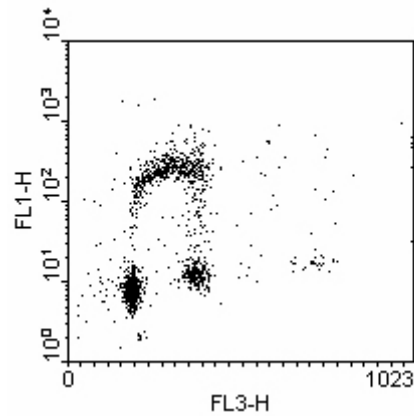


Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
der Universität Würzburg

Direktor : Professor Dr. med. M. Flentje

**Untersuchungen zur Zellproliferation von Maus-
Lungen-Fibroblasten am FACS-Flow-Zytometer
unter dem Einfluss von Kulturüberständen
bestrahlter Fibroblasten**



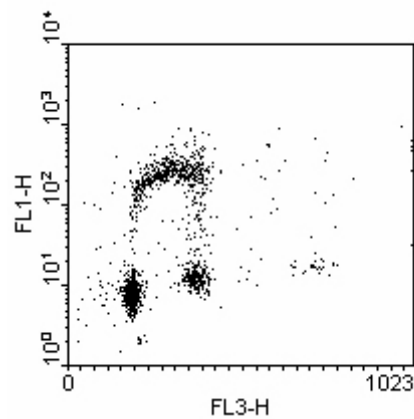
Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilian-Universität Würzburg
vorgelegt von
Alexander Wenemoser
aus Würzburg

Würzburg, Mai 2011

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
der Universität Würzburg

Direktor : Professor Dr. med. M. Flentje

**Untersuchungen zur Zellproliferation von Maus-
Lungen-Fibroblasten am FACS-Flow-Zytometer
unter dem Einfluss von Kulturüberständen
bestrahlter Fibroblasten**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilian-Universität Würzburg
vorgelegt von
Alexander Wenemoser
aus Würzburg

Würzburg, Mai 2011

Referent : Prof. Dr. M. Flentje

Koreferent : Prof. Dr. M. Schmidt

Dekan : Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 19.03.2012

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS :

	Seite
1.) <u>Einleitung</u> Lungenfibrose und pulmonale Fibroblasten als Effektorzellen	- 1 -
2.) <u>Material und Methoden</u>	
2.1.) Gewinnung der Maus-Lungen-Fibroblasten	- 4 -
2.2.) Herstellung des konditionierten Mediums	- 5 -
2.3.) Aufbau und Durchführung der Versuchsserien	- 7 -
2.4.) Färbeprotokoll mit BrdU und Propidiumiodid	- 10 -
2.5.) Messung am FACS-Flow-Zytometer	- 11 -
2.6.) Auswertung der FACS-Flow-Analysen mit WinMDI ^R	- 15 -
3.) <u>Ergebnisse</u>	
3.1.) Übersicht über die Ergebnisse der Entnahmephasen I-VI	- 20 -
3.2.) Vergleichsanalyse Entnahmephasen E _{II} /E _{III} gegenüber E _{IV} /E _V	- 30 -
4.) <u>Diskussion</u>	- 34 -
5.) <u>Klinischer Ausblick</u>	- 37 -
6.) <u>Literatur</u>	- 40 -
7.) <u>Abkürzungen</u>	- 46 -
8.) <u>Anhang</u>	
8.1.) Substanzen-Checkliste	- 49 -
8.2.) Kurzform der Protokolle	- 50 -

1.) Einleitung

Die Strahlentherapie ist eine der 3 Säulen der modernen onkologischen Therapie. In der Pneumologie kommt sie häufig beim inoperablen Bronchialkarzinom, aber auch bei anderen thorakalen Malignomen oder Fernmetastasen anderer Tumoren zum Einsatz. Nach wie vor begrenzen die pathologischen pulmonalen Begleitreaktionen trotz technischer Weiterentwicklungen in der Durchführung der Strahlentherapie die klinische Verträglichkeit und damit deren Einsatz. Die Höhe der Bestrahlungsdosis, das Bestrahlungsverfahren bzw. die Fraktionierung und der zeitliche Ablauf der Bestrahlung sowie frühere Steroid- und Chemotherapien determinieren den Schweregrad der Begleitreaktionen; ebenso sind verschiedene genetische Faktoren in neueren Studien beschrieben ^(36, 37, 38).

Bei einer hochdosierten Strahlentherapie können zwei pathologische Begleitreaktionen des Lungenparenchyms unterschieden werden: zunächst entwickelt sich eine klinisch variabel ausgeprägte akute strahleninduzierte Pneumonitis, sekundär kommt es zu einer umschriebenen chronischen Lungenfibrose als Langzeitschädigung ^(34, 45). Die Inzidenz der Entwicklung einer Strahlenpneumonitis wurde bei einer kurativen Hochdosis- Bestrahlung des Lungenkarzinoms näher untersucht: 1-3 Monate nach einer therapeutischen Hochdosis-Bestrahlung entwickelten in Abhängigkeit von der jeweiligen Bestrahlungsdosis bis zu 8% der Patienten klinisch Symptome einer Pneumonitis (Husten, Dyspnoe und weißliches Sputum), radiologisch zeigen sich bei bis zu 43% der bestrahlten Patienten Hinweise für eine strahleninduzierte Pneumonitis ⁽⁴⁵⁾. Therapeutisch wird die akute Pneumonitis typischerweise mit einer antiphlogistischen Steroidtherapie behandelt und die Symptome sind nach 2-3 Monaten regredient ⁽³⁴⁾.

Nach 6 bis 24 Monaten entwickeln nahezu alle Patienten nach pulmonaler Hochdosis-Strahlentherapie eine auf die Hochdosis-Areale begrenzte Lungenfibrose, hierbei bestehen aber signifikante Unterschiede im Schweregrad der klinischen Ausprägung. Eine Lungenfibrose kann insbesondere auch bei Patienten entstehen, die sowohl klinisch als auch radiologisch keine Anzeichen einer Pneumonitis erkennen ließen; allerdings dann mit typischerweise milderem Verlauf. ⁽⁴⁵⁾. Pathophysiologisch entwickelt sich im Rahmen der Lungenfibrose unter anderem ein variabel ausgeprägter pulmonal-arterieller Hypertonus. Die klinische Manifestation variiert stark: ein Teil der Patienten ist asymptomatisch oder entwickelt eine leichte Dyspnoe, es können jedoch auch eine schwere chronische

pulmonale und/oder kardiale Insuffizienz mit Dyspnoe und Orthopnoe, Hepatomegalie und weiteren konsekutiven Manifestationen einer Rechtsherzinsuffizienz auftreten.

Die Pathogenese der Pneumonitis als akute Inflammation mit Invasion von Entzündungszellen und einer folgenden Vaskulitis der Lungengefäße ist bereits weitgehend beschrieben. Im Kontext der (radiogenen) Lungenfibrose dagegen existieren noch immer wesentliche Unklarheiten. Die früher geltende Hypothese einer Lungenfibrose alleine aufgrund einer chronischen Entzündung mit folgendem Gewebeschaden ist heute praktisch obsolet. Es gilt als gesichert, dass die Lungenfibrose auf einer komplexen Interaktion zwischen einer chronischen Inflammation durch die Bestrahlung und einem pathologischen Remodeling bei der Wundheilung sowie genetischen Faktoren wie etwa dem individuellen T-Helferzellen(Th_1 - Th_2 -Zellen)-Gleichgewicht basiert⁽¹³⁾. Die einzelnen kausalen Faktoren in diesem Rahmen sind weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Eine Störung in der Interaktion der Zytokine wird als wahrscheinlichste Hypothese dieser Vorgänge postuliert und konnte in einigen neuen Studien partiell bewiesen werden^(2, 3, 5, 13). In der Arbeit von Rube. et al⁽⁶⁾ konnte beispielsweise immunhistochemisch das Bronchialepithel und das interstitielle Lungengewebe als Hauptquelle diverser Zytokine wie $TNF-\alpha$, $IL-1\alpha$ und $IL-6$ dargestellt werden, welche im Fokus der aktuellen Forschung liegen. Ein weiterer Forschungsschwerpunkt sind die möglichen Ziel- und/oder Effektorzellen dieser postulierten fibrogenen Zytokin-Dysregulation. Bis vor kurzen galten hier die Makrophagen und Epitheldeckzellen der Lunge (Typ I- und Typ II-Pneumozyten) als Haupteffektorzellen. Einige neuere Studien konnten im Gegensatz hierzu zeigen, dass den pulmonalen Fibroblasten eine Schlüsselrolle in diesem Prozess zukommt.^(6, 13, 31, 37, 49) Eine para- und autokrine Stimulation der Zellen durch Zytokine wie etwa $TGF-\beta$, $IL-1$ und $TNF-\alpha$, die nach Bestrahlung in den Zellen induziert werden, wird in vielen Arbeiten untersucht und diskutiert.^(6, 10, 13, 17, 36, 37, 38, 42, 45, 48, 49) Die Forschungsgruppe um Rodemann konnte eine Proliferationshemmung von Fibroblasten durch Bestrahlung dokumentieren, sowie eine präterminale Differenzierung der Fibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten. Diese Ergebnisse wurden indirekt durch Proliferations-Untersuchungen mittels colony-forming-units und immunhistochemischen Färbungen der Epitope postmitotischer Fibrozyten ermittelt^(31, 36, 49). Die Beeinflussung der Zellkinetik bestrahlter Fibroblasten konnte so indirekt untersucht werden. Bisher existieren in der Literatur keine objektiven und direkten Zellzyklus-Untersuchungen, die eine präterminale postmitotische Differenzierung und Proliferationshemmung von Fibroblasten dokumentiert haben.

Die folgende Arbeit soll untersuchen, ob im Maus-Tiermodell Interaktionen zwischen bestrahlten und unbestrahlten Fibroblasten hinsichtlich ihrer Proliferationseigenschaften bestehen bzw. untersuchen, ob bestrahlte Fibroblasten andere, nicht bestrahlte Fibroblasten in ihren proliferativen Eigenschaften beeinflussen können. Zur objektiven Darstellung der postulierten Zellzyklus-Veränderungen im Rahmen der Versuche wird eine FACS-Flow-Zytometrie mit einer BrdU und PI-Doppelfärbung verwendet. Als Versuchszellen werden in der vorliegenden Arbeit Maus-Fibroblasten eingesetzt, da diese Zellen in ihren Proliferationseigenschaften bereits gut untersucht sind und schon einige Fibrose-Modellvorstellungen zu diesem Zellstamm existieren. ^(26, 30, 37)

2.) Material und Methoden

2.1.) Gewinnung der Maus-Lungen-Fibroblasten

Die benötigten Maus-Lungen-Fibroblasten wurden aus Versuchstieren der Serie C57-BL6 gewonnen. Die Tiere wurden durch eine Barbiturat-Spritze und folgende Eröffnung der Bauchaorta getötet. Nach Präparation der Lungen unter Schonung des Parenchyms erfolgte eine Zerkleinerung der Lungenflügel in 0,5 cm³ große Anteile, welche auf eine Petrischale unter Zugabe von 10% FCS-Kulturmedium (Zusammensetzung siehe Anhang) aufgebracht wurden.

Die migrationsfähigen und proliferierenden Fibroblasten setzten sich im Lauf von 24-48h auf dem Boden einer Standard-Zellkulturflasche (25ml) fest und konnten mittels einer kurzen Trypsin-Inkubation nach ca. acht bis zwölf Tagen Kultur im Inkubator unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) und regelmäßigem zweitägigem Mediumwechsel mit jeweils 10% FCS-Nährmedium abgelöst werden. Regelmäßige Mediumwechsel erfolgten alle 2 -3 Tage. Die Zellkulturen wurden gemäß Wachstum der Zellen passagiert, um eine Konfluenz mit resultierender Wachstumsinhibition zu vermeiden. Zur Passagierung wurde eine kurze Trypsin-Inkubation zum Ablösen mit folgender Zentrifugation mit 900U/min für 5min durchgeführt; anschließend wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und jeweils erneut 100.000 Fibroblasten in eine Zellkulturflasche pipettiert.

Die Fibroblasten entfalten ihre volle Proliferationsfähigkeit typischerweise erst nach der 6. bis 8. Passage der Zellen; optimale Kulturbedingungen für die Proliferationsversuche waren daher erst ab der 6. Passage gegeben. Die gewonnenen Maus-Lungen-Fibroblasten ab der Passage 6 dienten im Weiteren dann als Versuchszellen für die Herstellung des konditionierten Mediums und die Durchführung der Versuchsserien.

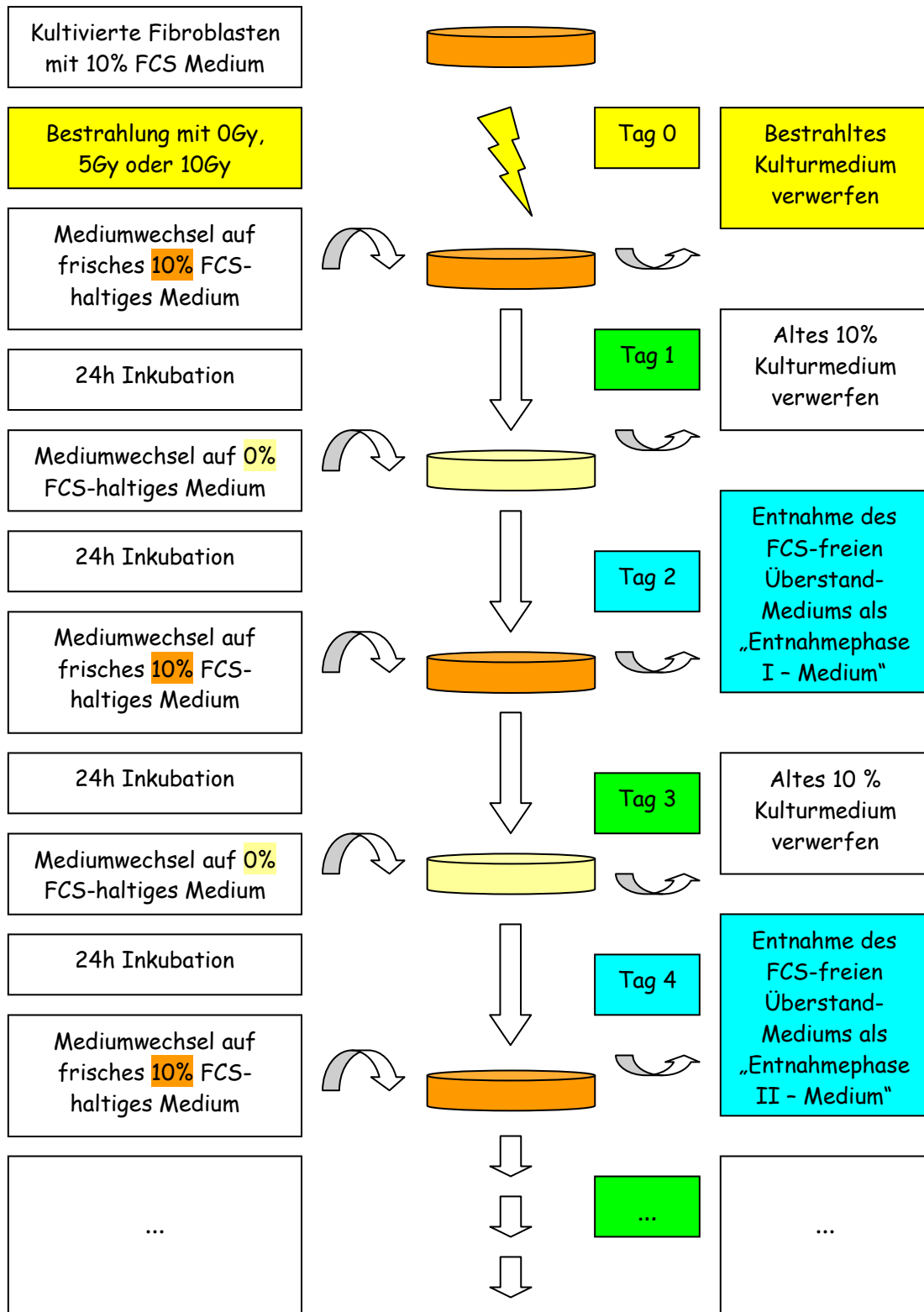
2.2.) Herstellung des konditionierten Mediums

Die Gewinnung des konditionierten Mediums erfolgte gemäß dem unten aufgeführten Ablauf (Kurzform siehe Anhang). Es wurden jeweils ca. eine Million Maus-Lungen-Fibroblasten (Bestimmung mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer) in 6 Zellkultur-Flaschen zu 25ml mit 10% FCS-Nährmedium ausgesät. Nach 24 Stunden im Inkubator erfolgte die Bestrahlung der 6 Zellkulturflaschen am Siemens Linearbeschleuniger Primus: zwei Flaschen erhielten eine Bestrahlungsdosis von 10Gy, weitere zwei eine Dosis von 5 Gy, zwei Flaschen wurden als Kontrollgruppe nicht bestrahlt und für die Zeit der Bestrahlung der anderen Kulturflaschen als Vergleichsgruppe mitgeführt, um identische Versuchsbedingungen zu schaffen. Nach Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel auf frisches 10%-FCS-Kulturmedium, um eventuelle artifizielle Veränderungen der Überstände durch Transport, Auskühlung, Erschütterung sowie veränderte O₂- und CO₂-Bedingungen zu vermeiden. Nach 24 Stunden Kultivierung im Inkubator wird das Medium auf 0% FCS-Kulturmedium bei allen 6 Flaschen gewechselt und erneut 24 Stunden inkubiert. Das 0%-FCS-Medium diente hierbei zur Vermeidung von proliferativen Effekten durch das Nährmedium auf die Zellen. Hierauf wurden erstmals die Überstände der Zellen als nun „konditioniertes“ Medium der jeweiligen Strahlenbedingungen entnommen und nach Strahlenbedingungen getrennt im -70°C Gefrierschrank eingefroren. Somit wurde jeweils ca. 50ml konditioniertes Medium mit 0% FCS-Anteil der Strahlenbedingungen 0Gy, 5Gy und 10Gy gewonnen nach einer Zeitraum von 2 Tagen post Radiatio der Fibroblasten (als *konditioniertes Medium der Entnahme-Phase I* bezeichnet).

Die Zellkulturflaschen erhielten nun wieder jeweils 25 ml 10% FCS-Medium für 24 Stunden Inkubationsdauer, danach wurde das Nährmedium erneut auf 0% FCS-Medium für 24 Stunden gewechselt. Im Anschluss erfolgte die Entnahme dieses konditionierten Mediums nach dem oben angegebenen Ablauf, diesmal als *konditioniertes Medium der Entnahmephase II* (entspricht 4 Tage post Radiatio) bezeichnet.

Gemäß diesem Schema wurde im Zwei-Tages-Rhythmus konditioniertes Medium gewonnen bis zum Tag 12 nach Bestrahlung. Nach Entnahme des *konditionierten Mediums der Entnahmephase VI* wurden die 6 Kulturflaschen mit den bestrahlten Fibroblasten anschließend entsorgt. Mit obigen Verfahren erhielten wir konditioniertes Nährmedium der Tage 2, 4, 6, 8, 10 und 12 post Radiatio aus den Überständen der bestrahlten Fibroblasten, im Folgenden also als *konditioniertes Medium der Entnahmephasen I-VI* bezeichnet (siehe auch Kurz-Schema nächste Seite).

Abbildung 2.2.1 - Schema zur Gewinnung der konditionierten Medien



Fortsetzung dieses Schemas bis Tag 12 mit Gewinnung des „konditionierten Mediums Entnahmephase VI“ ; mit jeweiligem Einfrieren der gewonnenen Medien in -70°C.

2.3.) Aufbau und Durchführung der Versuchsserien

Zur Kurzform des Protokolls der Versuchswoche siehe Anhang und Abbildung 2.3.1.

