

Aus der
Abteilung Molekulare Radioonkologie Heidelberg
eingereicht über das
Institut für Veterinär-Anatomie
der Freien Universität Berlin

***In vitro Untersuchungen zur
Wirkungsweise eines antifibrotisch wirksamen
Antikörpers gegen Connective Tissue Growth Factor
in Kombination mit Transforming Growth Factor-beta
oder ionisierender Strahlung***

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Johanna Pföhler
Tierärztin aus Ludwigshafen

Berlin 2014
Journal-Nr: 3715

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Huber
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Holger Martens

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

transforming growth factor, antibody testing, fibrosis, radiotherapy, fibroblasts,
migration, carcinoma, epithelial-mesenchymal transition (MeSH), transforming
growth factor beta (MeSH), pulmonary fibrosis (MeSH)

Tag der Promotion: 20.04.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-592-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der Aufbau der Lunge.....	1
1.2 Definition der Lungenfibrose.....	2
1.3 Pathogenese der Lungenfibrose.....	3
1.3.1 Hypothese: Lungenfibrose als Resultat einer chronischen Entzündung	4
1.3.2 Hypothese: Ein außer Kontrolle geratener Heilungsprozess führt zur Lungenfibrose.....	6
1.4 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Lungenfibrose.....	7
1.4.1 Strukturelle Veränderungen bei einer Lungenfibrose	7
1.4.2 Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT).....	9
1.4.3 Fibroblasten.....	10
1.4.4 Myofibroblasten.....	11
1.4.5 Transforming Growth Factor- β	13
1.4.6 Connective Tissue Growth Factor.....	15
1.4.7 CTGF-Antikörper: FG-3019	17
1.5 Bestrahlung der Lunge	19
1.5.1 Strahlungsinduzierte Lungenfibrose	20
1.5.2 Pathogenese der strahlenbedingten Lungenfibrose	22
2 FRAGESTELLUNG UND MOTIVATION	24
3 MATERIALIEN UND METHODEN	26
3.1 Zelllinien	26
3.1.1 Human Pulmonary Fibroblasts (HPF).....	26
3.1.2 Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF).....	26
3.1.3 Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC)	26
3.1.4 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)	26
3.1.5 Tumorzellen	27
3.2 Verarbeitung von Zellen.....	27
3.2.1 Auftauen und Kultivierung der Zellen	27
3.2.2 Subkultivierung von Zellen.....	28
3.2.3 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer	29
3.3 Zusätze	29
3.3.1 FG-3019	29
3.3.2 TGF- β	29
3.4 Bestrahlung.....	30
3.5 Zellversuche.....	30
3.5.1 Klonogenes Assay.....	30
3.5.2 Proliferations-Assay.....	31
3.5.3 Bestimmung der Vitalität	31
3.5.4 Adhäsions-Assay.....	32
3.5.5 Migrations-Assay	32
3.5.5.1 Vorbereitung der Zellen	33
3.5.5.2 Migrationsexperiment	33
3.5.5.3 Färbung	34
3.5.5.4 Auswertung	34
3.6 Statistische Analyse.....	35

3.7 Proteinbiochemische Methoden und morphologische Veränderungen	35
3.7.1 Behandlung der Zellen	35
3.7.2 Morphologische Veränderung.....	35
3.7.3 Proteinisolierung	36
3.7.4 Western Blot	36
3.7.5 Antikörper	38
4 ERGEBNISSE	39
4.1 Auswirkung von FG-3019 auf das Wachstumsverhalten der Zellen	39
4.1.1 Auswirkung von FG-3019 im klonogenen Assay	39
4.1.1.1 FG-3019 hemmt das klonogene Überleben von HPF.....	39
4.1.1.2 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben von NHDF.....	42
4.1.1.3 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben von HDMEC und HUVEC.....	43
4.1.1.4 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben von A549.....	47
4.1.2 Auswirkung von FG-3019 im Proliferations Assay	49
4.1.2.1 FG-3019 hemmt die Proliferation von HPF	49
4.1.2.2 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von NHDF	50
4.1.2.3 FG-3019 hemmt die Proliferation von HUVEC.....	51
4.1.2.4 FG-3019 zeigt keine signifikante Beeinflussung der Proliferation von A549.....	52
4.2 Auswirkung von FG-3019 auf die Vitalität von Zellen	53
4.2.1 FG-3019 hemmt die Vitalität von HPF.....	53
4.2.2 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Vitalität von NHDF	54
4.2.3 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Vitalität von HUVEC	55
4.2.4 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Vitalität von A549	56
4.3 Auswirkung von FG-3019 auf die Adhäsion von Zellen	57
4.3.1 FG-3019 reduziert leicht die Adhäsion von HPF	57
4.3.2 FG-3019 zeigt keinen Effekt auf das Adhäsionsverhalten von NHDF	58
4.3.3 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von HUVEC	59
4.3.4 FG-3019 beeinflusst das Adhäsionsverhalten von A549 nicht	60
4.4 Auswirkung der Migrationszeit auf die Migration und die Zellmorphologie von HPF und NHDF	61
4.4.1 Die Zeit beeinflusst das Migrationsverhalten und die Zellmorphologie von HPF.....	62
4.4.2 NHDF zeigen keine Migration im Migrations-Assay	62
4.5 Auswirkung von FG-3019 auf die Migration	63
4.5.1 FG-3019 reduziert die in-vivo Migration von HPF.....	63
4.5.2 FG-3019 zeigt keinen Einfluss auf die Migration von HDMEC.....	65
4.5.3 FG-3019 zeigt keinen Einfluss auf die Migration von HUVEC	67
4.5.4 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von A549	68
4.6 Auswirkung von Bestrahlung kombiniert mit FG-3019 auf das klonogene Überleben	70
4.6.1 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von HPF unter Bestrahlung nicht	70
4.6.2 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von NHDF unter Bestrahlung nicht.....	71
4.6.3 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von HUVEC unter Bestrahlung nicht.....	72
4.6.4 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von A549 unter Bestrahlung nicht.....	74
4.7 Reaktion von mit TGF-β behandelten Zellen auf FG-3019	75
4.7.1 TGF- β hemmt das klonogene Überleben von HPF und FG-3019 attenuiert diesen Effekt.....	75
4.7.2 TGF- β und die zusätzliche Behandlung mit FG-3019 haben keine Auswirkung auf die Adhäsion von HPF	76
4.7.3 FG-3019 reduziert die durch TGF- β stimulierte Migration von HPF	77
4.7.3.1 Ergebnisse für 5 h Migrationszeit.....	78
4.7.3.2 Ergebnisse für 12 h Migrationszeit.....	80
4.7.3.3 Ergebnisse für 14 h Migrationszeit.....	81
4.8 Mikroskopische Untersuchung des Wachstums und der morphologischen Entwicklung von HPF und A549	83
4.8.1 A549.....	83
4.8.2 HPF	85

4.9 Die Auswirkung von TGF-β auf die Expression verschiedener Proteine	89
4.9.1 A549.....	89
4.9.1.1 Kollagen IV	89
4.9.1.2 α -SMA	90
4.9.1.3 CTGF	91
4.9.2 HPF	91
4.9.2.1 Kollagen IV	92
4.9.2.2 α -SMA	92
5 DISKUSSION	94
5.1 Einfluss von FG-3019 auf humane Zellen in vitro	95
5.1.1 Beeinflussung der „Epithelial-to-Mesenchymal Transition“ durch TGF- β	98
5.2 TGF-β im Kontext von Fibrose und Strahlentherapie	100
5.3 Klinik, Verlauf und Therapieansätze der strahlungsbedingten Lungenfibrose	101
5.3.1 Einfluss ionisierender Strahlung auf Zellen der Lunge.....	104
5.3.2 Einfluss von TGF- β und CTGF auf die Entstehung einer Lungenfibrose.....	105
6 SCHLUSSFOLGERUNG.....	108
7 ZUSAMMENFASSUNG	109
8 SUMMARY	111
9 LITERATURVERZEICHNIS.....	113
10 DANKSAGUNG.....	129
11 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Connective Tissue Growth Factor	19
Abbildung 2: Arbeitsschritte des PromoCell Transmigration Kit	33
Abbildung 3: HPF im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 10 Tagen	40
Abbildung 4: HPF im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 7 Tagen	41
Abbildung 5: NHDF im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 7 Tagen.....	42
Abbildung 6: NHDF im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 10 Tagen.....	43
Abbildung 7: HDMEC im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 5 Tagen	44
Abbildung 8: HDMEC im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 7 Tagen	45
Abbildung 9: HUVEC im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 5 Tagen.....	46
Abbildung 10: HUVEC im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 7 Tagen.....	47
Abbildung 11: A549 im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 7 Tagen.....	48
Abbildung 12: A549 im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 5 Tagen.....	49
Abbildung 13: HPF im Proliferations-Assay mit FG-3019	50
Abbildung 14: NHDF im Proliferations-Assay mit FG-3019.....	51
Abbildung 15: HUVEC im Proliferations-Assay mit FG-3019.....	52
Abbildung 16: A549 im Proliferations-Assay mit FG-3019.....	53
Abbildung 17: HPF im Vitalitäts-Assay mit FG-3019	54
Abbildung 18: NHDF im Vitalitäts-Assay mit FG-3019.....	55
Abbildung 19: HUVEC im Vitalitäts-Assay mit FG-3019.....	56
Abbildung 20: A549 im Mortalitäts-Assay mit FG-3019.....	57
Abbildung 21: HPF im Adhäsions-Assay mit FG-3019	58
Abbildung 22: NHDF im Adhäsions-Assay mit FG-3019.....	59
Abbildung 23: HUVEC im Adhäsions-Assay mit FG-3019.....	60
Abbildung 24: A549 im Adhäsions-Assay mit FG-3019.....	61
Abbildung 25: Migration von HPF nach 5, 12 und 14 Stunden	62
Abbildung 26: Migration von NHDF nach 12 und 14 Stunden.....	62
Abbildung 27: HPF im 5, 12 und 14 Stunden Migrations Assay mit FG-3019.....	64
Abbildung 28: Migration von HPF nach 5 und 14 Stunden mit FG-3019.....	65
Abbildung 29: HDMEC im 12 Stunden Migrations Assay mit FG-3019	66
Abbildung 30: Migration von HDMEC nach 12 Stunden mit FG-3019.....	66
Abbildung 31: HUVEC im 12 Stunden Migrations Assay mit FG-3019.....	67

Abbildung 32: Migration von HUVEC nach 12 Stunden mit FG-3019	68
Abbildung 33: A549 im 12 Stunden Migrations Assay mit FG-3019	69
Abbildung 34: Migration von A549 nach 12 Stunden mit FG-3019	69
Abbildung 35: HPF im klonogenen Assay mit FG-3019 und Bestrahlung	71
Abbildung 36: NHDF im klonogenen Assay mit FG-3019 und Bestrahlung.....	72
Abbildung 37: HUVEC im klonogenen Assay mit FG-3019 und Bestrahlung.....	73
Abbildung 38: A549 im klonogenen Assay mit FG-3019 und Bestrahlung.....	74
Abbildung 39: HPF im klonogenen Assay mit TGF- β und FG-3019.....	76
Abbildung 40: HPF im Adhäsion-Assay mit TGF- β und FG-3019.....	77
Abbildung 41: HPF im 5 Stunden Migrations-Assay mit TGF- β und FG-3019	79
Abbildung 42: Migration von HPF nach 5 Stunden mit TGF- β und FG-3019.....	79
Abbildung 43: HPF im 12 Stunden Migrations-Assay mit TGF- β und FG-3019	81
Abbildung 44: HPF nach 14 Stunden Migration mit TGF- β und FG-3019.....	82
Abbildung 45: Wachstum von A549 nach 48 Stunden mit TGF- β	84
Abbildung 46: Wachstum von A549 nach 72 Stunden mit TGF- β	85
Abbildung 47: Monolayer von unbehandelten HPF	86
Abbildung 48: Wachstum von HPF nach 24 Stunden mit TGF- β	86
Abbildung 49: Wachstum von HPF nach 48 Stunden mit TGF- β	87
Abbildung 50: Wachstum von HPF nach 72 Stunden mit TGF- β	88
Abbildung 51: Wachstum von HPF nach 96 Stunden mit TGF- β	88
Abbildung 52: Wachstum von HPF nach 96 Stunden	89
Abbildung 53: Expression von Kollagen IV in A549.....	90
Abbildung 54: Expression von α -SMA in A549	91
Abbildung 55: Expression von CTGF in A549.....	91
Abbildung 56: Expression von Kollagen IV in HPF.....	92
Abbildung 57: Expression von α -SMA in HPF.....	93

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
α -SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin
β	Beta
BMP-4	Bone Morphogenetic Protein 4
BSA	Bovines Serumalbumin
BSS	Buffered Saline Solution
CCN	Abkürzung ergibt sich aus den ersten drei entdeckten Proteinen dieser Familie: CYR61 (cysteine-rich angiogenic protein 61 oder CCN1), CTGF (connective tissue growth factor oder CCN2) und NOV (nephroblastoma overexpressed oder CCN3)
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
FCS	Fetal Calf Serum
FG	FibroGen
γ	Gamma
Gy	Gray
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic-acid
HPF	Human Pulmonary Fibroblasts
HrP	Horseradish Peroxidase
HSPG	Heparin Sulfate Proteo Glycan
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IPF	Idiopathic Pulmonary Fibrosis
kDa	Kilodalton
LDL	Low-Density Lipoprotein

LRP	Lipoprotein Receptor-related Proteins
MMPs	Matrix Metalloproteinases
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts
PaO ₂	Arterieller Sauerstoff-Partialdruck
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution
PET	Polyethylenterephthalat
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TNS	Trypsin Neutralizing Solution
TRIS-HEPES-SDS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane-4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic-acid-sodium-dodecylsulfate
v	Ny
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWC	von Willebrand Factor

1 Einleitung

In der Einleitung werden der Aufbau der Lunge und das Krankheitsbild der Lungenfibrose näher erläutert.

1.1 Der Aufbau der Lunge

Die Säugerylunge ist ein paariges Organ, welches sich zusammen mit dem Kehlkopf und der Luftröhre in der Embryonalperiode aus einer entodermalen Ausstülpung der ventralen Wand des Vorderdarms entwickelt. Der luftleitende Teil besteht aus dem Bronchialbaum. Dieser beginnt mit der Trachea, die an der Bifurcatio tracheae in die beiden Stammbronchien, Bronchi principales, übergeht. Von diesen wiederum zweigen Lappenbronchien - Bronchi lobares genannt - ab. Die beiden Lungenflügel werden in Lungenlappen unterteilt. Aus den Bronchi lobares gehen Segmentbronchien, die Bronchi segmentales, hervor. Der Bronchialbaum verzweigt sich fortwährend weiter. Je kleiner die Verästelungen werden, umso weniger Knorpelanteile weisen sie auf, bis diese mit dem Beginn der kleinen Bronchuli nicht mehr vorhanden sind. An die Bronchi segmentales schließen sich mehrere Bronchuli terminales an, die schließlich in Bronchuli respiratorii und über die Ducti alveolares in den Lungenalveolen enden. Die Bronchuli respiratorii und deren weitere Verzweigungen regeln den Gasaustausch (Vollmerhaus und Frewein, 1993).

Von innen nach außen findet man im Bronchialbaum die Schleimhaut (Tunica mucosa), die Knorpelfaserhaut (Tunica fibromusculocartilaginea) und die peribronchiale Bindegewebshaut (Tunica adventitia).

Das Epithel besteht zu Beginn - wie in der Luftröhre - aus mehrreihigem, hochprismatischem respiratorischem Epithel, in das Becherzellen eingelagert sind. Mit der Aufteilung der Bronchien nimmt die Höhe des Epithels kontinuierlich ab und entwickelt sich zu einschichtigem iso- oder hochprismatischem Flimmerepithel, dem am Ende Becherzellen und „Flimmerhaare“ fehlen.

In der darunter liegenden Lamina propria findet sich glatte Muskulatur, deren Anteil zu den Alveolen hin zunimmt. Weiterhin enthält sie eine Vielzahl elastischer Fasern sowie muköse und seröse Drüsen. Sie ist von Knorpel umgeben, der gewährleistet, dass die Luftwege offen bleiben. Je kleiner der Durchmesser der Bronchien wird, umso geringer wird der Anteil der Knorpelmasse, bis sich nur noch kleine Knorpelinseln finden.

Die äußerste Schicht besteht aus der Tunica adventitia. Diese enthält die Blut- und Lymphgefäße.

Die Alveolen - Alveoli pulmonis genannt - werden von einem einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet, das der Basalmembran aufliegt. Das Epithel besteht zum größten Teil aus den Pneumozyten Typ I, die für den Gasaustausch zuständig sind, und den größeren Pneumozyten Typ II, die das Surfactant bilden. Weiterhin finden sich noch Alveolarmakrophagen.

Luft und Blut werden durch eine vierschichtige Wand, die Blut-Luft-Schranke voneinander getrennt. Sie wird vom Epithel der Alveolen, der epithelialen und der endothelialen Basalmembran sowie dem Endothel der Kapillaren gebildet.

Das bindegewebige Gerüst der Alveolarwand besteht vor allem aus elastischen Fasern, die die Alveolen korbartig umgeben. Zusätzlich findet man Kollagenfibrillen und vereinzelt auch Bindegewebszellen in dem Gerüst, die Fibroblasten. Der alveoläre Faserapparat bildet ein kontinuierliches elastisches Netz, das die gesamte Lunge durchzieht (Vollmerhaus und Frewein, 1994).

1.2 Definition der Lungenfibrose

Ist das Bindegewebe in den Organen von Menschen oder Tieren krankhaft vermehrt, spricht man von einer Fibrose, in deren Folge das Organ durch die strukturelle Gewebeverhärtung einen Teilbereich oder seine gesamte Funktion einbüßt. Die Bezeichnung Lungenfibrose wird durch ihr histologisches Bild verankert, in dem eine Ansammlung von fibrinösem Material im alveolären Interstitium zu beobachten ist (Murray, Laurent, 1988).

Durch Einlagerung von Bindegewebe kommt es zu einem Umbau und in der Folge über eine Verhärtung und Narbenbildung zu einer Zerstörung des normalen Lungengewebes. Die vermehrte Einlagerung von Bindegewebe zwischen den Alveolen, den sie umge-

benden Blutgefäßen und in die alveoläre Membran ist ein chronisch progressiver Prozess. Durch den Umbau sinkt die Compliance der Lunge, es manifestiert sich eine restriktive Ventilationsstörung, die Diffusionskapazität ist vermindert und der PaO_2 sinkt ab. So kommt es zu einer pulmonalen Hypertonie mit den Folgeschäden der chronischen Rechtsherzbelastung und eines Cor Pulmonale (Thomas, Wynn, 2007, Tomasek, Gabbiani, Hinz et al., 2002).

Diese Prozesse führen zu einem verminderten und erschwerten Gasaustausch und bedeuten gemäß dem heutigen Standard der medizinischen Entwicklung, ohne Lungentransplantation, den Tod des Patienten (Wynn et al., 2011 und Yang et al., 2012).

1.3 Pathogenese der Lungenfibrose

Es existieren mehrere Hypothesen, die die Pathogenese der Lungenfibrose beschreiben. Da es in der Regel oftmals erst sechs Monate bis zu zwei Jahre nach den Erstsymptomen zu einer Biopsieentnahme des Lungengewebes kommt, gibt es keine histologischen Schnitte, die ein Frühstadium der Lungenfibrose beim Menschen zeigen.

Als Ursachen für die Entwicklung einer interstitiellen Fibrose gelten sowohl vorhergehende entzündliche Erkrankungen, wie z. B. eine Pneumonie, aber auch Umweltbelastungen, systemische Kollagenasen oder Medikamente (Günther, Ermert, Breithecker et al., 2003). Oftmals wird auch keine Ursache für die Entwicklung eines fibrotischen Umbaus der Lunge gefunden. Diese sogenannte idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) gilt als die häufigste Form (Coultas, Zumwalt, Black et al., 1994 und Günther, Breithecker, Hackstein et al., 2003).

Lange Zeit besagte die vorherrschende Hypothese, dass die Lungenfibrose das Endstadium einer chronischen Entzündung darstellt (siehe Abschnitt 1.3.1) (Selman, King, Pardo, 2001, Katzenstein, Myers, 2000, und Mason, Schwarz, Hunninghake et al., 1999). Allerdings ist ein inflammatorisches Geschehen als alleinige Ätiologie in den letzten Jahren mehr und mehr angezweifelt worden. Der heutige Stand der Forschung besagt, dass die Entzündung nicht alleine die zentrale Rolle bei der Entstehung einer Lungenfibrose spielt. Es konnte nachgewiesen werden, dass sie nicht der ausschließlich relevante Faktor der Pathogenese ist (Selman, Pardo, 2002), sondern es häufen sich mit zunehmendem Verständnis der Vorgänge auf zellulärer Ebene bei dieser schweren Er-

krankung die Hinweise, dass eher ein vom Körper angestoßener Heilungsprozess, der jedoch außer Kontrolle gerät, das Krankheitsgeschehen in Richtung einer Fibrose ungünstig beeinflusst (siehe Abschnitt 1.3.2). Bis heute gibt es keine Beweise, dass ein entzündlicher Prozess zwingend am Anfang der Lungenfibrose stehen muss. Der fibrotische Umbau der Lunge ist in seinen Entstehungsmechanismen noch immer nicht vollständig bekannt. Vielfältige Ursachen erschweren die Erkenntnis einer einheitlichen Pathogenese (Wilson, Wynn, 2009).

1.3.1 Hypothese: Lungenfibrose als Resultat einer chronischen Entzündung

In der Vergangenheit verdächtigte man vor allem eine chronische Entzündung als verantwortlich für das Entstehen einer Lungenfibrose. Ein großer Teil der Forschungsarbeit wurde mit Hilfe eines Tiermodells, in dem Bleomycin bei Ratten, Mäusen oder Hamstern eingesetzt wurde, geleistet. Bleomycin induziert über eine entstehende Entzündung bei den oben erwähnten Tieren eine Lungenfibrose. Bedeutsam ist, dass sich diese durch das Antibiotikum induzierte Form der Lungenfibrose sehr schnell entwickelt (Murray, Laurent, 1988), wohingegen die eigentliche Lungenfibrose einen langsamen Entwicklungsprozess darstellt. Das akute und das chronische Stadium einer durch Bleomycin induzierten Lungenfibrose bei der Ratte, der Maus und dem Hamster unterscheiden sich von dem Bild der humanen fibrotischen Lungenveränderung. Zusätzlich gibt es bei Nagetieren Hinweise auf Spontanheilungen nach ca. vier Monaten, die bislang weder beim Menschen noch bei anderen Säugetieren beobachtet werden konnten (Williams, Malarkey, Cohn, 2004).

Heute vertreten viele Forscher die Meinung, dass die chronische Entzündung nicht als Hauptursache oder Hauptmerkmal einer Lungenfibrose angesehen werden darf. Es gibt kaum Beweise, dass eine Entzündung am Anfang dieser krankhaften Veränderung der Lunge steht. In der Histopathologie nimmt die entzündliche Reaktion bei einer Lungenfibrose keine bedeutsame Stellung ein und ist teilweise nur sehr mild oder überhaupt nicht nachweisbar (Nicholson, Fulford, Colby et al., 2002, Flaherty, Toews, Travis et al., 2002 und Thomas, Wynn, 2007).

Auch eine Untersuchung an Katzen hat bestätigt, dass eine inflammatorische Ursache kein vorrangiges Merkmal bei der Lungenfibrose sein muss. Entzündungszellen sind im

histologischen Präparat einer Fibrose nur dann nachweisbar, wenn eine vermehrte Kollageneinlagerung schon begonnen hat. Unveränderte alveoläre Septen sind jedoch fast nie betroffen (Williams, Malarkey, Cohn, 2004).

Es wurde bis heute kein Zusammenhang zwischen der Schwere der klinischen Symptome und dem Ausmaß des histopathologisch beobachteten entzündlichen Prozesses nachgewiesen. Zusätzlich ist die Lungenfibrose trotz der Behandlung mit Glucocorticoiden eine progressiv verlaufende Erkrankung, und in vielen Fällen kommt es trotz entzündungshemmender Behandlung zu keiner klinischen Besserung (Wynn et al., 2007).

Zwischen dem Grad einer Lungenentzündung und dem Überleben des Patienten gibt es keine Korrelation. Die Erklärung, dass eine Entzündung die Pathogenese des jeweiligen Leidens vorantreibt, ist auf viele Lungenerkrankungen anwendbar, jedoch nicht auf die Lungenfibrose.

Ein Pfeiler der Entzündungshypothese ist die Annahme, dass eine Alveolitis am Anfang der Lungenfibrose steht. Die im histopathologischen Bild etwas verdickt imponierenden Alveolarsepten können als Bestätigung dieser Theorie dienen. Allerdings sind in den histopathologischen Präparaten weder Ansammlungen von Fibroblasten noch fibrotische Muster zu erkennen. Außerdem führen viele Lungenerkrankungen, bei denen die Entzündung im Anfangsstadium als prominentes Merkmal auftritt, konsekutiv nicht zu einem fibrotischen Gewebeumbau. All diese Punkte sprechen gegen die Entzündungshypothese als Modell zur Entstehung einer Lungenfibrose. Auch die Progression der Erkrankung „Lungenfibrose“ zeigt keine typischen Entzündungsmerkmale und ist durch antiinflammatorisch wirkende Therapeutika kaum zu beeinflussen (Cook, Brass, Schwartz, 2002 und Gross, Hunnighake, 2001).

Versuche mit Tieren geben Hinweise darauf, dass als Reaktion auf eine Lungenerkrankung eine entzündliche sowie eine fibrinöse Antwort getrennt voneinander vorkommen können. So haben Munger, Huang, Kawakatsu et al. in ihrer Studie aus dem Jahr 1999 gezeigt, dass mit Bleomycin behandelte „ $\beta 6$ -/-Knockout Mäuse“ (TGF- $\beta 1$ ist Ligand unter anderem am $\alpha v\beta 6$ -Rezeptor) zwar eine massive Entzündung entwickelten, jedoch keine Lungenfibrose (Munger, Huang, Kawakatsu et al., 1999). Adamson, Young und Bowden zeigten 1988 bei explantierten hypoxischen Mäuselungen eine fibrinöse Antwort in einer blutfreien Umgebung und somit eine Fibroseentwicklung ohne auftretende Entzündungsreaktion (Adamson, Young, Bowed, 1988).

1.3.2 Hypothese: Ein außer Kontrolle geratener Heilungsprozess führt zur Lungenfibrose

Die normale Wundheilung besteht aus zwei Phasen. Nach einer Gewebeverletzung kommt es anfangs zu einer Regeneration, bei der verletzte Zellen durch neue ersetzt werden. In der Folge kommt es zu einer Einlagerung von Bindegewebe, welches das ursprüngliche, aber zerstörte parenchymale Gewebe ersetzt. Es erfolgt eine vollständige Reepithelisierung (Wynn, 2007). Die Aktivität der Myofibroblasten wird durch einen programmierten Zelltod (Apoptose) gehemmt (Willis et al., 2006).

Bei der Lungenfibrose bleibt dieser Reparaturprozess aus. Stattdessen kann eine abnormale, dauerhafte Aktivierung der Myofibroblasten („Myofibroblasten-Verhalten“) durch eine übermäßige Produktion wachstumsfördernder Zytokine zu einer fibrotischen Veränderung führen (Martin, Lefaix, Pinton et al., 1993, Martin, Lefaix, Delanian, 2000, und Hong, Jung, Tsao et al., 2003). Somit kann man die Entwicklung einer Lungenfibrose als einen fehlgeschlagenen Heilungsprozess bezeichnen.

Normalerweise findet die schnelle Reepithelisierung nach einer Gewebeverletzung durch eine Zellmigration, -proliferation und -differenzierung statt. Diese Antworten sind bei der Entwicklung einer Lungenfibrose langsamer und ungenügend. Die Verletzung des alveolären Epithels führt zu einer explosionsartigen Freisetzung von proinflammatorischen und fibroproliferativen Mediatoren. Normalerweise schließt sich daran die physiologische Wundheilung an. Aus noch ungeklärten Gründen kommt es jedoch als Antwort auf eine chronische Verletzung des alveolären Epithels (Nobel, Homer, 2004), bei der Anbahnung einer Fibrose zu einem pathologischen Heilungsprozess, der keinen Abbruch mehr findet (Strieter, 2005). Der Reparaturprozess dauert an und gerät in der Folge außer Kontrolle. Das alveoläre Epithel zeigt Schäden oder sogar einen vollständigen Verlust der Typ I Pneumozyten, Hyperplasien der Typ II Zellen und eine veränderte Expression der Adhäsionsmoleküle und HCM-Antigene (Kaspar, Haroske, 1996 und Kaspar, Koslowaki, Luther et al., 1995). Durch die Hyperplasie der Pneumozyten Typ II Zellen kommt es zu einer vermehrten Expression von Enzymen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die aufgrund ihrer Wirkung die Fibrose unterhalten.

Früher nahm man an, dass diese Faktoren hauptsächlich von den Entzündungszellen freigesetzt werden. Kapanaci, Desmouliere, Pache et al. haben aber im Jahr 1995 ge-

zeigt, dass die Pneumozyten Typ II als Hauptproduzenten von TGF- β , einem wichtigen Faktor bei der Fibroseentwicklung, gelten (Kapanaci, Y., Desmoulier, A., Pache, J.C., 1995). TGF- β wird vor allem dort exprimiert, wo Fibroblasten-Foci auftreten. Diese These wird von Khahill, O'Conner, Unruh et al. unterstützt, die TGF- β hauptsächlich in den Epithelzellen, die um die so genannten „honeycombs“ (cystische Wabenbildung im Lungengewebe) platziert sind, sowie an Stellen mit vermehrt eingelagertem Bindegewebe fanden. In einer gesunden Lunge kann man ein perfektes Zusammenspiel zwischen extrazellulärer Matrix, Enzymen, Integrinen, Wachstumsfaktoren und parenchymalen Zellen erkennen. Wenn dieses Gleichgewicht außer Kontrolle gerät, entsteht als pathologisches Resultat eine Lungenfibrose (Khalil, O'Connor, Unruh et al., 1991).

1.4 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Lungenfibrose

In diesem Abschnitt werden sowohl die bei einer Lungenfibrose auftretenden strukturellen Veränderungen als auch die an der Pathogenese beteiligten Zellen erläutert. Es gibt im Lungengewebe ca. 40 verschiedene Zelltypen. Für die Entwicklung einer Fibrose sind hingegen hauptsächlich vier Arten verantwortlich: Makrophagen, Pneumozyten Typ II, Endothelzellen und Fibroblasten (Johnston, Williams, Elder et al., 2004, Johnston, Williams, Okunieff et al., 2002, und Movsas, Raffin, Epstein, 1997).

1.4.1 Strukturelle Veränderungen bei einer Lungenfibrose

Bei der Lungenfibrose kommt es durch vermehrte Einlagerung von fibrillärem Kollagen, Fibronectin, Proteoglykanen und elastischen Fasern zu einem Umbau der extrazellulären Matrix. Physiologischerweise befindet sich diese - von Granulozyten, Makrophagen, epidermalen Zellen und Myofibroblasten gebildet - mit den „Metalloproteinasen (MMPs)“ und den „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)“ im Gleichgewicht. Bei der pulmonalen Fibrose jedoch kommt es zu einer Vermehrung der MMPs auf Kosten der TIMPs, so dass nachfolgend sowohl eine Proteolyse als auch eine

Zunahme der extrazellulären Matrix einsetzen. Das Gleichgewicht zwischen Kollagensynthese und -abbau wird somit schwer gestört (Wynn, 2008).

Zudem findet eine Akkumulation der Fibroblasten, eine Formung von Fibroblasten-Foci und eine Proliferation dieses Zelltyps statt (Murray, Laurent, 1988, Selman, King, Pardo, 2001 und Kim, Kugler, Wolters et al., 2006). Fibroblasten-Foci zeigen eine alveoläre Schädigung an, in deren Folge ein Kollaps der kleinsten distalen Luftwege entsteht (Kasper, 1999 und Kuhn, Boldt, King et al., 1989). Die Fibroblasten produzieren nun mehr Kollagen als abgebaut werden kann, und Narbengewebe ersetzt das zarte Alveolargefüge. Es kommt häufig zu einer wabenartigen Auflockerung der fibrotischen Verdickung, dem so genannten „honeycombing“. Dabei entsteht im Lungenparenchym ein zystischer, wabenartiger Raum, der mit Mucin gefüllt und von bronchiolärem Epithel umrandet ist. Die Bildung von Narbengewebe mit der konsekutiven Verdrängung der physiologischen Lungenstruktur hat eine Zerstörung der Architektur des Organs zur Folge (Meltzer, Noble, 2008).

Die persistierende Irritation führt zu einer vermehrten Produktion von Wachstumsfaktoren, proteolytischen Enzymen, Angiogenese-Faktoren und fibrogenetischen Zytokinen. Dieser Vorgang findet sein pathologisches Ende in einer Bindegewebsakkumulation (Wilson, Wynn, 2009).

Anstatt der normalen Reepithelisierung findet man nun kleine epitheliale Bereiche, in denen es durch Apoptose zu einem „Dropout“ von Zellen kommt, in anderen Arealen überwiegen die hyperplastischen Typ II Pneumozyten. In vitro Experimente haben gezeigt, dass sowohl Fibroblasten als auch Myofibroblasten den Zelltod epithelialer Zellen des Lungengewebes induzieren können (Uhal, Joshi et al., 1995). Auch in vivo konnte die Apoptose alveolärer Epithelzellen vor allem in den Bereichen erkannt werden, die direkt an Fibroblasten-Foci angrenzen (Uhal, Joshi et al. 1998). Zusammenhangstrennungen in der Basalmembran führen zur Migration von Fibroblasten und Myofibroblasten in die Alveolen (Kuhn, McDonald, 1991). In diesen Lungenarealen findet sich ein vollständiger Funktionsverlust der Lunge (Klinke, Silbernagel, 2003). Subepithelial gelegene Myofibroblasten produzieren Matrix-Metalloproteinasen, die vorrangig Kollagen IV als Bestandteil der Basalmembran abbauen. Dadurch wird ihre Migration in den alveolären Raum erleichtert (Selman, Ruiz, Cabera et al., 2000 und Hayashi, Stetler-Stevenson, Flemming et al., 1996).

1.4.2 Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)

Eine große Rolle in der Entwicklung der pulmonalen Fibrose spielt die Akkumulation von Fibroblasten. Die Mechanismen, die dazu führen, sind bis heute unklar. Vieles deutet darauf hin, dass epitheliale Zellen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen können - mit der Folge einer Vermehrung dieses Zelltyps. Es ist bekannt, dass während der Embryogenese eine Transdifferenzierung von epithelialen Zellen zu dem Phänotyp „mesenchymale Zellen“ stattfinden kann. Diesen Prozess nennt man „Epitheliale-Mesenchymale-Transition“, abgekürzt „EMT“ (Iwano, Plieth, Danoff et al., 2002).

Das erste Mal ist dieses Phänomen außerhalb der Embryogenese in der Niere beobachtet worden. Wills, Liebler, Luby-Phelps et al. wiesen 2005 eine Coexpression epithelialer und mesenchymaler Marker in histologischen Proben von Patienten mit einer Lungenfibrose nach (Wills, Liebler, Luby-Phelps, 2005). Dies bestätigte die Vermutung, dass EMT auch bei der pulmonalen Fibrose eine Rolle spielt.

Dass in Lungenbiopsien von Fibrose-Patienten epitheliale Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften zu finden sind, die eventuell ein Anfangsstadium der EMT darstellen, erhärtet die obige Annahme weiterhin. Außerdem wurde dieser Zelltyp in Bereichen kollabierter Alveolen und in Gruppen alveolärer Epithelzellen nachgewiesen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich schon im Anfangsstadium der Lungenfibrose alveoläre Epithelzellen von der Basalmembran ablösen. Mit dem Nachweis eines bestimmten Proteins (pro-surfactant-Protein-C) wurden alveoläre Epithelzellen zusätzlich auch im Interstitium der Lunge gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die von der Basalmembran gelösten Zellen über Migration in das interstitielle Lungengewebe gelangen (Kim, Kugler, Wolters et al., 2006).

Auch in einem Experiment mit TGF- β behandelten Mäusen wurde nachgewiesen, dass alveoläre Epithelzellen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen, zur Migration fähig sind und im weiteren Verlauf der Fibrose vor allem dort aufzufinden sind, wo eine vermehrte Ansammlung von Kollagen zu beobachten ist. Zusätzlich gibt es mindestens eine Komponente in der provisorischen extrazellulären Matrix, die zur EMT führen kann. Auch der „Connective Tissue Growth Factor“ wurde schon mehrmals mit einer EMT in Zusammenhang gebracht. Es gibt klare Hinweise, dass er für die EMT in der Lunge essentiell ist (Lipson, Wong, Teng, Spong, 2012). Auf diesen Faktor wird in Abschnitt 1.4.6 näher eingegangen.

Isolierte Fibroblasten von Patienten mit einer Lungenfibrose haben einen heterogenen Phänotyp und zeigen andere Eigenschaften als Fibroblasten, die aus gesunden Lungen stammen. Eine Erklärung für diese Heterogenität könnte die Tatsache sein, dass Fibroblasten aus fibrotischen Lungen von unterschiedlichen Zellen abstammen. Kim, Kugler, Wolter et al. fanden 2006 in einem Versuch, bei dem experimentell eine Fibrose induziert wurde, mesenchymale Marker fast ausschließlich in den epithelialen Zelllinien (Kim, Kugler, Wolters et al., 2006).

Es ist nachgewiesen, dass alveoläre Epithelzellen Vorläufer von Fibroblasten-ähnlichen Zellen sein können. Somit ist die Annahme begründet, dass sie eine Rolle in der Entwicklung einer pulmonalen Fibrose spielen (Kim, Kugler, Wolters et al., 2006).

Wird das Lungengewebe einer Noxe ausgesetzt, kommt es zu einer erhöhten Apoptose-rate der alveolären Epithelzellen und zu einer vermehrten alveolären Permeabilität. Eine provisorische Matrix wird gebildet, im gleichen Zuge findet eine Aktivierung der alveolären Epithelzellen zu mesenchymalen Zellen statt. Die epithelialen Zellen verlieren ihre typischen Merkmale und sind dann von mesenchymalen Zellen nicht mehr differenzierbar. Es entsteht eine pulmonale Fibrose als fibroproliferative Erkrankung, die von alveolären Epithelzellen vorangetrieben wird und somit eine epitheliale fibroblastische Veränderung des Lungengewebes darstellt (Selman, Pardo, 2002 und Kim, Kugler, Wolters et al., 2006).

1.4.3 Fibroblasten

Fibroblasten sind ortsständige Bindegewebszellen der Lunge. Sie spielen eine Hauptrolle bei der Synthese der Interzellularsubstanz, der extrazellulären Matrix. Zu den Produkten von Fibroblasten gehören neben dem Kollagen auch Metalloproteinasen (MMPs) und Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen (TIMPs), die in der gesunden Lunge im Gleichgewicht stehen (siehe Abschnitt 1.4.1). Diese physiologische Relation wird in fibrotischen Lungen jedoch aufgehoben, denn die Fibroblasten des erkrankten Gewebes exprimieren vermehrt MMPs (Wynn, 2007).

Eine generelle Schädigung der Lunge stimuliert die Proliferation von Fibroblasten und verstärkt die Abgabe von Zytokinen, die anfangs wiederum positiv auf die Reparatur der Verletzung einwirken. Gerät der Heilungsprozess jedoch außer Kontrolle, kommt es zu einer Verstärkung der fibrotischen Gewebeumwandlung (Wynn, 2007).

Auch auf Strahlung reagieren Fibroblasten mit einer Proliferation, Differenzierung und einer deutlich erhöhten Produktion von Kollagen. Histopathologisch sind nach einer Latenzzeit von zwei Wochen bis zu mehreren Monaten Schäden an den Alveolen im Sinne eines interstitiellen Ödems, Kapillarveränderungen sowie eine Verdickung der Alveolarsepten zu erkennen (Rübe, Uthe, Schmid et al., 2000).

Es wurde nachgewiesen, dass Fibroblasten nicht nur eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Lungenfibrose spielen, sondern auch für den Schweregrad der Erkrankung ausschlaggebend sind. Diese Zellen wandern in die Areale der Lungenschädigung, differenzieren sich dort zu Myofibroblasten und beginnen mit ihrer Proliferation (Crouch, 1990, Rodemann, Binder, Burger et al., 1996, Nicod, 1998 und Ward, Hunninghake, 1998). Fibroblasten werden unter anderem durch TGF- β und CTGF zur Differenzierung zu Myofibroblasten stimuliert (Gauldie, Sime, Xing et al., 1999, Kolb, Margetts, Galt et al., 2001 und Grotendorst, Rahmanie, Duncan, 2001).

Gleichzeitig erfolgt über eine gesteigerte sekretorische Aktivität der Bindegewebszellen die vermehrte Expression von Kollagen, Fibronectin und Proteoglykanen, die allesamt eine zunehmende Dichte des Interstitiums bewirken. Histologisch kann man bei der Lungenfibrose eine Zunahme und Ansammlung von Fibroblasten und Myofibroblasten beobachten, die so genannten „Fibroblasten-Foci“ (Selman, King, Prado, 2001). Diese bilden sich vorwiegend subepithelial und korrelieren direkt mit der Schwere der Erkrankung. Anfangs treten sie nur vereinzelt auf. Im fortschreitenden Verlauf der Fibrose ist jedoch oft ein regelrechtes Netz aus Fibroblasten-Foci zu beobachten, die Bereiche einer akuten Lungenschädigung determinieren. Mikroskopisch stellen sie sich als Zonen fortlaufender Gewebeverletzung dar (Katzenstein, Myers, 1998).

Fibroblasten von an Fibrose erkrankten Patienten haben eine signifikant höhere Proliferationsrate als solche von gesunden Probanden. Sie sind keine homogene Population, sondern zeigen eine große Diversität in ihrem Phänotyp (Jordana, Schulmann, McSharry et al., 1988).

1.4.4 Myofibroblasten

Myofibroblasten sind eine spezifische Unterpopulation der Fibroblasten. Sie spielen sowohl bei der physiologischen Wundheilung als auch bei der Pathogenese der Lungenfibrose eine Schlüsselrolle. Es handelt sich um spindel-oder sternförmige Zellen, die

Merkmale von glatten Muskelzellen haben, kontraktile sind und „ α -smooth muscle actin“ enthalten (Scotton, Chambers, 2007).

Myofibroblasten gehen durch Proliferation und Differenzierung aus ansässigen Fibroblasten hervor. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sie durch EMT aus epithelialen Zellen entstehen können (Kalluri, Neilson, 2003, Wills, Libler, Luby-Phelps et al., 2005 und Kim, Kugler, Wolters, 2006). Auch aus dem Knochenmark stammende und im Blut zirkulierende Fibrozyten können Vorläuferzellen von Myofibroblasten sein und in die Lunge migrieren (Bucala, Spiegel, Chesney et al. 1994, Hashimoto, Jin, Liu et al., 2004, und Phillips, Brudick, Hong et al., 2004).

Für andere Organe gilt ebenfalls, dass die Gewebefibroblasten nicht der Ursprung aller Myofibroblasten sind. In der Leber imponieren z. B. nicht nur die „Hepatischen Stellata-Zellen“ als Ursprung der Myofibroblasten, sondern hier spielen auch vom Knochenmark abstammende Zellen als Ressource eine Rolle. Da Fibrozyten unter dem Einfluss und der Stimulation durch „fibrogene Mediatorzellen“ (Endothelin und TGF- β) ihren Phänotyp zu Myofibroblasten ändern, ist die Annahme, dass zirkulierende Fibrozyten Vorläuferzellen der Myofibroblasten sind, sehr wahrscheinlich (Schmidt, Sun, Stacey et al., 2003).

Im fibrotisch veränderten Lungengewebe treten die Myofibroblasten zum einen vermehrt unter verändertem und zerstörtem alveolärem Epithel auf, zum anderen aber auch in den verdickten alveolären Septen, in denen aufgrund der fibrotischen Veränderungen eine andauernde Schädigung sowie ein struktureller Umbau stattfinden. In den Fibroblasten-Foci machen die Myofibroblasten den Hauptteil der Zellen aus.

Physiologischerweise sind sie an der Produktion der extrazellulären Matrix, an der Gewebekontraktion und somit an der Gewebereparatur beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation der Signaltransduktion und bei der Regulierung von Genexpressionen, inklusive der Gene der extrazellulären Matrix. Allerdings produzieren diese Zellen auch vermehrt interstitielles Kollagen und gleichermaßen eine hohe Anzahl profibrotischer Zytokine (Lama, Phan, 2006).

Im Verlauf der physiologischen Wundheilung kommt es gegen Ende zur Apoptose der Myofibroblasten. TGF- β inhibiert diese Apoptose und verhindert die Myofibroblasten-Reduktion, so dass eine anhaltende Produktion der extrazellulären Matrix erfolgt. Der im eigentlichen Sinne positive Reparaturmechanismus nimmt eine überschießende Form an, das Interstitium verdichtet sich und das Gewebe wandelt sich fibrotisch um.

CTGF trägt noch zusätzlich zum Überleben der Myofibroblasten bei (Hinz et al., 2007 und Allen, Spiteri, 2002).

In der gesunden Lunge gibt es einen endogenen Mechanismus, der über den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) die Synthese von Prostaglandin E2 (PGE2) steigert, dadurch die Expression von CTGF reduziert und somit die CTGF-Antwort auf TGF- β terminiert, was letztendlich zu einer verminderten fibrotischen Antwort führt. Myofibroblasten von Lungenfibrose-Patienten haben die Fähigkeit, die TNF- α Rezeptoren hoch zu regulieren um eine Fibrose zu verhindern, eingebüßt. Dadurch kommt es zu einem Verlust der autokrinen Proliferationshemmung und zu einem Verlust der Hemmung der Deposition der extrazellulären Matrix (Allen, Spiteri, 2002).

