

**Strahleninduzierte Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 und  
Phosphorylierung von Smad2 im Prozess der terminalen  
Differenzierung von humanen Hautfibroblasten**

**DISSERTATION**

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**2004**

**vorgelegt**

**von**

**Oliver Haase**

**Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2004**

**Dekan: Prof. Dr. S. Laufer**

**Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Machulla  
Prof. Dr. H. P. Rodemann**

*Für meine Oma Lilo*

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Tübingen (Prof. Dr. H. P. Rodemann) und in der Abteilung Biophysik der Gesellschaft für Schwerionenbestrahlung (GSI), Darmstadt (Prof. Dr. G. Kraft) in der Zeit von April 1998 bis Dezember 2003 angefertigt.

# Inhaltsverzeichnis

## *Abkürzungen*

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Krebs in Deutschland .....	1
1.2 Strahlentherapie bei Krebs .....	1
1.3 Strahlen und ihre Wirkung .....	1
1.3.1 Röntgenstrahlen.....	2
1.3.2 Ionenstrahlen .....	3
1.4 Fibrose als Spätfolge nach Bestrahlung .....	5
1.5 Das Fibroblastenzellsystem.....	5
1.6 TGF- $\beta$ 1 und sein Signalweg.....	7
1.6.1 TGF- $\beta$ 1 – “Transforming-Growth-Factor-beta1” .....	7
1.6.2 Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ 1-Komplexes .....	8
1.6.3 TGF- $\beta$ 1 Signaltransduktion.....	9
1.7 Ziel der Arbeit .....	11
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Zellkultur.....	12
2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen .....	12
2.1.2 Kulturbedingungen.....	13
2.1.3 Passagieren .....	13
2.1.4 Mediumwechsel .....	14
2.1.5 Depletion von Zellkulturen .....	14
2.1.6 Kryokonservierung von Zellen.....	15
2.1.7 DAPI-Test auf Mycoplasmen.....	15
2.1.7.1 Darstellung der Mycoplasmen durch Fluorochromierung mit DAPI.....	15
2.1.7.2 Durchführung des DAPI.....	16
2.1.8 Auftauen tiefgefrorener Zellen.....	16
2.1.9 Koloniebildungstest (Kobi).....	16
2.1.9.1 Ausplattieren eines Koloniebildungstests .....	17
2.1.9.2 Fixieren und Färben der Klonkulturen.....	17
2.1.9.3 Bestimmung der Klonierungseffizienz.....	18

2.2 Bestrahlung von <i>in vitro</i> Zellkulturen .....	18
2.2.1 Bestrahlung mit Röntgenstrahlen .....	19
2.2.2 Bestrahlung mit Schwerionen .....	19
2.2.3 Dosis-Wirkungskurven.....	19
2.2.4 Bestimmung des Differenzierungsmuster .....	20
2.2.5 Bestimmung des Gesamtgehalts an TGF- $\beta$ 1 im Mediumüberstand mittels ELISA ..	21
2.2.5.1 Probenvorbereitung .....	21
2.2.5.2 Versuchsdurchführung .....	21
2.4 Umschreibung von RNA in cDNA .....	23
2.5 PCR zur Herstellung von DNA-Sonden.....	24
2.6 Real-time PCR mit dem LightCycler .....	25
2.7 Agarose-Gele.....	26
2.8 Northern-Blot .....	26
2.8.1 Puffer und Lösungen .....	26
2.8.2 Gelelektrophorese.....	27
2.8.3 Kapillarblotting .....	28
2.8.4 Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde.....	28
2.8.4.1 Markierung der Sonde mit $^{32}\text{P}$ -dATP.....	28
2.8.4.2 Hybridisierung.....	29
2.8.4.3 Stripping .....	29
2.9 Proteinisolierung aus Zellen.....	30
2.10 Immunpräzipitation .....	30
2.11 Western-Blot .....	31
2.11.1 Puffer und Lösungen .....	31
2.11.2 SDS-Gelelektrophorese .....	33
2.11.3 „Semi-Dry“-Blot .....	34
2.11.4 Immunreaktion zum Nachweis eines bestimmten Proteins.....	34
2.12 Einengen der Mediumüberstände .....	35
2.13 Statistische Auswertung .....	35
2.14 Chemikalien .....	35
2.15 Geräte .....	37
2.16 Materialien .....	38

<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1 Strahlensensitivität der acht Hautfibroblastenzellstämme .....	39
3.2 Analyse des Differenzierungsmusters .....	41
3.2.1 PMF:MF-Verhältnis der unbestrahlten Fibroblastenzellstämme .....	41
3.2.2 L:E-Verhältnis der Fibroblastenzellstämme vor und nach Bestrahlung .....	42
3.3 Vergleich von Photonen- und Schwerionenbestrahlung .....	42
3.4 Genexpression von TGF- $\beta$ 1 nach Bestrahlung .....	45
3.4.1 TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression 6 h nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen.....	46
3.4.2 Vergleich mit der TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression nach Schwerionenbestrahlung .....	49
3.4.3 TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression verschiedene Zeiten nach Bestrahlung mit 2 Gy .....	51
3.5 Gehalt an TGF- $\beta$ 1 im Mediumüberstand der Zellstämme nach Photonenbestrahlung.....	52
3.5.1 Bestimmung des Gesamtgehalts an TGF- $\beta$ 1 .....	52
3.5.2 Analyse des Levels an aktivem TGF- $\beta$ 1 .....	55
3.5.3 Gehalt an aktivem TGF- $\beta$ 1 nach Bestrahlung in Abhängigkeit der Protease Furin....	56
3.6 Expression und Aktivierung von Smad2 in verschiedenen Fibroblastenzellstämmen .....	56
3.6.1 Phosphorylierung von Smad2 nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung.....	57
3.6.2 Smad2-Aktivierung nach Photonenbestrahlung.....	57
3.6.3 TGF- $\beta$ 1 abhängige Smad2-Phosphorylierung nach Bestrahlung.....	58
3.7 Expression des Zellzyklus-Regulatorproteins p21 in den Fibroblastenzellstämmen nach Bestrahlung.....	60
3.7.1 p21 mRNA-Expression nach Photonenbestrahlung .....	60
3.7.2 Proteinexpression von p21 nach Bestrahlung .....	61
3.7.2.1 p21-Proteinexpression in verschiedenen Fibroblastenzellstämmen nach Photonenbestrahlung .....	61
3.7.2.2 Proteinexpression von p21 nach Photonen- und Schwerionenbestrahlung.....	62
3.7.3 TGF- $\beta$ 1-abhängige Proteinexpression von p21 nach Photonenbestrahlung .....	64
3.8 Differenzierungsmuster nach Bestrahlung in Abhängigkeit vom Furin-Inhibitor .....	65
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>68</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>

## *Abkürzungen*

Abb	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	zyklische DNA
CPD	kumulative Populationsverdopplung
DAPI	Diamidinophenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dd	bidestilliert
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent assay
h	Stunde(n)
K	Kontrolle
MF	Progenitorfibroblasten
min	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA
NP-40	Nonidet-P-40
<sup>32</sup> P	radioaktiv markierter Phosphor
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Zellverdopplungsrate
PE	plating efficiency (Klonierungseffizienz)
PMF	Funktionsfibrozyten
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	survival fraction (Überlebensrate)
Tab	Tabelle
TGF-β	Transforming-Growth-Factor-beta
U	units

# **1 Einleitung**

## **1.1 Krebs in Deutschland**

Unter Krebs versteht man alle bösartigen Gewebeneubildungen einschließlich der primär systemischen Lymphome und Leukämien. Tumorerkrankungen sind nach den Krankheiten des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an Krebs in Deutschland wird auf ca. 168.000 Fälle bei Männern und ca. 179.000 bei Frauen geschätzt. Dabei ist bei Männern Lungenkrebs die häufigste zum Tode führende Krebskrankheit, bei Frauen ist es Brustkrebs. Die absolute Zahl der jährlichen Krebsneuerkrankungen hat bei Männern zwischen 1990 und 1998 um 11 % und bei Frauen um 7 % zugenommen.

## **1.2 Strahlentherapie bei Krebs**

Tumorerkrankungen sind nicht unheilbar. Es bestehen Heilungschancen solange sich keine Metastasen gebildet haben und der Tumor lokalisiert ist. Die Hälfte der an Krebs Erkrankten wird mit chirurgischen Methoden behandelt. Zehn Prozent der Fälle werden ausschließlich mit Zytostatika chemotherapiert. Nahezu 40 Prozent aller Krebserkrankungen werden allein oder in Kombination mit anderen Methoden bestrahlt. Bestrahlung erfolgt entweder extern durch eine entsprechende Strahlenquelle, intraoperativ oder durch in das kranke Organ eingebrachte radioaktiv strahlende Präparate (z.B. Jodtherapie, Brachytherapie).

Die externe Bestrahlung erfolgt überwiegend mit energiereicher Röntgen- bzw. Gammastrahlung. Daneben gibt es noch die Bestrahlung mit atomaren Teilchen. Diese Alternative zur Röntgenbestrahlung kam bisher nur selten bei speziellen Tumoren zur Anwendung.

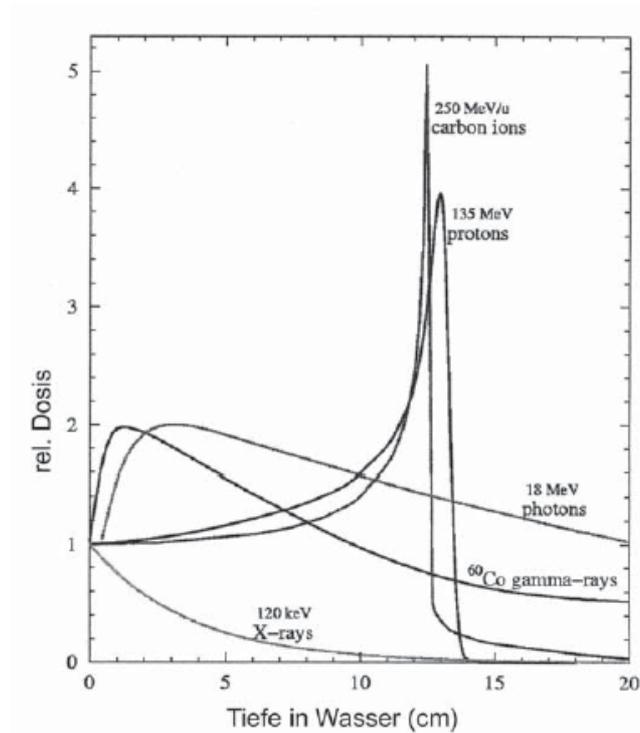
## **1.3 Strahlen und ihre Wirkung**

Strahlung wirkt durch die in einer Zelle ausgelösten Ionisationsereignisse. Je höher die Ionisationsdichte ist, um so wirksamer werden bösartige – aber auch gutartige – Zellen abgetötet werden. Das Geschehen des radiogenen Zelltodes wird von komplexen zellulären

Mechanismen bestimmt. Der Schlüssel zum Verständnis liegt in der Hierarchie also der Organisation der biologischen Zelle. Moleküle, die häufig vorkommen, können die Zerstörung einiger weniger Exemplare verkraften. Moleküle, die klein sind, werden weniger getroffen und haben eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit. Um die genetische Stabilität biologischer Zellen zu gewährleisten, hat die Natur ein System von Redundanz und Reparatur geschaffen. Schäden durch ionisierende Strahlung, wie Einzelstrangbrüche, können effizient repariert werden, da die Information auf den anderen Strang erhalten bleibt. Für Doppelstrangbrüche ist die komplette Reparatur schwieriger. Schadenshäufungen, bei denen größere Bruchstücke der Information ausgelöscht wurden, können nicht mehr repariert werden. Die Zelle ist dann nicht mehr teilungsfähig und löst sich auf durch Apoptose, den von der Zelle selbst gesteuerten und programmierten Tod.

### **1.3.1 Röntgenstrahlen**

Die heute in der Medizin verwendete elektromagnetische Strahlung, allgemein Röntgenstrahlung, gehört zur locker ionisierenden Strahlung. Da Tumoren ebenso viel Strahlung aushalten wie gesundes Gewebe, kommt es darauf an, die Dosis in der Geschwulst zu konzentrieren. Dies gelingt mit elektromagnetischer Strahlung unterschiedlicher Strahlungsenergie nur unbefriedigend, da ihre Dosis gesetzmäßig mit der Körpertiefe abnimmt. Abb. 1 gibt Tiefendosiscurven verschiedener Strahlungsarten wieder, so auch für Röntgen-, Gamma- und Photonenstrahlung. Die drei Tiefendosiscurven verdeutlichen, dass das Gewebe, das der Strahl auf seinem Weg zu einem tiefer liegenden Tumor durchdringt, eine mehrfach höhere Dosis erhält als der Tumor selbst. Da Röntgenstrahlung prinzipiell nicht lokal gestoppt werden kann, erhält auch das tiefer als der Tumor liegende Gewebe stets noch eine Strahlendosis. Die volle Dosis kommt weit vor dem Tumor zum Tragen und beschädigt auch gesunde Organe. Dieser in der Tumorthherapie unbefriedigende Dosisabfall ist unabhängig von der Energie des erzeugten Röntgenstrahls und kann nicht verhindert, höchstens modifiziert werden. Nebenschäden können nicht vollständig vermieden werden, auch wenn das gesunde Gewebe schonend, aus verschiedenen Richtungen, überlappend am Tumor bestrahlt wird. Inzwischen wurden moderne Bestrahlungstechniken (Linearbeschleuniger) für Photonen entwickelt, die mit inverser Strahlungsplanung und intensitätsmodulierter Bestrahlung arbeiten.

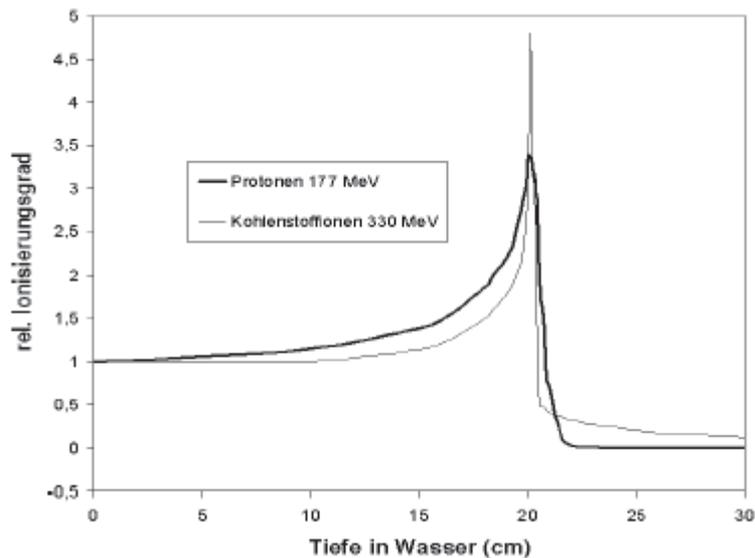


**Abb. 1:** Tiefendosisprofile verschiedener Strahlenarten

### 1.3.2 Ionenstrahlen

Geladene Teilchen, wie Protonen oder schwere Ionen, sind konventioneller Röntgenstrahlung weit überlegen. Das Verhältnis von Schädigung des gesunden Gewebes und erwünschter Schädigung im Tumor ist um ein Vielfaches günstiger. Der wesentliche klinische Vorteil ist das „umgekehrte“ Dosisprofil, also der Anstieg der Dosis mit zunehmender Eindringtiefe, sowie eine kleinere Strahlaufstreuung. Die strahlenbiologischen Eigenschaften sind ähnlich wie bei hochenergetischen Photonen im Wesentlichen durch die elektromagnetische Wechselwirkung mit Elektronen bestimmt. Die lokale Schadensdichte in der Spur lässt sich so auswählen, dass bei hohen Energien am Eingangsbereich des Strahls noch vorwiegend reparable Schäden produziert werden, am Ende der Reichweite bei niedriger Energie im Tumorgewebe aber vorwiegend irreparable Schäden stattfinden. Projektilen mit einer bestimmten Anfangsenergie werden im Körper verlangsamt und geben dabei nur wenig Energie an das umgebende Gewebe ab. Je langsamer sie dadurch werden, um so mehr Energie wird abgegeben. Das Maximum der Energieabgabe findet am Ende des Weges statt (Bragg-Peak). Damit ist die Ortsdosis beim Strahleneintritt in den Körper um ein Vielfaches niedriger als bei konventionellen Röntgenstrahlen. Sie ist im Tumor (Bragg-peak im Tumor positioniert) wesentlich höher, und im tiefer liegenden Gewebe findet keine Schädigung mehr statt. Abb. 2 zeigt die

Tiefendosisprofile von Protonen und Kohlenstoff-Ionen, aufgetragen über dem relativen Ionisierungsgrad. Der Protonen-Bragg-Peak ist dabei breiter als der für Ionen. Der Abfall des Ionen-Bragg-Peak ist steiler, aber im Niederdosisanteil hinter dem Bragg-Peak ungünstiger als für Protonen.



**Abb. 2:** Vergleich der Tiefendosisprofile von Protonen und Kohlenstoffionen

Durch geeignete Wahl der Primärenergie kann dieses Maximum in verschiedene Gewebetiefen gelegt werden. Durch zusätzliche elektronische Variation kann der schmale Bragg-Peak so geführt werden, dass der Tumor in seiner gesamten Ausdehnung während der Bestrahlung dreidimensional präzise erfasst wird. Für Protonen nimmt der Vorteil der höheren Präzision bei größeren Eindringtiefen ab, während Kohlenstoff-Ionen auch bei Eindringtiefen von mehr als 10 cm noch eine millimetergenaue Präzision besitzen. Dazu kommt, dass Kohlenstoff-Ionen eine erhöhte biologische Wirksamkeit haben, die jedoch auf das Zielvolumen beschränkt bleibt und nicht im Eingangskanal wirksam wird. Dies ermöglicht gleichzeitig eine Erhöhung der Tumordosis, was schließlich zu einer besseren Überlebenschance führt. Befindet sich ein Tumor im Gehirn oder in der Nähe strahlungsempfindlicher Organe, ist eine Operation oder eine konventionelle Strahlentherapie äußerst problematisch. In diesen speziellen Fällen setzen Bestrahlungsverfahren mit Ionenstrahlen ein.

## 1.4 Fibrose als Spätfolge nach Bestrahlung

Die Strahlendosis und somit die kurative Wirkung der Strahlentherapie wird durch Nebenwirkungen im mitbestrahlten Normalgewebe begrenzt. Häufigkeit und Grad der Normalgewebeschäden nach Strahlentherapie weisen große Variationen von Patient zu Patient auf. Diese individuellen Unterschiede sind sehr wahrscheinlich auf eine genetisch determinierte Strahlenempfindlichkeit zurückzuführen.

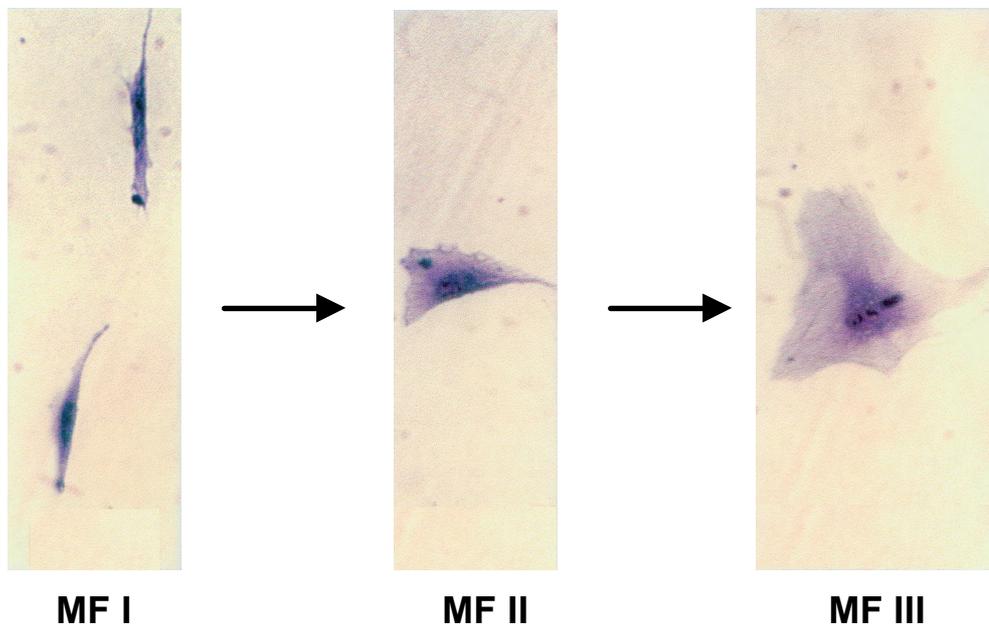
Eine prominente strahleninduzierte Gewebeveränderung ist die Fibrose. Obwohl die radiogene Fibrose als das Ergebnis einer übermäßigen Synthese und Ablagerung von interstitiellen Matrixproteinen (Kollagen, Fibronectin oder Glykosaminoglykan) erkannt wurde, sind die zellulären und molekularen Mechanismen der Fibroseinduktion und Progression noch nicht vollständig verstanden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass das Fibroblastenzellsystem in dem multizellulären Prozess der Fibroseentstehung eine entscheidende Rolle spielt.

## 1.5 Das Fibroblastenzellsystem

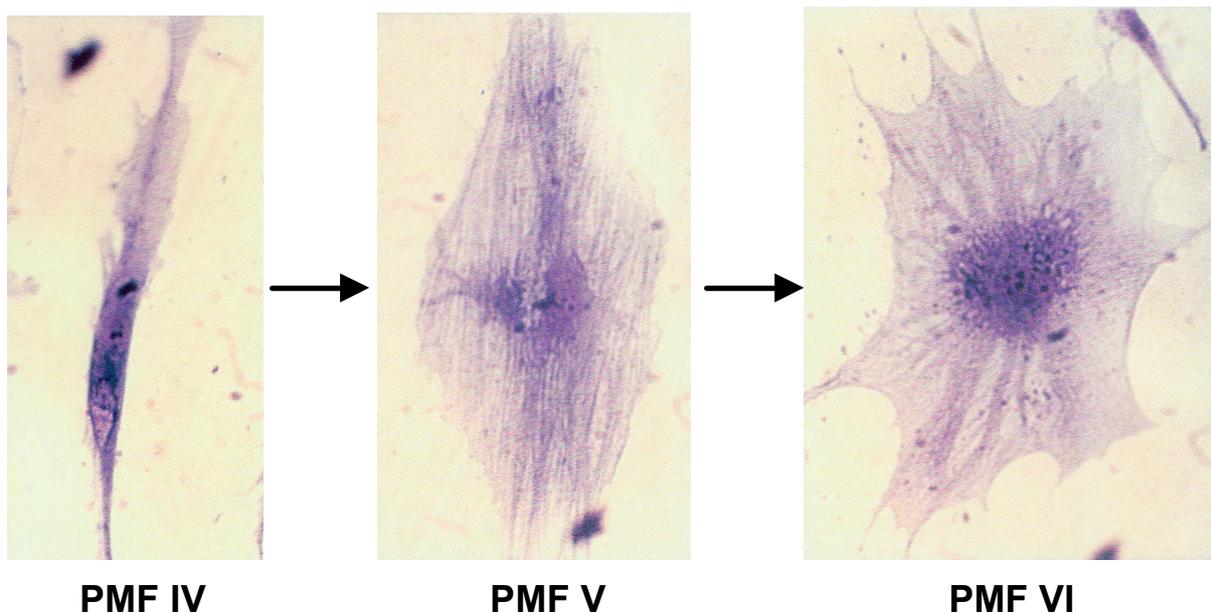
Das Fibroblastenzellsystem sämtlicher Organe eines Vertebraten-Organismus ist ein terminal differenziertes Stammzellsystem, das sich aus dem Stammzellkompartiment, dem Progenitor-kompartiment und dem Funktionskompartiment aufbaut. Das Progenitor-kompartiment besteht aus den drei potentiell teilungsfähigen Progenitorfibroblasten MF I, MF II und MF III, die sich deutlich in ihrem Zelltyp-spezifischen Teilungspotential unterscheiden (siehe Abb. 3a): MF I kann maximal ca. 25-30 Zellteilungen durchlaufen, MF II ca. 20 Zellteilungen und MF III ca. 5-8 Zellteilungen. Nach Ablauf des spezifischen Teilungspotentials differenziert die jeweilige Zelle in den nächst höheren Zelltyp (MF I → MF II → MF III). Nach dem Auslaufen der Teilungsaktivität im Zelltyp MF III differenziert diese Zelle über die postmitotischen Fibrozyten PMF IV und PMF V zum terminalen Funktionszelltyp PMF VI (siehe Abb. 3b). Dieser ist gekennzeichnet durch spezifische Synthesefunktionen für interstitielle Kollagene (Typ I, III und V), andere Matrix-Komponenten, sowie für Zytokine und Wachstumsfaktoren.

Anhand von *ex vivo*-/*in vitro*-Untersuchungen an Hautbiopsiematerial von Patientinnen mit Unterbauchoperationen konnte gezeigt werden, dass beispielsweise in der Dermis ein ausgewogenes und konstantes Verhältnis von mitotischen Progenitorfibroblasten (MF) und postmitotischen Fibrozyten (PMF) von 2:1 besteht. Die Aufrechterhaltung dieses ausgewogenen

Verhältnisses von Progenitorfibroblasten zu Fibrozyten scheint für die zelluläre und biochemische Homöostase des Bindegewebes von entscheidender Bedeutung zu sein. Störungen dieser zellulären Homöostase könnten beispielsweise die Ursache für fibrotische Geweberemodellierungen sein.



**Abb. 3a:** Das Progenitor-Kompartiment des Fibroblastenzellsystems, bestehend aus den potentiell mitotisch aktiven Progenitorfibroblasten MF I, MF II und MF III; Vergrößerung: x 400



**Abb. 3b:** Das Funktionskompartiment des Fibroblastenzellsystems, bestehend aus den irreversibel postmitotischen Funktionsfibrozyten PMF IV, PMF V und PMF VI; Vergrößerung: x 400

Zellbiologische und biochemische Untersuchungen konnten erstmalig für das Fibroblastenzellsystem belegen, dass terminale Differenzierungsprozesse durch verschiedene Arten elektromagnetischer Strahlung induziert werden. Durch umfangreiche Studien wurde insbesondere für ionisierende Strahlung gezeigt, dass Dosen zwischen 1 bis 8 Gy eine frühzeitige terminale Differenzierung induzieren.

Die Charakterisierung des primären Differenzierungsmusters von Fibroblastenkulturen aus unbestrahlten Hautbereichen von Brustkrebspatientinnen anhand der Analyse des Verhältnisses von späten zu frühen Fibroblastenpopulationen (L:E-Verhältnis) deutet darauf hin, dass Fibroblastenkulturen von Patientinnen, die eine strahleninduzierte Fibrose entwickelt haben, höhere Anteile der späten Differenzierungsstadien (späte MF II bzw. MF III) von Progenitorfibroblasten aufweisen als Patientinnen ohne Fibrose (Herskind 1998, 2000).

Gleichzeitig mit der strahleninduzierten Differenzierung ist ein Anstieg der Kollagensynthese zu verzeichnen (Rodemann 1996, Herskind 2000).

Da der Differenzierungsgrad des Fibroblastenzellsystems sämtlicher Bindegewebe aller Körperregionen für jeden Patienten genetisch determiniert ist und in Abhängigkeit vom Lebensalter deutliche Unterschiede hinsichtlich der Anteile früher bzw. später Progenitorfibroblastentypen bestehen, kann das individuelle Risiko für die Entstehung und Manifestation einer Fibrose in direktem Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Fibroblastenzellsystems des Patienten gesehen werden.

## **1.6 TGF- $\beta$ 1 und sein Signalweg**

### **1.6.1 TGF- $\beta$ 1 – “Transforming-Growth-Factor-beta1”**

Bei der Induktion der terminalen Differenzierung spielt das Zytokin TGF- $\beta$ 1 über autokrine und parakrine Mechanismen sehr wahrscheinlich eine entscheidende Rolle. Untersuchungen mit TGF- $\beta$ 1-knock-out-Mäusen zeigen, dass TGF- $\beta$ 1 auch ein wichtiger Determinator der Strahlensensitivität von Mäusefibroblasten ist.

Das Zytokin TGF- $\beta$ 1 (Transforming-Growth-Factor-beta1) ist ein 25 kD Homodimer. Es besteht aus zwei 12,5 kD Untereinheiten, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Es kommt hauptsächlich in humanen Blutplättchen vor, wird aber auch von anderen Zelltypen wie Fibroblasten, Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen synthetisiert.

Das aus sieben Exons und sechs Introns bestehende TGF- $\beta$ 1 Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 19 lokalisiert. Es codiert für ein Polypeptid von 390 Aminosäuren, das als latenter Komplex (LTGF- $\beta$ 1) sezerniert wird. In diesem Komplex ist TGF- $\beta$ 1 am N-terminalen Ende nicht-kovalent mit dem „latency-associated peptid“ (LAP) verbunden. Dieser Komplex kann über ein weiteres Bindeprotein, das „latent-TGF- $\beta$ 1-binding-protein“ (LTBP) an die extrazelluläre Matrix gebunden werden. Das LTBP ist ein 125 bis 190 kD großes Glykoprotein, welches LAP über Disulfidbrücken binden kann und selbst kovalent an die extrazelluläre Matrix gebunden ist. Der so an die extrazelluläre Matrix gebundene TGF- $\beta$ 1-Komplex ist biologisch inaktiv und wird erst durch proteolytische Abspaltung der beiden Peptide aktiviert.

TGF- $\beta$ 1 spielt zusammen mit seinen beiden Isoformen TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, Bindegewebshomöostase, Wundheilung und Entzündungsreaktion. Zwischen den Isoformen besteht eine ca. 80 %-ige Homologie in ihrer Aminosäuresequenz (115 Aminosäuren pro Monomer); die Homologie unter den Säugetierspezies (insbesondere Mensch, Maus und Rind) liegt bei nahezu 100 %.

### **1.6.2 Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ 1-Komplexes**

Die Aktivierung von latentem TGF- $\beta$ 1 geschieht durch Abspaltung von LAP, so dass TGF- $\beta$ 1 an seine spezifischen Rezeptoren in der Zellmembran binden kann. Diese Abspaltung gilt als entscheidender Regulationsschritt für die biologische Wirkung von TGF- $\beta$ 1. *In vitro* kann dies durch Azidifizierung, Hitze, Enzyme, Bestrahlung, und Detergentien geschehen. Für die enzymatische Spaltung des latenten Komplexes sind unter anderem die Proteasen Plasmin und Furin verantwortlich.

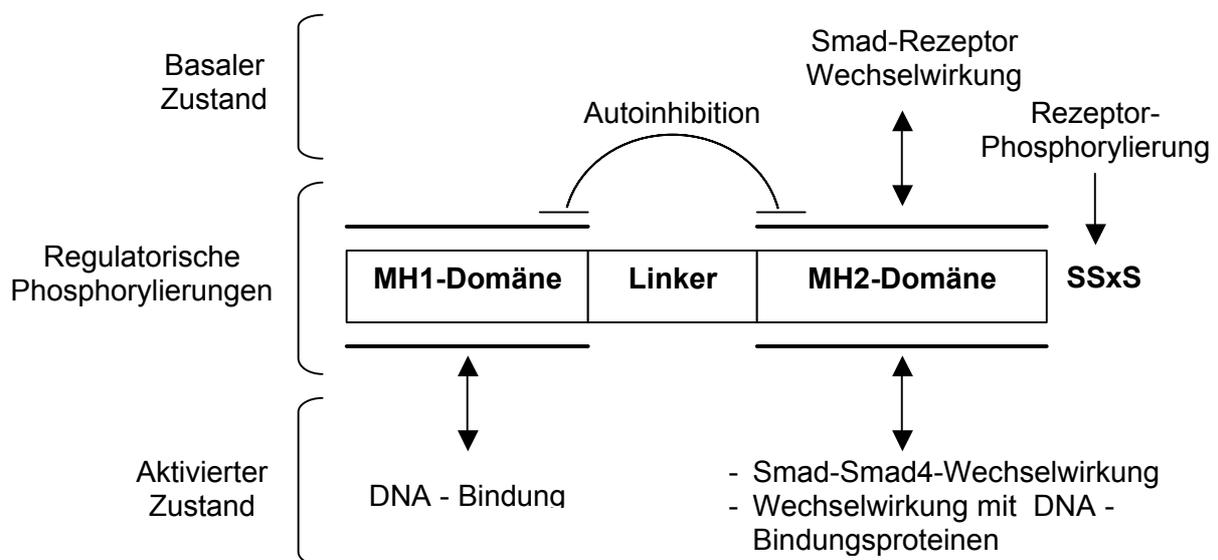
Furin ist die erste Pro-Protein Convertase, die identifiziert wurde. Sie wird im *trans*-Golgi Apparat aller untersuchter Gewebe und Zelllinien exprimiert. Die Endoprotease Furin ist fähig Vorläufer vieler Proteine, wie Wachstumsfaktoren, Serumproteine, Matrixmetalloproteinasen, Rezeptoren und Glykoproteine, zu spalten. Die proteolytische Spaltung erfolgt dabei in den meisten Fällen an der Consensus-Sequenz Arg-Xaa-(Lys/Arg)-Arg.