An **Tag 0** wurden 30x 5ml-Zellkulturflaschen (Fa. Falcon) mit jeweils ca. 150.000 unbestrahlten Fibroblasten ausgesät. Hierzu wurden die Fibroblasten mittels Trypsin vom Boden der bisherigen Kulturflaschen gelöst, 5 min bei 900 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Nach dem Aussähen der gelösten Fibroblasten in 5ml -Zellkulturflaschen erhielten die Fibroblasten für 36-48 Stunden ein 10%-FCS-Nährmedium. Die oben genannten 30 Zellkulturflaschen waren in der Versuchsanordnung wie folgt vorgesehen: zwei Flaschen als Kontrolle zum Messzeitpunkt $t = 0$ Stunden, die zur späteren Überprüfung für den Erfolg des BrdU-Labelings und der Färbeprozedur bei der FACS-Messung dienten. Für jeden der 4 weiteren Messtage (Mess-Zeitpunkte $t = 24, 48, 72$ und 96 Stunden) je eine Flasche zur Kontrolle, zwei Flaschen für kondit. 0Gy-Medium, kondit. 5Gy-Medium und kondit. 10Gy-Medium.

An **Tag 2** (=48 Stunden nach Aussaat) erfolgte das „Pulse-Labeling“ mit Bromodesoxyuridin (BrdU, Serva 250 μ g).

Aus der BrdU-Stock-Solution (Herstellung siehe Anhang) wurde eine effektive Konzentration von 30 μ mol/ml BrdU in jede 5ml- Zellkulturflasche pipettiert und hierauf die Zellen 1h lang unter sonstigen Standardbedingungen inkubiert. Hierauf wurde das BrdU-Nährmedium-Gemisch ab-pipettiert und die Überstände dreimal mit PBS-Puffer (GIBCO) gespült. Dieser Schritt stellt das das sogenannte „Pulse-Labeling“ der Fibroblasten dar: Nur proliferierende Zellen, die sich am Beginn ihrer S-Phase befanden, integrieren innerhalb dieser einen Stunde BrdU als Thymidin-Analogon in die DNA. Die Fibroblasten der 2 Zellkulturflaschen des Versuchszeitpunkts $t = 0$ wurden anschließend mit Trypsin abgelöst, 5min bei 900 U/min zentrifugiert, in 70% Ethanol gelöst und bei -20°C eingefroren bis zur Durchführung der FACS-Messungen (vgl. Kap. 2.5). Nach Auftauen des konditionierten Mediums der drei Strahlenbedingungen einer jeweils durchzuführenden Entnahmephase wurde mittels direkter FCS-Zugabe eine effektive Konzentration von 5% FCS-Anteil erzeugt zur Aufrechterhaltung einer minimalen Proliferation der Zellen. Alle Zellkulturflaschen erhielten hierauf 5ml des jeweiligen konditionierten Mediums gemäß vorgesehener Strahlenbedingung bzw. die Kontrollgruppen normales 5% FCS-Standard-Nährmedium. Es folgte eine 24-stündige Inkubation unter den üblichen Bedingungen.

Am **Tag 3**, d.h. 24 Stunden nach Pulse-Labeling und Beginn der Inkubation mit konditioniertem Medium, wurden nach oben genanntem Verfahren alle Zellen des vorgesehenen Messzeitpunkts $t = 24$ Stunden (d.h. eine Kontrollflasche und je zwei Flaschen mit 0Gy-, 5Gy- und 10Gy-konditioniertem Medium) mit Trypsin gelöst, zentrifugiert und in 5ml 70% Ethanol bei -20°C eingefroren.

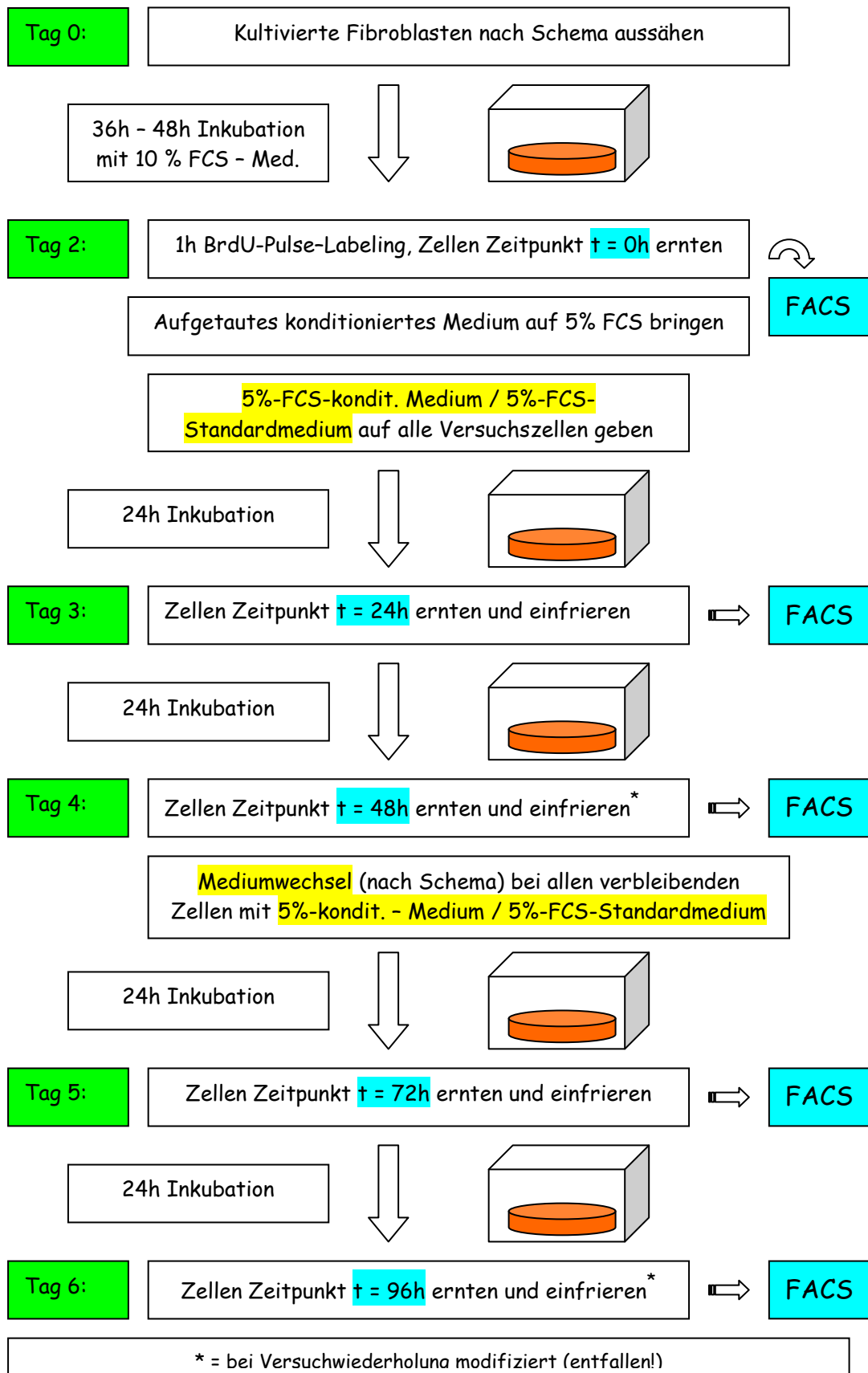
Am **Tag 4** wurde zusätzlich nach dem Ablösen und Einfrieren der jeweiligen Zellen des Messzeitpunkts $t = 48$ Stunden ein Mediumwechsel bei allen verbliebenen Zellkulturflaschen der Messzeitpunkte $t = 72$ und $t = 96$ Stunden durchgeführt mit neuen 5%-FCS-Anteil-konditionierten Medien bzw. mit normalem 5% FCS-Nährmedium bei den verbliebenen Kontrollen.

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation erfolgte an **Tag 5** und **Tag 6** die Entnahme der Zellen des Messzeitpunktes $t = 72$ bzw. 96 Stunden nach selbigem Schema.

Zusammenfassend erhält man zu jedem der Messzeitpunkte (24, 48, 72 und 96 Stunden nach Inkubationsbeginn) sieben Zellkulturproben durch Inkubation mit verschiedenen Überständen oder Kulturmedien: eine Kontrollprobe inkubiert mit 5%FCS-Standardmedium und je zwei Proben mit den jeweiligen konditionierten Medien. Die Inkubation wurde über 24 Stunden durchgeführt, da nach einer Mitteilung der Gruppe um Rodemann TGF- β und weitere für die Zellzyklus-Veränderungen maßgeblichen Zytokine erst nach dieser Zeitdauer in stärkerem Ausmaß sezerniert werden.

Die Versuchsanordnung wurde nach einmaliger Durchführung aller 6 Entnahmephasen geringfügig modifiziert: bei der Wiederholung der sechs Entnahmephasen mit neuem konditioniertem Medium wurde auf die Messzeitpunkte Tag 2 und 4 (d.h. 48 bzw 96 Stunden) verzichtet, da diese keine Verbesserung für die Auswertung der Ergebnisse erbrachten und teilweise die Ergebnisse der 72h-Messung höchstwahrscheinlich durch den Mediumwechsel bei $t = 48$ Stunden verfälscht wurden. In den letzten drei Versuchserien mit Wiederholung der Entnahmephasen 2, 4 und 5 wurden 4 zusätzliche Zellkulturflaschen mitgeführt, die nach Inkubation mit konditioniertem 10Gy-Medium einen Antikörper gegen TGF- β in der 100%-igen Neutralisations-Dosis ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) erhielten (Fa. R&D: pan-specific TGF-beta antibody). Diese wurden zum Messzeitpunkt $t = 24$ bzw. $t = 72$ Stunden ebenso abgelöst und eingefroren konserviert, um eine Evaluation der Hypothese einer möglichen Blockade der Aktivität von TGF- β auf die Zellzyklusphasen der mit konditionierten Medien inkubierten Zellen zu prüfen.

Abbildung 2.3.1 – Schemat. Durchführung der Versuchsserie einer Entnahmephase



2.4.) Färbeprotokoll mit BrdU und Propidiumiodid

Zur Darstellung möglicher Effekte der konditionierten Medien auf die Zellzyklus-Phasen der Fibroblasten wurde ein Färbeprotokoll einer BrdU-Propidiumiodid-Doppelfärbung verwendet und hierauf eine Fluoreszenz-Messung am FACS-Flow-Zytometer durchgeführt. Eine Kurzform des Färbeprotokolls findet sich im Anhang der Arbeit (vgl. Anhang 8.2). Das gesamte Färbeprotokoll wurde unter lichtgeschützten Arbeitsbedingungen ausgeführt, insbesondere ab dem Zeitpunkt der Antikörper-Zugabe, da der Antikörper durch die FITC-Markierung photosensibel ist.

Nach Zentrifugieren der aus der Versuchswoche gewonnenen Fibroblasten bei 4°C mit 1200rpm über 10min wurden die Überstände aus Ethanol abgesaugt und die verbliebenen Pellets aus Zellen resuspendiert. Nach Proteinolyse mit Pepsin und Inkubation für 20min wurde ein Milieu-Ausgleich mittels Dilution-Puffer durchgeführt und die Zellen erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden ab-pipettiert und die Pellets resuspendiert, anschließend Zugabe von 1,5 ml 2N Salzsäure pro Tube. Dann Inkubation der Tubes für 20min bei 37°C. Hierdurch wurde das Zytoplasma der Zellen aufgelöst und nur die Zellkerne blieben erhalten. Zur Neutralisation wurde im Anschluss 4ml 0,1M Natriumborat-Lösung pro Tube gegeben. Nach Zentrifugation der Tubes, Ab-Pipettierung der Überstände sowie Resuspension wurde Dilution-Puffer zugegeben und wiederum zentrifugiert. Im Anschluss wurde nach Absaugen der Überstände und Resuspendieren unter maximal lichtgeschützten Bedingungen 30µl des FITC-markierten anti-BrdU-Antikörpers (BD Nr. 347583, 2ml) pro Tube dazu gegeben und resuspendiert sowie 30min inkubiert. Der Dilution-Puffer wurde wiederum zugegeben und zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und die Pellets resuspendiert. Zuletzt wurden 500µl PI-RNase-Suspension (Herstellung siehe Kapitel 8.1) beigefügt pro Tube. Nach Um-Pipettieren der Suspension in FACS-Tubes wurde unter weiterem Lichtausschluss die endgültige Fluoreszenz-Messung am FACS-Flow-Zytometer vorgenommen. Aufgrund der Instabilität des FITC-markierten anti-BrdU-Antikörpers erfolgte die Messung am selben Tag im Anschluss an die Färbeprozedur.

2.5. Messung am FACS-Flow-Zytometer :

Die präparierten Zellkern-Suspensionen in den FACS-Tubes wurden nacheinander am FACS-Flow-Zytometer „FACSCalibur“ der Fa. Becton-Dickinson mit Hilfe des Programms „CellQuest alias“ ausgewertet.

Die FACS (Fluorescence-activated-Cell-Sorting) - Methode dient zur Charakterisierung individueller Zellenpopulationen innerhalb eines Zellgemisches, basierend auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie. Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Die entstehende Lichtbeugung und -streuung bei Auftreffen des Lasers sowie die emittierte Fluoreszenz werden von Detektoren aufgenommen und ausgewertet. Werden hierbei Zellen eingesetzt, die mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert sind, lassen sich die Zellen über ihre Fluoreszenz charakterisieren. Zur Isolation mehrerer individueller Zellpopulationen können Durchflusszytometer verwendet werden, die mit einer Sortier-Einrichtung bzw. diversen Filtern versehen sind. Auf Grund der charakteristischen Eigenschaften des emittierten Lichtes (hervorgerufen durch die unterschiedliche Bindung der Antikörper) können einzelne Zellen nach zuvor festgelegten Kriterien detektiert werden.

Basierend auf der im Färbeprotokoll durchgeführten Doppelfärbung der Zellkerne der Fibroblasten wurde eine photometrische Messung der Fluoreszenz der Fibroblasten-Zellkerne durchgeführt. Propidiumiodid färbt unspezifisch die DNA-enthaltenden Zellbestandteile mit einer roten Fluoreszenz an. Dadurch konnten die verschiedenen Zellzyklusphasen der Fibroblasten unterschieden werden, da in der G_1 -Phase die Zellkerne einen haploiden Chromosomensatz besitzen und in der G_2 - oder M-Phase einen diploiden. Eine rote Fluoreszenz zeigt sich in der G_2 /M-Phase daher etwa doppelt so ausgeprägt wie in der G_1 -Phase, da die DNA der Zellen hier diploid ist.

Das im Pulse-Labeling verwendete BrdU wurde während des Labelings von allen Zellen, die sich in einer proliferierenden S-Phase befanden, als Thymidin-Analogon in die singlestrang-DNA eingebaut. Am FACS-Flow-Zytometer kann dieser BrdU-Einbau als Fluoreszenz im grünen Lichtwellenbereich durch den FITC-markierten anti-BrdU-Antikörper gemessen werden. Es wurden Filter eingesetzt, welche nur einen speziellen emittierten Lichtfrequenzbereich auswerten, im Detail ein Filter für den Lichtbereich der

roten Fluoreszenz des Propidiumjodids (im Versuch FL3-H) und einer für die grüne Fluoreszenz des FITC-Antikörpers gegen BrdU (im Versuch FL1-H).

Es wurden bei jeder Probe 10.000 Zellereignisse gemessen und ein Diagramm der Messung erstellt. Eine exemplarische Darstellung der Diagramme der Filtermessungen (FL1-H, FL3-H) und deren Kombination zeigen die Abbildungen 2.5.1.-2.5.3. im Folgenden.

Abbildung 2.5.1 zeigt die Färbung durch PI, alleine dargestellt durch den Filter FL3-H: Es ist ein Peak an Fluoreszenz bei ca. 200nm durch den einfachen DNA-Gehalt in der G₁-Phase zu erkennen und ein weiteren Peak bei der doppelten Fluoreszenz durch den diploiden Chromosomensatz in der G₂/M-Phase. Dazwischen befinden sich die S-Phasen-Zellen in ihrer Synthesephase mit ss- und ds-DNA.

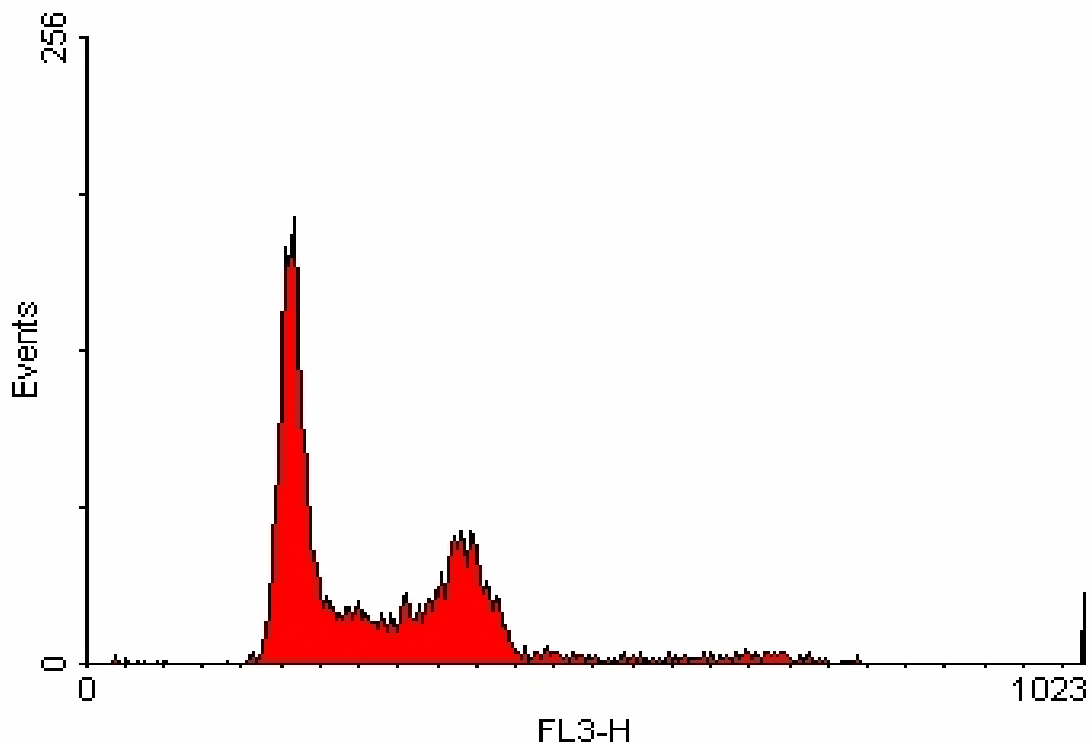


Abbildung 2.5.1: PI-Fluoreszenz

Abbildung 2.5.2 veranschaulicht die BrdU-Färbung mit grüner Fluoreszenz (Filter FL1-H): Es zeigt sich ein breiter Peak bei 15-25nm, der den ungefärbten, zum Zeitpunkt des Pulse-Labelings nicht proliferierenden Zellen entspricht, und ein weiterer Peak bei etwa 900nm, welcher den Zellen mit starker Inkorporation des BrdU beim Labeling entspricht.