In der Lungenfibrose persistieren die Myofibroblasten. Sie sind hauptverantwortlich für die fibrilläre Kollagenansammlung und spielen eine wichtige Rolle bei der Genexpression von Zytokinen. Sie tragen zur vermehrten Apoptoserate der alveolären Epithelzellen, zur Denudation der Basalmembran, zur Zerstörung alveolärer Epithelzellen und zu deren gestörter Regeneration bei (Hinz et al., 2007).

1.4.5 Transforming Growth Factor- β

Der Transforming Growth Factor-beta bezeichnet eine Gruppe von Zytokinen, von denen fünf Subtypen existieren (TGF- β 1 bis 5). Er konnte vor mehr als 20 Jahren erstmals isoliert werden (Border, Noble, 1994). Bei den Säugetieren stellt TGF- β 1 den quantitativ größten Anteil und damit die bedeutendste Unterform dieser Zytokingruppe dar. Viele Zellen sind in der Lage, TGF- β zu produzieren. Zu diesen Zelltypen zählen neben den Fibroblasten auch Thrombozyten, Entzündungszellen, mesenchymale Zellen und die Typ II Pneumozyten (Lasky, Brody, 2000, und Zhang, Phan, 1996). Bei der Entwicklung einer pulmonalen Fibrose spielt vor allem die vermehrte Freisetzung von TGF- β aus Lungenfibroblasten und den Pneumozyten Typ II eine wichtige Rolle (Pan, Yamauchi, Uzuki et al., 2001).

TGF- β wirkt auf unterschiedliche Organfunktionen und Regelkreisläufe im Körper ein, da quasi alle Zelltypen TGF- β -Rezeptoren enthalten (Zhang, Phan, 1996). Er hat Einfluss auf die korrekte Abfolge der Embryonalentwicklung, greift in den Zellzyklus überwiegend inhibitorisch ein, besitzt immunmodulierende Eigenschaften, ist in die

Genese maligner Tumore involviert und kontrolliert die Homöostase der extrazellulären Matrix (Lawrence, 1996 und Martin, Lefaix, Delanian, 2000).

Darüber hinaus hat TGF- β sowohl auf die Synthese als auch auf den Abbau von Bindegewebe einen wichtigen Einfluss. Er zeigt eine chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten, stimuliert die bindegewebsbildenden Zellen zur verstärkten Kollagensynthese (Martinet, Menard, Vaillant et al., 1996 und Allen, Spiteri, 2002) und beeinflusst somit die fibrotische Umwandlung des Gewebes (Lawrence, 1996). Er regt die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Myofibroblasten an (Gauldie, Sime, Xing et al., 1999, und Kolb, Margetts, Galt et al., 2001) und induziert über eine Anhäufung extrazellulärer Matrixproteine die Fibrose (Eickelberg, Köhler, Reichenberger et al., 1999).

TGF- β spielt aufgrund seiner profibrotischen Eigenschaften bei der Entwicklung einer Lungenfibrose eine entscheidende Rolle. Er ist vor allem ein Schlüsselmolekül bei den komplexen Vorgängen einer Gewebsverletzung nach Bestrahlung. Am Ort des Strahlenschadens ist ein hoher TGF- β Spiegel nachzuweisen (Rübe, Uthe, Schmid et al. 2000). Durch die Steigerung der kollagenen Syntheseleistung sowie die erhöhte Produktion von Fibronectin und Elastin in den Fibroblasten (Hiwatari, Shimutara, Yamauchi et al., 1997 und Sime, Xing, Graham et al., 1997) unterhält TGF- β den Fibroseprozess, indem die Matrixproteine akkumulieren (Khalil, O'Connor, Flanders et al., 1996). Eine zusätzliche Verstärkung dieses „circulus vitiosus“ wird durch die TGF- β vermittelte Hemmung der Kollagenasen erreicht (Rodemann, Bamberg, 1995 und Rodeman, Binder, Burger et al., 1996).

Außerdem beeinflusst TGF- β das Gleichgewicht zwischen den MMPs und TIMPs. Er inhibiert die Kollagenase-1 und vermindert so den Abbau von Prokollagen. Zusätzlich wird dieser Effekt durch die vermehrte Produktion von TIMPs unterstützt. Gleichzeitig induziert TGF- β die Prokollagenbildung in Fibroblasten und Myofibroblasten (Lasky, Brody, 2000). Die bei der physiologischen Wundheilung wichtige Apoptose von Myofibroblasten wird in Anwesenheit von TGF- β inhibiert. Dies führt zu einer anhaltenden Produktion der extrazellulären Matrix, deren Stabilität wiederum über die TGF- β Wirkung verstärkt wird (Khahil, O`Conner, Unruh et al., 1991).

Zusätzlich kommt es in den Myofibroblasten zu einer vermehrten Expression von CTGF Rezeptoren und auch damit zu einer fibrosebegünstigenden Wirkung von TGF- β (Allen, Spiteri, 2002). Im Gegenzug fördert TGF- β bei den alveolären Epithelzellen die Apoptoserate. Zusätzlich ist nachgewiesen, dass mit diesem Faktor exponierte alveoläre

Epithelzellen mit einer EMT reagieren (Wills, Liebler, Luby-Phelbs et al., 2005 und Kim, Kugler, Wolters et al., 2006).

Aufgrund der pluripotenten Natur der TGF- β Aktivität gibt es bis heute keine klinisch zugelassene Therapie, die direkt gegen den TGF- β gerichtet ist. In vielen Forschungsansätzen wird jedoch versucht, einen wirksamen Inhibitor zu entwickeln. Es gibt Antikörper und kleinmolekulare Inhibitoren, die im Tiermodell gegen strahlungsinduzierte Lungenfibrose vielversprechend sind (Bickelhaupt et al., 2010, Roehrich et al., 2011, Flechsig et al., 2012). Zusätzlich gibt es präklinische und klinische Studien, in denen gegen TGF- β gerichtete Therapien beim Glioblastom eingesetzt werden (Zhang et al., 2011).

1.4.6 Connective Tissue Growth Factor

Der Connective Tissue Growth Factor (CTGF), auch unter dem Namen CCN2 bekannt, gehört zu der Familie der CCN Proteine, von denen sechs Eiweiße identifiziert sind, CCN 1 bis 6 (Chen, Lau, 2008). CTGF ist 1991 als zweites Protein dieser Gruppe entdeckt worden (Bradham, Igarashi, Potter et al., 1991). Die CCNs stellen eine Gruppe von in der Zellmembran lokalisierten Proteinen dar, die Signale von anderen Eiweißen modifizieren und für die Kommunikation zwischen extrazellulärer Matrix und Zelle verantwortlich sind. Dabei regulieren sie Mechanismen wie das Migrationsverhalten, die Zelldifferenzierung und auch die Adhäsion oder Mitogenese, sind aber ebenso für Prozesse der Wundheilung, fibrotische Umbauvorgänge und auch für die Tumorgenese verantwortlich (Chen, Lau, 2008).

Entscheidende Funktionen fallen dem CTGF im Bereich der Zelladhäsion, -proliferation und -migration zu. Außerdem spielt er eine wichtige Rolle bei der Produktion von extrazellulärer Matrix und der Angiogenese. All diese unterschiedlichen Aufgaben sind auf verschiedenen Abschnitten der Proteine lokalisiert. Die CCN Eiweiße bestehen aus vier Domänen:

1. eine „insulin-like growth binding protein“-Domäne
2. eine „Von Willebrand Faktor“-Domäne
3. eine „Thrombospondin Homologie“-Domäne

4. eine „cysteinreiche Heparin-bindende“-Domäne

Diese vier Abschnitte sind für die unterschiedlichen Aufgaben des CTGF entscheidend. Die erste Domäne enthält einen Bindungsrezeptor für den „Insulin like-growth factor“, die zweite zeigt Ähnlichkeiten zu dem „Von Willebrand-Faktor“, während die dritte Domäne über Thrombospondin Typ 1 vor allem die adhäsiven Eigenschaften des CTGF überträgt, wie z. B. die Bindung an das LDL-Protein (Gao, Brigstock, 2003). Der vierte Bereich vermittelt schließlich die Bindung an Heparin (Brigstock, Steffen, Kim et al., 1997).

Zusätzlich haben alle Formen ein N-terminales Sekretions-Signal-Peptid (Chen, Lau, 2008), das für die Ausschleusung der jeweiligen Proteine aus der Zelle verantwortlich ist. Spezifische Bindungsstellen für Integrine sind auf der cysteinreichen Domäne des CTGF identifiziert (Grotendorst, Okochi, Hayashi, 1996).

Ein Teil der Wirkung von TGF- β wird über eine CTGF involvierende Kaskade reguliert. Dazu gehören die Kollagensynthese (Duncan, Frazier, Abramson et al., 1999), die Fibroblastenproliferation (Kothapalli, Frazier, Welply et al., 1997) und die Myofibroblasten-Differenzierung (Grotendorst, Rahmanie, Duncan, 2001). Gleichzeitig ist die Induktion von CTGF jedoch auch von TGF- β abhängig (Brunner, Chinn, Neubauer et al., 1991 und Igarashi, Okochi, Bradham et al., 1993).

In Fibroblasten wird über einen durch TGF- β angetriebenen CTGF Promotor die CTGF Synthese induziert (Allen, Spiteri, 2002 und Kothapalli, Frazier, Welply et al., 1997). Eine Blockade dieser CTGF Synthese hemmt effektiv die Wirkung von TGF- β auf die Fibroblasten (Duncan, Frazier, Abrahamson et al., 1999 und Kothapalli, Frazier, Welply et al., 1997). Eine Down-Regulierung der CTGF-Gen-Expression scheint die Ausbildung einer pulmonalen Fibrose zu verhindern (Ziesche, Hofbauer, Wittmann et al., 1999). Diese Vermutung unterstützten in einer Studie aus dem Jahr 2001 Gauldi, Galt, Anzano et al. in einem Experiment, das zeigte, dass TGF- β bei Mäusen zwar eine pulmonale Fibrose auslöst, bei Mäusen, deren CTGF Gen ausgeschaltet war, die fibrinöse Antwort trotz TGF- β Stimulation aber ausblieb (Gauldi, Galt, Anzano et al., 2001). Bis heute ist TGF- β der einzige bekannte Induktor einer CTGF-mRNA Expression (Igarashi, Okochi, Bradham et al., 1993 und Lasky, Oritz, Tonthat et al., 1998).

CTGF bindet TGF- β über die „Von Willebrand Faktor“ (vWC) Domäne und erhöht so dessen Wirkung (Abreu, Keptura, Reversade et al., 2002). 30% der Gene, die norma-

lerweise durch TGF- β aktiviert werden, können in CTGF-null-oder CTGF-knockdown-Zellen nicht mehr stimuliert werden (Shi-Wen, Stanton, Kennedy et al., 2006). In vivo hat sich gezeigt, dass TGF- β ohne CTGF nicht in der Lage ist, eine ausreichende fibrotische Antwort zu erzielen, so dass allein über TGF- β keine Fibrose entstehen kann (Mori, Kawara, Shinozaki et al., 1999). Somit spielt CTGF als fibroproliferativer Faktor eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Lungenfibrose. Es ist anzunehmen, dass TGF- β zwar die fibrotische Antwort auslöst, aber nur mit CTGF zusammen diese auch aufrechterhalten werden kann.

CTGF wird hauptsächlich von Fibroblasten und bronchialen Epithelzellen gebildet.

Wie in dem Abschnitt 1.4.4 erwähnt, gibt es einen endogenen Mechanismus, der die CTGF Antwort auf TGF- β terminiert. Wenn dieser jedoch unterbrochen oder gehemmt wird, unterbleibt auch die Inhibierung der fibrotischen Antwort (Allen, Spiteri, 2002).

CTGF ist ein potenter Apoptosemediator. 2001 belegten Allen und Spiteri mit einem Antisense-Oligonukleotid die inhibierende Apoptoseeigenschaft von CTGF auf Myofibroblasten und Fibroblasten. Im Gegensatz dazu konnte aber eine induzierende Apoptoseeigenschaft auf alveoläre Epithelzellen nachgewiesen werden (Allen, Spiteri, 2002).

Der CTGF ist in den letzten Jahren mehr und mehr als wichtiger Faktor in der zur Lungenfibrose führenden Signalkaskade des pluripotenten TGF- β in den Mittelpunkt gerückt, kann jedoch für sich genommen den Fibroseprozess nicht unterhalten (Kolb, Margetts et al., 2001).

Aufgrund seiner spezifischen Wirkung scheint CTGF als therapeutisches Ziel besser geeignet zu sein als das TGF- β allein.

1.4.7 CTGF-Antikörper: FG-3019

Beim FG-3019 handelt es sich um einen humanen monoklonalen IgG-Antikörper der Firma FibroGen Inc. (South San Francisco, CA). Dieser Antikörper bindet über ein Epitop (amino acids 142-157) in der Domäne 2 von humanem und Nager CTGF. Das Epitop ist spezifisch für CTGF und tritt bei anderen Proteinen der CCN Familie nicht auf.

Im Pankreas wird die Expression von CTGF in Adenokarzinomen erhöht. In einer Veröffentlichung aus dem Jahre 2006 zeigten Dornhöfer, Spong, Bennewith et al., dass FG-

3019 keinen Einfluss auf die Zellproliferation einer Pankreastumor-Zelllinie in einer in vitro-Monolayer-Kultur hatte, aber in zweidimensionalen Kulturen das anchorage-unabhängige Wachstum zu blockieren vermag. Trotz des ausgebliebenen Effekts in Monolayerkulturen konnte auf Softagar ein verlangsamtes Wachstum und eine verminderte Koloniengröße mit FG-3019 in CTGF exprimierten Zelllinien erzielt werden. Das Verhalten einer Kontrollzelllinie, die kein CTGF produzierte, wurde durch FG-3019 nicht hemmend beeinflusst. Ein zusätzlicher in vivo Versuch an Mäusen zeigte, dass FG-3019 die Wachstumsgeschwindigkeit eines Pankreaskarzinoms deutlich reduzieren konnte, die Metastasierung in die regionalen Lymphknoten inhibierte und die Apoptoserate der tumorös veränderten Zellen erhöhte.

Aikawa, Gunn, Spong et al. zeigten 2006 ähnliche Effekte in in vivo Experimenten auf. Durch FG-3019 verminderten sich in Pankreastumoren das Wachstum und die Metastasierung, gleichzeitig verringerten sich die Tumorangiogenese und die Proliferation der Karzinomzellen. Ein gesteigerter Effekt auf die Apoptoserate konnte hingegen nicht gezeigt werden.

Beide oben genannten Studien belegten, dass die Inhibierung von CTGF in Pankreastumoren einen Effekt auf Zellwachstum und -migration, die Metastasierungsrate und die Angiogenese hat. Der hemmende Effekt auf die Metastasierung war allerdings größer als der auf das direkte Tumorstadium.

Weiterführende Studien ergaben, dass CTGF außerdem in der Lage ist, eine durch Strahlenschäden induzierte Lungenfibrose (siehe Kapitel 1.5) nicht nur in ihrem progressiven Verlauf zu stoppen, sondern das klinische Bild im Sinne einer Reversibilität der Schäden zu beeinflussen (Lipson, Wong, Teng, Spong, 2012).

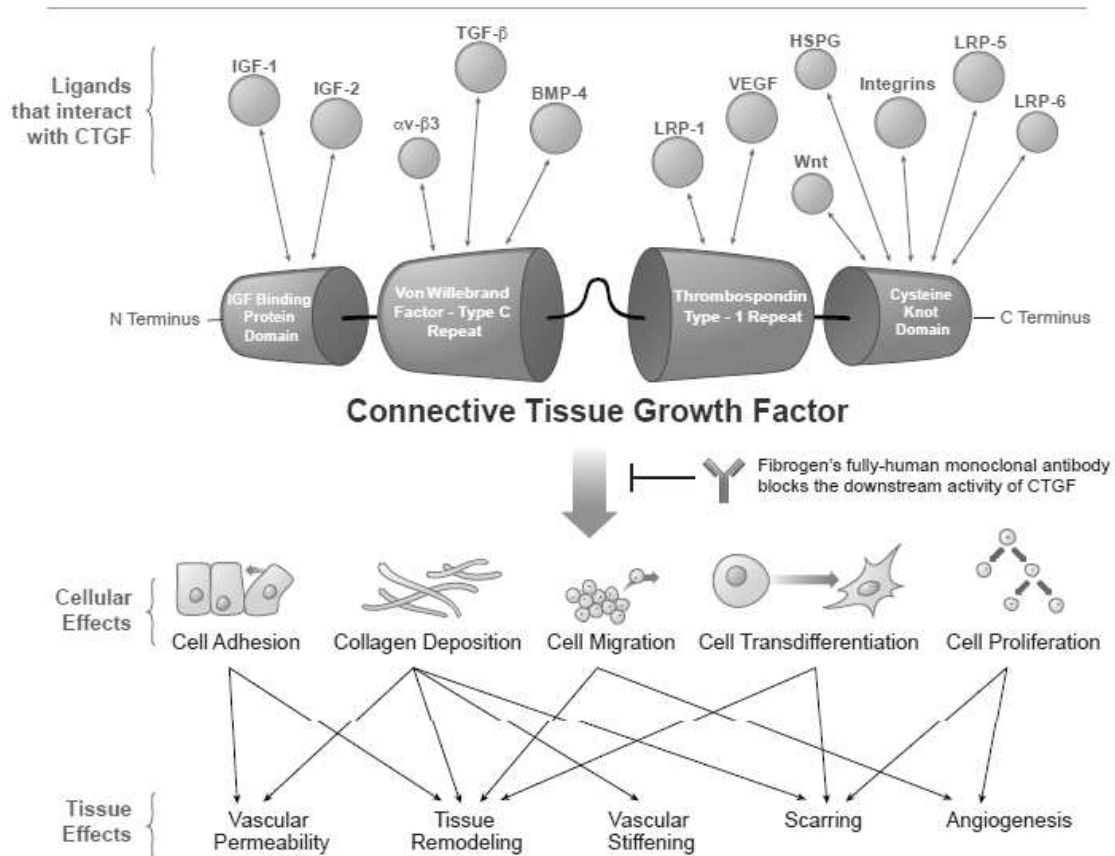


Abbildung 1: Connective Tissue Growth Factor

Dargestellt ist CTGF mit seinen vier Domänen. Oben im Bild sieht man die Liganden die mit CTGF interagieren können und unten die daraus resultierenden möglichen Effekte. Die Auswirkungen auf die Zelle und somit den Organismus sollen durch den monoklonalen Antikörper FG-3019 unterbunden werden. (abgewandelt nach FibroGen Inc. 2010)

1.5 Bestrahlung der Lunge

Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin hat sich die ionisierende Strahlung bei der Behandlung von malignen Neoplasien der Lunge als hochpotent erwiesen und gilt zusammen mit operativen Verfahren sowie einer systemischen Chemotherapie als Therapiemaßnahme der ersten Wahl. Doch es gibt trotz enormer Fortschritte in der Radiotherapie viele unerwünschte Nebenwirkungen im Bereich des Strahlenfeldes. Diese können sich als radiologisch nachweisbare Verdichtung des Lungenfeldes, als Strahlungspneumonitis mit Dyspnoe, Husten und Fieber (Movsat, Raffin, Epstein, 1997) oder als chronische, irreversible Lungenfibrose manifestieren, wobei diese nach

einer Bestrahlung die am häufigsten gestellte klinische Diagnose ist, denn die Lunge ist als Organ hoch radiosensitiv.

Das Auftreten und das Ausmaß der pulmonalen Veränderungen nach Bestrahlung hängen von verschiedenen Risikofaktoren ab. Dies sind zum einen die verabreichte Gesamtstrahlendosis, die Art der Dosenfraktionierung und die Größe und Lokalisation des bestrahlten Lungenvolumens, zum anderen aber auch die Anzahl vorausgegangener Bestrahlungen, eine eventuelle begleitende Chemotherapie oder das Bestehen pulmonaler Vorerkrankungen (Vujaskovic, Marks, Anscher, 2000 und Severin, Greve, Pascher et al., 2006).

Die Veränderungen in der Lunge korrelieren mit der applizierten Strahlendosis und setzen der Behandlung von malignen Neoplasien durch ihre dosislimitierende Struktur somit eine biologische Grenze (Rübe, Uthe, Schmid et al., 2000). Auch in anderen Organen führt ionisierende Strahlung zu fibrosierenden Erkrankungen, die sich in einem Umbau der Gewebsstruktur darstellen, bis das Organ seine physiologische Funktion nicht mehr aufrechterhalten kann und es somit zu Organversagen kommt (Powell, Miffelin, Valentich et al., 1999).

Aufgrund der unerwünschten Strahlungsfolgen können die Erfolg versprechenden Möglichkeiten strahlentherapeutischer Behandlung nicht voll ausgeschöpft werden. Es erscheint umso wichtiger einen Inhibitor der Fibrose vermittelnden Kaskade zu entwickeln (Movsas, Raffin, Epstein, 1997).

1.5.1 Strahlungsinduzierte Lungenfibrose

Strahlungsinduzierte Lungenschäden lassen sich in drei Stadien unterteilen: die akute, die intermediäre und die chronische Phase (Movsas, Raffin, Epstein, 1997).

Die im Bestrahlungsfeld hervorgerufenen Läsionen führen erst nach einer Latenzzeit von einigen Tagen bis hin zu zwei Wochen zu strahlungsinduzierten Veränderungen, da die Lunge zu den Organen mit langsam proliferierendem Gewebe gehört. Während dieser Latenz sind weder histopathologische noch radiologische oder klinische Anzeichen eines Strahlenschadens nachweisbar (Rübe, Uthe, Schmid et al., 2000).

Als subakute Reaktion auf Strahlung entsteht im Lungenparenchym eine Pneumonitis (Movsas, Raffin, Epstein, 1997). Typischerweise treten die klinischen Zeichen wie Husteln, Dyspnoe, subfebrile Temperaturen sowie ein allgemeiner Leistungsverlust vier bis

zwölf Wochen nach dem Ende der Strahlentherapie auf (Herrmann, Knorr, 1995). Hier sind auch histopathologisch Alveolarschäden auszumachen (Travis, Komaki, 1996). Entscheidend für den weiteren Verlauf ist die Reservekapazität der noch gesunden Lungenanteile. Die strahlungsbedingte Pneumonitis kann ausheilen, es ist jedoch nach mehreren Wochen bis Monaten der Übergang in eine irreversible Lungenfibrose möglich, wobei das Ausmaß der Erkrankung wiederum von der verbleibenden gesunden Lungenfunktion abhängt (Höller et al., 2007).

Nach ca. zwei Wochen bis mehreren Monaten zeigen sich hyaline Membranen in den Alveolarwänden mit konsekutiver Verdickung, Schwellung und einer Zerstörung der durch die fibrotischen Veränderungen hyperplastischen und atypischen Pneumozyten. In diesem Stadium sind im Gewebeschnittbild fibrotische Veränderungen der Alveolarsepten zu erkennen. Zusätzlich kommt es zu einem schweren interstitiellen Ödem und zu einer Infiltration durch inflammatorische Zellen, so dass der Gasaustausch innerhalb der Alveolen empfindlich gestört wird. Sowohl parenchymale als auch vaskuläre und entzündliche Faktoren tragen zur Entstehung der strahlenbedingten Lungenfibrose bei. Es ist bekannt, dass Strahlung die Pneumozyten Typ I zerstört und die Typ II-Pneumozyten in ihrer Proliferation hemmt, so dass die alveoläre Membran, die von den Pneumozyten ausgekleidet wird, ihren Schutz verliert (Bentzen, 2006).

Nach zwei bis neun Monaten folgt eine - durch eine Ansammlung von Thrombozyten, Fibrin und Kollagen hervorgerufene - Verlegung der pulmonalen Kapillaren. Fibroblasten infiltrieren die Alveolarwände, die Zellen des Alveolarepithels werden hyperplastisch und interstitiell wird vermehrt Kollagen eingelagert. Dies bedingt insgesamt eine hyperzelluläre Verdickung der Alveolarsepten. Bei sehr milden Strahlenschäden können sich die beschriebenen Umbauprozesse wieder zurückbilden, und die normale Lungenarchitektur wird wieder hergestellt (Ao, Zhao, Davis et al., 2009 und Williams, Johnston, Finkelstein, 2010).

Wenn eine schwere Schädigung des Lungengewebes stattgefunden hat, kommt es zu einem Fortschreiten des fibrotischen Umbauprozesses. Neun bis vierundzwanzig Monate nach der Bestrahlung entwickelt sich dann eine irreversible pulmonale Fibrose, deren Auftreten und Ausprägung unabhängig von einer vorhergegangenen Pneumonitis ist, eine bedeutende Rolle kommt dagegen der extrazellulären Matrix zu (Cook, Brass, Schwartz, 2002). Mit weiterer Progression der Fibrose verdicken sich die Alveolarsepten immer stärker, die Kollagenablagerungen nehmen zu (Rübe, Uthe, Schmid et al.,

2000) und es kommt zur Ausbildung einer pulmonalen Fibrose wie in Kapitel 1.4 „Zelluläre und molekulare Mechanismen der Lungenfibrose“ beschrieben.

1.5.2 Pathogenese der strahlenbedingten Lungenfibrose

Durch die Strahlung kommt es zu einer Schädigung der pulmonalen Zellen, wobei die Alveolarmakrophagen und die Pneumozyten Typ I aufgrund ihrer hohen Mitoserate im Vordergrund stehen. Zellulär setzt der Zytokin vermittelte Fibroseprozess ein, der letztendlich zur manifesten Lungenfibrose führt. Anfangs treten Membranschäden, Schädigung der intrazellulären Strukturen und in der Folge DNS-Einzel- und Doppelstrangbrüche auf, die zu einer veränderten Genexpression führen.

Hinzu kommt, dass eine Bestrahlung in den Vorläuferfibroblasten, die eine Komponente des Stammzellsystems der Fibrozyten darstellen, sofort die Produktion von TGF- β induziert. Auch Makrophagen und alveoläre Epithelzellen erfahren unter der Bestrahlung eine Stimulation der TGF- β -Expression (Ao, Zhao, Davis et al., 2009). Zusätzlich entstehen strahlungsbedingt oxidativer Stress und freie Radikale, die den TGF- β als Schlüsselzytokin in seiner Auswirkung auf den fibrotischen Verlauf verstärken (Tsoutsou, Koukourakis, 2006).

Die Zellen beginnen, autokrine und parakrine Signalmoleküle freizusetzen. Der biologische Mechanismus, der zur physiologischen Gewebeheilung führen soll, wird durch ein pathologisches Überschießen der Freisetzung von Signalmolekülen komplett aus dem Gleichgewicht gebracht. Diese bewirken eine Verschiebung innerhalb des Fibroblasten/Fibrozyten-Stammzellsystems, so dass vermehrt postmitotische Fibrozyten entstehen (Burger, Loffler, Bamberg et al., 1998 und Fournier, Scholz, Weyrather et al., 2001), die wiederum extrazelluläre Matrixproteine und Wachstumsfaktoren herstellen. So entsteht ein Teufelskreis. Signaltransduktionskaskaden führen in den stimulierten Fibroblasten über eine Gentranskription sowohl zu einer vermehrten Freisetzung von Kollagen als auch ebenfalls zu einer überschießenden Produktion von extrazellulärer Matrix. Aufgrund dieser Vorgänge kommt es konsekutiv zu einer Bindegewebszunahme und -verdichtung sowie über ein Gewebe-Remodelling zur irreversiblen Lungenfibrose (Hill, Rodemann, 2001).

Lichtmikroskopisch kann eine zunehmende Fibrosierung des Lungengerüsts erst sechs bis zwölf Monate nach der Bestrahlung nachgewiesen werden. Molekulare Veränderungen wie die vermehrte Expression von mRNA des TGF- β werden aber direkt nach dem Einsetzen der fibrotischen Pathogenese beobachtet (Allen, Spiteri, 2002). TGF- β ist demnach ein wichtiger Schlüsselmediator für die pulmonale Schädigung nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung, der außerdem über die pulmonale Lavage nachweisbar und in seiner Höhe mit der Schwere der Erkrankung und der Prognose des Patienten korreliert.

2 Fragestellung und Motivation

Bis heute ist der Prozess der Entstehung der strahlungsinduzierten Lungenfibrose nicht vollständig geklärt. Das ist ein Grund, weshalb es bislang keine effektive Therapie gibt, die bei der Bestrahlung von Tumoren die Entstehung einer Lungenfibrose verhindern kann. Es ist nachgewiesen, dass die bisher vorrangige klinische Maßnahme - der Einsatz von Corticosteroiden - zwar eine hemmende Wirkung auf die akute Pneumonitis hat, jedoch nicht die Entstehung einer Lungenfibrose verhindern kann. Seit wenigen Jahren gibt es Hinweise, dass connective tissue growth factor (CTGF) eine wichtige Rolle bei der Fibroseentstehung in mehreren Organen spielt und auch bei der Lungenfibrose eine wichtige Rolle einnimmt. Daher erscheint es sinnvoll, Inhibitoren von CTGF auch im Hinblick auf eine mögliche Rolle als Therapeutikum bei Lungenfibrosen zu untersuchen. Aufgrund der großen Bedeutung der Strahlentherapie in der Tumorbehandlung, besonders bei der Bestrahlung von Lungentumoren, hatte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Huber ein *in vivo* Mausmodell untersucht, in dem gezeigt werden konnte, dass ein Antikörper von CTGF (FG-3019) strahleninduzierte Lungenfibrosen attenuieren kann.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des monoklonalen humanen Antikörpers gegen CTGF (FG-3019) *in vitro* allein und in Kombination mit Bestrahlung, auf fibroserrelevante Zellen zu untersuchen, um zelluläre Grundlagen für die beobachtete *in vivo* Wirkung des Antikörpers zu finden.

Um die potenzielle Wirkung und die Wirkweisen von FG-3019 auf Zellniveau zu untersuchen, hatte die Studie im Einzelnen folgende Ziele:

1. Eine systematische funktionelle *in vitro* Analyse der Wirkung eines monoklonalen Antikörpers gegen CTGF auf an fibrotischen Prozessen beteiligte relevante Zellen. Dabei wurde insbesondere die Wechselwirkung mit ionisierender Strahlung und TGF- β berücksichtigt. Für die *in vitro* Analyse wurden klonogene, Proliferations-, Adhäsions- und Migrations-Assays durchgeführt.
2. Als funktioneller Aspekt sollte untersucht werden, inwiefern der monoklonale Antikörper die Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) von an fibrotischen Prozessen beteiligten Zellen beeinflusst. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Aktivie-

zung von Lungenfibroblasten mittels TGF- β zu Myofibroblasten durch FG-3019 gehemmt werden kann.

3. Auf Proteinebene sollten ebenfalls relevante Signalkaskaden in fibroserelevanten Zellen in vitro nach Behandlung mit FG-3019, Bestrahlung, TGF- β allein und in Kombination untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf die EMT.

3 Materialien und Methoden

3.1 Zelllinien

3.1.1 Human Pulmonary Fibroblasts (HPF)

Die humanen Lungenfibroblasten wurden von Firma „PromoCell“ GmbH, Heidelberg, Deutschland, käuflich erworben (Katalognummer C-12360). Sie stammen aus adultem Lungengewebe und sind kurz nach ihrer Gewinnung in Passage 2 tiefgefroren worden. Dazu wurde Cryo-SFM, ein serumfreies Gefriermedium benutzt. Aufbewahrt wurden sie in flüssigem Stickstoff.

3.1.2 Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF)

Die Hautfibroblasten wurden ebenfalls von Firma „PromoCell“ erworben (Katalognummer C-12302). Ihre Handhabung und Kultivierung erfolgte wie die der Lungenfibroblasten.

3.1.3 Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC)

Die humanen dermalen Endothelzellen wurden auch von Firma „PromoCell“ käuflich erworben (Katalognummer C-12215). Sie stammen von einem adulten Spender aus den Hautkapillaren und wurden wie die Fibroblasten in Cryo-SFM tiefgefroren und in Stickstoff aufbewahrt.

3.1.4 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Auch die humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene wurden von Firma „PromoCell“ erworben (Katalognummer C-12203). Die Handhabung und die Kultivierung erfolgten wie die der HDMECs.

3.1.5 Tumorzellen

Als Tumorzellen diente die Zellreihe A549 aus dem „Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ)“, Heidelberg, Deutschland, die ursprünglich aus dem alveolären Epithel eines humanen Lungenkarzinoms stammt.

3.2 Verarbeitung von Zellen

3.2.1 Auftauen und Kultivierung der Zellen

Nach der Entnahme des Zellröhrchens aus dem Stickstofftank taute dies in einem 37 °C warmen Wasserbad unter gleichmäßigem Schwenken auf. Das Röhrchen wurde danach mit Ethanol besprüht, um eine Kontamination zu verhindern. Die weitere Verarbeitung erfolgte in einer Reinraumwerkbank. Unter dem Abzug sind die Zellen dann durch vorsichtiges Pipettieren in den jeweiligen Kulturmedien resuspendiert und danach in die T75-Kulturflaschen eingebracht worden.

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37° C mit 5 % CO₂-angereicherter Luft bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

Die Kultivierung der 500 000 Fibroblasten aus dem Zellröhrchen erfolgte in Falcon T75-Kulturflaschen (Firma „Becton Dickinson GmbH“, Heidelberg, Deutschland) mit 37 °C warmem Fibroblasten Growth Medium 2 (Firma „PromoCell“, Katalognummer C-23120), supplementiert mit dem Supplement Mix (Firma „PromoCell“, Katalognummer C-39325). Als Kulturmedium wurde für die Endothelzellen das „Endothelial Cell Basal Medium MV2 (Firma „PromoCell“, Katalognummer C-22221) benutzt. Die Zusätze „Fetal Calf Serum“ (Firma „PromoCell“, Katalognummer C-37310) 0,05 ml/ml, „humaner Epidermal Growth Factor“ (Firma „PromoCell“, Katalognummer C-30224) 5 ηg/ml, „humaner Basic Fibroblasten Growth Factor“ (Firma „PromoCell“, Katalognummer C-30322) 10 ηg/ml, „Insulin-like Growth Factor“ (Firma „PromoCell“, Katalognummer C-31700) 20 ηg/ml, „humaner Vascular Endothelial Growth Factor 165“ (Firma „PromoCell“, Katalognummer C-30261) 0,5 ηg/ml, „Ascorbinsäure“ (Firma „PromoCell“, Katalognummer C-31750) 1 μg/ml, „Hydrocortison“ (Firma „Pro-

moCell“, Katalognummer C-31063) 0,2 µg/ml und 100 mg/ml „Genticidin“ (Firma „PAA Laboratories GmbH“, Cölbe, Deutschland) sind den jeweiligen Zellkulturen zugesetzt worden.

Die Kultivierung der A549 erfolgte in „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“, DMEM, (Firma „Cambrex“, Verviers, Niederlande), supplementiert mit 10 % „Fetal Calf Serum“ (Firma „Biochrom“, Cambridge, UK). Alle drei bis vier Tage erhielten die Zellpopulationen ein frisches Nährmedium.

3.2.2 Subkultivierung von Zellen

Nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers wurde das Medium vorsichtig abgenommen und verworfen. Danach wurden die Zellen mit 3-5 ml HEPES-BSS über einen Zeitraum von 15 bis 30 Sekunden gewaschen. Die Zugabe von 0,1% Trypsin in PBS (Firma „Roche“, Basel, Schweiz) und 0,05% EDTA in PBS (Firma „Merck“, Darmstadt, Deutschland) führte zu einer Ablösung der Zellen. Dieses Verfahren erfolgte bei allen Zellen - außer den Lungenfibroblasten - im Brutschrank. Die HPF wurden bei Raumtemperatur gelöst, um eine Schädigung der Zellen durch das Trypsin/EDTA zu vermeiden.

Nach einer Einwirkzeit von einer Minute lösten sich die Zellverbände durch leichtes Klopfen („shake off“) gegen die Kulturflasche. Der Erfolg dieser Maßnahme wurde mikroskopisch überprüft. Bei noch nicht abgelösten Zellen verlängerte sich die Einwirkzeit Schritt für Schritt auf maximal drei Minuten.

Eine spezifische Trypsin-neutralisierende-Lösung (TNS) (Firma „Cambrex IEP“, Wiesbaden, Deutschland) verhinderte in einer Menge von 3-5 ml Zellschädigungen durch das Enzym.

Danach wurden die Zellen mit 10 ml des jeweiligen unter 3.1 angegebenen Mediums aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen und die Zellen erneut mit 10 ml frischem Medium aufgefüllt.

Die Zellen wurden dann in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und danach auf neue T75-Kulturflaschen in einer Menge von 100 000 Zellen pro Flasche gegeben.

3.2.3 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer

Um die Zellen zählen zu können, wurde die nach 3.2.1 hergestellte Zellsuspension durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,55 mm in eine Spritze aufgezogen. Dadurch trennten sich die Zellen voneinander und es konnte eine aussagekräftige Zählung durchgeführt werden. Der passende Durchmesser der Kanüle wurde durch mehrere Vorversuche bestimmt. Bei kleineren Kanülen wurden die Zellen teilweise zerstört, bei größeren dagegen erwies sich die Auflösung der Zellverbände als schwierig, so dass das Auszählen der Zellen nicht nur problematisch war, sondern auch falsche Werte ergab.

10 µl der Zellsuspension wurden anschließend in die Neubauer-Zählkammer eingegeben und die Zelldichte lichtmikroskopisch bestimmt.

Hierbei galt: $\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl aus 4 Großquadraten} \times \text{Verdünnungswert} \times \text{Kammerkonstante}$.

Die Zellen wurden dann in einer Konzentration von 1000 Zellen/ml weiter kultiviert.

3.3 Zusätze

3.3.1 FG-3019

FG-3019 ist ein humaner monoklonaler IgG-Antikörper von Firma „FibroGen Inc.“, South San Francisco, CA, USA, der gegen den Connective Tissue Growth Factor gerichtet ist.

3.3.2 TGF-β

Es ist bekannt, dass TGF-β nach Strahlung von den produzierenden Zellen hochreguliert wird und unter anderem so zur Ausbildung einer Lungenfibrose führt. Da jedoch nicht alle Zellen in der in-vitro Kultur aktives TGF-β produzieren können, in-vivo aber sehr wohl auf TGF-β, das von anderen Zellen produziert wird, reagieren, ist es nötig TGF-β zuzugeben, um einen vollständigen Strahleneffekt zu erhalten.

Zusätzlich wurden, durch das Ersetzen der Strahlung durch TGF- β , in einem Teil der Versuche Strahlenschäden verhindert, die nicht durch TGF- β verursacht werden, z. B. DNA-Brüche, die jegliche weitere Untersuchungen an der in-vitro-Zellkultur unmöglich machen. Es ist jeweils so viel TGF- β (Firma „R&D Systems“, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben worden, dass eine Endkonzentration von 10 ng/ml erreicht wurde.

3.4 Bestrahlung

Um einen strahlungsinduzierten Zellschaden herbeizuführen, wurden die Zellen mit Hilfe eines Linearbeschleunigers (Firma Siemens Artiste (Prototyp), Seriennummer 4333), mit Photonen bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte zwei Stunden nach der Subkultivierung in T25-Kulturflaschen jeweils mit 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 10 Gy. Dies wurde bei den Klonogenen Assays durchgeführt. Wie unter 3.3.2 beschrieben, ersetzte TGF- β in den anderen Versuchsreihen die Bestrahlung.

3.5 Zellversuche

3.5.1 Klonogenes Assay

Um die Fähigkeit der Zellen zur Kolonienbildung zu untersuchen, wurde eine Zellsuspension - wie in Abschnitt 3.2.1 „Subkultivierung“ beschrieben - hergestellt. Nach der Zellzählung wurden 5000 Zellen in T25-Kulturflaschen gegeben, die mit 5 ml Medium gefüllt waren. Nach zwei Stunden kamen die unter 3.3 genannten Zusätze hinzu. Die Bestrahlung erfolgte zwei Stunden nach der Behandlung mit den Zusätzen. Die Kontrollgruppe wurde weder mit Zusätzen behandelt noch bestrahlt.

Die Flaschen wurden zur Inkubation wieder in den Brutschrank gestellt, bis in den Kontrollflaschen Kolonien gewachsen sind. Hierbei galt, dass eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen bestehen musste.

Dieser Prozess dauerte ca. 7 bis 14 Tage. Das Nährmedium wurde dann abpipettiert und die T25-Kulturflaschen zum Trocknen aufgestellt. Danach wurde eine Zellfärbung mit

Kristallviolett 25 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Färbelösung wurde abgegossen, die T25-Kulturflaschen mit Wasser ausgespült und danach wieder zum Trocknen aufgestellt. Nach der Anfärbung mit Kristallviolett konnten die Kolonien ausgezählt werden.

3.5.2 Proliferations-Assay

Um das proliferative Wachstum der Zellen zu untersuchen, enthielten die T25-Kulturflaschen 5 ml Medium mit 500 000 Zellen. 24 Stunden später wurde dann FG-3019 in einer Dosierung von 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml dazu gegeben, die Kontrollgruppe wurde nicht mit FG-3019 behandelt. Am Tag 5 wurden die Zellen nach dem in Abschnitt 3.2.2 „Subkultivierung“ beschriebenen Verfahren gelöst. Die Suspension wurde danach in Röhrchen gegeben. Nach dem Zentrifugieren konnte die Anzahl der Zellen - wie in Abschnitt 3.2.3 „Zellzählung“ beschrieben - ausgewertet werden.

3.5.3 Bestimmung der Vitalität

Um die Überlebensrate der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen erst einmal wie für das Proliferations-Assay verarbeitet. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt.

Der Farbstoff Trypanblau färbt tote Zellen an, wogegen er - mit wenigen Ausnahmen - nicht in das Zellinnere von lebenden Zellen dringen kann. Um die Vitalität zu bestimmen, wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau angefärbt. 10µl der Mischung wurden dann in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Die gefärbten und somit toten Zellen wurden gesondert ausgezählt und in ein Verhältnis zu den ausgezählten ungefärbten, somit vitalen Zellen, gesetzt.

3.5.4 Adhäsions-Assay

Das Adhäsionsverhalten der Zellen wurde untersucht, indem T25-Kulturflaschen mit 5 ml Medium befüllt wurden, zu dem dann pro Kulturflasche 100000 Zellen/ml gegeben wurden. 24 Stunden später wurde FG-3019 in einer Dosierung von 30 µg/ml und 100 µg/ml addiert. Die Kontrollgruppe wurde nicht mit FG-3019 behandelt. Am Tag 5 wurden die Zellen, ohne sie vorher mit Trypsin/EDTA anzulösen, nur über manuellen „shake off“, durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche, gelöst. Somit lösten sich nur die Zellen, die keine feste Adhäsion zum Boden hatten. Die in den T25-Kulturflaschen verbliebenen Zellen wurden angefärbt und dann - wie in Abschnitt 3.2.3 „Zellzählung“ beschrieben - ausgezählt. Die gelösten Zellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer gezählt. Zuletzt wurde das Verhältnis zwischen den abgelösten und den festsitzenden Zellen bestimmt.

3.5.5 Migrations-Assay

Um die Migrationsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurden Transmigrationsexperimente mit einem System aus einzelnen Inserts mit einer Polyethylenterephthalat (PET) Kapillarporenmembran in 24-Well Platten durchgeführt. Ab dem Zeitpunkt, an dem die Zellen in die Inserts gegeben und diese in den Brutschrank gestellt wurden, wurde die Migrationszeit gemessen. Für HDMEC, HUVEC und A549 war bereits etabliert, dass sich mit einer Migrationszeit von 12 h eine als Kontrolle geeignete Migrationsaktivität erzielen lässt.

Der Porendurchmesser der Inserts betrug 8 µm. Die folgende Abbildung 2 veranschaulicht das angewandte Verfahren.



Abbildung 2: Arbeitsschritte des PromoCell Transmigration Kit

1. In die untere Kammer wird Nährmedium gegeben, in die obere Kammer die Zellen.
2. Die Zellen heften sich an die Membran der Inserts.
3. Die Zellen wandern in die untere Kammer durch die Membranporen.
4. Nach der Migration haften die Zellen an der Unterseite der Membran und können ausgewertet werden.
(aus: PromoCell; Transmigration Kit)

3.5.5.1 Vorbereitung der Zellen

0,1 g BSA, in 100 ml Endothelial Cell Basal Medium MV2 gegeben, stellte ein serumfreies Hungermedium dar. Das Nährmedium wurde von den Zellen abgenommen und stattdessen 10 ml Hungermedium in die Flaschen gegeben.

12 Stunden später wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.2.1 „Subkultivierung“ beschrieben, aufbereitet. Anschließend wurden sie - nach dem Zentrifugieren in 0,1 % BSA Hungermedium - resuspendiert und mit dem Hemocytometer gezählt. Danach wurden je 200 000 Zellen auf 2 ml Hungermedium pro Röhrchen verteilt. Zu dieser Suspension wurde direkt der Antikörper FG-3019 zugegeben in einer Dosierung von 30 µg/ml. Die Kontrollgruppe wurde nicht mit FG-3019 behandelt. Nach einer Inkubation von zwei Stunden im Brutschrank wurde eine Versuchsgruppe direkt weiterverarbeitet wie unter 3.5.5.2 beschrieben, die andere Versuchsgruppe wurde mit TGF-β (Konzentration 5 µg/ml) behandelt.

3.5.5.2 Migrationsexperiment

Die einzelnen Wells der Zellkulturschalen erhielten als Zusatz 750 µl Nährmedium. Nach einer Resuspension der abgesetzten Zellen der wie unter 3.5.5.1 beschrieben hergestellten Zellsuspension wurden 500 µl der Zellsuspension in die Inserts pipettiert und diese wiederum in die Wells eingebracht. Die Platten kamen dann geschlossen für 12 bis 15 Stunden in den Brutschrank. Ab dem Einbringen der Zellen in die Inserts wurde die Migrationszeit gemessen.

3.5.5.3 Färbung

Nach der Entnahme der Platten aus dem Brutschrank wurde der obere Teil der Transmigrationsmembran mit einem weichen Tuch von nicht migrierten Zellen und Flüssigkeit befreit und die Membranen danach bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Um eine Beschädigung der migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran zu vermeiden, wurde auch die Diff-Quick-Färbung in einer 24-well Platte durchgeführt.