### 1.6.3 TGF- $\beta$ 1 Signaltransduktion

In den TGF- $\beta$ 1 Signalweg sind drei verschiedene transmembrane Rezeptoren involviert, von denen die beiden spezifischen TGF- $\beta$ 1-Rezeptoren I und II aufgrund ihrer Serin-Threonin-Kinase Domänen für die Signalübertragung verantwortlich sind. Der dritte spezifische TGF- $\beta$ 1-Rezeptor III ist wegen dem sehr kurzen intrazellulärem Teil wahrscheinlich nur dazu da, das aktive TGF- $\beta$ 1 in die Nähe des Rezeptors II zu bringen, damit es daran binden kann.

Typ I- und Typ II-Rezeptoren sind ca. 55 bzw. 70 kD große Glykoproteine. Die Kinase des Typ I-Rezeptors ist im Ruhezustand inaktiv. In direkter Nachbarschaft der Kinase liegt eine Glycerin-Serin-Domäne (GS-Domäne), die im phosphorylierten Zustand die Rezeptorkinase aktiviert. Die Kinase des Typ II-Rezeptors ist ständig aktiv. Bei Abwesenheit des Liganden liegen die beiden Rezeptoren als Monomere vor. Bindet nun ein TGF- $\beta$ 1 Molekül an den Typ II-Rezeptor dimerisiert dieser mit einem zweiten Typ II-Rezeptor. Dies führt zur Phosphorylierung der GS-Domänen zweier Typ I-Rezeptoren, welche ebenfalls dimerisieren. Durch diese Aktivierung der Typ I-Rezeptoren können nun intrazelluläre Signalproteine, die sogenannten R-Smads, phosphoryliert werden.

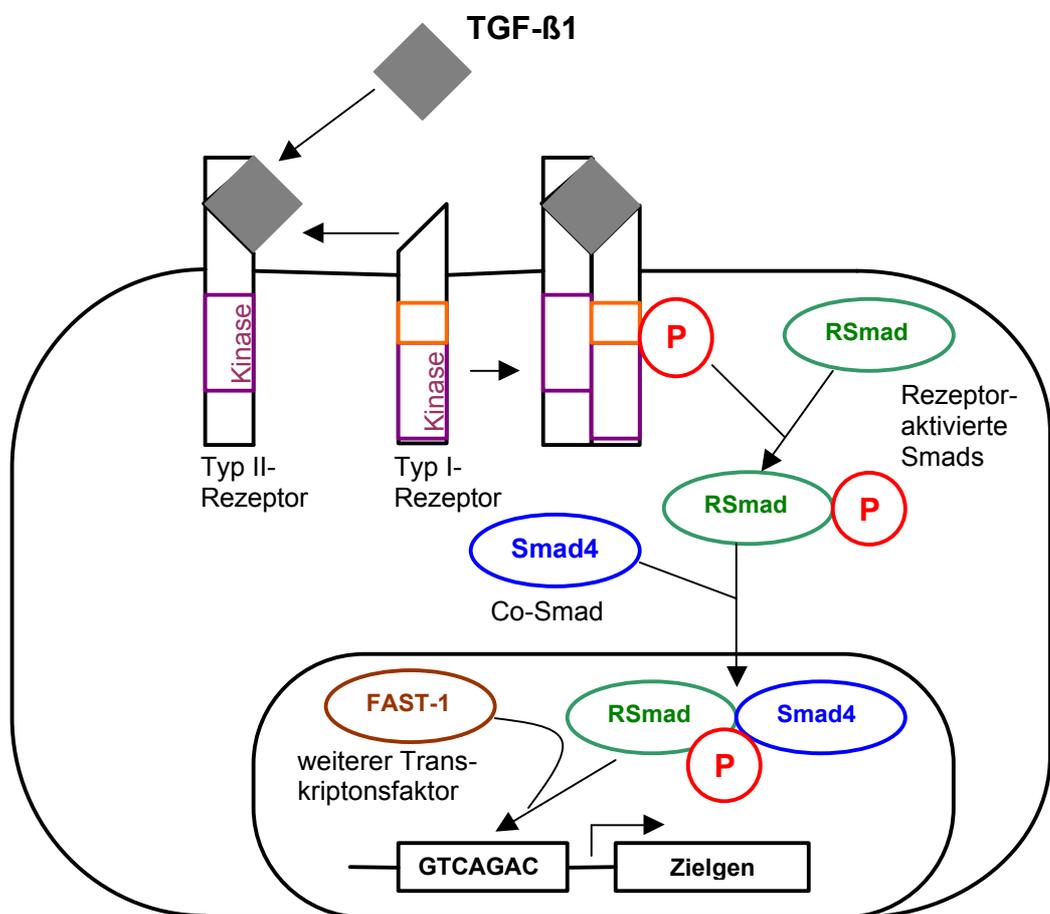
Die Smad-Proteine sind die als erste identifizierten Substrate der Typ I-Rezeptor Kinase und spielen für die Transduktion des Rezeptorsignal zu den Zielgenen im Zellkern eine zentrale Rolle. Der Name Smad setzt sich zusammen aus dem *Drosophila* Gen *Mad* (*mothers against dpp*) und den drei *Mad* Homologen in *C. elegans* *sma-2*, *-3* und *-4*.



**Abb. 4:** Smad-Domänen und ihre Funktionen

Im basalen Zustand bilden die Smads Homooligomere und bleiben in einem inaktiven Zustand durch Wechselwirkung zwischen der MH1- und MH2-Domäne (siehe Abb. 4). Die rezeptor-aktivierten Smads (R-Smads) treten über ihre MH2-Domäne in Wechselwirkung mit dem Typ I-Rezeptor und werden durch Phosphorylierung des C-terminalen SS(V/M)S-Motivs aktiviert.

Zu den rezeptor-aktivierten Proteinen gehören die Smads1, 2, 3, 5 und 8, wobei nur Smad2 und Smad3 von TGF- $\beta$ 1 aktiviert werden (siehe Abb. 5). Die Aktivierung dieser Smad-Proteine kann durch die inhibitorischen Smads (I-Smads), Smad6 und Smad7, verhindert werden.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des postulierten TGF- $\beta$ 1 Signaltransduktionswegs

Die phosphorylierten Smad-Proteine bilden über ihre MH2-Domäne mit dem Ko-Faktor Smad4 einen heteromeren Komplex. Dieser Komplex wird in den Zellkern eingeschleust und reguliert hier als Transkriptionsfaktor zusammen mit weiteren Faktoren wie z.B. FAST-1 die Expression verschiedener Gene. Ein wichtiges Protein, das u.a. durch den TGF- $\beta$ 1 Signalweg

reguliert wird ist p21. p21 gehört zu den Cyclin-abhängigen Kinase (cdk)-Inhibitoren und greift in den Zellzyklus ein, indem es an einen cdk/Cyclin-Komplex bindet und somit die Aktivierung des entsprechenden Cyclin/cdk-Komplexes verhindert. Wird auf diese Weise der CyclinE/cdk2-Komplex von p21 inhibiert, kommt es zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase. Neben TGF- $\beta$ 1 wird p21 von dem Tumorsuppressorprotein p53 reguliert. Mehrere Untersuchungen zeigen, dass p53 nach Bestrahlung durch Phosphorylierung an Serin15 aktiviert und daraufhin p21 induziert wird. Es kommt zu einer Arretierung in der G1-Phase, damit die Zelle den Bestrahlungsschaden reparieren kann. Gelingt dies nicht, wird die Apoptose eingeleitet, d.h. die Zelle stirbt ab.

### **1.7 Ziel der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollten vergleichend die zellulären und molekularen Mechanismen der Induktion des fibrotischen Phänotyps in menschlichen Fibroblastenpopulationen nach Photon- und Schwerionenbestrahlung analysiert werden.

Dabei wurde zunächst auf zellulärer Ebene die Strahlensensitivität verschiedener Zellstämme ermittelt und das Differenzierungsmuster vor und nach Bestrahlung bestimmt.

Auf molekularer Ebene sollte die Rolle von TGF- $\beta$ 1 im Prozess der terminalen Differenzierung nach Bestrahlung untersucht werden. Dazu wurde die Expression und Aktivierung von latentem TGF- $\beta$ 1 als auch die Expression verschiedener Proteine des TGF- $\beta$ 1-Signalweges nach Bestrahlung analysiert.

Für die Experimente wurden unterschiedliche Hautfibroblastenzellstämme verwendet, um vergleichende Ergebnisse zu erhalten, die möglicherweise für die Entwicklung eines prädiktiven Tests für die Strahlentherapie von großer Bedeutung sein könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Zur Durchführung der Experimente wurden acht Hautfibroblastenzellstämme verwendet. Diese Zellstämme wurden aus unbestrahlten Hautbiopsien von sechs Brustkrebspatientinnen, die einen unterschiedlichen Grad der Fibrosemanifestation nach Strahlentherapie zeigten, etabliert. Die Zellkulturen wurden aus der Arbeitsgruppe von C. West (Manchester, England) im Rahmen eines EU-Biomed2-Projektes erhalten.

#### 2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen

DMEM: 12,04 g DMEM (Dulbecco's modified Eagles' Medium, Life Technologies)  
3,33 g NaHCO<sub>3</sub> (Biochrom)  
1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung  
ad 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
pH = 7,2-7,4

Dem Medium wurden für die Massenkultivierung 10 % und für die Koloniebildungstests 20 % FCS (fötales Rinderserum, Gibco bzw. BioWhitaker) zugesetzt.

Für das Depletieren der Zellen wurde dem serumfreien Medium jeweils 5 mg/l Insulin und Transferrin zugefügt.

PBS<sup>-</sup>(Phosphat-Buffered-Saline): 8,0 g NaCl  
1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,2 g KCl  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Trypsin: 0,75 %-ige Trypsinlösung (Serva)

Alle unsterilen Substanzen wurden entweder sterilisiert/autoklaviert oder mittels Sterilfilter (sartolab-P-plus, Sartorius) steril filtriert.

### 2.1.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden im Brutschrank in wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub> in Gewebekulturflaschen (T 75, Falcon Becton Dickinson) gehalten. Die Maßnahmen der Zellkultur fanden in einer Sterilbank statt.

Normale nichttransformierte Zellstämme wachsen als Monolayer, d.h. sie bilden in der Gewebekulturschale nur eine Zellschicht aus. Eine Subkultivierung ist dann erforderlich, wenn die Kulturflasche konfluent mit Zellen bewachsen und die stationäre Wachstumsphase (Kontaktinhibition) erreicht ist. Deshalb wurden die Fibroblastenzellstämme routinemäßig einmal pro Woche passagiert.

### 2.1.3 Passagieren

Vor dem Passagieren wurden die benötigten Substanzen auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt.

Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt, die konfluente Kultur zweimal mit je 10 ml PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit 1,5 ml/T 75 Trypsin für ca. 5 min im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden abgelöst hatten, wurde mit 5 ml DMEM + 10 % FCS das Trypsin inaktiviert. Jetzt konnten die Zellen vereinzelt und anschließend die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt werden. Dies erfolgte mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die Dimensionen eines Kleinstquadrates entsprechen dabei einer Fläche von 0,0625 mm<sup>2</sup> und einer Tiefe von 0,2 mm. Jeweils 16 Kleinstquadrate entsprechen einem Kleinquadrat, was zur Berechnung in folgender Formel Verwendung findet:

$$\text{Zellen pro Milliliter} = \frac{\text{Zellzahl} \times 1000}{16 \times 0,0625 \times 0,2} \times V_F,$$

wobei V<sub>F</sub> ein eventuell zu berücksichtigender Verdünnungsfaktor ist.

Durch Auszählen zweier Diagonalen mit 16 Kleinstquadraten und anschließender Mittelwertbestimmung wurde die Zellzahl nach dieser Formel berechnet. Für die Subkultivierung wurden dann jeweils  $8 \times 10^5$  Zellen in 10 ml Medium pro Kulturflasche T 75 ausgesät.

Zur Quantifizierung des Wachstums wurden für jede Passage die Populationsverdopplung (*population-doubling*, PD) berechnet:

$$PD = (\ln \text{Zellzahl}_{\text{geerntet}} - \ln \text{Zellzahl}_{\text{ausgesät}}) / \ln 2$$

Durch Addieren der einzelnen PDs ergeben sich die kumulativen Populationsverdopplungen (*cumulative population doublings*, CPD).

#### **2.1.4 Mediumwechsel**

Ein regelmäßiger Mediumwechsel bei Monolayer ist erforderlich, da Bestandteile des Mediums und dessen Zusätze von den Zellen verbraucht oder bei 37 °C im Laufe der Zeit inaktiviert werden. Die Häufigkeit eines Mediumwechsels ist abhängig vom Metabolismus und von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und daher von Zellstamm zu Zellstamm unterschiedlich. Ein im Medium enthaltener Phenolrot-Indikator zeigt durch einen Farbwechsel die Notwendigkeit eines Mediumwechsels an. Bei Massenkulturen wurde 24 h nach Aussaat ein Mediumwechsel durchgeführt. Wenn nötig nach 3-4 Tagen ein weiterer. Bei bestrahlten Klonkulturen wurde sofort nach Bestrahlung ebenfalls ein Mediumwechsel durchgeführt.

#### **2.1.5 Depletion von Zellkulturen**

Für verschiedene Versuche wurden Zellen depletiert, d.h. für eine bestimmte Zeitspanne in Medium ohne FCS kultiviert. Durch diesen Serumentzug gehen normale diploide Zellen in einen „Ruhe-Zustand“ (G<sub>0</sub>-Phase) über, in welchem die DNA-Synthese und das Zellwachstum eingestellt sind.

Durch Serum-Depletion wird den Zellen auch das im Serum enthaltene TGF-β1 entzogen, was bei Versuchen, in denen die Zellen mit TGF-β1 behandelt wurden, wichtig war.

Bei der Serum-Depletion wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann das serumfreie Medium auf die Zellen gegeben.

### **2.1.6 Kryokonservierung von Zellen**

Um immer wieder auf Zellpopulationen der gleichen Passage zurück greifen zu können, wurden die Zellen tiefgefroren. Die Zellen wurden zunächst mehrmals subkultiviert, um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erhalten und anschließend in flüssigem Stickstoff konserviert. Dazu wurden die konfluenten Zellen wie bei der Passage zunächst trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in eiskaltem Einfriermedium (DMEM + 20 % FCS + 5 % DMSO) resuspendiert, so dass die Zellkonzentration  $1 \times 10^6$  Zellen/ml betrug. Von dieser Suspension wurde jeweils 1 ml in vorgekühlte Kryoröhrchen (Nunc-Cryo-Tube, Nalge Nunc International) pipettiert. Um die Zellen möglichst schonend einzufrieren, wurden die Kryoröhrchen im Einfriertank in einer speziellen Vorrichtung unterschiedliche Zeiten (15, 30 und 60 min) in drei verschiedenen Höhen über dem flüssigen Stickstoff gehalten. Erst danach wurden die Röhrchen komplett in den Stickstoff getaucht.

### **2.1.7 DAPI-Test auf Mycoplasmen**

Mycoplasmen sind mikroskopisch kleine, sich autark vermehrende Prokaryonten. Sie können gängige Sterilfilter zum Teil passieren und greifen, zumeist lange unentdeckt, stark in den Stoffwechsel der Zellen ein.

#### **2.1.7.1 Darstellung der Mycoplasmen durch Fluorochromierung mit DAPI**

Als schnelle Methode zur Kontaminationskontrolle ist die Anfärbung der Mycoplasmen-DNA durch das speziell an DNA-bindende Fluorochrom (4,6-Diamidino-2-phenyl-di-hydrochlorid) DAPI. Kleine hell leuchtende Ansammlungen von Punkten im Cytoplasma prägen das mit Mycoplasmen verunreinigte mikroskopische Bild einer Zellkultur. Traten solche Kontaminationen auf, wurde die betroffene Zellpopulation verworfen.

### **2.1.7.2 Durchführung des DAPI**

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellzahl sollte 50.000-70.000 pro Well betragen und die Zellpopulation sollte sich in einem 70 % konfluenten Zustand befinden. Aus einer DAPI-Stammlösung (350 µg/ml) wurde mit Methanol eine Verdünnung von 5 µg/ml hergestellt. 100 µl dieser Verdünnung wurden mit 10 ml Methanol aufgefüllt, welche die Arbeitslösung (0,05 µg/ml) für die Untersuchung dargestellt.

Das Medium wurde vorsichtig von der Kultur abgegossen und die Zellen einmal mit PBS und einmal mit Methanol gewaschen. Danach wurde einmal mit der Arbeitslösung gewaschen und anschließend die Zellen 15 Minuten bei 37 °C im Brutschrank angefärbt. Nachdem die Färbelösung abgegossen war, wurde die Kultur mehrmals mit Methanol und anschließend PBS gewaschen. Die Deckgläschen konnten danach aus den Wells entnommen und für die Mikroskopie auf Objektträgern positioniert werden. Diese wurden mit 100-fachem Ölimmersionsobjektiv (Biomed Fluoreszenzmikroskop) mikroskopiert.

### **2.1.8 Auftauen tiefgefrorener Zellen**

Die Kryoröhrchen wurden aus dem Einfriertank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C soweit aufgetaut bis noch ein kleines Eisklumpchen sichtbar war. Die Zellen wurden dann sofort in eine Kulturflasche T 25 mit 4 ml warmem DMEM + 20 % FCS überführt und zum Anwachsen in den Brutschrank gestellt. Nachdem sich die Zellen auf dem Boden abgesetzt hatten (nach ca. vier Stunden) wurde die Anwachsrate mit dem Mikroskop ermittelt und das Medium auf normales Kultivierungsmedium (DMEM + 10 % FCS) gewechselt, um das im Einfriermedium enthaltene Zellgift DMSO zu entfernen.

### **2.1.9 Koloniebildungstest (Kobi)**

Ein Klon stellt definitionsgemäß eine Population von Zellen dar, die aus einer Einzelzelle durch mitotische Teilung hervorgegangen ist. Die Fähigkeit von Zellen, Kolonien zu bilden, bezeichnet man als Klonierungseffizienz. Der Koloniebildungstest ist ein Testverfahren zur Ermittlung der Klonierungseffizienz von Zellen eines bestimmten Zellstamms.

### 2.1.9.1 Ausplättern eines Koloniebildungstests

- Zellen einer konfluenten Massenkultur abtrypsinieren und Zellzahl bestimmen,
- Aussaat der Fibroblasten in 6-Well-Platten mit einer Dichte von 500 Zellen pro Well oder in Petrischalen mit einer Dichte von 1500 Zellen pro Schale,
- Wichtig bei der Aussaat ist eine homogene Verteilung der Zellen, die man durch Rütteln der Platten/Schalen nach rechts und links bzw. nach vorne und hinten beim Hineinstellen in den Brutschrank erreicht,
- Die Kabis wurden dann 10-12 Tage im Brutschrank wachsen gelassen, wobei ab dem achten Tag die Größe der Kolonien mit dem Mikroskop überprüft wurde.

### 2.1.9.2 Fixieren und Färben der Klonkulturen

#### Reagenzien:

- Formaldehydlösung 3,7 %
- Ethanollösung 70 %
- Coomassie-Färbelösung: 0,05 % Coomassie Serva Blue G 250 (Serva),  
20 % Methanol,  
7,5 % Eisessig;
- Giemsa-Färbelösung: 77,6 ml Sörensen-Puffer A (9,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ad 1l  $\text{H}_2\text{O}_d$ ),  
122,4 ml Sörensen-Puffer B (11,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ad  $\text{H}_2\text{O}_d$ ),  
8 ml Giemsalösung,  
pH = 7,2-7,4

#### Fixierung:

- Medium abschütten,
- Zellen gut mit  $\text{PBS}^-$  waschen,
- Zellen für 10 min in Formaldehydlösung inkubieren,
- Fixierlösung wegkippen,
- 10 min mit Alkohol inkubieren,
- Platten oder Schalen unter Leitungswasser spülen,
- im Wärmeschrank trocknen.

### Färbung:

Zytosolfärbung mit Coomassie:

- 30-40 Sekunden Inkubation mit Coomassielösung,
- Wegkippen der Färbelösung,
- Platten gut mit Wasser spülen, um Essigsäure zu entfernen,
- Trocknen.

Zellkernfärbung mit Giemsa:

- 30-40 min Inkubation Giemsa-Färbelösung,
- gut mit Wasser spülen und anschließend trocknen.

### **2.1.9.3 Bestimmung der Klonierungseffizienz**

Die Koloniebildungstests werden ausgewertet, indem man mit dem Mikroskop die Kolonien pro Well oder Schale zählt die aus mehr als 50 Einzelzellen bestehen. Aus den so ermittelten Werten für die einzelnen Wells/Schalen wird dann das arithmetische Mittel berechnet.

Daraus lässt sich die Klonierungseffizienz (*plating-efficiency*, PE) wie folgt berechnen:

$$PE = \text{Mittelwert der Klone} > 50 \text{ Zellen/ausgesäte Zellzahl}$$

### **2.2 Bestrahlung von *in vitro* Zellkulturen**

Um die Wirkung ionisierender Strahlung verschiedener Dosen auf proliferierende oder kontaktinhibierte Zellpopulationen *in vitro* zu untersuchen, wurde der Koloniebildungstest als Testverfahren herangezogen. Bei allen Bestrahlungen wurden Kontrollen mitgeführt, die neben der Bestrahlungseinheit vergleichbaren Bedingungen wie die bestrahlten Proben ausgesetzt waren.

### **2.2.1 Bestrahlung mit Röntgenstrahlen**

Die Röntgenbestrahlung wurde einerseits mit einem Linearbeschleuniger (Mevatron 60, Firma Siemens) bei einer Dosisleistung von 2 Gy/min in der radioonkologischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. Die Feldgröße lag bei 30 x 30 cm, der Abstand zur Strahlenquelle war 100 cm.

Andererseits wurden die Zellen mit einer Röntgenröhre der Firma Müller in der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung bestrahlt. Die Dosisleistung lag bei 1 Gy/min (ohne Filter) und bei 0,18 Gy/min (mit Filter) bei einer Feldgröße von 40 x 40 cm und einem Abstand von 100 cm zur Strahlenquelle.

### **2.2.2 Bestrahlung mit Schwerionen**

Die Bestrahlung mit beschleunigten Ionen wurde für hochenergetische  $^{12}\text{C}$ -Ionen am Schwerionensynchrotron (SIS) der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt durchgeführt.

Bei der Bestrahlung am SIS wurde eine Energieleistung von 200 MeV/u gewählt. Dies entspricht der Energie am Anfang des Bragg-Peaks und ist somit entscheidend für die Strahlenreaktion des Normalgewebes.

Die Zellkulturflaschen mussten bei der Bestrahlung mit Medium aufgefüllt werden

### **2.2.3 Dosis-Wirkungskurven**

Um die Strahlensensitivität eines Zellstammes zu ermitteln, werden sogenannte Dosis-Wirkungskurven erstellt. Dazu wird ein bestimmter Zellstamm mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt (z.B. 1-7 Gy) und das Überleben bei jeder Dosis mit dem Kobi ermittelt. Es gilt, dass eine Zelle überlebt hat, wenn aus ihr nach 10-12 tägigem Wachstum ein Klon mit mindestens 50 Einzelzellen entstanden ist.

Die Dosis-Wirkungskurven wurden nach zwei unterschiedlichen Methoden erstellt:

- Bestrahlung von konfluenten Kulturen mit unterschiedlichen Dosen und sofortige Aussaat (*immediate plating*) bzw. Aussaat sechs Stunden nach der Bestrahlung (*delayed plating*) von Kobis in 6-well Platten oder Petrischalen;
- Aussaat von Kobis in 6-well Platten und 24 Stunden danach Bestrahlung der Kobis mit verschiedenen Dosen.

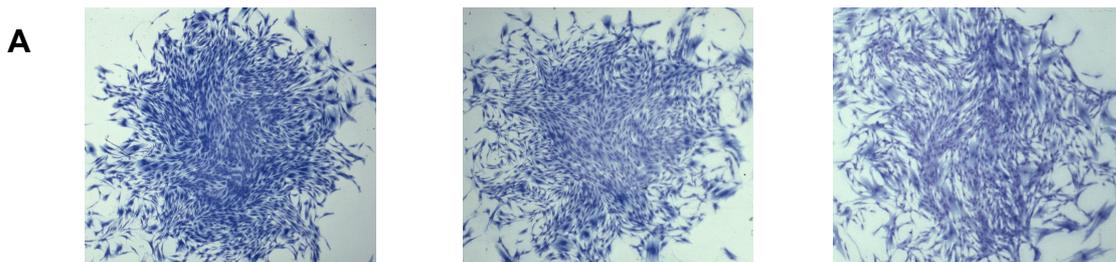
Die Auswertung der Kobis erfolgte wie in 2.1.8.3 beschrieben. Aus den so erhaltenen PE-Werten wurden für jede Dosis die sogenannten Überlebensraten (*survival fraction*, SF) berechnet:

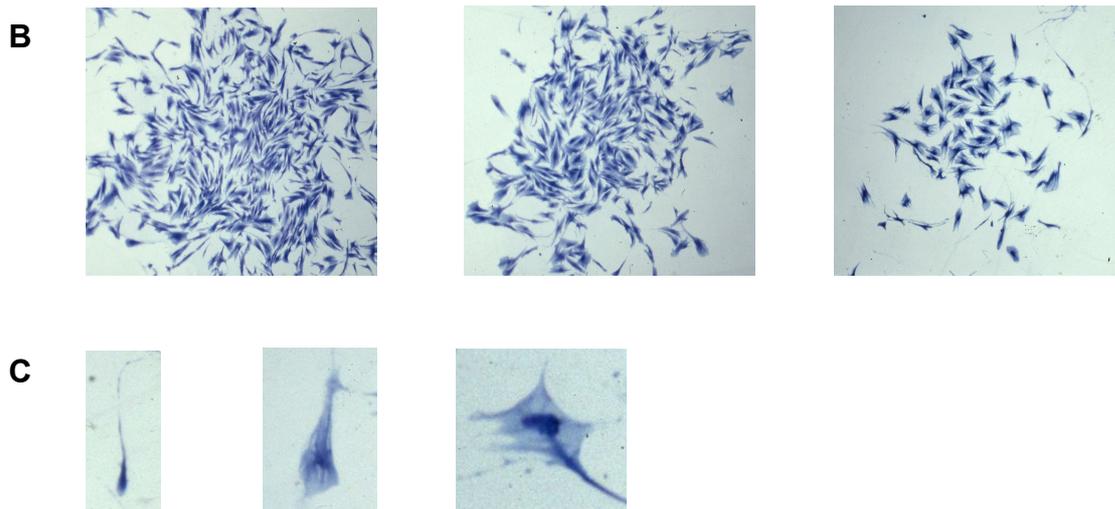
$$\text{SF (x Gy)} = \text{PE der mit x Gy bestrahlten Probe} / \text{PE der Kontrolle}$$

Durch Auftragen der so berechneten Überlebensraten (unbestrahlte Kontrolle = 1) in logarithmischem Maßstab gegen die zugehörige Strahlendosis ergibt sich die Dosis-Wirkungskurve des jeweiligen Zellstammes.

#### 2.2.4 Bestimmung des Differenzierungsmuster

Das Differenzierungsmuster der verschiedenen Zellstämme wurde ermittelt, indem die Koloniebildungstests nach folgenden zwei Methoden ausgewertet wurden: Es wurde entweder das Verhältnis der PMF-Zellen zu den MF-Klonen oder das der späten (*late*, L) Klone zu den frühen (*early*, E) Klonen gebildet. Zu den frühen Klonen werden alle Kolonien gezählt, die hauptsächlich aus MF I- bzw. frühen MF II-Zellen, zu den späten alle Kolonien, die hauptsächlich aus späten MF II bzw. MF III-Zellen, bestehen (siehe Abb. 6).





**Abb. 6:** typische frühe (A) und späte (B) MF-Klone und PMF-Zellen (C);  
Vergrößerung: x 30 (A und B), x 120 (C)

## 2.2.5 Bestimmung des Gesamtgehalts an TGF- $\beta$ 1 im Mediumüberstand mittels ELISA

### 2.2.5.1 Probenvorbereitung

Zur Bestimmung des Gesamtgehalts an TGF- $\beta$ 1 im Mediumüberstand wurden die dünn ausgesäten Zellen ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/T 25) nach 2-tägigem Wachstum mit 5 Gy bestrahlt, unterschiedliche Zeiten (0-96 h) nach der Bestrahlung das Medium abgenommen und die Zellzahl jeder Einzelflasche bestimmt. Das abgenommene Medium wurde sofort schock-gefroren und bis zur Durchführung des ELISA bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2.5.2 Versuchsdurchführung

Zur Durchführung des ELISA wurden die eingefrorenen Mediumüberstände langsam bei Raumtemperatur aufgetaut, Zellreste im Medium durch Zentrifugation entfernt und die Proben bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt. Um den Gesamtgehalt an TGF- $\beta$ 1 bestimmen zu können, muß vor dem ELISA das latente TGF- $\beta$ 1 durch Ansäuern der Proben in aktives umgewandelt werden. Dazu wurden 500  $\mu\text{l}$  der einzelnen Proben mit 100  $\mu\text{l}$  HCl (1 N) 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  einer NaOH (1,2 N)/Hepes (0,5 M)-Lösung wieder neutralisiert.

Um nachher die TGF- $\beta$ 1 Konzentration der Proben bestimmen zu können, musste zusätzlich aus einem Standard bekannter TGF- $\beta$ 1 Konzentration eine Verdünnungsreihe hergestellt werden. Von den Werten dieser Standards wurde später eine Regressionsgerade erstellt und somit die TGF- $\beta$ 1 Konzentration der Proben berechnet.

Für den ELISA wurden 200  $\mu$ l der standardisierten und 200  $\mu$ l der aktivierten Proben in je zwei Wells der beschichteten 96-Well-Platte aus dem TGF- $\beta$ 1 ELISA-Kit der Firma R & D Systems pipettiert. Nach 3-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand weg geschüttet und die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Dabei war darauf zu achten, dass der Waschpuffer nach dem letzten Waschschritt vollkommen entfernt wurde. Anschließend wurde 200  $\mu$ l TGF- $\beta$ 1 -Konjugat in jedes Well pipettiert und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde 200  $\mu$ l Substratlösung in jedes Well pipettiert und nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Stopplösung zugegeben. Mit dem ELISA-Reader wurde innerhalb der nächsten 30 Minuten die Absorption bei 450 nm gemessen. Durch logarithmische Auftragung der so erhaltenen Werte für die Standards gegen die zugehörige TGF- $\beta$ 1 -Konzentration ebenfalls im logarithmischen Maßstab ergibt eine Regressionsgerade, aus der die TGF- $\beta$ 1 -Konzentrationen der Mediumproben berechnet wurden. Diese Konzentrationen wurden mit Hilfe der Zellzahl auf fg/Zelle umgerechnet.