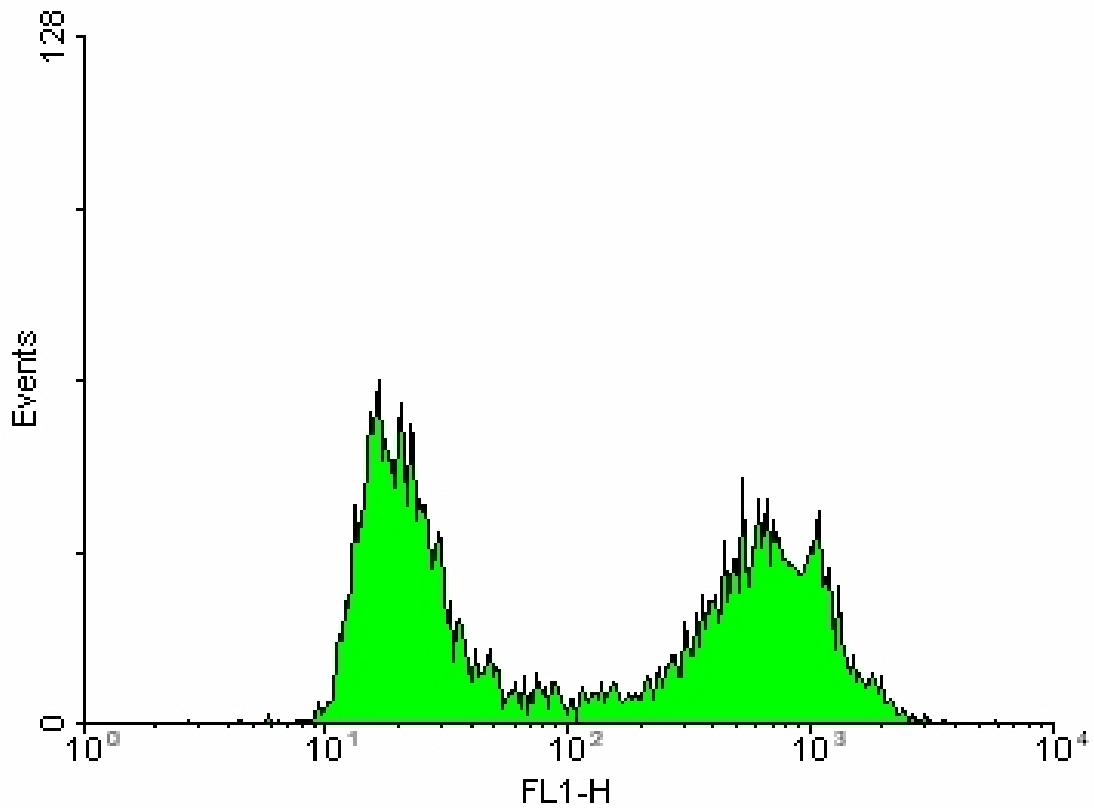


Abbildung 2.5.2: BrdU – Fluoreszenz

Die Kombination der beiden Färbungen ergibt ein charakteristisches Bild in der FACS-Analyse, welches genaue Rückschlüsse auf die Zellzyklusphasen ermöglicht: in der Ordinate wird die durch BrdU ausgelöste grüne Fluoreszenz der Zellkerne über den Filter FL1-H bestimmt (bei guter Anfärbung durch den Antikörper und guter Proliferation der Fibroblasten in Kultur meist mit logarithmischer Skala).

In der Abszisse wird die durch PI bewirkte rote Fluoreszenz über den Filter FL3-H aufgetragen.

Bei dieser Darstellung der roten Fluoreszenz durch PI auf der X-Achse gegenüber der grünen Fluoreszenz des inkorporierten BrdU auf der Y-Achse ergibt sich das folgende exemplarische Zellzyklus-Bild gemäß *Abbildung 2.5.3* (im Beispiel: Kontrollprobe t = 0h)

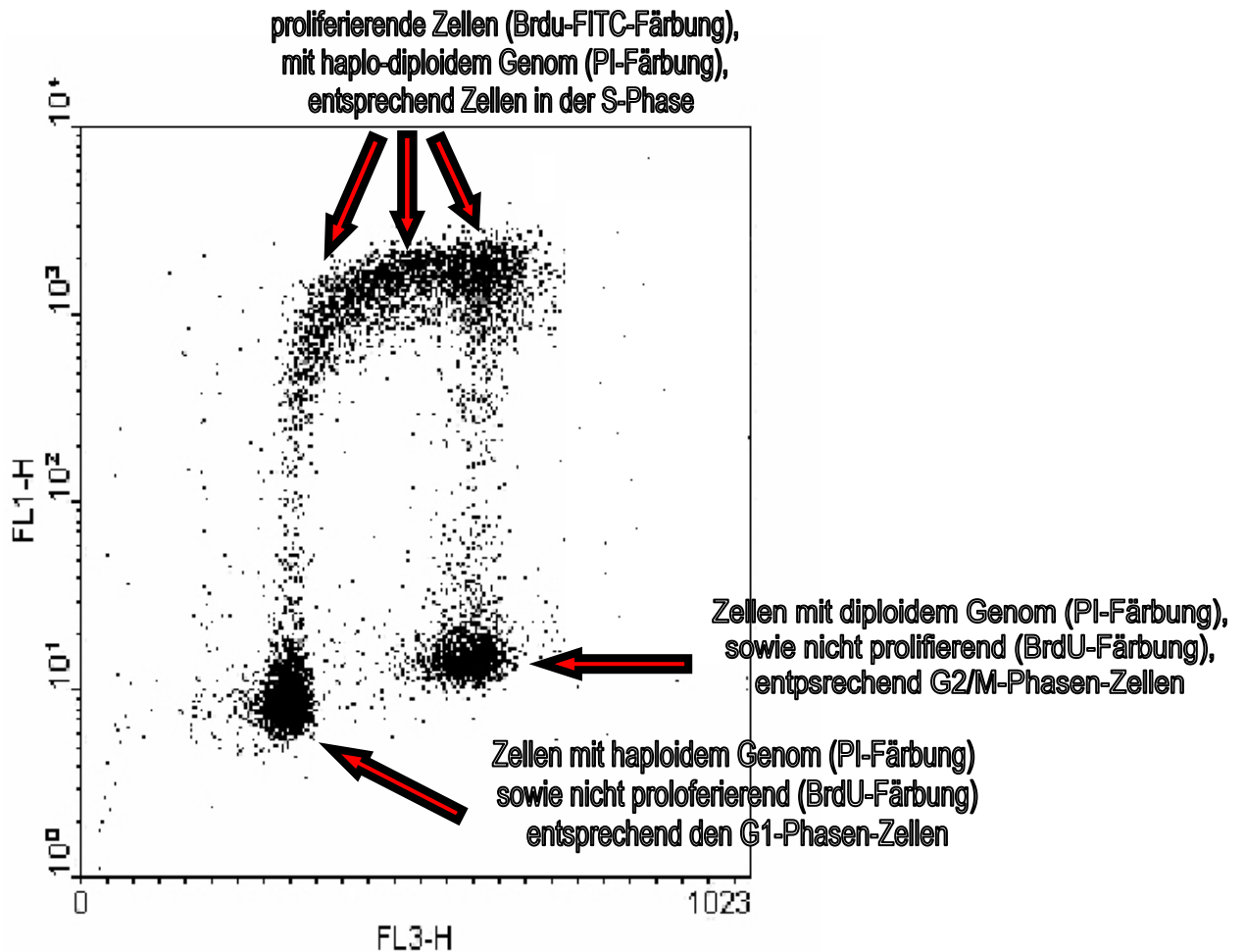


Abbildung 2.5.3: Zellzyklus – Analyse am FACS-Flow-Zytometer mit BrdU-PI-Doppelfärbung

Die verschiedenen Zellzyklus-Phasen der jeweiligen Zellen lassen sich anhand ihrer unterschiedlichen photometrischen Emissionen durch die Färbekombination mit BrdU und PI hiermit objektiv bestimmen.

Speziell anhand des durchgeführten Pulse-Labelings mit BrdU konnten hierdurch objektiv belegbare Aussagen getroffen werden, ob ehemals proliferierende Zellen (welche beim Pulse-Labeling mittels BrdU grün angefärbt wurden) zum Messzeitpunkt die Proliferation eingestellt hatten, oder eine unveränderte Proliferation besaßen. Für Einzelheiten zur Auswertung dieser FACS-Analysen siehe Kapitel 2.6.

2.6.) Auswertung der FACS-Flow-Analysen mit WinMDI®

Nach Abschluss einer kompletten Versuchsserie und Messung der Fluoreszenz am FACS-Flow-Zytometer wurden die erhaltenen Fluoreszenz-Diagramme zur weiteren Analyse mit dem Programm WinMDI® ausgewertet. In den Dotplot-Diagrammen wurden verschiedene Regionen anhand der Zellzyklusphasen wie folgt definiert: alle Zellen der ersten Punktwolke (bei circa 200nm auf der Ordinate) wurden im folgenden als *nicht-grüne* G₁-Zellen (einfacher DNA-Gehalt, *nicht BrdU-gefärbt*) bezeichnet, alle oberhalb dieser Punktwolke als *grüne* G₁-Zellen (einfacher DNA-Gehalt, *BrdU-Anfärbung im Pulse-Labeling*). Um diese Punktwolken wurde per „Region“-Befehl ein Bereich zum Auszählen der Zellereignisse definiert, exemplarisch die Region **R₁** für die *nicht-grüne* G₁-Zellen. Die darüber-liegenden *grünen* G₁-Zellen erhielten die Region **R₅**. Die Punktwolke der G₂/M-Phasen-Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt erhielt die Region **R₂**; die darüber liegenden *grünen* G₂/M-Zellen die Region **R₆**. Die Region **R₄** wurde um die Regionen **R₁-R₃** definiert, die Region **R₈** um **R₅** bis **R₇**, um später die sogenannten „Gates“ definieren zu können, mit denen alle *grünen* bzw. *nicht-grünen* Zellen erfasst wurden (s.u.). Zur Auswertung der prozentualen Anzahl der S-Phasen-Zellen wurde eine dritte Region **R₃** definiert, in der der Abstand zwischen der G₁-und der G₂/M-Punktwolke gedrittelt wurde und das mittlere Drittel als Breite der S-Phasen-Region gewählt wurde. Dies diente der Standardisierung der Breite der S-Phasen-Region in allen Messungen, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die darüber liegenden Zellen (S-Phasen-Zellen mit BrdU-Inkorporation) erhielten die Region **R₇**.

Zellzyklus – Phasen	Region
G₁, nicht-grün	R₁
G₂/M, nicht-grün	R₂
S, nicht-grün	R₃
Gate 1 (alle nicht-grünen Zellen)	R₄
G₁, grün	R₅
G₂/M, grün	R₆
S, grün	R₇
Gate 2 (alle grünen Zellen)	R₈

Abbildung 2.6.1 zeigt ein Beispiel zu Verdeutlichung der genannten Auswertungsmethode anhand der Messung der Entnahme-Phase 5 zum Messzeitpunkt $t = 24\text{h}$ unter konditioniertem 0Gy-Medium (siehe *Abbildung 2.6.1*).

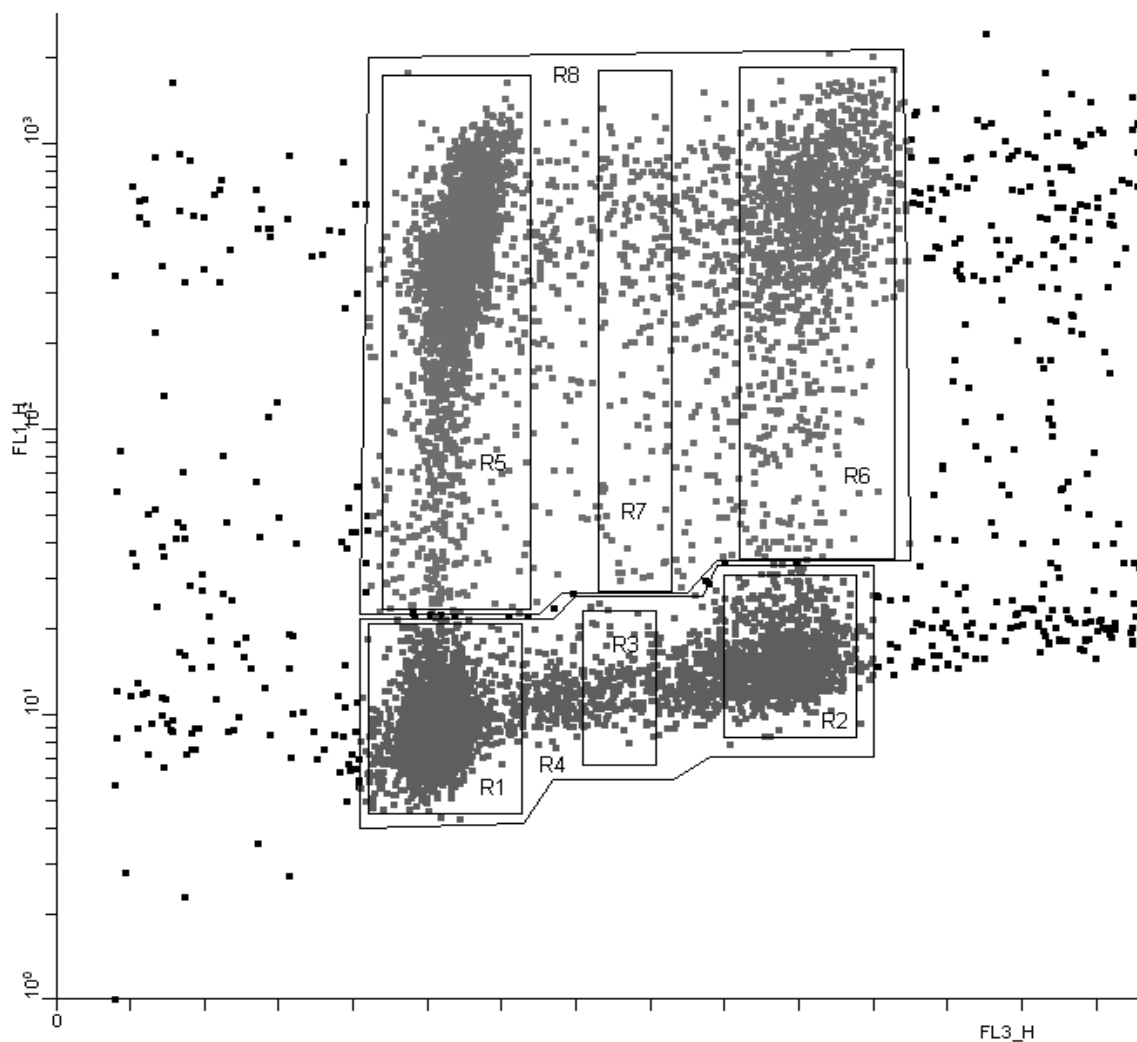


Abbildung 2.6.1 : exemplarisches Beispiel zur Festlegung der Gates und Regionen

Nach der Definition der Regionen wurde per *Gate*-Befehl zuerst das Gate 1 (\mathbf{R}_4) aktiviert. Dieses sogenannte „Gating“ diente der spezifischen Messung der Zellereignisse in der jeweiligen Gate-Region und zur Bestimmung des relativen Anteils der jeweiligen Regionen im Vergleich zum Gate (Gesamtzahl der jeweiligen Zellereignisse).

Mit oben beschriebener Methodik wurde eine prozentuale Auswertung der Zellereignisse in den Regionen R_1 , R_2 und R_3 bezogen auf das Gate R_4 (Gesamtzahl nicht-grüner Zellen) durchgeführt. (siehe *Abbildung 2.6.2.*)

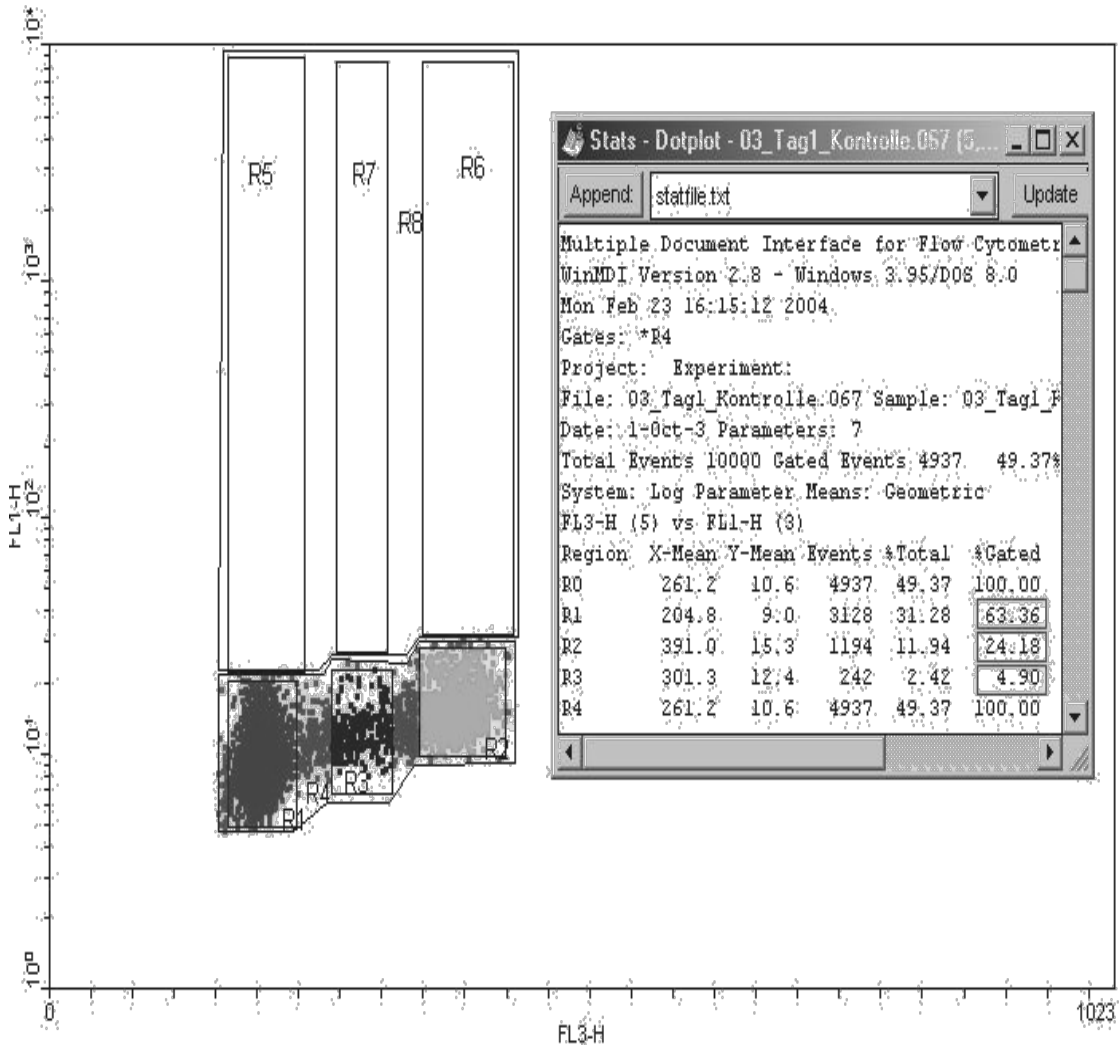


Abb. 2.6.2: Gate 1(R_4) aktiviert zur Auswertung der Regionen R_1 – R_3

Exemplarisch sind am Beispiel die folgenden prozentualen Werte für die Zellzyklusverteilung der nicht-grünen Zellen zu entnehmen: in der G_1 -Phase befanden sich 63,36% aller nicht-grünen Zellen, in der (gemittelten) S-Phase 4,90% aller Zellen und in der G_2 /M-Phase 24,18% aller Zellen.