In jedem Schritt der Diff-Quick-Färbung (Firma „Medion Diagnostics AG“, Düdingen, Schweiz) wurden die Zellen 30 Sekunden inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Inserts mit destilliertem Wasser ausgewaschen.

Zuerst erfolgte eine Fixierung der Zellen in der Fixierlösung (Methanol und Methylblau). Danach wurde die Färbung durchgeführt, erst mit der Farblösung I (Phosphatpuffer, Eosin und Detergentien) dann mit der Farblösung II (Phosphatpuffer und Azur). Nach dem Auswaschen wurden eventuelle Farbreste auf der Oberseite der Membran mit einem weichen Tuch entfernt und die Inserts bei Raumtemperatur getrocknet.

Um ein Vermischen der Zellen zu verhindern, fand immer nur die Färbung einer Zelllinie statt.

3.5.5.4 Auswertung

Danach wurden die Membranen vorsichtig mit einem Skalpell randständig aus den Inserts ausgeschnitten. Die Membranen wurden kopfüber mit etwas Öl auf einen Objektträger gelegt. Mit einem Deckgläschen darüber konnten die Membranen dann mikroskopiert (Nikson Eclipse E600 Mikroskop) und mit einer ColorCube III Microscope Camera (Olympus) unter Vergrößerung (4x und 10x) fotografiert werden. Die Auszählung erfolgte anhand der Zellkerne manuell.

3.6 Statistische Analyse

Die P-Werte aller Messungen wurden mit dem T-Test für ungepaarte Werte mit dem Programm SPSS 11.0 errechnet. Die Graphen wurden mit dem Programm Sigma Plot 12 erstellt.

Die statistische Beratung erfolgte durch die Abteilung „Biostatistik am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ)“ im Rahmen einer generellen Zusammenarbeit mit der Abteilung „Klinische Kooperationsseinheit Molekulare Radioonkologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Huber.

3.7 Proteinbiochemische Methoden und morphologische Veränderungen

Um die in den Zellen enthaltenen Proteine, die auf EMT hinweisen, zu bestimmen, kam das Verfahren einer Proteinisolierung zum Einsatz. Zusätzlich wurden die Zellen in den Kulturen auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Das Wachstum der Zellen wurde ebenfalls untersucht.

3.7.1 Behandlung der Zellen

HPF und A549 wurden in T75-Kulturflaschen kultiviert. 24 Stunden vor der Behandlung mit Zytokinen und Antikörpern ersetzte 0,1 % BSA-Medium das Nährmedium. Neben den Kontrollgruppen gab es jeweils eine TGF- β -Behandlung mit 5 ng/ml, eine mit FG-3019 30 μ g/ml behandelte Gruppe und eine Gruppe, die sowohl mit TGF- β als auch mit FG-3019 behandelt wurde. Die Kultivierung erfolgte über eine Dauer von 24, 48, 72 und 96 Stunden.

3.7.2 Morphologische Veränderung

Im Jahre 2005 wiesen Kasai, Allen, Mason, Kamimura und Zhang EMT bei A549 Zellen in einer ähnlichen Versuchsreihe nach. Um zu klären, ob das auch bei HPF der Fall ist, wurden die Zellen alle 24 Stunden mikroskopisch betrachtet und zufällig ausgewähl-

te Areale photographiert. Dadurch konnte das Wachstum, der Zell-zu-Zell-Kontakt und eventuell auftretende andere morphologische Veränderungen beurteilt werden.

Sobald morphologische Veränderungen zu sehen waren, wurde die Proteinisolierung begonnen.

3.7.3 Proteinisolierung

Nach der Abnahme des Mediums erfolgte die Waschung der Zellen mit PBS (Firma „Affymetrix“, Santa Clara, CA, USA, Katalognummer 10848125MG). Die Zellfraktionierung wurde mit dem Qproteom Mammalian Protein Prep Kit (Firma „Qiagen“, Deutschland) durchgeführt. Der Puffer beinhaltete Benzoase, ein Enzym, das die DNS zerstört, und einen Proteinaseinhibitor, der die freigesetzten Proteine vor der Weiterverdauung schützt. Ein Proteaseinhibitor (Firma „Roche“, Basel, Schweiz) und ein Phosphataseinhibitor-Cocktail (Firma „Sigma“, Seelze, Deutschland) aus Phosphataseinhibitor I und II ergänzte das Pufferkit.

Nach der Inkubation der Zellen mit 300 µl des Lysepuffers für wenige Sekunden und der folgenden Abschabung entstand eine Zelltrümmerlösung, die für 7 Minuten im Ultraschallbad behandelt wurde, um die Lyse zu verstärken. Danach erfolgte für 10 Minuten eine Zentrifugation bei 4 °C. So konnte der proteinhaltige Überstand gewonnen werden. Diese Proteinlösungen wurden danach bei -18°C aufbewahrt.

3.7.4 Western Blot

Um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine Tris-HEPES-SDS Polyacrylamidgelelektrophorese in einem 12%igen Precise Protein Gel (Firma „Thermo Scientific“, Karlsruhe, Deutschland, Katalognummer 25242) durchgeführt. Die Proteinmengen der Extrakte wurden mit der Bradford-Methode, einer photometrischen Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen, bestimmt. Dazu wurde das Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Firma „Bio Rad“, München, Deutschland, Katalognummer 500-0007) genutzt und anschließend mit β -Actin-Antikörper (1:1000) (Firma „Cell Signaling Technology“, Danvers, MA, USA, Katalognummer 4967) im

Blot konfirmiert. β -Actin ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, welches als Parameter für die gleiche Proteinmenge gilt. Davon ausgehend, dass β -Actin in jeder Zelle in der gleichen Konzentration vorkommt, konnte damit bewiesen werden, dass effektiv immer die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde. Damit wurde sichergestellt, dass Unterschiede in den Stärken der Banden nicht von unterschiedlichen Konzentrationen herrührten.

Die Menge, die auf das Gel geladen wurde, betrug beim Kollagen IV 2,5 μg , bei α -SMA und CTGF 5 μg .

Nach Auftrennung der Proteine im Acrylamidgel wurden diese im Western Blot Verfahren nach der Anleitung des Western Immunoblotting Protokolls (Firma „Cell Signaling Technology“, Danvers, MA, USA, Katalognummer 7071) auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Um den Proteintransfer zu überprüfen, wurde dann eine Schnellfärbung mit Ponceau S (Firma „Sigma Diagnostics“, Taufkirchen bei München, Deutschland, Katalognummer P7170), einem anionischen, hydrophilen Diazofarbstoff, durchgeführt. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran eine Stunde mit 5% Magermilchpulver in TBS mit 1% Tween proteingesättigt um den Blot zu blockieren. Das bedeutet, dass alle noch möglichen freien Bindekapazitäten gesättigt wurden und somit unspezifische Bindungen der Antikörper verhindert wurden. Zur Vermeidung eines unspezifischen Hintergrundes ist den Antikörperlösungen 5% BSA zugefügt, um somit eine kontrastreichere Darstellung zu erhalten. Um die gewünschten Zielproteine zu markieren, wurden die Blots über Nacht mit dem Erstantikörper (1:1000) auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Nach Abnahme des Erstantikörpers und anschließendem Waschen mit TBS mit 1% Tween, erfolgte die Zugabe des Zweitantikörpers in einer Verdünnung von 1:2000, an den über einen Linker das Enzym Meerrettichperoxidase (HrP) gebunden war. Nach zwei Stunden Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wurden die Blots wieder mit TBS mit 1% Tween gewaschen. Dann wurde eine Lösung hergestellt aus 0,5 ml LumiGLO (Firma „Cell Signaling Technology“, Danvers, MA, USA, Katalognummer 7003), 9 ml Wasser und 0,5 ml einer Peroxid- und Chemolumineszenz-haltigen Lösung (Firma „Cell Signaling Technology“, Danvers, MA, USA). Das System wurde mit der Lösung benetzt und der Blot durch die Peroxid- und Chemolumineszenz-haltige Lösung entwickelt.

Die HrP am Zweitantikörper setzte das Peroxid um. Das dadurch entstehende Sauerstoffradikal aktivierte die Chemolumineszenz und brachte sie dadurch zum Leuchten. Dadurch konnte der Blot auf einem Röntgenfilm („Amersham Hyperfilm ECL“, Firma „GE Healthcare Life Sciences“, Freiburg, Deutschland, Katalognummer 28-9068-36) dargestellt werden. Dieser wurde je nach Intensität des Signals bis zu 50 Sekunden inkubiert und dann entwickelt.

3.7.5 Antikörper

Es wurden FG-3019 (1:500) (Firma „FibroGen Inc.“, siehe Abschnitt 3.3.1), ein α -SMA Antikörper (1:500) (Firma „Abcam“, Cambridge, UK, Katalognummer AB-5694) in einer 0,02%igen Natriumazid Lösung und ein Kollagen IV Antikörper (1:5000) in einer 0,01%igen Natriumazid Lösung (Firma „Abcam“, Katalognummer AB-6586) verwendet.

4 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Auswirkungen des Antikörpers FG-3019 mit und ohne zusätzliche Bestrahlung durch Photonen in unterschiedlicher Dosis auf das Wachstumsverhalten, die Vitalität, die Adhäsion und die Zellmorphologie von menschlichen Fibroblasten, Endothelzellen und Lungenkarzinomzellen dargestellt.

4.1 Auswirkung von FG-3019 auf das Wachstumsverhalten der Zellen

Es werden die Auswirkungen von FG-3019 auf das Wachstumsverhalten der genannten Zelllinien sowohl im klonogenen Assay als auch im Proliferations-Assay dargestellt.

4.1.1 Auswirkung von FG-3019 im klonogenen Assay

Für die Untersuchung der Wirkung von FG-3019 auf das klonogene Wachstum wurden die verschiedenen Zelllinien mit FG-3019 in verschiedenen Dosen behandelt und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

4.1.1.1 FG-3019 hemmt das klonogene Überleben von HPF

In einer ersten Versuchsreihe wurde das klonogene Überleben unbehandelter HPF-Zellen mit Zellen verglichen, die mit FG-3019 in steigender Dosierung (von 0,1 µg/ml FG-3019 bis 100 µg/ml FG-3019) behandelt waren. Die Versuchsansätze wurden über sieben und zehn Tage durchgeführt.

Es zeigte sich insgesamt eine moderate Reduktion des klonogenen Überlebens durch die Behandlung mit FG-3019. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (100 +/- 6,59 %) wurde die relative Anzahl der klonogenen Einheiten durch die Be-

handlung mit FG-3019 auf folgende Werte gesenkt: Nach Behandlung mit FG-3019 in einer Dosis von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ reduzierte sich die Anzahl der klonogenen Einheiten auf 97,83 \pm 5,88 % (p-Wert = 0,692); nach einer Dosis von 1 $\mu\text{g/ml}$ auf 90,22 \pm 10,48 % (p-Wert = 0,144); nach einer Dosis von 5 $\mu\text{g/ml}$ auf 86,42 \pm 5,49 % (p-Wert = 0,031); nach einer Dosis von 10 $\mu\text{g/ml}$ auf 86,01 \pm 5,38 % (p-Wert = 0,027); nach einer Dosis von 20 $\mu\text{g/ml}$ auf 86,96 \pm 5,24 % (p-Wert = 0,041); nach einer Dosis von 30 $\mu\text{g/ml}$ auf 82,75 \pm 5,47 % (p-Wert = 0,014); nach einer Dosis von 70 $\mu\text{g/ml}$ auf 81,11 \pm 10,86 % (p-Wert = 0,029); und nach einer Dosis von 100 $\mu\text{g/ml}$ auf 79,89 \pm 9,06 %. (p-Wert = 0,036).

Statistisch signifikante Unterschiede (p-Wert < 0,05) konnten also ab einer Dosis von 5 $\mu\text{g/ml}$ erzielt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

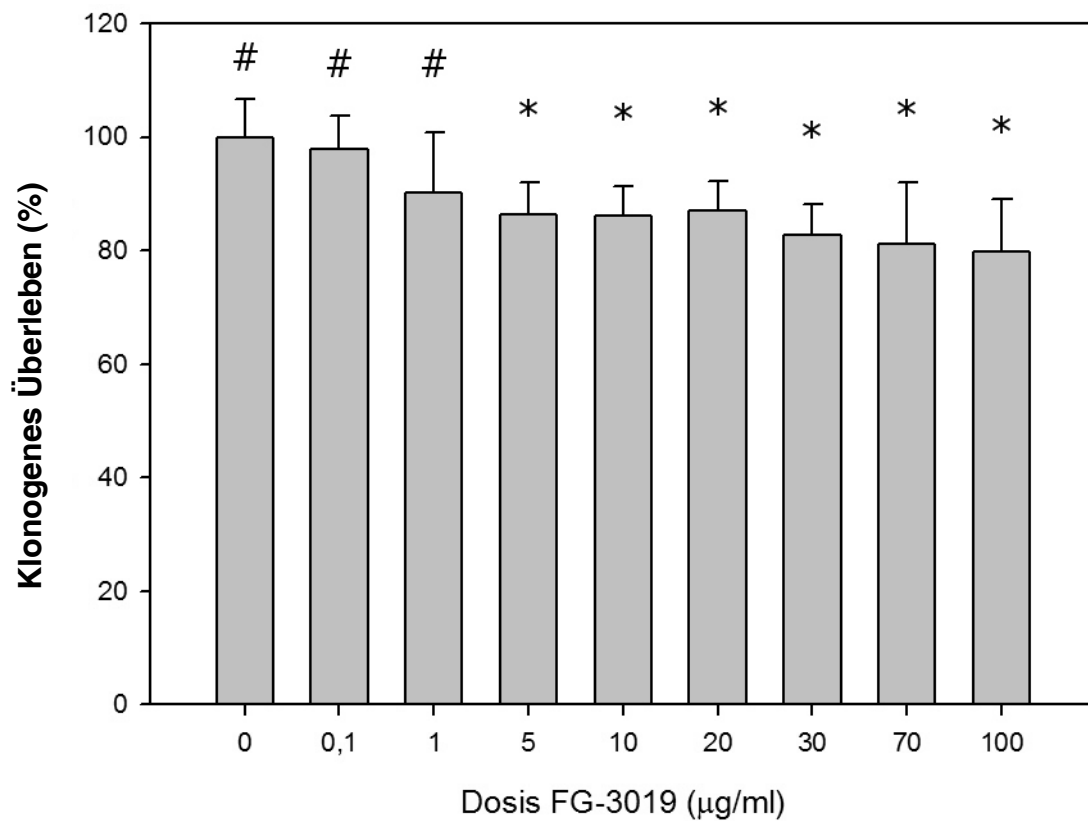


Abbildung 3: HPF im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 10 Tagen

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach 10 Tagen von HPF Passage 3 anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 ($\mu\text{g/ml}$) behandelten Gruppen aufgetragen; auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonienzahl in Prozent \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

Um kurzfristige Effekte der Behandlung mit FG-3019 zu evaluieren, wurde eine zweite Versuchsreihe mit einer Kontrollgruppe und zwei unterschiedlichen FG-3019 Dosierungen (30 und 100 $\mu\text{g/ml}$) durchgeführt. Die Anzahl der Kolonien wurde hierbei bereits nach sieben Tagen ausgezählt.

Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Versuchsansätzen. Es konnte ein auf 93,75 \pm 16,77 % (p-Wert 0,485) für 30 $\mu\text{g/ml}$ und ein auf 88,28 \pm 13,72 % (p-Wert 0,157) für 100 $\mu\text{g/ml}$ reduzierter Mittelwert im Vergleich zur Kontrollgruppe (100 \pm 12,81 %) beobachtet werden. Somit kann auch nach einer Zeitspanne von sieben Tagen ein hemmender Effekt von FG-3019 auf das klonogene Wachstum beobachtet werden, ohne dass die Unterschiede jedoch statistisch signifikant wären. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 grafisch dargestellt.

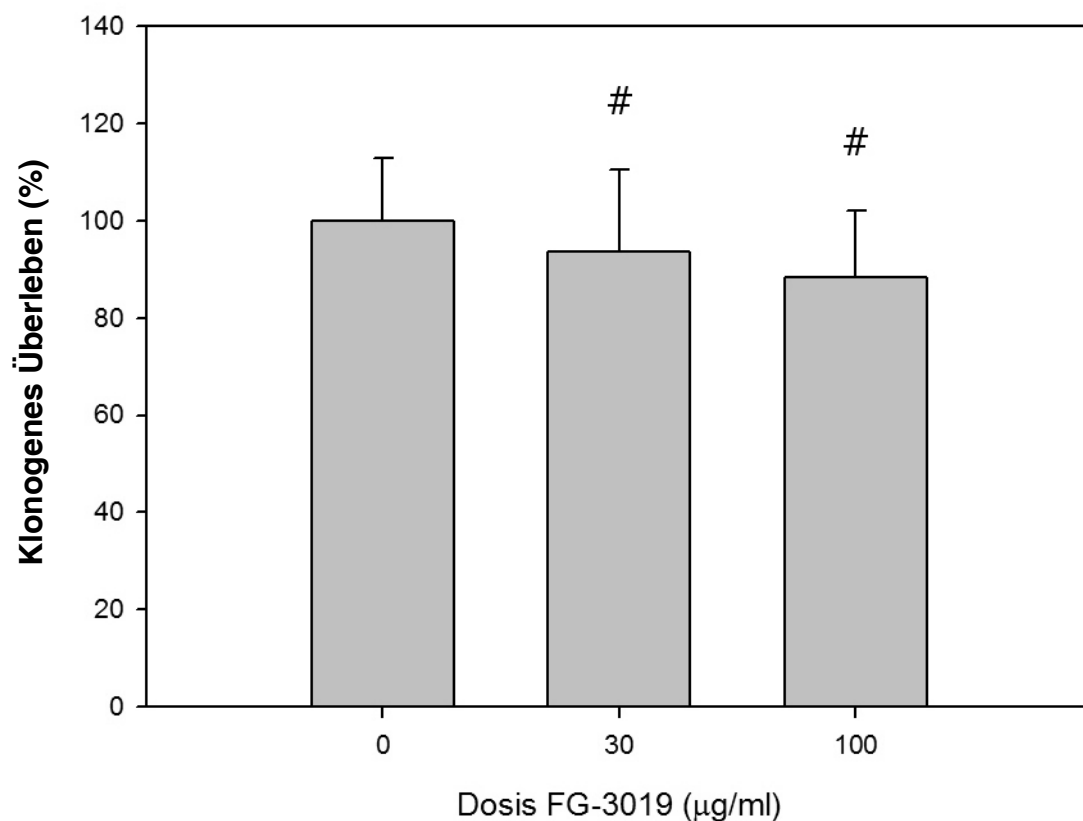


Abbildung 4: HPF im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 7 Tagen

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach 7 Tagen von HPF Passage 5 anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 ($\mu\text{g/ml}$) behandelten Gruppen aufgetragen; auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonienzahl in Prozent \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert $<$ 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.1.1.2 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben von NHDF

Auch mit NHDF wurden zwei Versuchsreihen mit steigender Dosierung (von 0,1 µg/ml bis 100 µg/ml) von FG-3019 über sieben und zehn Tage zur Abschätzung kurzfristiger Effekte durchgeführt. Für beide Beobachtungszeiträume blieb die Behandlung mit FG-3019 ohne Effekt auf das klonogene Überleben. Abbildung 5 und 6 stellen die Ergebnisse dar.

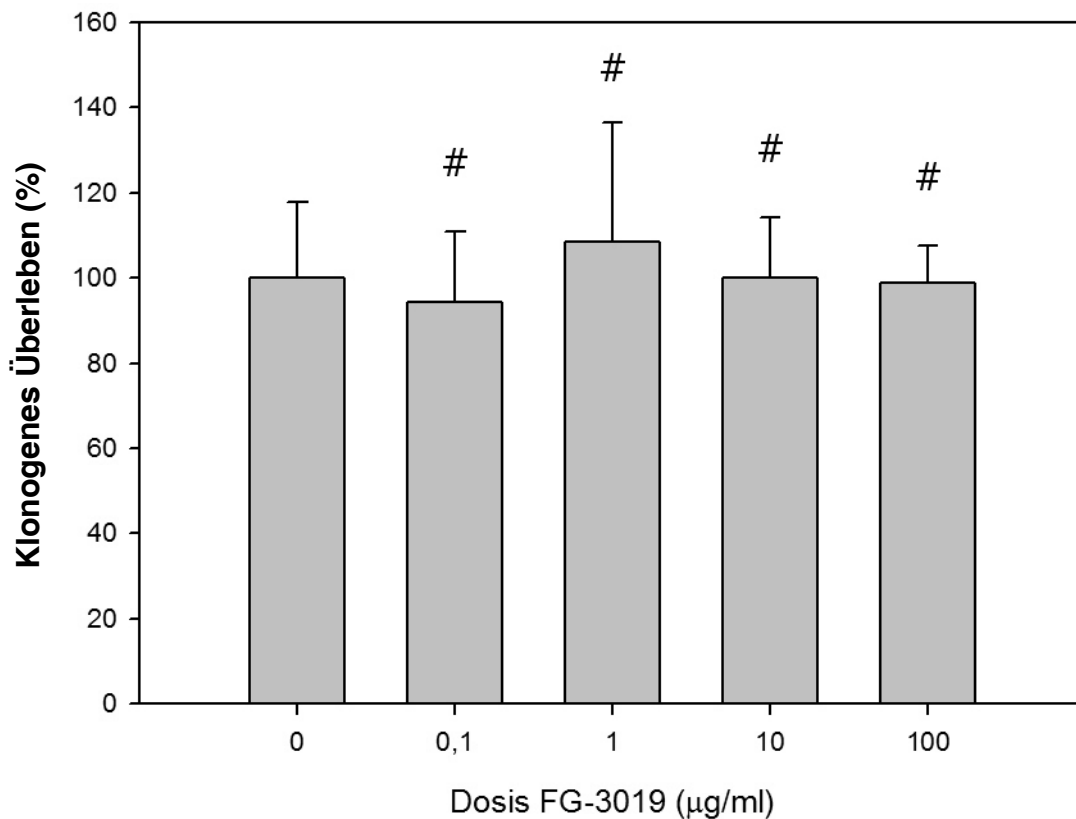


Abbildung 5: NHDF im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 7 Tagen

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach 7 Tagen von NHDF Passage 4 anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 (µg/ml) behandelten Gruppen aufgetragen; auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonienzahl in Prozent +/- Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

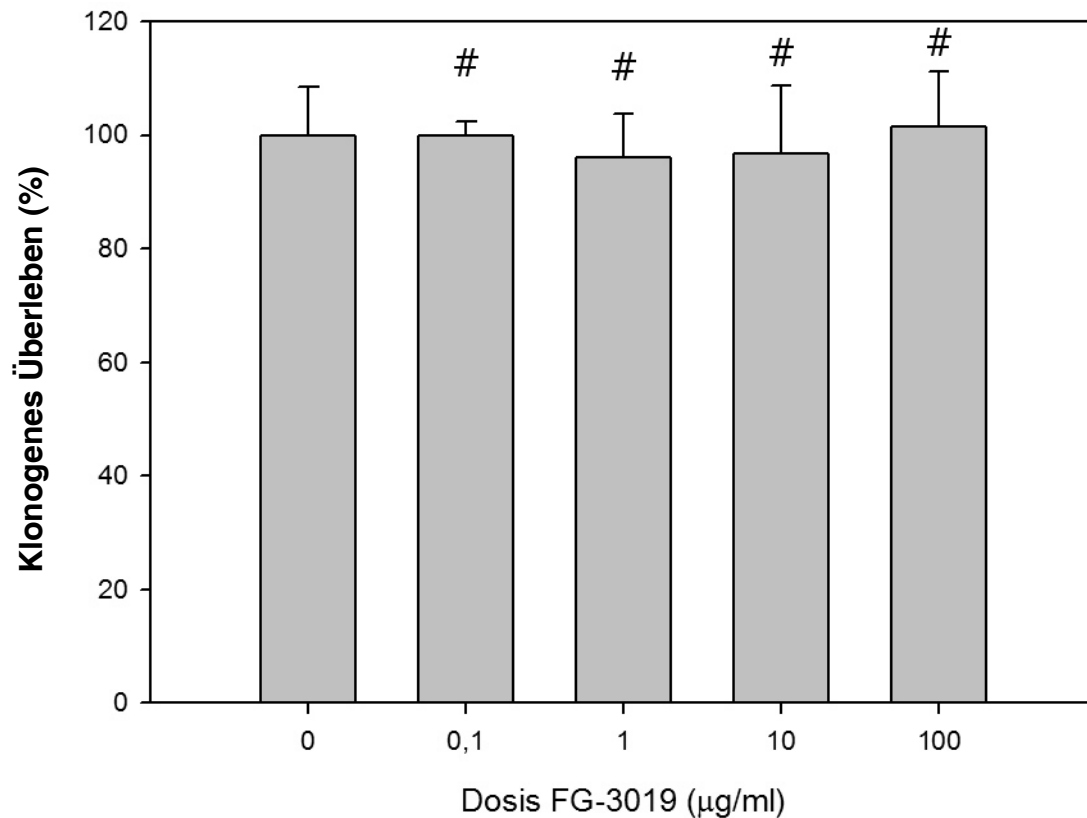


Abbildung 6: NHDF im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 10 Tagen

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach 10 Tagen von NHDF Passage 4 anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 ($\mu\text{g/ml}$) behandelten Gruppen aufgetragen; auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonienzahl in Prozent \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.1.1.3 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben von HDMEC und HUVEC

Sowohl für HDMEC als auch für HUVEC zeigten sich im klonogenen Assay keine Effekte in Bezug auf die Anzahl der gebildeten Kolonien durch die Behandlung mit FG-3019. Die beiden Zellreihen wurden mit FG-3019 in einer Dosis von jeweils 0,1 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ behandelt und die Anzahl der klonogenen Einheiten nach 7 bzw. 5 Tagen ermittelt.

Die Ergebnisse der 4 Versuchsansätze sind in den Abbildungen 7 bis 10 dargestellt.

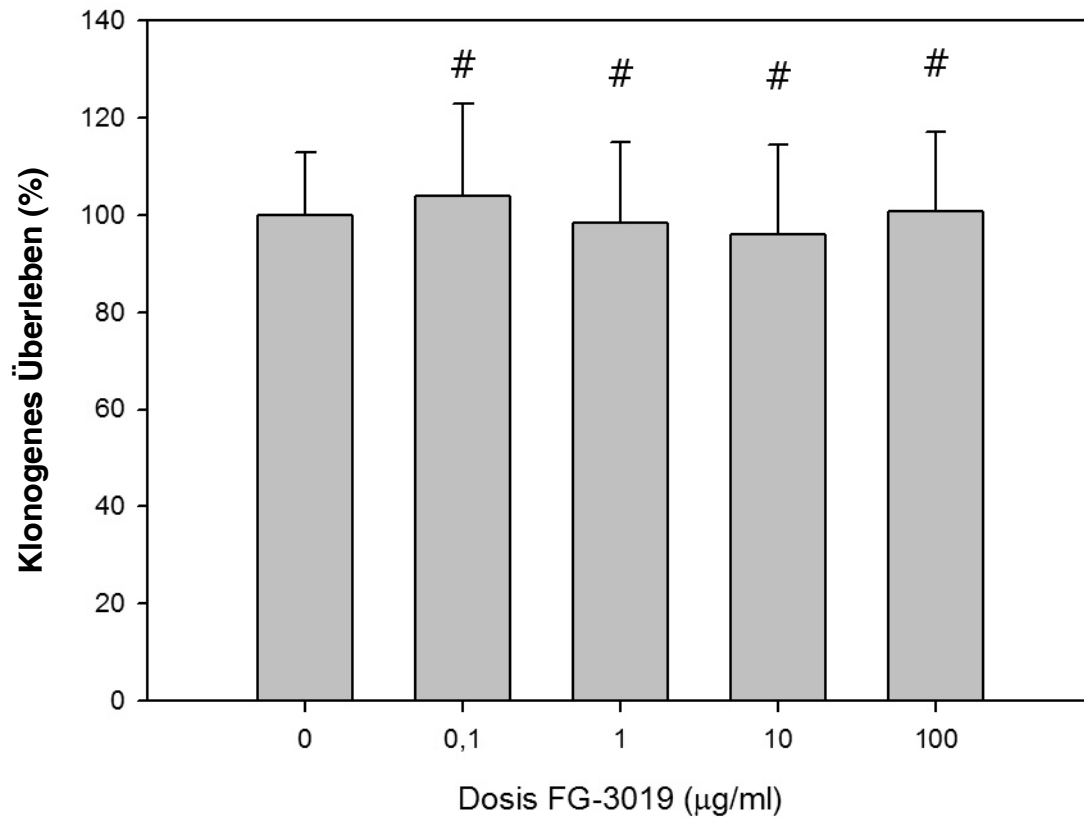


Abbildung 7: HDMEC im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 5 Tagen

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach 5 Tagen von HDMEC Passage 6 anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 (µg/ml) behandelten Gruppen aufgetragen; auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonienzahl in Prozent +/- Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

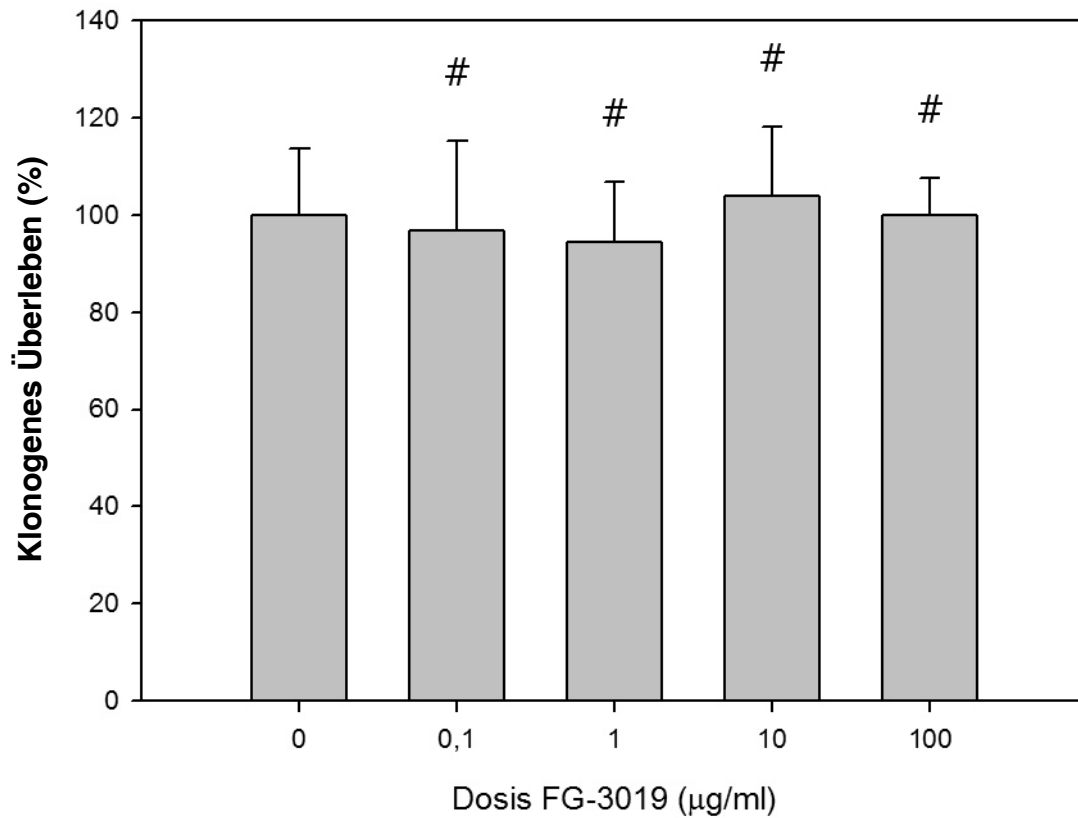


Abbildung 8: HDMEC im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 7 Tagen

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach 7 Tagen von HDMEC Passage 7 anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 (µg/ml) behandelten Gruppen aufgetragen; auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonienzahl in Prozent +/- Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

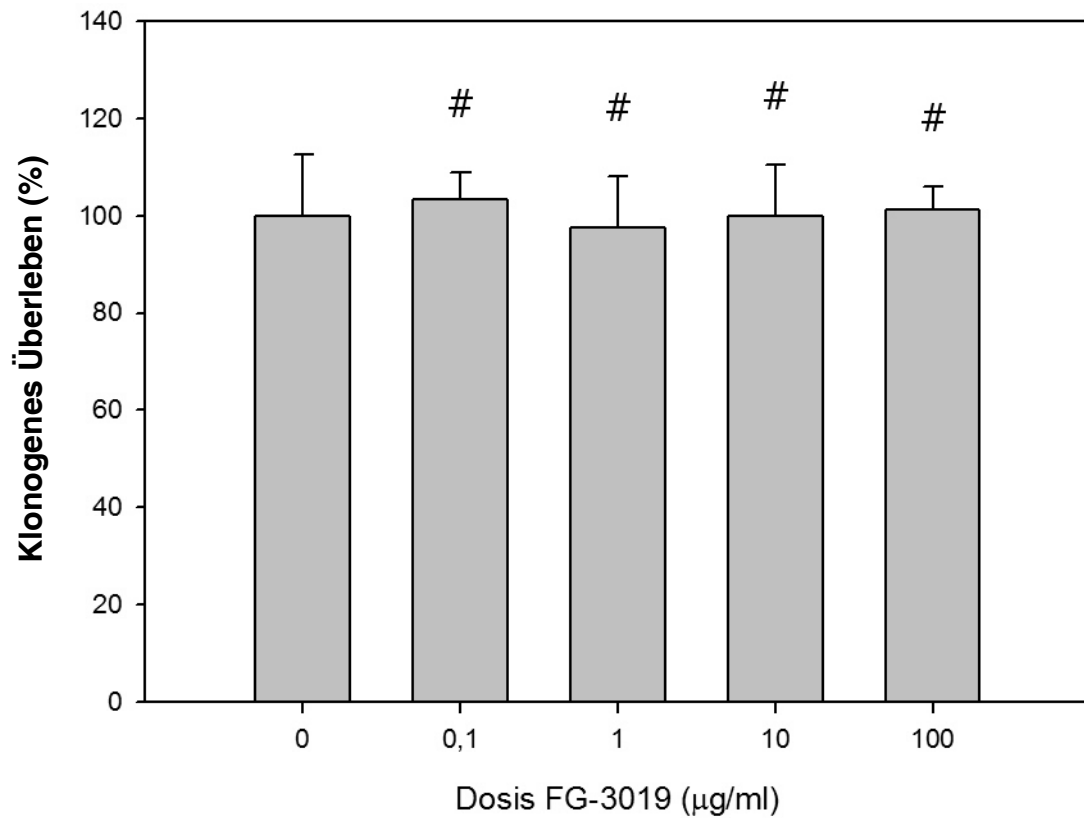


Abbildung 9: HUVEC im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 5 Tagen

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach 5 Tagen von HUVEC Passage 5 anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 (µg/ml) behandelten Gruppen aufgetragen; auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonienzahl in Prozent +/- Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

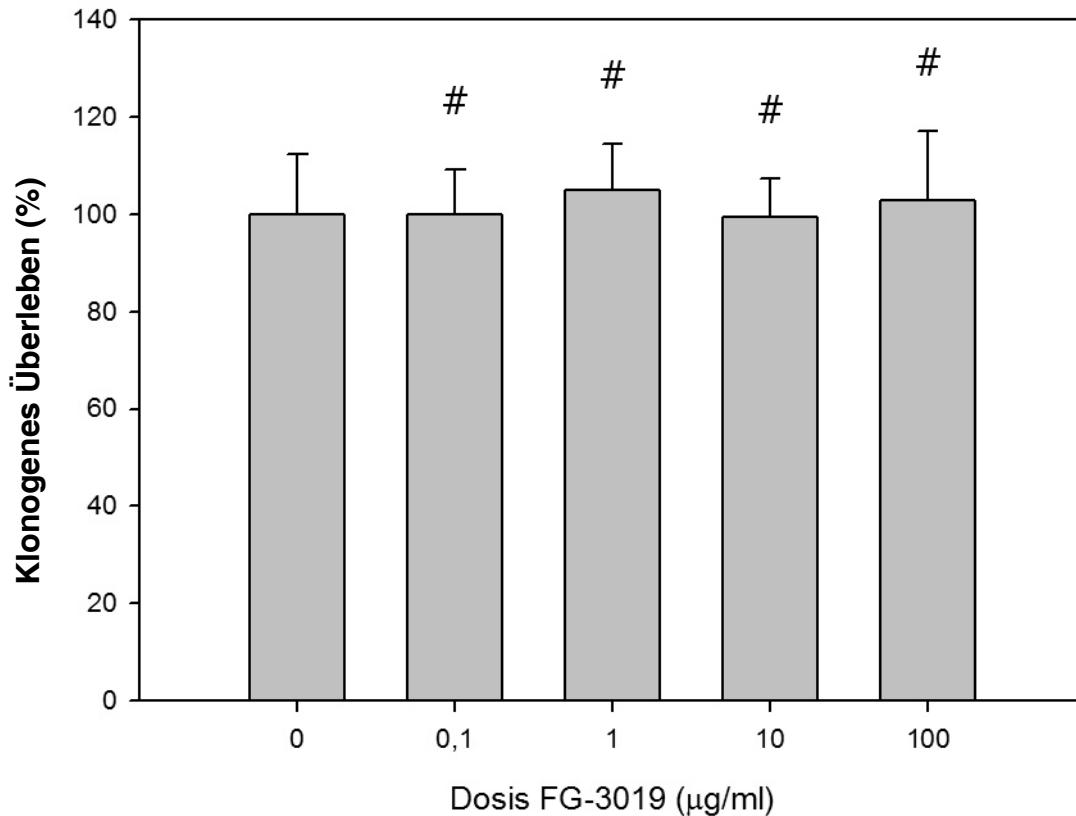


Abbildung 10: HUVEC im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 7 Tagen

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach 7 Tagen von HUVEC Passage 5 anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 (µg/ml) behandelten Gruppen aufgetragen; auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonienzahl in Prozent +/- Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.1.1.4 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben von A549

Im klonogenen Assay zeigte die Behandlung mit FG-3019 in aufsteigender Dosis (0,1 bis 100 µg/ml) sowohl nach fünf als auch nach sieben Tagen keine Effekte bezüglich der Anzahl der klonogenen Einheiten. Die Abbildungen 11 und 12 stellen die Ergebnisse grafisch dar.

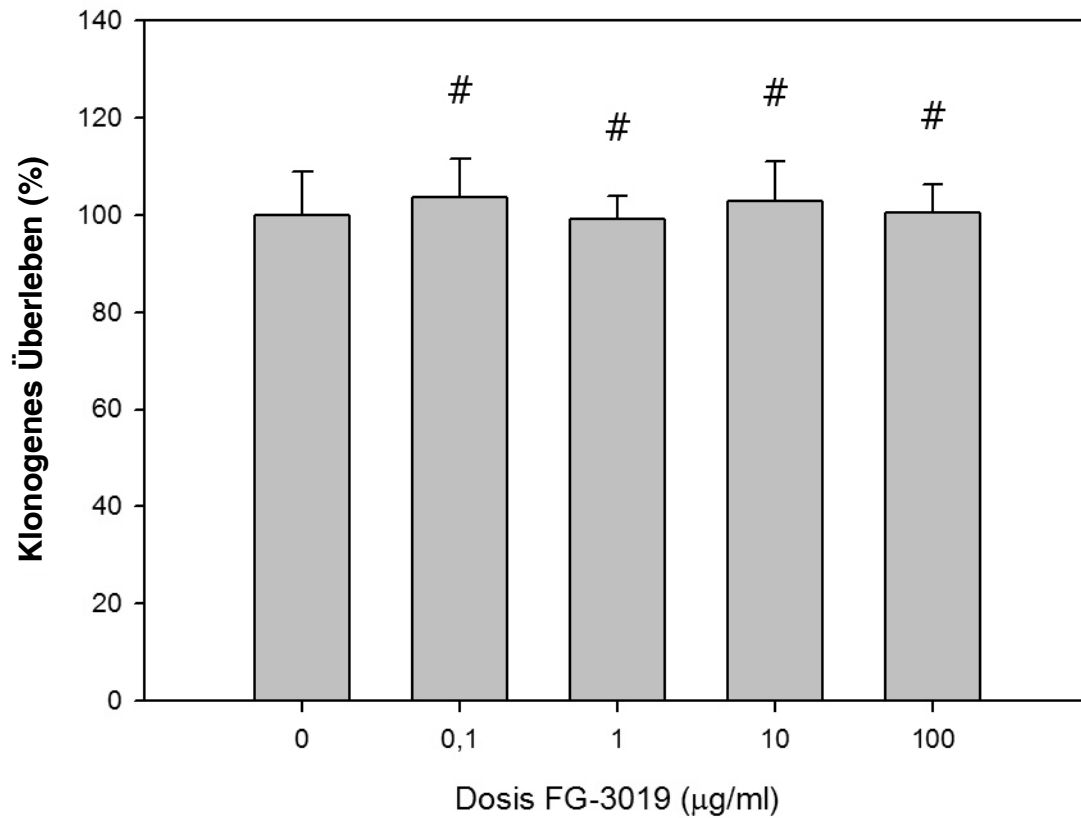


Abbildung 11: A549 im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 7 Tagen

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach 7 Tagen von A549 Passage 8 anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 (µg/ml) behandelten Gruppen aufgetragen; auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonienzahl in Prozent +/- Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

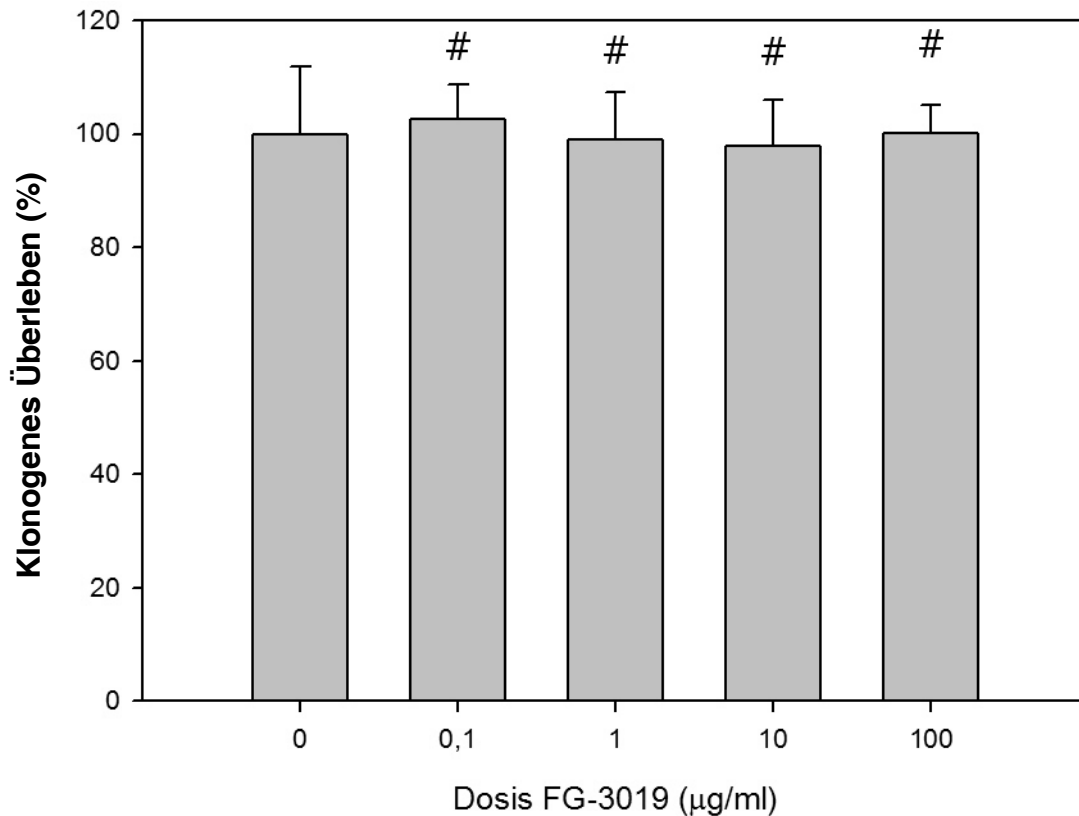


Abbildung 12: A549 im klonogenen Assay mit FG-3019 nach 5 Tagen

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach 5 Tagen von A549 Passage 9 anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 ($\mu\text{g/ml}$) behandelten Gruppen aufgetragen; auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonienzahl in Prozent \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.1.2 Auswirkung von FG-3019 im Proliferations Assay

Um die Ergebnisse des Wachstums zu überprüfen, wurden mit den HPF, den NHDF, HUVEC Endothelzellen und A549 Tumorzellen Proliferations Assays durchgeführt.

4.1.2.1 FG-3019 hemmt die Proliferation von HPF

Für HPF konnte ein signifikanter hemmender Effekt von FG-3019 auf die Proliferation nachgewiesen werden. Während bei einer Dosis von $0,1 \mu\text{g/ml}$ FG-3019 die Reduktion der ausgezählten Zellen ($98,28 \pm 6,02 \%$) gegenüber der Kontrolle ($100 \pm 6,18 \%$) noch nicht signifikant war (p -Wert $0,885$), konnte ab einer Dosis von $1 \mu\text{g/ml}$

(88,41 +/- 5,33 %, p-Wert 0,01) das Signifikanzniveau erreicht werden. Für 10 µg/ml (78,62 +/- 8,44 %) und 100 µg/ml (76,77 +/- 4,55 %) war der p-Wert jeweils unter 0,001. Das Ergebnis veranschaulicht Abbildung 13.