### **2.3 RNA-Isolierung aus Zellen**

Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen so ausgesät, dass sie sich am Tag der Isolierung im exponentiellen Wachstum befanden. Die subkonfluenten Kulturen wurden dann trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt, bei 1300 rpm 3 min zentrifugiert und die Zellpellets in je 400  $\mu$ l (für bis zu  $10 \times 10^6$  Zellen) TRK-Lysepuffer mit einer Spritze resuspendiert. Der Lysepuffer ist Teil des für die RNA-Isolierung verwendeten Isolierungskits der Firma PeQLab. Die resuspendierten Zellen wurden mit dem gleichen Volumen Ethanol (70 %) vermischt und auf die Säulen aus dem Kit aufgetragen. Nach Zentrifugation bei  $10.000 \times g$  für 15 Sekunden wurde 750  $\mu$ l des Waschpuffers I auf die Säulen aufgetragen und erneut zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde samt Tube verworfen und die Säulen auf neue Sammel tubes gesetzt. Es folgten noch zwei Waschschritte bei denen die Säulen mit 500  $\mu$ l Waschpuffer II gespült wurden. Anschließend wurden die Säulen 1 Minute bei maximaler Umdrehung getrocknet und die

RNA mit jeweils 30 µl sterilem Wasser eluiert. Die Konzentration der so erhaltenen RNA-Proben wurden photometrisch nach folgender Formel bestimmt:

$$c(\text{RNA}) = \text{Absorption bei } 260 \text{ nm} \times 40 \times \text{Verdünnung} [\text{ng/ml}]$$

Die Verdünnung wurde dabei so gewählt, dass die Absorption in einem Bereich zwischen 0,2 und 1 lag.

## 2.4 Umschreibung von RNA in cDNA

Die Umschreibung der RNA erfolgte mittels First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) der Firma Roche. Dabei wurde zuerst 1 µg eluierte RNA mit sterilem Wasser auf 8,6 µl verdünnt, 10 Minuten bei 70 °C denaturiert und anschließend fünf Minuten auf Eis gestellt. Dann wurde zu jeder Probe folgender Ansatz pipettiert:

- |                             |        |
|-----------------------------|--------|
| - 10 x Reaktionspuffer      | 2,0 µl |
| - MgCl <sub>2</sub> (25 mM) | 4,0 µl |
| - dNTPs (10 mM)             | 2,0 µl |
| - Oligo-Primer (0,8 µg/µl)  | 2,0 µl |
| - RNase-Inhibitor (50 U/µl) | 0,4 µl |
| - AMV-RT (2,5 U/µl)         | 1,0 µl |

Anschließend wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) nach folgendem Schema durchgeführt:

- |                                   |                    |
|-----------------------------------|--------------------|
| - Annealing                       | 10 min bei 25 °C   |
| - Transkription                   | 60 min bei 42 °C   |
| - Denaturierung der Transkriptase | 5 min bei 99 °C    |
| - Kühlung                         | unendlich bei 4 °C |

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 2.5 PCR zur Herstellung von DNA-Sonden

Die strahlenmodulierte Expression des TGF- $\beta$ 1 Gens wurde durch Bestimmung des mRNA-Gehaltes in den verschiedenen Fibroblastenzellstämmen mittels Northern-Blot (siehe 2.8) analysiert. Dazu wurde mit Hilfe der PCR eine spezifische TGF- $\beta$ 1 Sonde hergestellt.

Zunächst wurden anhand der RNA-Sequenz von TGF- $\beta$ 1 und mit Hilfe des Computerprogramms DNASIS zwei geeignete Primer, SFB3.for und SFB3.rev, für die PCR ermittelt. Diese Primer wurden von der Firma Gibco, Life Technologies synthetisiert und sollten zu einer 795 bp-langen TGF- $\beta$ 1 Sonde führen:

**SFB3.for:** 5' – GAC ATG GAG CTG GTG AAG CGG – 3'

**SFB3.rev:** 5' – AAT GTA CAG CTG CCG CAC GCA – 3'

Die Primer wurden in jeweils 1 ml sterilem Wasser gelöst.

Für die Amplifikation der Sonde wurde ein PCR-Kit der Firma Roche verwendet. Zunächst wurden verschiedene cDNAs, cDNA-Konzentrationen und Annealing-Temperaturen ausgetestet, um die optimalen Bedingungen für die PCR zu ermitteln.

Dies führte zu folgender PCR:

### PCR-Reaktionsansatz (50 $\mu$ l):

- 10 x Reaktionspuffer	5 $\mu$ l
- dNTPs (10 mM)	4 $\mu$ l
- SFB3.for (54 $\mu$ M)	0,92 $\mu$ l
- SFB3.rev (72 $\mu$ M)	0,7 $\mu$ l
- Taq-Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
- cDNA	10 $\mu$ l
- H <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>	27,38 $\mu$ l

### PCR-Programm (30 Zyklen):

- Denaturierung: 1 x	5 min bei 94 °C
- Denaturierung: 30 x	1 min bei 94 °C
- Annealing: 30 x	30 s bei 68 °C
- Amplifikation: 30 x	50 s bei 72 °C

- Amplifikation: 1 x                      10 min bei 72 °C
- Kühlung:                                      unendlich bei 4 °C

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit einem Agarose-Gel überprüft und bei –20 °C gelagert.

## 2.6 Real-time PCR mit dem LightCycler

Um die mRNA-Expression von p21 nach Bestrahlung zu bestimmen wurden PCRs mit dem LightCycler, spezifischen p21-Primern und den entsprechenden cDNA-Proben durchgeführt.

Die Primer wurden anhand der RNA-Sequenz von p21 ermittelt:

**FW-p21:**     5' – GTG AGC GAT GGA ACT TCG A – 3'

**REV-p21:**    5' – AAT CTG TCA TGC TGG TCT GC – 3'

Die Primer wurden in sterilem Wasser gelöst, so dass die Konzentration 10 µM betrug.

Die PCR wurde nach folgendem Schema mit dem LightCycler Fast Start DNA Master Kit der Firma Roche durchgeführt:

### PCR-Reaktionsansatz (20 µl):

- H<sub>2</sub>O<sub>steril</sub>                                      8,6 µl
- MgCl<sub>2</sub>    2,4 µl
- FW-p21 (10 µM)                              1 µl
- REV-p21 (10 µM)                              1 µl
- SYBR Green I                                      2 µl
- cDNA (2 µg)                                      5 µl

### PCR-Programm (35 Zyklen):

- Denaturierung: 1 x                      10 min bei 95 °C
- Denaturierung: 35 x                      10 s bei 94 °C
- Annealing: 35 x                              5 s bei 61 °C
- Amplifikation: 35 x                      24 s bei 72 °C
- Schmelzkurve: 1 x                      von 98 bis 40 °C (0,1 °C/s)

Mit den gleichen cDNA-Proben, aber mit spezifischen Primern für GAPDH (FW-GAPDH: 5' – ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC – 3', REV-GAPDH: 5' – TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA – 3'), wurde nach dem gleichen Schema die mRNA-Expression von GAPDH bestimmt. Aus den so erhaltenen Werten für p21 und GAPDH wurde dann die relative p21 mRNA-Expression für jeden Zeitwert und Zellstamm berechnet.

## 2.7 Agarose-Gele

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden Agarose-Gele (2 %-ig) verwendet: 1 g Agarose (Sigma) wurde in 50 ml TAE-Puffer (10 x TAE-Puffer: 141 Tris-base, 28,55 ml Eisessig, 50 ml 0,5 M EDTA, ad 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) durch mehrmaliges Aufkochen gelöst. Dem Puffer war 1,5 µl Ethidiumbromid (Sigma) zugesetzt. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C konnte die Agarose-lösung in ein Gel-Tray (7,5 x 10 cm) gegossen und der Kamm eingesetzt werden. Nach der Aushärtung wurde das Gel in die GNA-100-Submarine-Electrophoresis-Unit (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt, 1 x TAE Laufpuffer (500 ml + 15 µl Ethidiumbromid) eingefüllt und 5 µl der PCR-Proben (+ Molekulargewichtsmarker), die vorher mit 5 x Probenpuffer versetzt wurden, aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 1 h bei 95 V wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

## 2.8 Northern-Blot

### 2.8.1 Puffer und Lösungen

- 10 x MOPS:                    220 mM MOPS  
   50 mM Na-acetat  
   10 mM EDTA  
   mit Essigsäure auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
  
- Laufpuffer:                    1 x MOPS  
   20 ml Formaldehyd (37 %)  
   720 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>

- Probenpuffer: 12,5 µl Formamid  
2,5 µl 10 x MOPS  
5 µl Formaldehyd (37 %)
- Beschwerungspuffer: 50 % Glycerin  
0,25 % Bromphenolblau
- 20 x SSC: 3 M NaCl  
0,3 M Na<sub>3</sub>-citrat x 2 H<sub>2</sub>O  
mit 1 N HCl auf pH 7,0 einstellen
- 5 x Denhardt: 0,1 g Ficoll  
0,1 g BSA  
0,1 g PVP  
ad 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>
- Hybridisierungslösung: 5 x SSC  
5 x Denhardt  
50 % Formamid (w/v)  
1 % SDS (w/v)  
100 µg/ml denaturierte, niedermolekulare DNA  
(unmittelbar vor Gebrauch zugeben)

### 2.8.2 Gelelektrophorese

Für den Northern-Blot musste die RNA zunächst mit Hilfe 1 %-iger Agarosegele aufgetrennt werden. Zur Herstellung der Gele wurde 1 g Agarose (Promega) in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> durch mehrmaliges Aufkochen gelöst. Nachdem die Agaroselösung auf 60 °C abgekühlt war, wurden 10 ml 10 x MOPS und 2 ml Formaldehyd (37 %) zugegeben und das Gel unter dem Abzug in die Gelvorrichtung gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel 1-2 mm mit Laufpuffer überschichtet. 20 µg RNA wurde mit dem Probenpuffer im Verhältnis 1 : 4 gemischt und 5 Minuten bei 65 °C denaturiert. Danach wurden die Proben sofort für 5 Minuten auf Eis abgekühlt, wodurch eine erneute Ausbildung

der RNA-Sekundärstruktur verhindert wurde. Nach der Zugabe von 2,5 µl Beschwerungs-puffer erfolgte die Applikation der Proben auf das Gel. Damit die Proben möglichst rasch in das Gel wanderten, wurden die ersten 5 Minuten der Elektrophorese bei 100 Volt durchgeführt. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 60 Volt für 3-4 Stunden. Die Überprüfung der RNA wurde mit einer kleinen Gelkammer durchgeführt, wobei 3-4 µg RNA verwendet wurde. Durch Zugabe von 1 µl Ethidiumbromidlösung in das Gel waren bei intakter RNA die 18s- und 28s-Banden unter UV-Licht sichtbar.

### **2.8.3 Kapillarblotting**

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde mittels Kapillarblotting auf eine Hybond-Nylon N+ Membran (Amersham) übertragen. Dazu wurde nach dem Lauf das Agarosegel und die auf Gelgröße zugeschnittene Nylonmembran 2 x 5 Minuten mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> und dann 10 min mit 20 x SSC behandelt. Der Blotaufbau bestand aus einem Pufferreservoir, das mit 20 x SSC gefüllt war, einer dicken Plexiglasscheibe, die mit in 20 x SSC getränktem Whatman-Papier umwickelt wurde, dem Gel, der Nylonmembran, vier weiteren Whatman-Papieren (auf Gelgröße zugeschnitten) und 30 Papiertüchern. Dieser Aufbau wurde von oben beschwert, damit der Transfer der RNA auf die Membran über Nacht erfolgen konnte.

Nach dem Blotten wurde die RNA durch 2-stündige Inkubation der Membran bei 80 °C auf dieser fixiert.

### **2.8.4 Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde**

#### **2.8.4.1 Markierung der Sonde mit <sup>32</sup>P-dATP**

Die Markierung der jeweiligen Sonde erfolgte mit dem Random Primer Labeling Kit Prime-It II (Stratagene) und <sup>32</sup>P-dATP (NEN<sup>TM</sup>). Dazu wurden 150 ng der DNA-Sonde mit 10 µl Random Primer aus dem Kit in einem Eppendorf-Tube gemischt und mit DEPC-Wasser auf 34 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA durch 10 minütiges Kochen denaturiert und die Probe bei Raumtemperatur langsam (10 min) abkühlen gelassen, damit die Primer an die DNA binden konnten. Um das radioaktiv markierte dATP einzubauen, wurde die Probe mit

10 µl 5 x Primer-Puffer für dATP, 5 µl <sup>32</sup>P-dATP und 1 µl Klenow Enzym (5 U) versetzt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert.

#### **2.8.4.2 Hybridisierung**

Um unspezifische Bindungen auf der Membran abzusättigen, muß sie zunächst prähybridisiert werden. Die trockene Nylonmembran wird dazu in ein Hybridisierungstube gelegt und mit 1 ml Hybridisierungslösung pro cm<sup>2</sup> Membran eine Stunde bei 42 °C inkubiert.

Für die Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde bei 100 °C 10 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und dann in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran 3 x 5 min mit 2 x SSC/0,1 % SDS bei 42 °C (Waschen mit niedriger Stringenz) und anschließend 2 x 15 min mit 0,2 x SSC/0,1 % SDS bei 68 °C (Waschen mit hoher Stringenz) gewaschen. Zuletzt wurde die Membran mit 2 x SSC bei RT kurz gespült, in Haushaltsfolie eingepackt und für die Detektion in eine Filmkassette mit Verstärkerfolie geklebt. Die Detektion erfolgte dann mit einem BioMax-Film (Agfa) bei -70 °C.

#### **2.8.4.3 Stripping**

Um eine Membran nochmals mit einer anderen Sonde hybridisieren zu können, musste das Signal der vorherigen Sonde entfernt werden. Die Membran wurde dazu mit 100 ml kochender SDS-Lösung (0,1 %) für 10 Minuten gewaschen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur konnte die Membran mit einer anderen Sonde erneut hybridisiert werden.

## 2.9 Proteinisolierung aus Zellen

Lysepuffer:	150 mM NaCl
	50 mM Tris-HCl
	20 mM $\beta$ -Glycerophosphat
	0,5 % Triton-X
	0,5 % NP-40
	10 mM NaF
	1 mM DTT
	1 mM Pefabloc
	1:100 Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1

Für die Proteinisolierung wurden die subkonfluenten Zellen zweimal mit eiskaltem PBS<sup>-</sup> gewaschen, das restliche PBS<sup>-</sup> abgesaugt und 100  $\mu$ l Lysepuffer pro Petrischale (d = 15 cm) auf die Zellen gegeben. Nun wurde mit Hilfe eines Zellschabers die Zellen von den Schalen gekratzt und in ein Eppendorf-Tube überführt. Um eine vollständige Zellyse zu gewährleisten, wurden die Zellen noch 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurde der Zellschrot durch 20 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C entfernt und die Proteinkonzentration des Überstandes mit Hilfe eines Kits von Biorad bestimmt. Dazu wurden je 2  $\mu$ l der Proben und des Proteinstandards (0, 2, 4, 6, 8 und 10 mg/ml BSA gelöst im verwendeten Lysepuffer) für die Standardproteinkurve in je zwei Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 25  $\mu$ l der Lösung 1 und danach 200  $\mu$ l der Lösung 2 aus dem Kit zu den Proben pipettiert. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 620 nm mit dem ELISA-Reader gemessen.

Für die Auswertung wurde mit den Werten der Proteinstandards eine Regressionsgerade erstellt und damit die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

## 2.10 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde dazu verwendet, die Phosphorylierung von Smad2 in den Fibroblasten nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 oder Bestrahlung nachzuweisen. Dazu wurden 3 mg der entsprechenden Proteinlösung mit 8  $\mu$ l des Smad2/3-Antikörpers (BD Bioscience) und 30  $\mu$ l Protein G-Plus Agarose Suspension (Oncogene) in einem Eppendorf-Tube ge-

mischt und über Nacht auf Eis auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Somit konnten die Smad-Proteine an den „beads“ binden. Nach der Inkubation wurden die „beads“ abzentrifugiert und der Proteinüberstand abgenommen. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS<sup>-</sup> wurde 40 µl Probenpuffer für den Gellauf zugefügt und die Proben 5 min aufgekocht. Damit wurden die gebundenen Proteine wieder von den „beads“ abgelöst.

## 2.11 Western-Blot

### 2.11.1 Puffer und Lösungen

- Acrylamid-Lösung (Roth): 30 % (w/v)
  
- 4 x Trenngelpuffer: 18,17 g Tris-Base  
4 ml SDS-Lsg. (10 %)  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
mit HCl auf pH 8,8 einstellen
  
- 4 x Sammelgelpuffer: 6,06 g Tris-Base  
4 ml SDS-Lsg. (10 %)  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
mit HCl auf pH 6,8 einstellen
  
- Ammoniumpersulfat (APS): 10 % (w/v) in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, frisch ansetzen
  
- Probenpuffer (reduzierend): 2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer  
2,0 ml SDS (10 %)  
2,0 ml Glycerin  
0,5 ml β-Mercaptoethanol  
0,25 mg Bromphenolblau  
ad 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

- Laufpuffer:
  - 72 g Glycin
  - 15 g Tris-Base
  - 5 g SDS
  - ad 5 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
  - pH = 8,6
  
- Anodenpuffer:
  - 3,1 g Borsäure
  - 4 ml SDS-Lsg. (10 %)
  - 200 ml Methanol
  - ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
  - mit NaOH auf pH = 9,0 einstellen
  
- Kathodenpuffer:
  - 3,1 g Borsäure
  - 4 ml SDS-Lsg. (10 %)
  - 50 ml Methanol
  - ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
  - mit NaOH auf pH = 9,0 einstellen
  
- Tween-PBS<sup>-</sup> (T-PBS<sup>-</sup>):
  - PBS<sup>-</sup>
  - 0,1 % Tween 20
  
- TBS-Tween (TBS-T):
  - 6,05 g Tris-Base
  - 8,76 g NaCl
  - 0,1 % Tween 20
  - ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
  - mit HCl auf pH = 7,5 einstellen

### 2.11.2 SDS-Gelelektrophorese

Je nachdem welche Proteine untersucht wurden, wurden unterschiedliche Trenngele verwendet (siehe Tab. 1).

	10 %	12 %	15 %
<b>4 x Trenngelpuffer</b>	5 ml	5 ml	5 ml
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></b>	8,4 ml	7 ml	5 ml
<b>Acrylamidlösung</b>	6,6 ml	8 ml	10 ml
<b>APS</b>	100 µl	100 µl	100 µl
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	10 µl

**Tab. 1:** Protokolle für Trenngele

Nachdem die Gelapparatur (Hoefer<sup>®</sup>, Pharmacia Biotech) vorschriftsgemäß aufgebaut war, wurde das Trenngel entsprechend einem der Protokolle in Tab. 1 bis 1 cm unterhalb des Kammes gegossen. Damit eine gleichmäßige Trennschicht entstand, wurde das Gel bis zum Aushärten mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 Minuten konnte das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel gegossen werden.

Für das Sammelgel wurden 1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer, 3 ml dest. Wasser, 750 µl Acrylamidlösung, 100 µl APS und 5 µl TEMED gemischt und sofort zwischen den Kamm bis zur Oberkante der Glasplatten gegossen. Nach dem Erstarren des Gels (ca. 15 min) wurde der Kamm vorsichtig heraus gezogen und die Geltaschen mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Proteinproben wurden durch 5 minütiges Aufkochen denaturiert und anschließend mit Hilfe einer Hamilton-Spritze durch Unterschichten in die Geltaschen gefüllt. Zusätzlich wurden 10 µl Proteinmarker (Invitrogen) und 5 µl „Prestain“ (Sigma) mit aufgetragen. Anschließend wurde das Gel vorsichtig in die Elektrophoresekammer überführt und nachdem das obere Pufferreservoir mit Laufpuffer aufgefüllt war, bei 30 mA unter Wasserkühlung für 3-4 Stunden laufen gelassen.

### **2.11.3 „Semi-Dry“-Blot**

Für das Blotten wurden für ein Gel jeweils sechs Whatman-Papiere und die Membran auf Trenngelgröße zugeschnitten. Drei Whatman-Papiere wurden dann zusammen mit der Membran in Anodenpuffer und drei Whatman-Papiere in Kathodenpuffer gelegt.

Nach dem Gellauf wurde vorsichtig eine Glasplatte von dem Gel gelöst und das Sammelgel mit einem Skalpell vom Trenngel abgetrennt. Damit die Proteine aus dem Gel auf die Membran gebロットet werden konnten, musste das Gel folgendermaßen in die Blot-Apparatur gelegt werden: Zuerst die Anoden-Whatman-Papiere, die Membran, dann das Gel und zuletzt die Kathoden-Whatman-Papiere. Der Blotvorgang dauerte je nach Proteingröße zwischen 1,5 und 2 Stunden bei 135 mA pro Gel (12 x 14 cm). Anschließend wurde die Membran mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit Ponceau S die Bloteffizienz überprüft. Nun konnten auch mit einem Kugelschreiber die Banden des Proteinmarkers für die spätere Auswertung markiert werden.

### **2.11.4 Immunreaktion zum Nachweis eines bestimmten Proteins**

Um unspezifische Bindungen zu blocken, wurde der Blot vor der Detektion mit dem Antikörper mit einer 5 %-igen Trockenmilchpulver- (gelöst in T-PBS<sup>-</sup>) oder mit einer 3 %-igen BSA- (gelöst in TBS-T, bei phosphorylierten Antikörpern) Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der entsprechende Primär-Antikörper in der gleichen Lösung, mit der vorher geblockt wurde, zu dem in Plastikfolie eingeschweißten Blot gegeben und für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Orbital-schüttler inkubiert. Danach wurde der Blot mindestens 3 x 10 Minuten mit T-PBS<sup>-</sup> oder TBS-T gewaschen, mit dem Sekundär-Antikörper in Plastikfolie eingeschweißte und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem der Blot nochmals 3 x 10 Minuten gewaschen wurde, erfolgte die Detektion mit einem Kit der Firma Pharmacia Amersham Biosciences. Dazu wurde der Blot mit den Detektionslösungen 1 und 2 aus dem Kit (vorher im Verhältnis 1 : 1 mischen) für eine Minute inkubiert. Anschließend ließ man die Lösung auf einem Papiertuch gut abtropfen und klebte den Blot in Plastikfolie in eine Filmkassette. Es wurde dann ein Röntgenfilm (Agfa) aufgelegt, der je nach Stärke des Signals 15 Sekunden oder mehrere Stunden exponiert wurde.

Die densitometrische Auswertung der Filme erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Image J (NIH).

## 2.12 Einengen der Mediumüberstände

Um das aktive TGF- $\beta$ 1 in den Mediumüberständen der Zellen mittels Western-Blot nachweisen zu können, mussten diese vorher eingeeengt werden. Dazu wurde das Medium von drei Petrischalen ( $d = 15 \text{ cm}$ ) gesammelt (insgesamt ca. 45 ml) und davon 40 ml mit Hilfe der Cenricon Plus-20 Zentrifugenröhrchen (Millipore) bei  $4000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  auf ca. 200  $\mu\text{l}$  eingent. Diese 200  $\mu\text{l}$  wurden dann mit den Zentrifugenröhrchen YM-3 (Millipore) bei  $5000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  auf ca. 60  $\mu\text{l}$  reduziert. Somit konnten die Proben mit Probenpuffer versetzt, aufgekocht und auf ein 15 %-iges SDS-Gel aufgetragen werden.

## 2.13 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurden folgende Formeln verwendet:

Arithmetisches Mittel:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Standardabweichung SD:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

## 2.14 Chemikalien

Ammoniumpersulfat	Sigma
Aceton	Merck
Acrylamid-Lösung	Roth
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Sigma

Coomassie Brillant Blau Tabletten	Serva
DAPI	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dinatriumhydrogenphosphat	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethanol	Merck
EDTA	Sigma
Formaldehyd	Merck
Giemsa	Serva
Glycerin	Roth
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma
Glycin	Sigma
Insulin	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Mowiol	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Biochrom
Natriumhydroxid	Sigma
Natriumfluorid	Sigma
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma
Penicillin	Biochrom
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Streptomycin	Biochrom
Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Sigma
Tris-Base	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Transferrin	Sigma
Triton-X	Serva
Trypsin	Serva
Tween 20	Roth

## 2.15 Geräte

Absaugeinrichtung	Neuberger
Autoklav	Wolf
Brutschrank	Heraeus
Einfrierhilfe	TW Cryogenics
ELISA-Reader	Beckmann
Elektrophoresekammer	Life Technologies
	Pharmacia
Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Freezer (-86 °C)	Forma Scientific
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Brand
Kühlschrank	Siemens
Lichtmikroskop	Leitz
	Hund
LightCycler	Roche
Mevatron 60	Siemens
Mikrowelle	AEG
Orbitalschüttler	Heidolph
PCR-Gerät	Perkin-Elmer
Photometer	Eppendorf
	Beckmann
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfen	Integra Biosciences
PowerSupply	Pharmacia
Röntgenfilmentwickler	Agfa
Heiz- und Rührgerät	UniEquip
Rüttler	Edmund Böhler
Sterilbank	BDK
Sterilisator	WTB binder
Waage	Kern
	Satorius
Wärmeschrank	Heraeus Instruments

Wasserbad

GFL

Vortexer

Julabo

Janke & Kunkel

Zentrifugen

UniEquip

Eppendorf

Heraeus Instruments

Hettich

## 2.16 Materialien

Deckgläser

Menzel-Gläser

Einfrierröhrchen

Nunc™

Einmal-Injektions-Kanüle

Braun

Einwegpipetten

Corning Inc.

Kulturflaschen/-schalen

Becton Dickinson

Kulturröhrchen

Greiner bio-one

Sarstedt AG & Co.

Pasteurpipetten

J. Poulten Ltd.

Pipettenspitzen

Eppendorf

Reaktionsgefäße

Eppendorf

Sarstedt AG & Co.

Röntgenfilm

Agfa

Spritzen

BD Plastipak™

Sterilfilter

Millipore

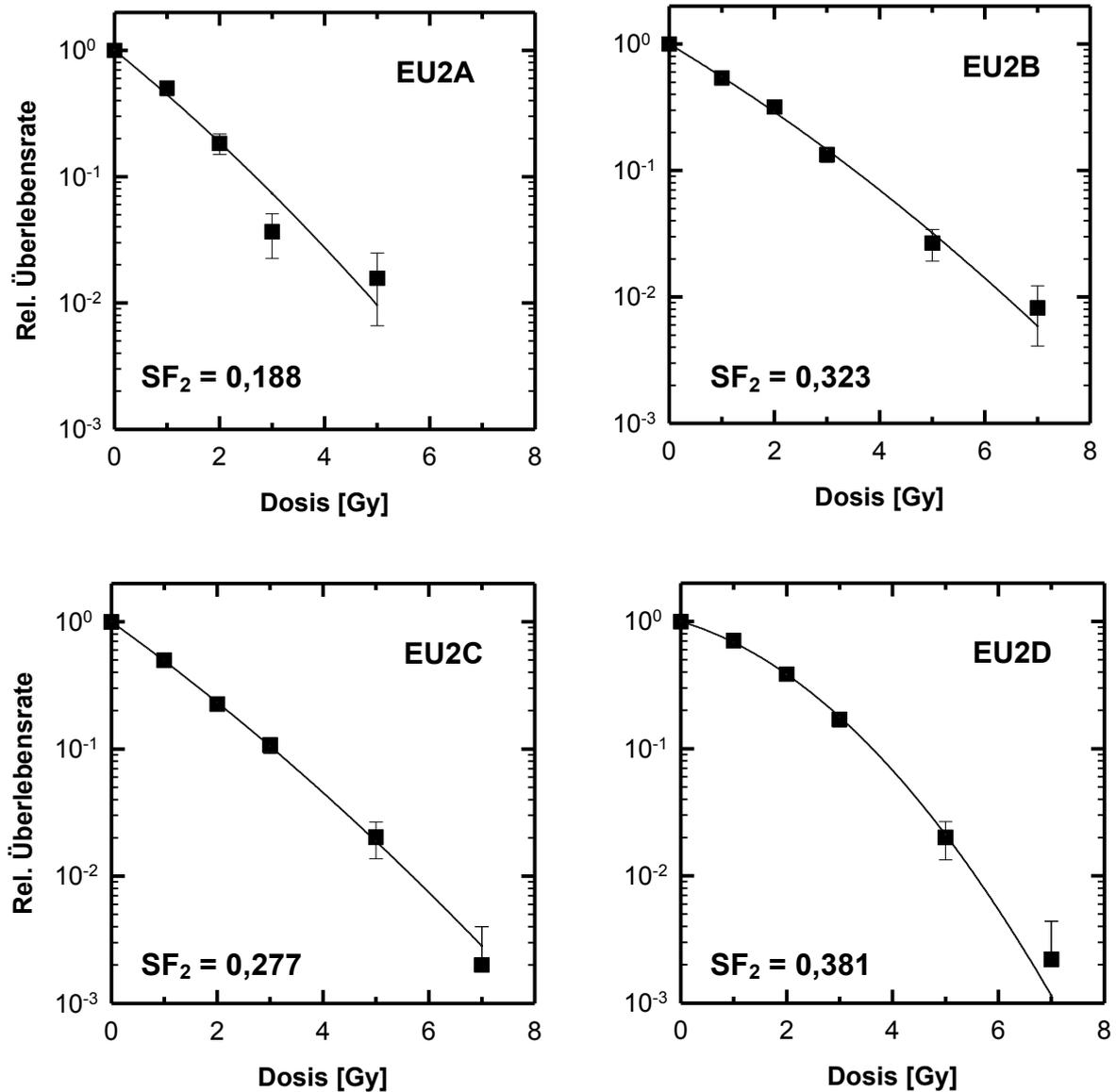
Zellschaber

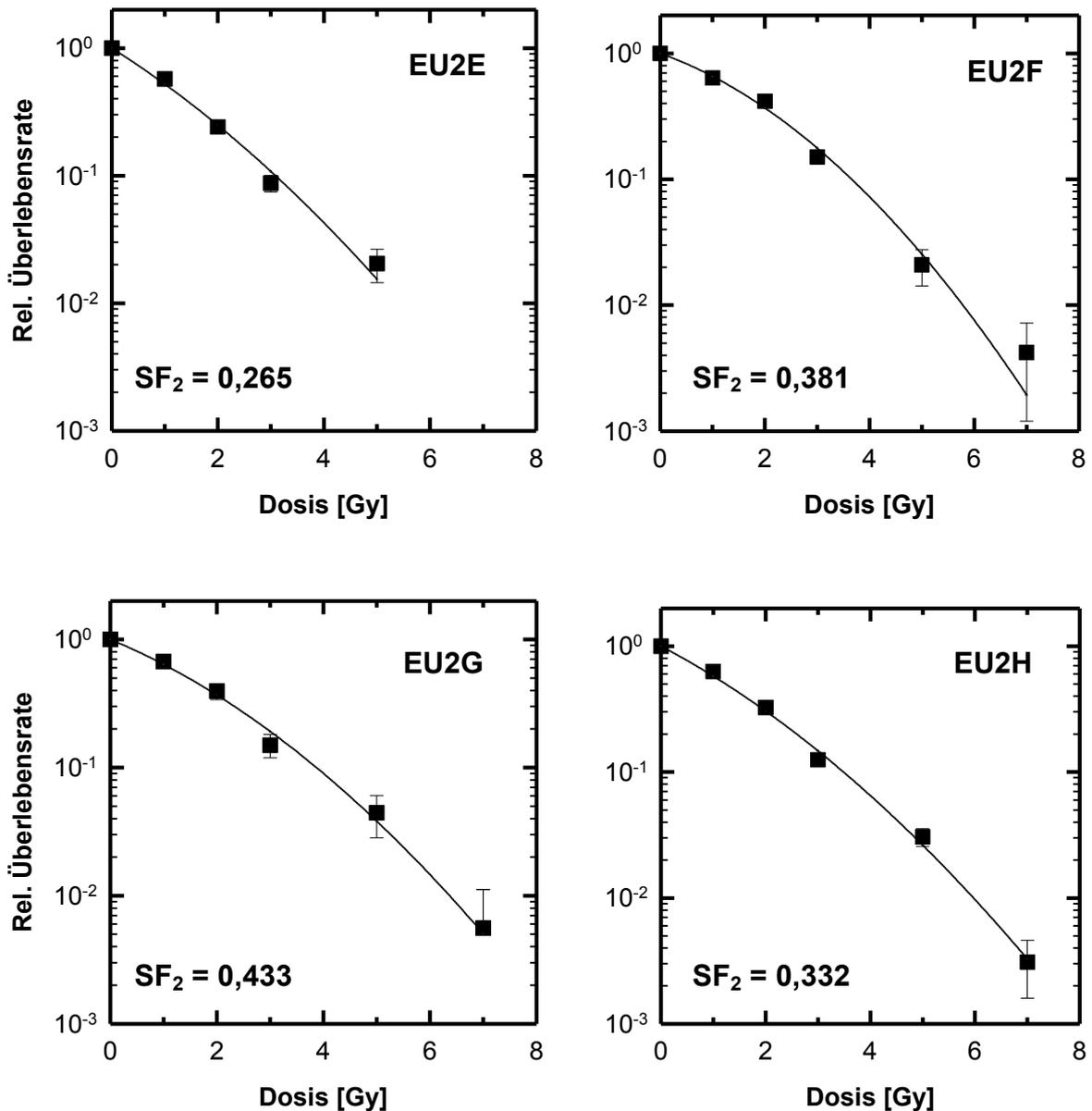
Corning Inc.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Strahlensensitivität der acht Hautfibroblastenzellstämme

Um die Strahlensensitivität der acht Hautfibroblastenzellstämme EU2A bis EU2H zu untersuchen, wurden von allen Zellstämmen Dosis-Wirkungskurven erstellt. Dazu wurden jeweils 500 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte zum Koloniebildungstest ausgesät und 24 h nach der Aussaat die Zellen mit 1, 2, 3, 5 und 7 Gy bestrahlt. Nach 12-tägigem Wachstum wurden die Koloniebildungstests ausgewertet. Die so erhaltenen Dosis-Wirkungskurven sind in Abb. 7 dargestellt.