Unter Verwendung von Gate 2 (R_8) sowie des gleichen Verfahrens wurden die Prozentzahlen der grünen Zellen der jeweiligen Zellzyklusphasen bezogen auf alle grünen Zellen bestimmt. (siehe *Abb. 2.6.3.*)

Mit oben beschriebener Methodik wurde eine prozentuale Auswertung der Zellereignisse in den Regionen R_1 , R_2 und R_3 bezogen auf das Gate R_4 (Gesamtzahl nicht-grüner Zellen) durchgeführt. (siehe *Abbildung 2.6.2.*)

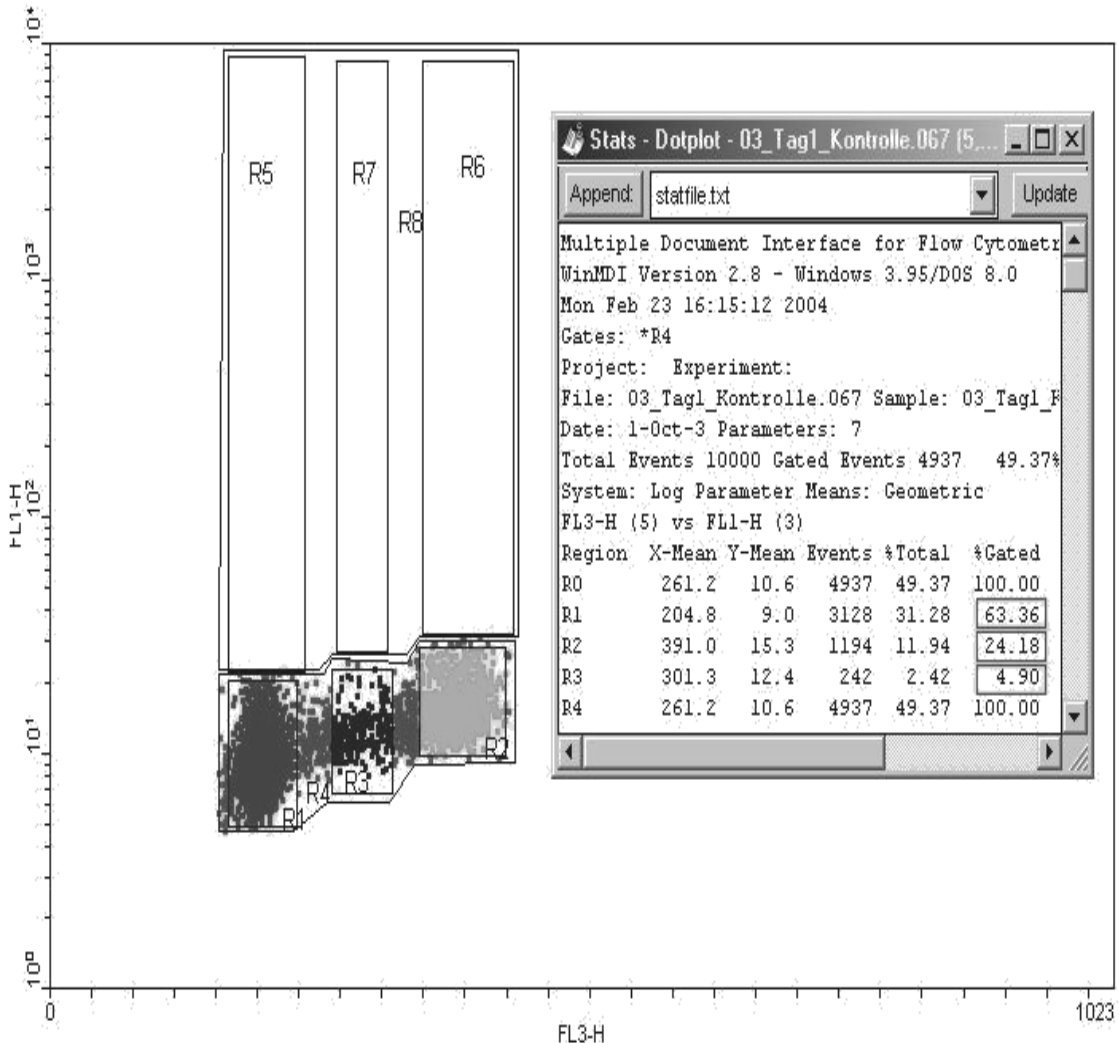


Abb. 2.6.2: Gate 1(R_4) aktiviert zur Auswertung der Regionen R_1 – R_3

Exemplarisch sind am Beispiel die folgenden prozentualen Werte für die Zellzyklusverteilung der nicht-grünen Zellen zu entnehmen: in der G_1 -Phase befanden sich 63,36% aller nicht-grünen Zellen, in der (gemittelten) S-Phase 4,90% aller Zellen und in der G_2 /M-Phase 24,18% aller Zellen.

Unter Verwendung von Gate 2 (R_8) sowie des gleichen Verfahrens wurden die Prozentzahlen der grünen Zellen der jeweiligen Zellzyklusphasen bezogen auf alle grünen Zellen bestimmt. (siehe *Abb. 2.6.3.*)

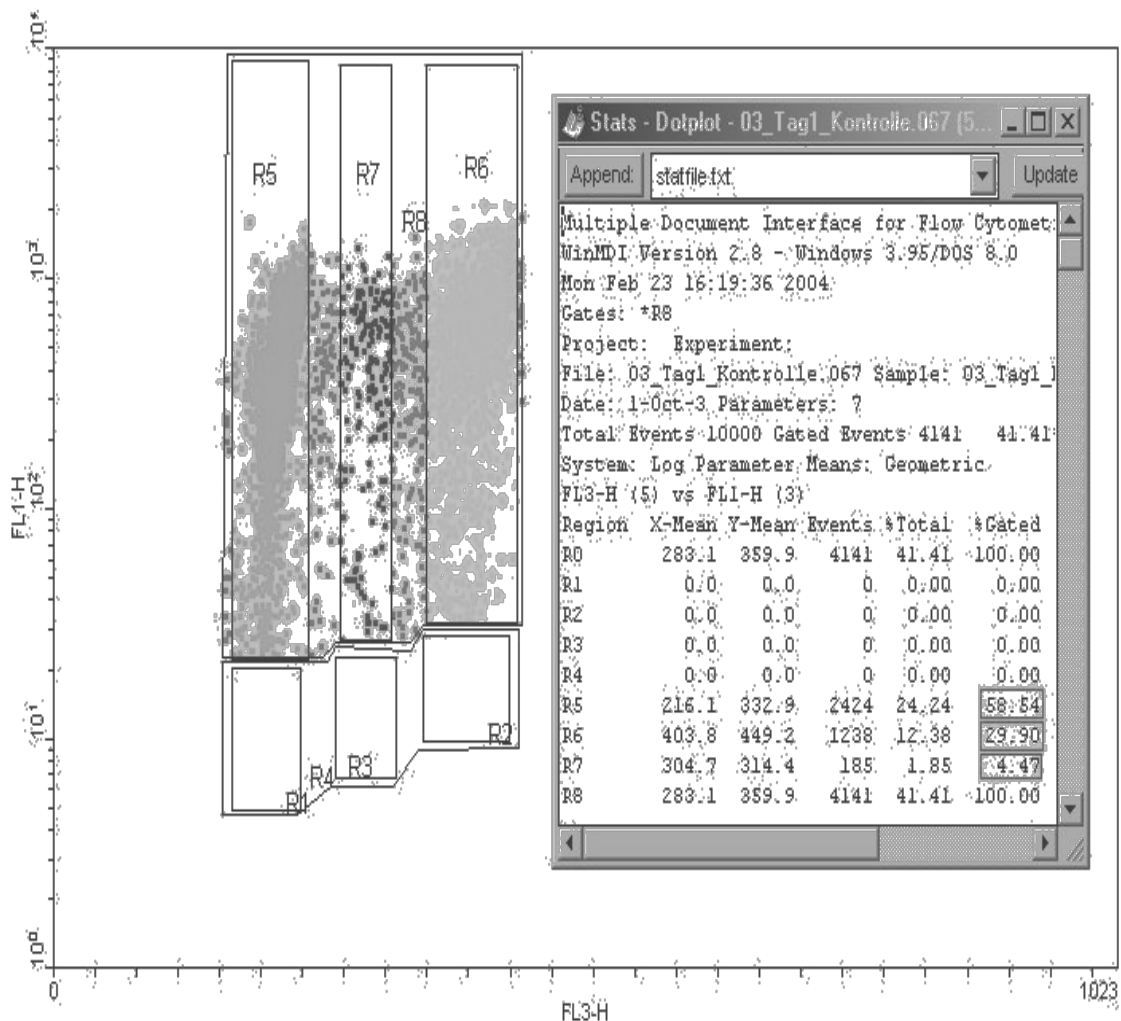


Abb. 2.6.3: Gate 2 (R₈) aktiviert zur Auswertung der Regionen R₅ – R₇

Hier sind dementsprechend exemplarisch die Werte 58,54%, 29,90% und 4,47% für die jeweiligen Regionen und damit die entsprechende prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen G₁, S und G₂/M unter den grünen Zellen zu entnehmen.

Hierdurch konnten bei allen Versuchsproben der Entnahme-Phasen die jeweiligen prozentualen Anteile der Zellen in den Zellzyklus-Phasen G₁, S und G₂/M objektiv bestimmt werden.

Der Kern der beschriebenen Methodik besteht wie oben dargestellt im Pulse-Labeling der Zellen: spezifische Zellpopulationen können so grafisch dargestellt und deren Proliferation und Zellzykluskinetik im Verlauf unter verschiedenen Bedingungen dokumentiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die oben beschriebene Methodik angewandt, um den Einfluss von Kulturmedien bestrahlter Fibroblasten auf andere, unbestrahlte Fibroblasten am FACS-Flow-Zytometer zu objektivieren, in dem die jeweiligen Veränderungen der Proliferation und Zellzyklus-Kinetik „gelabelter Zellen“ unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen dargestellt und statistisch ausgewertet wurden.

Die weitere Analyse und der Vergleich der prozentualen Daten der Zellzyklusphasen je nach Entnahme-Phase, Strahlenbedingung und Inkubationsdauer erfolgte mit *Microsoft Excel*^R zur tabellarisch anschaulichen Darstellung.

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm *Graphpad InStat 3*[®] verwendet, zur statistischen Auswertung auf Signifikanz wurde der "*Welch – korrigierte unpaarige T-Test*" angewendet.

3.) Ergebnisse

3.1) Übersicht der Ergebnisse der Entnahme-Phasen I-VI

Im folgenden Ergebnisteil werden die Ergebnisse der Zellzyklus-Beobachtungen der „nicht-grünen“, ungelabelten Zellen zur Darstellung herangezogen, da sich keine signifikanten Unterschiede in den Zellzyklus-Verteilungen zwischen grünen, BrdU-gelabelten, und nicht-grünen, ungelabelten Zellen zeigen ließen.

Bei den Zellen, die Überstände der **Entnahme-Phase I** (= Tag 2 nach Radiotherapie) erhielten, ließ sich in den prozentualen Anteilen der Fibroblasten in der G₁-Phase keine signifikante Veränderung durch Inkubation mit den verschiedenen konditionierten Medien zeigen. Ebenso galt dies auch für die prozentualen Anteile der S-Phasen und G₂/M-Phasen. Ein klarer Effekt oder Trend durch die Inkubation mit konditionierten Medien war nicht abgrenzbar. Ähnlich unspezifisch zeigten sich die Ergebnisse der „grünen“ Zellen (hier nicht im Einzelnen dargestellt).

Bei Zugabe der Überstände des **Entnahme-Phase II** (= Tag 4 nach Radiotherapie) zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 24h und 72h eine Erhöhung der Anteile der G₁-Phasen bei den Proben mit konditioniertem 0Gy – Medium im Vergleich zum 10Gy-Medium (hier am Beispiel der G₁ – Phasen Zellen, siehe *Tabelle 3.1.1. und Abbildung 3.1.1*)

E-Phase II, G1-Phasen-Zellen :

Versuchstage	0Gy-24h	5Gy-24h	10Gy-24h	0Gy-72h	5Gy-72h	10Gy-72h
<i>Versuch 6 a</i>	48,0	52,7	54,7	68,1	71,1	76,9
<i>Versuch 6 b</i>	46,8	53,4	52,4	71,4	74,0	77,0
<i>Versuch 13 a</i>	44,6	50,4	47,0	71,8	68,9	70,5
<i>Versuch 13 b</i>	44,1	53,6	49,3	73,1	66,2	67,4
Mittelwerte	45,9	52,5	50,8	71,1	70,0	72,9
Standardabweichung	1,8	1,5	3,4	2,1	3,3	4,8

Tabelle 3.1.1. : Tabelle der G₁-Zellphasen-Anteile mit Entnahmephase 2-Medium unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

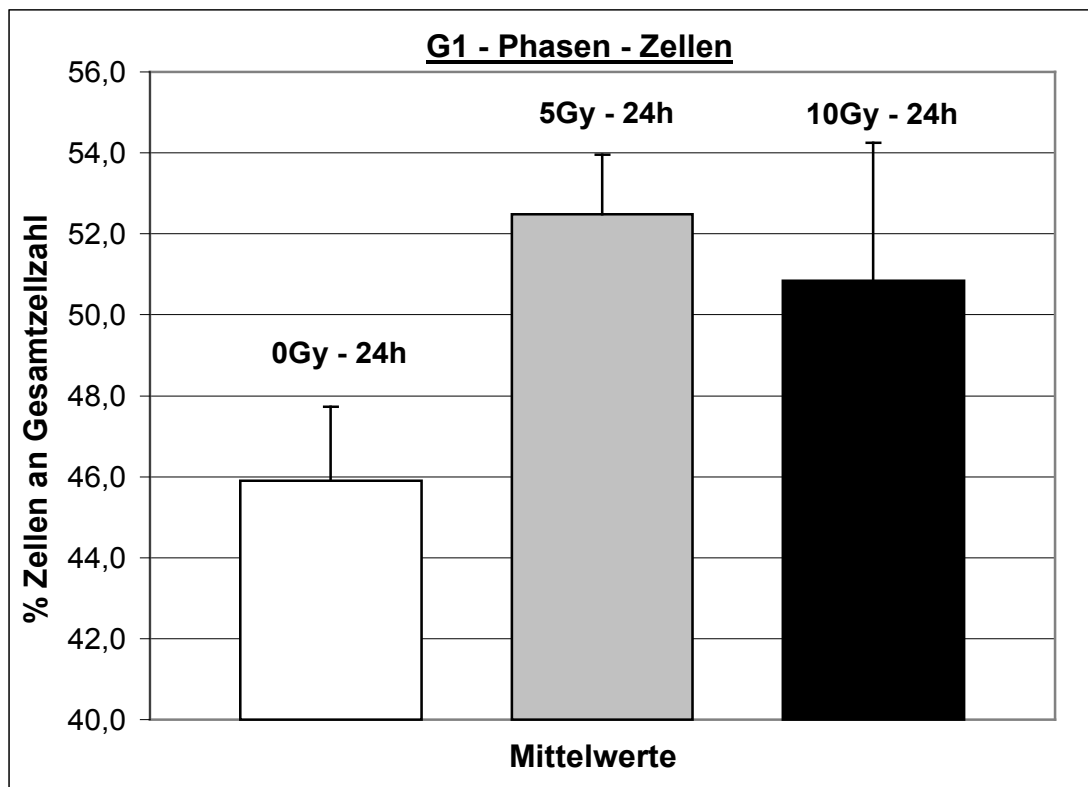


Abbildung 3.1.1: Trend zur prozentualen Zunahme der G₁-Phasen-Zellen durch konditioniertes Medium 4 Tage nach Radiotherapie bei 24Stunden Inkubation

Wie ersichtlich ist, bestand ein grenzwertig signifikanter Unterschied zwischen den prozentualen Anteilen der G₁-Phasen nach Inkubation mit unbestrahlten bzw. mit 5- oder 10Gy konditioniertem Medium nach 24h ($p=0,06$); nach 72h war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar.

Bei den S-Phasen-Zellen zeigte sich eine prozentuale Abnahme abhängig von der Erhöhung der Bestrahlungsdosis des konditionierten Überstand-Mediums. Diese Abnahme der S-Phasen-Zellen war bei $t=24h$ grenzwertig signifikant ($p= 0,06$), siehe auch *Abbildung 3.1.2*. Bei den restlichen Inkubationszeitpunkten erreichten die Differenzen der prozentualen S-Phasen-Zellen-Anteile eine Signifikanz von ca. $p= 0,10$. Ein Trend war auch hier ersichtlich.

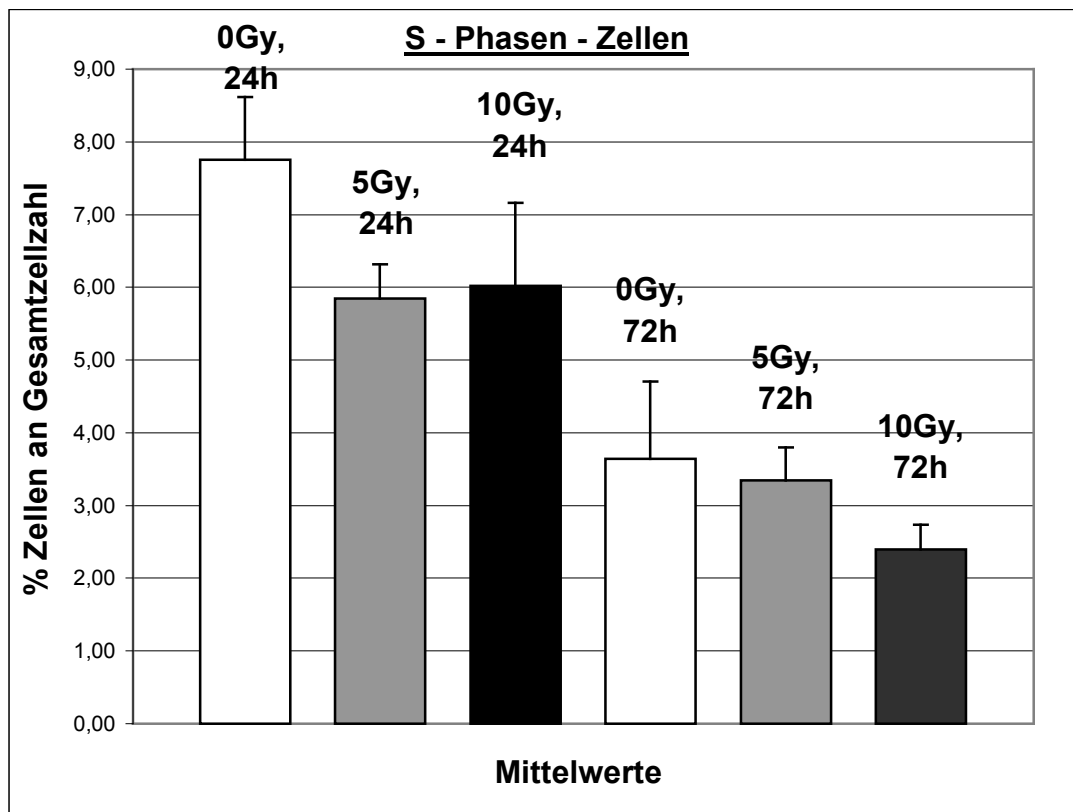


Abb. 3.1.2: Reduktion der S- Phasen unter 10Gy-kondit. Medium im Vgl. zu 0Gy-Medium bei Inkubation mit Medien 4 Tage nach Radiotherapie

Bei den G₂/M-Phasen-Anteilen war nur eine leichte Reduktion der prozentualen Zellzahl der Fibroblasten mit 10Gy-konditioniertem Medium gegenüber denen mit 0Gy-Medium zu erkennen, vorwiegend bei späteren Inkubationszeitpunkten; diese zeigte sich aber nicht konsistent und nicht signifikant.

Während der Wiederholung der Entnahme-Phase II wurde noch (wie unter Kapitel 2.3 beschrieben) ein Antikörper gegen TGF- β zu zwei Proben mit 10Gy – konditioniertem Medium gegeben. Bei den G₁-und G₂/M-Phasen war kein deutlicher Antikörper-Effekt nachweisbar. Im Vergleich zu den Proben mit 10Gy – Medium ohne Antikörper-Zugabe stiegen die S- Phasen bei Antikörper-Zugabe etwas an, dieser Anstieg bestand aber in einem Bereich von 0,5 – 1 % mit hoher Standardabweichung.