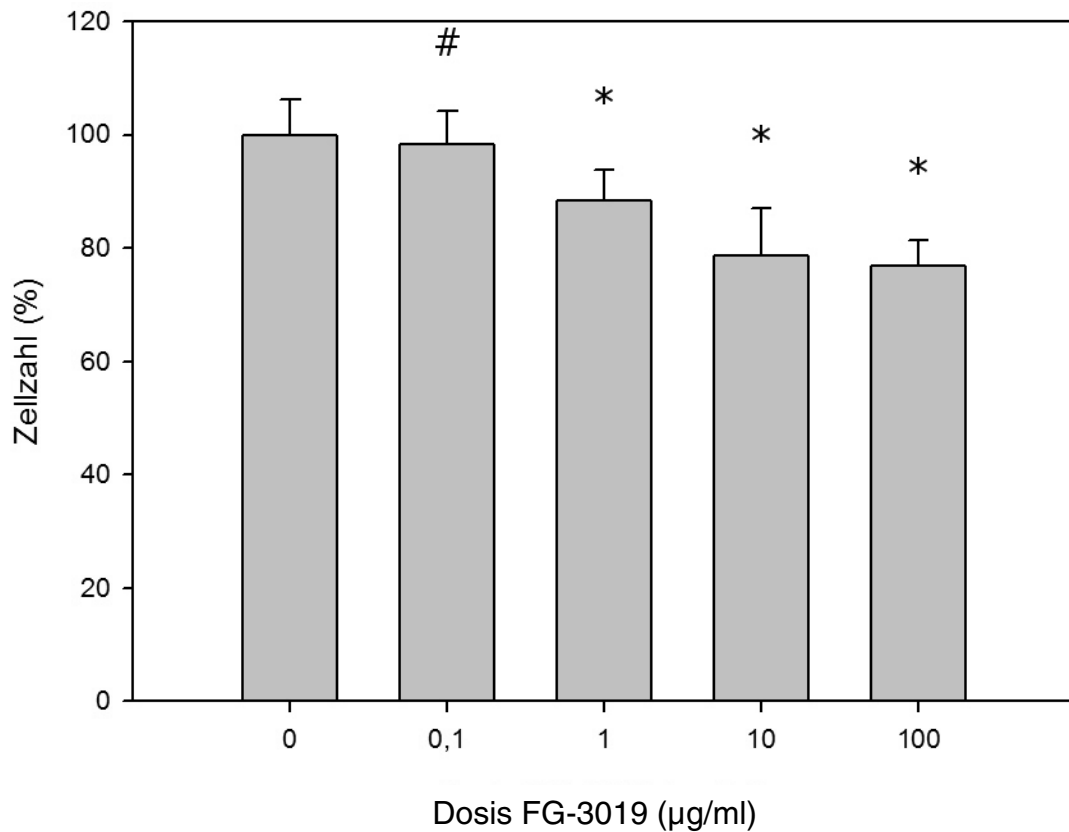


Abbildung 13: HPF im Proliferations-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das proliferative Wachstum von HPF Passage 5. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit verschiedenen Dosen von FG-3019 (µg/ml) behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der Mittelwert der Anzahl der Zellen in % der Kontrollgruppe +/- Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.1.2.2 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von NHDF

Wie im klonogenen Assay ist auch im Proliferations-Assay keine Beeinflussung des Wachstums von NHDF durch die Behandlung mit FG-3019 in aufsteigender Dosis (0,1 bis 100 µg/ml) zu beobachten. Dies zeigt Abbildung 14.

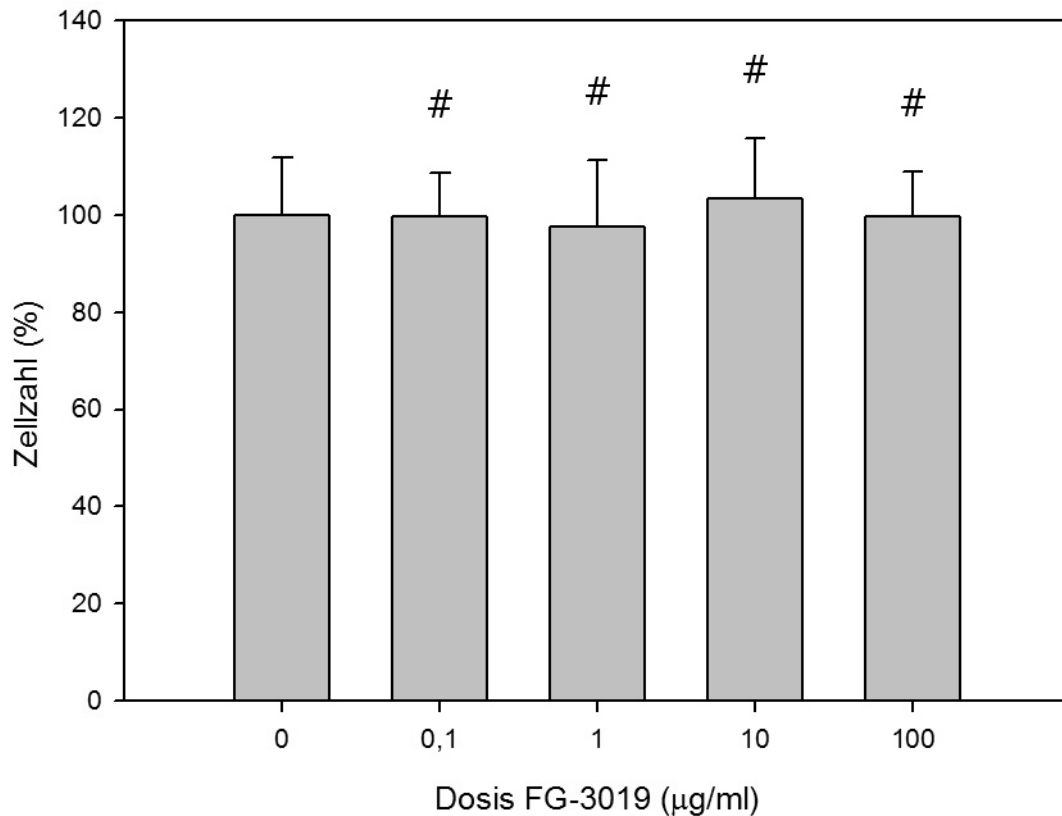


Abbildung 14: NHDF im Proliferations-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das proliferative Wachstum von NDHF Passage 5. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit verschiedenen Dosen von FG-3019 ($\mu\text{g/ml}$) behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der Mittelwert der Anzahl der Zellen in % der Kontrollgruppe \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.1.2.3 FG-3019 hemmt die Proliferation von HUVEC

HUVEC zeigten nach der Behandlung mit FG-3019 eine verminderte Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe (100 \pm 8,96 %). Bei Dosen von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (95,5 \pm 4,57 %, p -Wert 0,452) und 1 $\mu\text{g/ml}$ (93,97 \pm 7,69 %, p -Wert 0,3) war die Veränderung statistisch nicht signifikant. Bei Dosen von 10 $\mu\text{g/ml}$ (82,84 \pm 4,34 %, p -Wert 0,009) und 100 $\mu\text{g/ml}$ (79,93 \pm 3,78 %, p -Wert 0,003) konnte ein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 15.

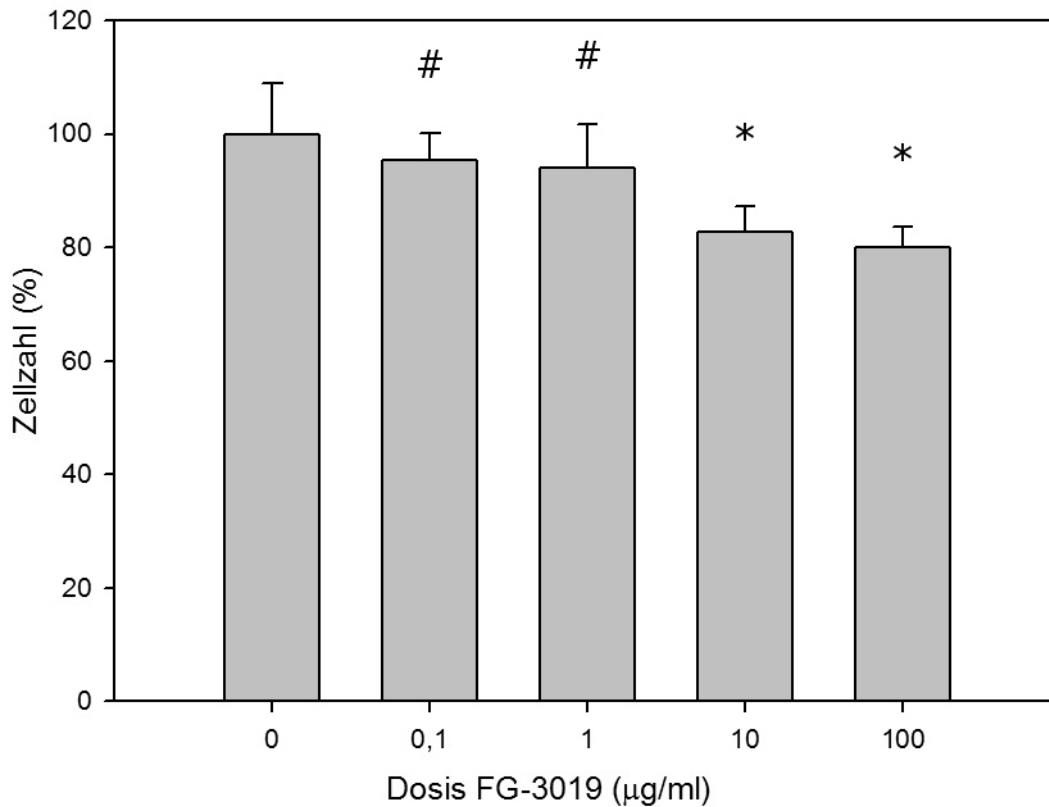


Abbildung 15: HUVEC im Proliferations-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das proliferative Wachstum von HUVEC. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit verschiedenen Dosen von FG-3019 (µg/ml) behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der Mittelwert der Anzahl der Zellen in % der Kontrollgruppe +/- Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.1.2.4 FG-3019 zeigt keine signifikante Beeinflussung der Proliferation von A549

Es war kein signifikanter Einfluss durch die Behandlung mit FG-3019 in aufsteigender Dosis (0,1 bis 100 µg/ml) auf das Wachstumsverhalten von A549 im Proliferations-Assay zu beobachten. Dies ist in Abbildung 16 dargestellt.

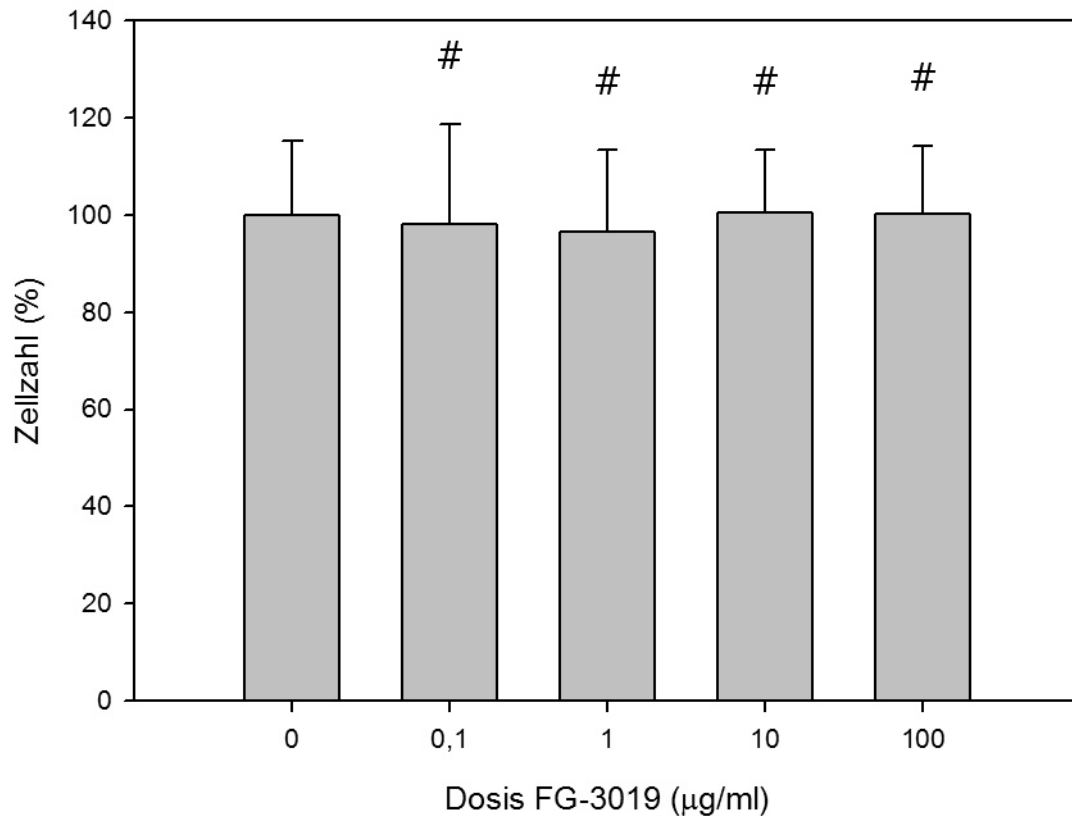


Abbildung 16: A549 im Proliferations-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das proliferative Wachstum von A549 Passage 28. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit verschiedenen Dosen von FG-3019 ($\mu\text{g/ml}$) behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der Mittelwert der Anzahl der Zellen in % der Kontrollgruppe \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.2 Auswirkung von FG-3019 auf die Vitalität von Zellen

4.2.1 FG-3019 hemmt die Vitalität von HPF

Die Vitalität der HPF konnte durch die Behandlung mit FG-3019 signifikant gehemmt werden.

HPF zeigten nach der Behandlung mit FG-3019 eine erhöhte Anzahl an mortalen Zellen (Kontrollgruppe: $100 \pm 30,98 \%$). Die Dosis von $0,1 \mu\text{g/ml}$ ($114 \pm 25,1 \%$, p -Wert $0,438$) zeigte zwar noch kein signifikantes Ergebnis, doch schon ab einer Dosis von $1 \mu\text{g/ml}$ ($145 \pm 22,58 \%$, p -Wert $0,017$) war die Veränderung statistisch signifikant. Auch für Dosen von $10 \mu\text{g/ml}$ ($165 \pm 41,35 \%$, p -Wert $0,012$) und $100 \mu\text{g/ml}$

(190 +/- 30,98 %, p-Wert 0,001) konnte ein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 17.

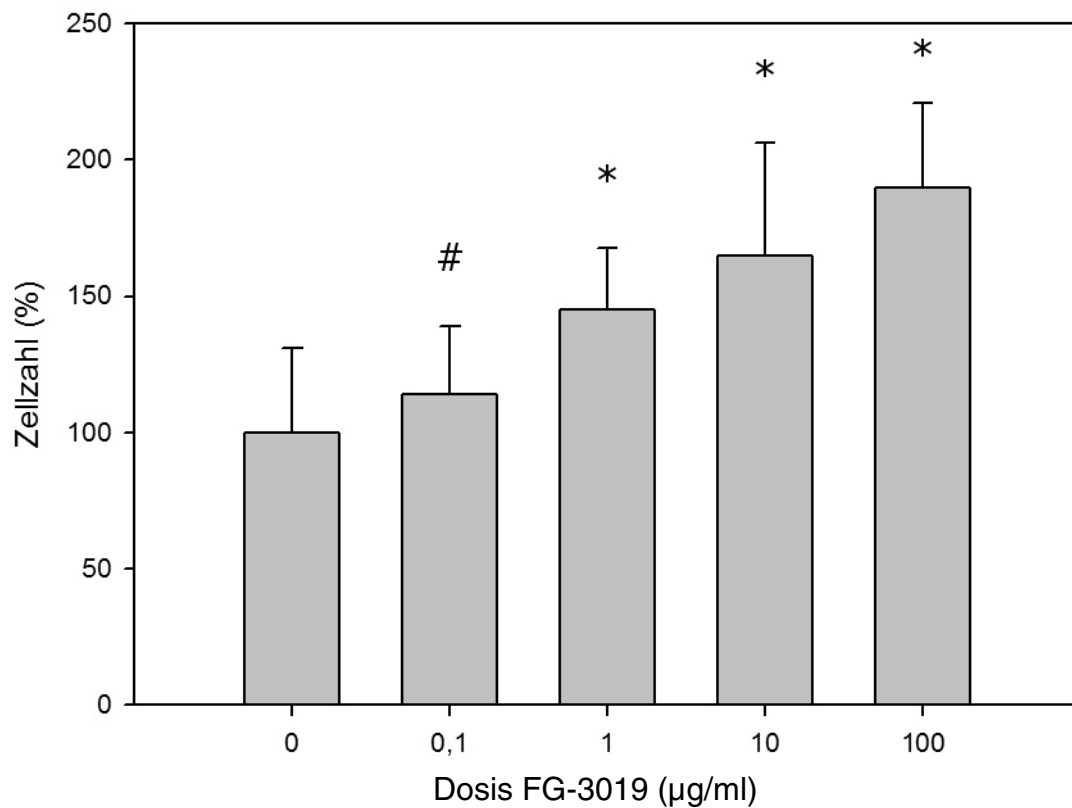


Abbildung 17: HPF im Vitalitäts-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist die Mortalität, also die Anzahl toter Zellen, von HPF im Vitalitäts-Assay. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit verschiedenen Dosen FG-3019 µg/ml behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der toten Zellen im Vergleich zur Kontrolle +/- Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.2.2 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Vitalität von NHDF

Die Behandlung mit FG-3019 (0,1 bis 100 µg/ml) hatte keinen Einfluss auf die Vitalität von NHDF. Das Ergebnis zeigt Abbildung 18.

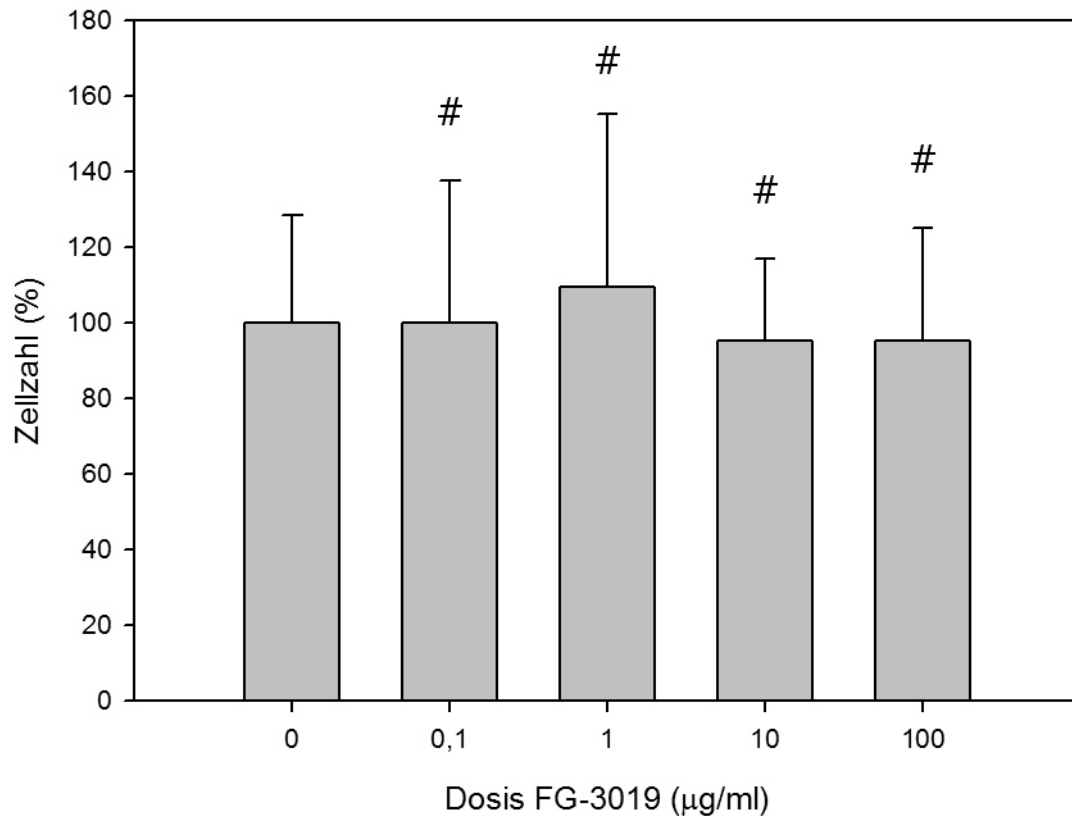


Abbildung 18: NHDF im Vitalitäts-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist die Mortalität, also die Anzahl toter Zellen, von NDHF im Vitalitäts-Assay. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit verschiedenen Dosen FG-3019 µg/ml behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der toten Zellen im Vergleich zur Kontrolle +/- Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.2.3 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Vitalität von HUVEC

Bei den HUVEC hatte die Behandlung mit FG-3019 (0,1 bis 100 µg/ml) keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen, wie in der Abbildung 19 dargestellt ist.

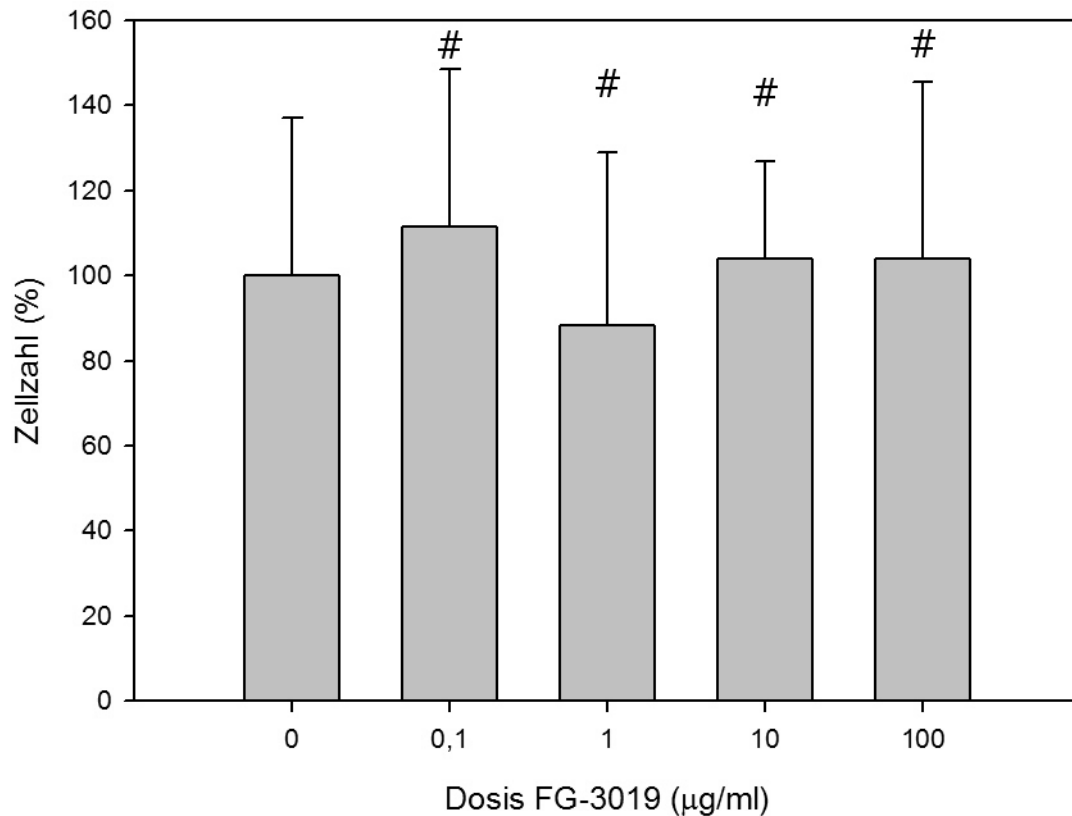


Abbildung 19: HUVEC im Vitalitäts-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist die Mortalität, also die Anzahl toter Zellen, von HUVEC im Vitalitäts-Assay. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit verschiedenen Dosen FG-3019 µg/ml behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der toten Zellen im Vergleich zur Kontrolle +/- Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.2.4 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Vitalität von A549

Die Vitalität der getesteten Tumorzellen A549 konnte durch die Behandlung mit FG-3019 (0,1 bis 100 µg/ml) nicht beeinflusst werden. Dies zeigt die Abbildung 20.

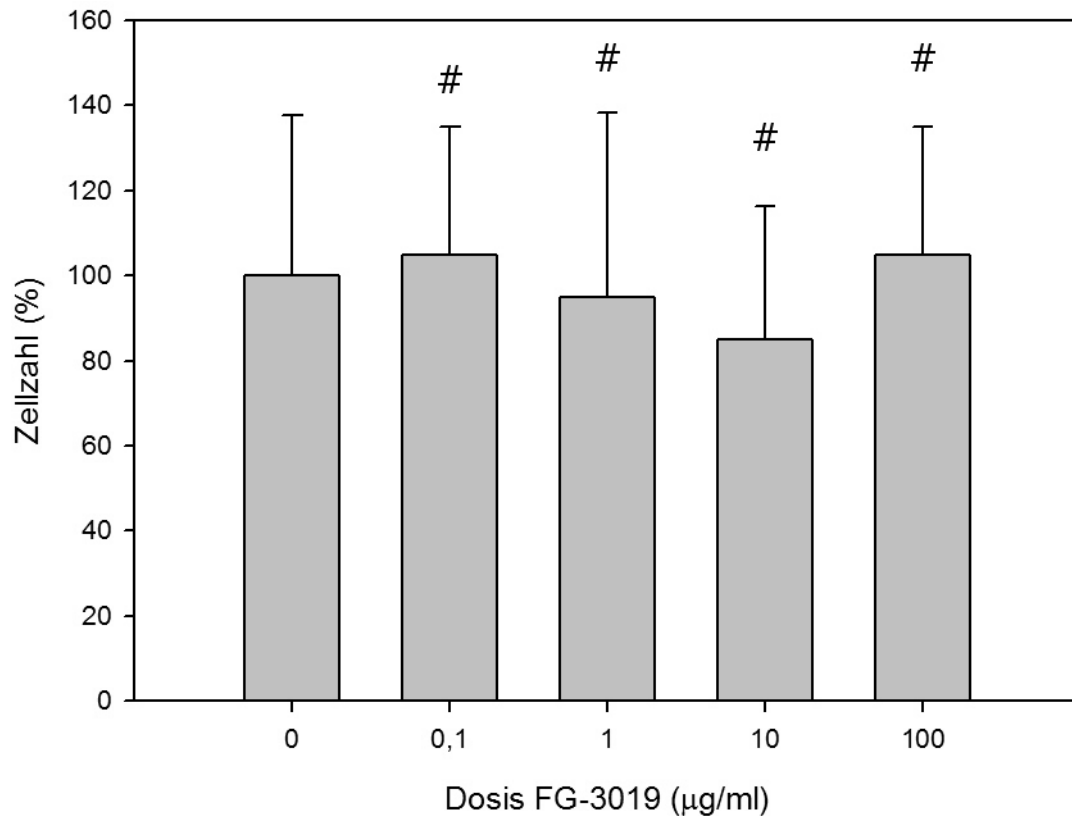


Abbildung 20: A549 im Mortalitäts-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist die Mortalität, also die Anzahl toter Zellen, von A549 im Mortalitäts-Assay. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit verschiedenen Dosen FG-3019 µg/ml behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der toten Zellen im Vergleich zur Kontrolle +/- Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.3 Auswirkung von FG-3019 auf die Adhäsion von Zellen

4.3.1 FG-3019 reduziert leicht die Adhäsion von HPF

Bei den mit FG-3019 behandelten Gruppen blieben mit steigender FG-3019 Dosierung (30 bis 100 µg/ml) reproduzierbar geringfügig weniger Zellen haften als in den Kontrollgruppen. Bei einer Dosis von 30 µg/ml war der Wert auf 96,72 +/- 14,62 % (p-Wert 0,677) und bei einer Dosis von 100 µg/ml auf 95,99 +/- 15,07 % (p-Wert 0,618) gegen-

über der Kontrollgruppe (100 +/- 11,72 %) reduziert. Das Signifikanzniveau konnte jedoch nicht erreicht werden. Dies ist optisch in der Abbildung 21 zu erkennen.

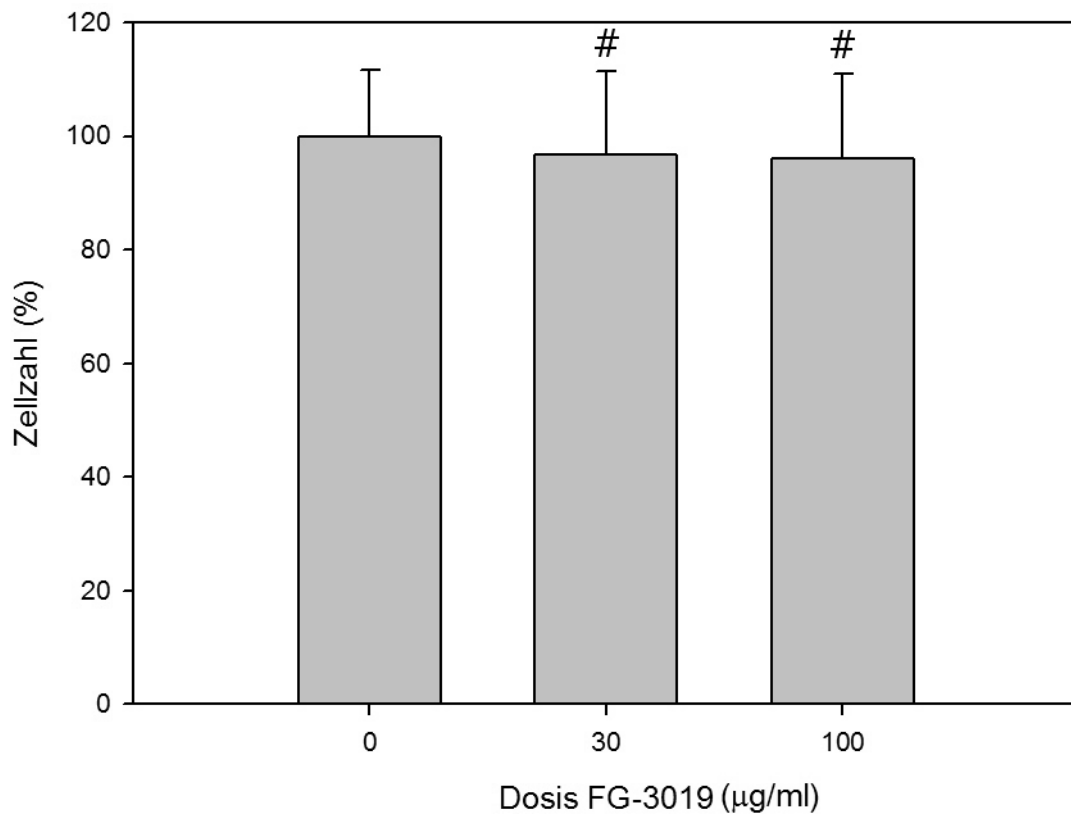


Abbildung 21: HPF im Adhäsions-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das Adhäsionsverhalten von HPF. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle +/- Standardabweichung in Prozent der Kontrollgruppe aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.3.2 FG-3019 zeigt keinen Effekt auf das Adhäsionsverhalten von NHDF

Es konnte kein Unterschied in der Anzahl adhäsiver Zellen zwischen der Kontrollgruppe und den beiden mit FG-3019 behandelten Gruppen festgestellt werden. Somit hatte

FG-3019 keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Hautfibroblasten. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 22 grafisch dargestellt.

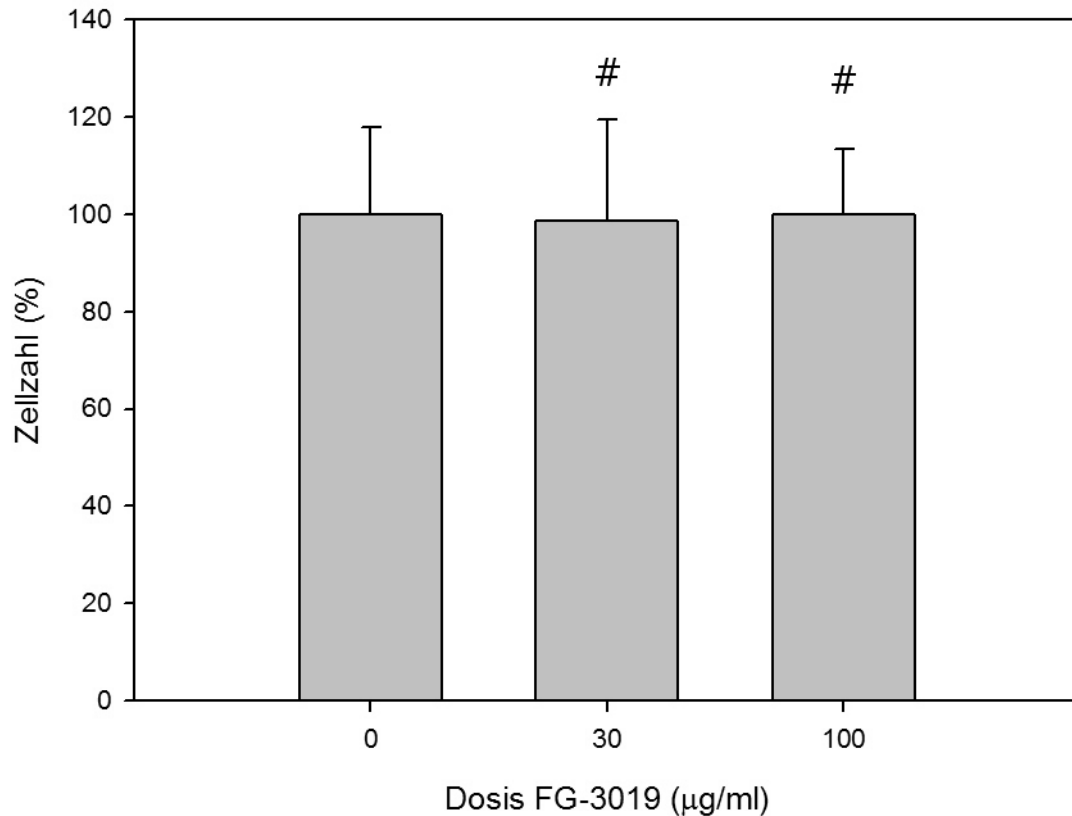


Abbildung 22: NHDF im Adhäsions-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das Adhäsionsverhalten von NHDF. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle +/- Standardabweichung in Prozent der Kontrollgruppe aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.3.3 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von HUVEC

Auf das Adhäsionsverhalten von HUVEC hatte die Behandlung mit FG-3019 ebenfalls keinen Einfluss. Dies ist in Abbildung 23 dargestellt.

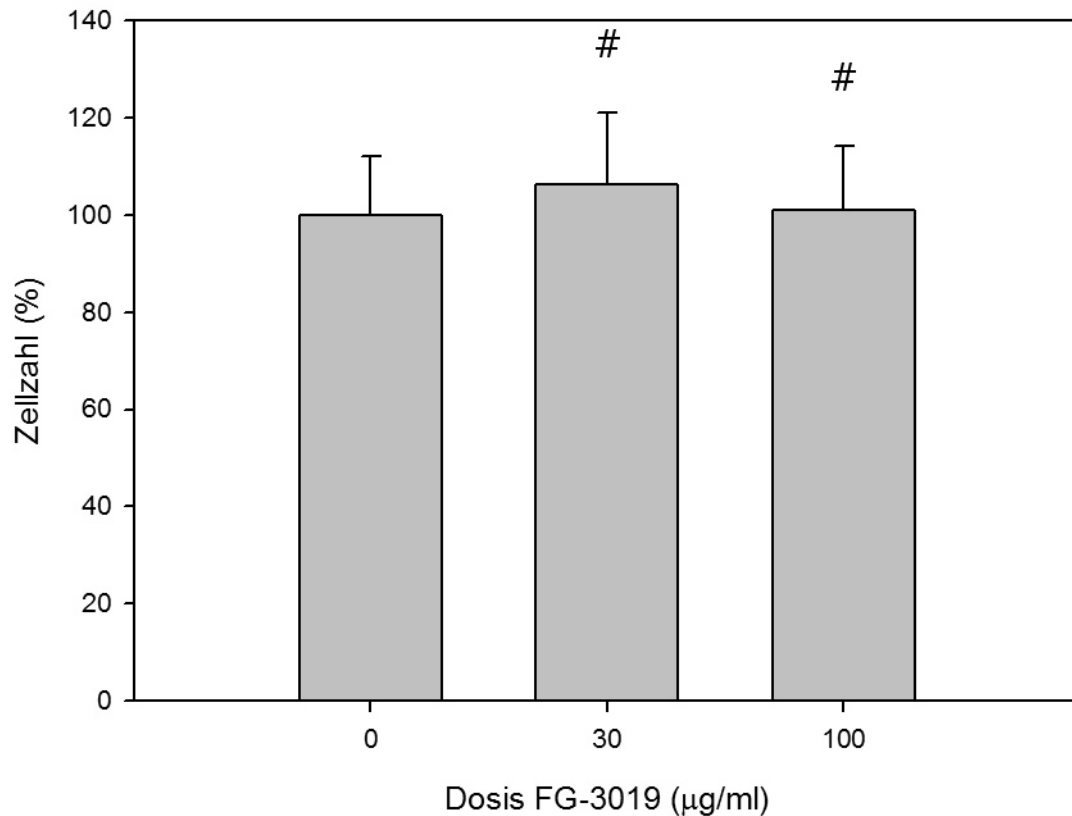


Abbildung 23: HUVEC im Adhäsions-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das Adhäsionsverhalten von HUVEC. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle +/- Standardabweichung in Prozent der Kontrollgruppe aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.3.4 FG-3019 beeinflusst das Adhäsionsverhalten von A549 nicht

FG-3019 hatte - wie in der Abbildung 24 dargestellt - keine Auswirkung auf das Adhäsionsverhalten von A549 Tumorzellen.

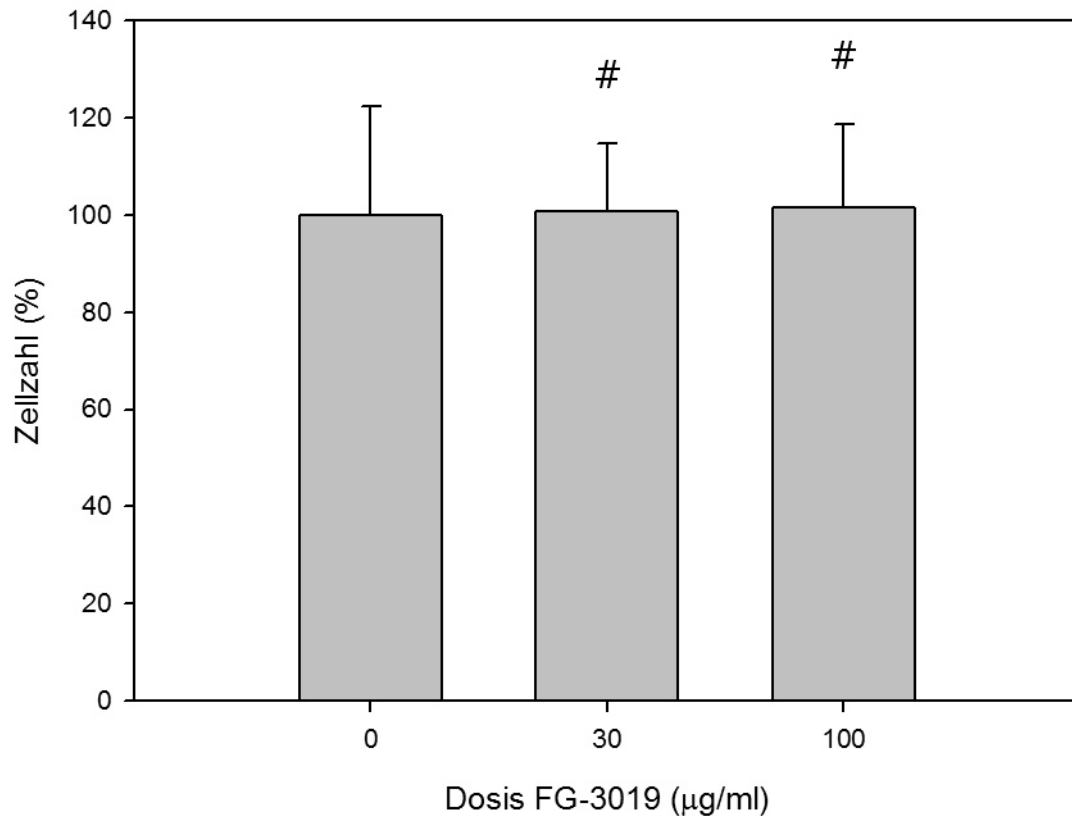


Abbildung 24: A549 im Adhäsions-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das Adhäsionsverhalten von A549. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle +/- Standardabweichung in Prozent der Kontrollgruppe aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.4 Auswirkung der Migrationszeit auf die Migration und die Zellmorphologie von HPF und NHDF

Zunächst wurden das Migrationsverhalten und die Zellmorphologie in Zusammenhang mit der Dauer der Migration unbehandelter HPF und NHDF untersucht. Für HDMEC, HUVEC und A549 war bereits etabliert, dass sich mit einer Migrationsdauer von 12 h eine als Kontrolle geeignete Migrationsaktivität erzielen lässt.

4.4.1 Die Zeit beeinflusst das Migrationsverhalten und die Zellmorphologie von HPF

Es zeigte sich, dass die Zeit deutlichen Einfluss auf die Anzahl der migrierten Zellen und die Zellmorphologie hat. So waren nach 5 Stunden weniger Zellen migriert als nach 12 bzw. 14 Stunden. Auch waren die migrierten Zellen im Vergleich zu den länger inkubierten Zellen noch abgerundet und auch kleiner. Abbildung 25 lässt diese Zellunterschiede erkennen.

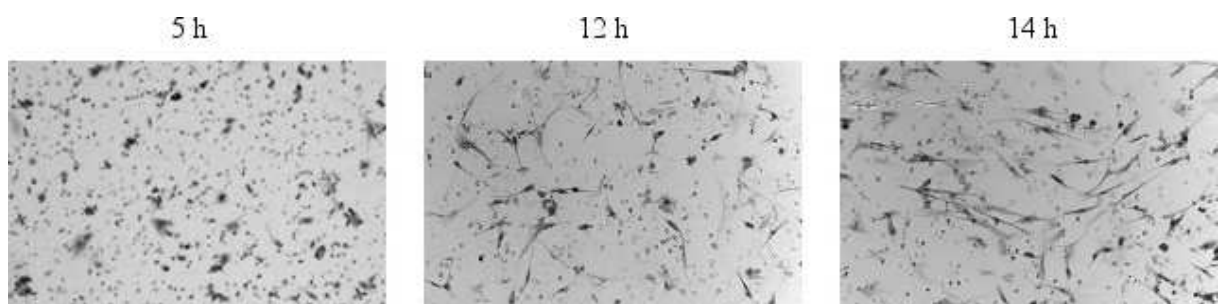


Abbildung 25: Migration von HPF nach 5, 12 und 14 Stunden

Migration einer Kontrollgruppe von HPF. Gezeigt werden repräsentative Photos (80 x) nach 5, 12 und 14 Stunden Migrationszeit. Während nach 5 Stunden die Entfaltung der physiologischen Fibroblasten-Morphologie noch unvollständig ist, zeigt sich nach 12 und 14 Stunden eine voll entfaltete, typische Zellmorphologie. Es zeigte sich ebenfalls, dass nach längerer Inkubation eine vermehrte Migration stattgefunden hat.

4.4.2 NHDF zeigen keine Migration im Migrations-Assay

Nach 12 Stunden Migrationszeit konnte bei NHDF keine Migration beobachtet werden. Auch eine Ausdehnung der Migrationszeit auf 14 Stunden führt zu keiner Wanderung der Hautfibroblasten. Gezeigt wird dies in Abbildung 26. Daher entfielen diese Zellen auch für weitere Migrationsversuche.

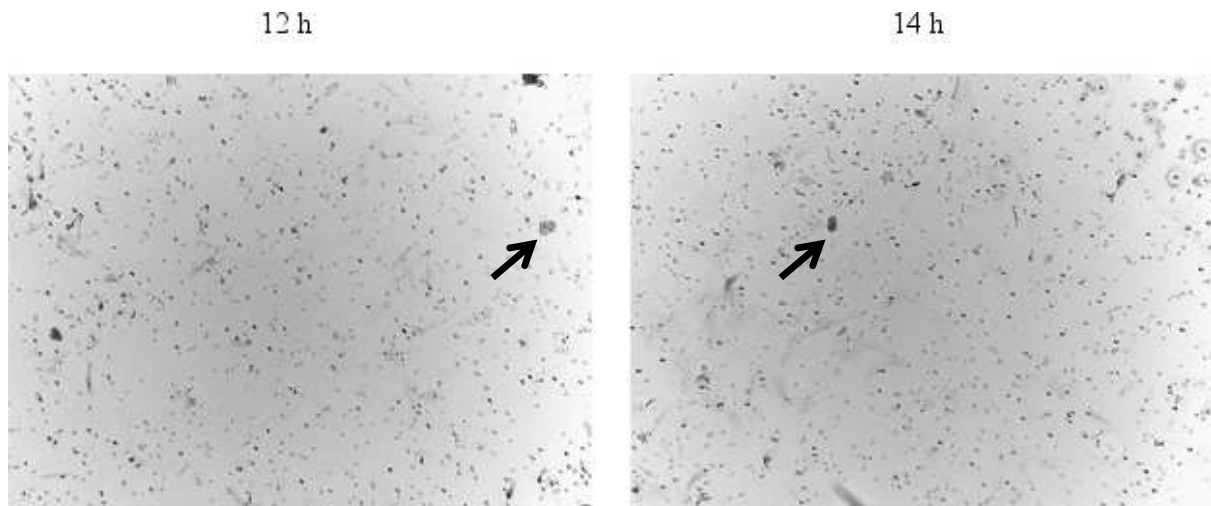


Abbildung 26: Migration von NHDF nach 12 und 14 Stunden

Es werden repräsentative Photos (20 x) für die Migration von NHDF nach 12 und 14 Stunden gezeigt. Es sind nur vereinzelte gewanderte intakte Zellen mit Zellkern zu sehen.