**Abb. 7:** Dosis-Wirkungskurven und SF<sub>2</sub>-Werte der Hautfibroblastenzellstämme EU2A bis EU2H; dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten

Ein Maß für die Strahlenempfindlichkeit von Zellen ist der sogenannte SF<sub>2</sub>-Wert, was der relativen Überlebensrate („surviving fraction“) bei einer Dosis von 2 Gy entspricht. Vergleicht man diese SF<sub>2</sub>-Werte (siehe Abb. 7), so ergibt sich für die Zellstämme ein sehr unterschiedliches Bild: Die Zellstämme EU2A, EU2C und EU2E gehören danach zu den strahlenempfindlichen Zellstämmen, während die Zellstämme EU2D, EU2F und EU2G zu den resistenten zu zählen sind. Dies zeigt sich auch an der stärker ausgeprägten Schulter der Überlebenskurven im Niedrigdosisbereich.

Die Zellstämme EU2B und EU2H gehören zu keinem der beiden Extreme.

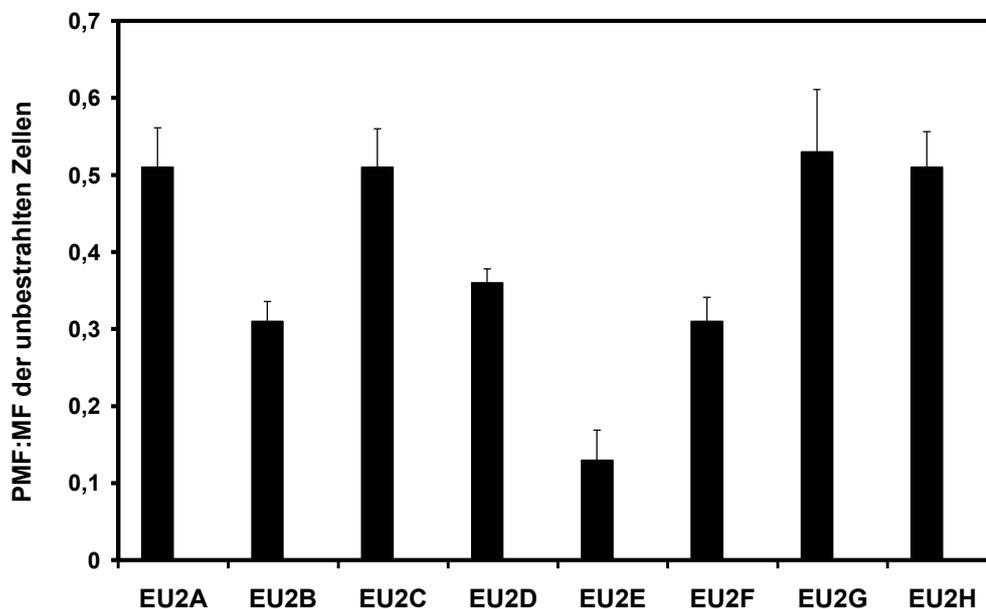
### 3.2 Analyse des Differenzierungsmusters

Für das Entstehen einer Fibrose ist der Differenzierungszustand des Fibroblastenzellsystems von entscheidender Bedeutung. *In vitro* kann man das Differenzierungsmuster analysieren, indem man bei einem Koloniebildungstest entweder das Verhältnis der PMF-Zellen zu den MF-Kolonien oder das L:E-Verhältnis bildet.

#### 3.2.1 PMF:MF-Verhältnis der unbestrahlten Fibroblastenzellstämme

Für die Auswertung wurden die unbestrahlten Kontrollen der Koloniebildungstests aus 3.1 verwendet.

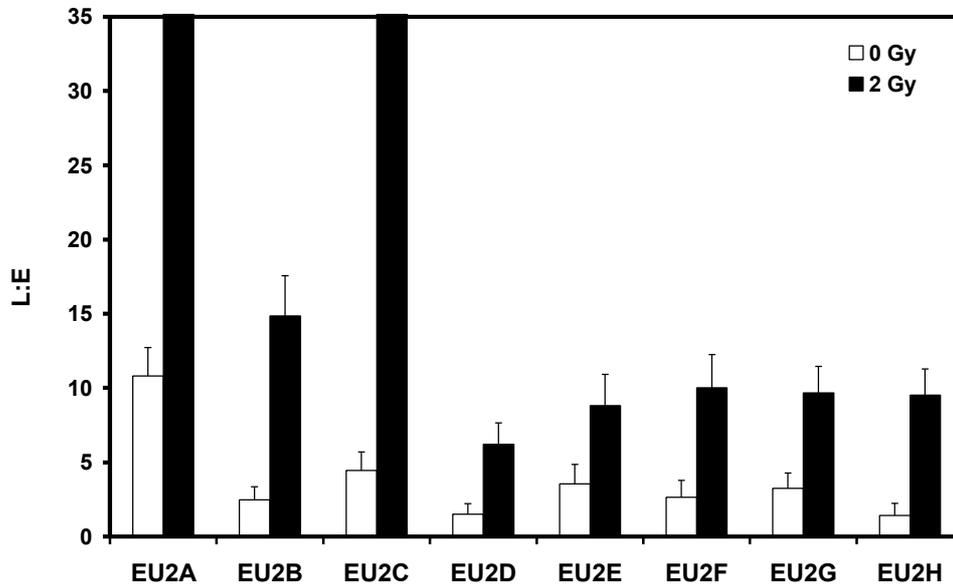
Es gibt auch hier große Unterschiede zwischen den Zellstämmen. Man erkennt, dass der Anteil der PMF-Zellen bei den Zellstämmen EU2A, EU2C, EU2G und EU2H sehr groß ist im Vergleich zu den restlichen Zellstämmen. Eine Ausnahmestellung nimmt der Zellstamm EU2E ein, da er von allen Zellstämmen das kleinste PMF:MF-Verhältnis ( $< 0,1$ ) aufweist.



**Abb. 8:** PMF:MF-Verhältnis der verschiedenen unbestrahlten Fibroblastenzellstämme; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten

### 3.2.2 L:E-Verhältnis der Fibroblastenzellstämme vor und nach Bestrahlung

Für die Auswertung wurden ebenfalls die entsprechenden Koloniebildungstests aus 3.1 verwendet.



**Abb. 9:** L:E-Verhältnis der Fibroblastenzellstämme vor und nach Bestrahlung; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten

Vergleicht man die L:E-Verhältnisse der verschiedenen Zellstämme vor der Bestrahlung miteinander, so sieht man, dass der Zellstamm EU2A mit Abstand das größte Verhältnis aufweist. Dagegen ist bei allen Zellstämmen eine deutliche Zunahme des L:E-Verhältnisses nach Bestrahlung zu erkennen. Bei den Zellstämmen EU2A und EU2C ist dieser Anstieg am größten, da nach der Bestrahlung nur noch späte Klone vorhanden waren. Die Zellstämme EU2D und EU2E zeigen die kleinste Zunahme. EU2D ist auch zusammen mit EU2H der Zellstamm, der vor Bestrahlung das kleinste L:E-Verhältnis aufweist.

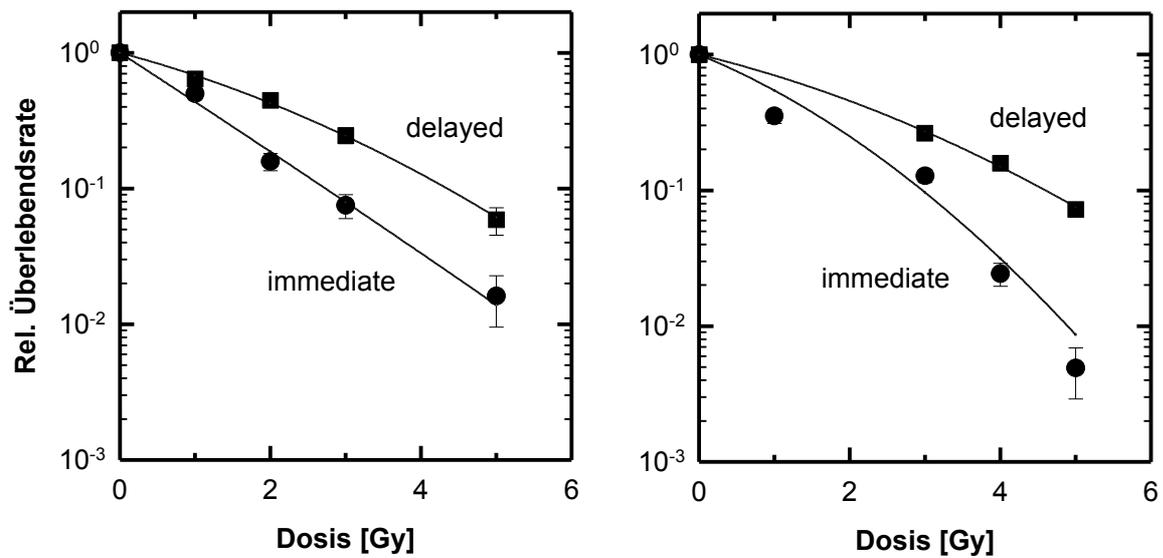
### 3.3 Vergleich von Photonen- und Schwerionenbestrahlung

Um die beiden Strahlenarten miteinander vergleichen zu können, wurden von ausgewählten Zellstämmen Dosis-Wirkungskurven erstellt. Dazu wurden konfluente Zellen mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt, und sofort nach der Bestrahlung („immediate plating“) bzw. sechs Stunden danach („delayed plating“) Koloniebildungstests ausgesät. Bei der Schwer-

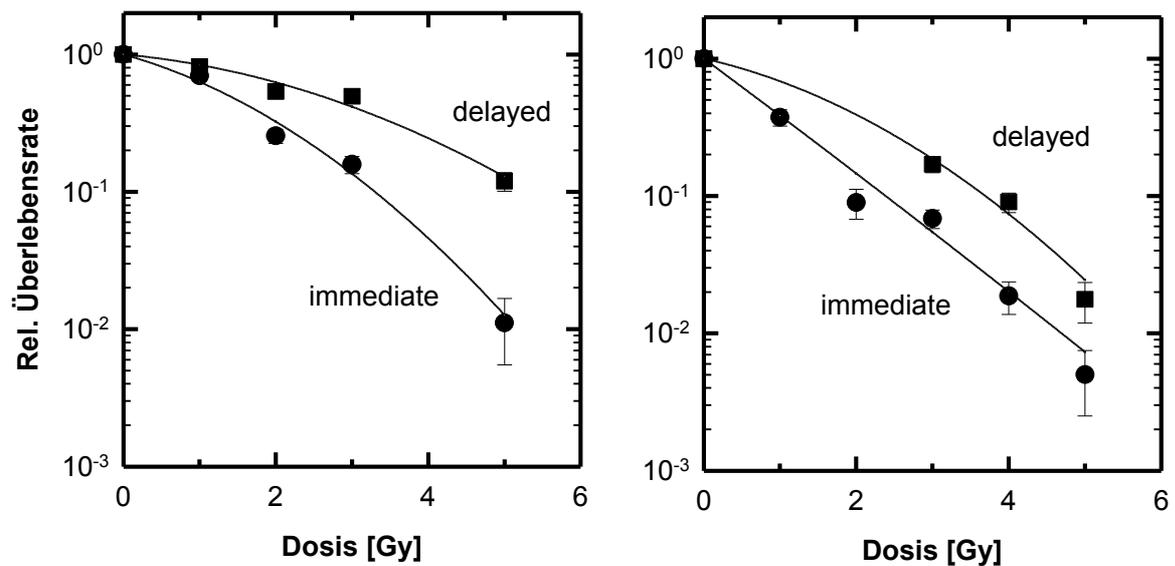
ionenbestrahlung wurde dabei eine Energie (200 MeV/u) gewählt, die der Energie am Anfang des Bragg-Peaks entspricht und somit entscheidend für die Strahlenwirkung auf das Normalgewebe ist.

In Abb.10 sind die Dosis-Wirkungskurven nach „immediate-“ und „delayed-plating“ für die Zellstämme EU2A, EU2C, EU2D und EU2E dargestellt.

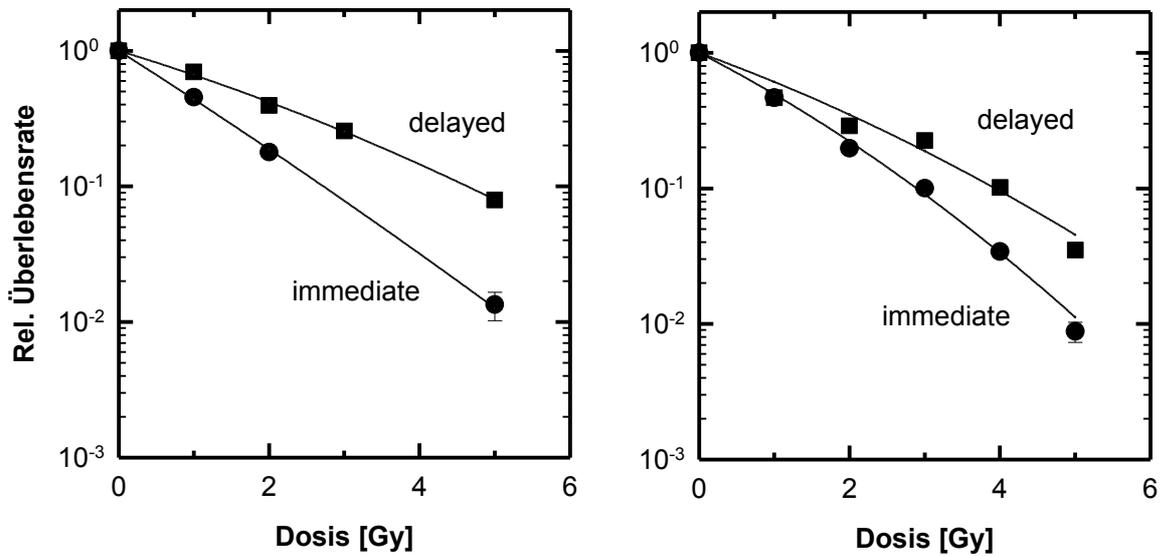
### EU2A



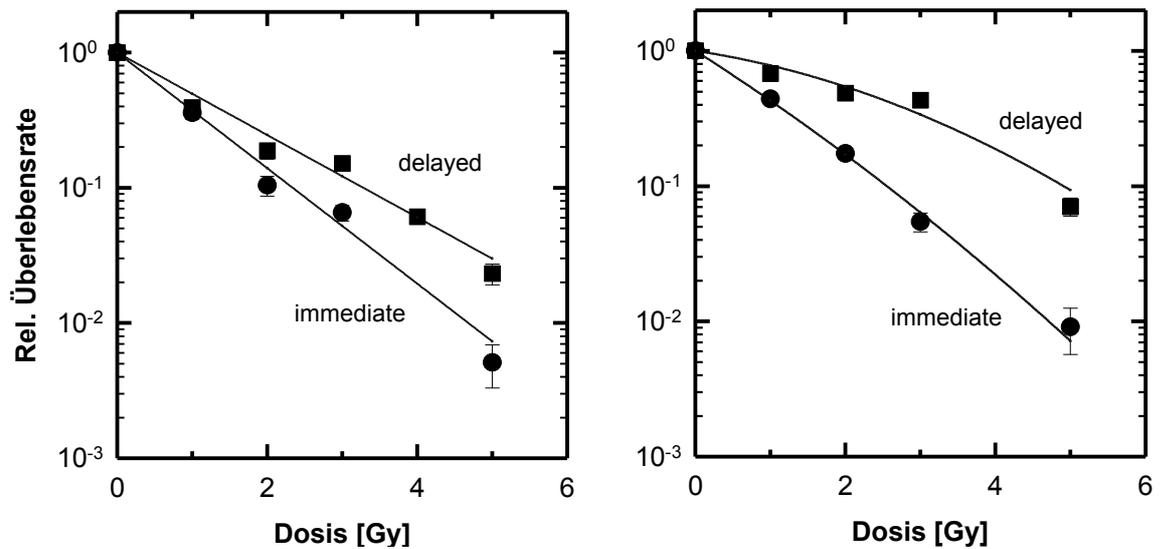
### EU2C



### EU2D



### EU2E



**Abb. 10:** Dosis-Wirkungskurven („immediate- und delayed-plating“) der Fibroblastenzellstämme EU2A, EU2C, EU2D und EU2E nach Bestrahlung mit Photonen (links) und Schwerionen (rechts); für Photonenbestrahlung sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Einzelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten und für Schwerionenbestrahlung die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Einzelwerten aus einem Experiment dargestellt

Während bei den Zellstämmen EU2A und EU2D kaum Unterschiede zwischen den Kurven festzustellen sind, unterscheiden sich die Kurven nach delayed-plating bei den Zellstämmen EU2C und EU2E. Beim Zellstamm EU2C fällt die Kurve nach Schwerionenbestrahlung stärker ab als die Kurve nach Photonenbestrahlung, beim Zellstamm EU2E verhält es sich umgekehrt. Hier ist die Kurve nach Photonenbestrahlung steiler. Es scheint somit, dass der Zellstamm EU2E Schäden nach Schwerionenbestrahlung besser reparieren kann als der Zellstamm EU2C.

### **3.4 Genexpression von TGF- $\beta$ 1 nach Bestrahlung**

Da TGF- $\beta$ 1 vermutlich eine entscheidende Rolle im Differenzierungsprozess der Fibroblasten nach Bestrahlung spielt, wurde die Expression des TGF- $\beta$ 1 Gens in den verschiedenen Fibroblastenzellstämmen nach Bestrahlung mittels Northern-Blot untersucht.

Dazu wurden die subkonfluenten Fibroblasten entweder mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt und sechs Stunden nach der Bestrahlung RNA isoliert oder mit 2 Gy bestrahlt und verschiedene Zeiten danach die Zellen für die RNA-Isolierung lysiert.

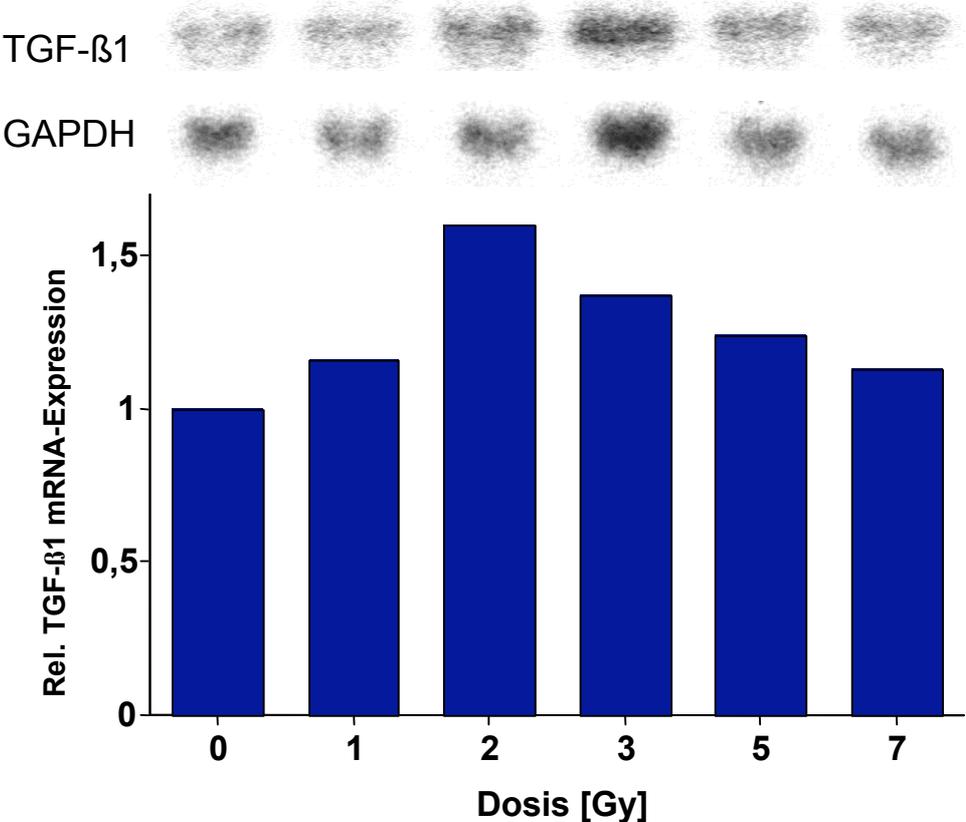
Anschließend wurde die isolierte RNA mit einem Agarosegel aufgetrennt und für die Hybridisierung auf eine Nylonmembran geblottet.

Zum Nachweis der TGF- $\beta$ 1 mRNA auf dem Blot wurde eine spezifische DNA-Sonde mit Hilfe der PCR synthetisiert. Diese spezifische TGF- $\beta$ 1-Sonde wurde mit radioaktivem Phosphor markiert und so die TGF- $\beta$ 1 mRNA auf dem Blot nachgewiesen.

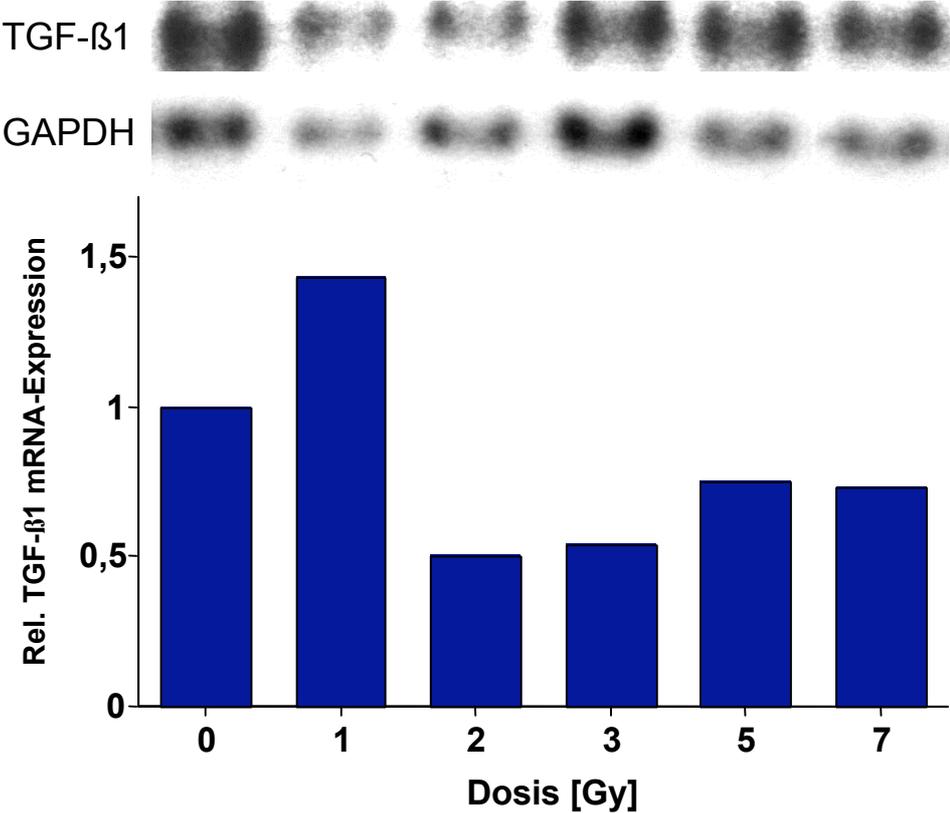
Außerdem wurde der Blot zur Kontrolle der aufgetragenen RNA-Menge mit einer spezifischen GAPDH-Sonde hybridisiert.