Die Resultate der Überstandsmedien der **Entnahme-Phase III** (= 6 Tage nach Radiotherapie) zeigten keine wesentlichen Unterschiede von denen der Entnahme-Phase II: eine leichte anteilmäßige Erhöhung der G₁-Phasen-Zellen mit Schwerpunkt auf den

späteren Messzeitpunkten im Vergleich von 0Gy- gegenüber 10Gy-konditioniertem Überstandsmedien war erkennbar, die S-Phasen sanken ebenfalls tendenziell etwas stärker bei 10Gy- als bei 0Gy-Überstandsmedien ab und die G₂/M-Phasen der Zellen mit konditionierten Überstandsmedien tendierten teilweise ebenfalls zu einer stärkeren Abnahme im Vergleich zu denen der nicht-konditionierten Zellen. Insgesamt ließ sich hier kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachweisen.

Bei Auswertung der Überstände der **Entnahme-Phase IV** (= 8 Tage nach Radiotherapie) ließ sich ein deutlicher Effekt der konditionierten Medien auf die G₁- und S-Phasen-Verteilungen dokumentieren: die prozentualen Anteile der G₁-Phasen-Zellen waren bei Medien unbestrahlter Zellen konsistent im Vergleich zu 10Gy-kondit. Medium erhöht, v. a. nach 24h und 72h. (siehe *Abbildung 3.1.3*).

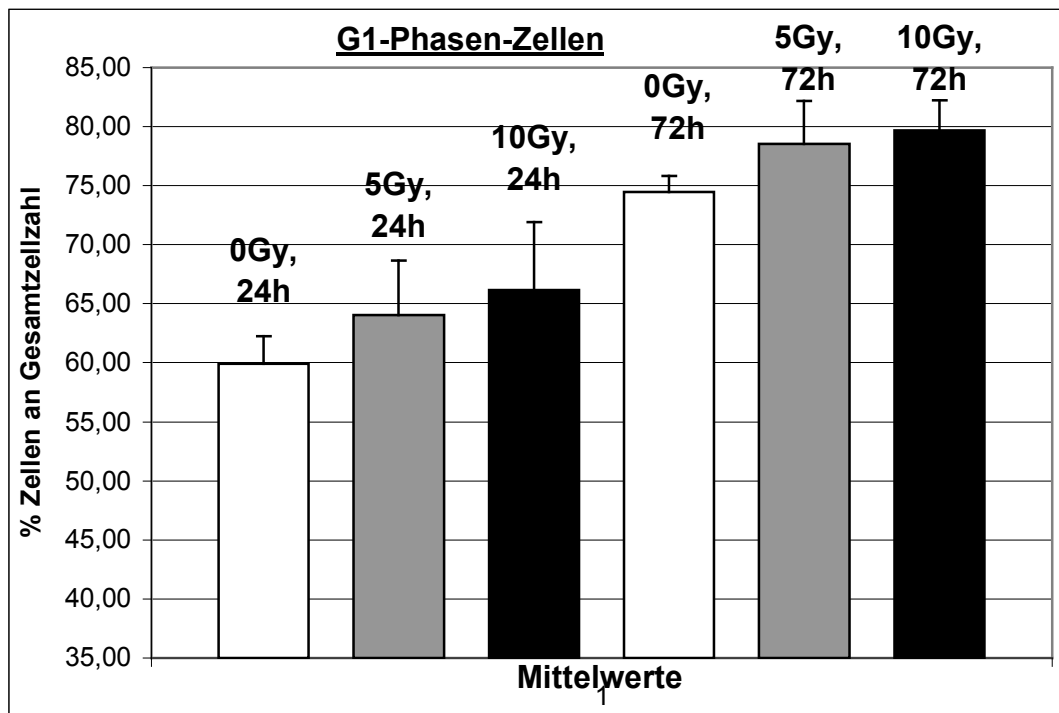


Abb. 3.1.3: Erhöhung des Prozentanteils G1-Phasen-Zellen bei bestrahlten Medien im Vergleich zu 0Gy-Medien mit tendenzieller Dosisabhängigkeit

Die Prozentzahlen bei Zellen mit 5Gy-konditionierten Überständen zeigten konklusiv Werte zwischen denen der Zellen mit 0Gy- und 10Gy-kondit. Überständen und gaben somit Hinweise für eine Dosisabhängigkeit des dargestellten Effektes. Für die S-Phasen-Zellen zeigte sich ebenfalls eine stärkere Erniedrigung der anteilmäßigen Prozentzahlen im

Vergleich von kondit. 0Gy- zu 10Gy-Überstandsmedien. Erstmals konnte hier ein durchgängiger Trend für die G₂/M-Phasen-Verteilung abgeleitet werden: mit steigender Strahlungsdosis des konditionierten Mediums nahmen die G₂/M-Phasen-Prozentzahlen stetig ab; dies ließ sich vor allem nach 24h und 72h Inkubation deutlich erkennen. Bei t = 24h ergab der Unterschied zwischen 0Gy- und 10Gy-kondit. Überstandsmedien der G₂/M-Zellen eine Signifikanz von p=0,019 (siehe *Tabelle 3.1.4.* und *Abbildung 3.1.4*)

Entnahme-Phase IV, G2/M-Phasenzellen:

Versuchstage	0Gy-24h	5Gy-24h	10Gy-24h	0Gy-72h	5Gy-72h	10Gy-72h
<i>Versuch 8 a</i>	27,2	20,8	22,2	10,9	11,9	9,1
<i>Versuch 8 b</i>	25,2	22,4	20,1	12,3	9,2	10,4
<i>Versuch 11 a</i>	28,2	24,9	23,5	19,5	16,6	18,3
<i>Versuch 11 b</i>	23,6	23,7	21,5	18,4	15,4	14,8
Mittelwerte	26,0	22,9	21,8	15,3	13,3	13,1
Standardabweichung	2,0	1,8	1,4	4,3	3,4	4,2

Tabelle 3.1.4.: Tabelle der G₂/M-Phasen-Anteile der Zellen mit Entnahmephase IV-Überstandsmedien unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

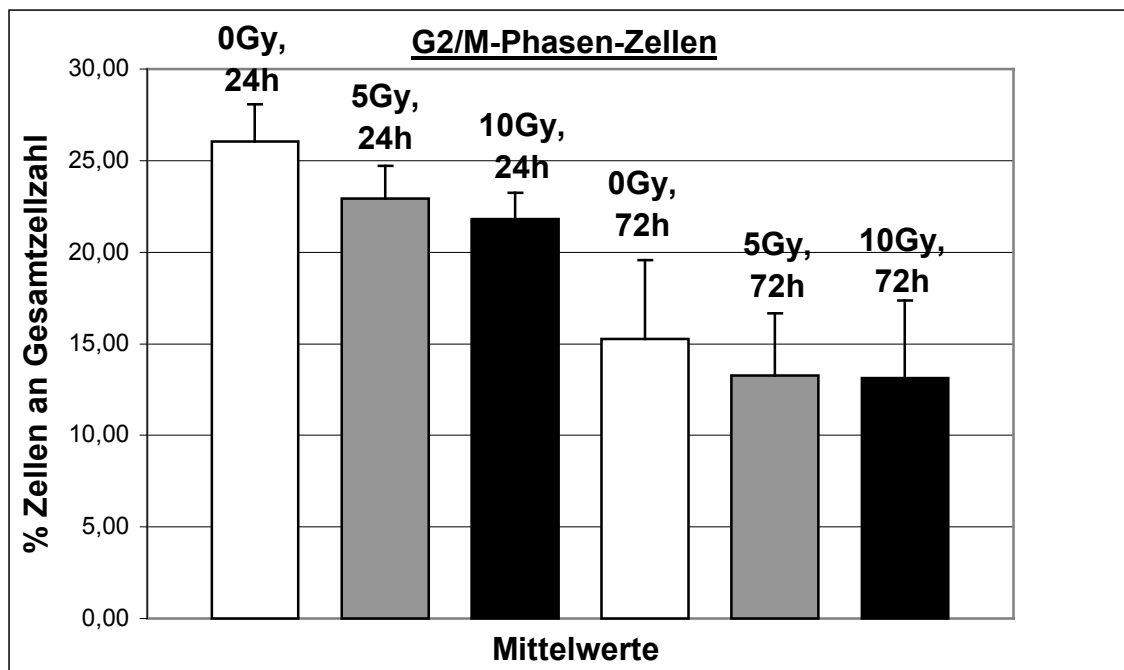


Abb. 3.1.4.: Reduktion der G₂/M-Phasen durch Inkubation mit Überstandsmedien der Entnahmephase IV (= 8 Tage nach RT) im Vergleich der Strahlenbedingungen

Eine Dosisbeziehung für 0Gy-, 5Gy- und 10Gy-kondit. Überstandsmedien war ersichtlich.

Der bei der Wiederholung des Entnahme-Tages 4 eingesetzte Antikörper gegen TGF- β zeigte keine eindeutigen Effekte auf die G₁-, S- und G₂/M-Phasen-Prozentverteilung.

G1	0 Gy	10 Gy	10Gy+AK	S	0 Gy	10 Gy	10Gy+AK	G2/M	0 Gy	10 Gy	10Gy+AK
24h	58,765	61,935	61,24	24h	5,39	4,485	5,965	24h	25,89	22,47	22,915
72h	73,7	77,515	76,9	72h	2,38	1,87	2,105	72h	18,95	16,555	17,105

Tabella 3.1.5: Zellzyklusverteilung in der Entnahme-Phase IV bei Zugabe des TGF- β -Antikörpers

Da diese Versuchsanordnung nur einmalig bei der Wiederholung der Versuchsserie durchgeführt wurde, sind die Ergebnisse nur eingeschränkt verwertbar, der Antikörper gegen TGF- β beeinflusste die Zellzyklusverteilung hier nicht.

Für die Überstände der **Entnahme-Phase V** (Überstandsmedien 10 Tage nach Radiotherapie) stellte sich über die gesamte Versuchsserie betrachtet der deutlichste Zusammenhang im Vergleich der prozentualen Unterschiede der Zellenzyklusphasen dar: bei 24 Stunden und besonders ausgeprägt bei 72 Stunden Inkubation konnte bei den G₁-Phasen-Zellen stetig eine Erhöhung der prozentualen Anteile an G₁-Phasen mit steigender Bestrahlungsdosis des konditionierten Mediums nachgewiesen werden. Dieser Unterschied erreichte bei t =72h Signifikanz mit p=0,033. (siehe auch *Tabella 3.1.6* und *Abbildung 3.1.5*)

Entnahme-Phase V, G1-Phasen-Zellen:

Versuchstage	0Gy-24h	5Gy-24h	10Gy-24h	0Gy-72h	5Gy-72h	10Gy-72h
<i>Versuch 9 a</i>	54,9	54,7	59,8	70,4	65,3	71,9
<i>Versuch 9 b</i>	54,0	53,8	54,0	66,4	68,5	70,2
<i>Versuch 12 a</i>	57,5	64,9	68,6	68,8	76,3	77,5
<i>Versuch 12 b</i>	61,2	65,6	67,5	63,8	74,6	76,3
Mittelwerte	56,9	59,7	62,5	67,3	71,2	74,0
Standardabweichung	3,2	6,4	6,9	2,9	5,1	3,5

Tabella 3.1.6: Tabelle der prozentualen G₁-Phasen-Anteile mit Entnahmephase V – Überstandsmedien unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen.

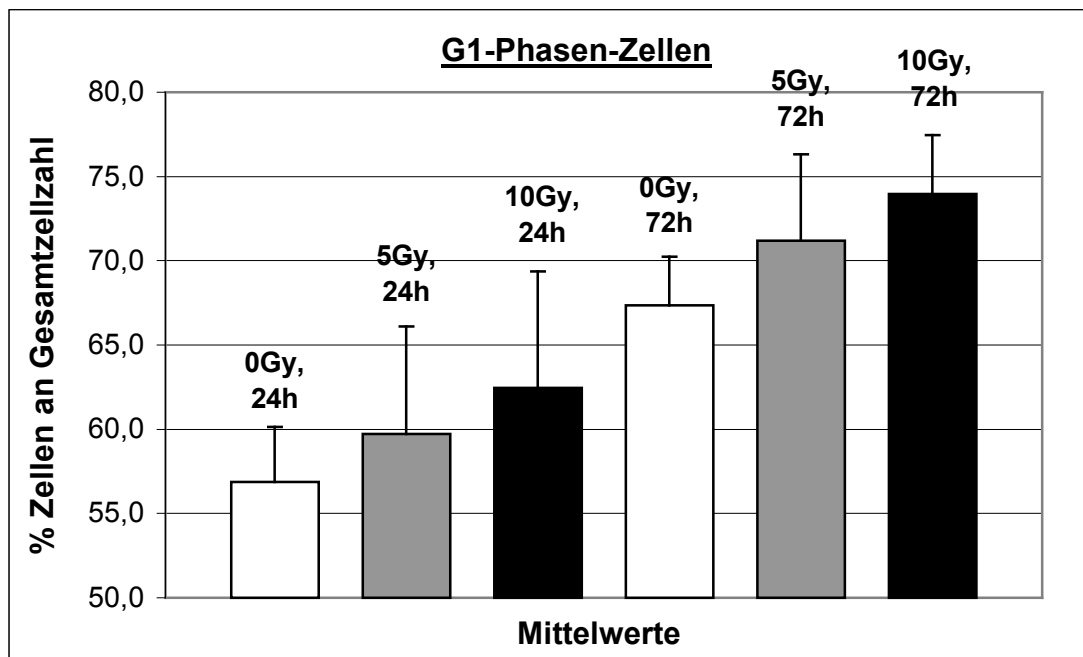


Abbildung 3.1.5: deutlicher Trend zur Erhöhung der prozentualen Anteile der G₁-Phasen-Zellen zw. 0Gy- und 10Gy- Überständen, v.a. bei 72 Stunden Inkubation

Auch für die S-Phasen-Anteile war der deutlichste Unterschied im Vergleich der 6 Entnahmephasen sichtbar (siehe *Abbildung 3.1.6*): Bei 24h Inkubation erreichten die Unterschiede der S-Phasen-Zellen Signifikanz mit $p=0,011$, bei den restlichen S-Phasen-Messungen betrug die Signifikanz zwischen $p=0,063$ bis $p=0,119$.

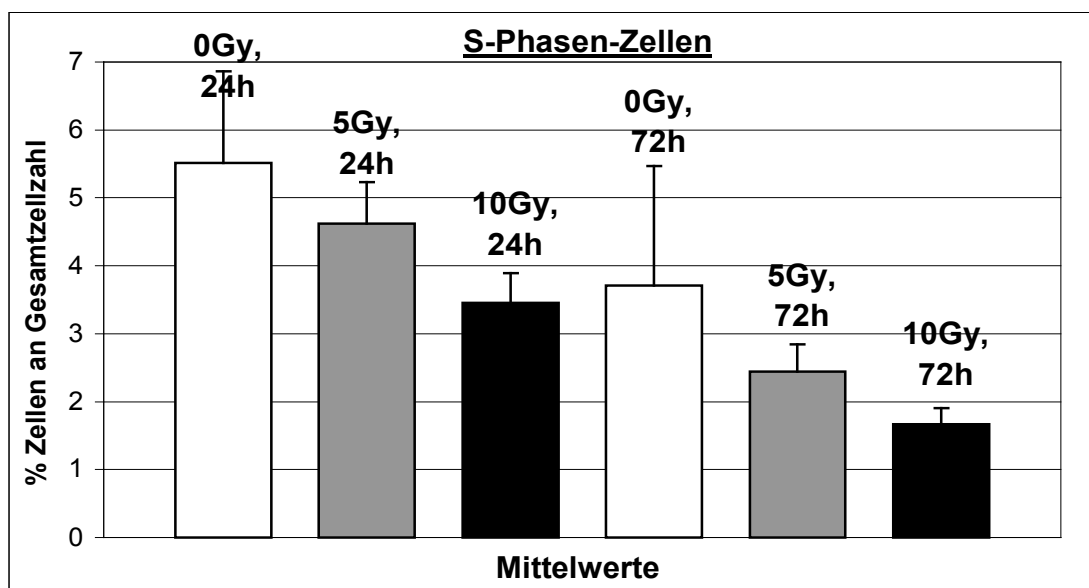


Abb. 3.1.6: Reduktion der S-Phasen-Zellen durch Überstandsmedien der Entnahmephase V (=10 Tage nach Radiotherapie) im Vergleich der Strahlenbedingungen

Die Ergebnisse der Untersuchungen der G₂/M-Phasen zeigen keine eindeutig signifikanten Veränderungen, ein nicht-signifikanter Trend (Abnahme der prozentualen Anteile an G₂/M-Phasen-Zellen mit steigenden Bestrahlungsdosen der Überstandsmedien) konnte dokumentiert werden. (vgl. *Tabelle 3.1.7*)

Entnahme-Phase V, G₂/M – Phasenzellen :

Versuchstage	0Gy-24h	5Gy-24h	10Gy-24h	0Gy-72h	5Gy-72h	10Gy-72h
Versuch 9 a	26,8	31,7	30,4	23,1	24,8	23,4
Versuch 9 b	33,6	31,1	33,0	24,9	22,3	22,5
Versuch 12 a	28,0	24,8	19	18,9	16,9	13,0
Versuch 12 b	24,7	22,0	22,8	20,0	15,5	15,4
Mittelwerte	28,3	27,4	26,3	21,7	19,9	18,6
Standardabweichung	3,8	4,8	6,5	2,8	4,4	5,2

Tab. 3.1.7: Tendenzielle Abnahme der G₂/M-Phasen-Zellen unter Einfluss der verschiedenen Strahlungsbedingungen in Entnahmephase V

Die Wiederholung der Versuchsreihen der **Entnahmephase V mit Antikörper-Gabe** gegen TGF- β zeigte einen ausgeprägteren Effekt als bei Überstandsmedien der früheren Entnahme-Phasen. In allen Zellzyklusphasen bewirkte der Antikörper im Vgl. zu den mit 10Gy-kondit. Überstandsmedien behandelten Zellen ein Absinken der G₁-Phasen- und Ansteigen der S-Phasen-Prozentzahlen im Vgl. zur Verteilung bei 10Gy-kondit. Überstandsmedium ohne Antikörper-Zugabe (siehe *Tabelle 3.1.8, Abbildung 3.1.7 und 3.1.8*).

Entnahme-Phase V, G₁ – Phasenzellen im Vgl. bei Ak-Zugabe:

Versuchstage	0Gy-24h	10Gy-24h	10Gy+Ak-24h	0Gy-72h	10Gy-72h	10Gy+Ak-72h
Versuch 9 a	57,5	68,6	65	68,8	77,5	76,9
Versuch 9 b	61,2	67,5	63	63,8	76,3	74,6
Versuch 12 b	59,3	68,1	64	66,3	76,9	75,7
Mittelwerte	59,3	68,1	64,0	66,3	76,9	75,7
Standardabweichung	1,9	0,6	1,0	2,5	0,6	1,2

Tab. 3.1.8: Trend zur Reduktion der G₁-Phasenzellen der Entnahmephase V bei Antikörper-Zugabe zu Überstandsmedien der 10Gy-Strahlenbedingung

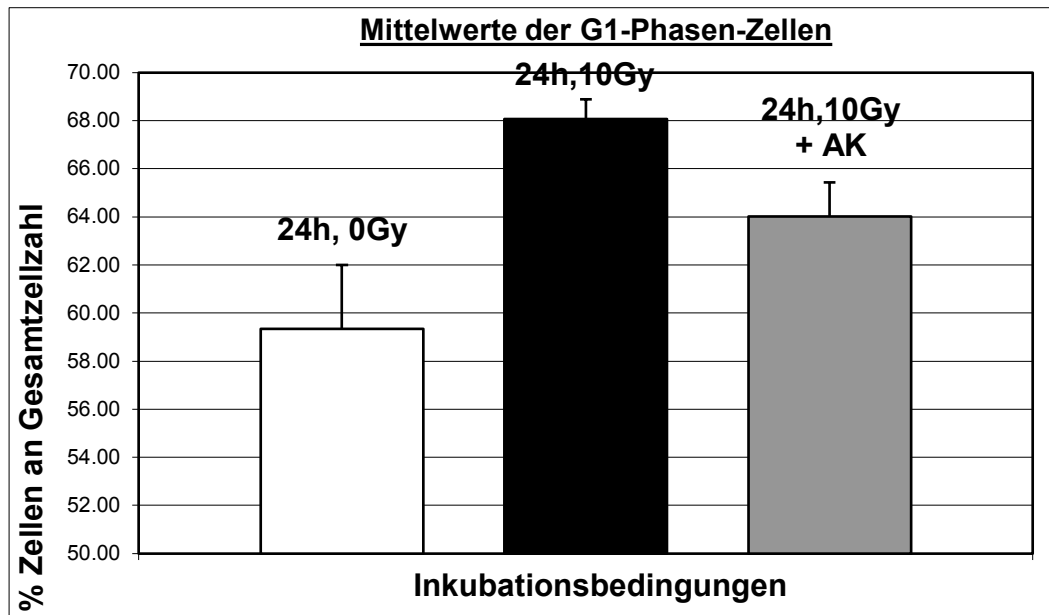


Abbildung 3.1.7: Reduktion der prozentualen Anteile an G₁-Phasen im Vgl. zu kondit. 10Gy-Medium durch Antikörper-Zugabe

Die Werte unter Antikörperzugabe erreichten nicht die Werte der 0Gy- Kontrollgruppe. Da diese Antikörper-Zugabe nur bei der Wiederholung der Versuchsreihe erfolgte, kann keine statistische Aussage zu diesem Trend gemacht werden.

