin in the bleomycin hamster model of lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* , Vol. 18, 334-342, 1998
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. *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 76/4, pp.503- 509, 2000
28. Hernando, M.L.; Marks, L.B.; Bentel, G.C.; Zhou, S.-M.; Hollis, D.; Das, S.K.; Fan, M.; Munley, M.T.; Shafman, T.D.; Anscher, M.S.; Lind, P.A.: Radiation-induced pulmonary toxicity: a dose-volume histogram analysis in 201 patients with lung cancer. *Int. J. Radiation Oncology, Biol. Phys.*, Vol. 51/3, pp. 650- 659, 2001
29. Herskind, C.; Rodemann, H.P.: Spontaneous and radiation-induced differentiation of fibroblasts. *Experimental Gerontology* , vol. 35, pp. 747-755, 2000
30. Hoang, T.; Huang, S.; Armstrong, E.; Eickhoff, J.C.; Harari, P.: Augmentation Of Radiation Response With The Vascular Targeting Agent ZD6126. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 64, No. 5, 1458- 1465, 2006
31. Hong; J.-H.; Chiang, C.-S.; Tsao, C.-Y.; Lin, P.-Y.; McBride, W.H.; Wu, C.-J.: Rapid induction of cytokine gene expression in the lung after single and fractionated doses of radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 75/11, pp. 1421-1427, 1999
32. Hong; J.-H.; Chiang, C.-S.; Tsao, C.-Y.; Lin, P.-Y.; Wu, C.-J.; McBride, W.H.: Can short-term administration of dexamethasone abrogate radiation-induced acute cytokine gene response in lung and modify subsequent molecular responses? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, Vol. 51/2, pp. 296- 303, 2001

33. Hu, T.; RamachandraRao, P.; Siva, S.; Valancius, C.; Zhu, Y.; Mahadev, K.; Toh, I.; Goldstein, B.J.; Woolkalis, M.; Sharma, K.: Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF- $\beta$ -induces cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 289: F816-F825, 2005
34. Iyer, S.N.; Gurujeyalakshmi, G.; Giri, S.N.: Effects of pirfenidone on transforming growth factor- $\beta$  gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, Vol. 291/1, pp. 367- 373, 1999
35. Johnston, C.J.; Williams, J.P.; Okunieff, P.; Finkelstein, J.N.: Radiation-induced pulmonary fibrosis: Examination of chemokine and chemokine receptor families. *Radiat. Research*, Vol. 157, pp. 256- 265, 2002
36. Kasper, M.; Fehrenbach, H.: Immunohistochemical evidence for the occurrence of similar epithelial phenotypes during lung development and radiation-induced fibrogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 76/4, pp. 493- 501, 2000
37. Kolb, M.; Margetts, P.J.; Sime, P.J.; Gauldie, J.: Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF- $\beta$ -mediated fibrotic responses in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, Vol. 280, pp. L1327- L1334, 2001
38. Kolb, M.; Margetts, P.J.; Galt, T.; Sime, P.J.; Xing, Z.; Schmidt, M.; Gauldie, J.: Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol. 163, pp. 770- 777, 2001
39. Kolb, M.; Willner, J.; Köberlein, E.; Hoffmann, U.; Kirschner, J.; Flentje, M.; Schmidt, M.: Autokrine Aktivierung von Fibroblasten nach Bestrahlung. *Pneumologie*, Vol. 53, pp. 296- 301, 1999
40. Kolb, M.; Margetts, P.J.; Anthony, D.C.; Pitossi, F.; Gauldie, J.: Transient expression of Il-6-1 $\beta$  induces acute lung injury and chronic repair leading to

- pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 107/12, pp. 1529- 1536, 2001
41. Kolb, M.; Bonniaud, P.; Galt, T.; Sime, P.J.; Kelly, M.; Margetts, P.J.; Gauldie, J.: Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor- $\beta$ 1 gene to lungs of "fibrosis-prone" and "fibrosis-resistant" mouse strains. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* , Vol. 27, pp. 141-150, 2002
42. Kolb, M.; Schmidt, M.: The role of cytokines and growth factors in fibroproliferative lung disease. *Pneumologie*, Vol. 57, pp. 91- 97, 2003
43. Kong, F.-M.; Jirtle, R.L.; Huang, D.H.; Clough, R.W.; Anscher, M.S.: Plasma transforming growth factor- $\beta$ 1 level before radiotherapy correlates with long term outcome of patients with lung carcinoma.: American Cancer Society, Vol. 86/9, pp. 1712- 1719, 1999
44. Leask, A.; Abraham, D.J.: TGF- $\beta$ 1 signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*. Vol. 18, pp. 816- 827, 2004
45. Li, C.; Wilson, P.B.; Levine, E.; Barber, J.; Stewart, A.L.; Kumar, S.: TGF- $\beta$ 1 levels in pre-treatment plasma identify breast cancer patients at risk of developing post-radiotherapy fibrosis. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, Vol. 84, pp. 155- 159, 1999
46. Marshall, R.P.; McAnulty, R.J.; Laurent, G.J.: Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type I receptor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol. 161, pp. 1999- 2004, 2000
47. Martin, M.; Lefaix, J.-L.; Delanian, S.: TGF- $\beta$ 1 and radiation fibrosis : A master switch and a specific therapeutic target. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, Vol. 47/2, pp. 277- 290, 2000
48. Miller, K.L.; Zhou, S.-M.; Barrier, Jr, R.C.; Shafman, T.; Folz, R.J.; Clough, R.W.; Marks, L.B.: Long-term changes in pulmonary function tests after definitive radiotherapy for lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, Vol. 56/3, pp. 611- 615, 2003