3.4.1 TGF-β1 mRNA-Expression 6 h nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen

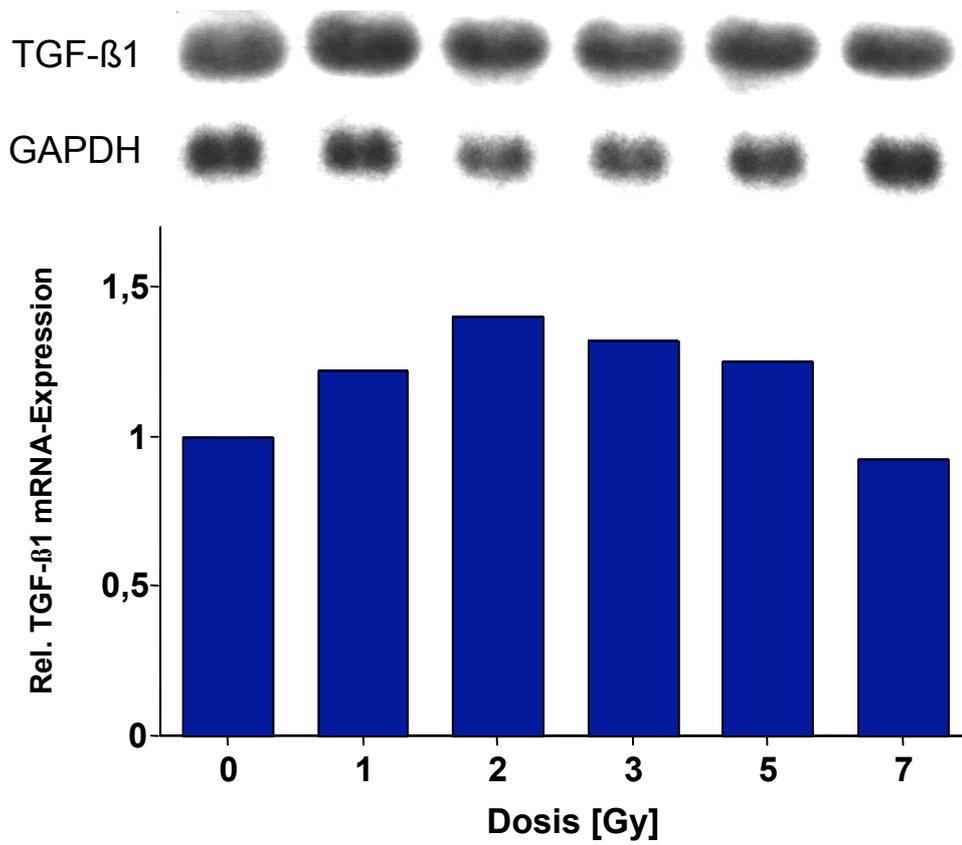
**EU2A**



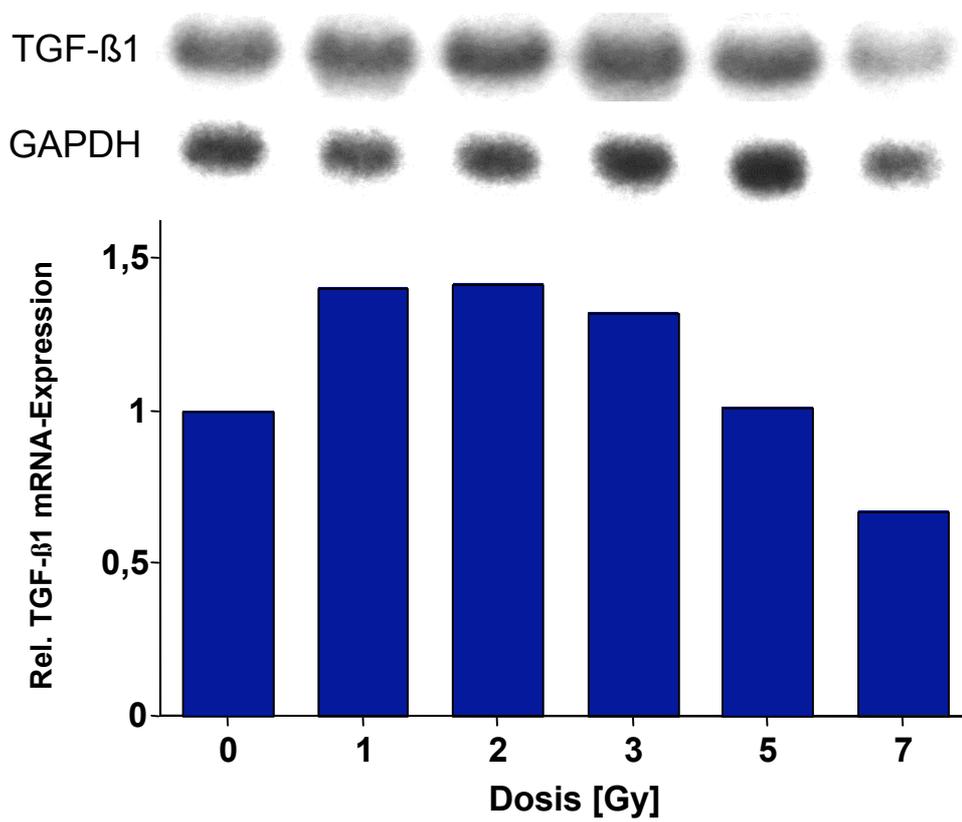
**EU2B**



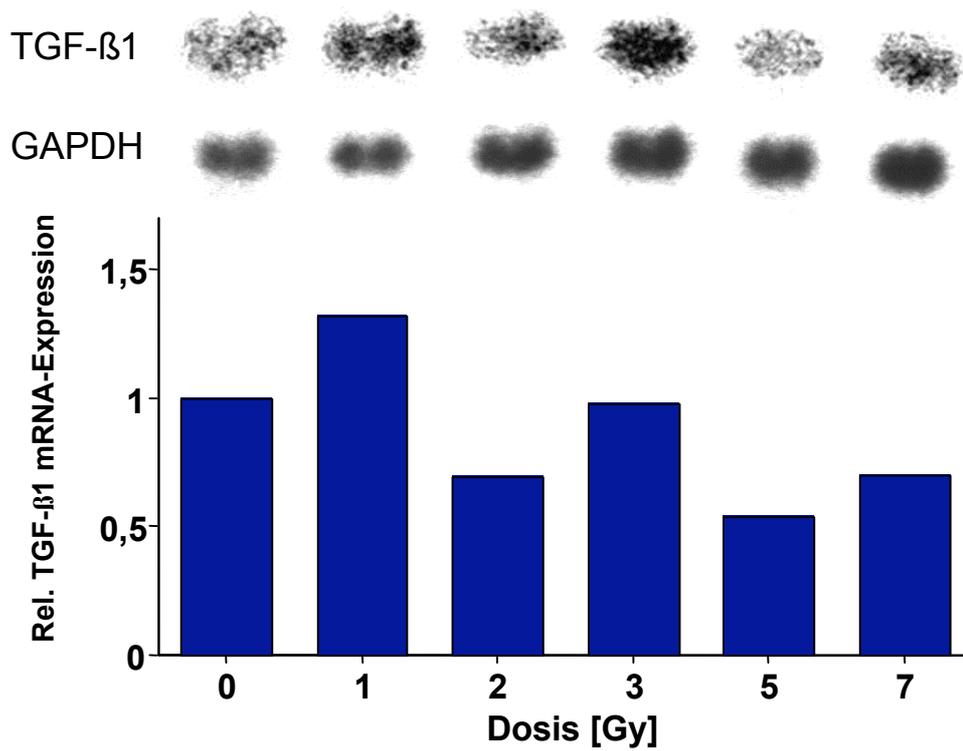
## EU2C



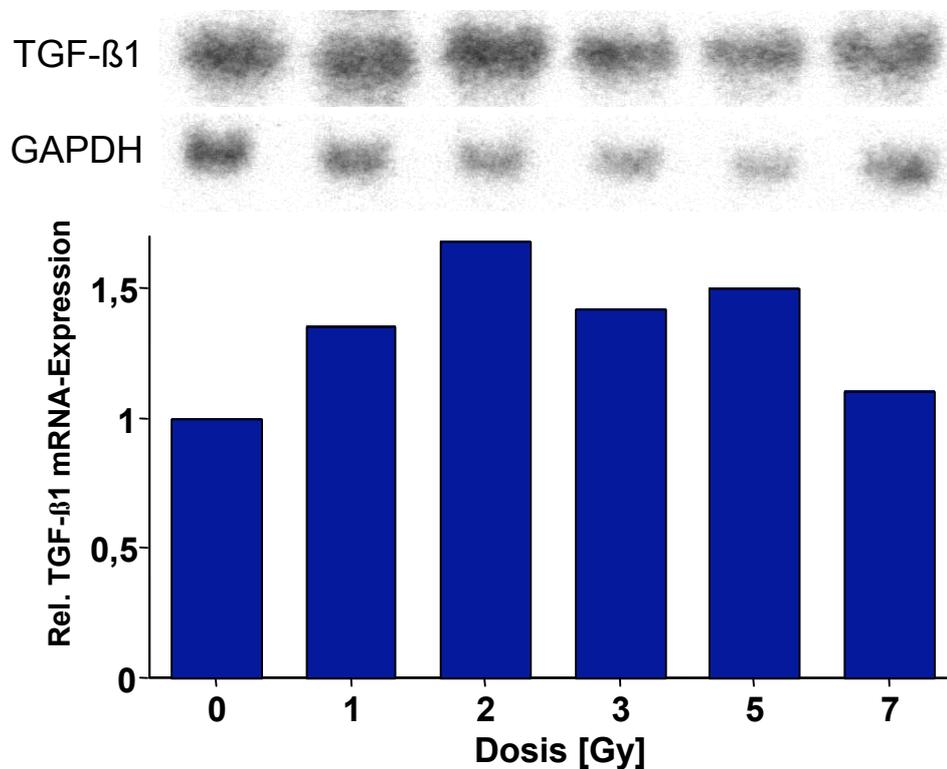
## EU2D



## EU2E



## EU2F

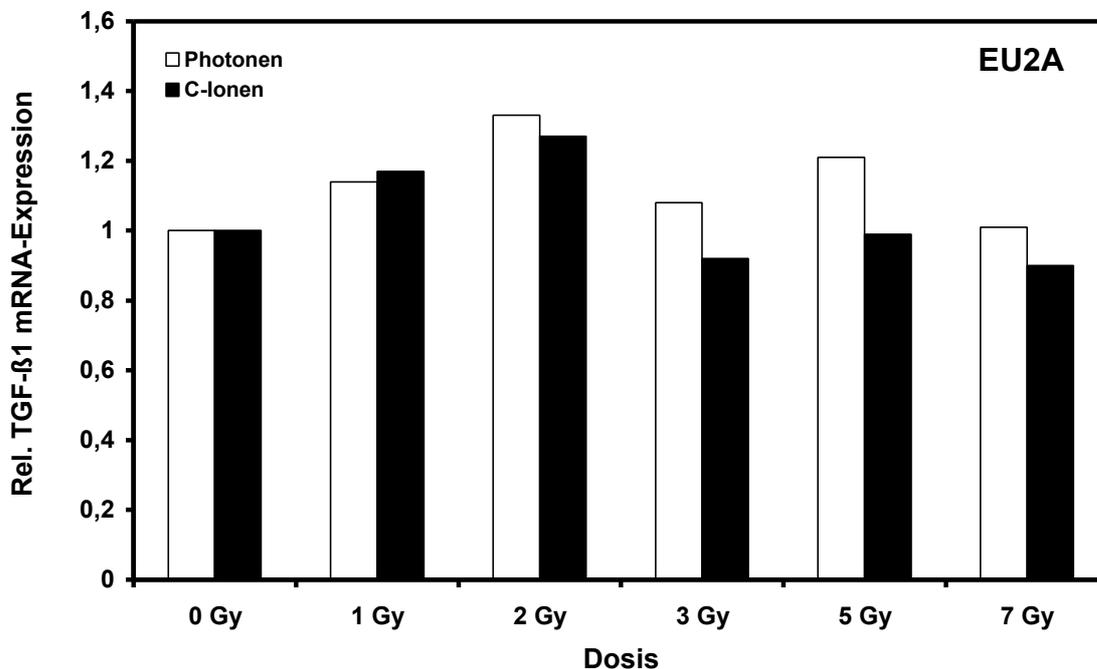


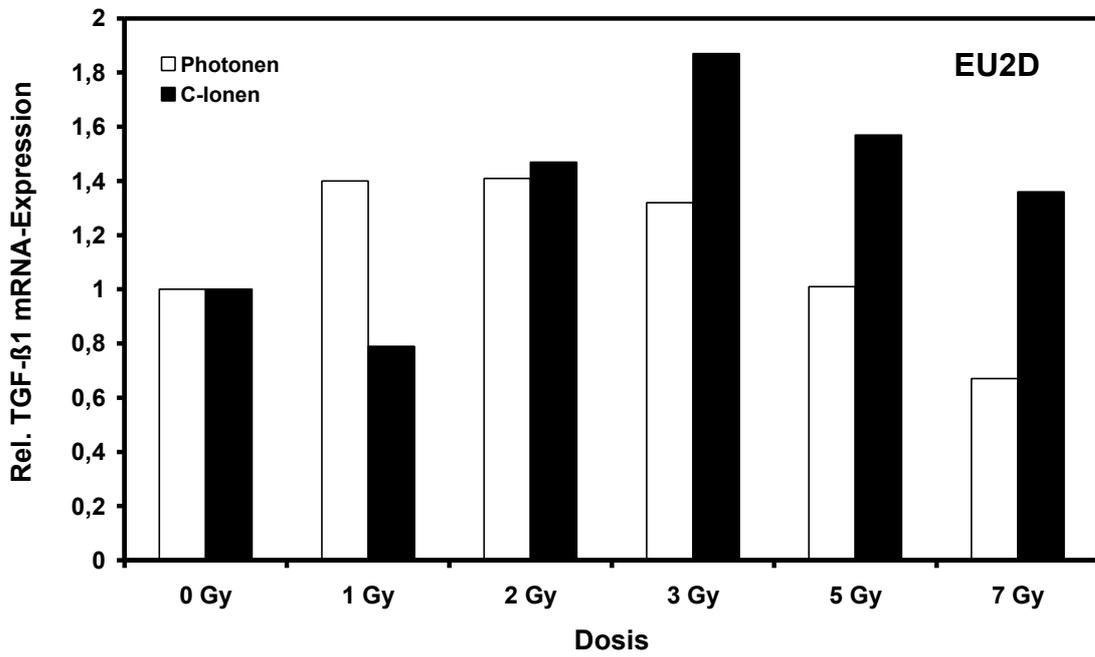
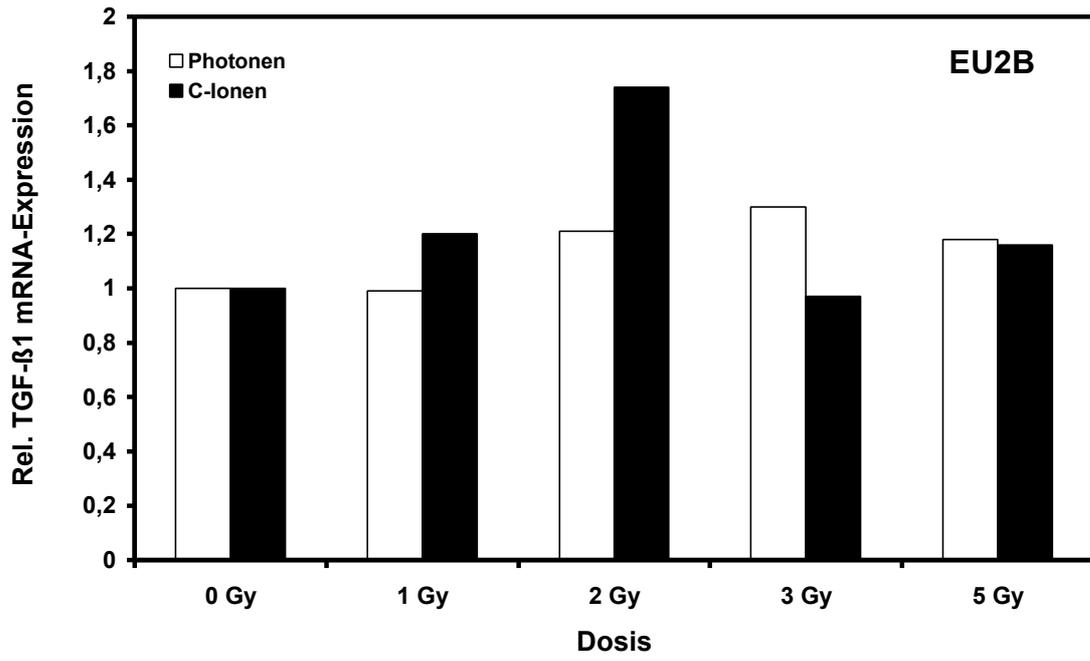
**Abb. 11:** TGF-β1 mRNA Expression in den unterschiedlichen Fibroblastenzellstämmen 6 Stunden nach Photonenbestrahlung mit verschiedenen Dosen: Es sind sowohl die Banden von TGF-β1 und GAPDH des entsprechenden Northern-Blots als auch die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung dargestellt (n = 1)

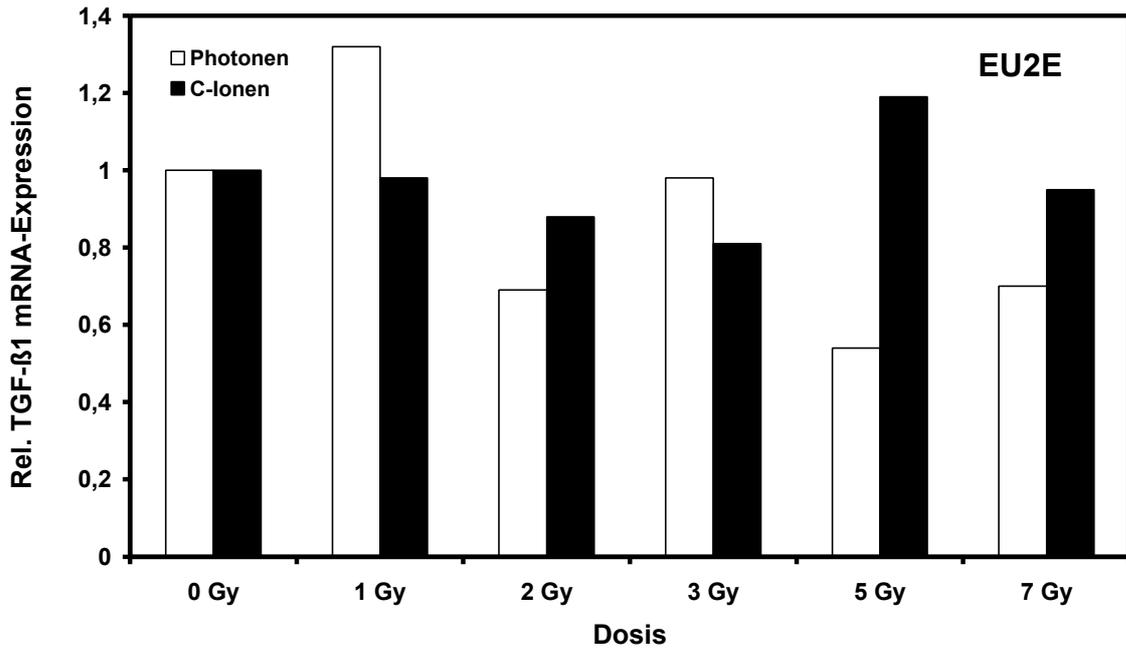
Vergleicht man die Ergebnisse des Northern-Blots der verschiedenen Zellstämme, so erkennt man bei allen eine schwache Induktion des TGF- $\beta$ 1 Transkripts nach der Bestrahlung mit 1 oder 2 Gy, aber keine weitere Zunahme bei höheren Dosen. Die größte Zunahme der TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ist bei den Zellstämmen EU2A und EU2F (ca. 1,6 fach) nach Bestrahlung mit 2 Gy zu beobachten. Dagegen ist das Maximum der TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression bei den Zellstämmen EU2B und EU2E schon bei 1 Gy erreicht.

### 3.4.2 Vergleich mit der TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression nach Schwerionenbestrahlung

Vergleicht man die TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression nach der Bestrahlung mit Photonen mit der nach Schwerionenbestrahlung sieht man keine großen Unterschiede (siehe Abb. 12). Auch nach Schwerionenbestrahlung ist der Gehalt der TGF- $\beta$ 1 mRNA bei fast allen Zellstämmen nur leicht erhöht. Nur bei den Zellstämmen EU2B und EU2D ist die Expression des TGF- $\beta$ 1 Transkripts bei 2 bzw. 3 Gy etwas stärker als bei Photonenbestrahlung.

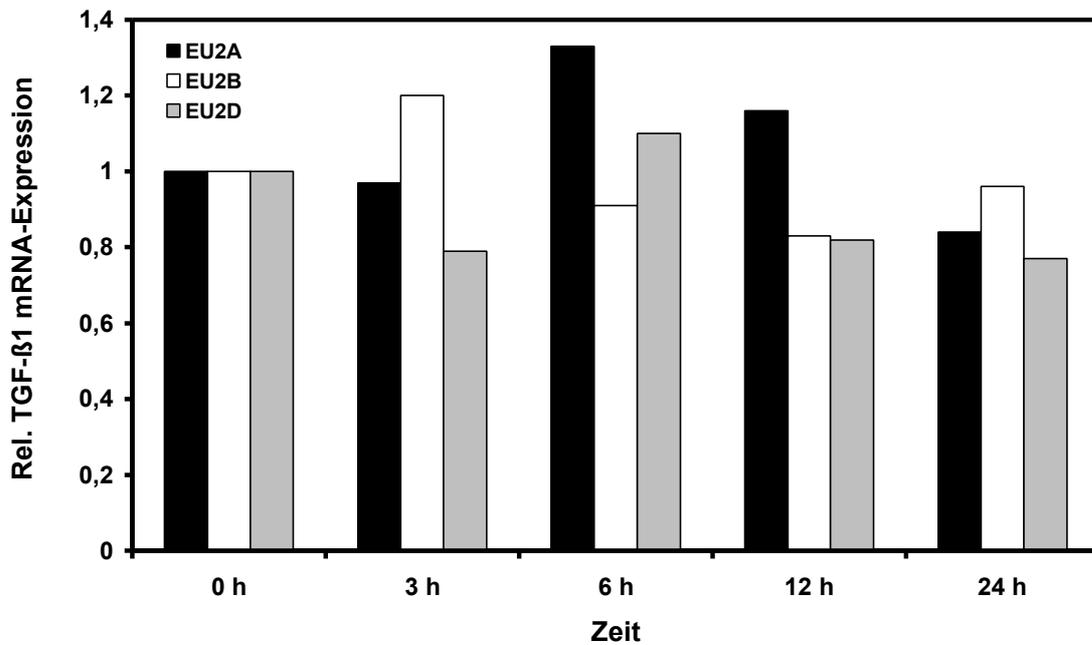






**Abb. 12:** TGF-β1 mRNA-Expression in Abhängigkeit von Zellstamm, Strahlungsart und Dosis (n = 1)

### 3.4.3 TGF-β1 mRNA-Expression verschiedene Zeiten nach Bestrahlung mit 2 Gy



**Abb. 13:** Densitometrische Auswertung der Northern-Blots der unterschiedlichen Fibroblastenzellstämme (n = 1): Die RNA wurde dabei zu den entsprechenden Zeiten nach Photonenbestrahlung (2 Gy) isoliert.

Nachdem sechs Stunden nach der Bestrahlung nur eine schwache Induktion des TGF- $\beta$ 1 Transkripts zu sehen war, sollte mittels Zeitkinetik untersucht werden, ob zu anderen Zeitpunkten nach Bestrahlung eine deutlichere Zunahme der TGF- $\beta$ 1 mRNA zu beobachten ist. Da bei den meisten Zellstämmen das Maximum der Expression bei 2 Gy lag, wurden die Zellen mit dieser Dosis bestrahlt und verschiedene Zeiten danach RNA isoliert. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Northern-Blots für TGF- $\beta$ 1 und GAPDH sind in Abb. 13 dargestellt.

Bei allen drei untersuchten Zellstämmen ist nur eine sehr schwache Erhöhung der TGF- $\beta$ 1 mRNA nach Bestrahlung zu beobachten. Das Maximum ist bei den Zellstämmen EU2A und EU2D nach sechs Stunden und beim Zellstamm EU2B schon nach drei Stunden erreicht.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Regulation von TGF- $\beta$ 1 nach Bestrahlung nicht auf transkriptioneller Ebene passiert, sondern wahrscheinlich extrazellulär durch Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ 1-Komplexes.

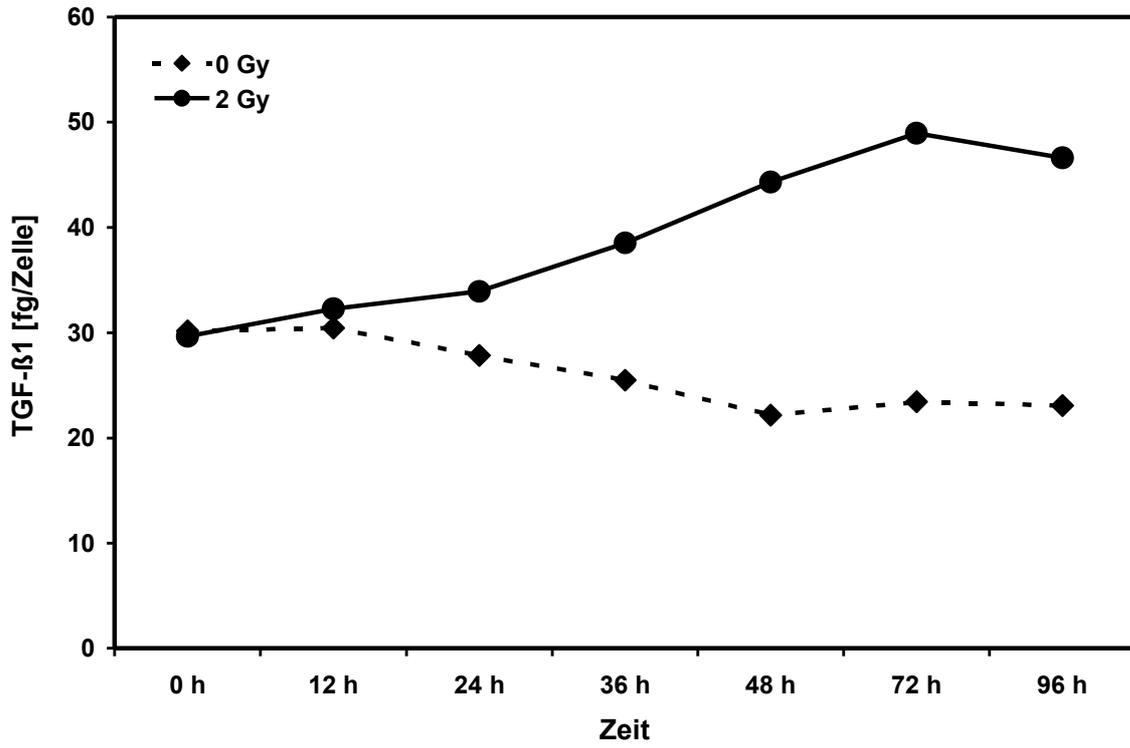
### **3.5 Gehalt an TGF- $\beta$ 1 im Mediumüberstand der Zellstämme nach Photonenbestrahlung**

#### **3.5.1 Bestimmung des Gesamtgehalts an TGF- $\beta$ 1**

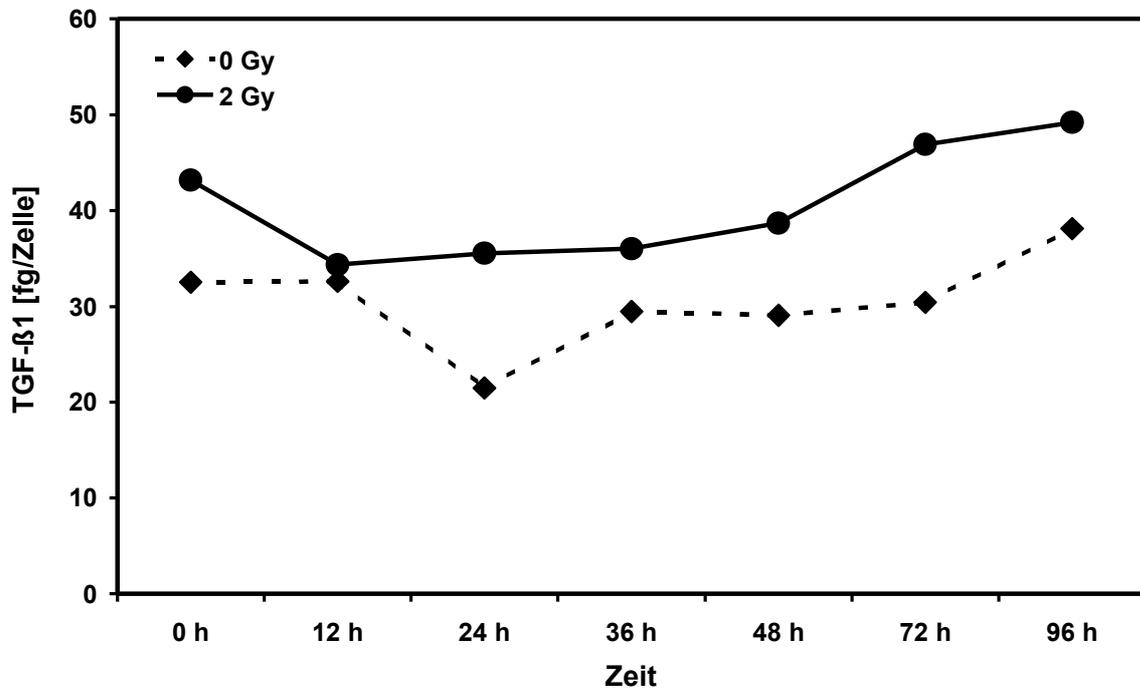
Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 wird als ein wichtiger Mediator für die durch ionisierende Strahlung induzierte, beschleunigte terminale Differenzierung und erhöhte Kollagenproduktion von Fibroblasten diskutiert. Deshalb wurde mit Hilfe eines Sandwich-ELISA der Gesamtgehalt von TGF- $\beta$ 1 verschiedene Zeiten nach Bestrahlung untersucht. In Abb. 14 sind die Ergebnisse des ELISA für verschiedene Zellstämme dargestellt.

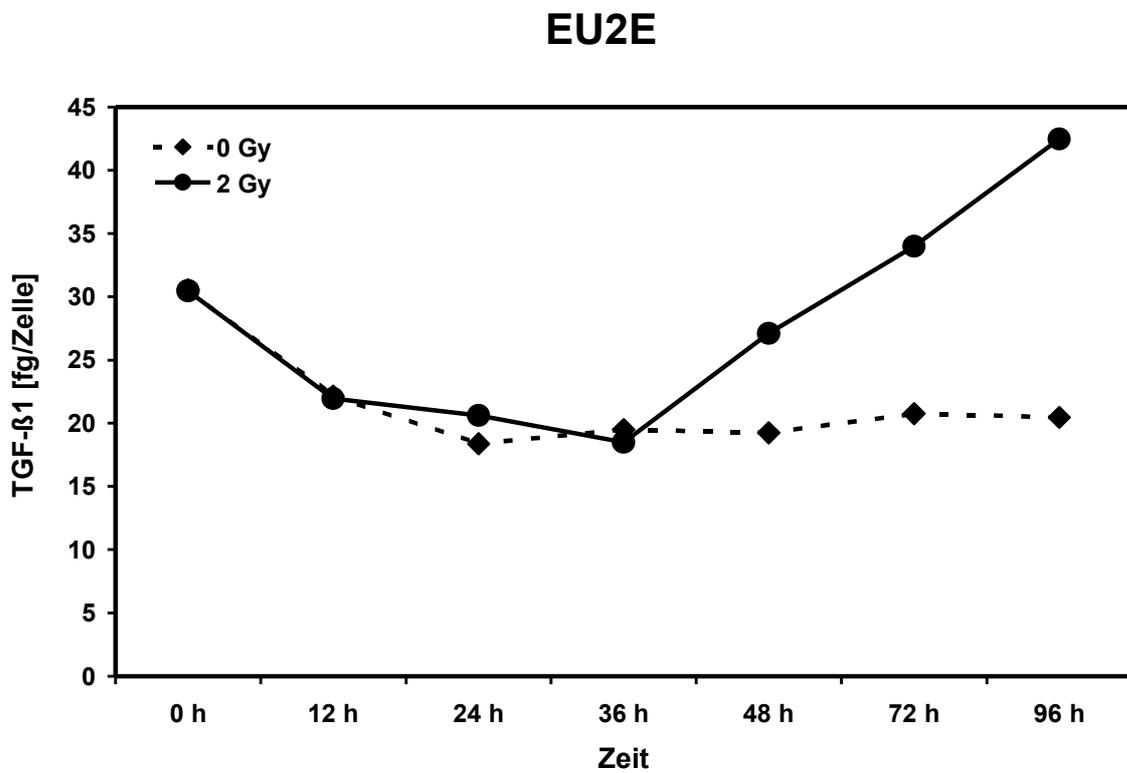
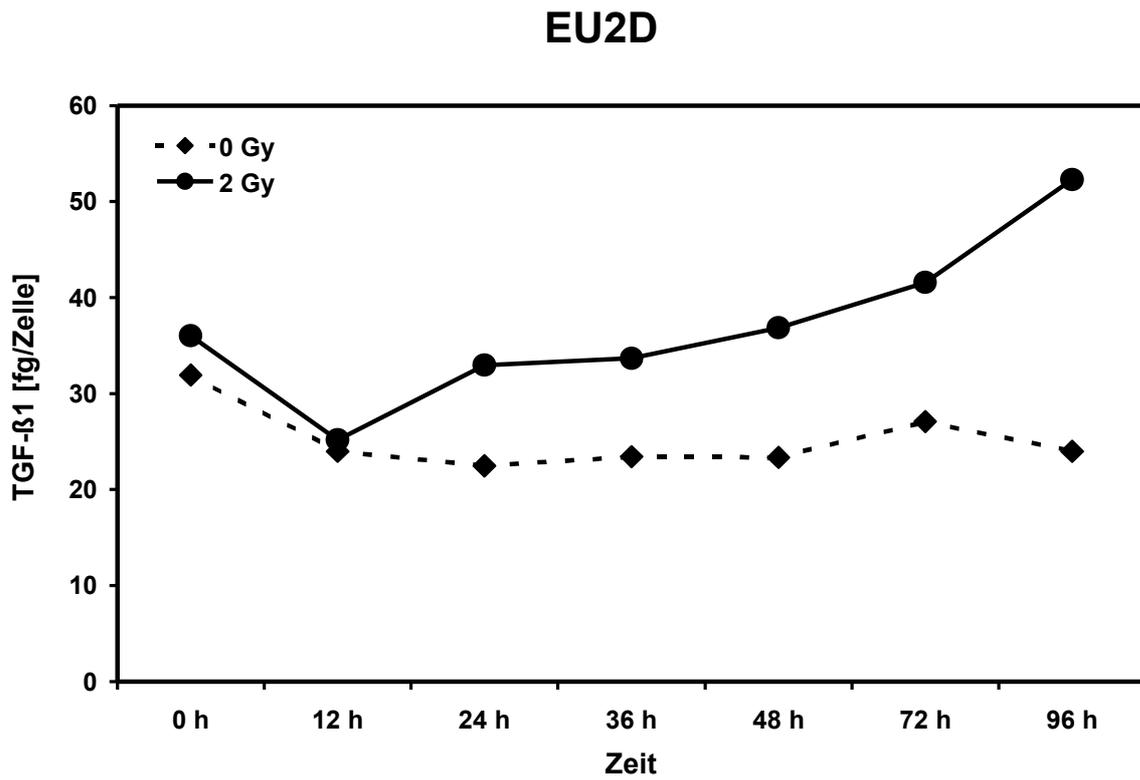
Bei allen Zellstämmen ist der TGF- $\beta$ 1 Gehalt im Medium nach Bestrahlung erhöht. Allerdings steigt er beim Zellstamm EU2A bis 72 Stunden nach Bestrahlung kontinuierlich an, während er bei den Zellstämmen EU2D und EU2E erst nach 24 bzw. 36 Stunden zunimmt und beim Zellstamm EU2C auf Ausgangsniveau bleibt.

## EU2A



## EU2C





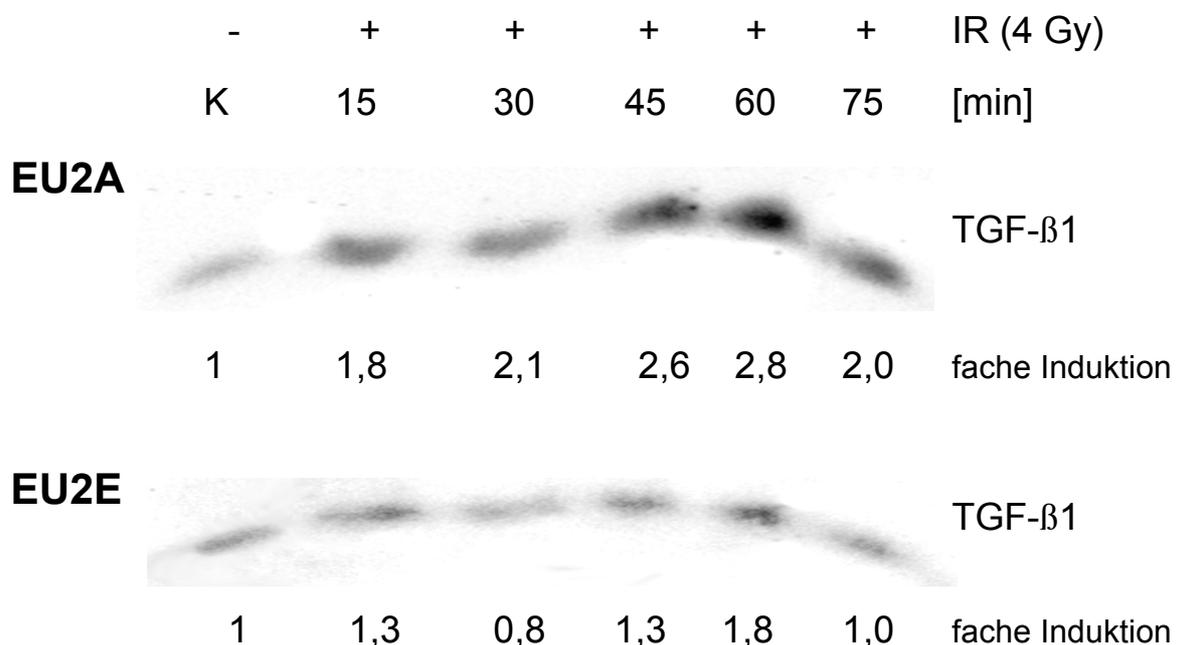
**Abb. 14:** Gesamtgehalt an TGF-β1 im Zellkulturüberstand unterschiedlicher Fibroblastenzellstämme verschiedene Zeiten nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy (n = 1)

### 3.5.2 Analyse des Levels an aktivem TGF- $\beta$ 1

Viel wichtiger als der Gesamtgehalt ist der Level an aktivem TGF- $\beta$ 1 im Zellkulturüberstand der Fibroblasten, da nur das aktive TGF- $\beta$ 1 an seinen spezifischen Rezeptor II binden und somit den für die Genexpression wichtiger zellzyklus-regulatorischer Proteine im Zellkern verantwortlichen Signalweg auslösen kann. Aus diesem Grund wurde durch Einengen der Mediumüberstände verschiedener Fibroblastenzellstämme und anschließendem Western-Blot die Menge an aktivem TGF- $\beta$ 1 verschiedene Zeiten nach Photonenbestrahlung analysiert.

In Abb. 15 ist der Gehalt an aktivem TGF- $\beta$ 1 im Mediumüberstand der Zellstämme EU2A und EU2E verschiedene Zeiten nach Photonenbestrahlung dargestellt.