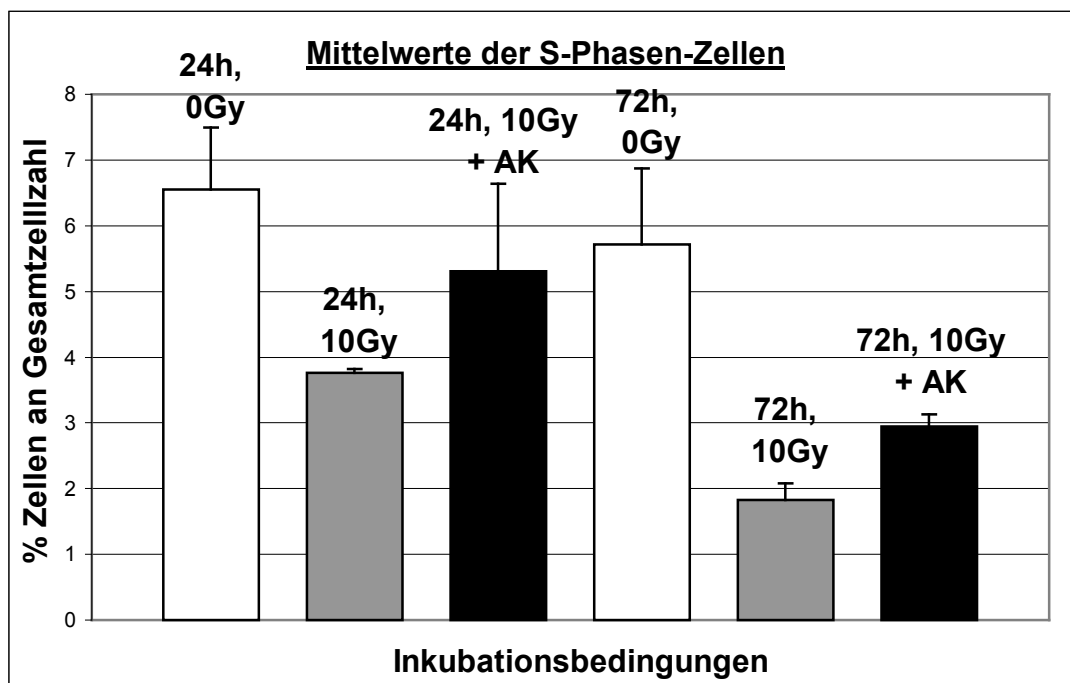


Abbildung 3.1.8: Anstieg der prozentualen Anteile an S--Phasen im Vgl. zu kondit. 10Gy-Medium durch Antikörper-Zugabe.

Die **Entnahme-Phase VI** (=12 Tage post Radiatio) dokumentierte wiederum tendenziell, dass ab den späteren Zeitpunkten der Gewinnung des konditionierten Mediums (Entnahme-Phasen IV, V und VI) ein deutlicherer Effekt auf die Zellzyklusverteilung der Zellen durch das konditionierte Überstandsmedium entstand.

Im Wesentlichen existierten keine Unterschiede zu den Ergebnissen, die aus den Überständen der Entnahmephase V- Medien resultieren. Die G₁-Phasen-Anteile stiegen mit Erhöhung der Strahlendosis des kondit. Mediums zu allen Messzeitpunkten an (siehe exemplarisch *Abbildung 3.1.9*). Die prozentualen S- Phasen-Anteile sowie teilweise auch G₂/M-Phasen-Anteile fielen bei Inkubation mit 10Gy-kondit. Medium gegenüber 0Gy-kondit. Medium ab.

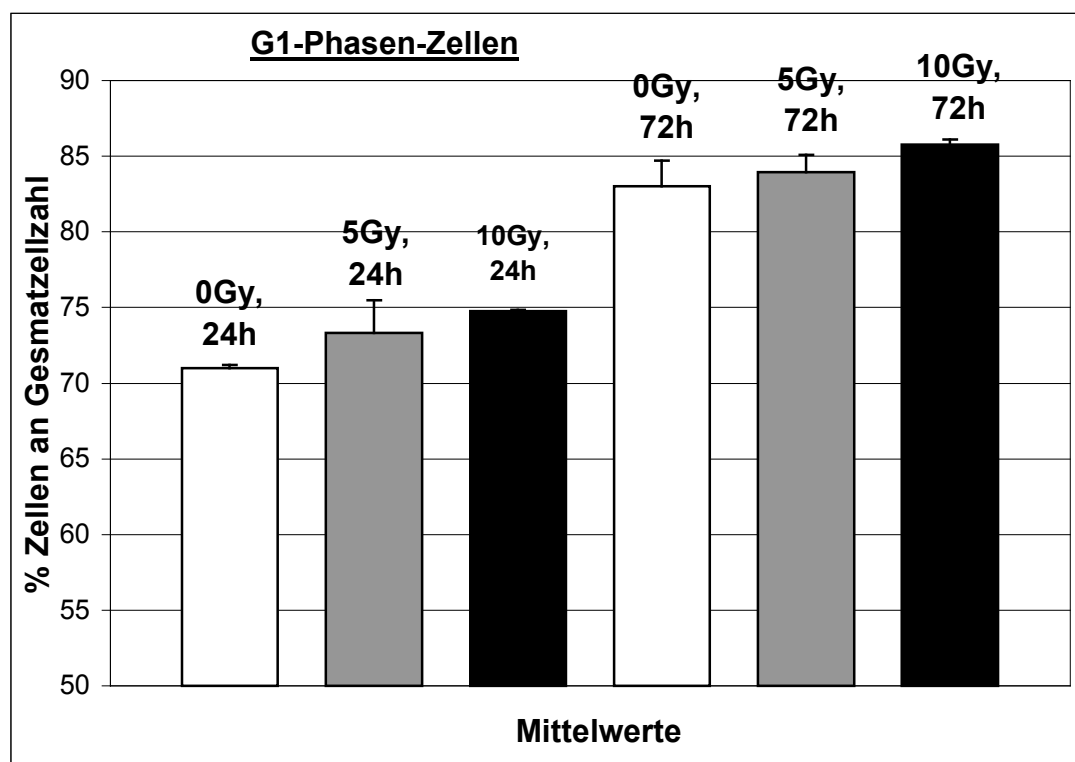


Abb. 3.1.9: Anstieg der G₁-Phasen-Zellen mit steigender Dosis des Überstandsmediums in der Entnahmephase VI mit tendenziell sichtbarer Dosisabhängigkeit

Zusammenfassend wird festgehalten, dass ab der Entnahmephase II folgender Trend ersichtlich wurde: Zellen mit Inkubation von 10Gy-kondit. Überstandsmedium persistierten im Vergleich zu 0Gy-kondit. Medium stärker in der G₁-Phase (d.h. der prozentuale Anteil der Zellen in der G₁-Phase war zum jeweiligen Messzeitpunkt größer bei Inkubation mit Überstandsmedien bestrahlter Fibroblasten als derjenige bei unbestrahlten Überstandsmedien). Die gemessenen S- und G₂/M-Phasen-Prozentanteile nahmen konsekutiv ab, mit teilweiser Signifikanz der Versuchsergebnisse dieser Zellen. Des Weiteren konnte durch Zugabe eines TGF- β -Antikörpers eine partielle Antagonisierung dieses Effektes aufgezeigt werden, wobei diese Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren sind aufgrund der begrenzten Versuchszahl.

3.2) Vergleichsanalyse der Entnahme-Phasen E_{II} und E_{III} gegenüber E_{IV} und E_V

Wie unter Kapitel 3.1 erläutert, zeigte sich ab der Entnahme-Phase II bei allen Versuchen der Trend, dass Zellen mit Inkubation von 10Gy-kondit. Medium im Vergleich zu 0Gy-kondit. Medium stärker in der G₁-Phase persistierten (d.h. die prozentuale Anzahl der Zellen am Messzeitpunkt in der G₁-Phase größer war) und die S- und G₂/M-Phasen abnahmen. Die nachfolgenden Auswertungen sollten zeigen, ob eine zeitliche Abhängigkeit dieses Effektes vom Entnahmezeitpunkt statistisch zu erkennen ist. Dazu wurden die **frühen Entnahme-Phasen II und III** als **Gruppe A** zusammengefasst und gegenüber den **späten Entnahme-Phasen IV und V** als **Gruppe B** verglichen hinsichtlich der Ausprägung der erkennbaren Effekte auf die Zellzyklusverteilung.

Es ergab sich bei dieser Gegenüberstellung folgendes Bild für die **G₁-Phasen-Zellen nach 24h** Inkubation: für die **Gruppe A** (= Entnahmephasen II und III) zeigte sich eine mittlere Differenz von 4,9 absoluten Prozentpunkten. Bei der Gruppe B (= Entnahmephasen IV und V) betrug die mittlere Differenz zw. 0Gy und 10Gy absolut 5,9 Prozentpunkte (siehe *Tabelle 3.2.1*).

Die Unterschiede zwischen den jeweiligen 0- und 10Gy-Bedingungen waren signifikant, aber es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der frühen und der späten Entnahmephasen nachweisen.

G1-Phasen-Verteilung nach 24h Inkubation

Inkubierte Medien	Gruppe A (E-Phase II+III)		Gruppe B (E-Phase IV+V)	
	0Gy	10Gy	0Gy	10Gy
	-	-	59,8	66,6
	-	-	62,4	74,1
	48,0	54,7	56,8	62,6
	46,8	52,4	60,8	61,3
	44,6	47,0	54,9	59,8
	44,1	49,3	54,0	54,0
	53,1	58,7	57,5	68,6
	53,0	57,2	61,2	67,5
Mittelwert	48,3	53,2	58,4	64,3
Standardabweichung	3,9	4,6	3,1	6,2
Mittlere Differenz	4,9		5,9	
Signifikanz	p = 0,075		p = 0,036	

Tabella 3.2.1: Auswertung des Vergleich der Entnahme-Phasen II und III (Gr. A) gegenüber den Entnahme-Phasen IV und V (Gr. B) bez. G1-Phasen-Zellen nach 24h Inkubation

Nach **72h Inkubation** ergab sich bei Gruppe A eine mittlere Differenz zw. 0Gy und 10Gy von absolut 3,8 Prozentpunkten. Bei Gruppe B zeigten sich absolut 5,9 Prozentpunkte Unterschied (siehe *Tabella 3.2.2*).

G1-Phasen-Verteilung nach 72h Inkubation

Inkubierte Medien	Gruppe A (E-Phase II+III)		Gruppe B (E-Phase IV+V)	
	0Gy	10Gy	0Gy	10Gy
	-	-	74,0	81,6
	-	-	76,4	82,1
	68,1	77,0	73,4	77,0
	71,4	77,0	74,0	78,1
	71,8	70,5	70,4	71,9
	73,1	67,4	66,4	70,2
	62,5	69,6	68,8	77,5
	59,6	67,8	63,8	76,3
Mittelwert	67,8	71,5	70,9	76,8
Standardabweichung	5,5	4,4	4,3	4,2
Differenz (absolut)	3,8		5,9	
Signifikanz	p = 0,221		p = 0,015	

Tabella 3.2.2: Auswertung des Vergleich der Entnahme-Phasen 2 und 3 (Gr. A) gegenüber den Entnahme-Phasen 4 und 5 (Gr. B) bez. G1-Phasen-Zellen nach 72h Inkubation

Dieselben Auswertungen wurden für die Unterschiede zwischen den Gruppen A und B bezüglich der S- und G₂/M- Phasen erstellt:

Es ergab sich bei dieser Darstellung folgendes Bild für die **S-Phasen-Zellen nach 24h** Inkubation bei der Gruppe B (Entnahmephase IV und V): bei einem Signifikanzniveau von $p=0,001$ betrug die mittlere Differenz zw. 0Gy und 10Gy absolut 1,5 Prozentpunkte. Für die Gruppe A (Entnahmephase II und III) ergab sich eine mittlere Differenz von 1,99 absoluten Prozentpunkten.

Nach 72h Inkubation ergab sich für die S-Phasen-Zellen bei Gruppe B eine mittlere Differenz zw. 0Gy und 10Gy von absolut 1,6 Prozentpunkten. Bei Gruppe A zeigten sich absolut 1,17 Prozentpunkte Unterschied.

Die Ergebnisse beider **G₂/M-Phasen** wurden mit denselben Berechnungen bestimmt; hier zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei zu starken Schwankungen der Messwerte.

Es konnte der folgende Ergebnis-Trend nachgewiesen werden:

Generell zeigten sich die Unterschiede der Gruppe B (späte Entnahmephase IV und V) ausgeprägter als die vergleichbaren Unterschiede der Gruppe A (Entnahmephase II und III) beim Vergleich zwischen 0Gy- und 10Gy-kondit. Medium. Zur Veranschaulichung dienen die *Abbildungen 3.2.1 und 3.2.2* der nächsten Seite, die dieses Teilergebnis anhand der G₁-Phasen und der S-Phasen darstellen (bei den S-Phasen als Reduktion der Zellen in der S-Phase und somit als negative Differenz).

Im Vergleich der beiden Entnahme-Gruppen A und B konnte kein eindeutiger Trend für eine Unterscheidung der Ergebnisse dokumentiert werden zwischen einer 24-stündigen und einer 72-stündigen Inkubation.

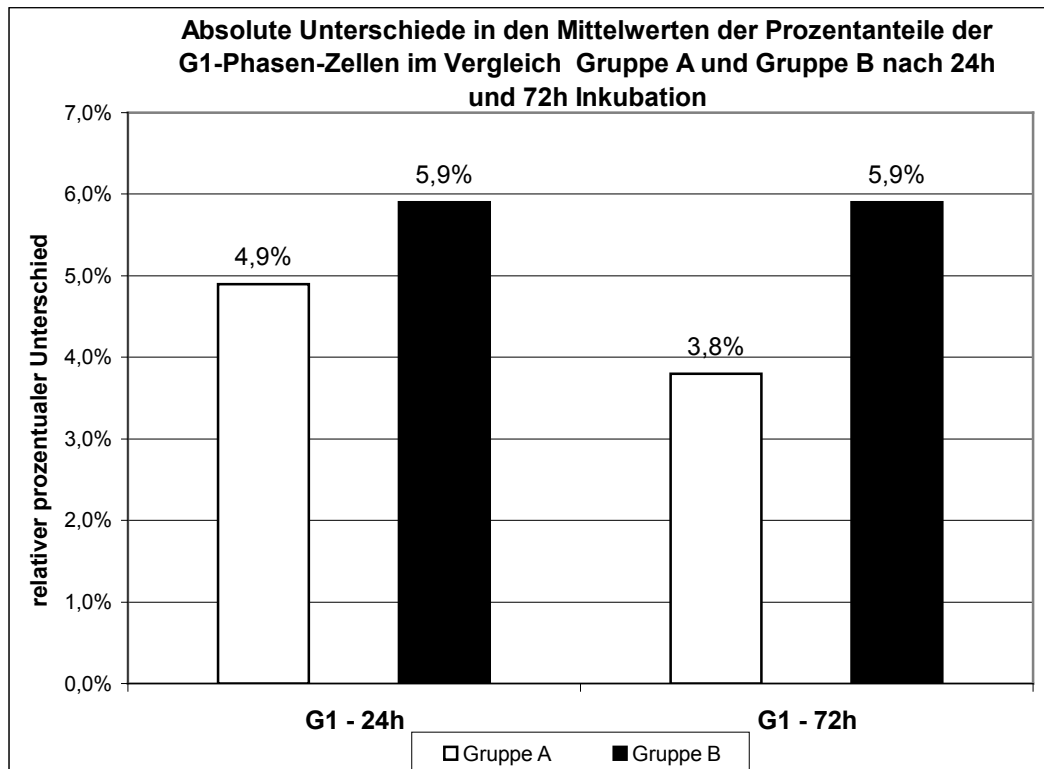


Abbildung 3.2.1: Absolute Unterschiede der Mittelwerte der G₁-Phasen im Vergleich Gruppe A und Gruppe B nach 24h und 72h Inkubation.

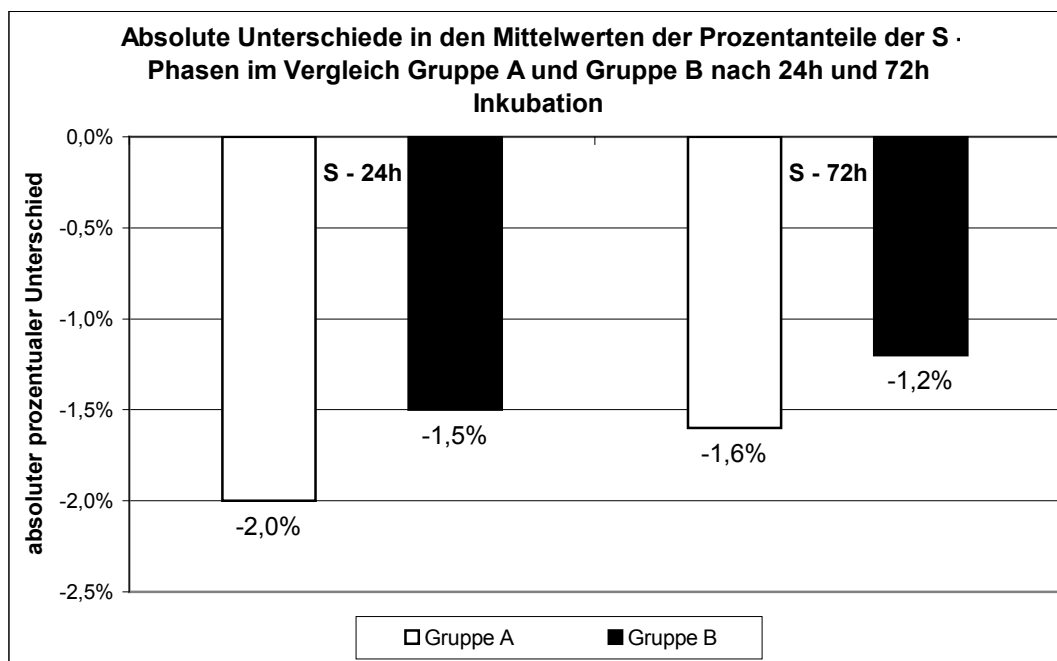


Abbildung 3.2.2: Absolute Unterschiede der Mittelwerte der S-Phasen im Vergleich Gruppe A und Gruppe B nach 24h und 72h Inkubation.