4.5 Auswirkung von FG-3019 auf die Migration

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse erläutert und grafisch dargestellt, die durch Behandlung von HPF, HDMEC, HUVEC und A549 mit FG-3019 im Migrations-Assay beobachtet werden konnten.

4.5.1 FG-3019 reduziert die in-vivo Migration von HPF

Im Gegensatz zu den moderaten Effekten auf das Wachstumsverhalten von HPF hatte die Behandlung mit FG-3019 einen starken Einfluss auf das Migrationsverhalten der Lungenfibroblasten. In Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkungszeit von FG-3019 (5, 12 und 14 h) konnte ein zunehmend deutlicherer Effekt beobachtet werden.

Nach einer Einwirkzeit von 5 Stunden war die Migration der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (100 +/- 11,09 %) auf 89,64 % +/- 9,53 % (p-Wert = 0,081) reduziert. Nach 5 Stunden Migration hatten die Zellen noch nicht die fibroblastentypische Zellmorphologie angenommen. Nach 12 Stunden Einwirkzeit wurde dieser Wert auf

60,81 +/- 12,48 % (p-Wert kleiner 0,001) der Kontrollgruppe (100 +/- 26,17 %) und nach 14 Stunden auf 37,5 +/- 4,91 % (p-Wert 0,007) im Vergleich zur Kontrollgruppe (100 +/- 28,05 %) reduziert. Also konnte für die Einwirkzeiten von 12 und 14 Stunden jeweils eine signifikante (p-Wert < 0,05) Reduktion der Migration beobachtet werden. Die Behandlungseffekte sind in Abbildung 27 als Graphenfunktion dargestellt. Zusätzlich stellt dieser Graph die von der Einwirkdauer abhängige Steigerung des Effektes durch die Behandlung mit FG-3019 dar. Abbildung 28 zeigt repräsentative Photos der Migration nach 5 und 14 Stunden.

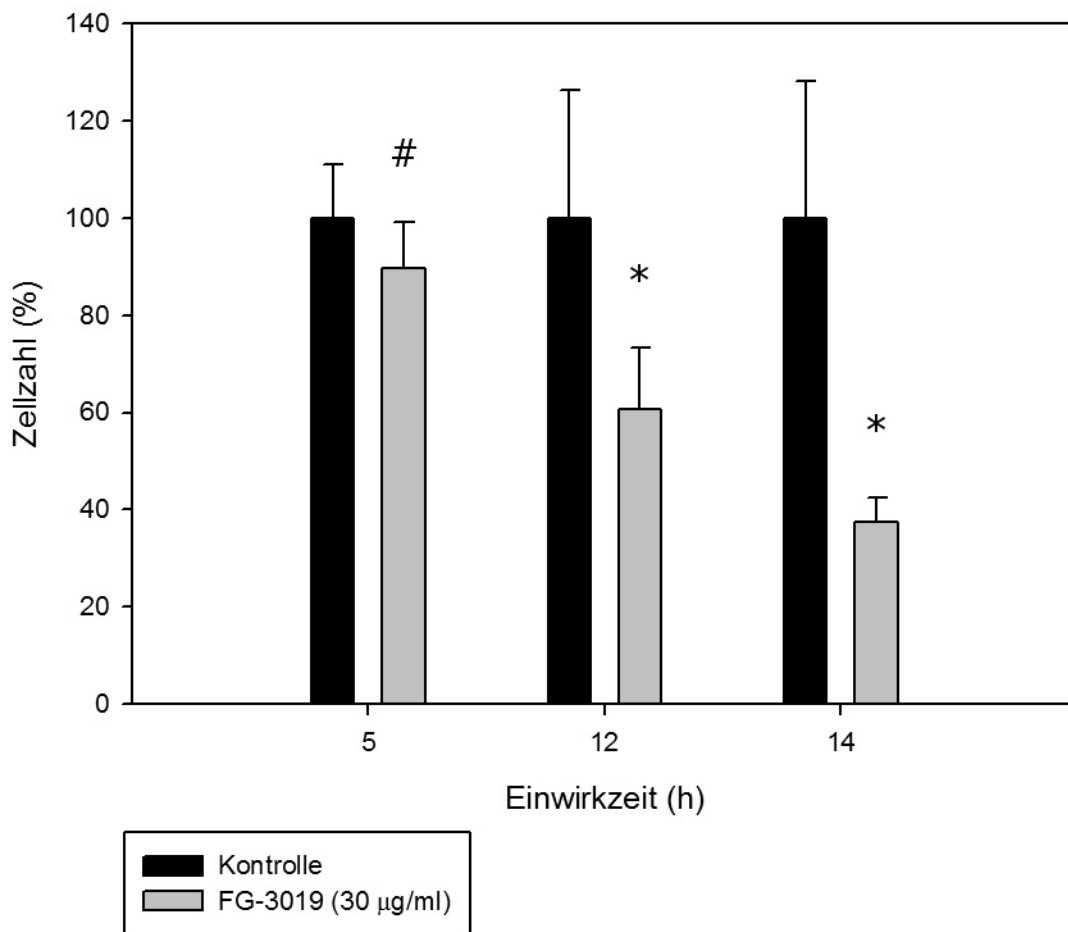


Abbildung 27: HPF im 5, 12 und 14 Stunden Migrations-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das Migrationsverhalten von HPF innerhalb von 5, 12 und 14 Stunden. Auf der X-Achse ist die Einwirkzeit von FG-3019 aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Anzahl der migrierten Zellen in Prozent +/- der Standardabweichung für die unbehandelten Kontrollen und die mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelten Zellen aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

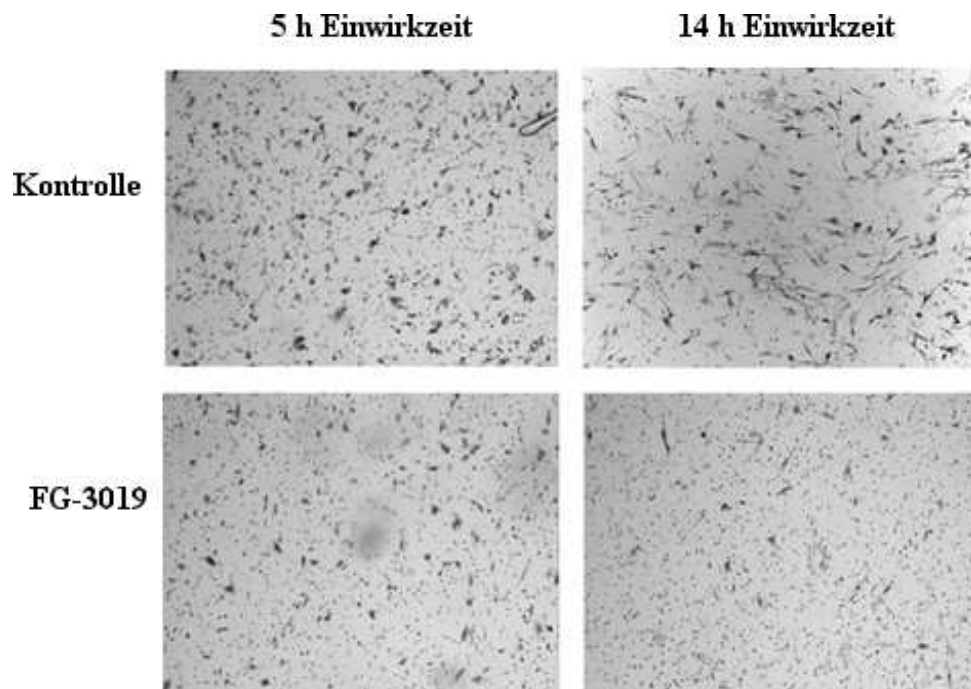


Abbildung 28: Migration von HPF nach 5 und 14 Stunden mit FG-3019

Gezeigt werden repräsentative Photos (20 x) der Migration von HPF nach 5 und 14 Stunden Inkubation. Es werden jeweils unbehandelte Kontrollen mit Zellen, die zuvor mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelt worden sind, verglichen.

4.5.2 FG-3019 zeigt keinen Einfluss auf die Migration von HDMEC

Bei der Anzahl der nach 12 Stunden migrierten HDMEC Zellen konnte kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelten Gruppe festgestellt werden. Dies zeigen die Abbildungen 29 und 30.

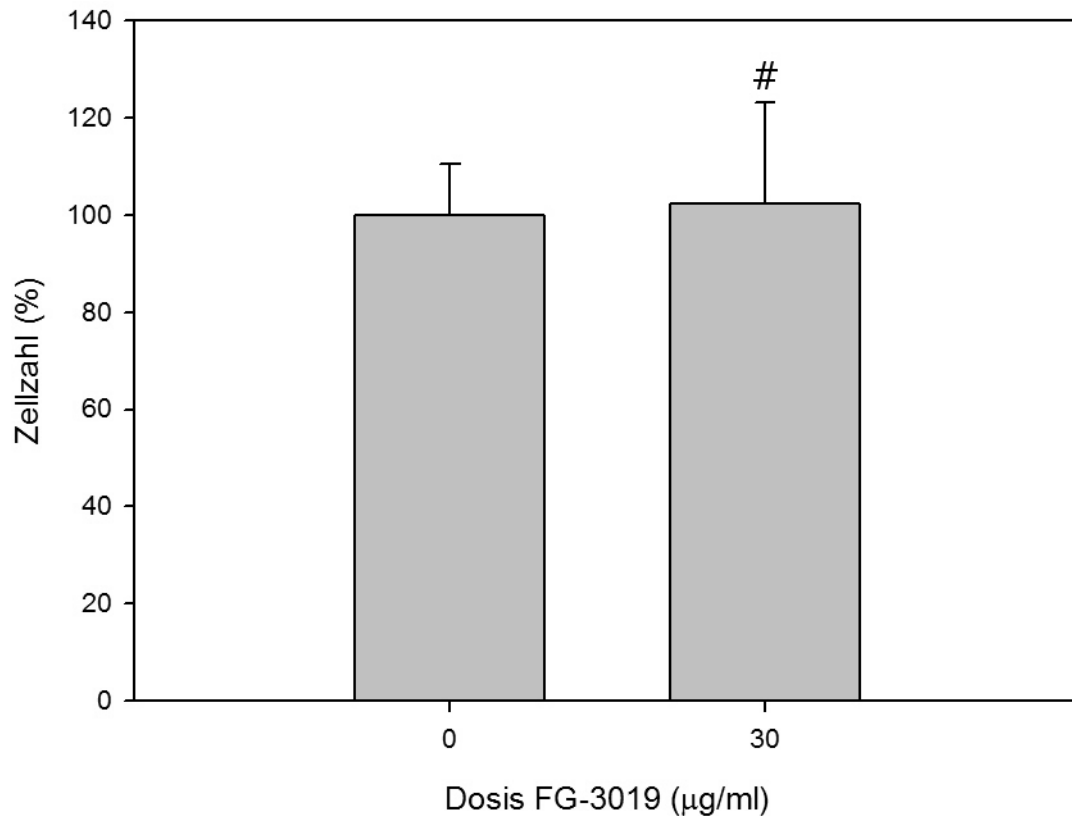


Abbildung 29: HDMEC im 12 Stunden Migrations-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das Migrationsverhalten von HDMEC innerhalb von 12 Stunden. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelte Gruppe aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Anzahl der migrierten Zellen in Prozent +/- der Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

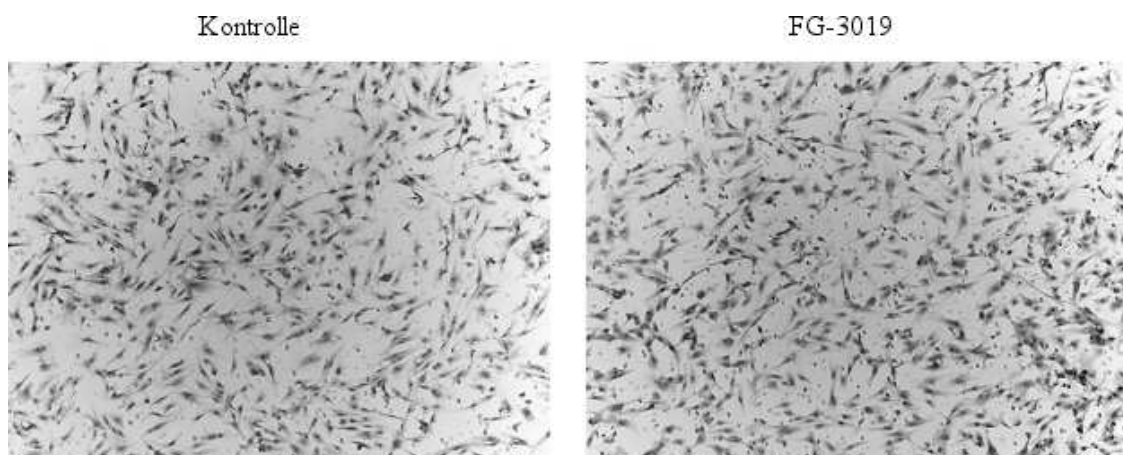


Abbildung 30: Migration von HDMEC nach 12 Stunden mit FG-3019

Gezeigt werden repräsentative Photos (20 x) der Migration von HDMEC nach 12 Stunden Einwirkzeit. Es wird eine unbehandelte Kontrolle mit Zellen, die zuvor mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelt worden sind, verglichen.

4.5.3 FG-3019 zeigt keinen Einfluss auf die Migration von HUVEC

Bei der Anzahl der nach 12 Stunden migrierten HUVEC Zellen konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelten Gruppe festgestellt werden. Dies zeigen die Abbildungen 31 und 32.

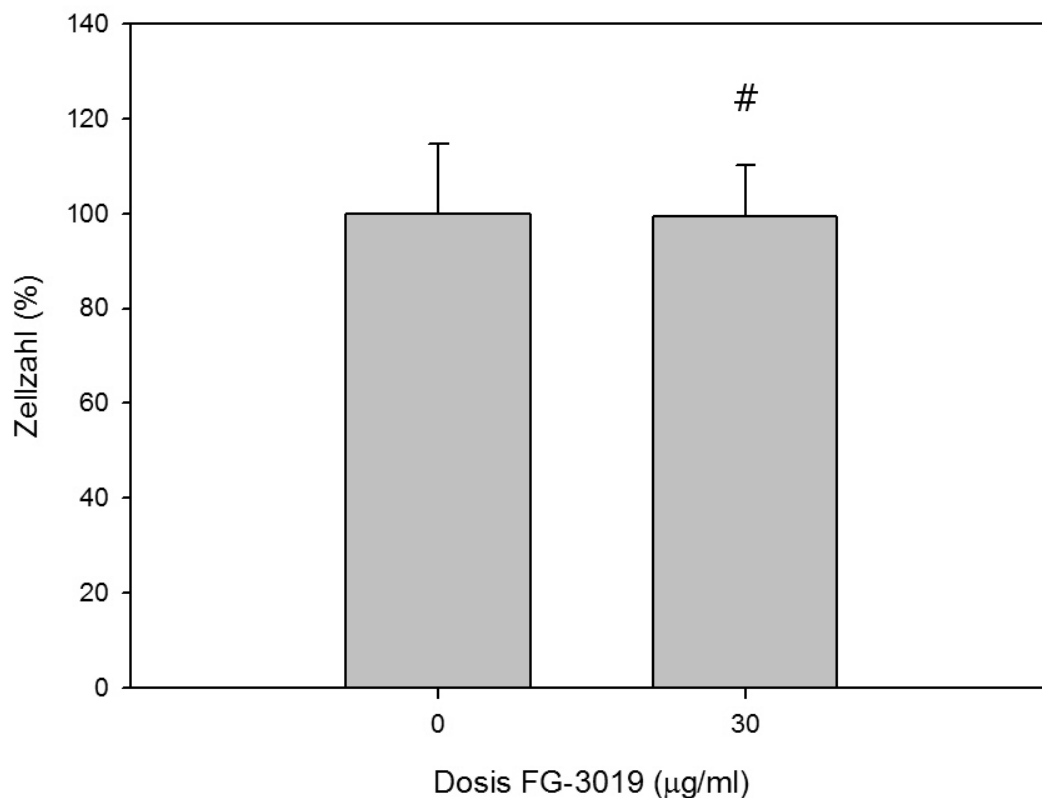


Abbildung 31: HUVEC im 12 Stunden Migrations-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das Migrationsverhalten von HUVEC innerhalb von 12 Stunden. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelte Gruppe aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Anzahl der migrierten Zellen in Prozent +/- der Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

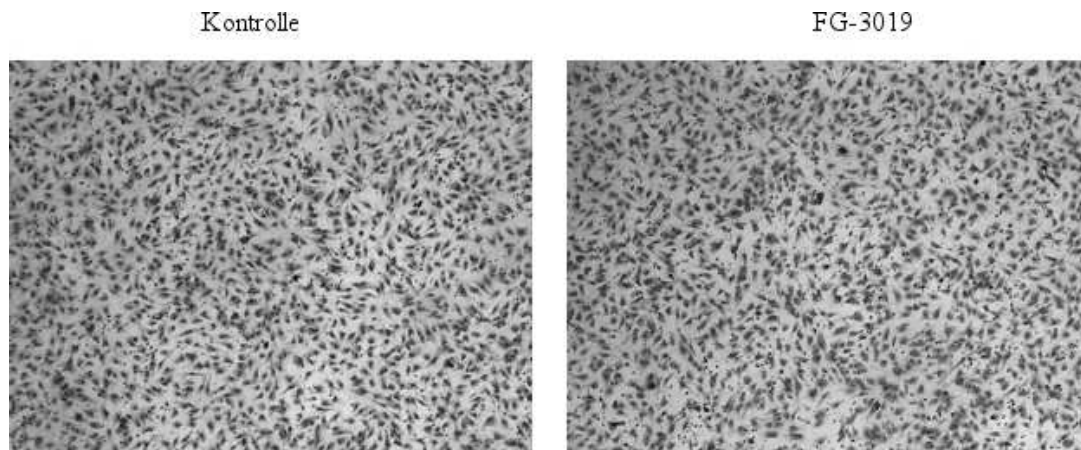


Abbildung 32: Migration von HUVEC nach 12 Stunden mit FG-3019

Gezeigt werden repräsentative Photos (20 x) der Migration von HUVEC nach 12 Stunden Einwirkzeit. Es wird eine unbehandelte Kontrolle mit Zellen, die zuvor mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelt worden sind, verglichen.

4.5.4 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von A549

Auf das Migrationsverhalten von A549 hatte FG-3019 keinen signifikanten Einfluss. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 33 grafisch und in der Abbildung 34 optisch dargestellt.

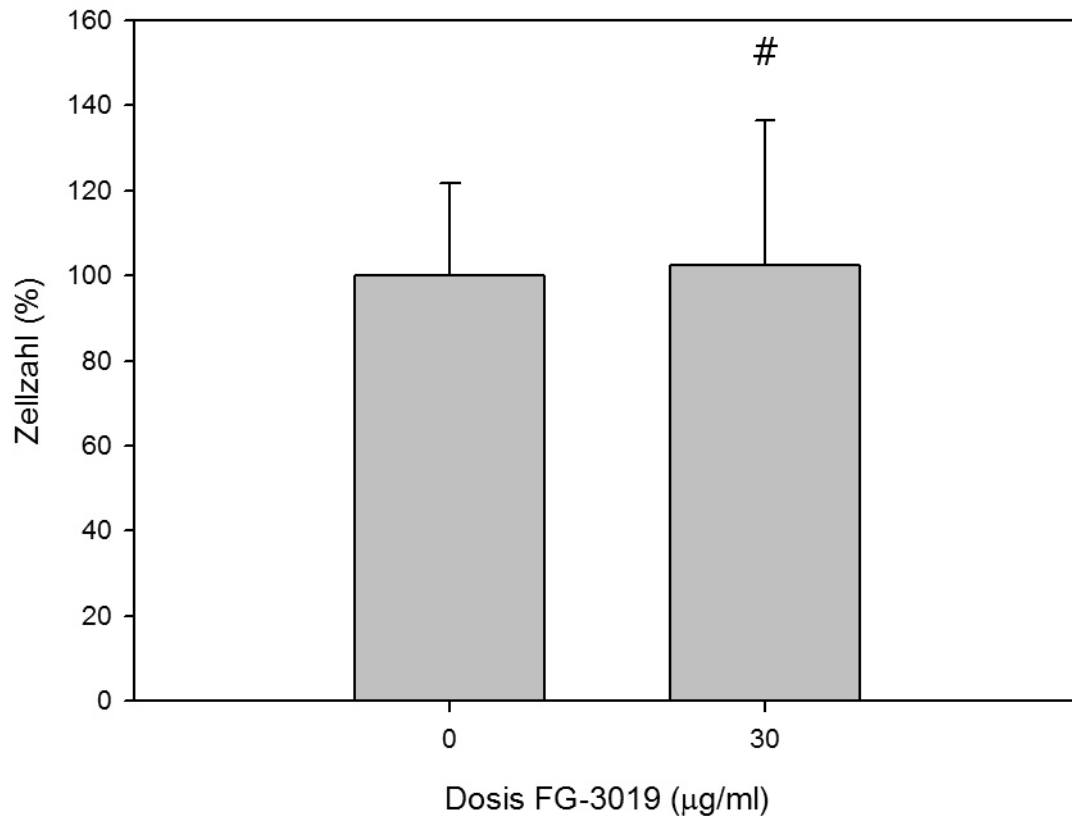


Abbildung 33: A549 im 12 Stunden Migrations-Assay mit FG-3019

Dargestellt ist das Migrationsverhalten von A549 innerhalb von 12 Stunden. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelte Gruppe aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Anzahl der migrierten Zellen in Prozent +/- der Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

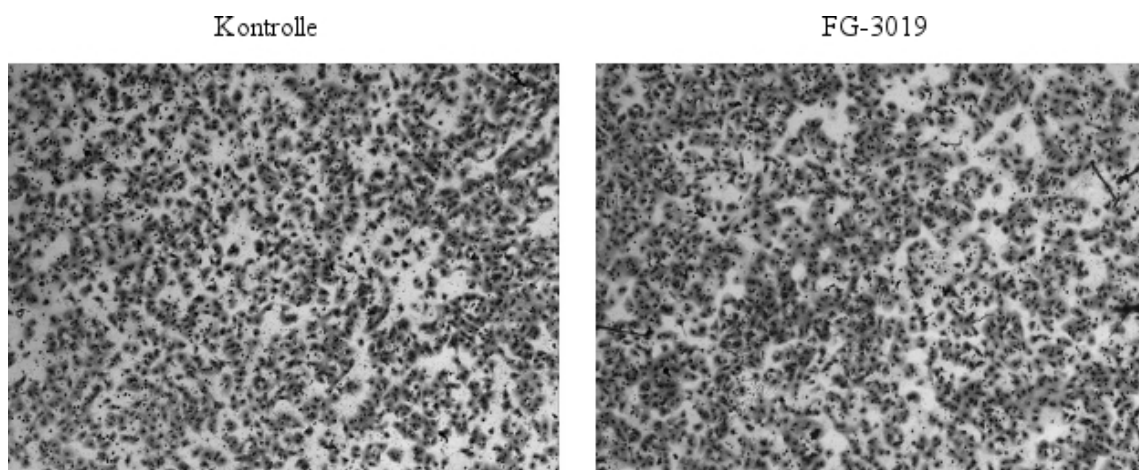


Abbildung 34: Migration von A549 nach 12 Stunden mit FG-3019

Gezeigt werden repräsentative Photos (20 x) der Migration von A549 nach 12 Stunden Einwirkzeit. Es wird eine unbehandelte Kontrolle mit Zellen, die zuvor mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelt worden sind, verglichen.

4.6 Auswirkung von Bestrahlung kombiniert mit FG-3019 auf das klonogene Überleben

Um herauszufinden, ob sich durch die Behandlung von HPF, NHDF, HUVEC und A549 mit FG-3019 in Kombination mit Bestrahlung eine synergistische Wirkung beobachten lässt, wurden für diese Zelllinien Klonogene Assays nach Bestrahlung (0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 10 Gy) mit und ohne zusätzliche Gabe von FG-3019 (30 µg/ml) durchgeführt.

4.6.1 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von HPF unter Bestrahlung nicht

Die Bestrahlung der Zellen zeigte erwartungsgemäß einen signifikanten hemmenden Effekt auf das klonogene Überleben von HPF. Die relative Anzahl der klonogenen Einheiten wurde durch die Bestrahlung mit 1 Gy auf 87,48 +/- 9,55 % (p-Wert = 0,44), mit 2 Gy auf 49,71 +/- 8,06 % (p-Wert kleiner 0,001), mit 4 Gy auf 14,4 +/- 1,3 % (p-Wert kleiner 0,001) und mit 10 Gy auf 0,19 +/- 0,17 % (p-Wert kleiner 0,001) gegenüber der Kontrolle (100 +/- 24,39 %) gesenkt. Ab einer Dosis von 2 Gy konnten also signifikante Unterschiede (p-Wert kleiner als 0,05) zur Kontrolle beobachtet werden. Bei einer Dosis von 10 Gy wiesen so gut wie alle Lungenfibroblasten eine so starke Schädigung auf, dass bis auf die Bildung von wenigen vereinzelt Kolonien kein Wachstum mehr zu beobachten war. Die zusätzliche Gabe von FG-3019 konnte keine Veränderung der Anzahl der klonogenen Einheiten im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung bewirken (alle P-Werte über 0,05). Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 35 grafisch dargestellt.

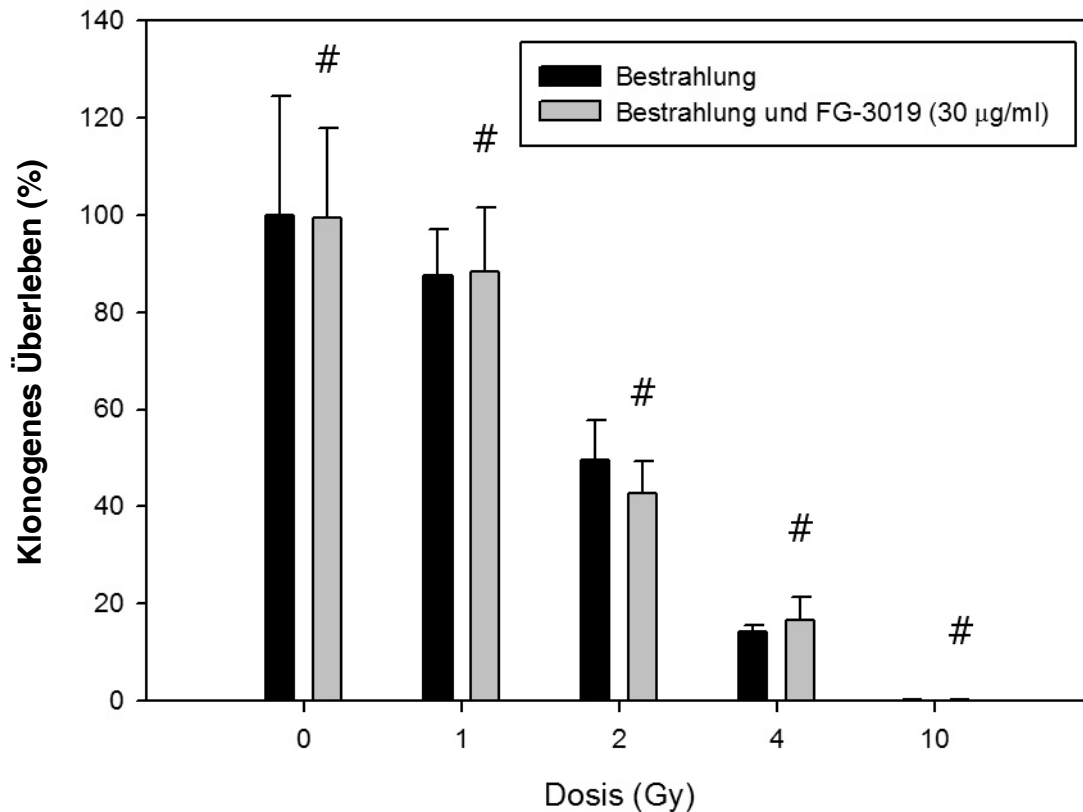


Abbildung 35: HPF im klonogenen Assay mit FG-3019 und Bestrahlung

Dargestellt ist das klonogene Überleben von bestrahlten HPF mit und ohne zusätzliche Behandlung mit FG-3019 (30 µg/ml) anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse ist die Bestrahlungsdosis (Gy) aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Kolonienzahlen in Prozent der Kontrollgruppe +/- Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zwischen der alleinigen Bestrahlung und der kombinierten Therapie (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.6.2 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von NHDF unter Bestrahlung nicht

Auch bei NHDF nahm das klonogene Überleben mit steigender Strahlendosis signifikant ab. Die relative Anzahl der klonogenen Einheiten wurde durch die Bestrahlung mit 1 Gy auf 90,77 +/- 7,89 % (p-Wert = 0,245), mit 2 Gy auf 52,21 +/- 8,21 % (p-Wert kleiner 0,001), mit 4 Gy auf 27,72 +/- 3,33 % (p-Wert kleiner 0,001) und mit 10 Gy auf 2,88 +/- 0,13 % (p-Wert kleiner 0,001) gegenüber der Kontrolle (100 +/- 6,72 %) gesenkt. Ab einer Dosis von 2 Gy konnten also signifikante Unterschiede (p-Wert kleiner als 0,05) zur Kontrolle beobachtet werden. Es konnte jedoch kein zusätzlicher Effekt

von FG-3019 festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 36 optisch veranschaulicht.

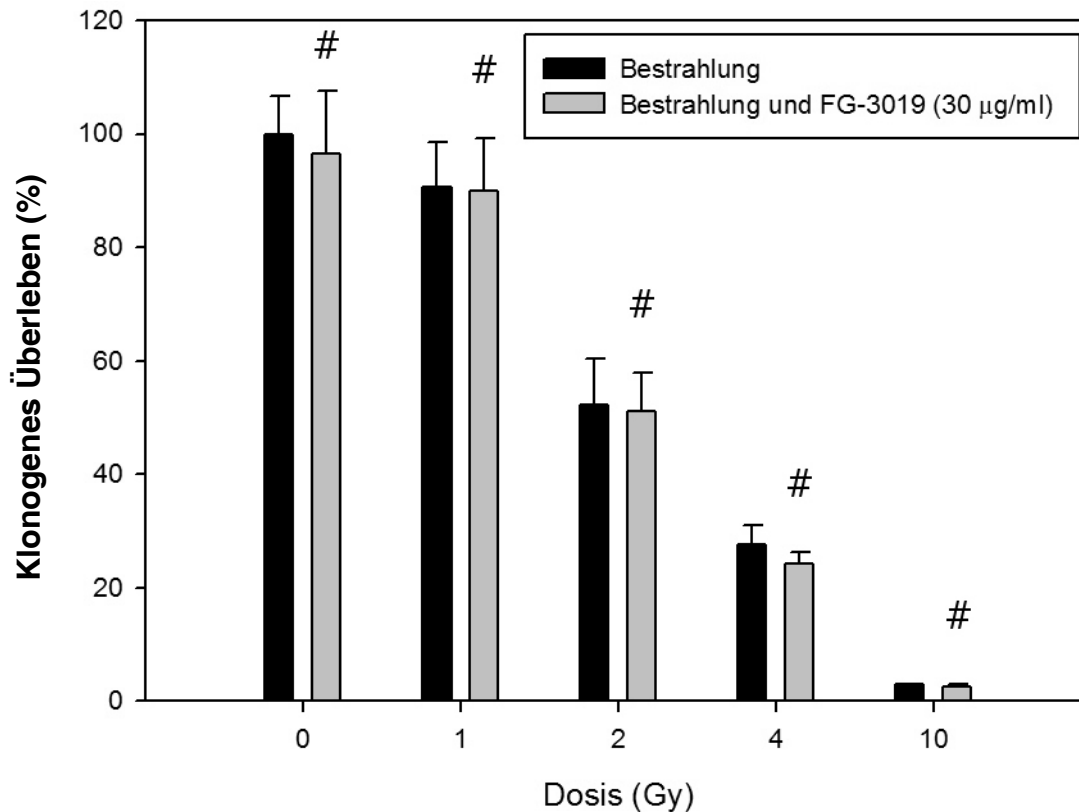


Abbildung 36: NHDF im klonogenen Assay mit FG 3019 und Bestrahlung

Dargestellt ist das klonogene Überleben von bestrahlten NHDF mit und ohne zusätzliche Behandlung mit FG 3019 (30 µg/ml) anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse ist die Bestrahlungsdosis (Gy) aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Kolonienzahlen in Prozent der Kontrollgruppe \pm Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zwischen der alleinigen Bestrahlung und der kombinierten Therapie (p -Wert $< 0,05$) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.6.3 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von HUVEC unter Bestrahlung nicht

Auch bei HUVEC nahm das klonogene Überleben mit steigender Strahlendosis signifikant ab. Die relative Anzahl der klonogenen Einheiten wurde durch die Bestrahlung mit 1 Gy auf 94,39 \pm 11,9 % (p -Wert 0,016), mit 2 Gy auf 45,79 \pm 8,92 % (p -Wert klei-

ner 0,001), mit 4 Gy auf 11,34 +/- 0,47 % (p-Wert kleiner 0,001) und mit 10 Gy auf 0,12 +/- 0,04 % (p-Wert kleiner 0,001) gegenüber der Kontrolle (100 +/- 12,64 %) gesenkt. Ab einer Dosis von 1 Gy konnten also signifikante Unterschiede (p-Wert kleiner als 0,05) zur Kontrolle beobachtet werden. Es konnte jedoch kein zusätzlicher Effekt von FG-3019 festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 37 veranschaulicht.

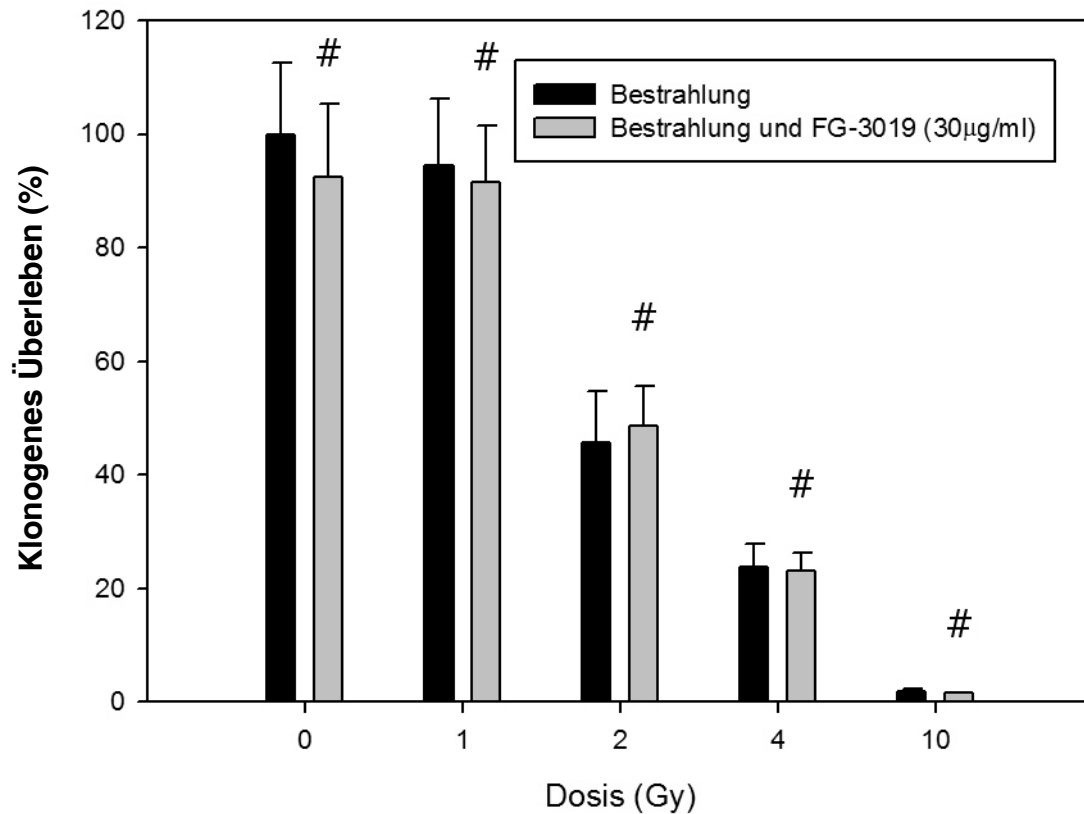


Abbildung 37: HUVEC im klonogenen Assay mit FG-3019 und Bestrahlung

Dargestellt ist das klonogene Überleben von bestrahlten HUVEC mit und ohne zusätzliche Behandlung mit FG-3019 (30 µg/ml) anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse ist die Bestrahlungsdosis (Gy) aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Kolonienzahlen in Prozent der Kontrollgruppe +/- Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zwischen der alleinigen Bestrahlung und der kombinierten Therapie (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.6.4 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von A549 unter Bestrahlung nicht

Auch bei A549 nahm das klonogene Überleben mit steigender Strahlendosis signifikant ab. Die relative Anzahl der klonogenen Einheiten wurde durch die Bestrahlung mit 1 Gy auf 74,61 +/- 14,2 % (p-Wert 0,016), mit 2 Gy auf 37,16 +/- 2,09 % (p-Wert kleiner 0,001), mit 4 Gy auf 11,34 +/- 0,47 % (p-Wert kleiner 0,001) und mit 10 Gy auf 0,12 +/- 0,04 % (p-Wert kleiner 0,001) gegenüber der Kontrolle (100 +/- 4,3 %) gesenkt. Ab einer Dosis von 1 Gy konnten also signifikante Unterschiede (p-Wert kleiner als 0,05) zur Kontrolle beobachtet werden. Es konnte jedoch kein zusätzlicher Effekt von FG-3019 festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 38 veranschaulicht.

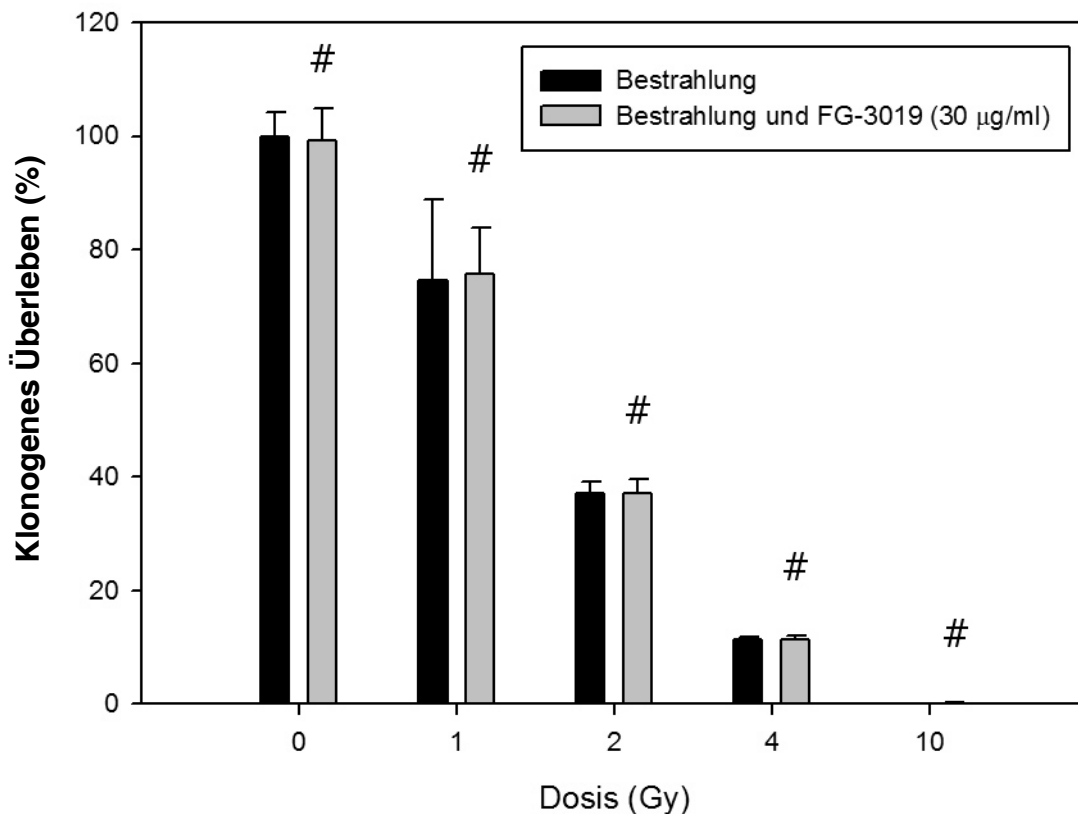


Abbildung 38: A549 im klonogenen Assay mit FG-3019 und Bestrahlung

Dargestellt ist das klonogene Überleben von bestrahlten A549 mit und ohne zusätzliche Behandlung mit FG-3019 (30 µg/ml) anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse ist die Bestrahlungsdosis (Gy) aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Kolonienzahlen in Prozent der Kontrollgruppe +/- Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zwischen der alleinigen Bestrahlung und der kombinierten Therapie (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.7 Reaktion von mit TGF- β behandelten Zellen auf FG-3019

Wie in Kapitel 1.5 (Einführung: Bestrahlung) erwähnt, ist eine der Auswirkungen von Strahlung die vermehrte Freisetzung von Zytokinen - insbesondere von TGF- β . Da die TGF- β Transduktionskaskade CTGF als Downstreammediator beinhaltet und somit durch die Behandlung mit FG-3019 unterbrochen werden sollte, war es von Interesse, spezifisch von TGF- β -vermittelte Strahlenwirkungen zu untersuchen und dabei andere Strahlungsschäden zu filtrieren. Dies wurde durch die Gabe von TGF- β anstelle von Bestrahlung erreicht. Strahlungsschäden, wie z. B. DNS-Brüche, die weitere Untersuchungen an der einzelnen Zelle unmöglich gemacht hätten, konnten so vermieden werden. Da sich in den bisherigen Versuchen bei HPF die Effekte von FG-3019 am besten nachweisen lassen konnten, wurden die Versuche mit zusätzlicher Stimulation durch TGF- β (10 ng/ml) mit dieser Zelllinie durchgeführt.

Im Folgenden werden die Wirkungen von TGF- β mit und ohne zusätzliche Behandlung mit FG-3019 auf das klonogene Überleben, die Adhäsion, die Migration und die Zellmorphologie von HPF dargestellt.

4.7.1 TGF- β hemmt das klonogene Überleben von HPF und FG-3019 attenuiert diesen Effekt

Im klonogenen Assay konnte eine signifikante hemmende Wirkung von TGF- β (10 ng/ml) auf Lungenfibroblasten beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (100 +/- 16,61 %) wurde das klonogene Überleben durch Gabe von TGF- β auf 61,02 +/- 9,1 % (p-Wert = 0,01) reduziert. Durch zusätzliche Behandlung mit FG-3019 (30 μ g/ml) war das klonogene Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe auf nur 77,12 +/- 10,38 % reduziert (p-Wert 0,17). Das entspricht einer signifikanten Steigerung der Anzahl der klonogenen Einheiten durch die zusätzliche Behandlung mit FG-3019

gegenüber der alleinigen Gabe von TGF- β um 26,39 \pm 3,55 % (p-Wert 0,17). Dieses Ergebnis bildet Abbildung 39 ab.

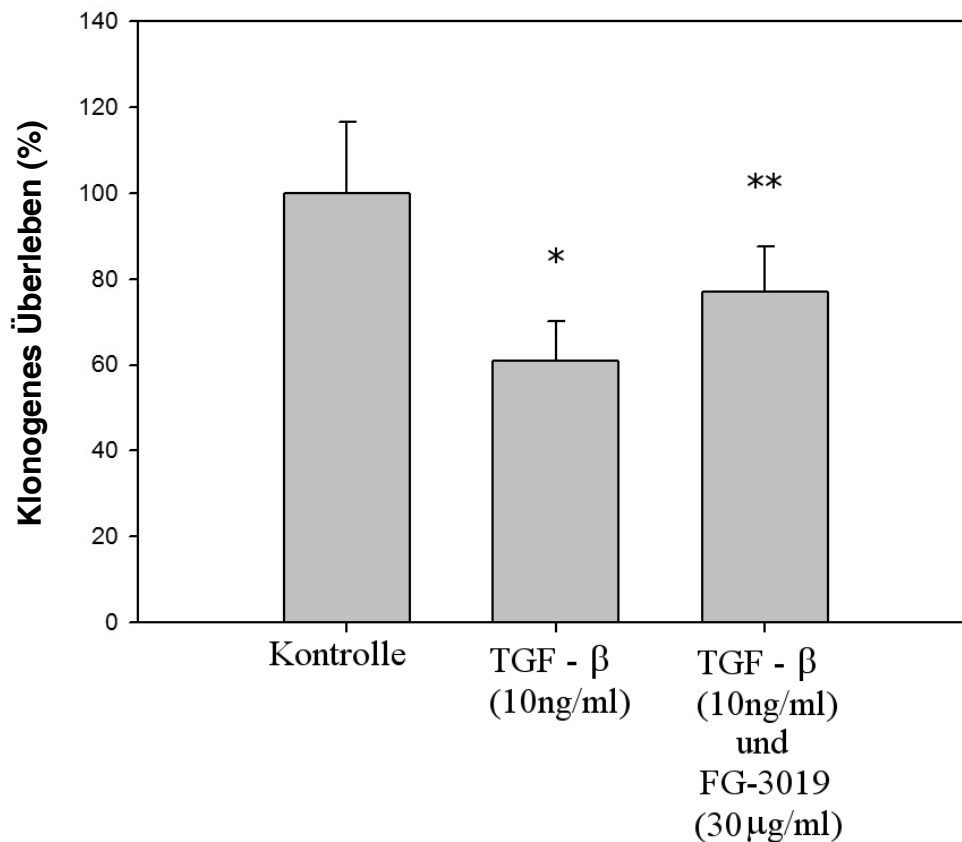


Abbildung 39: HPF im klonogenen Assay mit TGF- β und FG-3019

Dargestellt ist das klonogene Überleben von HPF nach TGF- β Gabe mit und ohne zusätzliche Behandlung mit FG-3019 (30 μ g/ml) anhand der gebildeten Kolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen besteht. Auf der X-Achse ist die Bestrahlungsdosis (Gy) aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Kolonienzahlen in Prozent der Kontrollgruppe \pm Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit einem Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe und zur alleinigen TGF- β -Gabe sind mit zwei Sternchen markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.7.2 TGF- β und die zusätzliche Behandlung mit FG-3019 haben keine Auswirkung auf die Adhäsion von HPF

Weder durch die Zugabe von TGF- β , noch durch die zusätzliche Behandlung mit FG-3019 konnten signifikante Unterschiede im Adhäsionsverhalten gemessen werden. Dieses Ergebnis zeigt Abbildung 40.