Bei beiden Zellstämmen nimmt der Level an aktivem TGF- $\beta$ 1 bis 60 Minuten nach Bestrahlung zu. Allerdings ist die Induktion beim Zellstamm EU2A deutlich stärker als bei EU2E. Ein Grund dafür könnte der Differenzierungszustand der Zellen sein, da der Zellstamm EU2A im Vergleich zu EU2E weiter differenziert ist und somit mehr TGF- $\beta$ 1 produziert, was auch schon beim ELISA (siehe 3.5.1) zu beobachten war.



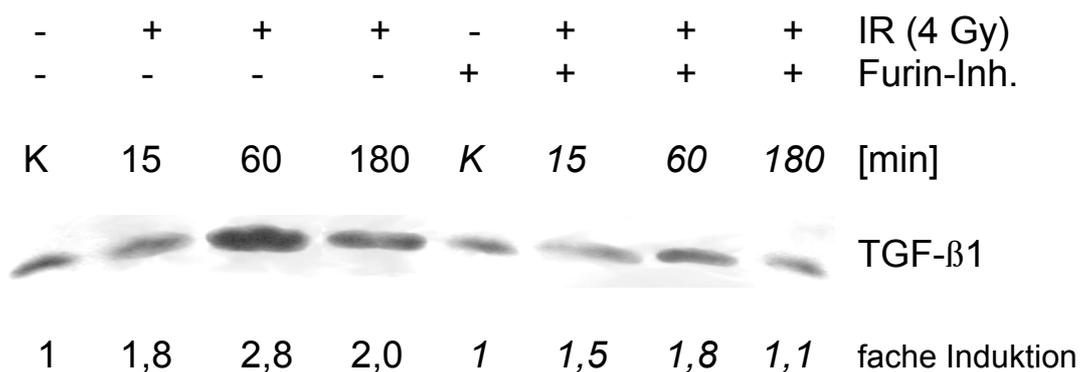
**Abb. 15:** Gehalt an aktivem TGF- $\beta$ 1 im Mediumüberstand der Zellstämme EU2A und EU2E verschiedene Zeiten nach Photonenbestrahlung mit 4 Gy; dargestellt sind repräsentative Blots von drei unabhängigen Einzelerperimenten

### 3.5.3 Gehalt an aktivem TGF-β1 nach Bestrahlung in Abhängigkeit der Protease Furin

Bei der Aktivierung des latenten TGF-β1 Komplexes spielt die Protease Furin eine wichtige Rolle. Um zu überprüfen, ob Furin auch an der Aktivierung des latenten TGF-β1 nach Bestrahlung beteiligt ist, wurden die Fibroblasten des Zellstammes EU2A vor der Bestrahlung mit dem spezifischen Inhibitor Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketon (50 μM) für die Protease behandelt. Die Aufarbeitung der Mediumproben erfolgte wie in 3.5.2.

In Abb. 16 ist nach alleiniger Bestrahlung wieder ein deutlicher Anstieg des aktiven TGF-β1 bis 60 Minuten zu erkennen. Vergleicht man allerdings die Banden nach Bestrahlung mit denen die zusätzlich mit dem Furin-Inhibitor behandelt wurden, sieht man eine starke Reduzierung des aktiven TGF-β1-Levels.

Die Protease Furin stellt somit einen wichtigen Faktor bei der Aktivierung des latenten TGF-β1 Komplexes nach Bestrahlung in Fibroblasten dar.



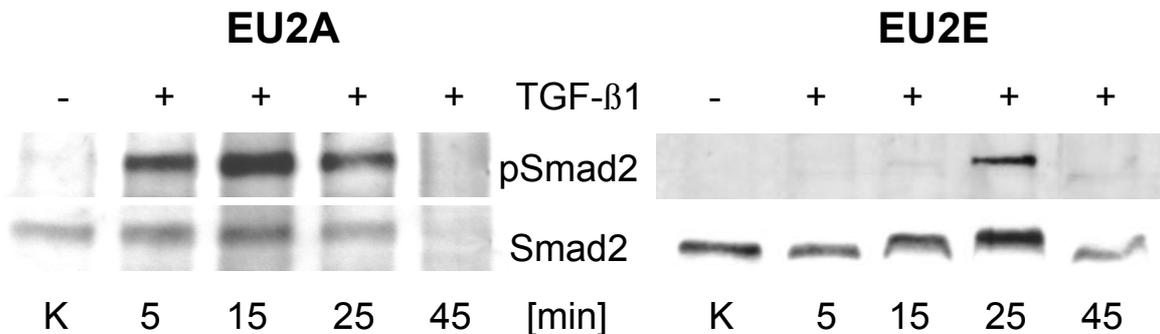
**Abb. 16:** Gehalt an aktivem TGF-β1 im Mediumüberstand des Zellstammes EU2A verschiedene Zeiten nach Photonenbestrahlung (4 Gy) +/- Furin-Inhibitor (n = 1)

### 3.6 Expression und Aktivierung von Smad2 in verschiedenen Fibroblastenzellstämmen

Nach der Aktivierung des latenten TGF-β1 Komplexes sind die rezeptor-aktivierten Smads, Smad2 und Smad3, die entscheidenden Proteine bei der Transduktion des TGF-β1 Signals in den Zellkern. Mittels Immunpräzipitation und anschließendem Western-Blot wurde deshalb die Expression und Phosphorylierung von Smad2 unter verschiedenen Bedingungen in unterschiedlichen Fibroblastenzellstämmen analysiert.

### 3.6.1 Phosphorylierung von Smad2 nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung

Um zu sehen, ob der TGF- $\beta$ 1 Signalweg in den verwendeten Fibroblasten aktiviert werden kann, wurden die Zellen mit 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 behandelt und nach verschiedenen Zeiten die Proteinisolierung vorgenommen. Die repräsentativen Ergebnisse von Western-Blots aus drei unabhängigen Experimenten sind für die Zellstämme EU2A und EU2E in Abb. 17 dargestellt. Bei beiden Zellstämmen ist eine starke Aktivierung von Smad2 nach der Behandlung zu erkennen, wobei die Phosphorylierung beim Zellstamm EU2A schneller abläuft als beim Zellstamm EU2E. Vergleicht man die Banden des unphosphorylierten Smad2 beim Zellstamm EU2E, so kann man sogar einen deutlichen Shift nach 25 minütiger TGF- $\beta$ 1 Behandlung erkennen, was ebenfalls auf die Phosphorylierung hinweist.

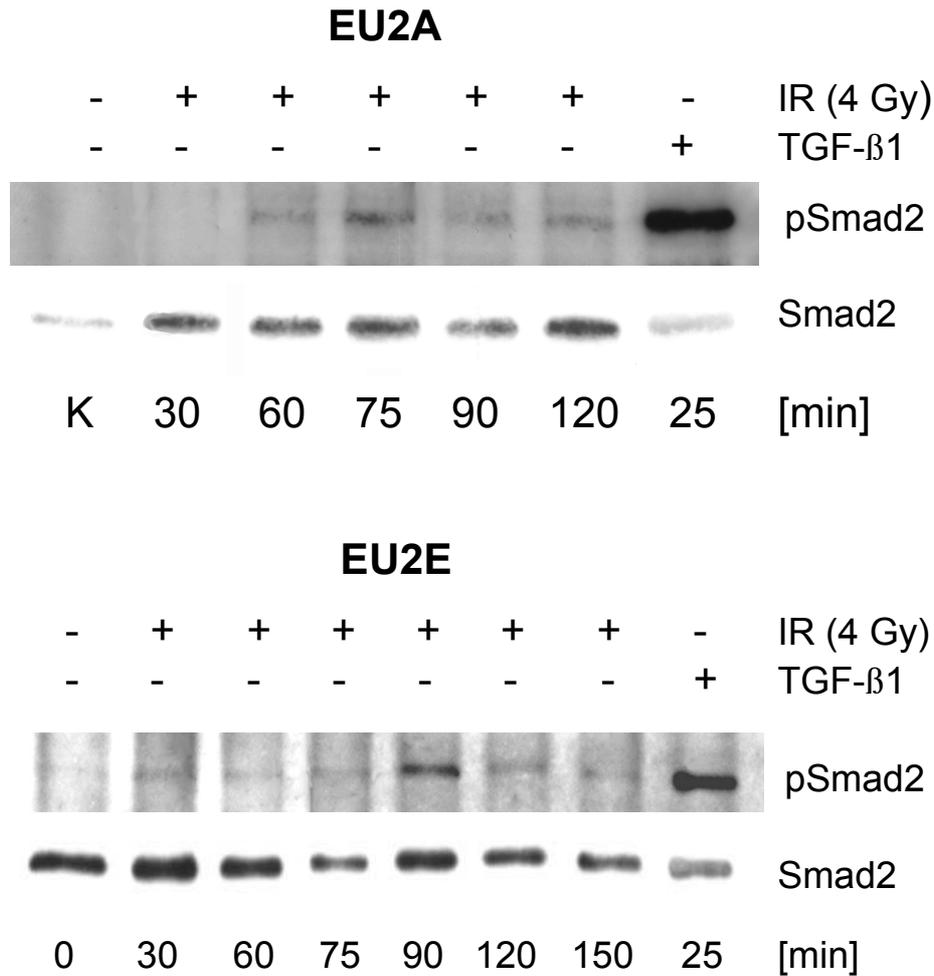


**Abb. 17:** Smad2-Phosphorylierung in den Zellstämmen EU2A und EU2E verschiedene Zeiten nach Behandlung mit 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (n = 3)

### 3.6.2 Smad2-Aktivierung nach Photonenbestrahlung

Nachdem die Aktivierung von Smad2 in den Fibroblasten nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob Smad2 auch nach Bestrahlung phosphoryliert wird. Um dies zu beantworten, wurden wieder die beiden Zellstämme EU2A und EU2E im subkonfluenten Zustand mit 4 Gy bestrahlt und verschiedene Zeiten danach die Zellen für die Proteinisolierung lysiert. Die nach Immunpräzipitation und Western-Blot erhaltenen Banden sind in Abb. 18 dargestellt.

In beiden Fällen ist eine schwache Smad2-Phosphorylierung nach der Bestrahlung zu erkennen, wobei das Maximum beim Zellstamm EU2A früher erreicht wird als beim Zellstamm EU2E.



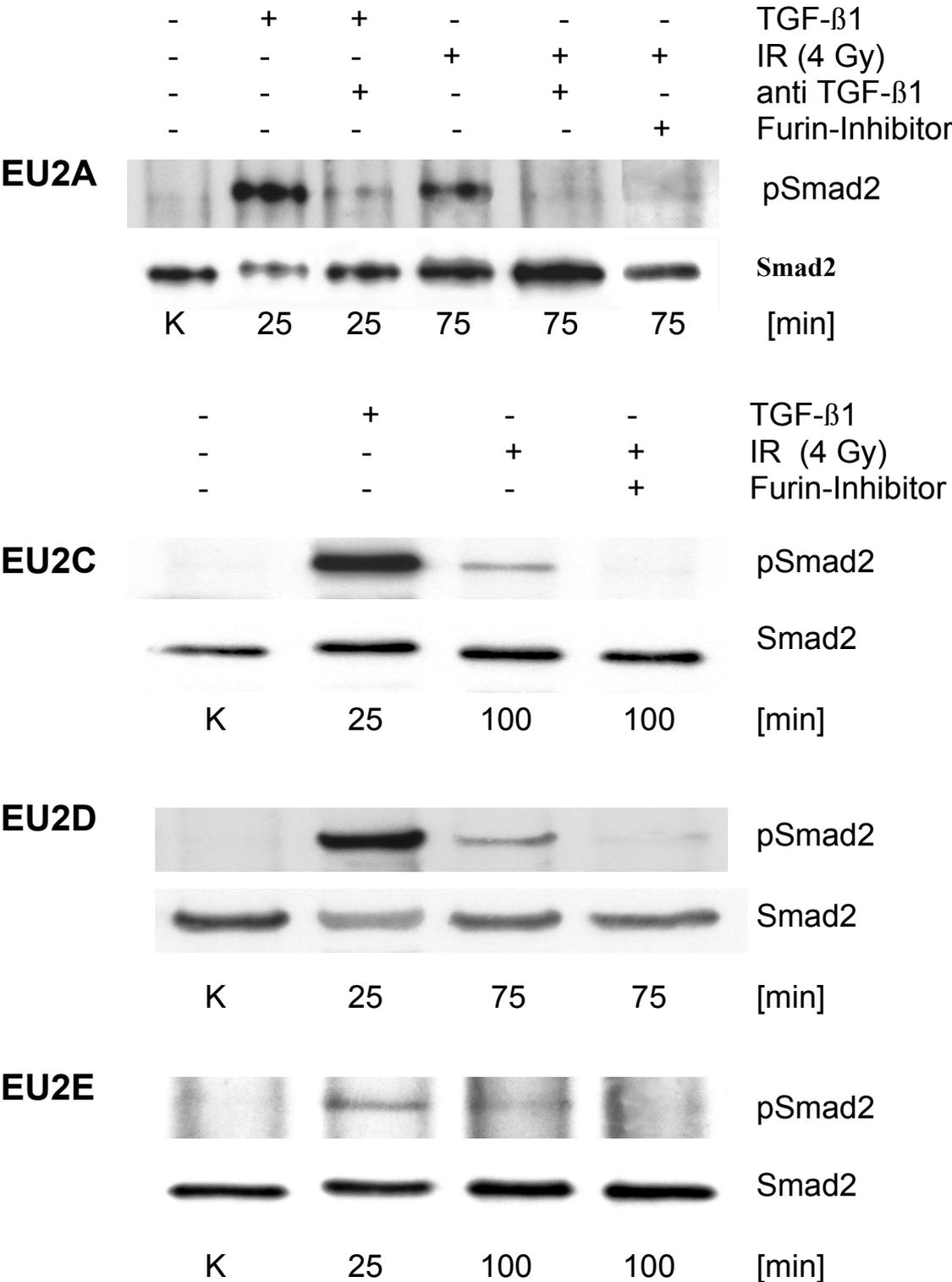
**Abb. 18:** Smad2-Phosphorylierung in den Zellstämmen EU2A und EU2E verschiedene Zeiten nach Bestrahlung mit 4 Gy (n = 2)

### 3.6.3 TGF-β1 abhängige Smad2-Phosphorylierung nach Bestrahlung

Um die Frage zu klären, ob die nach Bestrahlung gefundene Phosphorylierung von Smad2 auf eine Aktivierung von TGF-β1 zurückzuführen ist, wurde das gleiche Experiment wie zuvor durchgeführt, aber diesmal wurde entweder zwei Stunden vor der Bestrahlung der spezifische Inhibitor für Furin, der schon in 3.5.3 verwendet wurde oder direkt davor ein Neutralisierungsantikörper gegen TGF-β1 (nur beim Zellstamm EU2A) in das Medium der Fibroblasten gegeben.

In Abb. 19 sieht man die Ergebnisse der verschiedenen Western-Blots. Bei allen Zellstämmen ist ein starkes Signal für aktiviertes Smad2 nach der Behandlung mit TGF-β1 zu beobachten. Nach Bestrahlung ist ebenfalls bei allen Zellstämmen phosphoryliertes Smad2 zu erkennen,

was aber durch die Behandlung mit dem Furin-Inhibitor und beim Zellstamm EU2A mit Hilfe des Antikörpers gegen TGF- $\beta$ 1 auf Kontrollniveau reduziert wird.



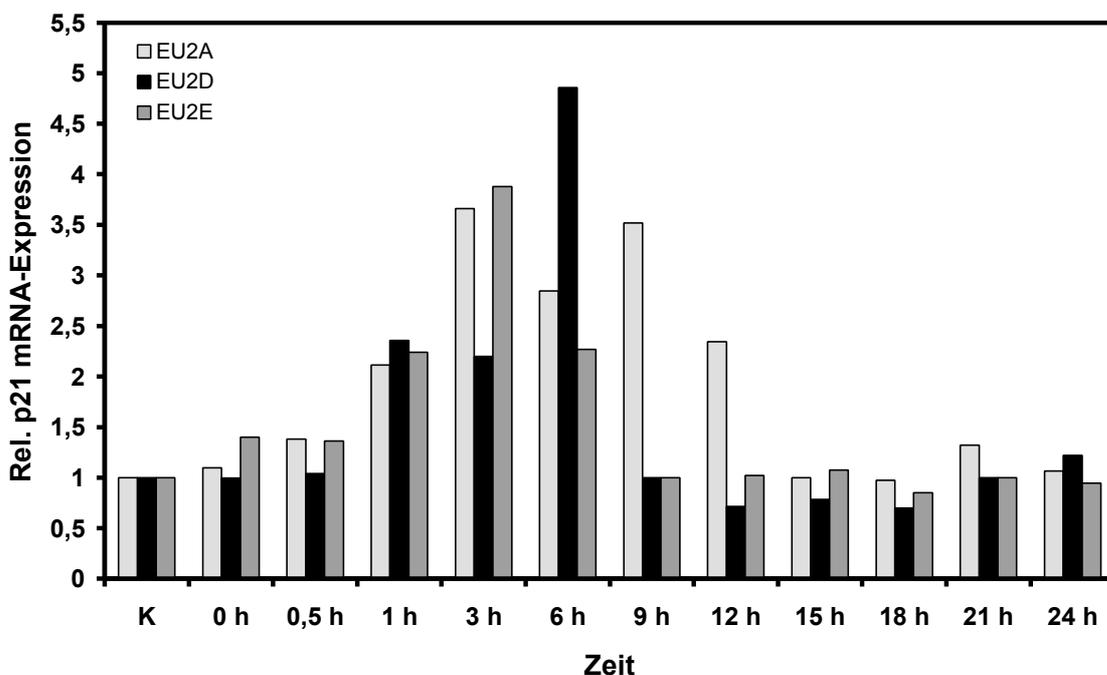
**Abb. 19:** TGF- $\beta$ 1-abhängige Phosphorylierung von Smad2 in verschiedenen Zellstämmen nach Bestrahlung mit 4 Gy (n = 1)

### 3.7 Expression des Zellzyklus-Regulatorproteins p21 in den Fibroblastenzellstämmen nach Bestrahlung

Die nach Bestrahlung zu beobachtende Arretierung von Zellen in der G1-Phase ist u.a. auf eine Induktion des Cdk-Inhibitors p21 zurückzuführen. Neben der direkten Regulation des p21-Promotors durch p53 als Transkriptionsfaktor wird auch TGF- $\beta$ 1 (über die Smad-Proteine) als p53-unabhängiger Regulator von p21 diskutiert. Deshalb wurde die p21-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nach Bestrahlung untersucht.

#### 3.7.1 p21 mRNA-Expression nach Photonenbestrahlung

Es wurde die Expression des p21-Transkripts verschiedene Zeiten nach Bestrahlung mittels PCR analysiert. Dazu wurden semikonfluente Fibroblastenkulturen mit 4 Gy bestrahlt und unterschiedliche Zeiten danach die Zellen für die RNA-Isolierung lysiert. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels Light-Cycler und spezifischen p21-Primern die Expression von p21 analysiert. Die so erhaltenen Daten für die Zellstämme EU2A, EU2D und EU2E sind in Abb. 20 dargestellt.



**Abb. 20:** Induktion der p21 mRNA in verschiedenen Zellstämmen nach Photonenbestrahlung mit 4 Gy (n = 1)

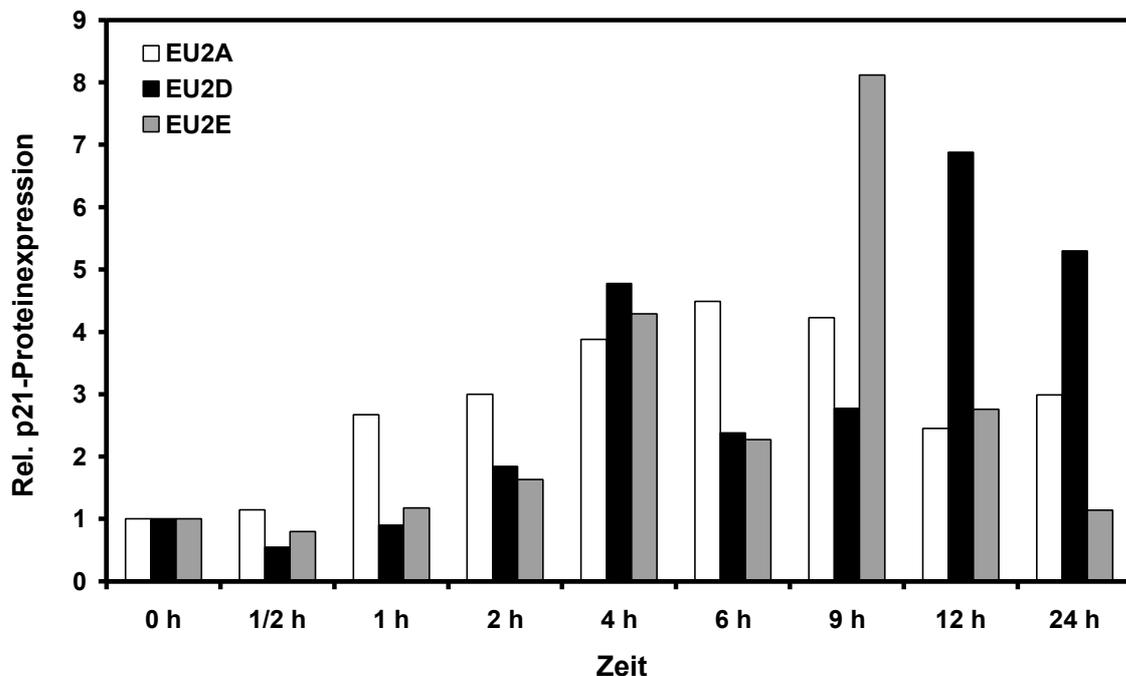
Bei allen Zellstämmen ist schon eine Stunde nach Bestrahlung eine über zweifach erhöhte Expression der p21 mRNA zu erkennen, die sogar bis drei Stunden (bei EU2A und EU2E) bzw. sechs Stunden (bei EU2D) nach Bestrahlung weiter ansteigt. Auffällig ist, dass bei den Zellstämmen EU2D und EU2E ab neun Stunden nach der Bestrahlung keine p21-Induktion mehr vorhanden ist, während sie beim Zellstamm EU2A noch bis 12 Stunden danach anhält.

### 3.7.2 Proteinexpression von p21 nach Bestrahlung

Um den zeitlichen Verlauf der Proteinexpression von p21 nach Bestrahlung zu untersuchen, wurden unterschiedliche semikonfluente Fibroblastenzellstämme mit 4 Gy bestrahlt und nach verschiedenen Zeiten die Proteinisolierung vorgenommen. Für den anschließenden Western-Blot wurden jeweils 100 µg Protein auf ein 12 %-iges SDS-Gel aufgetragen.

#### 3.7.2.1 p21-Proteinexpression in verschiedenen Fibroblastenzellstämmen nach Photonenbestrahlung

In Abb. 21 ist die Zeitkinetik der Proteinexpression von p21 in den Zellstämmen EU2A, EU2D und EU2E nach Bestrahlung mit 4 Gy dargestellt.



**Abb. 21:** Zeitkinetik der Proteinexpression von p21 in verschiedenen Zellstämmen nach Photonenbestrahlung mit 4 Gy (n = 2)

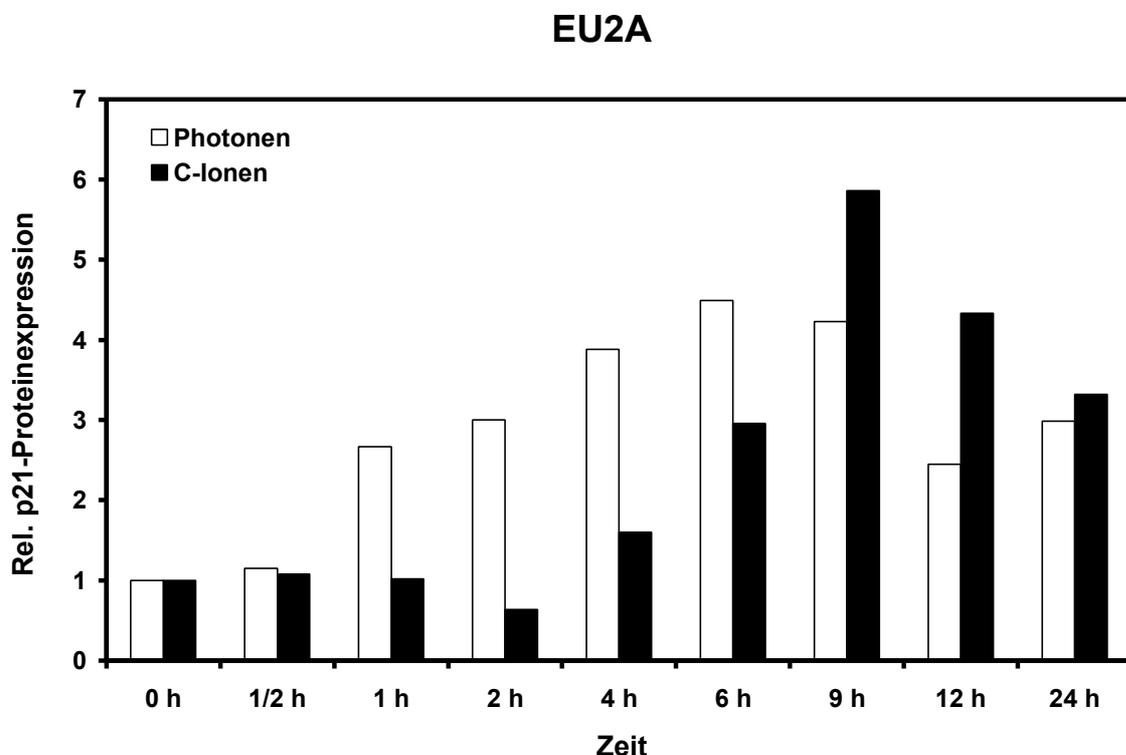
Bei allen Zellstämmen ist eine deutliche Induktion von p21 vier Stunden nach Bestrahlung zu beobachten, wobei allerdings beim Zellstamm EU2A schon nach einer Stunde die p21-Expression erhöht ist. Auffällig ist, dass der p21-Level bei den Zellstämmen EU2D und EU2E nach 9 bzw. 12 Stunden weiter ansteigt, während er sich beim Zellstamm EU2A eher verringert.

### 3.7.2.2 Proteinexpression von p21 nach Photonen- und Schwerionenbestrahlung

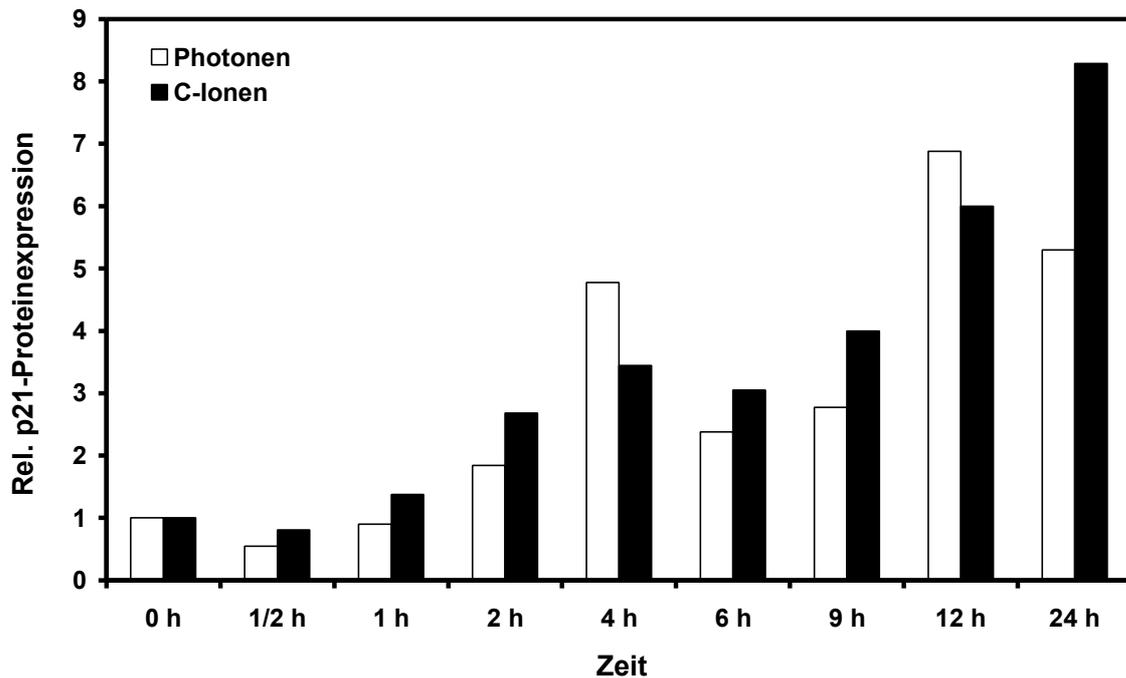
In Abb. 22 sind die Ergebnisse der Western-Blots für die p21-Expression nach Photonen- und Schwerionenbestrahlung für die Zellstämme EU2A, EU2D und EU2E dargestellt.

Während beim Zellstamm EU2D keine großen Unterschiede in der p21-Expression zwischen Photonen- und Schwerionenbestrahlung zu erkennen sind, gibt es bei den Zellstämmen EU2A und EU2E erhebliche Differenzen.

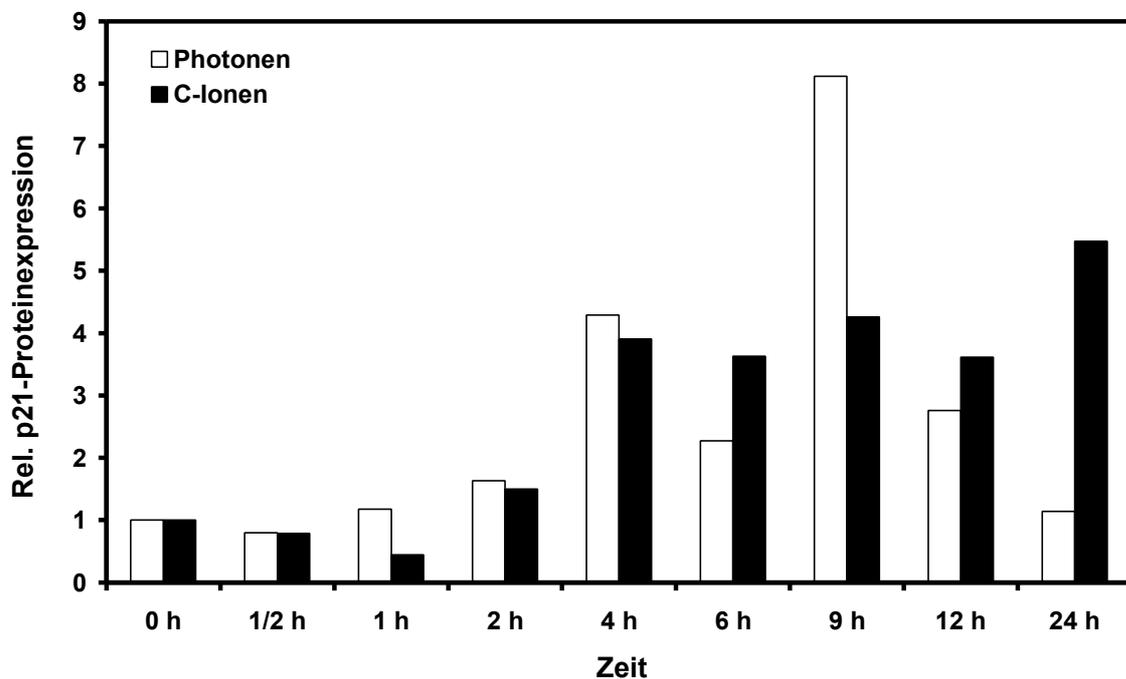
So ist bei EU2A erst sechs Stunden nach Schwerionenbestrahlung eine Induktion von p21 vorhanden, während schon eine Stunde nach Photonenbestrahlung der p21-Level deutlich erhöht ist. Allerdings liegt er bei beiden Strahlenarten auch nach 24 Stunden noch über Kontrollniveau.