4.) Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Die Pathogenese der strahleninduzierten Lungenfibrose ist nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt und verstanden. In der vorliegenden Arbeit lag der Focus des Interesses hauptsächlich darauf, Interaktionen zwischen bestrahlten und unbestrahlten Fibroblasten im Zeitraum von Tagen bis Wochen nach der Bestrahlung zu untersuchen. Dies erfolgte durch Inkubation der durch Bestrahlung von Fibroblasten *in vitro* gewonnenen konditionierten Überstandsmedien auf unbestrahlte Fibroblasten, deren Proliferation dann mittels FACS-Zellzyklus-Analysen gemessen wurde. Durch diese Versuchsanordnung konnte zu definierten Zeitpunkten ein proliferationshemmender Effekt auf unbestrahlte Fibroblasten, am wahrscheinlichsten durch sezernierte Zytokine verursacht, dargestellt werden.

Wie in Kapitel 3 dargestellt, zeigte sich bei Inkubation mit Überstandsmedien bestrahlter Zellen ab der Entnahmephase II (mit Schwerpunkt auf den späteren Entnahmephasen IV, V und VI) eine Erhöhung der Anteile der G₁-Phasen-Zellen im Vergleich zur Inkubation mit Überstandsmedien von unbestrahltem Kontroll-Zellreihen. Biologisch findet dieser Sachverhalt eine gute Übereinstimmung mit anderen aktuellen Arbeiten im Rahmen des Kontextes der Lungenfibrose. Es wird als gesichert angesehen, dass nach Bestrahlung von Fibroblasten eine Zytokin-Produktion einsetzt, die umliegende Zellen *in vivo* beeinträchtigen kann ^(6, 10, 16, 20). Die wahrscheinlichste Hypothese aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lautet, dass die zuvor bestrahlten Fibroblasten *in vitro* Zytokine in das sie umgebende Kulturmedium abgeben. Wird dieses Medium dann auf unbestrahlte Zellen als Kulturmedium gegeben, besitzt dieses konditionierte Medium einen nachweisbaren Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferation der unbestrahlten Fibroblasten. Die Gruppe um Rodemann et al konnte wie bereits erwähnt eine Ausreifung von Fibroblasten zu Matrix-produzierenden Fibrozyten aufzeigen ^(31, 36, 40). Die Gruppe zeigte eine durch TGF- β induzierte terminale Differenzierung der Progenitor-Fibroblasten in postmitotische Fibrozyten mit erhöhter Kollagenproduktion. Im Speziellen wurde in den Versuchen dieser Arbeit eine nachweisbare Arretierung von Zellen in der G₁-Phase dokumentiert. Hier muss angemerkt werden, dass unter diesen gemessenen „G₁-Phasen-Zellen“ auch Zellen in der G₀-Phase enthalten sein könnten. Diese lassen sich mit der angewandten Messmethodik nicht voneinander trennen, da nur der haploide oder diploide DNA-Gehalt der Zellen hinsichtlich der Zellzyklus-Einteilung maßgebend war. Der Trend zur Arretierung der Zellen in der G₁-Phase wurde bestätigt durch die messbare Verringerung der Zellen in der

S-Phase im Vergleich der Zellen mit Inkubation von kondit. 0Gy- und 10Gy-Medien. Die auftretende Verringerung der S- Phasen-Zellen kann nicht etwa nur durch „Hungereffekte“ des kondit. Mediums oder ähnliches erklärt werden, wie sie etwa bei Oya et al. ⁽²²⁾ geschildert werden, da das 0-Gy-kondit. Überstandsmedium ebenfalls zum selben Zeitpunkt gewonnen und eingefroren wurde wie das 10Gy-Überstandsmedium und daher beide Medien dieselben beeinträchtigenden Effekte aufweisen müssten. Die Aufteilung während der Messungen in „grüne“ (d.h. BrdU-gelabelte) und „nicht-grüne“ Zellen ermöglichte neben einer besseren methodischen Auswertung auch eine Aussage darüber, dass die mit BrdU gelabelten Zellen ebenso weiter im Zellzyklus voranschreiten und nicht durch Artefakte oder Effekte der Zytotoxizität des BrdU in der G₁-Phase arretieren (eine solche Zytotoxizität und Hemmung der Proliferation wird erst bei wesentlich höheren BrdU-Konzentrationen in der Fachliteratur beschrieben als den hier verwendeten 30 µmol/ml. Prinzipiell konnten wir keine Unterschiede der Zellzyklusphasen-Verteilung zwischen BrdU-gelabelten und nicht gelabelten Zellen feststellen: die beobachteten Effekte der Überstände waren bei beiden Gruppen gleich, im Kontrast zu direkt bestrahlten Zellen, welche in der Synthesephase und G₂/M-Phase eine erhöhte Strahlensensibilität aufweisen.

Gemäß der Darstellung in Kapitel 3.2 zeigte sich bei späteren Entnahmephasen ein tendenziell stärkerer Effekt auf die Arretierung der Zellen in der G₁-Phase. Der Vergleich der Ergebnisse der Entnahmephasen II und III gegenüber den Entnahmephasen IV und V zeigte eine signifikante Verstärkung der dokumentierten G₁-Arretierung bei den späteren Entnahmephasen. Dies könnte sich biologisch damit erklären, dass *in vitro* (und wahrscheinlich auch *in vivo*) die durch die Bestrahlung in den Fibroblasten induzierten Veränderungen in der Zytokin- und Protein-Synthese eine gewisse zeitliche Latenz besitzen, und erst einige Tage nach Bestrahlung ihr Maximum erreichen. Hierzu existieren bereits Arbeiten wie etwa die von Rube et al. ^(6,9,10), welche eine solche Latenz der Sekretion von Zytokinen (exemplarisch TGF- β) nachweisen konnten. Beispielsweise konnte in zwei Arbeiten von Rube ^(6, 10) eine biphasische zeitliche Latenz der verstärkten Sekretion von TNF-α, IL1-α und IL-6 zwischen 6-12h nach Bestrahlung dokumentiert werden: initial zeigte sich eine vermehrte Sekretion 6-12h nach Radiatio der Zellen, nach Regredienz der Sekretion auf basale Level wurde ein zweites Maximum zwischen 4-8 Wochen post Radiatio dokumentiert. Eine Arbeit von Martin et al ⁽³⁸⁾ zeigte eine Induktion von TGF-β ebenso 6h nach Bestrahlung und einen 2. Gipfel nach initialer Rückkehr zu basalen Leveln

ab dem 14. Tag. Weitere Autoren und Arbeiten unterstützen diese zeitliche Latenz-Theorie der Zytokinsekretion nach Bestrahlung von Fibroblasten. ^(15, 20, 25, 26, 37, 49)

Inwieweit TGF- β in dieser Zytokin-Kaskade eine Schlüsselrolle einnimmt, kann mit der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden: unter anderem sind größere Versuchsreihen und Wiederholungen hierfür nötig. Allerdings scheint sich (siehe Kapitel 3.1.) bei Antikörper-Zugabe gegen TGF- β in das 10Gy-kondit. Medium der arretierende Effekt auf die G₁-Phasen-Zellen zu verringern. Zu dieser Deutung passt auch die Arbeit von Mattos et al ⁽¹⁶⁾, in der von einer mäßigen TGF- β Aktivierung einen Tag nach Bestrahlung und einer starken Aktivierung nach ca. 10-14 Tagen gesprochen wird. In der Literatur finden sich unterschiedliche Ergebnisse über die zeitliche Latenz der Zytokin-Produktion (auf m-RNA und auf Proteinebene) und der folgenden Zytokin-Reaktionen (je nach Zytokin und angewandtem Versuchsaufbau). Ebenso scheinen einige Zytokine als potente Stimulatoren und Amplifikatoren anderer Stoffwechsel-Kaskaden zu wirken: dies wurde exemplarisch anhand von Interleukin 5 als wahrscheinlichem Amplifikator für TGF- β gezeigt. ⁽¹⁾

Das deutlichere Ansprechen der G₁-Phasen-Arretierung auf die Antikörperzugabe gegen TGF- β bei den späteren Entnahmephasen im Vergleich der frühen Entnahmephasen könnte die Hypothese bestätigen, dass TGF- β erst mit einer gewissen Latenz durch die Zellen produziert und sezerniert wird. Im Gegensatz dazu zeigten einige der neueren Arbeiten dagegen eine starke Expression von m-RNA für TGF- β bereits 6 – 12h nach Bestrahlung und ein weiteres Maximum 1-2 Wochen nach Bestrahlung ⁽³⁸⁾. Dies könnte im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit (in der nach 8-10 Tagen ein stärkerer G₁-arretierender Effekt und somit hypothetisch eine deutlichere Zytokin-Auswirkung auf die Fibroblasten zu erkennen ist) ein Hinweis darauf sein, dass nicht nur TGF- β für die gemessenen Veränderungen in der Zellkinetik, Proliferation und Zelldifferenzierung der Fibroblasten verantwortlich ist. Vielmehr scheint durch eine Bestrahlung eine tiefgreifende Veränderung in diversen Zytokin-Systemen induziert zu werden. TGF- β erscheint hierbei als ein Schlüsselenzym in verschiedenen Enzymkaskaden. Exemplarisch zeigt die Arbeit von Yang und Palm et. al. ⁽⁴⁾ nach Bestrahlung eine ebenso deutliche Zunahme der Sekretion der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 im Rahmen des Remodelings der extrazellulären Lungen-Matrix. Diese gelten ebenso als wichtige Zytokine im Rahmen der pulmonalen Fibrose.

Um festzustellen, inwieweit die Dauer der Inkubation mit konditionierten Medien einen Einfluss auf die Stärke der G₁-Arretierung hat, sind wie erwähnt weitere Versuche nötig, da eine Signifikanz mit der durchgeführten Versuchszahl dieser Arbeit nur teilweise zu erreichen war. Zu vermuten wäre biologisch ein stärkerer Effekt nach einer längeren Inkubation mit konditionierten Medien: dies ist aber mit der dargestellten Methodik schwer zu dokumentieren, da die Zellenzahlen nach 72h Inkubation bereits bei den S-Phasen-Messungen in sehr niedrigen Prozentbereichen liegen und so geringe Mess-Schwankungen bereits eine hohe Varianz und Fehlerbreite bedingen.

Im Weiteren erschweren zunehmende Hungereffekte des Mediums die Zellzyklusmessungen an den Fibroblasten.

Bei der Betrachtung und statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse beschränkten wir uns nach Vergleich der jeweiligen Ergebnisse der „grünen“, gelabelten Fibroblasten und der ungelabelten nicht-grünen Zellen auf letztere: einerseits waren die Ergebnisse der Überstandsmedien der jeweiligen Entnahmephasen bei gelabelten wie auch ungelabelten Zellen weitgehend identisch, vor allem aber sollten in der Auswertung hypothetische kleine zytotoxische und proliferationshemmende Effekte der BrdU-Ingestion auf die Zellen möglichst vermieden werden, um ein geringeres Fehlerniveau und eine geringere Schwankungsbreite zu erreichen.

Mit Zurückhaltung sollten die Ergebnisse der absoluten Unterschiede der Prozentzahlen in Kapitel 3.2. interpretiert werden: diese liegen bei den S- und G₂/M-Phasen-Zellen in Zahlen-Bereichen von absolut 1,2 - 1,6 Prozent. Die relativen Unterschiede bei kleinen Mess-Schwankungen beeinflussen daher die Auswertungen stark. Dieser Effekt ist aufgrund der geringen Ausgangspopulationen an S-Phasen-Zellen mit der vorgenommenen Messmethodik nicht zu vermeiden, und verursacht mögliche Signifikanzschwankungen. Zusätzlich wären für eine höhere Signifikanz der Versuchsergebnisse weitere Wiederholungen durchzuführen, um die Schwankung der variablen und störanfälligen Proliferation der Zellen und die damit verbundene große Standardabweichung auszugleichen sowie das Fehlerniveau zu verringern. Die große Variationsbreite der Proliferation identischer Fibroblasten-Zellreihen verursacht zusätzliche Schwankungen in den Messergebnissen.

5.) Klinischer Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, dass bestrahlte Lungenfibroblasten Substanzen in die Umgebung absondern, welche andere Fibroblasten im Zellzyklus arretieren lassen.

Biologisch entspricht dies möglichen Veränderungen in der Zellzykluskinetik sowie den Proliferations- und Fibrose-Eigenschaften unbestrahlter Zellen nach pulmonaler Bestrahlung beispielsweise nach Bestrahlung eines pulmonalen Malignoms. Es ergab sich *in vitro* eine Tendenz zur Arretierung der Fibroblasten in der G₁-Phase und eine konsekutive Verringerung der S-Phasen-Zellen bei Inkubation mit Medien von 10Gy-konditionierten Zellen im Vergleich zur Inkubation mit den Medien von 0Gy-Kontrollzellen. Dies konnte durch FACS-Flow-Analysen mittels einer Doppelfärbung aus Propidiumiodid und BrdU hinreichend dargestellt werden. Biologisch könnte dieser Effekt einer deutlichen Verringerung der Proliferation der Fibroblasten und Umwandlung in extrazelluläre Matrix - produzierende Myofibroblasten entsprechen, die im Kontext bereits vorliegender Arbeiten (etwa die der Gruppe um Rodemann) als eine postmitotische Differenzierung der Fibroblasten zu Fibrozyten/Myofibroblasten angenommen werden darf. Eine leichte Beeinflussung im Sinne einer Antagonisierung dieses dargestellten Effektes durch einen Antikörper gegen TGF- β konnte aufgrund geringer Versuchszahl und Messschwankungen als nicht-signifikanter Ergebnis-Trend dokumentiert werden.

Die entnommenen konditionierten Medien der späteren Phasen nach Bestrahlung scheinen nach den hier vorliegenden Ergebnissen einen stärkeren Effekt auf diese Ausdifferenzierung der Fibroblasten zu Fibrozyten zu besitzen. Dies scheint auf eine gewisse Latenz in der hinter diesem Effekt stehenden Zytokin-Dysregulation und veränderten Zytokin-Produktion bzw. Sezernierung der bestrahlten Zellen hinzuweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit veranschaulichen einen deutlichen und wichtigen Angriffspunkt für die translationale Forschung: gelänge es, die genauen Zytokinabläufe der Zellen nach einer Bestrahlung vollständig mit den hierbei aktivierten Signalkaskaden, Rezeptoren und interagierenden Zytokinen zu entschlüsseln, wäre theoretisch eine Beeinflussung dieser Regulationsvorgänge mittels spezifischer Antikörper oder Chemotherapeutika denkbar. Vorstellbar wäre eine Reduktion schädigender Effekte der Bestrahlung auf nicht-bestrahlte umgebende pulmonale Zellen und eventuell auch eine protektive Wirkung auf direkt bestrahlte, gesunde Nachbarzellen. TGF- β scheint in der Zytokin-Dysregulation post Radiatio eine zunehmend als wichtiger erkannte Funktion zu haben. Es wurden bereits Versuche in der Literatur beschrieben mit Interferon γ ,

Antikörpern gegen TGF- β und dessen Isoformen TGF- β 1/- β 2/- β 3 oder der Substanz Decorin. Diese waren allerdings wegen hoher Nebenwirkungen und Toxizität zum momentanen Zeitpunkt nicht klinisch anwendbar. ^(11, 38, 45) Auch andere Chemotherapeutika wie ACE-Hemmer, Angiotensin-II-Antagonisten, Niacin, Taurin und Pirfenidon scheinen auf noch teilweise unbekannt Weise mit der Expression, Synthese und Regulation von TGF- β zu interferieren und daher einen gewissen Einfluss auf den Verlauf der Zytokin-Dysregulation sowie der Lungenfibrose zu haben ⁽¹³⁾. Allerdings ist zum momentanen Zeitpunkt noch keine klinisch ausgereifte kausale Therapie einer Lungenfibrose anhand der Zytokin-Dysregulationen abzusehen. Interessant sind Ansätze zur spezifischen Blockade von TGF- β -Subgruppen, wie sie etwa in der Arbeit von Ask und Bonniaud ⁽²⁾ oder Decolonne und Kolb et al. ⁽³⁾ beschrieben werden. Hier zeigte sich ein Ungleichgewicht zwischen den Isoformen TGF- β 1 und TGF- β 3 mit Verschiebung zur Isoform β -1 bei der pathologischen Lungenfibrose im Vergleich zur Zytokin-Kaskade bei einer regulären Wundheilung. Dies könnte einen spezifischen Angriffspunkt für eine Blockade ablaufender Zytokin-Kaskaden im Rahmen der radiogenen Lungenfibrose liefern. Weitere Arbeiten konnten sich gegenseitig verstärkende Enzymkaskaden mit IL-4 oder IL-5 sowie TGF- β nachweisen ^(1, 2, 4), so dass theoretische Interventionsmöglichkeiten durch eine Hemmung der Amplifikatoren solcher Kaskaden bestehen.

Das Interesse weiterer Forschung wird verstärkt auf möglichst spezifischen Angriffspunkten in der speziellen Interaktion aus Zytokin-Dysregulation und gestörtem Tissue-Remodeling liegen, um hierdurch die Raten der Nebenwirkungen und Toxizitäten im Rahmen einer pulmonalen Radiotherapie zu minimieren oder eine mögliche Therapie einer bestehenden Lungenfibrose zu versuchen. Eine klinische Anwendung von Zytokin-Antikörpern oder Rezeptorantagonisten in vivo ist zum aktuellen Zeitpunkt aufgrund der möglichen Nebenwirkungen noch nicht klinisch etabliert. Viele der aktuellen Ziel-Substanzen (beispielsweise Interleukine, TGF- β -Isoformen, MMP) zeigen eine nicht nur pathogen einzustufende Wirkung im komplexen System des Tissue-Remodelings, so dass beispielsweise bei Blockierung dieser Vorgänge pathologische Auswirkungen auf normal funktionierende Stoffwechselsysteme zu erwarten wären.