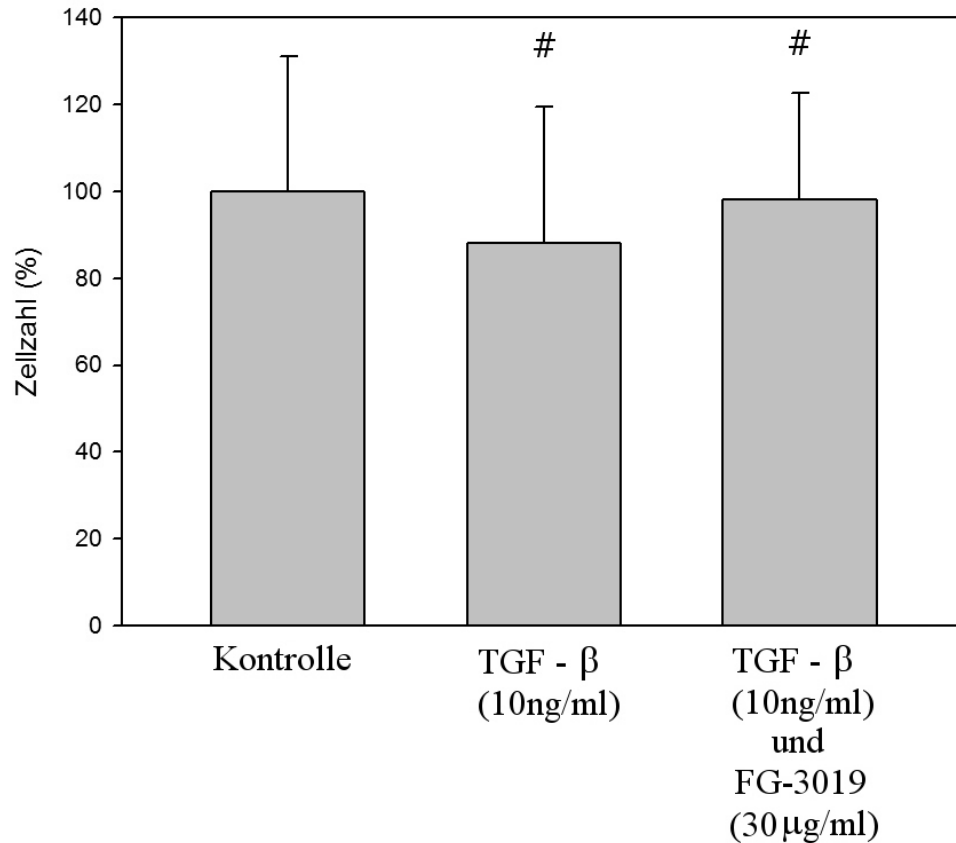


Abbildung 40: HPF im Adhäsions-Assay mit TGF- β und FG-3019

Dargestellt ist das Adhäsionsverhalten von HPF nach Behandlung mit TGF- β Gabe, mit und ohne zusätzliche Behandlung mit FG-3019 (30 μ g/ml). Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die mit FG-3019 behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle +/- Standardabweichung in Prozent der Kontrollgruppe aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert < 0,05) sind mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.7.3 FG-3019 reduziert die durch TGF- β stimulierte Migration von HPF

HPF wurden für 24 und 72 Stunden mit TGF- β inkubiert. Dann wurde mit den vorbehandelten HPF ein Migrations-Assay mit FG-3019 angesetzt. Die Migration wurde nach 5, 12 und 14 Stunden nach Behandlung mit FG-3019 quantifiziert.

4.7.3.1 Ergebnisse für 5 h Migrationszeit

Bereits nach fünf Stunden konnte eine signifikant gesteigerte Migration bei den mit TGF- β behandelten HPF festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (100 +/- 4,05 %) wurde die Anzahl der migrierten Zellen durch TGF- β Gabe für 24 Stunden vor Beginn des Migrations Assays auf 112,56 +/- 9,39 % (p-Wert = 0,025) gesteigert. Wenn zu Beginn der Migrationszeit mit FG-3019 behandelt wurde, konnte die Migration sowohl gegenüber der Migration nach TGF- β Gabe als auch gegenüber der Kontrolle signifikant auf 86,54 +/- 10,34 % der Kontrolle vermindert werden (p-Wert gegenüber der Kontrolle = 0,034; p-Wert gegenüber alleiniger TGF- β Gabe = 0,006). Wurde die Zeit der Vorbehandlung mit TGF- β auf 72 h ausgedehnt, waren sowohl die signifikante Stimulation der Migration durch TGF- β (119,49 +/- 17,02 %; p-Wert = 0,037), als auch der signifikante die Migration attenuierende Effekt durch FG-3019 (46,58 +/- 9,0 % , p-Wert gegenüber der Kontrolle kleiner 0,001, p-Wert gegenüber der alleinigen TGF- β Gabe 0,001) noch deutlicher als nach 24 Stunden. Diese Ergebnisse zeigen die Abbildungen 41 und 42.

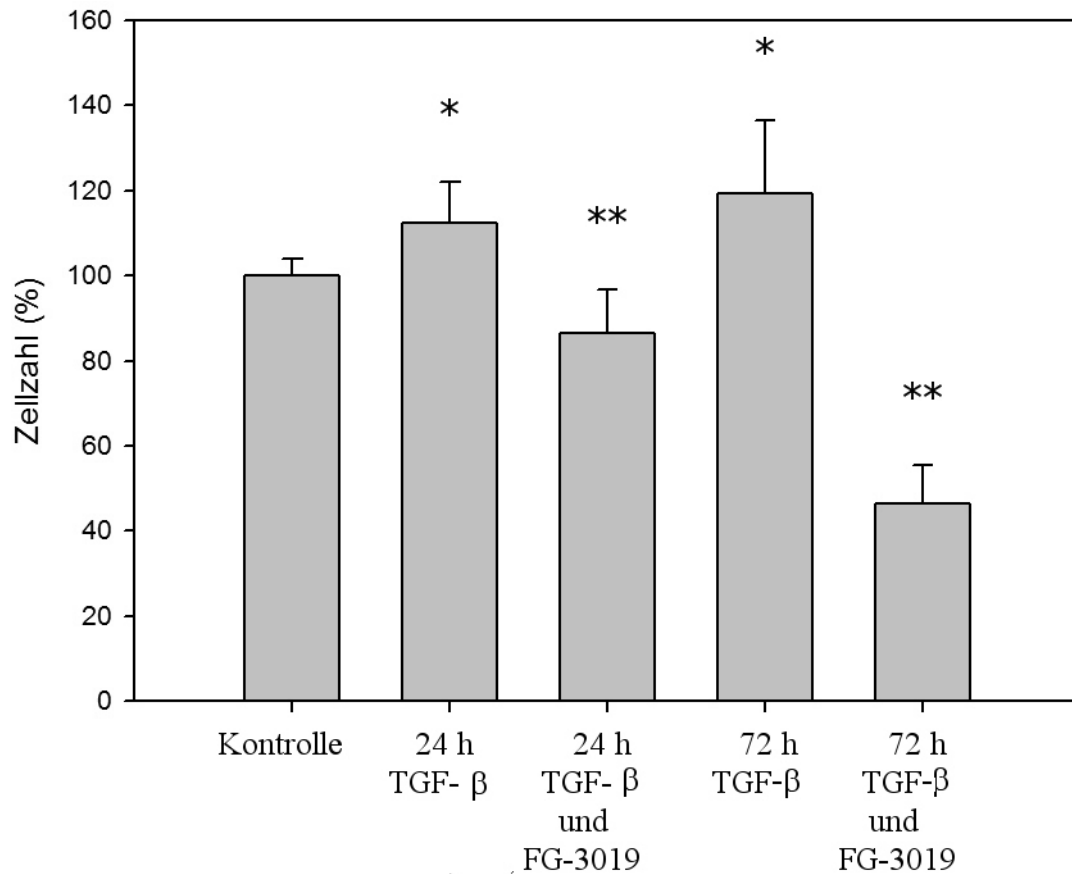
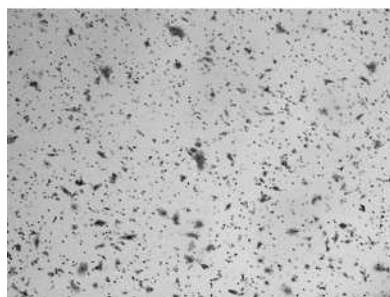


Abbildung 41: HPF im 5 Stunden Migrations-Assay mit TGF-β und FG-3019

Dargestellt ist das Migrationsverhalten von HPF innerhalb von 5 Stunden. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die für 24 bzw. 72 Stunden mit TGF-β (10 ng/ml) mit oder ohne anschließender Behandlung mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Anzahl der migrierten Zellen in Prozent +/- der Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p -Wert < 0,05) sind mit Sternchen, signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle und der alleinigen TGF-β Gabe sind mit zwei Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

24 h TGF-β



24 h TGF-β plus FG-3019

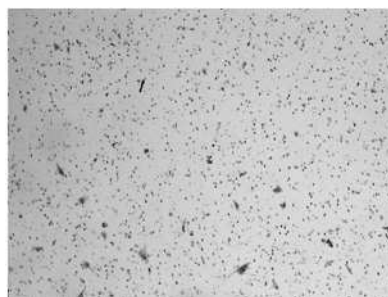


Abbildung 42: Migration von HPF nach 5 Stunden mit TGF-β und FG-3019

Gezeigt werden repräsentative Photos (20 x) der Migration von HPF nach alleiniger TGF-β (10 ng/ml) Gabe für 24 h mit und ohne anschließende Behandlung mit FG-3019 (30 µg/ml) nach 5 Stunden Migrationszeit.

4.7.3.2 Ergebnisse für 12 h Migrationszeit

Das Ergebnis nach 12 Stunden Migrationszeit bestätigte das Ergebnis, welches nach fünf Stunden beobachtet wurde. Es konnte eine signifikant gesteigerte Migration bei mit TGF- β behandelten HPF festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (100 +/- 3,94 %) wurde die Anzahl der migrierten Zellen durch TGF- β -Gabe für 24 Stunden vor Beginn des Migrations-Assays auf 113,42 +/- 13,01 % (p-Wert = 0,043) gesteigert. Wenn zu Beginn der Migrationszeit mit FG-3019 behandelt wurde, konnte die Migration sowohl gegenüber der Migration nach TGF- β -Gabe als auch gegenüber der Kontrolle signifikant auf 90,04 +/- 8,36 % der Kontrolle vermindert werden (p-Wert gegenüber der Kontrolle = 0,025; p-Wert gegenüber alleiniger TGF- β -Gabe = 0,013). Wurde die Zeit der Vorbehandlung mit TGF- β auf 72 h ausgedehnt, waren sowohl die signifikante Stimulation der Migration durch TGF- β (115,8 +/- 11,97 %; p-Wert = 0,012) als auch der signifikante, die Migration attenuierende Effekt durch FG-3019 (47,19 +/- 9,12 %, p-Wert gegenüber der Kontrolle kleiner 0,001, p-Wert gegenüber der alleinigen TGF- β Gabe kleiner 0,001) ebenfalls vorhanden. Diese Ergebnisse zeigt Abbildung 43:

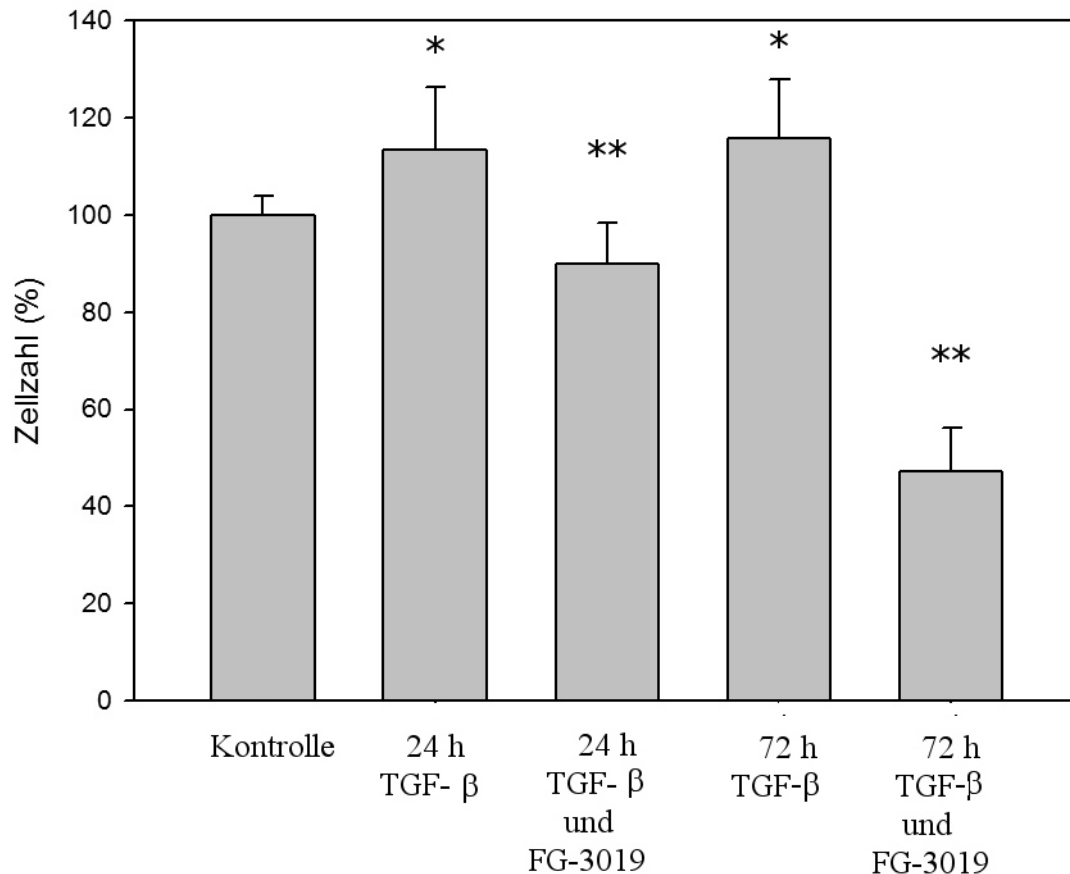


Abbildung 43: HPF im 12 Stunden Migrations-Assay mit TGF-β und FG-3019

Dargestellt ist das Migrationsverhalten von HPF innerhalb von 12 Stunden. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die für 24 bzw. 72 Stunden mit TGF-β (10 ng/ml) mit oder ohne anschließender Behandlung mit FG-3019 (30 µg/ml) behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Anzahl der migrierten Zellen in Prozent +/- der Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle und der alleinigen TGF-β Gabe sind mit zwei Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.7.3.3 Ergebnisse für 14 h Migrationszeit

Das Ergebnis nach 14 Stunden Migrationszeit glich dem Ergebnis nach fünf Stunden. Es konnte eine signifikant gesteigerte Migration bei mit TGF-β behandelten HPF festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (100 +/- 12,9 %) wurde die Anzahl der migrierten Zellen durch TGF-β-Gabe für 24 Stunden vor Beginn des Migrations Assays auf 119,44 +/- 11,61 % (p-Wert = 0,036) gesteigert. Wenn zu Beginn der Migrationszeit mit FG-3019 behandelt wurde, konnte die Migration sowohl gegenüber der Migration nach TGF-β-Gabe als auch gegenüber der Kontrolle signifikant auf 67,46 +/- 22,74 % der Kontrolle vermindert werden (p-Wert gegenüber der

Kontrolle = 0,024; p-Wert gegenüber alleiniger TGF- β -Gabe = 0,002). Wurde die Zeit der Vorbehandlung mit TGF- β auf 72 h ausgedehnt, waren sowohl die signifikante Stimulation der Migration durch TGF- β (125 +/- 12,65 %; p-Wert = 0,023), als auch der signifikante, die Migration attenuierende Effekt durch FG-3019 (49,6 +/- 5,61 %, p-Wert gegenüber der Kontrolle kleiner 0,001, p-Wert gegenüber der alleinigen TGF- β Gabe kleiner 0,001) noch deutlicher als nach 24 Stunden. Diese Ergebnisse zeigt Abbildung 44:

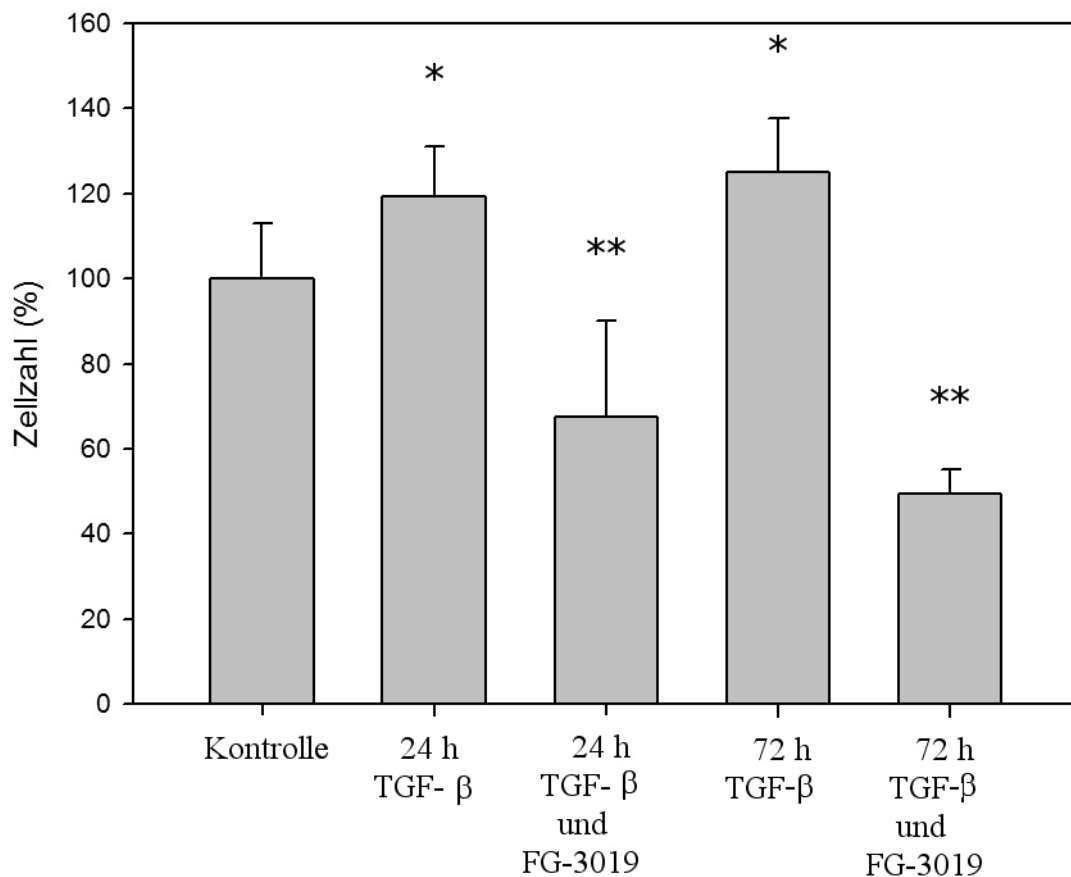


Abbildung 44: HPF nach 14 Stunden Migration mit TGF- β und FG-3019

Dargestellt ist das Migrationsverhalten von HPF innerhalb von 14 Stunden. Auf der X-Achse sind die Kontrollgruppe und die für 24 bzw. 72 Stunden mit TGF- β (10 ng/ml) mit oder ohne anschließender Behandlung mit FG-3019 (30 μ g/ml) behandelten Gruppen aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Anzahl der migrierten Zellen in Prozent +/- der Standardabweichung aufgetragen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (p-Wert < 0,05) sind mit Sternchen, signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle und der alleinigen TGF- β Gabe sind mit zwei Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit einer Raute markiert. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde für die X-Achse eine kategoriale Skalierung gewählt.

4.8 Mikroskopische Untersuchung des Wachstums und der morphologischen Entwicklung von HPF und A549

Um den Einfluss von Radiation – hier vermittelt über TGF- β – und FG-3019 und auch den Effekt beider Maßnahmen zusammen zu beobachten, wurden die (wie unter 3.6.1 bis 3.6.2 Materialien und Methoden beschrieben) behandelten Zellen unter dem Phasen-Kontrast Mikroskop beobachtet und in regelmäßigen Abständen Kontrollphotos angefertigt. Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) spielt bei der Entwicklung der Lungenfibrose eine wichtige Rolle. Kasai, Allen, Mason et al. wiesen 2005 eine durch TGF- β induzierte morphologische Veränderung, die zu EMT führt, bei A549 nach. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, ob EMT durch TGF- β -Behandlung auch bei Lungenfibroblasten nachgewiesen werden kann und somit die Differenzierung in Myofibroblasten beeinflusst. Zusätzlich soll die 2005 von Kasai, Allen, Mason et al. beobachtete morphologische Veränderung an A549 nachvollzogen werden.

4.8.1 A549

Bei den A549 ist nach 48 Stunden unter TGF- β Exposition eine deutliche morphologische Veränderung zu sehen. Die A549, die ohne Zusatz von TGF- β kultiviert worden sind, behalten bis zum Schluss morphologisch das typische epitheliale „Kopfsteinpflaster“-Muster.

Bei den mit 5 ng/ml TGF- β behandelten Zellen geht nach 48 Stunden die typische „Kopfsteinmuster“-Morphologie verloren. Die Zellen strecken sich und nehmen immer mehr eine den Fibroblasten ähnliche Morphologie an. Somit verändern sich die ursprünglich epithelialen Zellen immer mehr zu einem mesenchymalen Phänotyp.

Zusätzlich kann beobachtet werden, dass die behandelten A549 mit der Zeit ihren Zell-zu-Zell Kontakt verlieren. Nach 72 Stunden stellt sich die Abnahme der Adhäsion besonders deutlich dar.

Die genannten Ergebnisse der morphologischen Veränderungen deuten darauf hin, dass unter der Behandlung von TGF- β ein mesenchymaler Phänotyp eingenommen wird. Diese morphologischen Veränderungen sind in den Abbildungen 45 und 46 zu erkennen.

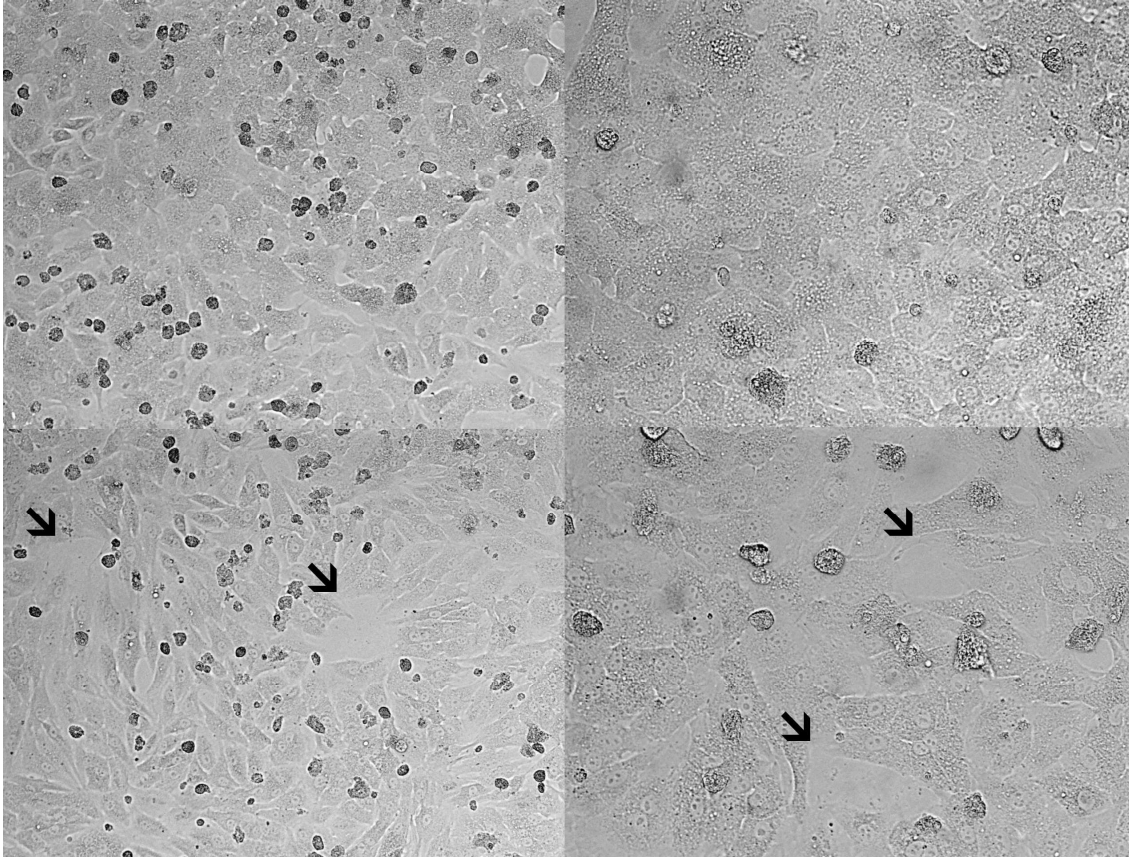


Abbildung 45: Wachstum von A549 nach 48 Stunden mit TGF- β

Gezeigt werden repräsentative Photos (10 x links und 20 x rechts) des Wachstums von A549 nach 48 Stunden. Es wird eine unbehandelte Kontrollgruppe (oben), mit einer TGF- β behandelten Gruppe (unten) verglichen. Auf den beiden oberen Bildern ist zu sehen, dass die unbehandelten A549 ihr typisches „Kopfsteinpflastermuster“ beibehalten. Auf den beiden unteren Bildern ist zu sehen, wie die behandelten A549 langsam ihren Zellkontakt zueinander verlieren und dadurch größere Abstände zwischen den Zellen entstehen (Pfeile).

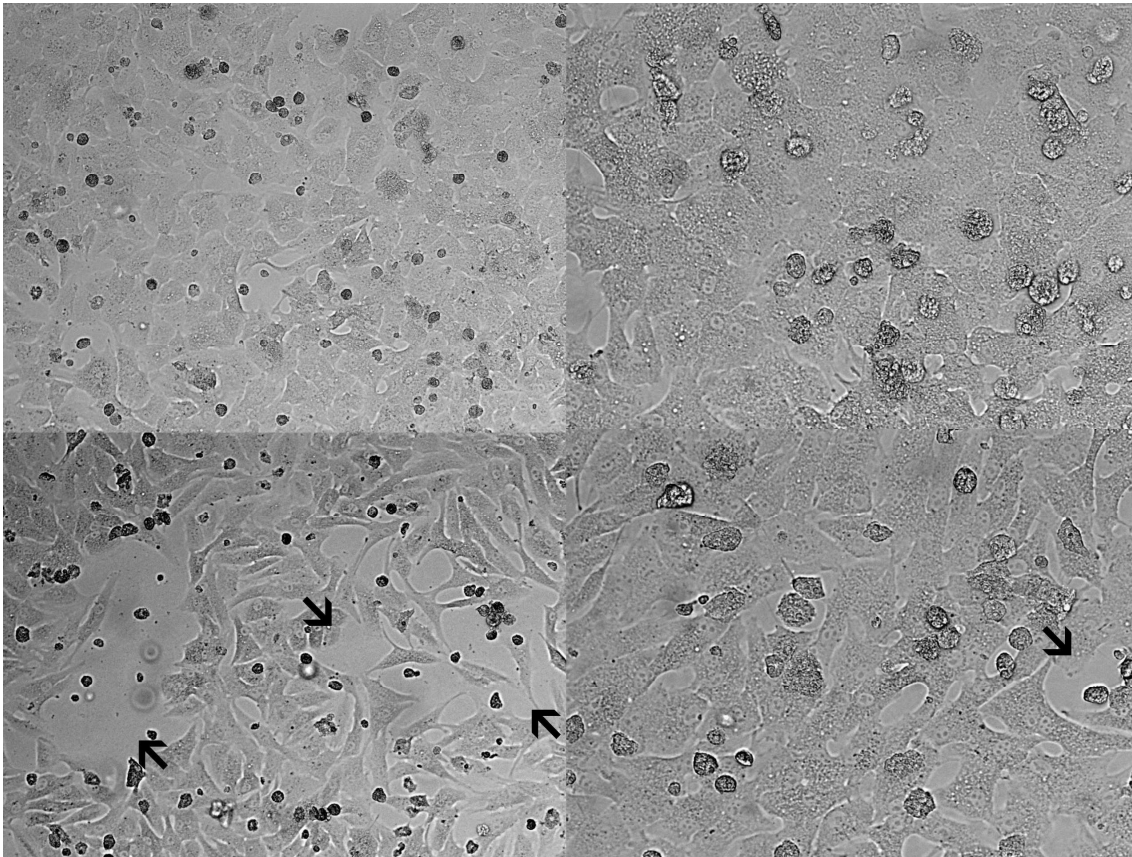


Abbildung 46: Wachstum von A549 nach 72 Stunden mit TGF- β

Gezeigt werden repräsentative Photos (10 x links und 20 x rechts) des Wachstums von A549 nach 72 Stunden. Es wird eine unbehandelte Kontrollgruppe (oben), mit einer TGF- β behandelten Gruppe (unten) verglichen. Bei der Kontrollgruppe sind morphologisch typische Lungenkarzinomzellen zu sehen. Bei der behandelten Gruppe verlieren die Zellen ihre typische Form und den Zellkontakt (Pfeile). Im Zellrasen entstehen größere Lücken und die Zellen nehmen morphologisch eher eine fibroblastenartige Form an.

4.8.2 HPF

Bei den HPF sind im Gegensatz zu den A549 keine morphologischen Veränderungen unter TGF- β Stimulation zu beobachten. Sowohl die typische Fibroblastenmorphologie als auch die Zelladhäsion blieben erhalten und es gab keinen Hinweis, dass unter TGF- β Stimulation ein mesenchymaler Phänotyp eingenommen wird. Dies ist in den Abbildungen 47 bis 52 zu sehen.

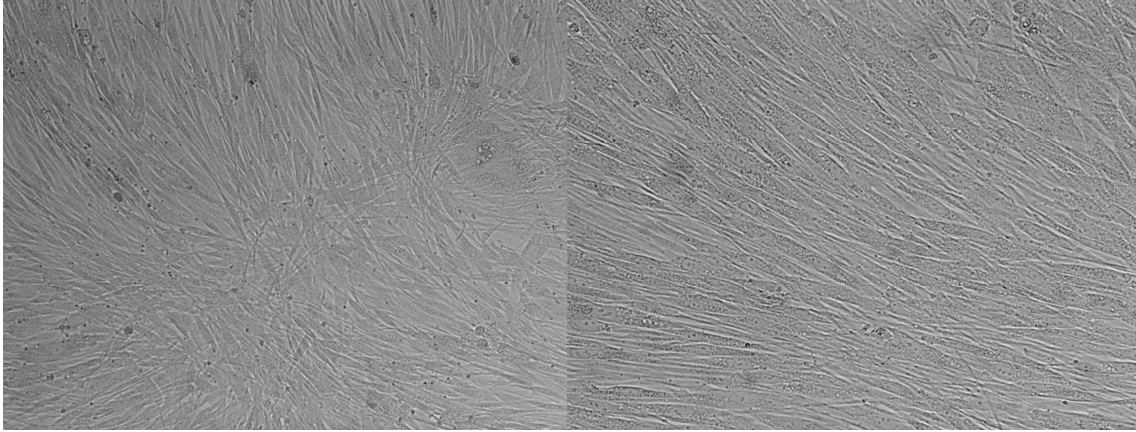


Abbildung 47: Monolayer von unbehandelten HPF

Gezeigt werden repräsentative Photos (10 x links und 20 x rechts) von HPF zum Zeitpunkt 0 des Versuchsansatzes. Zu sehen ist die typische Form von unbehandelten Lungenfibroblasten.

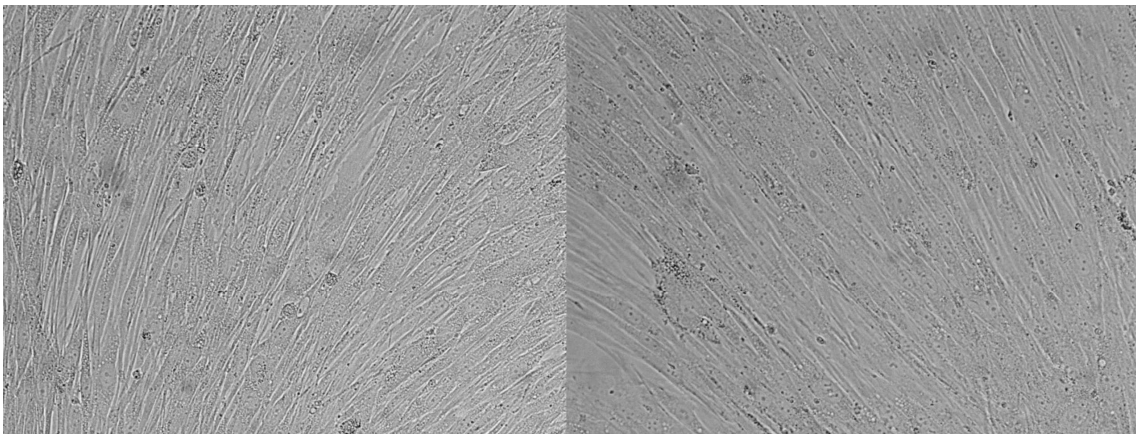


Abbildung 48: Wachstum von HPF nach 24 Stunden mit TGF- β

Gezeigt werden repräsentative Photos (20 x) des Wachstums von HPF nach 24 Stunden. Es wird eine unbehandelte Kontrollgruppe (links) mit einer TGF- β behandelten Gruppe (rechts) verglichen. Morphologisch unterscheidet sich die behandelte Gruppe nicht von der unbehandelten Gruppe.



Abbildung 49: Wachstum von HPF nach 48 Stunden mit TGF- β

Gezeigt werden repräsentative Photos (10 x links und 20 x rechts) des Wachstums von HPF nach 48 Stunden. Es wird eine unbehandelte Kontrollgruppe (oben) mit einer TGF- β behandelten Gruppe (unten) verglichen. Morphologisch unterscheidet sich die behandelte Gruppe nicht von der unbehandelten Gruppe.



Abbildung 50: Wachstum von HPF nach 72 Stunden mit TGF- β

Gezeigt werden repräsentative Photos (10 x und 20 x) des Wachstums von HPF nach 72 Stunden. Es wird eine unbehandelte Kontrollgruppe (oben; 10x) mit einer TGF- β behandelten Gruppe (unten; 10 x links und 20 x rechts) verglichen. Morphologisch unterscheidet sich die behandelte Gruppe nicht von der unbehandelten Gruppe.

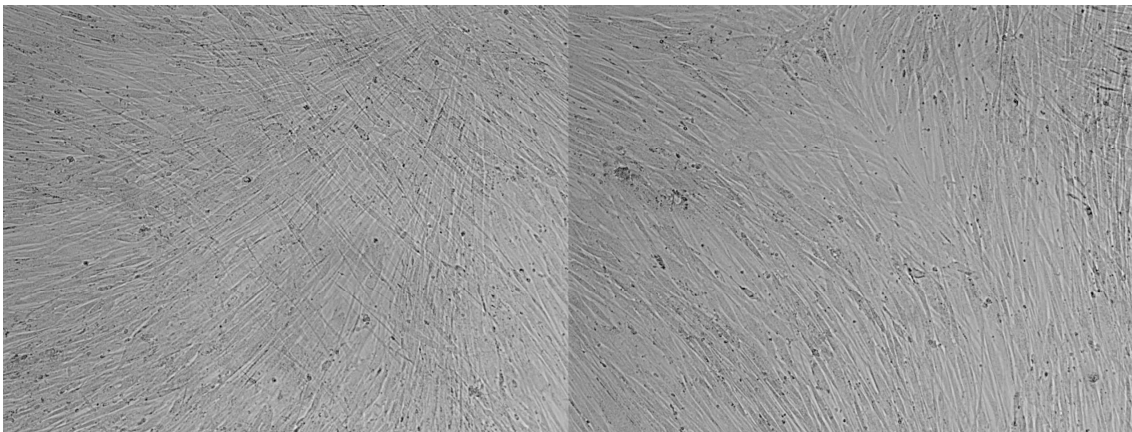


Abbildung 51: Wachstum von HPF nach 96 Stunden mit TGF- β

Gezeigt werden repräsentative Photos (10 x) des Wachstums von HPF nach 96 Stunden. Es wird eine unbehandelte Kontrollgruppe (links) mit einer TGF- β behandelten Gruppe (rechts) verglichen. Morphologisch unterscheidet sich die behandelte Gruppe nicht von der unbehandelten Gruppe.

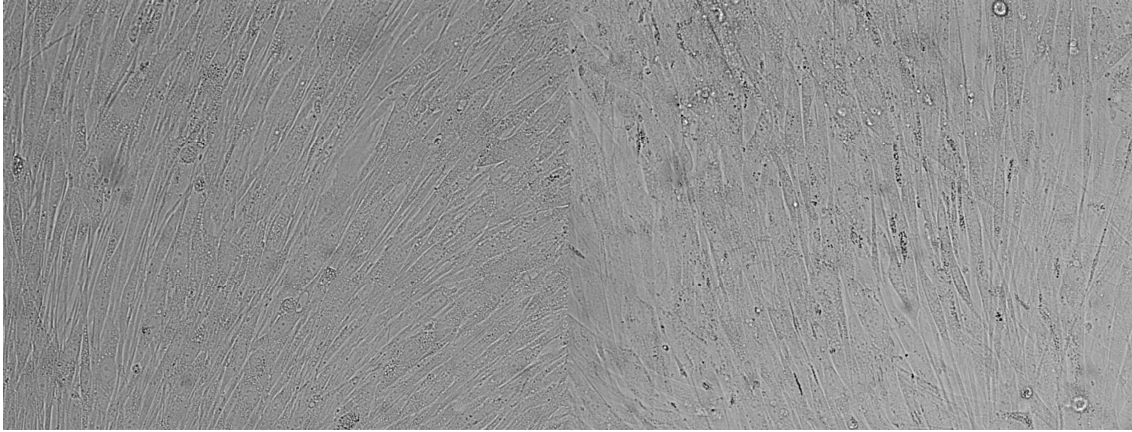


Abbildung 52: Wachstum von HPF zum Zeitpunkt 0 des Versuchsansatzes und nach 96 Stunden mit TGF- β

Gezeigt werden repräsentative Photos (10 x) des Wachstums von HPF. Es wird eine Kontrollgruppe zu Beginn des Versuchsansatzes (links) mit einer TGF- β behandelten Gruppe nach 96 Stunden (rechts) verglichen. Morphologisch unterscheidet sich die Kontrollgruppe zu Beginn des Versuches nicht von der behandelten Gruppe nach 96 Stunden.

4.9 Die Auswirkung von TGF- β auf die Expression verschiedener Proteine

Die Expression von CTGF, Kollagen IV und α -SMA mit und ohne TGF- β Stimulation wurde an den Tumorzellen A549 und den HPF untersucht.

4.9.1 A549

Es wurde jeweils eine Kontrollgruppe, eine mit TGF- β behandelte, eine mit TGF- β und FG-3019 inkubierte und eine nur mit FG-3019 behandelte Gruppe untersucht. Sobald nach 24 h morphologische Veränderungen auffielen, wurden jeweils im Abstand von 24 Stunden die Proteinisolierungen und Western Blots durchgeführt.

4.9.1.1 Kollagen IV

Bereits nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erhöhte TGF- β deutlich die Expression von Kollagen IV der A549 Zellen im Gegensatz zu den Kontrollgruppen. Eine weitere Steigerung der Expression konnte durch längere Inkubationszeiten nicht erreicht werden. Es erfolgte tendenziell bei steigender Inkubationszeit mit TGF- β sogar

eher eine Abnahme des Kollagen IV, was durch Abbau des bereits exprimierten Kollagen IV zu erklären ist.

Die Zugabe von FG-3019 zu TGF- β behandelten Zellen bewirkte sowohl nach 48 Stunden als auch nach 72 Stunden eine verminderte Expressierung von Kollagen IV im Vergleich zu den ausschließlich mit TGF- β behandelten Zellen. Die Produktion von Kollagen IV der mit TGF- β und FG-3019 behandelten Zellen war allerdings nicht so gering wie die der Kontrollgruppen.

Im Gegensatz zu den Kontrollen wurde von den nur mit FG-3019 behandelten Zellen zu jedem Inkubationszeitpunkt mehr Kollagen IV exprimiert.

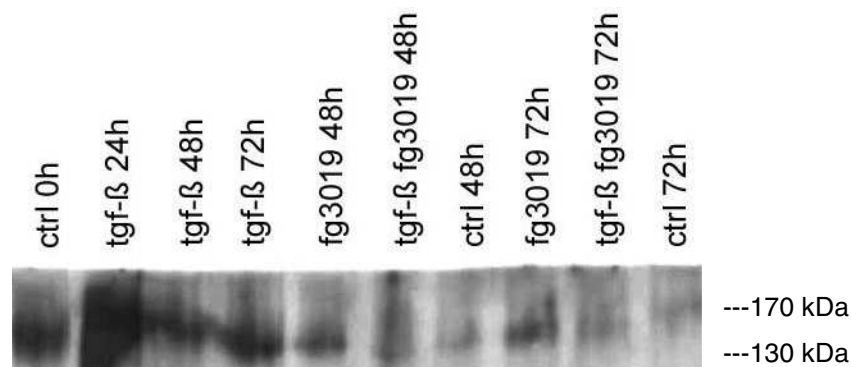


Abbildung 53: Expression von Kollagen IV in A549

4.9.1.2 α -SMA

Es konnte eine leicht vermehrte Expressierung von α -SMA nach der Stimulation mit TGF- β gezeigt werden. Die Inkubationszeit von TGF- β spielte dabei keine Rolle. Die Behandlung der TGF- β stimulierten Zellen mit FG-3019 führt wieder zu einem Rückgang der vorher durch TGF- β stimulierten Expression von α -SMA und glich im Wesentlichen den Kontrollgruppen und den ausschließlich mit FG-3019 behandelten Gruppen. Besonders deutlich war eine Abnahme der α -SMA-Expression bei den 72 Stunden mit TGF- β stimulierten und FG-3019 behandelten Zellen zu beobachten. Bei den 48 Stunden mit TGF- β stimulierten Zellen konnte unter der FG-3019-Behandlung kein wesentlicher Unterschied der α -SMA Expression bemerkt werden.

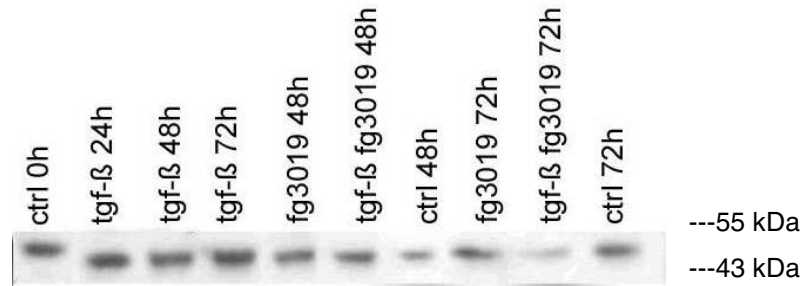


Abbildung 54: Expression von α -SMA in A549

4.9.1.3 CTGF

Mit dem Antikörper FG-3019 können zwar - nach Optimierung des Versuchs - Banden dargestellt werden, allerdings erschien diese Bandenbildung so gering, dass sie nur mit einer starken Belichtung darstellbar war. Eine Veränderung der CTGF Expression durch unterschiedliche Behandlungen mit FG-3019 und TGF- β konnte nicht nachgewiesen werden.



Abbildung 55: Expression von CTGF in A549

(Der Scan erfolgte nicht genau im rechten Winkel.
Deshalb verlaufen die Banden von links nach rechts abfallend.)

4.9.2 HPF

Auch bei den HPF gab es jeweils eine Kontrollgruppe, eine TGF- β behandelte, eine TGF- β und FG-3019 behandelte und eine nur mit FG-3019 behandelte Gruppe. Auch hier wurde auf morphologische Veränderungen gewartet und mehrmals daraufhin kontrolliert. Nach 48 Stunden konnten noch keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden.

bachtet werden. Da aber bereits nach 24 Stunden bei den A549 Veränderungen zu sehen waren, wurden dann auch bei den HPF nach 48 Stunden Proteinisolierungen durchgeführt, um auf diesem Weg eventuelle Zellveränderungen zu untersuchen.

4.9.2.1 Kollagen IV

Die Expressierung von Kollagen IV nahm bereits nach 48 Stunden durch die Behandlung mit TGF- β deutlich zu. Noch deutlicher war dieser Effekt nach 72 Stunden zu sehen. Nach 96 Stunden wurde die Bande sichtlich verwaschener, was auf eine Abnahme von Kollagen IV schließen lässt und auch hier wieder durch die Verstoffwechselung des Proteins verursacht war. Sehr deutlich war zu sehen, dass in der Kontrollgruppe nach 96 Stunden keine Expressierung von Kollagen IV zu beobachten war.

Durch die Behandlung mit FG-3019 konnte keine Veränderung der Kollagen Bande der TGF- β stimulierten Zellen beobachtet werden.