## EU2D



## EU2E



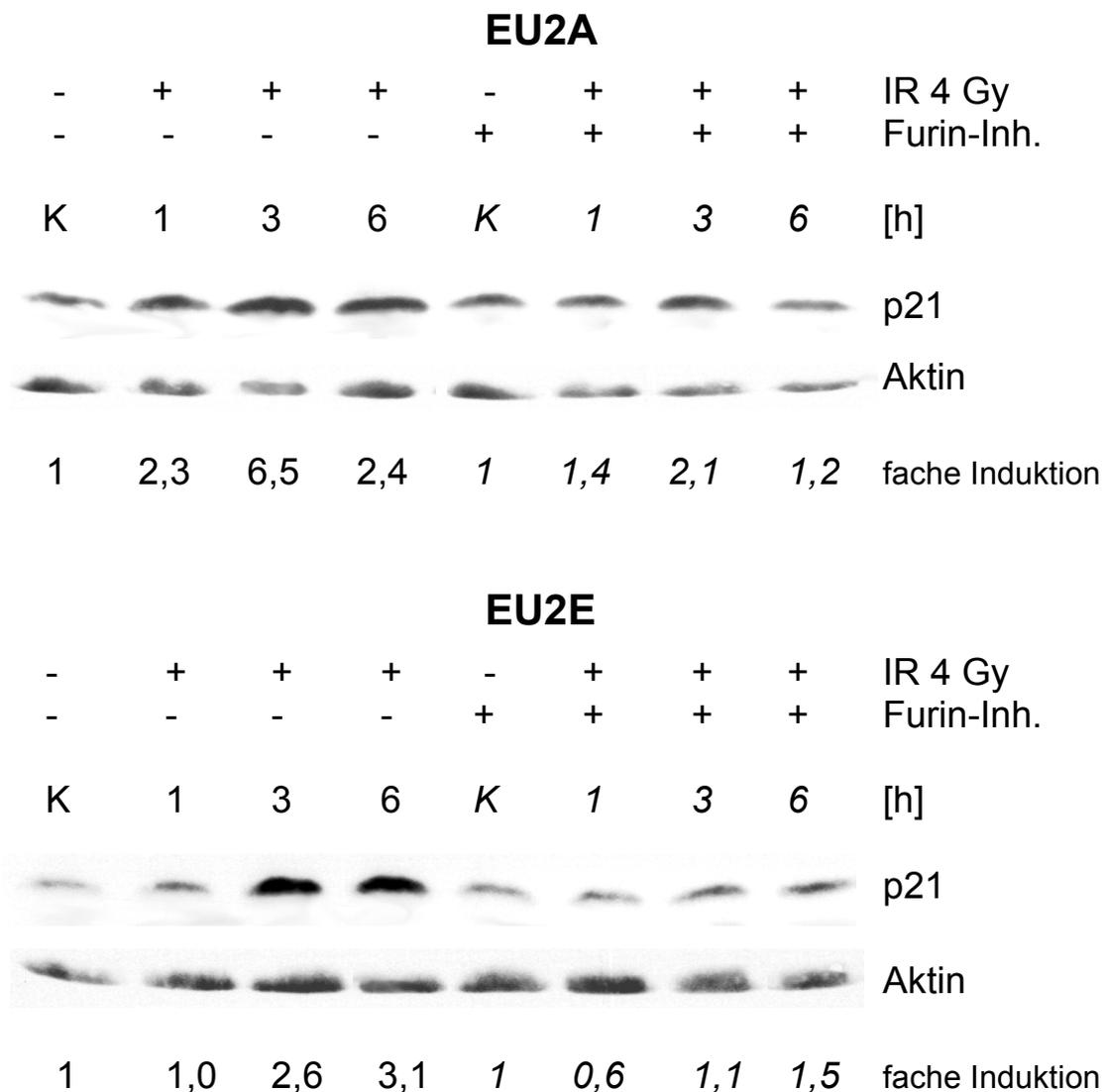
**Abb. 22:** Zeitkinetik der Proteinexpression von p21 in Abhängigkeit von der Strahlenart

Beim Zellstamm EU2E ist der Verlauf der p21-Expression bis vier Stunden nach Bestrahlung in beiden Fällen sehr ähnlich. Aber danach persistiert der Level bei Schwerionenbestrahlung bis 24 Stunden, während er bei Photonenbestrahlung nach 9 Stunden abnimmt.

### 3.7.3 TGF-β1-abhängige Proteinexpression von p21 nach Photonenbestrahlung

Um zu sehen, ob die zu beobachtende Induktion von p21 nach Photonenbestrahlung von TGF-β1 abhängt, wurden die Fibroblasten zwei Stunden vor der Bestrahlung mit dem Furin-Inhibitor behandelt und verschiedene Zeiten nach der Bestrahlung Protein isoliert.

In Abb. 23 sieht man repräsentative Western-Blots der p21-Expression in den Zellstämmen EU2A und EU2E. Bei beiden Zellstämmen ist nach alleiniger Bestrahlung eine starke Induktion von p21 zu erkennen, die bei EU2A schon nach einer Stunde vorhanden ist, während sie bei EU2E erst nach drei Stunden einsetzt. Sowohl bei EU2A als auch EU2E ist der Level nach sechs Stunden noch deutlich erhöht.

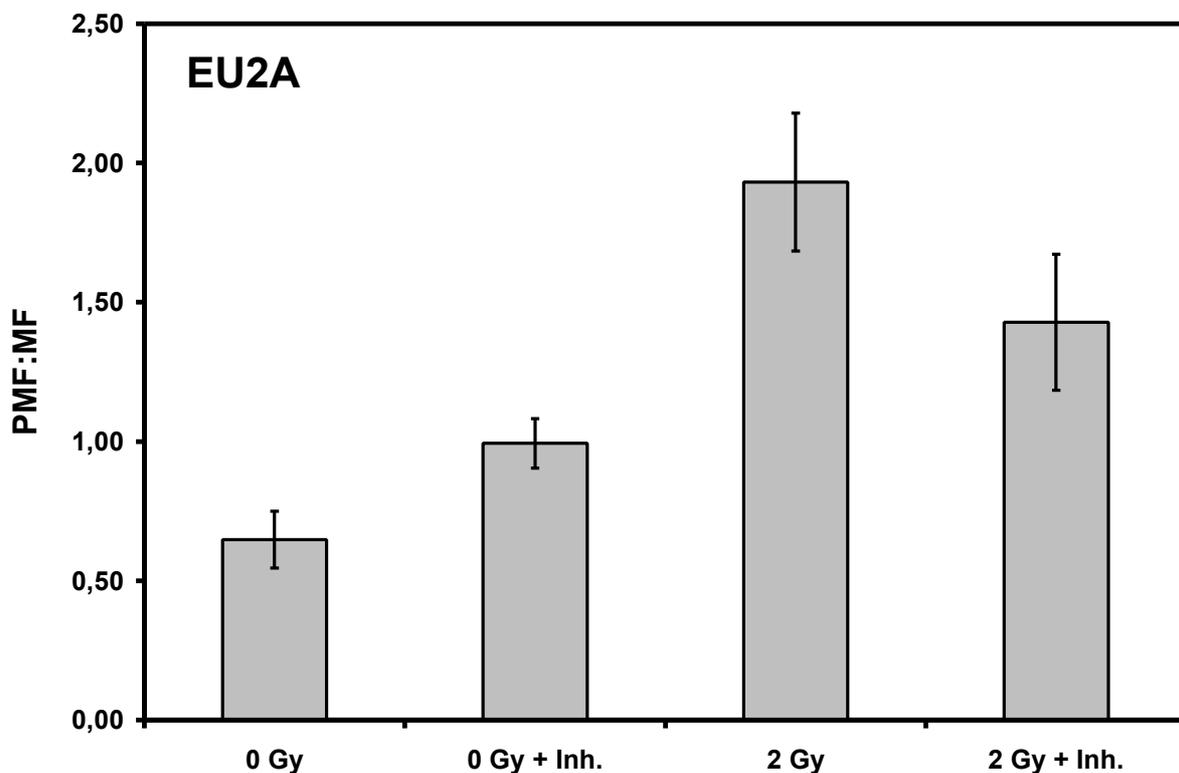


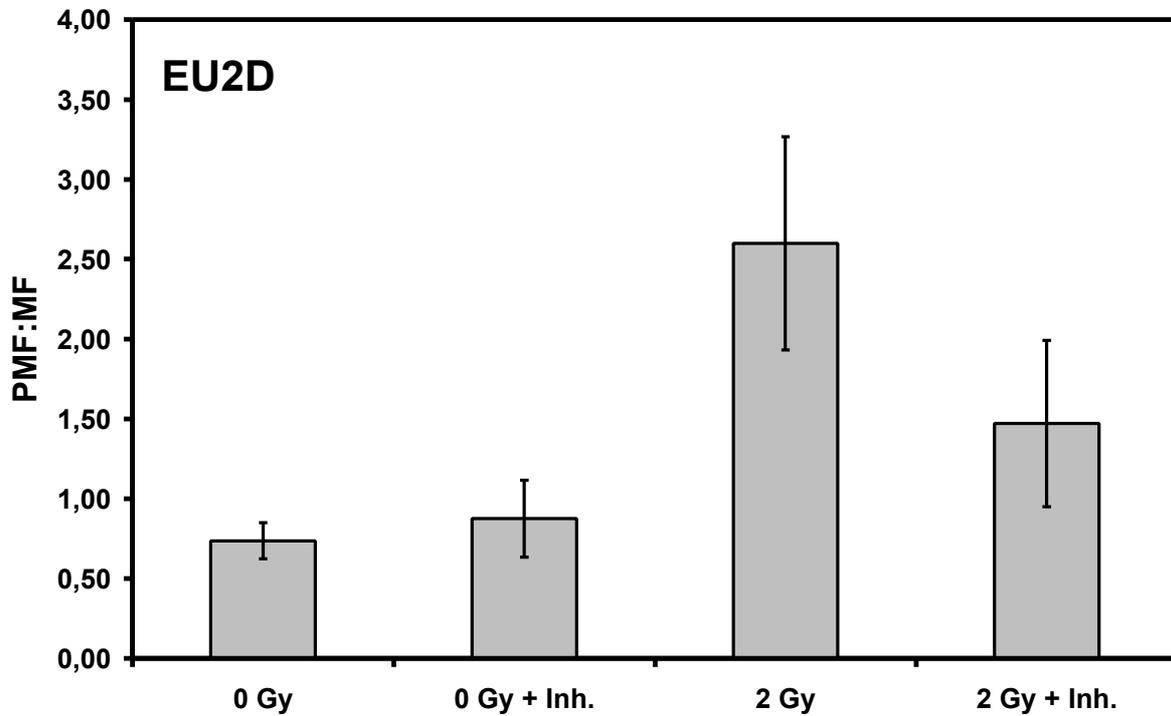
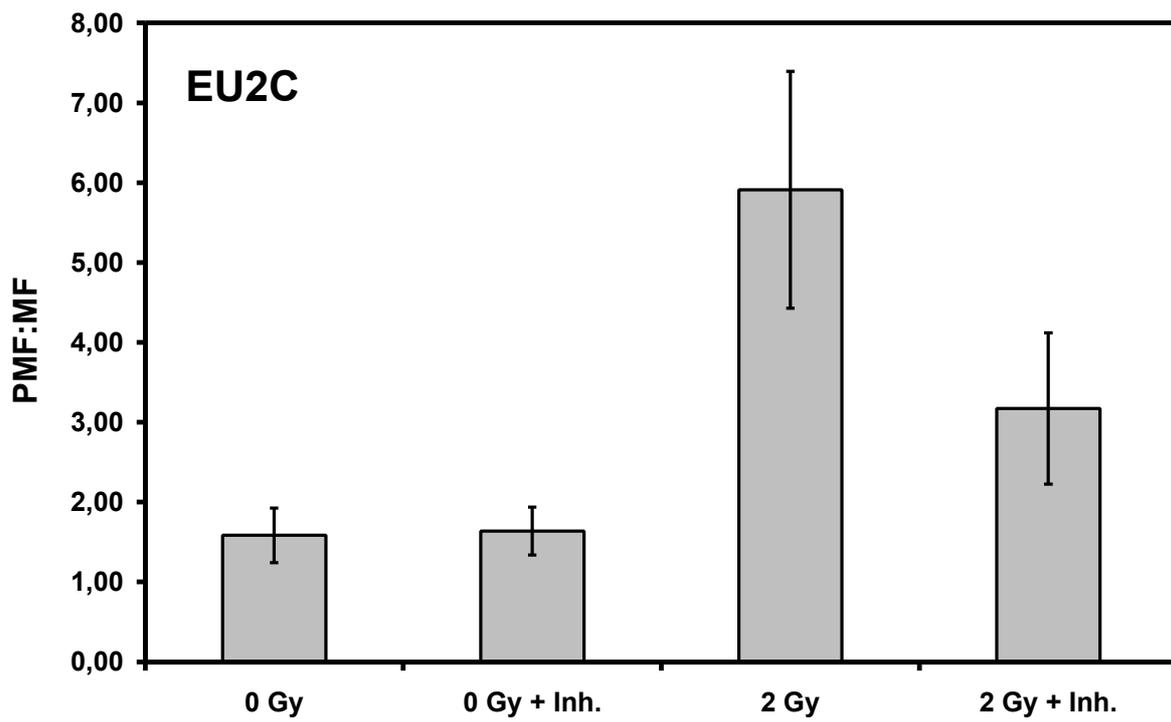
**Abb. 23:** TGF-β1-abhängige p21-Proteinexpression in den Zellstämmen EU2A und EU2E nach Photonenbestrahlung mit 4 Gy (n = 3)

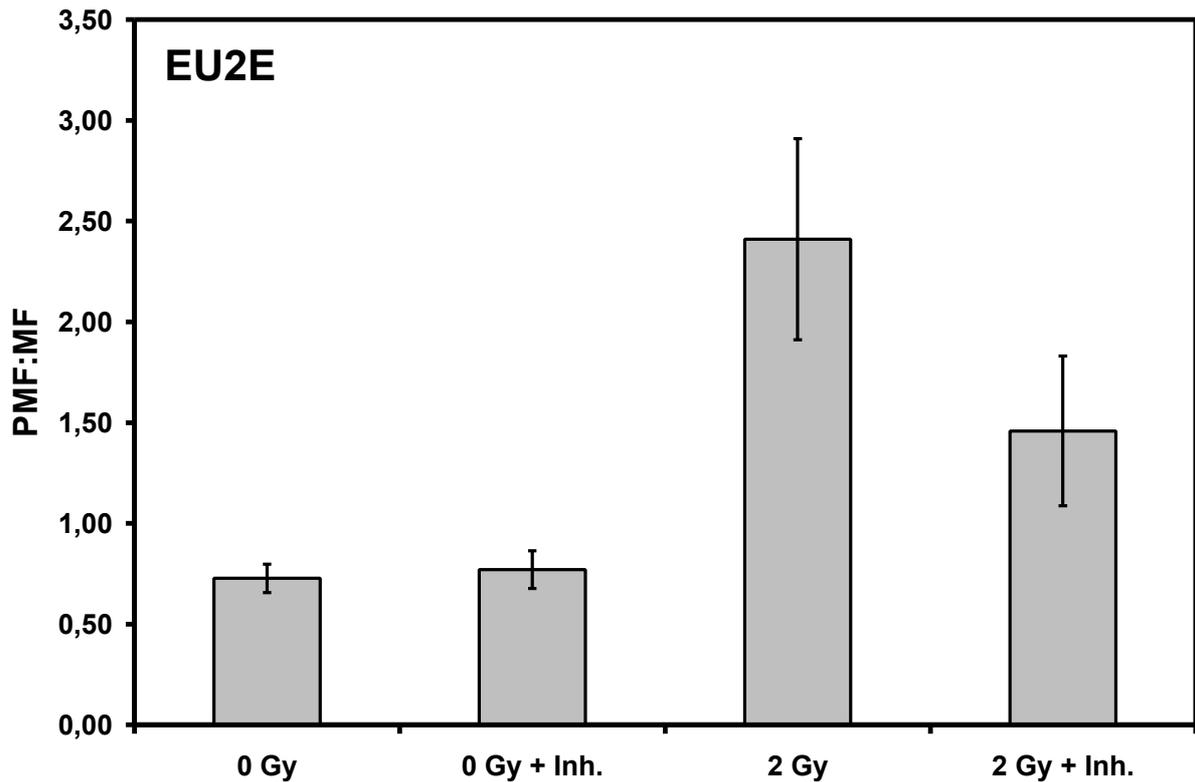
Vergleicht man allerdings die Banden nach Bestrahlung alleine mit den Banden der Proben, die zusätzlich mit dem Furin-Inhibitor behandelt wurden, so sieht man bei allen Zeitwerten bei beiden Zellstämmen eine deutliche Abnahme der p21-Expression. Dies bedeutet, dass die Verhinderung der Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ 1 Komplexes durch den Furin-Inhibitor (vgl. 3.5.3) zu einer Verringerung der p21-Induktion nach Bestrahlung führt. Die verbliebene Induktion ist auf die Regulation von p21 durch p53 zurückzuführen.

### 3.8 Differenzierungsmuster nach Bestrahlung in Abhängigkeit vom Furin-Inhibitor

Um zu sehen, ob TGF- $\beta$ 1 einen Einfluss auf das Differenzierungsmuster der Fibroblastenzellstämme nach Bestrahlung hat, wurden subkonfluente Zellen zwei Stunden und direkt vor der Bestrahlung (2 Gy) mit dem Furin-Inhibitor behandelt und sechs Stunden danach in den Koloniebildungstest ausgesät. Außerdem wurden zur Kontrolle Koloniebildungstests von Zellen ausgesät, die überhaupt nicht behandelt, nur mit dem Furin-Inhibitor behandelt oder nur bestrahlt wurden. Bei der Auswertung der verschiedenen Koloniebildungstests wurde das Differenzierungsmuster analysiert, indem das Verhältnis PMF:MF gebildet wurde. In Abb. 23 sind die Ergebnisse für die Zellstämme EU2A, EU2C, EU2D und EU2E dargestellt.







**Abb. 24:** Differenzierungsmuster (PMF:MF-Verhältnis) verschiedener Zellstämme +/- 2 Gy, +/- Furin-Inhibitor; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten

Vergleicht man die unbestrahlten Proben miteinander, so sieht man nur beim Zellstamm EU2A eine Zunahme des PMF:MF-Verhältnisses, während bei allen anderen die Behandlung mit dem Inhibitor keinen Einfluss hat.

Nach alleiniger Bestrahlung ist bei allen Zellstämmen eine deutliche Verschiebung in Richtung der PMFs zu beobachten. Diese starke Erhöhung des PMF:MF-Verhältnisses lässt sich durch die Behandlung mit dem Furin-Inhibitor bei allen Zellstämmen signifikant verringern. Diese Ergebnisse zeigen, dass der strahleninduzierte Shift im Differenzierungsmuster der Fibroblasten verringert werden kann, indem die Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ 1 mit Hilfe des Furin-Inhibitors verhindert wird.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten die zellulären und molekularen Mechanismen der Induktion des fibrotischen Phänotyps in menschlichen Fibroblastenpopulationen nach Photonen- und Schwerionenbestrahlung analysiert werden.

Das Krankheitsbild der Fibrose als Reaktion des Gewebes auf Bestrahlung wurde für verschiedene Gewebe wie Haut, Lunge, Herz und Leber beschrieben [72,73,74,75]. Durch histologische Studien konnte man feststellen, dass fibrotisches Gewebe infiltrierende, inflammatorische Zellen, Fibroblasten und mehrere verschiedene extrazelluläre Matrixkomponenten enthält. Es wurde eine erhöhte Synthese und Deposition von interstitiellem Kollagen, Fibronektin und Proteoglykanen gefunden [12,76]. Diese Veränderungen wurden als Ergebnis einer strahleninduzierten Modulation des Fibroblastenzellsystems interpretiert [10].

Um die zellulären und molekularbiologischen Mechanismen aufzuklären, die dazu führen, dass normale Fibroblasten sich fibrotischen Veränderungen unterziehen, wurde mit Hilfe zytomorphologischer, biochemischer und molekularbiologischer Marker das Fibroblastenzellsystem des Bindegewebes der Haut, Lunge und Niere von verschiedenen Säugerspezies analysiert. Dabei hat man festgestellt, dass sich das Fibroblastenzellsystem aus dem Stammzellkompartiment, dem Progenitorkompartiment und dem Funktionskompartiment aufbaut. *In vitro* konnte mit etablierten Primär- und Sekundärkulturen gezeigt werden, dass das Progenitorkompartiment aus drei mitotisch aktiven Progenitorfibroblasten MFI, MFII und MFIII und das Funktionskompartiment aus drei postmitotischen Fibrozyten PMFIV, PMFV und PMFVI besteht [14,15,16,17,18]. Die Stammzellen und Fibroblasten des Bindegewebes differenzieren dabei entlang einer terminalen Differenzierungssequenz in die Kompartimente der Fibroblastenstammzellen, der mitotischen Progenitorfibroblasten und der postmitotischen Fibrozyten. Basierend auf Klonierungs- und Subklonierungsexperimente mit Zellen des Progenitorkompartimentes konnte gezeigt werden, dass der Progenitorfibroblast MFI 20-30 Zellteilungen durchläuft, bevor er spontan in den Zelltyp MFII differenziert. Dieser unterliegt 15-20 Zellteilungen und geht dann spontan in den Progenitorfibroblast MFIII über. Der Zelltyp MFIII kann 5 bis 8 Zellteilungen durchlaufen, bevor er in den ersten postmitotischen Zelltyp PMFIV differenziert [22,77].

Eine der spezifischen Funktionen der Progenitorfibroblasten ist die Selbsterneuerung und die Erneuerung des postmitotischen Fibrozytenkompartiments. Das postmitotische Funktionskompartiment selbst stellt das funktionelle Kompartiment des Fibroblasten-/Fibrozyten-Zellsystems dar. Der Zelltyp PMFVI ist der terminal differenzierte Zelltyp des Fibroblasten-

zellsystems. Dieser ist gekennzeichnet durch spezifische Synthesefunktionen für interstitielle Kollagene (Typ I, III, V), andere extrazelluläre Matrixkomponenten, sowie für Zytokine und Wachstumsfaktoren [19,20].

Auf der Basis von *ex vivo*-/*in vitro*-Experimenten mit humanem Hautbiopsiematerial von Spendern verschiedener Altersklassen konnte gezeigt werden, dass *in vivo* ein konstantes Verhältnis von Progenitorfibroblasten (MF) und postmitotischen Fibrozyten (PMF) von 2:1 für die Altersgruppe von 20-80 Jahre besteht [21]. Die Aufrechterhaltung dieses ausgewogenen Verhältnisses von Progenitorfibroblasten zu Fibrozyten scheint für die zelluläre und biochemische Homöostase des Bindegewebes von entscheidender Bedeutung zu sein. Störungen dieser zellulären Homöostase könnten die Ursache für fibrotische Geweberemodellierungen sein [12].

Zellbiologische und biochemische Untersuchungen konnten für das Fibroblasten-/Fibrozyten-Zellsystem belegen, dass terminale Differenzierungsprozesse durch verschiedene Arten elektromagnetischer Strahlung induziert werden [12,18,75]. Insbesondere wurde für ionisierende Strahlung gezeigt, dass Dosen zwischen 0 bis 8 Gy eine frühzeitige terminale Differenzierung innerhalb von 7-21 Tagen induzieren [18,20,22]. Als Konsequenz verändert sich das Verhältnis von Progenitorfibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten signifikant zu Gunsten der biosynthetisch aktiven Fibrozyten, was einem Anstieg der Kollagensynthese um das 7-fache zur Folge hat [20].

Aufgrund dieser Daten kann man schließen, dass durch ionisierende Strahlung eine Veränderung der Zelltypenzusammensetzung des Fibroblasten-/Fibrozyten-Zellsystems induziert wird, welche in einer Veränderung der Gewebekomöostase verschiedener Gewebe resultiert und somit zur Ausbildung des fibrotischen Phänotyps führt.

Für die Durchführung der Experimente der vorliegenden Arbeit wurden acht normale Hautfibroblastenzellstämme von sechs Brustkrebspatientinnen, die einen unterschiedlichen Grad der Fibrosemanifestation nach Strahlentherapie zeigten, verwendet. Die Zellkulturen (EU2A bis EU2H) wurden in der Arbeitsgruppe von C. West (Manchester, England) etabliert und im Rahmen eines EU-Biomed2-Projektes an verschiedene Labors in Europa verteilt. Das Ziel dabei war es mit gleichen Methoden in verschiedenen Labors vergleichende Ergebnisse zu erhalten, die für die Entwicklung eines prädiktiven Tests für die Strahlentherapie von ent-

scheidender Bedeutung sein könnten. Um die Objektivität bei den Experimenten zu gewährleisten, wurden die Zellstämme verschlüsselt mit einem bestimmten Code verteilt.

Um die Strahlensensitivität der acht Hautfibroblastenzellstämme EU2A bis EU2H zu untersuchen, wurden von allen Zellstämmen Dosis-Wirkungskurven erstellt. Es zeigte sich ein typischer Verlauf der Überlebenskurven, deren Daten dem linear-quadratischen Modell angepasst werden konnten. Beim Vergleich der Überlebenskurven der verschiedenen Zellstämme waren deutliche Unterschiede zu erkennen: Die Dosis-Wirkungskurven der Zellstämme EU2A, EU2C und EU2E fallen wesentlich stärker ab, als die der Zellstämme EU2D, EU2F und EU2G, die eine ausgeprägte Schulter im Niedrigdosisbereich aufweisen. Dies resultiert wahrscheinlich aus der Fähigkeit der Zellen, die entstandenen Schäden in diesem Dosisbereich besser reparieren zu können [79]. Die Analyse der SF<sub>2</sub>-Werte, die ein Maß für die Strahlensensitivität darstellen, bestätigt dies: Die Zellstämme EU2A, EU2C und EU2E weisen einen SF<sub>2</sub>-Wert kleiner als 0,3 auf. Deshalb werden diese Zellstämme zu den strahlenempfindlichen Zellstämmen gezählt, während die Zellstämme EU2D, EU2F und EU2G (SF<sub>2</sub> > 0,35) zu den resistenten gehören. Auffallend war auch, dass bei den Zellstämmen EU2A und EU2E bei einer Dosis von 7 Gy keine Kolonien mit mehr als 50 Zellen vorhanden waren. Die beiden Zellstämme EU2B und EU2H sind zu keiner der beiden Gruppen zu zählen, da ihr SF<sub>2</sub>-Wert im mittleren Bereich liegt.

Beim Vergleich der Dosis-Wirkungskurven nach „immediate“- und „delayed-plating“ von Photonen- und Schwerionenbestrahlung waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier untersuchten Zellstämmen nach „immediate-plating“ zu erkennen.

Auch Fournier et al. [80] fanden nur geringe bzw. keine Unterschiede in den Überlebenskurven bei „immediate-plating“ zwischen Röntgen- und Schwerionenbestrahlung von menschlichen Vorhaut- bzw. Schweinehautfibroblasten.

Im Gegensatz dazu waren beim klonogenen Überleben nach „delayed-plating“ bei den Zellstämmen EU2C und EU2E Unterschiede zwischen beiden Strahlenarten vorhanden. So war beim Zellstamm EU2C die Überlebenskurve nach Schwerionenbestrahlung steiler im Vergleich zur Photonenbestrahlung. Beim Zellstamm EU2E war dies genau umgekehrt. Dies bedeutet, dass der Zellstamm EU2E die Strahlenschäden nach Schwerionenbestrahlung besser reparieren kann als der Zellstamm EU2C.

Die beiden Zellstämme EU2A und EU2D zeigten dagegen auch nach „delayed-plating“ keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Strahlenarten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es hinsichtlich der Strahlensensitivität der Fibroblastenzellstämme keine signifikanten Unterschiede zwischen Photonen- und Schwerionenbestrahlung gibt.

Bei der Bestrahlung von Tumorpatienten hat man erhebliche Variationen in der individuellen Reaktion eines Patienten auf Bestrahlung gefunden. Diese Unterschiede sind sehr wahrscheinlich auf eine genetisch determinierte Strahlenempfindlichkeit zurückzuführen [7,8,9]. Deshalb ist ein Ziel der Strahlenbiologie einen prädiktiven Test zu entwickeln, mit dem man zuverlässige Daten hinsichtlich der Strahlenreaktion eines Patienten erhalten könnte.

Als eine Möglichkeit wurde dabei die Korrelation des Fibroserisikos mit der Radiosensitivität von menschlichen Hautfibroblasten angesehen [81,82]. In einer klinischen Studie konnten Peacock et al. [83] allerdings keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Radiosensitivität von Fibroblastenkulturen und der Entwicklung einer Fibrose nach Strahlentherapie nachweisen.

Da der Differenzierungsgrad des Fibroblasten-/Fibrozyten-Zellsystems sämtlicher Bindegewebe aller Körperregionen für jeden Patienten genetisch determiniert ist, und in Abhängigkeit vom Lebensalter deutliche Unterschiede hinsichtlich der Anteile früher bzw. später Progenitorfibroblastentypen bestehen, kann das individuelle Risiko für die Entwicklung und Manifestation einer Fibrose in direktem Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Fibroblasten-/Fibrozyten-Zellsystems eines Patienten gesehen werden. Aus diesem Grund wurde in verschiedenen Studien Unterschiede im Differenzierungsmuster von Fibroblasten mit der Strahlenreaktion der Patienten verglichen.

Herskind et al. [23] haben den Zusammenhang zwischen dem Differenzierungszustand unbehandelter Fibroblastenkulturen von verschiedenen Strahlentherapiepatienten und dem Fibroserisiko untersucht. Dabei fand man eine signifikante Korrelation des L:E-Verhältnisses mit dem individuellen Fibroserisiko.

Mit den gleichen Fibroblastenkulturen wurde in einer weiteren Studie die Veränderung des Differenzierungsmusters nach Röntgenbestrahlung analysiert [24]. Die Ergebnisse zeigen, dass die strahleninduzierte Inaktivierung der Fibroblasten mit einer Zunahme der terminalen Differenzierung begleitet wird. Außerdem ist ein deutlicher Anstieg der Kollagenproduktion nach Bestrahlung zu beobachten. Dies unterstreicht die These, dass die terminale Differenzierung von Fibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten bei der Induktion der radiogenen Fibrose eine entscheidende Rolle spielt.

Diese Ergebnisse wurden von Russell et al. [84], die eine positive Korrelation zwischen dem Entstehen einer strahleninduzierten Fibrose und dem Differenzierungsmuster von patientenspezifischen Fibroblastenkulturen gefunden haben, untermauert.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Differenzierungsmuster der verschiedenen Fibroblastenzellstämme mit Hilfe zweier unterschiedlicher Verfahren analysiert: Es wurde zum einen das Verhältnis der postmitotischen Fibrozyten (PMF) zu den Kolonien der mitotischen Fibroblasten (MF) der unbestrahlten Fibroblastenkulturen und zum anderen das Verhältnis der späten (L) zu den frühen (E) Progenitorfibroblasten vor und nach Bestrahlung bestimmt.

In Tabelle 2 sind die beiden Verhältnisse für die unbestrahlten Fibroblastenzellstämme dargestellt. Vergleicht man diese Werte, so sind deutliche Unterschiede im Differenzierungsmuster zwischen den verschiedenen Zellstämmen zu beobachten.