6.) Literatur

- nach Erscheinungsdatum angeordnet -

1. Wynn TA **Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.** J Pathol. 2008 Jan; 214(2):199-210.
2. Ask K, Bonniaud P, Maass K, Eickelberg O, Margetts PJ, Warburton D, Groffen J, Gauldie J, Kolb M. **Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3.** Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(3):484-95.
3. Decolonne N, Kolb M, Margetts PJ, Menetrier F, Artur Y, Garrido C, Gauldie J, Camus P, Bonniaud P. **TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis.** J Immunol. 2007 Nov 1;179(9):6043-51
4. Yang K, Palm J, König J, Seeland U, Rosenkranz S, Feiden W, Rube C, Rube CE.: **Matrix-Metallo-Proteinases and their tissue inhibitors in radiation-induced lung injury.** Int. J. Radiat. Biol. 2007 Oct; 83(10):665-76
5. M. Hetzel, M. Baschem, D. Anders. G. Tischler and M. Faehling: **Different Effects of Growth Factors on Proliferation and Matrix Production of Normal and Fibrotic Human Lung Fibroblasts.** Lung August 2005, Vol. 183, No.4, p.225 – 237
6. Rube CE, Uthe D, Wilfert F, Ludwig D, Yang K, König J, Palm J, Schuck A, Willich N, Remberger K, Rube C.: **The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation.** Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 Apr 1;61(5):1482-92
7. Noble PW, Homer RJ: **Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights into pathogenesis.** Clin. Chest Med. 2004 Dec; 25(4):749-58,VII
8. Renzoni EA, Abraham DJ, Howat S, Shi-Wen X, Sestini P et al : **Gene expression profiling novel TGF-beta targets in adult lung fibroblasts.** Respir. Res. 2004 Nov 30; 5(1):24
9. Rube CE, Rodemann HP, Rube C.: **The relevance of cytokines in the radiation-induced lung reaction. Experimental basis and clinical significance.** Strahlenther Onkol. 2004 ep;180(9):541-9
10. Rube CE, Wilfert F, Palm J, König J, Burdak-Rothkamm S, Liu L, Schuck A, Willich N, Rube C. **Irradiation induces a biphasic expression of pro-inflammatory cytokines in the lung.** Strahlenther Onkol. 2004 Jul;180(7):442-8

11. Brammer I., Herskind C., Rodemann H. P. et al: **Induction and Repair of radiation -induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts are not affected by terminal differentiation.** DNA Repair 3 (2004) 113-120
12. Kolb M., Möller A., Dietz N., Schmidt M., Willner J: **Ausdifferenzierung von Fibroblasten nach Bestrahlung als pathogenetischer Faktor der Strahlenfibrose.** Abstrakt bei der Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie in München März 2003.
13. M. Kolb, M. Schmidt: **The role of Cytokines and Growth Factors in fibroproliferative lung disease.** Pneumologie 2003; 57; 91-97.
14. Moira K.B. Whyte: **Genetic Factors in idiopathic pulmonary fibrosis: Transforming growth factor beta- β implicated at last.** Am. J. of Resp. and critic. care Medicine, Vol 168, 2003 : 410-411.
15. Ying Dong Xu, Jiesong Hua, Alice Mui, Robert Connor et al : **Release of biologically active TGF- β 1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis.** Am. J. Physiol. Lung cell Mol. Physiol. 285, p. 527-539, 2003.
16. Mattos M.D., Kimura ET, Silva MR., Egami MI et al: **Latent TGF – beta1 activation in the lung irradiated in vivo.** Rev. Assoc. Med. Bras. 2002 Oct.-Dec., 48(4). 329-34 Epub. 2003 Jan 18.
17. Meyer K., Seger S., Willner J., Schmidt M., Kolb M: **Macrophages and fibroblasts induce pro-fibrotic effects following irradiation.** Abstract for Conference of European Respiratory Society in Wien Okt. 2003
18. Kolb M., Willner J., Möller A., Dietz N., Meyer K. and Schmidt M: **Terminal differentiation of pulmonary fibroblasts is a pathogenetic factor in irradiation-induced lung disease.** Abstract for Conference of American Thoracic Society in Seattle May 2003.
19. Willner J., Möller A., Dietz N., Flentje M., Kolb M: **Proliferationshemmung und Ausdifferenzierung von Fibroblasten nach Bestrahlung als pathogenetischer Faktor der Strahlenfibrose.** Abstract beim Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Radionkologie (DEGRO) Juli 2003 in Essen.
20. Helen B. Stone, C. Norman Coleman, Mitchell S. Anscher et al : **Effects of radiation on normal tissue : consequences and mechanisms.** The Lancet-Oncology Vol 4 September 2003, 529-536

21. Y.S. Yu, X.S. Sun, H.N. Jiang et al: **Studies of the cell cycle of in vitro cultured skin fibroblasts in goats : work in progress.** Theriogenology 59 (2003), 1277-1289
22. Natsuo Oya, Friedo Zölzer, Frank Werner Christiab Streffer : **Effects of Serum Starvation on Radiosensitivity, Proliferation and Apoptosis in Four Human Tumor Cell lines with different p53 status.** Strahlentherapie und Onkologie 2003, No. 2, p. 99-105
23. Annie Pardo, Moises Selman : **Extracellular matrix remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis.** Chest, 120, 1, Juli 2001: p. 77
24. Robert M. Strieter : **Mechanisms of pulmonary fibrosis-Conference Summary.** Chest, 120, 1, Juli 2001: p. 77-85.
25. Nasreen Khalil, Robert O`Connor, Leslie I.Gold, Trilok Parekh and Ganesh Rahgu: **Biological effects of transforming growth factor- β 1 in idiopathic pulmonary fibrosis may be regulated by the activation of latent transforming growth factor- β 1 and the differential expression of transforming growth factor – β 1 receptors.** Chest 2001; 120: 48S.
26. Arnold B. Brody, Sakuntala Warshamana, Jing-Yao and Derek A. Pociask: **Expression of transforming growth factor – β induces fibroproliferative pulmonary disease in fibrotic-resistant mice.** Chest 2001; 120: p48-49.
27. Patricia J. Sime and Katherine M.A. O` Reilly: **Fibrosis of the lung and other tissues: New concepts in pathogenesis and treatment.** Clinical Immunology, Vol. 99, No. 3, June, pp. 308-319, 2001.
28. Kuwano K., Hagimoto N., Hara N: **Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis and current treatment.** Curr. Mol. Med. 2001 Nov.; 1(5): 551-73.
29. Dean Sheppard: **Integrin-mediated Activation of Transforming Growth Factor- β 1 in pulmonary fibrosis.** Chest, 120, 1, July 2001, p49-53.
30. Olejar T., Zadinova M., Hlouskova D., Pouckova P.: **Production of TGF – beta1 in lungs after low-dose whole-body radiation exposure in fibrosing (C57BL6) and non-fibrosing (C3H/J) mouse strain.** Folia Biol. (Praha) 2001; 47(2): 55-61.
31. Hill R.P., Rodemann H.-P., Hendry J.H. et al: **Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic.** Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 49, No.2, pp. 353-365, 2001.

32. Darzynkiewicz Z., Bedner E., Smolewski P : **Flow Cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis.** Semin. Hematol. 2001 Apr., 38(2). 179-93
33. Nunez R. : **DNA-Measurement and cell cycle analysis by flow cytometry.** Curr. Issues Mol. Biol. 2001 Jul.; 3(3): 67 – 70
34. Abid SH, Malhotra V., Perry MC: **Radiation-induced and chemotherapy-induced pulmonary injury.** Curr. Opin. Oncol. 2001 Jul., 13(4): 242-8
35. Zolzer F., Streffer C.: **G2 – Phase delays after irradiation and/or heat treatment as assessed by two – parameter flow cytometry.** Radiat. Res. 2001 Jan; 155(1 PT 1): 50-6
36. Hakenjos L., Bamberg M., Rodemann HP: **TGF-Beta 1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation – induced fibrotic phenotype.** Int. J. Radiat. Biol. 2000 Apr.; 76(4): 503-9.
37. Claudia E. Rube, Daniela Uthe., Kurt W. Schmid et al: **Dose-dependent induction of transforming growth factor β (TGF- β) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation.** Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 47, No. 4, pp. 1033-1042, 2000.
38. Michele Martin, Jean-Louis Lefaix, and Sylvie Delanian: **TGF- β 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?** Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 47, No. 2, pp. 277-290, 2000.
39. J. Allen D. Cooper, Jr.: **Pulmonary Fibrosis – Pathways are slowly coming into light.** Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., Vol.22, pp. 520-523, 2000.
40. Herskind C., Rodemann H.P: **Spontaneous and radiation- induced differentiation of fibroblasts.** Experimental Gerontology 35 (2000), 747-755
41. Adrian C. Gegg, Karin Haustermans, August A.M. Hart et al: **The Value of pretreatment cell kinetic parameters as predictors for radiotherapy outcome in head and neck cancer: a multicenter analysis.** Radiotherapy and Oncology 50 (1999), 13-23.
42. Patricia J. Sime, Robert A. Marr, David Gauldie, Zhou Sing et al: **Transfer of tumor necrosis factor- α to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor – β 1 and Myofibroblasts.** American Journal of Pathology, Vol. 153, No. 3, pp. 825-832 September 1998.

43. Herskind C., Berentzen M. S., Overgaard J., Rodemann H. P. et al: **Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy.** *Radiotherapy and Oncology* 47, (1998), 263-269.
44. Murata T., Akagi K., Uda M. et al: **Cell kinetic changes in cultured tumor cells after treatment with radiation and chemotherapy.** *Int. J. Oncol.* 1998 Jan., 12(1):171-4
45. Benjamin Morsas, Thomas A. Raffin, Alan H. Epstein et al: **Pulmonary Radiation injury.** *Chest* 1997; 111: 1061 – 76
46. Eunhee S. Yi., Adriana Bedoya, Hyesun Lee et al: **Radiation-induced lung injury in vivo: expression of transforming growth factor beta precedes fibrosis.** *Inflammation*, Vol. 20, No. 4, 1996: 339-352.
47. Rodemann HP, Binder A., Burger A. et al: **The underlying cellular mechanisms of fibrosis.** *Kidney Int. Suppl.* 1996 May; 54: S. 32-6.
48. Philip Rubin, Carl J. Johnston, Jacqueline P. Williams et al: **A perpetual cascade of Cytokines post irradiation leads to pulmonary fibrosis.** *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 33, No. 1, pp. 99-109, 1995.
49. H. Peter Rodemann, Michael Bamberg: **Cellular Basis of radiation – induced fibrosis.** *Radiotherapy and Oncology* 35 (1995), 83-90.
50. Finkelstein JN., Johnston CJ., Baggs R., Rubin P.: **Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis.** *Int. J. Radiat. Oncol. Biol.*
51. Ormerod MG, Kubbies M.: **Cell cycle analysis of asynchronous cell populations by flow cytometry using bromodesoxydesuridine label and Hoechs-propidium iodide stain.** *Cytometry* 1992; 13(7): 678-85
52. Rodemann H.P., Peterson H.P., Schwenke K., von Wangenheim: **Terminal Differentiation of human fibroblasts is induced by radiation.** *Scanning Microsc.*, Dec. 1991; 5(4): 1135-42, Discussion
53. Khaliil N., Greenberg AH: **The role of TGF-beta in pulmonary fibrosis.** *Ciba Found Symp.* 1991; 157: 194-211.
54. Raghu G., Masta S., Meyers D., Narayanan AS: **Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor beta.** *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989 Jul; 140(1): 95-100.

55. Reiser KM, Last JA. : **Early cellular events in pulmonary fibrosis.** Exp. Lung Res. 1986; 10(4): 331-355.

7.) Abkürzungen

- Propidiumiodid = PI
- Bromodesoxydesuridin = BrdU
- FCS = Fetal-Calb-Bovin Serum
- TGF- β = Transforming Growth Factor Beta
- v.a. = vor allem
- bsp. = beispielsweise
- bzw. = beziehungsweise
- kondit. Med. = konditioniertes Medium
- Abb. = Abbildung
- Vgl. = Vergleich
- ss-DNA = singlestrang-DNA
- ds-DNA = doublestrang-DNA
- FITC = Fluorescein-Isothiocyanat

8.) Anhang

8.1.) Anhang Substanzen-Checkliste

Hier eine kurze Auflistung der verwendeten Materialien und Lösungen mit ihren jeweiligen Konzentrationen und Herstellern.

- **Standard – Kulturmedium:** 1% Penicillin, 1% Gentamicin, 1% Glutamat, 1% Amphotericin B, evtl. Zusatz von 0/5/10 % FCS – Serum, Rest-% DME – Medium (s.u.)
- **BrdU Pulse Labeling Stock-Lösung :**
250mg BrdU (MG 307u) lösen in 27,1ml DME-Medium
→ Gebrauchskonzentration = 30mmol/ml
- **Borat –Lösung :**
5,715g Borate in 150ml Aqua dest. lösen → Gebrauchskonzentration = 0,1 M
- **Pepsin (2500 FIP-U/g, 35000 E/g) :**
24mg Pepsin in 60ml 0,1N HCL → Gebrauchskonzentration = 0,4mg/ml
- **Diluting Puffer :**
Suspension aus 500ml PBS, 0,5g BSA (Albumin Fraktion V) und 2,5ml Tween 20
- **Propidium-Iodid-RNAse-Mischung :**
Suspension mit $c(\text{PI}) = 10\mu\text{g/ml}$ und $c(\text{RNA-se}) = 0,2\text{mg/ml}$

Checkliste der Hersteller :

- | | |
|---|---|
| 1.) Bromodesoxydesuridin (BrdU) : | Serva 15240 , 250 μg |
| 2.) FITC-anti-BrdU-AK : | B-D Katalog 347583 für 100Tests (2ml) |
| 3.) Rinderserumalbumin (BSA) : | Sigma A-9418 , 10g |
| 4.) Tween 20 : | Sigma P- 7949, 100ml |
| 5.) Na-Borat [$\text{Na}_2(\text{B}_4\text{O}_7) * 10(\text{H}_2\text{O})$] : | Sigma B-9876 Sodium-tetraborat-decahydrat |
| 6.) Propidiumiodid (PI) : | Sigma P-4170 , 10mg |
| 7.) Ribonuklease A (RNA-se) : | Sigma r-5503, Typ 1-AS, Bovine Pan, 500mg |
| 8.) Pepsin : | Sigma R-7012 , 1g |
| 9.) PBS-Puffer : | GIBCO 14040091, 500ml |
| 10.) Dulbecos Mod Eagle Medium: | GIBCO 31885-023 500m |
| 11.) TGF-Beta Antikörper: | pan – specific – TGF – beta Antibody,
R&D Cat.-No. AB-100-NA |

8.2.) Anhang Protokolle

- **Kurz – Protokoll zur Gewinnung des konditionierten Mediums :**

Tag 0: Bestrahlung von Zellen in 25ml Zellkultur-Flaschen; jeweils 2 Flaschen mit 0 Gy (unbestrahlt), 5Gy und 10 Gy, Zellzahl ca. 1.000.000 / Flasche
→ Mediumwechsel nach Bestrahlung auf 10%-Normalmedium, Inkubation für 24h

Tag 1: Mediumwechsel auf FCS-freies Medium, 24 Stunden Inkubation

Tag 2: **Mediumentnahme I** -> Aliquotieren und einfrieren in -70°C
→ Mediumwechsel auf 10%-Normalmedium, 24 Stunden Inkubation

Tag 3: Mediumwechsel auf FCS-freies Medium, 24 Stunden Inkubation

Tag 4: **Mediumentnahme II** -> Aliquotieren und einfrieren in -70°C
→ Mediumwechsel auf 10%-Normalmedium, 24 Stunden Inkubation

Tag 5: Mediumwechsel auf FCS-freies Medium

Tag 6: **Mediumentnahme III** -> Aliquotieren und einfrieren in -70°C
→ Mediumwechsel auf 10%-Normalmedium, 24 Stunden Inkubation

Tag 7: Mediumwechsel auf FCS-freies Medium

Tag 8: **Mediumentnahme IV** -> Aliquotieren und einfrieren in -70°C
→ Mediumwechsel auf 10%-Normalmedium, 24 Stunden Inkubation

Tag 9: Mediumwechsel auf FCS-freies Medium

Tag 10: **Mediumentnahme V** -> Aliquotieren und einfrieren in -70°C
→ Mediumwechsel auf 10%-Normalmedium, 24 Stunden Inkubation

Tag 11: Mediumwechsel auf FCS-freies Medium

Tag 12: **Mediumentnahme VI** -> Aliquotieren und einfrieren in -70°C

• **Kurz – Protokoll der Versuchsserie :**

Tag 0:

- **Zellen aussähen: 30 kl. Flaschen zu je 150.000 FB :**
 - Zellen mittels Trypsin lösen, zentrifugieren bei 900 U/min für 5min
 - Zellzahl bestimmen in einer Zählkammer
 - Zellen in kleine Flaschen (5ml) ansähen; 150.000 Zellen /Flasche
 - für 36-48h Inkubation mit 10% FCS-Medium

Tag 2:

- **Pulse-Labeling mit BrdU für 1h mit 30 µmol**
 - 5µl BrdU – Stock – Solution pro kleine Flasche zum Medium pipettieren
 - 1 Stunde lang alle Zellflaschen inkubieren
 - danach BrdU – Medium – Lösung absaugen und alle Flaschen 3 x waschen mit PBS-Puffer
 - Zellen Zeitpunkt 0h ernten, in 5ml 20% Ethanol geben und einfrieren bis zum Messtag in -70°C Kühlschrank
 - konditioniertes Medium auftauen, durch FCS-Zugabe auf 5%ige FCS-Konzentration bringen
 - 5ml konditioniertes Medium zu allen Flaschen je nach Strahlenbedingung
 - Inkubation aller Flaschen im 37°C-Brutschrank

Tag 3:

- **Zellen Zeitpunkt 24h ernten**, in 5ml 70% Ethanol legen und einfrieren im -20°C

Tag 4:

- **Zellen Zeitpunkt 48h ernten** , in 5ml 70% Ethanol legen und einfrieren im -20°C
- **Mediumwechsel** bei allen restlichen Zellflaschen mit konditioniertem Medium (Auftauen, durch vorherige FCS-Zugabe auf 5%ige FCS-Konzentration bringen)

Tag 5:

- **Zellen Zeitpunkt 72h ernten**, in 5ml 70% Ethanol legen und einfrieren im -20°C

Tag 6:

- **Zellen Zeitpunkt 96h ernten**, in 5ml 70% Ethanol legen und einfrieren

- **Kurz – Protokoll der BrdU – PI – Doppelfärbung**

- 1.) Zellen sind als Suspension von 1ml ca. in 5ml 70% Ethanol fixiert, bei -20° gelagert
- 2.) Zentrifugieren (1200rpm, 10min, 4°C)
- 3.) Überstand absaugen, Pellet gründlich resuspendieren (auf Gittergestell)
- 4.) Tubes auf Vortex stellen, dabei 1,5ml Pepsin / Tube zugeben
- 5.) 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 6.) Nach 20min Tubes auf Vortex stellen dabei 4ml Diluting Puffer pro Tube zugeben
- 7.) Zentrifugieren (1200rpm, 10min, 4°C)
- 8.) Überstand absaugen, Pellets gründlich resuspendieren (auf Gittergestell)
- 9.) Tubes auf Vortex stellen, dabei 1,5ml 2N HCL pro Tube zugeben
- 10.) 20min im CO_2 – Inkubator inkubieren
- 11.) Nach 20min Tubes auf Vortex stellen, dabei 4ml 0,1M Natriumborat-Lösung zugeben pro Tube
- 12.) Zentrifugieren (1200rpm, 10min, 4°C)
- 13.) Überstände absaugen, Pellets gründlich resuspendieren (auf Gittergestell)
- 14.) Tubes auf Vortex stellen, dabei 4ml Diluting Puffer pro Tube zugeben
- 15.) Zentrifugieren (12000rpm, 10min, 4°C)
- 16.) Überstände absaugen, Pellets gründlich resuspendieren (auf Gittergestell)
- 17.) Tubes auf Vortex stellen, dabei 30 μl FITC – anti – BrdU Antikörper pro Tube zugeben
- 18.) 30 min bei Raumtemperatur inkubieren (ab hier andunkeln mit Alufolie)
- 19.) Nach 30 min Tubes auf Vortex stellen und 4ml Diluting Puffer pro Tube zugeben
- 20.) Zentrifugieren (1200rpm, 10min, 4°C)
- 21.) Überstände absaugen, Pellets gründlich resuspendieren (auf Gittergestell)
- 22.) 500 μl Propidiumiodid – RNAse-Suspension pro Tube hinzufügen
- 23.) Zellsuspension jeweils in FACS – Tubes pipettieren

→ Messung am FACS-Flow-Zytometer

Danksagung:

Diese Arbeit wäre ohne die nette und stets hilfsbereite tatkräftige Unterstützung durch das gesamte Team der pneumologischen Abteilung und der Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg niemals zustande gekommen !

Mein herzlicher Dank gilt im Besonderen:

- meinen Doktorvätern Herrn Prof. Dr. med. Schmidt und Herrn Prof. Dr. med. Flentje für die Überlassung des Dissertationsthemas meiner Arbeit.
- meinen Betreuern Herrn PD Dr. med. J. Willner und Herrn PD Dr. med. M. Kolb für ihre Unterstützung und Betreuung
- Frau M. Wechner für ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfe in der experimentellen Labormedizin und der Literaturrecherche
- allen hilfsbereiten MTA`s aus der Pneumologie und der Strahlentherapie, die mich tatkräftig unterstützt haben
- und natürlich vielen anderen unermüdlichen Motivationshilfen wie etwa meiner Frau Olivia, Leif Hommers oder meinen Eltern Klaus und Gabriele Wenemoser, ohne die diese Arbeit nie fertig gestellt worden wäre