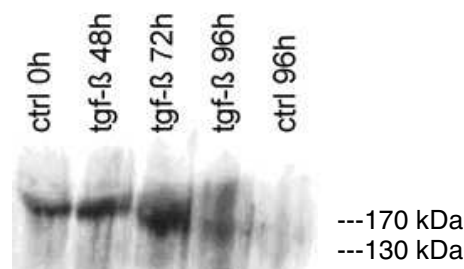


Abbildung 56: Expression von Kollagen IV in HPF

4.9.2.2 α -SMA

Deutlich war zu sehen, dass die α -SMA Expressierung durch TGF- β Stimulation zunahm. Am deutlichsten war die Zunahme nach 72 Stunden Stimulation, wobei sie bei einer Stimulation von 96 Stunden abnahm und fast wieder der Kontrolle glich.

Nach 48 Stunden konnte keine Veränderung der α -SMA Expressierung der TGF- β stimulierten Zellen durch die Behandlung mit FG-3019 oder der ausschließlich mit FG-3019 behandelten Zellen festgestellt werden. Zu sehen war jedoch, dass die Kontrollgruppe nach 48 Stunden deutlich weniger α -SMA exprimierte als die anderen Gruppen nach 48 Stunden.

Die durch TGF- β nach 72 Stunden stark vermehrte α -SMA Expressierung konnte durch die Behandlung mit FG-3019 nicht gemindert werden. Die α -SMA Expressierung der ausschließlich mit FG-3019 behandelten Zellen glich nach 72 Stunden der Kontroll-

gruppe. Die α -SMA Expression der Kontrollgruppen glichen einander sowohl nach 48, 72 als auch nach 96 Stunden.

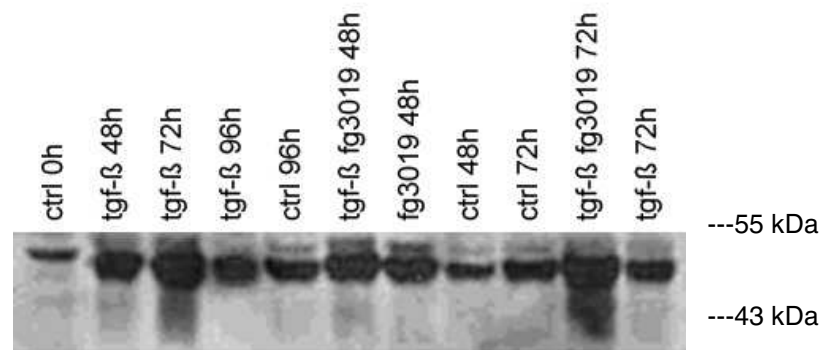


Abbildung 57: Expression von α -SMA in HPF

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden die Wirkungen des humanen, monoklonalen IgG Antikörpers FG-3019 gegen den Connective Tissue Growth Factor (CTGF), ein Protein der CCN-Reihe, auf humane Lungenfibroblasten (HPF), humane Hautfibroblasten (NHDF), humane dermale Endothelzellen (HUVEC), humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HDMEC) und Tumorzellen eines humanen Lungenkarzinoms (A549) allein und in Kombination mit ionisierender Strahlung untersucht. Diese Fragestellung ist deshalb relevant, weil CTGF einerseits an der fibrotischen Umwandlung von Geweben, besonders von Lungengewebe, und andererseits an der Tumorprogression beteiligt ist. In neuesten Ergebnissen, auch der Arbeitsgruppe, konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des CTGF Signalings einen hemmenden Einfluss auf die Entstehung einer strahlenbedingten Lungenfibrose in Mäusen ausüben kann (Bickelhaupt et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit werden besonders die Wirkungen auf Zellebene *in vitro* an relevanten Zelltypen untersucht. Im Wesentlichen zeigte sich, dass der CTGF Antikörper FG-3019 spezifisch profibrotische, besonders auch strahleninduzierte und Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) induzierte profibrotische Veränderungen in humanen Lungenfibroblasten attenuiert, während dermale Fibroblasten und Endothelzellen sowie A549 Lungenkarzinomzellen weniger stark beeinflusst werden. Als Ausnahme wurde gefunden, dass FG-3019 die TGF- β induzierte epitheliale mesenchymale Transition (EMT) nicht nur in Lungenfibroblasten sondern auch in den epithelialen A549 Karzinomzellen attenuierte. Zusammengefasst bieten die hier vorgelegten Daten eine mechanistische Erklärungsmöglichkeit auf Zellebene *in vitro* für den Befund *in vivo*, nämlich dass FG-3019 an einem Mausmodell phänomenologisch strahleninduzierte Lungenfibrose reduzieren konnte (Bickelhaupt et al., 2010).

Vor dem Hintergrund der Zunahme der Inzidenz des Lungenkarzinoms (Pirozynski, 2006) und der Häufigkeit des Mammakarzinoms, bei denen die Strahlentherapie des Thorax eingesetzt wird und als ein auslösender Faktor fibrotischer Umbauprozesse im Lungengewebe gilt, ist die Thematik der vorliegenden Arbeit die Untersuchung von Effekten, die FG-3019 auf Zellen *in vitro* hat.

Da CTGF im Zusammenspiel mit TGF- β , aber auch unabhängig davon wirkt, wurde auch die Bedeutung von TGF- β in Kombination mit FG-3019 mit und ohne ionisierender Strahlung untersucht. Dies erschien sinnvoll, da TGF- β durch ionisierende Strahlen induziert werden kann und eine wichtige Rolle bei der Fibrogenese in vielen Organen (Flehsig et al., 2012) einschließlich bei strahleninduzierter Lungenfibrose spielt (Barcellos-Hoff, 1998, und Munger, Harpel, Gleizes et al., 1997).

5.1 Einfluss von FG-3019 auf humane Zellen in vitro

Nach Bestrahlung der Zellen (Lungenfibroblasten, Hautfibroblasten, Endothelzellen und Tumorzellen) mit ansteigender Dosis (1-10 Gy) wurde das klonogene Überleben mit und ohne Vorbehandlung mit FG-3019 ermittelt. Bei allen Zelltypen zeigte sich mit zunehmender Bestrahlungsstärke eine Abnahme des klonogenen Wachstums. Bei einer Bestrahlung von 10 Gy waren lediglich noch Zelltrümmer zu erkennen. Bei keiner Zellart zeigte FG-3019 einen protektiven Effekt bezogen auf das klonogene Wachstum. Umgekehrt wurde auch die Strahlensensitivität durch die Vorbehandlung nicht erhöht.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Zellen mit TGF- β inkubiert, da dieser Faktor in der Strahlungskaskade freigesetzt wird und so teilweise Wirkungen einer Bestrahlung ohne typische Strahlenschäden simuliert. Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, ist TGF- β über unterschiedliche Mechanismen stark fibrotisch wirksam und gilt als Schlüsselzytokin der Lungenfibrose. Insgesamt induziert Bestrahlung die Synthese von TGF- β (Sheppard, 2001, und Finkelstein, Johnston, Baggs et al., 1994), was wiederum zu einer Selbstaktivierung der Zellen führt (Kolb, Willner, Koeberlein et al., 1999). TGF- β beeinflusst sowohl die Produktion als auch den Abbau des Bindegewebes, es überwiegt jedoch die synthetisierende Komponente (Gauldie, Jordana, Cox, 1993). Zusätzlich kann dieser Faktor die pulmonalen Fibroblasten zu einer vermehrten Produktion von Kollagen I und II anregen (Fine, Goldstein, 1987) und die Differenzierung zu terminalen Fibrozyten fördern. Gleichzeitig wirkt TGF- β inflammatorisch, so dass die Entstehung der strahlenbedingten Pneumonitis gefördert wird (Suzuki, Tanigaki, Heimer et al., 1994). Die Induktion der nachfolgenden Strahlenfibrose wird durch TGF- β ebenfalls unterstützt (Martin, Lefaix, Delanian, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass FG-3019 das klonogene Wachstum von primären humanen Lungenfibroblasten dosisabhängig hemmt. Interessanterweise wurden humane Hautfibroblasten nicht signifikant in ihrem klonogenen Wachstum durch FG-3019 beeinflusst. Humane Lungen-Endothelzellen reagierten ebenfalls nicht auf die Zugabe von FG-3019. Auch auf das klonogene Überleben des Lungenkarzinoms A549 hatte FG-3019 keinen signifikanten Einfluss. Dies spricht für eine gewisse Organ- und Zellspezifität und kann bezüglich eines therapeutischen Einsatzes von FG-3019 beim Menschen wichtig sein.

Zusätzlich wurde hier gefunden, dass das klonogene Wachstum von humanen Lungenfibroblasten unter dem Einfluss des TGF- β im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gemindert wird. Gibt man jedoch FG-3019 zu diesem Versuchsansatz hinzu, zeigt sich eine geringere Inhibition. Dies bedeutet, dass FG-3019 bestimmte Wirkungen von TGF- β reduzieren kann.

Um einen weiteren Endpunkt für Zellüberleben bzw. Zellproliferation zu testen, wurde in analogen Ansätzen das proliferative Wachstum der Zellen in verschiedenen Kombinationen mit FG-3019 im 72 h Proliferationsassay untersucht. Ähnlich wie im klonogenen Assay reduzierte FG-3019 dosisabhängig die Zellzahl von Lungenfibroblasten im Proliferationsassay, während FG-3019 keinen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Hautfibroblasten oder A549 Tumorzellen hatte. Die Proliferation von HUVEC Zellen wurde durch FG-3019 in der am höchsten gewählten Dosierung von 100 $\mu\text{g/ml}$ demgegenüber leicht gehemmt.

In der Literatur finden sich, insbesondere im Hinblick auf das Proliferationsverhalten der Lungenfibroblasten unter dem Einfluss von TGF- β , widersprüchliche Angaben. So bestätigten Untersuchungen die deutliche Hemmung der Proliferation unter TGF- β (Hakenjos, Bamberg, Rodeman, 2000, und Burger, Loeffler, Bamberg, 1998), es gibt jedoch auch Studien, die eine Proliferationsstimulation der Lungenfibroblasten unter TGF- β Einfluss zeigen konnten (Vujaskovic, Marks, Anscher, 2000, und Herskind, Bamberg, Rodemann, 1998). Dies deutet daraufhin, dass die Wirkung von TGF- β stark vom Kontext wie beispielsweise dem Mikromilieu und anderen intrinsischen und extrinsischen Faktoren abhängen kann.

Um weitere Wirkungen von FG-3019 auf die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen zu untersuchen, ist die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit der FG-3019 Konzentration gemessen worden. Wie schon beim klonogenen und proliferativen Wachstum, wurde speziell die Vitalität von Lungenfibroblasten durch FG-3019 stark gehemmt, während der Antikörper weder auf die Hautfibroblasten noch auf die Endothelzellen oder auf die A549 Lungentumorzelllinie einen wesentlichen Einfluss hatte.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit FG-3019 das Adhäsionsverhalten der unterschiedlichen Zellen beeinflussen konnte. Interessanterweise hatte FG-3019 keinen Einfluss auf die Adhäsion von Hautfibroblasten, Endothelzellen oder A549 Tumorzellen, während die Lungenfibroblasten durch FG-3019 - wenn auch im geringen Maße - signifikant gehemmt wurden.

Ebenso wurde hier gefunden, dass FG-3019 die Migrationsfähigkeit von Lungenfibroblasten reduzieren konnte, während Endothelzellen sowie A549 in ihrem Migrationsverhalten kaum beeinflusst wurden. Dabei waren die Effekte umso stärker, je länger die Einwirkzeit war.

Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass TGF- β die Migration von Lungenfibroblasten wesentlich steigerte. Wurde zu diesen Versuchsansätzen FG-3019 zugegeben, ergab sich eine deutliche Minderung der Migration, die von der Dauer der Einwirkzeit des TGF- β abhängig war. Diese Versuchsreihe konnte demnach wieder belegen, dass ein spezifischer Einfluss von FG-3019 auf das Verhalten der Lungenfibroblasten besteht, der Wirkungen von TGF- β antagonisiert.

Die erste Versuchsreihe, bei der weder ionisierende Strahlung auf die Zellen einwirkte noch profibrotische Zytokine zu den Zellen hinzugegeben wurden, zeigte den hemmenden Einfluss von FG-3019 auf das klonogene Wachstum, die Proliferationsrate, die Adhäsion, die Migration sowie die Vitalität von primären humanen Lungenfibroblasten. Es stellte sich heraus, dass keiner dieser Effekte bei den anderen getesteten Zellen auftrat.

Zusätzlich zeigten die durchgeführten Versuche der vorliegenden Studie, dass FG-3019 als potenter Antikörper von CTGF die TGF- β induzierte Hemmung des klonogenen Überlebens der Lungenfibroblasten genauso wie die TGF- β induzierte Zunahme der

Migration zum Teil aufheben kann. Diese Mechanismen sprechen dafür, dass FG-3019 durch TGF- β getriggerte fibrotische Umbauprozesse reduzieren könnte.

5.1.1 Beeinflussung der „Epithelial-to-Mesenchymal Transition“ durch TGF- β

Die sogenannte Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) gilt als ein bedeutender Faktor bei der Entstehung der Lungenfibrose. Pneumozyten Typ I sind als Epithelzellen, die auf der Alveolarmembran sitzen, den Noxen, die auf die Lunge einwirken, direkt ausgesetzt (Crouch, 1990). Willis et al. konnten im Jahr 2006 nachweisen, dass Pneumozyten Typ I nach einer Gewebsverletzung - wie z. B. bei einer Radiotherapie - im Rahmen eines Vernarbungsprozesses zu Myofibroblasten differenzieren können. Diese wiederum wirken über die Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix profibrotisch (Willis, duBois, Borok, 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TGF- β im Sinne einer EMT auch Lungenfibroblasten anregt, sich zu Myofibroblasten umzuformen (Hu, Wu, Phan 2003). Auch in vitro Versuche belegten eine durch TGF- β bedingte Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten (Powell, Mifflin, Valentich et al., 1999, und Abe, Donnelly, Peng, 2001). Ebenso können Alveolarepithelzellen unter Einfluss des TGF- β ein so genanntes EMT-Proteom exprimieren, das die Transdifferenzierung zu Myofibroblasten zur Folge hat (Zavadil, Böttinger, 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, inwieweit TGF- β 1 eine EMT im gewählten Versuchsansatz der Lungenfibroblasten zu Myofibroblasten auslösen kann und welchen Einfluss FG-3019 auf diesen Prozess hat. Da bekannt war, dass TGF- β auch in Tumorzellen der Linie A549 eine EMT induzieren kann (Kasai, Allen, Mason et al., 2005), konnte zunächst nachgewiesen werden, dass Tumorzellen (A549) in ihrer morphologischen Struktur durch TGF- β verändert werden. Innerhalb von 48 Stunden Einwirkzeit verloren die A549 Zellen ihren epithelialen Phänotyp und entwickelten eine mesenchymale Ausprägung. Gleichzeitig wurden durch TGF- β die Zell-zu-Zell-Kontakte der Tumorzellen reduziert, so dass ihre Adhäsionsfähigkeit deutlich abnahm. Auf Proteinebene im Western Blot Assay konnte nach 24 Stunden eine deutlich gesteigerte Kollagensynthese Typ IV bestimmt werden. Interessanterweise wurde durch Zugabe von FG-3019 die Kollagenexpression der Tumorzellen vermindert, jedoch nicht auf das Level der Syntheseleistung unbehandelter Tumorzellen. Kollagen

Typ IV gilt als Hauptkollagen der Basalmembran und setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen (Tryggvason, Soininen, Hastikka et al., 1990). Auch die Expression von α -SMA Protein, das typischerweise von Myofibroblasten gebildet wird und ebenfalls profibrotisch wirkt, wurde durch TGF- β gering stimuliert, was durch FG-3019 aufhebbar war. Demgegenüber wurde die Synthese von CTGF weder durch die Zugabe von TGF- β noch durch die Inkubation mit FG-3019 signifikant verändert.

Damit erhöhte TGF- β 1 die Kollagen- als auch die α -SMA-Syntheseleistung, während die Expression von CTGF in A549 Zellen unbeeinflusst blieb. Im Hinblick auf Fibrogenese aber auch Tumorprogression sind dies fördernde Wirkungen z. B. über die proangiogenen Wirkungen. Da unter anderem TGF- β eine Immunsuppression erzeugen kann (Horwitz, Gray, Ohtsuka, 1999), ist ein weiterer fördernder Effekt hinsichtlich der Tumorprogression zu erwarten, wie sich z. B. in Studien zum Glioblastom gezeigt hat (Zhang, Kleber et al., 2011 und Zhang, Herion et al., 2011). In diesem Sinne sprechen die Daten der vorliegenden Arbeit bezüglich der inhibitorischen Effekte von FG-3019 auf den Einfluss von TGF- β auf Tumorzellen dafür, dass FG-3019 auch eine Rolle als Tumorthapeutikum spielen könnte. In der Tat sprechen eigene Daten am orthotopen Glioblastom (Röhrich et al., 2011, unpublished) und Daten anderer Gruppen am Pankreaskarzinom (Dornhöfer et al., 2006) dafür, dass FG-3019 einen starken antitumoralen Effekt haben kann.

Zwar konnten bei analogen Experimenten mit Lungenfibroblasten anstelle der A549 Tumorzellen keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden, aber durch TGF- β kam es zu einer erhöhten Synthese von α -SMA, und auch Kollagen IV wurde von den Lungenfibroblasten vermehrt exprimiert. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit die in der Studie von Hu et al. aus dem Jahr 2003 beobachtete EMT von Lungenfibroblasten unter TGF- β Einfluss morphologisch nicht nachvollzogen werden, allerdings erscheint die phänomenologische Mesenchymalisierung von Fibroblasten auch nicht zwingend notwendig.

Wie schon bei den A549 Zellen konnte die TGF- β induzierte Expression von α -SMA durch FG-3019 komplett aufgehoben werden, während die erhöhte Kollagensynthese in Lungenfibroblasten reduziert aber durch FG-3019 nicht komplett verhindert wurde.

Insgesamt konnte hier eine inhibierende Wirkung von FG-3019 auf die EMT von Lungenfibroblasten zu Myofibroblasten gezeigt werden.

5.2 TGF- β im Kontext von Fibrose und Strahlentherapie

Wie schon oben beschrieben, ist der genaue Wirkmechanismus des TGF- β nicht geklärt. Denn dieses Zytokin nimmt Einfluss auf unterschiedliche Zellfunktionen und Regelkreise. Es ist bekannt, dass TGF- β zum Teil sogar antagonistische Funktionen aufweist, die vom Zustand des umliegenden Gewebes, der Zellen und der extrazellulären Matrix abhängig sind (Sporn, 1997). Die Synthese von TGF- β wird durch unterschiedliche Bedingungen - wie eine Gewebsverletzung - induziert (De Visser, Kast, 1999) und über Proteasen zellulär aktiviert (Munger, Harpel, Gleizes et al., 1997). Die weitere Wirkung von TGF- β ist sehr vielseitig. Ein wesentlicher Effekt des TGF- β ist die homöostatische Kontrolle der extrazellulären Matrix (Lawrence, 1996). Die Zellen des Bindegewebes werden so zu vermehrter Synthese von Kollagen angeregt. Diese Wirkung kann in den Versuchen der vorliegenden Arbeit ebenfalls belegt werden. Da gleichzeitig der Abbau der Matrix über die Aktivierung von Protease-Inhibitoren und eine Reduktion der Kollagenaseaktivität (Martinet, Menard, Vaillant et al., 1996) gehemmt wird, zeigt TGF- β in der Hauptsache eine profibrotische Wirkung (Gauldie, Jordana, 1993). Studien konnten zeigen, dass der TGF- β Spiegel mit der Zunahme der extrazellulären Matrix positiv korreliert, so dass hier ein „circulus vitiosus“ in der Entstehung der Lungenfibrose erkennbar ist (Broekelmann, Limper, Colby et al., 1991, und Khahil, O’Conner, Unruh et al., 1991). TGF- β ist außerdem in der Lage seine eigene Synthese nach Erstkontakt mit Fibroblasten zu induzieren und so persistierend die Synthese fibrotischer Faktoren zu fördern (Kim, Angel, Lafyatis, 1990).

Eine Bestrahlung der Lunge mit ionisierenden Strahlen wegen Lungentumoren oder auch anderer Tumoren wie z. B. Knochenmetastasen oder Mammakarzinomen, erhöht die Synthese des TGF- β , so dass die physiologische Regulation des Zytokin-Haushaltes aufgehoben wird (Barcellos-Hoff, Derynck, Tsang et al., 1994, und Barcellos-Hoff, 1998). Auch unwirksames, inaktives TGF- β kann durch Bestrahlung direkt ohne Proteasenbeteiligung aktiviert werden. Klingt die akute Entzündungsreaktion des Lungengewebes nach Bestrahlung ab, können TGF- β und andere Zytokine weiterhin im Gewebe verbleiben und zusätzlich autokrin von den Lungenfibroblasten weiter produziert werden (Rubin, Johnston, Williams et al., 1995).

Trotz widersprüchlicher Aussagen in der Literatur ist in der vorliegenden Arbeit ein die Proliferation deutlich hemmender Effekt des TGF- β auf Lungenfibroblasten gefunden worden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ein Verbleiben der Zellen im Zellzyklus-Arrest. Die vermehrte TGF- β Produktion in Vorläuferfibroblasten kann eine Signalkaskade unterschiedlicher Proteine und Zytokine in Gang setzen, an deren Ende eine vorzeitige terminale Differenzierung der Lungenfibroblasten steht. Diese können sich nicht mehr teilen, so dass vermehrt postmitotische Myofibroblasten entstehen (Schmidt, Sun, Stacey et al., 2003), die wiederum extrazelluläre Matrixproteine sezernieren und so in vivo in situ zur Entstehung von Fibrose beitragen können. Eine EMT, bei der sich aus Fibroblasten Myofibroblasten entwickeln, konnte hier anhand vermehrter Expression von Kollagen IV und α -SMA gezeigt werden. Eine Erklärung, weshalb die Lungenfibroblasten unter TGF- β -Einfluss hier keine morphologische Veränderung zeigten, könnte die in unterschiedlichen Untersuchungen bereits belegte Hypothese darstellen, dass TGF- β nicht in der Akutphase, sondern erst im späteren Verlauf einen Einfluss auf die Morphologie der Lungenfibroblasten hat (De Jaeger, Seppenwolde, Kampigna et al., 2004), so dass eine morphologisch sichtbare EMT erst bei viel längerer Inkubation mit TGF- β zu erwarten wäre. TGF- β wurde in diesem Zusammenhang als „second-line“ Zytokin der Fibroseentstehung bezeichnet (Rubin, Johnston, Williams et al., 1995, und Pelton, Moses, 1990).

5.3 Klinik, Verlauf und Therapieansätze der strahlungsbedingten Lungenfibrose

Die Erkrankung Lungenfibrose ist in Kapitel 1 ausführlich dargestellt worden. Als deutliche histologische Merkmale der Lungenfibrose gelten die „Fibroblasten-Foci“ (Katzenstein, Myers, 2000) sowie Bereiche der Lunge, die als Zeichen einer Schädigung die „Honeycomb“-Struktur aufweisen. Beide Areale finden sich in einer fibrotischen Lunge nebeneinander. Ionisierende Strahlung, wie sie z. B. zur Therapie eines Lungenkarzinoms nötig werden kann, ist eine mögliche Ursache von Lungenfibrose. Die Motivation der vorliegenden Untersuchung ist, dass die strahlungsbedingte Lungenfibrose durch FG-3019 verhindert oder zumindest eingedämmt werden kann. Eine wirkungsvolle medikamentöse Therapie der Lungenfibrose gibt es bislang in der Klinik nicht. Trotz der

Weiterentwicklung in Klinik und Forschung zählt die idiopathische Form der Lungenfibrose (IFP) zu den Krankheiten mit einer schlechten Prognose. Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt bei der idiopathischen Lungenfibrose weniger als drei Jahre (Ai, Liao, 2002). Die strahlenbedingte Variante bezieht zwar in der Regel nicht die ganze Lunge mit ein, schränkt aber die Lungenfunktion vor allem angesichts der Grunderkrankungen entscheidend ein. Die derzeit akzeptierte Behandlungsrichtlinie besteht aus einer Intervall-Kombinationstherapie von Kortikosteroiden und Immunsuppressiva, die jedoch für die eigentliche Fibrose nicht wirkungsvoll ist (Rafii et al., 2013). Auch die Entwicklung der typischen fibrosierten Wabellunge kann medikamentös bislang nicht aufgehalten werden (Akira, Sakatani, Ueda, 1993).

Als alternatives Therapiemodell gilt Interferon-gamma-1b, das in einer nicht kontrollierten Studie eine Reduktion der Mortalitätsrate erzielen konnte (Ziesche, Hofbauer, Wittmann et al., 1999), da es anfängliche Entzündungsreaktionen unterdrückt und TGF- β herunterreguliert. Allerdings existiert eine neuere Placebo-kontrollierte Doppelblind-Studie, bei der keine signifikante Steigerung der Überlebenszeit von Interferon-gamma-1b behandelten Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) Patienten nachgewiesen werden konnte (King et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit ist die Gabe von Pirfenidon, ein Therapeutikum, das die Kollagensynthese hemmen soll, das aber in klinischen Studien bislang leider nur ein äußerst geringes therapeutisches Ansprechen zeigte (Brantly, Troendle, Avila et al., 2002, und Taniguchi et al., 2010). Zusätzlich ist die Photosensibilität eine häufig auftretende Nebenwirkung des Pirfenidon (Rafii et al., 2013). Auch Bosentan, ein Endothelin-Rezeptorantagonist, kann zur Verbesserung klinischer Symptome führen (Humbert, Segal, Kiely et al., 2007 und Sfikakis, Papamichael, Stamatelopoulos et al., 2007). Man nimmt an, dass das Endothelin-System bei längerer Aktivierung zu einer Fibroblastenveränderung beiträgt (Shi-Wen, Chen, Denton et al., 2004, und Hoher, Schwarz, Fagan et al., 2000), doch auch der Erfolg von Bosentan muss in weiteren klinischen Studien untermauert werden. Umso wichtiger erscheint es, weitere und neue Therapieoptionen zu untersuchen. In der Tat konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Huber zeigen, dass FG-3019 in vivo in Mäusen eine strahleninduzierte Lungenfibrose attenuiert (Bickelhaupt et al., 2010). Die Entwicklung einer Lungenfibrose nach Bestrahlung hängt nicht nur von dem Bestrahlungsvolumen bzw. der applizierten Dosis ab (McDonald, Rubin, Phillips, 1995), sondern zusätzlich noch von einer Reihe patientenbezogener Risikofaktoren (Chon, Loeffler,

2002), wie z. B. dem Alter sowie bestehender Komorbiditäten (Metha, 2005). Eine gleichzeitig verabreichte Chemotherapie kann unterschiedliche Auswirkungen auf die Entstehung einer fibrotischen Reaktion des Lungengewebes haben und wird auch in der Literatur uneinheitlich bewertet. Während Studien belegen, dass weder das bei einem Mammakarzinom verwandte CMF-Schema (eine Polychemotherapie, bei der drei zytostatische Wirkstoffe verabreicht werden: Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil) noch die bei einem Bronchialkarzinom häufig simultan oder sequentiell verabreichten Substanzen Cisplatin, Carboplatin und Etoposid zu einer vermehrten Strahlenfibrose führen (Sause et al., 2000, und Huber et al., 2006), belegen andere Untersuchungen ein erhöhtes Risiko der Pathogenese einer Lungenfibrose bei Bestrahlung und den simultan gegebenen Chemotherapeutika Cisplatin und Etoposid. Eindeutig risikosteigernd sind die Gaben von Paclitaxel, Irinotecan, Doxecatel und Gemcitabin (Metha, 2005). Die Einschätzung, ob ein Patient nach einer Bestrahlung eine Lungenfibrose entwickelt, ist abhängig von der angewandten Dosis und dem Gesamtvolumen der Lunge (Rodrigues et al., 2004), jedoch ist das Ergebnis trotz aller Bemühungen schwer vorhersehbar. Es konnte aber in Untersuchungen gezeigt werden, dass eine niedrige Strahlendosis in einem kleinen Bereich der Lunge besser toleriert wird (Hopewell, Trott, 2000) als die gleiche Dosis auf das Gesamtvolumen der Lunge verteilt (McBride, Vegesna, 2000). Als erwiesen gilt außerdem, dass Patienten, die schon zu Beginn der Therapie erhöhte TGF- β -Werte aufweisen, ein höheres Risiko haben an einer Lungenfibrose zu erkranken (Höller et al., 2007 und Chen, Williams, Ding et al., 2002). Auch erhöhte TGF- β -Spiegel nach dem Ende der Strahlentherapie stellen einen erhöhten Risikofaktor für die Entwicklung einer Pneumonitis mit konsekutiver Fibrose dar (Fu, Huang, Bentel et al., 2001). Aus diesen Gründen erscheint der therapeutische Einsatz eines CTGF Antikörpers wie FG-3019, der profibrotische Wirkungen von TGF- β reduzieren kann, sinnvoll.

Die Therapie einer strahlenbedingten Lungenfibrose ist zurzeit kurativ nicht möglich. Eine schon bei der Pneumonitis frühzeitig angewandte Steroidtherapie scheint den Übergang in eine Fibrose in manchen Fällen verhindern zu können (Riesenbeck, Herrmann, 2000). Große Hoffnung wurde auf die Substanz Amifostin gesetzt, die als Radikalfänger zytotoxische Stoffe abfängt. Leider zeigte sich in einer größeren Phase III Studie kein signifikanter Rückgang der Strahlungspneumonitis (Movsas et al., 2005). Allerdings konnte in einer Untersuchung von wenigen Probanden gezeigt wer-

den, dass die prophylaktische Gabe des TNF α -Inhibitors Pentoxifyllin, die Entwicklung der Pneumonitis als Strahlenfolge zu hemmen vermochte (Öztürk, 2004). Amifostin als i.v. Präparat hat nicht unerhebliche Nebenwirkungen, ist aber dennoch klinisch zur Prophylaxe akuter Nebenwirkungen bei der Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich zugelassen. Durchgesetzt hat sich die Medikation aber nicht und im Hinblick auf den Endpunkt Fibrose, besonders im Hinblick auf die Lungenfibrose, wird der Einsatz außerhalb von Studien nicht empfohlen.

5.3.1 Einfluss ionisierender Strahlung auf Zellen der Lunge

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass ionisierende Strahlung das Wachstum von Lungenfibroblasten dosisabhängig hemmt. Der radiobiologische Vorgang ist hochkomplex. Durch die Strahlung entstehen in Zellen freie Radikale und dann DNA-Brüche, so dass diese nicht mehr in der Lage sind sich zu teilen (Sauer, 1998). Radiation hemmt auch im Zellzyklus wichtige Kinasen (Gadbois, Crissman, Natasi et al., 1996, und Dimitrijevic-Bussod, Balzaretto-Maggi, Gadbois, 1999, und Chang-Liu, Woloschak, 1997). Zusätzlich führt Bestrahlung zu einer vorzeitigen Differenzierung der mitotisch aktiven Lungenfibroblasten (Lara, Russell, Smolders et al., 1996). Diese sogenannten postmitotischen Fibrozyten produzieren unter anderem profibrotische Zytokine und Kollagen. Sie sind nicht mehr zur Zellteilung fähig. Das normale Verhältnis von teilungsfähigen Fibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten liegt bei 2:1 (Hill, Rodemann, Hendry et al., 2001), für die Umwandlung von Lungenfibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten sind in der gesunden Lunge bis zu 35 Zellzyklen notwendig. Bestrahlung reduziert diese Anzahl auf etwa drei Zyklen. Während normalerweise ca. drei Prozent aller Lungenfibroblasten in Form von postmitotischen Fibrozyten vorliegen, erhöht sich dieser Anteil nach Bestrahlung des Thoraxraumes auf 70 %. (Rodemann, Binder, Burger, 1996). Diese Mechanismen bestätigen das in dieser Arbeit gemessene reduzierte Wachstum der Lungenfibroblasten unter Bestrahlung. CTGF und TGF- β unterstützen dies. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheint es wahrscheinlich, dass FG-3019 als CTGF-Antikörper die Umwandlung aktiver Lungenfibroblasten in die differenzierte Form der Fibrozyten attenuiert und somit die vermehrte Synthese profibrotischer Faktoren sowie des Kollagens eindämmen kann.

5.3.2 Einfluss von TGF- β und CTGF auf die Entstehung einer Lungenfibrose

Im Rahmen einer fibrotischen Reaktion tritt der Rückkopplungsmechanismus, der normalerweise dafür sorgt, dass aktivierte Myofibroblasten als terminal differenzierte Zellen regulatorisch der Apoptose unterliegen (Desmouliere, Redgard, Darby et al., 1995), nicht ein. Es kommt zu einer ständigen Myofibroblastenaktivierung bedingt durch eine verstärkte Synthese profibrotisch wirkender Zytokine. Studien konnten zeigen, dass nicht einzelne Zytokine für den Pathomechanismus einer Lungenfibrose verantwortlich sind, sondern dass pro- und antifibrotisch wirksame Mediatoren einem labilen Regelkreis unterliegen (Zhang, Phan, 1996). Das entscheidende Zytokin ist hier TGF- β , das durch CTGF reguliert wird, aber gleichzeitig auch in den Fibroblasten die Produktion des CTGF hervorruft. Beide Faktoren sind in den Fibroblasten-Foci nachzuweisen und beeinflussen sich wechselseitig (Broekelmann, Limper, Colby et al., 1991, und Allen, Knight, Bloor et al., 1999).

Unter dem Einfluss von TGF- β , das auch durch Strahlung in den Fibroblasten freigesetzt oder aktiviert wird, verändert sich die Proteinzusammensetzung der extrazellulären Matrix, die zwischen den Lungenzellen im Interzellularraum liegt. Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Auf- und Abbau der Matrix (Fernandes, Bonacci, Stewart, 2006). MMPs und TIMPs verändern täglich etwa 10 % der Matrixproteine (Page-McCraw, Ewald, Werb, 2007, und McAnulty, Staple, Guerreiro et al., 1988), deren wichtigstes faserförmiges Protein das von Fibroblasten hergestellte Kollagen darstellt. Kollagen erhält zusammen mit Proteoglykanen die Struktur der extrazellulären Matrix. Ist diese intakt, wird kein weiteres Kollagen mehr hergestellt (Tomasek, Gabbiani, Hinz et al., 2002). Bei Gewebeerstörung - z. B. durch Strahlung - werden von unterschiedlichen Zellen Reparaturprozesse in Gang gesetzt. Das dabei synthetisierte TGF- β unterhält den Prozess, es regt die weitere Proliferation von Fibroblasten und damit auch von Matrixproteinen an (Bartram, Speer, 2004, Laurent, Chambers, Hill et al., 2007, und Hinz, 2007). Gleichzeitig wird die Umwandlung in Myofibroblasten gefördert, die durch das in ihnen enthaltene α -smooth-muscle-Aktin eine verstärkte Kontraktilität aufweisen (Hinz, Celetta, Tomasek et al., 2001) und außerdem vermehrt Kollagen produzieren. Diese Umwandlung von Lungenfibroblasten zu Myofibroblasten konnte in der vorliegenden Arbeit belegt werden, indem gezeigt wur-

de, dass die Migration durch TGF- β zunimmt und die Expression von Kollagen IV und α -SMA ebenfalls zunimmt.

Auch im Blut zirkulierende Vorläuferzellen - die Fibrozyten - können nach Migration in das verletzte Gebiet durch eine TGF- β Aktivierung zu terminalen Myofibroblasten differenzieren (Anscher, Kong, Marks et al., 1997, und Rodemann, Peterson, Schwenke et al., 1991) und so den Kreislauf der fibrotischen Umbauprozesse weiter aktivieren (Abe, Donnelly, Peng et al., 2001).

Mehrere Studien postulieren, dass TGF- β auf zellulärer Ebene ähnlich wie Bestrahlung wirkt, indem es die am Zellzyklus beteiligten Kinasen und damit das Wachstum der Lungenfibroblasten hemmt (Sundarshan, Yaswen, Kulkanarni, 1998, und Hakenjos, Bamberg, Rodemann, 2000). Diese Argumentation wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt. Andere Forscher kamen jedoch zu einem gegenteiligen Ergebnis und konnten TGF- β als einen deutlichen Stimulus der Proliferation der Fibroblasten benennen (Kelley, 1993, Strutz, Zeisberg, Renziehausen et al., 2001, und Vujaskovic, Marks, Anscher, 2000). Insgesamt kann aufgrund der vielen unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur die Frage nach dem genauen Wirkmechanismus von TGF- β nicht beantwortet werden, da die Beeinflussung der Zellen durch TGF- β von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren abhängt und daher keine einheitliche Wirkung beschrieben werden kann. So ist in Studien nachgewiesen worden, dass TGF- β eine bifunktionale Wirksamkeit besitzt. Zum einen induziert der Faktor die Expression bestimmter Gene, die die am Zellzyklus beteiligten Kinasen hemmen. Durch diesen Mechanismus wird die Zellproliferation gehemmt. Zum anderen ist TGF- β jedoch auch in der Lage die gleichen Gene zu hemmen und so zu einer Proliferation der Zellen beizutragen (Miyazaki, Ohashi, Tsuji et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings ein deutlich wachstumshemmender Effekt des TGF- β bei Lungenfibroblasten nachgewiesen werden, so dass die Schlussfolgerungen dieser Studie auf dem inhibierenden Effekt auf die Proliferation des TGF- β als Grundlage beruhen.

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass TGF- β in bestimmten Fibroblastenarten - so auch den Lungenfibroblasten - die Expression von CTGF induzieren kann (Lasky, Ortiz, Tonthat et al., 1998, und Abraham, Shiwen, Black et al., 2000). Dieser Faktor ist für die vermehrte Produktion extrazellulärer Matrix und der konsekutiven Fibrose von entscheidender Bedeutung, da der CTGF ein mit der zellulären Matrix assoziiertes Pro-

tein ist, das zwar auch verschiedene physiologische zelluläre Prozesse reguliert, aber ebenso an fibrotischen Umbauvorgängen und der Tumorprogression beteiligt ist. Insbesondere an der Entwicklung einer Atherosklerose, aber auch an der Pathogenese einer Haut-, Nieren- oder Lungenfibrose scheint CTGF ursächlich beteiligt zu sein (Blom, Goldschmeding, Leask, 2002). Bei all diesen Erkrankungen konnte eine gesteigerte Synthese des CTGF in den jeweiligen Fibroblasten (Lorena, Uchio, Costa, 2002) und bei der Atherosklerose in den Endothelzell-Läsionen nachgewiesen werden (Cicha, Yilmaz, Klein et al., 2005).

TGF- β reguliert vielfältige zelluläre Mechanismen und wird wiederum von anderen Faktoren wie z. B. von CTGF beeinflusst. Neben der profibrotischen Wirkung des TGF- β (Nakagome, Dohi, Okunishi et al., 2006) belegen neuere Studien zusätzlich, dass TGF- β durch Beeinflussung von Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen (Nazarath, Broderick, Simpson-Abelson et al., 2007) eine für ein Tumorwachstum geeignete Umgebung herstellt und somit tumorfördernd wirken kann. In Untersuchungen wurde zusätzlich belegt, dass Bronchialkarzinome selbst TGF- β produzieren und so das Risiko einer strahlenbedingten Lungenfibrose erhöht wird (Massague, Blain, Lo, 2000). Auch bezüglich der Überlebensrate, bei an einem Bronchialkarzinom erkrankten Patienten, korrelierte eine TGF- β Expression des Tumors mit einer ungünstigen Prognose (Takanami, Imamura, Hashizume et al., 1994). In der Tat zeigen eine Reihe von eigenen prä-klinischen Daten am Glioblastom und auch klinische Studien, dass Medikamente, die spezifisch TGF- β Signale hemmen, als Tumorthapeutika wirksam sind (Zhang et al., 2011).

Diese Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass ein CTGF Antikörper wie FG-3019 möglicherweise eine wichtige Rolle in der klinischen Medizin einnehmen kann. Der Antikörper kann nicht nur, abhängig und unabhängig von der hemmenden Wirkung auf CTGF, die Synthese von TGF- β und somit die strahlungsbedingte Lungenfibrose unterdrücken, sondern eventuell auch eine Tumorprogression verhindern.

6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen den Einfluss des gegen den CTGF gerichteten Antikörpers FG-3019 auf das Proliferations-, Adhäsions- und Migrationsverhalten sowie auf das klonogene Wachstum von Lungenfibroblasten. Effekte, die über TGF- β - als ein profibrotisches Element der Signalkaskade - nach ionisierender Strahlung auf Lungenfibroblasten ausgeübt werden, können durch FG-3019 reduziert werden. FG-3019 ist somit in der Lage, die fibrotischen Signale, die über eine gegenseitige Beeinflussung von TGF- β und CTGF verlaufen, hemmend zu beeinflussen. Allerdings konnte in den Versuchen dieser Studie zwar eine antagonistische Wirkung des FG-3019 auf durch TGF- β induzierte Effekte wie Proliferation und Migration von HPF nachgewiesen werden, es gelingt jedoch nicht die vermehrte Kollagensynthese sowie die Produktion von α -SMA in den Lungenfibroblasten mittels FG-3019 zu inhibieren. Hier ist es nicht möglich den profibrotischen Effekt des TGF- β zu hemmen.

Dennoch könnte FG-3019 als Antikörper des an der Fibroseentstehung beteiligten CTGF eventuell - therapeutisch eingesetzt - die Prognose der strahlenbedingten Lungenfibrose verbessern. In einem in vivo Mausmodell konnten bereits erste Erfolge bei der Attenuierung von strahlungsinduzierter Lungenfibrose durch FG-3019 nachgewiesen werden (Bickelhaupt et al., 2010). FG-3019 wird bereits in klinischen Studien bei Pankreastumoren und Leberfibrosen erfolgversprechend angewandt (FibroGen, 2010) und hat sich ebenfalls in einer klinischen Studie bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose bewährt (Günther, 2007, und Kjetil, Gail, Kolb et al., 2006). FG-3019 wird ebenfalls im klinischen Test bei Patienten angewandt, die nicht an einer idiopathischen sondern an einer der anderen Formen der pulmonalen Fibrose leiden (Martinez, 2006). Zusätzlich gibt es vielversprechende erfolgreiche Ansätze bei der Behandlung von Glioblastomen mit FG-3019 (Zhang et al., 2011).

7 Zusammenfassung

Der fibrotische Umbauprozess der Lunge kann unterschiedliche Ursachen haben. Eine davon ist die Bestrahlung des Thoraxraumes zur Therapie eines Mamma- oder Lungenkarzinoms. Vor dem Hintergrund der steigenden Inzidenz bösartiger Tumore in diesem Bereich gewinnt die Strahlentherapie eine immer größere Bedeutung. Häufig limitiert die Lunge als äußerst strahlensensibles Organ diese Behandlungsform, so dass eine kurative Tumorbestrahlung nicht möglich ist. Strahlung induziert über vielfältige, ineinander greifende Mechanismen die Entstehung einer Lungenfibrose. Trotz großer Fortschritte in der Erkenntnis der Pathogenese dieser Erkrankung und der Entwicklung neuer Therapiemethoden ist die Prognose der pulmonalen Fibrose infaust. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Zytokin-vermittelte Signalkaskade, die letztendlich in einer manifesten Fibrose endet, mittels eines gegen den Connective Tissue Growth Faktor (CTGF) gerichteten Antikörpers (FG-3019) experimentell gehemmt werden kann und welche Wirkungen FG-3019 auf Zellen hat, die an fibrotischen Umbauprozessen beteiligt sind. Um zelluläre Grundlagen für die in vivo beobachtete Wirkung von FG-3019 zu finden, wurde eine systematisch funktionelle in vitro Analyse durchgeführt, indem klonogene Assays, Proliferations-Assays, Adhäsions-Assays, Vitalitäts-Assays und Migrations-Assays durchgeführt wurden. Als funktioneller Aspekt wurde im Hinblick auf die Auswirkung von FG-3019 auf die „Epithelial-to-Mesenchymal-Transition“ (EMT) von an fibrotischen Prozessen beteiligten Zellen zusätzlich nach morphologischen Veränderungen gesucht und die Expression verschiedener Proteine untersucht. Als bedeutende und sich wechselseitig beeinflussende Faktoren im komplizierten Regelkreis der Fibroseentwicklung konnten CTGF und der Transforming Growth Faktor-beta (TGF- β) bestimmt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass TGF- β eine proliferationshemmende Wirkung auf Lungenfibroblasten ausübt, die Migration von Lungenfibroblasten steigert, aber auf die Adhäsion von Lungenfibroblasten keine Auswirkung hat. Stimulierend wirkt TGF- β auf die Synthese des Kollagens und des Proteins α -SMA, das die Kontraktion fibrotischer Areale fördert und somit ebenfalls eine Fibrose begünstigt. Während die Auswirkungen des TGF- β auf die Proliferation und die Migration der Lungenfibroblasten durch Zugabe des Antikörpers FG-3019 zum Teil rückgängig gemacht werden können, lässt sich die vermehrte Produktion von

Kollagen und α -SMA nicht hemmen. Auch eine morphologische Veränderung der Zellen im Sinne einer EMT ist in den Untersuchungen nicht gefunden worden. Jedoch beeinflusst TGF- β die Lungenadenokarzinomzellen A549, indem er eine EMT induziert. Auch Kollagen und α -SMA werden unter TGF- β Einfluss von den A549-Zellen verstärkt exprimiert. An den Tumorzellen sind alle Wirkungen des TGF- β durch FG-3019 aufhebbar.

So konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass FG-3019 als Antikörper gegen den CTGF in der Lage ist, einige der profibrotischen Wirkungen des durch CTGF beeinflussten TGF- β teilweise aufzuheben. Auch allein gegeben zeigte FG-3019 eine inhibierende Wirkung auf das klonogene Wachstum, die Proliferation, die Vitalität und die Migration der Lungenfibroblasten. Da die durch TGF- β induzierte profibrotisch wirkende kollagene Exprimierung jedoch in den Lungenfibroblasten genau wie die Synthese von α -SMA durch FG-3019 nicht beeinflusst werden kann, sind hier eventuell weitere Studien nötig, um die genaue Wirkweise des FG-3019 zu erforschen. Da auch Tumorzellen des adenoiden Bronchialkarzinoms in der Lage sind TGF- β zu produzieren, kann die in den Ergebnissen dieser Arbeit festgestellte Hemmung des TGF- β Einflusses auf die Tumorzellen durch FG-3019 einen weiteren wichtigen Schritt in der Behandlung der Lungenfibrose darstellen, da die TGF- β Synthese durch Karzinome bislang mit einer erhöhten Fibrosegefahr und einer schlechten Prognose gekoppelt ist.