49. Nakanishi, H.; Sugiura, T.; Streisand, J.B.; Lonning, S.M.; Roberts, Jr, J.D.: TGF- $\beta$ -neutralizing antibodies improve pulmonary alveogenesis and vasculogenesis in the injured newborn lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L151-L161, 2007
50. Nieder, C.; Jeremic, B.; Astner, S.; Mollis, M.: Radiotherapy-induced lung toxicity: Risk factors and prevention strategies. *Anticancer Research*, Vol. 23, pp. 4991- 4998, 2003
51. Novakova- Jiresova, A.; Van Gameren, M.M., Coppes, R.P.; Kampinga, H.K.; Groen, H.J.M.: Transforming growth factor- $\beta$  plasma dynamics and post-irradiation lung injury in lung cancer patients. *Radiotherapy and Oncology*, Vol. 71, pp. 183- 189, 2004
52. Ortiz, L.A.; Lasky, J.; Hamilton, R.F. Jr.; et al.: Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. *Exp. Lung Res.*, Vol. 24, pp. 721- 743, 1998
53. Rancati, T.; Ceresoli, G.L.; Gagliardi, G.; Schipani, S.; Cattaneo, G.M.: Factors predicting radiation pneumonitis in lung cancer patients: a retrospective study. *Radiotherapy and Oncology*, Vol.67, pp. 275- 283, 2003
54. Rube, C.E.; Rodemann, H.P.; Rube, Ch.: Die Bedeutung von Zytokinen für die radiogene Lungenreaktion. *Strahlentherapie und Onkologie*, 180: 541- 549, 2004. (A)
55. Rube, C.E.; Uthe, D.; Schmid, K.W.; Richter, K.D.; Wessel, J.; Schuck, A.; Willich, N.; Rube, C.: Dose-dependent induction of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol.Biol. Phys.*, Vol. 47/4, pp. 1033- 1042, 2000

56. Selman, M.; King Jr., T.E.; Pardo, A.: Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.*, Vol. 134, pp. 136- 151, 2001
57. Takami, S.; Yamashita, S.; Kihara, S.; Ishigami, M.; Takemura, K.; Kume, N.; Kita, T.; Matsuzawa, Y.: Lipoprotein (a) Enhances the Expression of Intracellular Adhesion Molecule-1 in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Circulation*. 97: 721- 728, 1998
58. Teicher, B.A.: Transforming Growth Factor-B and the Immune Response to Malignant Disease. *Clin Cancer Res* 2007; 13(21) November 1, 2007
59. Trott, K.R.; Herrmann, T.; Kasper, M.: Target cells in radiation pneumopathy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, Vol. 58/2, pp. 463- 469, 2004
60. Wang, J.-M.; Kumar, S.; van Agthoven, A.; Kumar, P.; Pye, D.; Hunter, R.D.: Irradiation induces up-regulation of E9 Protein (CD105) in human vascular endothelial cells. *Int. J. Cancer*, 62, 791-796, 1995
61. Wenneberg, B.; Gagliardi, G.; Sundbom, L., Svane, G.; Lind, P.: Early response of lung in breast cancer irradiation: radiologic density changes measured by CT and symptomatic radiation pneumonitis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, Vol. 52/5, pp. 1196- 1206, 2002
62. Yamauchi, K.; Nishimura, Y.; Shigematsu, S.; Takeuchi, Y.; Nakamura, J.; Aizawa T.; Hashizume, K.: Vascular Endothelial Cell Growth Factor Attenuates Actions of Transforming Growth Factor- $\beta$  in Human Endothelial Cells. *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 53, Issue of December 31, pp. 55104- 55108. 2004



## Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Martin Kolb für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der experimentellen Arbeit und der Korrektur, die mir selbst über Kontinente hinweg immer und sofort zur Verfügung stand.

Herrn Prof. Dr. med. Schmidt und Herrn Prof. Dr. habil. Dr. med. Flentje danke ich sehr für die freundliche Übernahme der Funktionen als Referent bzw. Koreferent.

Allen MTAs unter der Leitung von Margret Wechner möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die stets angenehmen Arbeitsbedingungen und gegenseitigen Hilfestellungen bei allen Arbeiten, sowie die kulinarische Betreuung in den gemeinsamen Pausen. Dieses hervorragende Klima vermochte auch nach wissenschaftlichen Tiefschlägen, dass die Doktoranden mit viel Freude an ihren Arbeiten festhielten.

Meinem Schwiegervater und meiner Schwägerin danke ich für die aufmerksamen Korrekturen und die Hilfe beim Formatieren der Arbeit.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken. Sie haben mir während des gesamten Studiums und auch danach mit Rat und Tat immer bedingungslos zur Seite gestanden. Dadurch haben sie mir ein sehr schönes Studium in Würzburg und viele Auslandsaufenthalte ermöglicht.