Die Unterbrechung der Zytokin-vermittelten Signalkaskade, die letztendlich zu einer Fibrose führt, gilt als ein vielversprechender Ansatz in der Prävention und Therapie der Fibrose. Somit kann FG-3019, das auch schon in klinischen Tests mit Erfolg angewandt worden ist, einen Fortschritt auch in der Behandlung der strahlenbedingten Lungenfibrose darstellen. Weitere Studien können eventuell Aussagen treffen, inwieweit auch eine präventive Behandlung mit FG-3019 einen Fibroseschutz darstellen kann, so dass die Strahlentherapie effektiver zur Karzinombehandlung eingesetzt werden könnte.

8 Summary

In vitro study of the mechanism of an antifibrotic antibody against Connective Tissue Growth Factor in combination with Transforming Growth Factor-beta or ionising radiation.

The fibrotic remodelling process of the lung can have different causes. One is the radiation of the thorax for the treatment of breast or lung carcinomas. Because of the increasing incidence of malignant tumors in this region the treatment with radiation is of growing importance. Often the lung, as an extremely radiation sensitive organ, limits this form of treatment, so that a curative tumor radiotherapy is not possible. Radiation induces through diverse cross-mechanisms the development of pulmonary fibrosis. Despite great advances in the knowledge of the pathogenesis of pulmonary fibrosis and the development of new therapeutic methods, the prognosis of pulmonary fibrosis is still poor. In this study it was examined, whether the cytokine-mediated signalling cascade that ultimately ends in a manifest fibrosis, could be inhibited experimentally by an antibody (FG-3019) against the Connective Tissue Growth Factor (CTGF) and the effects FG-3019 has on cells involved in the fibrotic remodelling process of the lung. To find a cellular basis for the in vivo observed effect of FG-3019, a systematic functional in vitro analysis was carried out by clonogenic-assays, proliferation-assays, adhesion-assays, vitality-assays and migration-assays. In regard to the effect of FG-3019 on the "epithelial-to-mesenchymal transition" (EMT) of cells involved in fibrotic processes, it was looked for morphological changes and the expression of various proteins was examined as a functional aspect.

CTGF and Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) have been determined as important and mutually influencing factors in the development of fibrosis. The results of the present study show, that TGF- β exerts an antiproliferative effect on pulmonary fibroblasts and increases their migration, but has no effect on the adhesion of pulmonary fibroblasts. TGF- β has a stimulating effect on the synthesis of collagen and α -SMA, which promote the contraction of fibrotic areas and therefore also favour fibrosis. While the effects of TGF- β on the proliferation and migration of lung fibroblasts can partly be reversed by addition of the antibody FG-3019, the increased production of collagen and α -SMA cannot be restrained. Also, a morphological change of the cells in terms of

EMT has not been found in the investigations. However, TGF- β does influence the lung adenocarcinoma A549 by inducing an EMT. Collagen and α -SMA are also increased expressed by A549 under TGF- β influence. In the tumor cells all the effects of TGF- β are cancelled by FG -3019.

In the present study it was shown, that some of the profibrotic effects, which TGF- β has through CTGF, could partly be reversed by FG-3019. Given alone FG-3019 also shows an inhibitory effect on the clonogenic growth, proliferation, vitality and migration of pulmonary fibroblasts. Since the induced expression of collagen and α -SMA, both profibrotic active in the pulmonary fibroblasts through TGF- β , cannot be influenced by FG-3019, further studies are possibly necessary to investigate the exact mode of action of FG-3019. The inhibiting effect of FG-3019 on the impact of TGF- β on tumor cells that was found in this study can be another important step in the treatment of pulmonary fibrosis as tumor cells of the adenoid lung cancer are able to produce TGF- β themselves. Also, since the carcinoma induced TGF- β synthesis is associated with an increased risk of fibrosis and a poor prognosis up to now.

The interruption of the cytokine-mediated signalling cascade that ultimately leads to fibrosis, is considered a promising approach in the prevention and treatment of fibrosis. Therefore FG-3019, which has been already used in clinical trials with success, can represent a progress in the treatment of radiation-induced pulmonary fibrosis. Further studies are necessary to clarify, whether a preventive treatment with FG-3019 has a protective fibrotic effect, so that radiotherapy could be used more effectively for the carcinoma treatment.

9 Literaturverzeichnis

Abe, R., Donnelly, S.C., Peng, T., Bucala, R., Metz, C.N., 2001: *Peripheral Blood Fibrocytes: Differentiation Pathway and Migration to Wound Sites*, J Immunol, 166, S. 7556-7562

Abraham, D.J., Shiwen, X., Black, C.M., Sa, S., Xu, Y., Leask, A., 2000: *Tumor Necrosis Factor alpha suppresses the induction of Connective Tissue Growth Factor by Transforming Growth Factor - beta in normal and scleroderma fibroblasts*, J Biol Chem, 275, S. 15220-15225

Abreu, J.G., Ketpura, N.I., Reversade, B., De Robertis, E.M., 2002: *Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta*, Nat Cell Biol. 2002 Aug;4(8):599-604

Adamson, I.Y., Young, L., Bowdler, D.H., 1988: *Relationship of alveolar epithel injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis*. Am J Pathol, 130, S. 377-383

Ai, L., Liao, F., 2002: *Mutating the four extracellular cysteines in the chemokine receptor CCR6 reveals their differing roles in receptor trafficking, ligand binding, and signalling*, Biochemistry 41 (26), S. 8332-8341

Aikawa, T., Gunn, J., Spong, S.M., Klaus, S.J., Korc, M., 2006: *Connective tissue growth factor-specific antibody attenuates tumor growth, metastasis, and angiogenesis in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer*, Mol Cancer Ther. 2006 May;5(5):1108-16.

Akira, M., Sakatani, M., Ueda, E., 1993: *Idiopathic pulmonary fibrosis: progression of honeycombing at thin-section CT*, Radiology 189 (3), S. 687-691

Allen, J.T., Knight, R.A., Bloor, C.A., Spiteri, M.A., 1999: *Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective Tissue Growth Factor) expression in patients with idiopathic fibrosis and pulmonary sarcoidosis*, Am J Respir Cell Mol Biol 21 (6), S. 693-700

Allen, J.T., Spiteri, M. A., 2002: *Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis: relative roles*, Respir Res. 2002; 3:13. Epub 2001 Nov 28

Anscher, M.S., Kong, F.M., Marks, L.B., Bentel, G.C., Jirtle, R.L., 1997: *Changes in plasma transforming growth factor beta during radiotherapy and the risk of symptomatic radiation-induced fibrosis*, Int J Radiat Oncol Bio Phys, 37, S. 253-258

Ao, X., Zhao L., Davis, M.A., Lubman, D.M., Lawrence, T.S., Kong, F.M., 2009: *Radiation produces differential changes in cytokine profiles in radiation lung fibrosis sensitive and resistant mice*, J Hematol Oncol. 2009 Feb 2;2: 6. doi: 10.1186/1756-8722-2-6.

Ask, K., Martin, G.E., Kolb, M., Gauldie, J., 2006: *Targeting genes for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities, promises and pitfalls*. Proc Am Thorac Soc. 3(4):389-393

Barcellos-Hoff, M.H., 1998: *How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues*, Radiat Res 1998 Nov; 150 (5 Suppl): S. 109-120

Barcellos-Hoff, M.H., Derynck, R., Tsang, M.L., Weatherbee, J.A., 1994: *Transforming Growth Factor-beta activation in irradiated murine mammary gland*, J Clin Invest, 93, S. 892-899

Bartram, U., Speer, C.P., 2004: *The Role of Transforming Growth Factor Beta in Lung Development and Disease*, Chest, 125, S. 754-765

Bentzen, S.M., 2006: *Preventing or reducing late side effects of radiation on therapy: radiobiology meets molecular pathology*, Nat Rev Cancer, 6, S. 702-13

Bickelhaupt, S., Peschke, P., Erbel, C., Tietz, A., Timke, C., Wirkner, U., Debus, J., Lipson, K., Huber, P., 2010: *Attenuation and reversal of Radiation-induced Pulmonary Fibrosis in a Murine Model by an Anti-CTGF Monoclonal Antibody*. I. J. of Radiation Oncology. Biology. Physics 78 (3), S. 40

Blom, I.E., Goldschmeding, R., Leask, A., 2002: *Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy?*, Matrix Biol. 2002 Oct;21(6):473-82

Border, W.A., Noble, N.A., 1994: *Transforming Growth Factor beta in Tissue Fibrosis*, N Engl J Med, 331 (19), S. 1286-1292

Bradham, D.M., Igarashi, A., Potter, R.L., Grotendorst, G.R., 1991: *Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10*. J Cell Biol 114, S. 1285-1294.

Brantly, M.L., Troendle, J., Avila, N., Padua, A., Montalvo, C., Cardone, H., Calis, K., Gochuico, B., Gahl, W. A., 2002: *A randomized placebo-controlled trial of oral pirfenidone for the pulmonary fibrosis of Hermansky-Pudlak syndrome*, Am J Respir Crit Care Med, 165, S. A 728

Brigstock, D.R., Steffen, C.L. Kim, G.Y., Vegunta, R.K. Diehl, J.R. and Harding P.A., 1997: *Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids: Identification as heparin-regulated 10,000-Mr forms of connective tissue growth factor*. J. Biol. Chem.272 20275-20282

Broekelmann, T.J., Limper, A.H., Colby, T.V., McDonald, J.A., 1991: *Transforming Growth Factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis*, Proc Natl Acad Sci USA, 88, S. 6642-6646

- Brunner, A., Chinn, J., Neubauer, M., Purchio, A.F., 1991: *Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta*, DNA Cell Biol. 1991 May;10(4):293-300.
- Bucala, R., Spiegel, L.A., Chesney, J., Hogan, M., Cerami, A., 1994: *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair*. Mol Med 1, S. 71-81
- Burger, A., Loffler, H., Bamberg, M., Rodemann, H.P., 1998: *Molecular and cellular basis of radiation fibrosis*, Int J Radiation Biology, Vol. 73 Nr. 4, S. 401-408
- Chang-Liu, C.-M., Woloschak, G.E., 1997: *Effects of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression*, Cancer Letters, 113, S. 77-86
- Chen, C.C., Lau, L.F., 2008: *Functions and mechanisms of action of CCN matrix cellular proteins*, Int J Biochem Cell Biol, doi:10.1016/j.biochel.2008.07.025
- Chen, Y., Williams, I., Ding, I., Hernady, E., Liu, W., Smudzin, T., Finkelstein, J.N., Rubin, P., Okunieff, P., 2002: *Radiation Pneumonitis and early circulatory cytokine markers*, Semin Radiat Oncol, 12 suppl 1, S. 26-33
- Chon, B.H., Loeffler, J.S., 2002: *The effect of nonmalignant systemic disease on tolerance to radiation therapy*, Oncologist, 7, S. 136-143
- Cicha, I., Yilmaz, A., Klein, M., Raithel, D., Brigstock, D.R., Daniel, W.G., Goppelt-Strube, M., Garlich, C.D., 2005: *Connective tissue growth factor is overexpressed in complicated atherosclerotic plaques and induces mononuclear cell chemotaxis in vitro*, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 May;25(5):1008-13
- Cook, D.N., Brass, D.M., Schwartz, D.A., 2002: *A Matrix for new ideas in pulmonary fibrosis*, Am J Respir Cell Mol Biol, 27, S. 122-124
- Coultas, D.B., Zumwalt, R.E., Black, W.C., Sobonya, R.E., 1994: *The epidemiology of intestinal lung diseases*, Am J Respir Crit Care Med 150 (4), S. 967-972
- Crouch, E., 1990: *Pathophysiology of pulmonary fibrosis*, Am J Physiol, 259, S.L159-L184
- Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., Gabbiani, G., 1995: *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*, Am J Pathol, 146, S. 56-66
- De Jaeger, K., Seppenwolde, Y., Kampigna, H.H., Boersma, L.J., Belderbos, J.S., Lebesque, J.V., 2004: *Significance of Plasma Transforming Growth Factor-L levels in radiotherapy for non-small cell lung cancer*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 5, S. 1378-1387

De Visser, K.E., Kast, W.M., 1999: *Effects of TGF-beta on the immune system: Implications for cancer immunotherapy*, Leukemia, Vol 13, S. 1188-1199

Diaz, K.T., Skaria, S., Harris, K., Solominta, M., Lau, S., Bauer, K., Smaldone, G.C., Condos, R., 2012: *Delivery on safety of inhaled interferon- γ in idiopathic pulmonary fibrosis*, J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. (2):79-87. doi: 10.1089/jamp.2011.0919. E-pub 2012 Feb 23

Dietel, M., Dudenhausen, J., Suttorp, N., 2003: *Harrisons Innere Medizin*, Deutsche Ausgabe der 15. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag Berlin

Dimitrijevic-Bussod, M., Balzaretto-Maggi, V. S., Gadbois, D.M., 1999: *Extracellular matrix and radiation G1 cell cycle arrest in human fibroblasts*, Cancer Research, 59, S. 4843-4874

Dornhöfer, N., Spong, S., Bennewith, K., Salim, A., Klaus, S., Kambham, N., Wong, C., Kaper, F., Sutphin, P., Nacamuli, R., Höckel, M., Le, Q., Longaker, M., Yang, G., Koong, A., Giaccia, A., 2006: *Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis*, Cancer Res. 66(11):5816-5827

Duncan, M.R., Frazier, K.S., Abramson, S., Williams, S., Klapper, H., Huang, X., Grotendorst, G.R., 1999: *Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP*, FASEB J. 1999 Oct;13(13):1774-86.

Eickelberg, O., Köhler, E., Reichenberger, F., Beretschin, S. et al., 1999: *Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3*, Am J Physiol, 276, S. L814-L824

Fernades, D.J., Bonacci, J.V., Stewart, A. G., 2006: *Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways*, Curr Drug Targets, 7, S. 567-577

Flaherty, K.R., Toews, G.B., Travis, W.D, Colby, T.V., Kazerooni, E.A., Gross, B.H., Jain, A., Strawderman, R.L, Paine, R., Flint, A., Lynch, J.P., Martinez F.J., 2002: *Clinical significance of histological classification of idiopathic interstitial pneumonia*. Eur Respir J 19:275-283

Flehsig, P., Dadrich, M., Bickelhaupt, S., Jenne, J., Hauser, K., Timke, C., Peschke, P., Hahn, E.W., Grone, H.J., Yingling, J.M., Lahn, M.M., Wirkner, U., Huber, P., 2012: *LY2109761 attenuates radiation-induced pulmonary murine fibrosis via reversal of TGF-beta and BMP associated proinflammatory and pro angiogenic signals*. Clin Cancer Res 2012 Apr 30

FibroGen, 2010: *FibroGen announces initiation of FG-3019 phase 2 study for reversing liver fibrosis*, The Medical News

- Fine, A., Goldstein, R.H., 1987: *The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts*, J Biol Chem. 1987 Mar 15;262(8): 3897-902
- Finkelstein, J.N., Johnston, C.J., Baggs, R., Rubin, P., 1994: *Early alterations in extracellular matrix and TGF-beta1 gene expression in mouse lung indicative of late fibrosis*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 28, S. 621.631
- Fournier, C., Scholz, M., Weyrather, W.K., Rodemann, H.P., Kraft, G., 2001: *Changes of fibrosis-related parameters after high- and low-dose ET irradiation of fibroblasts*, Int J Radiat Biol.; 77(6):713-22
- Fu, X.L., Huang, G., Bentel, G., Clough, R., Jirtle, R.L., Kong, F.M., Marks, L.B., Anscher, M.S., 2001: *Predicting the risk of symptomatic radiation-induced lung injury both the physical and biologic parameters V(30) and transforming growth factor beta*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 50, S. 899-908
- Gadbois, D.M., Crissman, H.A., Natasi, A., Habbersett, R., Wang, S.K., Chen, D., Lehnert, B.E., 1996: *Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays*, Radiation Research, 146, S. 414-424
- Gao, R., Brigstock, D.R., 2003: *Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan*, J Biol Chem. 2004 Mar 5;279(10):8848-55.
- Gauldie, J., Jordana, M., Cox, G., 1993: *Cytokines and pulmonary fibrosis*, Thorax, 48, S. 931-935
- Gauldie, J., Sime, P.J., Xing, Z., Marr, B., Tremblay, G.M., 1999: *transforming growth factor beta gene transfer to the lung induces myofibroblast presence and pulmonary fibrosis*, Curr Top Pathol. 1999; 93:35-45. PMID: 10339897
- Gross, T.J., Hunninghake, G.W., 2001: *Idiopathic lung fibrosis*, N Engl J Med 345 (7), S. 517-525
- Grotendorst, G.R., Okochi, H., Hayashi, N., 1996: *A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene*, Cell Growth & Diff: Mol Biol J Am Ass Canc Res, 7(4) 469-480
- Grotendorst, G.R., Rahmanie, H., Duncan, M.R., 2004: *Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation*, FASEB J. 2004 Mar;18(3):469-79.
- Günther, A.E.L., Ermert, L., Breithecker, A., Hackstein, N., Eickelberg, O., Morr, H., Grimminger, F., Velcovsky, H.-G., Seeger, W., 2003: *Klassifikation, Diagnostik und Therapie der idiopathischen interstitiellen Pneumonien: Eine kritische Bestandsaufnahme der gegenwärtig in Deutschland geübten Praxis*, Deutsches Ärzteblatt, Jg. 100, Heft 24, S. A 1676-A 1685

Günther, A.E.L., 2007: *Perspektiven der Therapie fibrosierender Lungenerkrankungen*, Drug Research, 57 (11), S. 736-737

Hakenjos, L., Bamberg, M., Rodeman, H.P., 2000: *TGF- beta 1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation in the radiation-induced fibrotic phenotype*, International Journal of Radiation Biology, Vol. 76 Nr. 4, S. 503-509

Hashimoto, N., Jin, H., Liu, T., Chensue, S.W., Phan, S.H., 2004: *Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 113(2), S. 243-252

Hayashi, T., Stetler-Stevenson, W.G., Fleming, M.V., Fishback, N., Koss, M.N., Liotta L.A., Ferrans, V.J., Travis, W.D., 1996: *Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Pathol, 149, S. 1241-1256

Herrmann, T., Knorr, A., 1995: *Strahlenreaktion der Lunge: Pathogenese-Prävention-Therapie*, Strahlenther Onkol, 171, S. 490-498

Herskind, C., Bamberg, M., Rodemann, H.P., 1998: *The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy*, Strahlenther Onkol, 174, Suppl. III, S.12-15

Hill, R.P., Rodeman, H.P., Hendry, J.H., Roberts, S.A., Anscher, M.S., 2001: *Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic*, Int J radiat Oncol Biol Phys, 49 (2), S. 353-365

Hinz, B., 2007: *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair*, J Invest Dermatol, 127, S. 526-537

Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Chaponnier, C., 2001: *Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblasts contractile activity*, Mol Biol Cell, 12, S. 2730-2741

Hiwatari, N., Shimura, S., Yamaucji, K., Nara, M., Hida, W., Shirato, K., 1997: *Significance of elevated procollagen-III-peptide and transforming growth factor-beta levels of bronchoalveolar lavage fluids from Idiopathic pulmonary fibrosis patients*, Tohoku J. Exp. Med., 181 (2), S. 285-295

Hocher, B., Schwarz, A., Fagan, K.A., Thone-Reineke, C., El-Hag, K., Kusserow, H., Elitok, S., Bauer, C., Neumayer, H.H., Rodman, D.M., Theuring, F., 2000: *Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice*, Am J Respir Cell Mol Biol, 23 (1), S. 19-26

Hoeller, U., Borgmann, K., Feyer, P., Souchon, R., 2007: *On the interaction of adjuvant radiotherapy and tamoxifen treatment for breast cancer*, Strahlenther Onkol. 2007 Oct;183(10):535-44.

Hong, J.H., Jung, S.M, Tsao, T., Wu, C.J., Lee, C.Y, Chen, F.H., Hsu, C.H., McBride, W.H., Chiang, C.S., 2003: *Bronchoalveolar lavage and interstitial cells have different roles in radiation-induced lung injury*, Int J Rad Biol 2003,79(3), 159-16

Hopewell, J.W., Trott, K.R., 2000: *Volume effects in radiobiology as applied to radiotherapy*, *Radiother Oncol*, 56, S. 283-288

Horwitz, D.A., Gray, J.D., Ohtsuka, K., 1999: *Role of NK cells and TGF-beta in the regulation of T-cell-dependent antibody production in health and autoimmune disease*, *Microbes Infect.* 1999 Dec;1(15):1305-11

Hu, B., Wu, Z., Phan, S.H., 2003: *Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression*, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29, S. 397-404

Huber, R.M., Flentje, M., Schmidt, M., Pöllinger, B., Gosse, H., Willner, J., Ulm, K.; Bronchial Carcinoma Therapy Group, 2006: *Simultaneous chemoradiotherapy compared with radiotherapy alone after induction chemotherapy in inoperable stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer: study CTRT 99/97 by the bronchial carcinoma therapy group*, *J Clin Oncol*, 24, S. 4397-4404

Humbert, M., Segal, E.S., Kiely, D.G., Carlsen, J., Schwierin, B., Hoepper, M.M., 2007: *Results of European post-surveillance of bosentan in pulmonary hypertension*, *Eur Respir J.* 2007 Aug;30(2):338-44

Idiopathic Pulmonary Fibrosis, 2000: *Diagnosis and treatment, international consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS)*, *Am J Respir Crit Care Med*, 161, S. 646-664

Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D.M., Grotendorst, G.R., 1993: *Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair*, *Mol Biol Cell.* 1993 Jun;4(6):637-45.

Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., Neilson, E.G., 2005: *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. *J Clin Invest* 2002, 110(3):341-350

Johnston, C.J., Williams, J.P., Elder, A., Hernady, E., Finkelstein, J.N., 2004: *Inflammatory cell recruitment following thoracic irradiation*, *Exp Lung Res*, 30 (5), S. 369-382

Johnston, C.J., Williams, P., Okunieff, P., Finkelstein, J.N., 2002: *Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine receptor families*, *Radiat Research*, 157, S. 256-265

Jordana, M.J., Schulmann, C., McSharry, L.B., Irving, M.T., Newhouse, G., Gauldie, J., 1988: *Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and colonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue*, *Am Rev Respir Dis* 137, S. 579-584

Kalluri, R., Neilson, E.G., 2003: *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*, *J. Clin. Invest.* 112:1776-1784

Kapanci, Y., Desmouliere, A., Pache, J.C., Redard, M., Gabbiani, G., 1995: *Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis*, Am J Respir Crit Care Med, 152, S. 2163-2169

Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T., Zhang, Z., *TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT)*, Respir Res. 2005; 6(1):56. doi: 10.1186/1465-9921-6-56

Kasper, M., 1999: *Re: Alterations in cytokeratin expression by the alveolar lining epithelial cells in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis*, J Pathol 188 (2), S. 227

Kasper, M., Haroske, G., 1996: *Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis*, Histol Histopathol, 11, S. 463-483

Kasper, M., Koslowski, R., Luther, T., Schuh, D., Muller, M., Wenzel, K.W., 1995: *Immunohistochemical evidence for loss of ICAM-1 by alveolar epithelial cells in pulmonary fibrosis*. Histochem Cell Biol.; 104:397-405

Katzenstein, A.L., Fiorelli, R.F., 1994: *Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance*, Am J Respir Crit Care Med 154 (4 Pt 1), S. 1301-1315

Katzenstein, A.L., Myers, J.L., 1998: *Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical relevance of Pathologic Classification*, Am J Respir Crit Care Med, 157, S. 1301-1315

Katzenstein, A.L., Myers, J.L., 2000: *Nonspecific interstitial pneumonia and the other idiopathic interstitial pneumonias: classification and diagnostic criteria*, Am J Surg Pathol. 2000 Jan;24(1):1-3.

Kelley, J., 1993: *Transforming Growth Factor-beta*, in Kelley, J. (Hrsg.): *Cytokines of the Lung*, New York, S. 101-137

Keogh, B., Crystal, R.G., 1982: *Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders*. Editorial. Thorax 37, S. 1-10

Khalil, N., O'Connor, R.N., Unruh, H.W., Warren, P.W., Flanders, K.C., Kemp, A., Berezney O.H., Grennberg, A.H., 1991: *Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Cell Mon Biol, 5, S. 155-162

Khalil, N., O'Connor, R.N., Flanders, K.C., Unruh, H., 1996: *TGF- β 1, but not TGF- β 2 or TGF- β 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study*. Am J Respir Cell Mol Biol, **14**:131-138

Kim, S.-J., Angel, P., Lafyatis, R., Hattori, K., Kim, K.Y., Sporn, M.B., Karin, M., Roberts, A.B., 1990: *Autoinduction of transforming growth factor-beta1 is mediated by the AP-1 complex*, Molecular and Cellular Biology, S. 1492-1497

Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.M., Sheppard, D., Chapman, H.A., 2006: *Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix.* Proc Natl Acad Sci USA, 103 (35), S. 13180-13185

King Jr, T.E., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., Hormel, P., Lancaster, L., Noble, P.W., Sahn, S.A., Szwarcberg, J., Thomeer, M., Valeyre, D., du Bois, R.M., 2009: *Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial*. Lancet, 2009. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60551-1. Epub 2009 Jun 29.

Kjetil, A., Gail, E.M.M., Kolb, M., Gauldie, J., 2006: *Targeting genes for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities, promises and pitfalls*, Proceedings of the ATS, 3, S. 389-393

Klinke, R., Silbernagel, S. (Hrsg.), 2003: *Lehrbuch der Physiologie*, 4. Auflage, Thieme-Verlag Stuttgart

Kolb, M., Margetts, P.J., Galt, T., Sime, P.J., Xing, Z., Schmidt, M., Gauldie, J., 2001: *Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin*, Am J Respir Crit Care Med, 163, S. 770-777

Kolb, M., Schmidt, M., 2003: *The role of cytokines and growth factors in fibroproliferative lung disease*, Pneumologie, 57, S. 91-97

Kolb, M., Willner, J., Koeberlein, E., Hoffmann, U., Kirschner, J., Flentje, M., Schmidt, M., 1999: *Autokrine Aktivierung von Fibroblasten nach Bestrahlung*, Pneumologie, 53, S. 1-6

Kothapalli, D., Frazier, K.S., Welply, A., Segarini, P.R., Grotendorst, G.R., 1997: *Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway*, Cell Growth Differ. 1997 Jan;8(1):61-8.

Kuhn, C., Boldt, J., King, T.E. Jr., Crouch, E., Vartio, T., McDonald, J.A., 1989: *An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis*, Am Rev Respir Dis 140 (6), S. 1693-1703

Kuhn, C., McDonald, J.A., 1991: *The role of myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis: ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis*. Am J Pathol, 139, S. 1257-65

Lama, V.N., Phan, S.H., 2006: *The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond*, Proc Am Thorac Soc 3 (4), S. 373-376

Lara, P.C., Russell, N.S., Smolders, I.J., Bartelink, H., Begg, A.C., Coco-Martin, J.M., 1996: *Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production*, Int J Radiation Biology, Vol. 70 Nr. 6, S. 683-692

Lasky, J.A., Brody, A.R., 2000: *Interstitial Fibrosis and Growth Factors* , Environ Health Perspec, 108 (Suppl. 4), S. 751-762

Lasky, J.A., Ortiz, L.A., Tonthat, B., Hoyle, G.W., Corti, M., Athas, G., Lungarella, G., Brody, A., Friedman, M., 1998: *Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis* , American Journal of Physiology, 275, S. L365-L371

Laurent, G.J., Chambers, R.C., Hill, M.R., McAnulty, R.J., 2007: *Regulation of matrix turnover: fibroblasts, forces, factors and fibrosis*, Biochem Soc Trans, 35, S. 647-651

Lawrence, D.A, 1996: *Transforming growth factor-beta: a general review* , European Cytokine Network Vol. 7 Nr 3, S. 363-374.

Lipson, K.E., Wong, C., Teng, Y., Spong, S., 2012: *CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis*, Fibrogenesis & Tissue Repair, 5 (Suppl 1): S. 24

Lorena, D., Uchio, K., Costa, A.M., Desmouliere, A., 2002: *Normal scarring: importance of myofibroblasts*, Wound Repair Regen, 10, S. 86-92

Martin, M., Lefaix, J.L., Delanian, S., 2000: *TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 47 (2), S. 277-290

Martin, M., Lefaix, J.L., Pinton, P.H., Crechet, F., Daburon, F., 1993: *Temporal modulation of TGF-beta1 and beta-actin gene expression in pig skin and muscular fibrosis after ionizing radiation*, Radiat Research, 134, S. 63-70

Martinet, Y., Menard, O., Vaillant, P., Vignaud, J.-M., Martinet, N., 1996: *Cytokines in human lung fibrosis*, Arch Toxicol, Vol. 18, S. 127-139

Martinez, F.J., 2006: *Idiopathic interstitial pneumonias: usual interstitial pneumonia versus nonspecific interstitial pneumonia*, Proceedings of the ATS, 3, S. 81-95

Mason, R.J., Schwarz, M.I., Hunninghake, G.W., Musson, R.A., 1999: *NHLBI Workshop Summary. Pharmacological therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. Past, present, and future*, Am J Respir Crit Care Med 160 (5 Pt 1), S. 1771-1777

Massague, J., Blain, S.W., Lo, R.S., 2000: *TGF-beta signaling in growth control, cancer, and heritable disorder*, Cell 103, S. 295-309

McAnulty, R.J., Staple, L.H., Guerreiro, D., Laurent, G.J., 1988: *Extensive changes in collagen synthesis and degradation compensatory lung growth*, Am J Physiol 255, S. C754-C759

McBride, W.H., Vegesna, V., 2000: *The role of T-cells in radiation pneumonitis after bone marrow transplantation*, Int J Radiat Biol, 76, S. 517-521

McDonald, S., Rubin, P., Phillips, T.L., 1995: *Injury from the lung cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints and potential scoring systems*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 31, S. 1187-1203

Mehta, V., 2005: *Radiation pneumonitis and pulmonary fibrosis in non-small-cell lung cancer: pulmonary function, prediction, and prevention*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 63, S. 5-24

Metzler, E.B., Noble, P.W., 2008: *Review: Idiopathic pulmonary fibrosis*, Orphanet Journal of Rare Diseases, 3, S. 1186/1750-1172-3-8

Miyazaki, M., Ohashi, R., Tsuji, T., Mihara, K., Gohda, E., Namba, M., 1998: *Transforming Growth Factor-beta1 stimulates or inhibits cell growth via down-or up-regulation of p 21/Waf 1*, Biochem Biophys Res Commun, 246, S. 873-880

Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T., Takehara, K., 1999: *Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model.*, J Cell Physiol. 1999 Oct;181(1):153-9

Movsas, B., Scott, C., Langer, C., Werner-Wasik, M., Nicolaou, N., Komaki, R., Machtay, M., Smith, C., Axelrod, R., Sarna, L., Wasserman, T., Byhardt, R., 2005: *Randomized trial of amifostine in locally advanced non-small-cell lung cancer patients receiving chemotherapy and hyperfractionated radiation: radiation therapy oncology group trial 98-01*, J Clin Oncol, 23, S. 2145-2154

Movsas, B., Raffin, T.A., Epstein, A.H., 1997: *Pulmonary radiation injury*, Chest, 111, S. 1061-1076

Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.E., Mazziere, R., Nunes, I., Ritkin, J.S., 1997: *Latent transforming growth factor-beta: Structural features and mechanism of activation*, Kidney Int, 51, S. 1376-1382

Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., Rifkin, D.B., Sheppard, D., 1999: *The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF-beta1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis.* Cell, 96, S. 319-328

Murray, J.C., Laurent, G.J., 1988: *What is pulmonary fibrosis?*, Thorax, 43, S. 9-11

Nakagome, K., Dohi, M., Okunishi, K., Tanaka, R., Miyazaki, J., Yamamoto, K., 2006: *In vivo Il-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung*, Thorax 61 (10), S. 886-894

Nazareth, M.R., Broderick, L., Simpson-Abelson, M.R., Kelleher, R.J. Jr., Yokota, S.J., Bankert, R.B., 2007: *Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells*, J Immunol 178 (9), S. 5552-5562

- Nicholson, A.G., Fulford, L.G., Colby, T.V., du Bois, R.M., Hansell, D.M., Wells, A.U., 2002: *The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med 166:173-177
- Nicod, L.P., 1998: *Recognition and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis*, Drugs, 55, S. 555-562
- Nobel, P.W., Homer, R.J., 2004: *Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights into pathogenesis*. Clin Chest Med, 25 (4), S. 749-758
- Öztürk, B., Egehan, I., Atavci, S., Kitapci, M., 2004: *Pentoxifylline in prevention of radiation-induced lung toxicity in patients with breast and lung cancer: A double-blind randomized trial*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 58, S. 213-219
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., Werb, Z., 2007: *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling*, Nat Rev Mol Cell Biol, 8, S. 221-233
- Pan, L.H., Yamauchi, K., Uzuki, M., Nakanishi, T., Takigawa, M., Inoue, H., Sawai, T., 2001: *Type II alveolar epithelial cells and intestinal fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF*. Eur Respir J, 17, S. 1220-1227
- Pelton, R.W., Moses, H.L., 1990: *The beta-type transforming growth factor*, Am Rev Respir Dis, 142, S. 31-35
- Phillips, R.J., Brudick, M.D., Hong, K., Lutz, M.A., Murray, L.A., Xue, Y.Y., Belperio, J.A., Keane, P., Strieter, R.M., 2004: *Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis*. J Clin Invest, 114 (3), S. 438-446
- Pirozynski, M., 2006: *100 years of lung cancer*, Respir Med 100 (12), S. 2073-2084
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., West, A.B., 1999: *Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease*, Am J Physiol 277 (1 Pt 1), S. C1-9
- Rafii, R., Juarez, M.M., Albertson, T.E., Chan, L.A., 2012: *A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis*, J Thorac Dis 2013;5(1):48-73. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2012.12.07
- Riesenbeck, D., Herrmann, T., 2000: *Lunge und Bronchialsystem*, in Herrmann, T., Dörr, W.(Hrsg.): *Nebenwirkungen in der Radioonkologie*, München, Urban und Vogel
- Rodemann, H.P., Bamberg, M., 1995: *Cellular basis of radiation-induced fibrosis*, Radiother Oncol, 35, S. 83-90
- Rodemann, H.P., Binder, A., Burger, A., Güven, N., Löffler, H., Bamberg, M., 1996: *The underlying cellular mechanism of fibrosis*, Kidney Int Suppl., 54, S. 32-36
- Rodemann, H.P., Peterson, H.P., Schwenke, K., von Wangenheim, K.H., 1991: *Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation*, Scanning Microsc, 5 (4), S. 1135-1143

- Rodrigues, G., Lock, M., D'Souza, D., Yu, E., Van Dyk, J., 2004: *Prediction of radiation pneumonitis by dose-volume histogram parameters in lung cancer-a systematic review*, *Radiother Oncol*, 71, S. 127-38
- Roehrich, M., Zhang, M., Capper, D., Wirkner, U., Trinh, T., Debus, J., Timke, C., Jenne, J., Huber, P., 2011: *An anti-CTGF-antibody attenuates tumor invasion, delays tumor-growth, and prolongs survival alone and in combination with radiation in an orthotopic glioma*, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 81 (2), S. 738-739
- Rubin, P., Johnston, C.J., Williams, J.P., McDonald, S., Finkelstein, J.N., 1995: *A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 33, S. 99-109
- Rübe, C.E., Uthe, D., Schmid, K.W., Richter, K.D., Wessel, J., Schuck, A., Willich, N., 2000: *Dose-dependent induction of transforming growth factor β in the lung of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 47, n0.4, S. 1033-1042
- Sauer, R., 1998: *Strahlentherapie und Onkologie für MTA-R*, 3. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- Sause, W., Kolesar, P., Taylor, S. IV, Johnson, D., Livingston, R., Komaki, R., Emami, B., Curran, W. Jr, Byhardt, R., Dar, A.R., Turrisi, A. 3rd, 2000: *Final results of phase III trial in regionally advanced unresectable non-small cell lung cancer: Radiation Therapy Oncology Group, Eastern Cooperative Oncology Group, and Southwest Oncology Group*, *Chest*, 117, S. 358-364
- Schmidt, M., Sun, G., Stacey, M.A., Mori, L., Mattoli, S., 2003: *Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma*, *J Immunol* 171 (1), S. 380-389
- Scotton, C.J., Chambers, R.C., 2007: *Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus*, *Chest*, 132, S. 1311-1321
- Selman, M., King, T. E., Pardo, A., 2001: *Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy*. *Ann Intern Med* 134 (2), S. 136-151.
- Selman, M., Pardo A., 2002: *Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder*. *Respir Res*, 3:3, Print ISSN 1465-9921; Online ISSN 1465-993X
- Selman, M., Ruiz, V., Cabera, S., Segura, L., Ramirez, R., Barrios, R. et al., 2000: *Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Physiol*, 297, S. L562-574
- Severin, E., Greve, B., Pascher, E., Wedemeyer, N., Hacker-Klom, U., Silling, G., Kienast, J., Willich, N., Göhde, W., 2006: *Evidence for predictive validity of blood as-*

says to evaluate individual radiosensitivity , Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2006 Jan 1;64(1):242-50

Sfikakis, P.P., Papamichael, C., Stamatelopoulos, K.S., Tousoulis, D., Fragiadaki, K.G., Katsichti, P., Stefanadis, C., Mavrikakis, M., 2007: *Improvement of vascular endothelial function using the oral endothelin receptor antagonist bosentan in patients with systemic sclerosis*, Arthritis Rheum 56 (6), S. 1985-1993

Sheppard, D., 2001: *Pulmonary fibrosis: a cellular overreaction or a failure of communication?*, J Clin Invest, 107, S. 1501-1502

Shi-wen, X., Stanton, L.A., Kennedy, L., Pala, D., Chen, Y., Howat, S.L., Renzoni, E.A., Carter, D.E., Bou-Gharios, G., Stratton, R.J., Pearson, J.D., Beier, F., Lyons, K.M., Black, C.M., Abraham, D.J., Leask, A., 2006: *CCN2 is necessary for adhesive responses to transforming growth factor-beta1 in embryonic fibroblasts*, J Biol Chem. 2006 Apr 21;281(16):10715-26

Shi-Wen, X., Chen, Y., Denton, C.P., Eastwood, M., Renzoni, E.A., Bou-Gharios, G., Pearson, J.D., Dashwood, M., Du Bois, R.M., Black, C.M., Lesak, A., Abraham, D.J., 2004: *Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts*, Mol Biol Cell 15 (6), S. 2707-2719

Sime, P.J., Xing, Z., Graham, F.L., Csaky, K.G., Gauldie, J., 1997: *Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung*, J. Clin. Invest., 100 (4), S. 768-776

Sporn, M., 1997: *The importance of context in cytokine action*, Kidney International, Vol 51, S. 1352-1354

Strieter, R.M., 2005: *Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel*. Chest, 128 (5 Suppl I), S. 526S-532S

Strutz, F., Zeisberg, M., Renziehausen, A., Raschke, B., Becker, V., van Kooten, C., Müller, G., 2001: *TGF-beta1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2)*, Kidney International, Vol 59, S. 579-592

Sundarshan, C., Yaswen, L., Kulkarni, A., Raghow, R., 1998: *Phenotypic consequences of transforming growth factor beta-1 gene ablation in murine embryonic fibroblasts : autocrine control of cell proliferation and extracellular matrix biosynthesis*, J Cell Physiol, 176, S. 67-75

Suzuki, Y., Tanigaki, T., Heimer, D., Wang, W., Ross, W.G., Murphy, G.A., Sakai, A., Sussmann, H.H., Vu, T.H., Raffin, T.A., 1994: *TGF-beta causes increased endothelial ICAM-1 expression and lung injury*, J Appl Physiol 77, S. 1281-1287

Takanami, I., Imamura, T., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamoto, Y., Kodaira, S., 1994: *Transforming growth factor beta1 as a prognostic factor in pulmonary adenocarcinoma*, J Clin Pathol, 47, S. 1098-1100

Taniguchi, H., Ebina, M., Kondoh, Y., Ogura, T., Azuma, A., Suga, M., Taguchi, Y., Takahashi, H., Nakata, K., Sato, A., Takeuchi, M., Raghu, G., Kudoh, S., Nukiwa, T., 2010: *Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis* , Eur Respir J 35(4):821-9. doi: 10.1183/09031936.00005209

Thomas, A., Wynn, 2007: *Common unique fibrosis in various fibroproliferative diseases*, J Clin Invest, 117, S. 524-529

Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R.A., 2002: *Myofibroblast and mechano-regulation of connective tissue remodeling*, Nat Rev Mol Cell Biol, 3, S. 349-363

Travis, E.L., Komaki, R., 1996: *Treatment-related lung damage*, in Pass, H.I., Mitchell, J.B., Johnson, D.H. (eds.): *Lung cancer: principles and practice* , Philadelphia: Lippincott-Raven

Tryggvason, K., Soininen, R., Hostikka, S.L., Ganguly, A., Huotari, M., Prockop, D.J., 1990: *Structure of the human type IV collagen genes*, Ann N Y Acad Sci, 580, S. 97-111

Tsoutsou, P.G., Koukourakis, M.I., 2006: *Radiation pneumonitis and fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 66, S. 1281-1293

Uhal, B.D., Joshi, I., Hughes, W.F., Ramos, C., Pardo, A., Selman, M., 1998: *Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung*. Am J Physiol, 275, S. L1192-1199

Uhal, B.D., Joshi, I., True, A.L., Raza, A., Pardo, A., Selman, M., 1995: *Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro*, Am J Physiol, 296, S. L819-828

Vollmerhaus, B., Frewein, J., 1994: *Anatomie von Hund und Katze*, 1. Aufl. Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin; S. 186-194

Vujaskovic, Z., Marks, L.B., Anscher, M.S., 2000: *The physical parameters and molecular events associated with radiation lung toxicity* , Seminars in Radiation Oncology, Vol. 10 Nr. 4, S. 296-307

Ward, P.A., Hunninghake, G.W., 1998: *Lung inflammation and fibrosis* , Am J Respir Crit Care Med, 157, S. 123-129

Williams, J.P., Johnston, C.J., Finkelstein, J.N., 2010: *Treatment for radiation-induced pulmonary late effects: Spoiled for choice or looking in the wrong direction?* Curr Drug Targets; 11(11): S. 1386-1394.

Williams, K., Malarkey, D., Cohn, L., Patrick, D., Dye, J., Galen, T., 2004: *Identification of spontaneous feline idiopathic pulmonary fibrosis: morphology and ultrastructural evidence for a type II pneumocyte defect*. Chest., 125(6), S. 2278-2288

Willis, B.C., du Bois, R.M., Borok, Z., 2006: *Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung*, Proc Am Thorac Soc, 3, S. 377-382

Wills, B.C., Liebler, J.M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A.G., Crandall, E.D., du Bois, R.M., Borok, Z., 2005: *Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor beta 1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Pathol, 166 (5) S. 1321-1332

Wilson, M.S., Wynn, T.A., 2009: *Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation*, Mucosal Immunol.; 2(2): S. 103-121. doi:10.1038/mi.2008.85.

Wynn, T.A., 2007: *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases*, J Clin Invest.; 117(3): S. 524-529

Wynn, T.A., 2008: *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 214, S. 199-210 doi: 10.1002/path

Wynn, T.A., 2011: *Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis*, J Exp Med.; 208(7): S. 1339-1350. doi: 10.1084/jem.20110551.

Yang, I.V., 2012: *Epigenomics of idiopathic pulmonary fibrosis*, Epigenomics; 4(2): S. 195-203. doi:10.2217/epi.12.10.

Zavadil, J., Böttinger, E.P., 2005: *TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions*, Oncogene, 24, S. 5764-5774

Zhang, M., Herion, T.W., Timke, C., Han, N., Hauser, K., Weber, K.J., Peschke, P., Wirkner, U., Lahn, M., Huber, P., 2011: *Trimodal glioblastoma treatment consisting of concurrent radiotherapy, temozolomide, and the novel TGF- β receptor I kinase inhibitor LY2109761*. Neoplasia 13:537-549

Zhang, M., Kleber, S., Roehrich, M., Timke, C., Han, N., Tuettenberg, J., Martin-Villalba, A., Debus, J., Peschke, P., Wirkner, U., Lahn, M.M., Huber, P., 2011: *Blockade of TGF- β signaling by the TGF β R-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma*. Cancer Research 71: 7155-7167

Zhang, K., Phan, S.H., 1996: *Cytokines and pulmonary fibrosis*, Biol Signals 5 (4), S. 232-239

Ziesche, R., Hofbauer, E., Wittmann, K., Petkow, V., Block, L.H., 1999: *A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolon in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*, N Engl J Med, 341, S. 1264-1269

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Huber danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Betreuung der Arbeit. Bei Frau Prof. Dr. Johanna Plendl bedanke ich mich für die Betreuung der Arbeit von tiermedizinischer Seite aus.

Ganz besonderer Dank geht an Thuy Trinh, die mir bei der experimentellen Arbeit in Bezug auf Ausführung und Auswertung mit ihrer sachkundigen Erfahrung eine außerordentliche und unermüdliche Hilfe war.

Ebenso danke ich Thomas Regiert für seine tatkräftige und freundliche Unterstützung bei den proteinbiochemischen Versuchen.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Mitdoktoranden Manuel Röhrich, der mir mit seinen Computerkenntnissen die Fertigstellung der Dissertation deutlich erleichtert hat.

Mein größter Dank gilt meinem Großvater, ohne den ich diesen Weg nicht eingeschlagen hätte, meinen Eltern, die mir diesen Weg ermöglicht haben und Tacker, ohne den ich diesen Weg nicht geschafft hätte.

11 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Johanna Pföhler