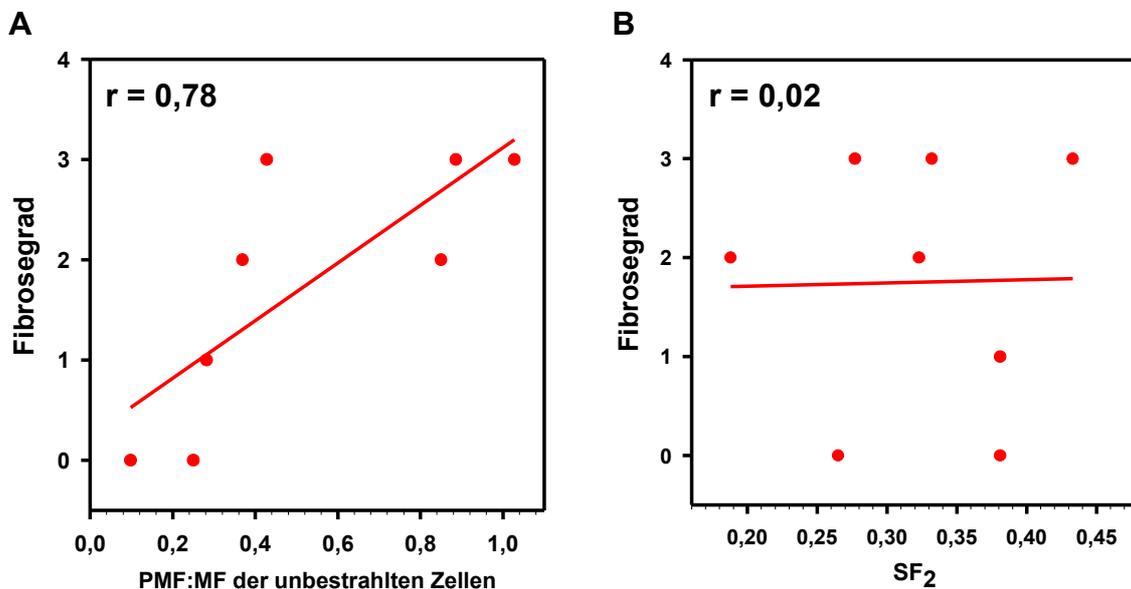
<b>Zellstamm</b>	<b>PMF:MF</b>	<b>L:E</b>	<b>LENT-SOMA</b>	<b>Fibrosegrad</b>
<i>EU2A</i>	0,85	10,81	6	2
<i>EU2B</i>	0,369	2,46	11	2
<i>EU2C</i>	0,428	3,9	16	3
<i>EU2D</i>	0,282	1,51	8	1
<i>EU2E</i>	0,098	3,54	4	0
<i>EU2F</i>	0,25	2,64	4	0
<i>EU2G</i>	1,028	3,24	14	3
<i>EU2H</i>	0,886	1,4	14	3

**Tab. 2:** Vergleich des PMF:MF- bzw. L:E-Verhältnisses der unbestrahlten Zellstämme mit dem LENT-SOMA-Faktor bzw. Fibrosegrad der dazugehörigen Patientin; die Zellstämme EU2E und EU2F bzw. EU2G und EU2H stammen dabei von identischen Patientinnen.

Bei der Analyse des PMF:MF-Verhältnisses der unbestrahlten Fibroblasten wiesen die Zellstämme EU2E und EU2F, die von der selben Patientin stammen, von allen Fibroblasten das kleinste PMF:MF-Verhältnis auf, was sehr gut mit dem geringsten LENT („late effects of normal tissues“)-SOMA („subjective, objective management and analytic categories“)-Wert aller Patientinnen korreliert. Mit dem LENT-SOMA-Wert werden die langfristigen Therapiefolgen in der Onkologie bewertet (kleiner Wert = geringer Grad an Spätfolgen). Die Zell-

stämme EU2A, EU2G und EU2H zeigten einen wesentlich höheren Anteil an PMF-Zellen im Vergleich zu den restlichen Zellstämmen. Vergleicht man die PMF:MF-Verhältnisse der beiden Zellstämmen EU2G und EU2H mit dem LENT-SOMA-Wert der Patientin, so ist auch hier eine sehr gute Übereinstimmung zu erkennen. Dagegen ist die Übereinstimmung des PMF:MF-Verhältnisses mit dem LENT-SOMA-Wert beim Zellstamm EU2A, wie auch beim Zellstamm EU2C (stammt von der Patientin mit dem höchsten LENT-SOMA-Wert), eher gering.

Vergleicht man das PMF:MF-Verhältnis aller Zellstämmen mit dem Fibrosegrad der jeweiligen Patientin (siehe Tab. 2 bzw. Abb. 25), so ist eine gute Korrelation zu erkennen ( $r = 0,78$ ). Dagegen ist beim Vergleich des SF<sub>2</sub>-Wertes mit dem Fibrosegrad (siehe Abb. 25) keine Korrelation festzustellen ( $r = 0,02$ ), was die Studie von Peacock et al. [83] untermauert.



**Abb. 25:** Zusammenhang von Fibrosegrad und PMF:MF-Verhältnis (A) bzw. SF<sub>2</sub>-Wert (B)

Die Untersuchung des Differenzierungsmusters der verschiedenen Zellstämmen vor und nach Bestrahlung anhand des L:E-Verhältnisses ergab eine deutliche Zunahme bei allen Zellstämmen durch die Bestrahlung. Allerdings war der Anstieg bei den Zellstämmen EU2A und EU2C am größten, da bei diesen beiden Zellstämmen nach der Bestrahlung keine frühen Klone mehr nachzuweisen waren. Auffallend war auch das große L:E-Verhältnis von EU2A schon vor der Bestrahlung, wie auch bei der Analyse des PMF:MF-Verhältnisses. Allerdings lag der LENT-SOMA-Wert und der Fibrosegrad bei diesem Zellstamm im mittleren Bereich und korreliert somit in beiden Fällen nicht mit dem Differenzierungsmuster. Dagegen ist der

starke Anstieg beim Zellstamm EU2C in sehr guter Übereinstimmung mit dem größten LENT-SOMA-Wert aller Patientinnen.

Die Zellstämme EU2D und EU2H wiesen das kleinste L:E-Verhältnis vor der Bestrahlung auf. Betrachtet man allerdings die Zunahme des L:E-Verhältnisses durch die Bestrahlung, so erkennt man beim Zellstamm EU2H einen wesentlich stärkeren Anstieg als bei EU2D. Dies korreliert gut mit dem höheren Fibrosegrad der Patientin, die dem Zellstamm EU2H zuzuordnen ist. Die geringe Zunahme des L:E-Verhältnisses beim Zellstamme EU2D, wie auch beim Zellstamm EU2E (Zellstamm mit dem kleinsten PMF:MF-Verhältnis), durch die Bestrahlung stimmt sehr gut mit dem geringen Fibrosegrad der zugehörigen Patientinnen überein.

Dagegen waren bei den Zellstämmen EU2F und EU2G nur geringe Unterschiede im L:E-Verhältnis zu beobachten, obwohl EU2F zu einer Patientin mit geringem Fibrosegrad gehört, während EU2G von einer Patientin mit einem hohen Grad der Fibrose stammt.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Analyse des Differenzierungsmusters in dieser und in früheren Arbeiten zeigen, dass das PMF:MF-Verhältnis sehr wahrscheinlich gute Möglichkeiten bieten könnte, Voraussagen über das Fibrosierisiko von Bestrahlungspatienten zu treffen. Um diese These zu bestätigen sind allerdings weitere Studien notwendig.

Mehrere Untersuchungen in den letzten Jahren untermauern die These, dass die strahleninduzierte Fibrose durch das Zytokin TGF- $\beta$ 1 vermittelt wird. TGF- $\beta$ 1 stimuliert die Expression extrazellulärer Matrixproteine und wird *in vivo* durch ionisierende Strahlung induziert [32,42,85]. Martin et al. [86] fanden eine deutlich erhöhte TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression in der Schweinehaut sechs Stunden nach Bestrahlung.

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 wahrscheinlich bei der Induktion der terminalen Differenzierung von Fibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten entscheidend beteiligt ist [13,20,25].

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Genexpression von TGF- $\beta$ 1 in verschiedenen Fibroblastenzellstämmen sechs Stunden nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen untersucht. Dabei konnte nur ein geringer Anstieg der mRNA-Gehalte festgestellt werden. Bei den Zellstämmen war das Maximum der mRNA-Expression schon bei einer Dosis von 1 bis 2 Gy erreicht und stieg mit zunehmenden Dosen nicht weiter an.

Auch verschiedene Zeiten (3-24 Stunden) nach Bestrahlung mit 2 Gy konnte kein größerer Anstieg in der Genexpression von TGF- $\beta$ 1 festgestellt werden.

Der Vergleich von Photonen- und Schwerionenbestrahlung ergab ebenfalls nur geringe Unterschiede in der TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression.

Diese und andere Ergebnisse [42,87] lassen vermuten, dass nicht die transkriptionelle Regulation von TGF- $\beta$ 1, sondern die Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ 1 Komplexes die entscheidende Rolle nach Bestrahlung spielt. Diese Theorie wird von Seong et al. [88] unterstützt, die zwar einen deutlichen Anstieg der TGF- $\beta$ 1 Genexpression in der Rattenleber fanden, allerdings erst ab fünf Tagen nach der Bestrahlung. Diese relativ späte Induktion der TGF- $\beta$ 1 Genexpression lässt vermuten, dass das extrazellulär verbrauchte latente TGF- $\beta$ 1 durch Aktivierung der Transkription wieder nachgeliefert wird.

Deshalb wurde als nächstes der Gesamtgehalt von TGF- $\beta$ 1 im Zellkulturüberstand verschiedener Fibroblastenzellstämme unterschiedliche Zeiten nach Bestrahlung analysiert.

Hierbei zeigte sich bei allen untersuchten Zellstämmen ein erhöhter TGF- $\beta$ 1 Gehalt nach Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Im Gegensatz zum Zellstamm EU2C stieg der Level von TGF- $\beta$ 1 bei den restlichen Zellstämmen bis 96 Stunden nach Bestrahlung an. Auffällig war, dass die Zunahme beim Zellstamm EU2A bis 72 Stunden kontinuierlich war, während sie bei den Zellstämmen EU2D und EU2E erst nach 24 bzw. 36 Stunden zu beobachten war. Auch Hakenjos et al. [25] fanden 48 Stunden nach Bestrahlung einen erhöhten Gehalt an TGF- $\beta$ 1 im Medium von Rattenlungenfibroblasten.

Bei der Bestimmung des Gehalts von TGF- $\beta$ 1 mittels ELISA im Kulturmedium der Fibroblasten kann nicht zwischen latentem und aktivem TGF- $\beta$ 1 unterschieden werden, da das latente TGF- $\beta$ 1 in den Mediumproben durch Ansäuern in aktives umgewandelt wird. Da nur aktives TGF- $\beta$ 1 an seinen spezifischen Rezeptor II in der Zellmembran binden kann und dadurch die Signalkaskade ausgelöst wird, ist die Aktivierung von latentem TGF- $\beta$ 1 im Überstand der Zellen von entscheidender Bedeutung. Barcellos-Hoff et al. [42] konnten erhöhte Level an aktivem TGF- $\beta$ 1 schon eine Stunde nach Bestrahlung in der Brustdrüse von Mäusen nachweisen.

Als Aktivierungsmechanismus wird dabei vor allem die proteolytische Abspaltung des LAP vom latenten TGF- $\beta$ 1 Komplex diskutiert [38,45]. Vor allem die Proteasen Plasmin [39] und Furin [44,47] scheinen an dieser Spaltung beteiligt zu sein.

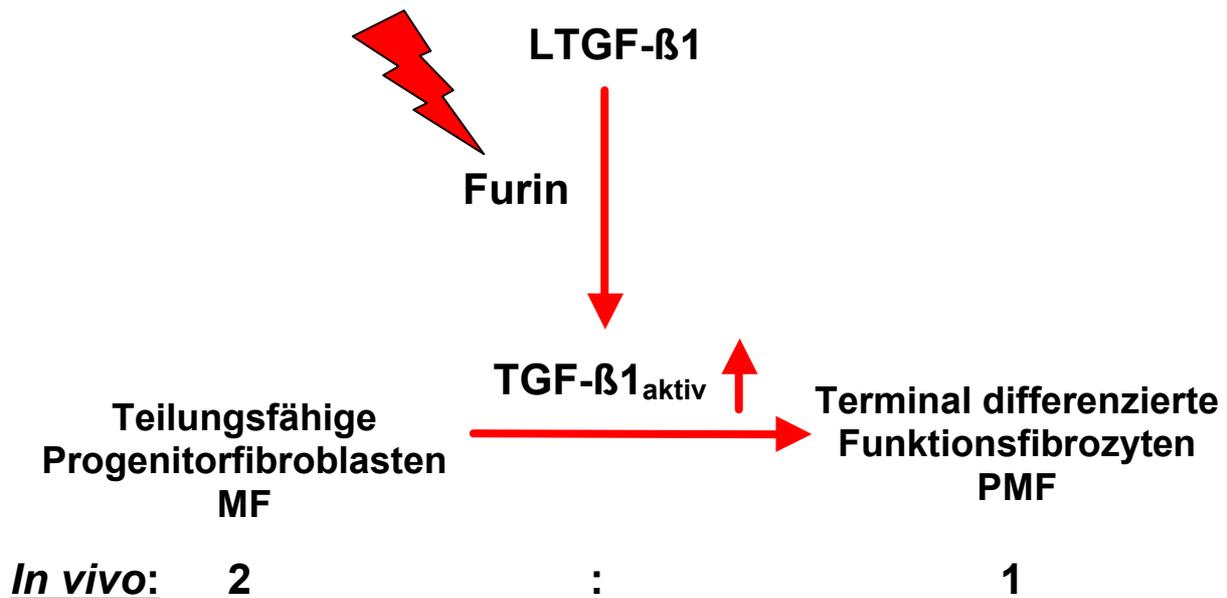
In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung von latentem TGF- $\beta$ 1 nach Bestrahlung verschiedener Zellstämmen untersucht.

Eine Zeitkinetik nach Photonenbestrahlung der Zellstämme EU2A und EU2E zeigte einen deutlichen Anstieg von aktivem TGF- $\beta$ 1 im Mediumüberstand des Zellstammes EU2A bis 60 Minuten nach Bestrahlung. Beim Zellstamm EU2E war ebenfalls eine Erhöhung des Gehalts an aktivem TGF- $\beta$ 1 zu beobachten. Allerdings war die Induktion bei EU2E (1,8 fach) nicht so groß wie bei EU2A (2,8 fach). Dieser Unterschied könnte mit dem Differenzierungszustand der Zellstämme erklärt werden. Sowohl das PMF:MF- als auch das L:E-Verhältnis des unbestrahlten Zellstammes EU2A ist vier- bzw. dreimal größer als die entsprechenden Verhältnisse beim Zellstamm EU2E. Auch die Zunahme des L:E-Verhältnisses nach Bestrahlung ist beim Zellstamm EU2A, bei dem nach Bestrahlung nur noch späte Klone vorhanden waren, wesentlich höher. Dies könnte somit ein Hinweis auf den Zusammenhang zwischen terminaler Differenzierung (Verschiebung des Differenzierungsmuster) der Fibroblastenzellstämme und der Aktivierung von latentem TGF- $\beta$ 1 nach Bestrahlung geben.

Um den Aktivierungsprozess von TGF- $\beta$ 1 nach Bestrahlung genauer zu analysieren, wurde untersucht, ob die Protease Furin an diesem Prozess beteiligt ist. Dazu wurde ein spezifischer Inhibitor gegen Furin in das Medium vor der Bestrahlung gegeben und wie zuvor der Level an aktivem TGF- $\beta$ 1 unterschiedliche Zeiten nach Bestrahlung bestimmt. Dabei war eine deutliche Verringerung von aktivem TGF- $\beta$ 1 durch die Behandlung mit dem Furin-Inhibitor im Vergleich zu den unbehandelten Proben zu erkennen. Dieses Ergebnis gibt deutliche Hinweise auf die Beteiligung der Protease Furin bei der Aktivierung von latentem TGF- $\beta$ 1 nach Photonenbestrahlung.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist in Abb. 26 der mögliche Mechanismus, der zur Induktion der terminalen Differenzierung von Progenitorfibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten nach Bestrahlung führt, dargestellt. Dabei wird das *in vivo* konstante Verhältnis von Progenitorfibroblasten zu Funktionsfibrozyten von 2:1 durch das durch Bestrahlung aktivierte TGF- $\beta$ 1 in Richtung der Fibrozyten verschoben. An der Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ 1 Komplexes ist die Protease Furin sehr wahrscheinlich entscheidend beteiligt.

Nach seiner Aktivierung bindet TGF- $\beta$ 1 an den spezifischen Rezeptor II in der Zellmembran. Durch darauffolgendes Dimerisieren der beiden Rezeptoren I und II entsteht ein heteromerer Komplex [51]. Dadurch werden in der Zelle die beiden R-Smads, Smad2 und Smad3, durch Phosphorylierung aktiviert [53].



**Abb. 26:** möglicher Mechanismus der Induktion der terminalen Differenzierung nach Bestrahlung

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Aktivierung von Smad2 sowohl nach TGF-β1 Behandlung als auch nach Photonenbestrahlung in verschiedenen Fibroblastenzellstämmen nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung durch exogenes TGF-β1 war dabei deutlich stärker und geschah auch schneller als die Aktivierung durch Bestrahlung.

Eine Phosphorylierung von Smad3 konnte nicht gezeigt werden. Dies lag vermutlich am unspezifischen Antikörper (für Phospho-Serin), der zum Nachweis der Phosphorylierung verwendet wurde.

Durch Zugabe von TGF-β1 in das serumfreie Medium der Fibroblasten war phosphoryliertes Smad2 bei allen untersuchten Zellstämmen schon nach 5 bis 15 Minuten nachzuweisen. Die maximale Aktivierung war nach ca. 25 Minuten erreicht. Auch Poncelet et al. [89] fanden eine Aktivierung von Smad2 und auch Smad3 in normalen menschlichen Nierenzellen nach 15-minütiger TGF-β1 Behandlung.

Nach Photonenbestrahlung war die Smad2-Aktivierung deutlich schwächer als nach TGF-β1 Behandlung. Auffällig war auch, dass bei EU2A die Aktivierung etwa 15 bis 20 Minuten früher als bei EU2E zu beobachten war. Die Phosphorylierung von Smad2 nach Bestrahlung ist sehr wahrscheinlich auf eine Aktivierung des latenten TGF-β1 Komplexes durch Furin zurückzuführen, da sich bei allen untersuchten Zellstämmen (EU2A, EU2C, EU2D und EU2E) das Signal für phosphoryliertes Smad2 durch Vorbehandlung mit dem spezifischen

Inhibitor gegen Furin und beim Zellstamm EU2A auch mit einem Antikörper für TGF- $\beta$ 1 bis auf Kontrollniveau reduzieren ließ. Die zeitlich verzögerte Smad2-Aktivierung nach Bestrahlung gegenüber TGF- $\beta$ 1 Behandlung könnte damit erklären werden, dass nach Bestrahlung zunächst die Protease Furin aktiviert werden muss, bevor latentes TGF- $\beta$ 1 aktiviert werden kann.

Bei allen Experimenten, bei denen das extrazellulär aktivierte TGF- $\beta$ 1 nach Bestrahlung direkt oder indirekt (Smad-Phosphorylierung) nachgewiesen wurde, war es von entscheidender Bedeutung, dass der Mediumüberstand der Fibroblastenkulturen während der Bestrahlung unverändert blieb.

Da für Schwerionenbestrahlung aufgrund des waagerechten Ionenstrahls die Kulturflaschen nur aufrecht stehend bestrahlt werden konnten und sie deshalb komplett mit Medium aufgefüllt werden mussten, konnten die Experimente für die Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 und Phosphorylierung von Smad2 nach Schwerionenbestrahlung nicht durchgeführt werden.

Nach Aktivierung bilden die R-Smads zusammen mit dem Co-Faktor Smad 4 einen heteromeren Komplex und werden in den Zellkern eingeschleust [60]. Dort regulieren sie durch Bindung an spezifische Promotor-Sequenzen zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren die Genexpression wichtiger zellzyklus-regulatorischer Proteine [90,91,92,93].

Feng et al. [91] konnten zeigen, dass ein heteromerer Komplex aus Smad2, 3 und 4 an der transkriptionellen Aktivierung von p15 beteiligt ist. Während dabei Smad3 direkt an den p15 Promotor bindet, benötigen Smad2 und Smad4 dazu den Transkriptionsfaktor Sp1, der ohne Stimuli durch konstitutive Wechselwirkung mit dem Promotor für eine basale Genexpression sorgt.

Wie mehrere Arbeiten [93,94,95,96] zeigen ist dieser Transkriptionsfaktor zusammen mit Smad-Proteinen auch an der p53-unabhängigen Regulation von p21 durch TGF- $\beta$ 1 beteiligt. Dagegen wird angenommen, dass die strahleninduzierte Arretierung in der G1-Phase durch die p53-abhängige Aktivierung von p21 vermittelt wird [97]. Cordenonsi et al. [98] konnten allerdings nachweisen, dass p53 und Smad-Proteine wahrscheinlich gemeinsam an der Regulation verschiedener Gene, u.a. auch p21, beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die p21-Expression nach Bestrahlung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in verschiedenen Fibroblastenzellstämmen (EU2A, EU2D und EU2E) untersucht. Dabei zeigte sich, dass schon eine Stunde nach Photonenbestrahlung die Genexpression von 21 induziert wird. Der hohe p21-Level persistiert bei den Zellstämmen EU2D und EU2E bis sechs Stunden und beim Zellstamm EU2A bis 12 Stunden nach Be-

strahlung. Namba et al. [97] fanden in menschlichen Schilddrüsenzellen eine erhöhte p21-mRNA-Expression von 2 bis 48 Stunden nach Bestrahlung.

Auf Proteinebene waren gewisse Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellstämmen festzustellen. So war zwar bei allen drei Zellstämmen vier Stunden nach Bestrahlung die p21-Expression um das Vierfache gegenüber der Kontrolle erhöht, allerdings stieg der p21-Level beim Zellstamm EU2A im Gegensatz zu den anderen Zellstämmen schon nach einer Stunde an. Außerdem war auffällig, dass sich der erhöhte p21-Level bei EU2A nach 9 Stunden eher verringert, während er bei EU2D nach 12 und bei EU2E nach 9 Stunden nochmals deutlich ansteigt.

Beim Vergleich von Photonen- und Schwerionenbestrahlung bezüglich der p21-Proteinexpression ergaben sich beim Zellstamm EU2D kaum Unterschiede. Dagegen war beim Zellstamm EU2A eine zeitlich verzögerte p21-Expression nach Schwerionenbestrahlung zu beobachten. Beim Zellstamm EU2E sind erst sechs Stunden nach der Bestrahlung Unterschiede zu erkennen. Während der hohe p21-Level bei Schwerionenbestrahlung bis 24 Stunden persistierte, stieg er bei Photonenbestrahlung nach 9 Stunden nochmals an und nahm dann kontinuierlich ab.

Um zu analysieren, welche Rolle TGF- $\beta$ 1 bei der Regulation von p21 nach Bestrahlung spielt, wurden die Fibroblasten vor der Bestrahlung mit dem Furin-Inhibitor behandelt. Dabei zeigte sich, dass der erhöhte Level von p21 nach Bestrahlung durch Behandlung mit dem Inhibitor deutlich abnimmt. Da mit Hilfe des Inhibitors sowohl die Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 als auch die Phosphorylierung von Smad2 reduziert werden kann, ist es sehr wahrscheinlich, dass der TGF- $\beta$ 1/Smad-Signalweg bei der Induktion von p21 nach Bestrahlung entscheidend beteiligt ist. Die auch bei Behandlung mit dem Inhibitor zu beobachtende p21-Expression ist vermutlich auf die Aktivierung durch p53 zurückzuführen.

Neueste Untersuchungen [56,99] zeigen, dass auch der MAPK-Signalweg bei der Regulation von p21 durch TGF- $\beta$ 1 beteiligt ist.

So konnten Kim et al. [99] die Stabilisierung von p21 durch eine von p38 $\alpha$  und JNK1-vermittelte Phosphorylierung an Serin130 nachweisen. Ungefroren et al. [100] zeigten, dass auch bei der durch TGF- $\beta$ 1 regulierten Genexpression von Biglycan der MKK6-p38 Signalweg „downstream“ vom TGF- $\beta$ 1/Smad-Signalweg benötigt wird. Auch die durch TGF- $\beta$ 1 induzierte Kollagenase3-Expression in menschlichen Zahnfleischfibroblasten wird über den p38 MAPK-Signalweg gesteuert [101].

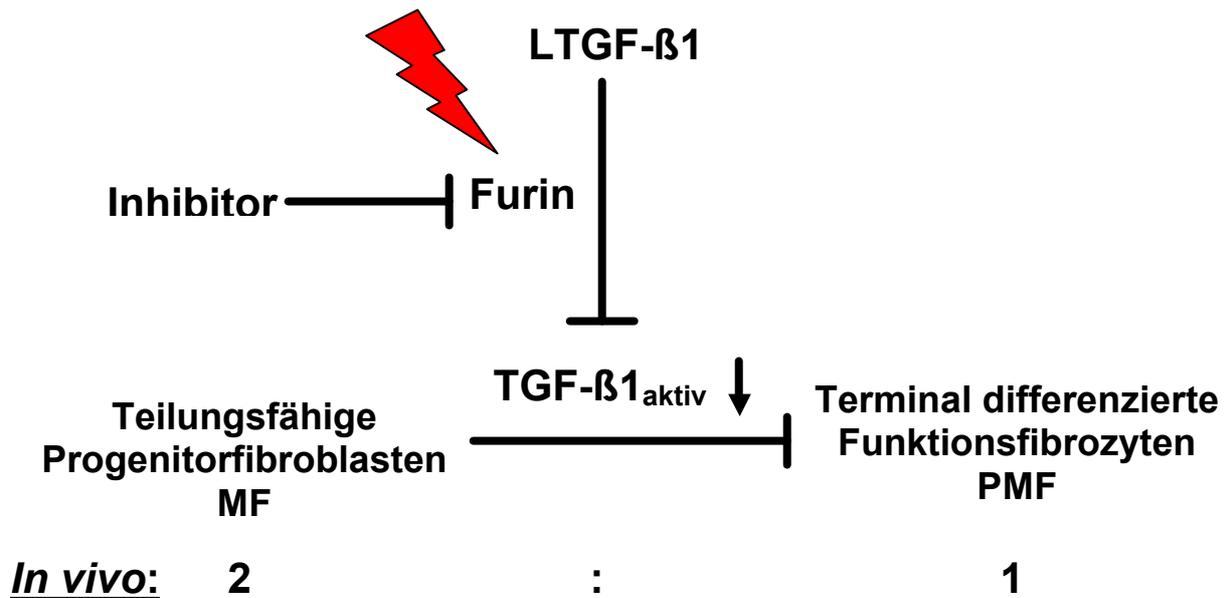
Andere Arbeitsgruppen [102,103,104] fanden eine Beteiligung von ERK1/2 (p42/p44) bei der von TGF- $\beta$ 1-vermittelten Expression verschiedener Gene. So konnten Blanchette et al. [103]

einen Cross-talk zwischen dem p42/p44 MAP Kinase- und dem Smad-Signalweg bei der Transaktivierung des Furingens nachweisen.

Diese Ergebnisse führen zu zwei Modellen für den Zusammenhang zwischen Smad- und MAPK-Signalweg: (1) TGF- $\beta$ 1 aktiviert sowohl den Smad- als auch den MAPK-Signalweg unabhängig voneinander, was letztendlich aber zu einer gemeinsamen Wechselwirkung bei der Regulation des entsprechenden Zielgens führt. (2) TGF- $\beta$ 1 aktiviert nur den Smad-Signalweg, der dann für die Aktivierung der entsprechenden MAP-Kinase (ERK1/2 oder p38/JNK) verantwortlich ist. Dafür spricht die frühere Aktivierung (nach etwa 15 Minuten) der Smad-Proteine [89,105] im Gegensatz zur Aktivierung von p38 (nach ca. 60 Minuten) nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung [100,101].

Für die Regulation von p21 nach Bestrahlung könnte somit folgender Mechanismus postuliert werden: Durch Bestrahlung wird zunächst die Protease Furin aktiviert, die extrazellulär zusammen mit anderen Proteasen, wie z.B. Plasmin, für die Aktivierung von latentem TGF- $\beta$ 1 sorgt. Daraufhin werden in der Zelle die Smad-Proteine Smad2 und Smad3 durch Phosphorylierung aktiviert, die dann zusammen mit Smad4 in den Zellkern eingeschleust werden, und hier zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Sp1 oder auch p53, für die transkriptionelle Aktivierung des p21-Gens verantwortlich sind. Außerdem werden möglicherweise die MAP-Kinasen p38 und JNK durch den Smad-Komplex aktiviert. Diese MAP-Kinasen stabilisieren daraufhin das überexprimierte p21 durch Phosphorylierung. Somit kann p21 an einen Cyclin/cdk-Komplex binden, was zur Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase führt.

Um einen Zusammenhang zwischen terminaler Differenzierung und Aktivierung des TGF- $\beta$ 1 Signalweges nach Bestrahlung herzustellen wurden in der vorliegenden Arbeit Koloniebildungstests mit und ohne Bestrahlung von verschiedenen Zellstämmen angefertigt. Gleichzeitig wurden die Zellen vor der Bestrahlung mit dem Furin-Inhibitor behandelt. Es wurde dann das Verhältnis PMF:MF für die verschiedenen Proben bestimmt. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme des Verhältnisses nach Bestrahlung im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen. Wurden die Fibroblasten allerdings vorher mit dem Inhibitor behandelt, wurde diese Zunahme signifikant vermindert. Dies bedeutet, dass die Verschiebung des Differenzierungsmusters (PMF:MF-Verhältnis) nach Bestrahlung reduziert werden kann, indem man die Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ 1 Komplexes und somit auch des TGF- $\beta$ 1 Signalweges mit dem Furin-Inhibitor verhindert (siehe Abb. 27).



**Abb. 27:** Wirkung des Inhibitors gegen Furin auf die strahleninduzierte terminale Differenzierung des Fibroblasten-/Fibrozyten-Zellsystems

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass TGF-β1 sehr wahrscheinlich das entscheidende Zytokin ist, welches nach Bestrahlung aktiviert wird und somit die strahleninduzierte terminale Differenzierung von Fibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten steuert. Dies geschieht vermutlich über Phosphorylierung von Smad-Proteinen (Smad2) und die daraus folgende Überexpression des Cdk-Inhibitors p21.

## 5 Zusammenfassung

Im Vergleich zur konventionell in der Radioonkologie eingesetzten und durch Linearbeschleunigung generierten Photonenstrahlung weisen hochenergetische schwere Ionen am Ende ihrer Reichweite eine weitaus höhere relative biologische Wirksamkeit (RBW) auf, während im durchstrahlten gesunden Gewebe die RBW für akute Effekte nur leicht erhöht ist. Somit bieten schwere Ionen potentiell im Falle von strahlenresistenten Tumoren eine bessere Therapiechance. Die Strahlendosis und somit die kurative Wirkung der Strahlentherapie wird durch Nebenwirkungen im mitbestrahlten Normalgewebe begrenzt. Häufigkeit und Grad der Normalgewebeschäden nach Strahlentherapie weisen große Variationen von Patient zu Patient auf. Diese individuellen Unterschiede sind sehr wahrscheinlich auf eine genetisch determinierte Strahlenempfindlichkeit zurückzuführen.

Eine prominente strahleninduzierte Gewebeeränderung ist die Fibrose. Das Risiko für die Entstehung einer radiogenen Fibrose steht sehr wahrscheinlich in direktem Zusammenhang mit dem individuellen Differenzierungsgrad des Fibroblasten-/Fibrozytenzellsystems eines Patienten. Dabei spielt vermutlich die strahleninduzierte terminale Differenzierung von Progenitorfibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten eine entscheidende Rolle.

Molekularbiologische Untersuchungen lassen vermuten, dass das Zytokin TGF- $\beta$ 1 bei der Induktion dieses Prozesses zentral beteiligt ist. TGF- $\beta$ 1-abhängig werden hierbei sehr wahrscheinlich Inhibitoren von Cyclin-abhängigen Kinasen, wie p21, über sogenannte Smad-Proteine aktiviert und die Induktion der Differenzierung eingeleitet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle von TGF- $\beta$ 1 im Prozess der terminalen Differenzierung in menschlichen Fibroblastenpopulationen nach Photonen- und Schwerionenbestrahlung zu untersuchen.

Im wesentlichen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Zunächst waren deutliche Unterschiede in der Strahlensensitivität zwischen den verschiedenen Fibroblastenzellstämmen zu beobachten. Dabei gehörten EU2A, EU2C und EU2E zu den sensitiven Zellstämmen, während EU2D, EU2F und EU2G zu den resistenten zu zählen waren. Dagegen waren die Unterschiede im klonogenen Überleben einzelner Zellstämme nach „immediate“- und „delayed-plating“ zwischen Photonen- und Schwerionenbestrahlung nur gering.

Bei der Analyse des Differenzierungsmusters mit und ohne Photonenbestrahlung waren signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellstämmen festzustellen. Dabei war

eine gute Korrelation des PMF:MF-Verhältnisses der unbestrahlten Fibroblastenzellstämme mit dem Fibroserisiko der jeweiligen Patientin zu erkennen.

Im Gegensatz zum Level der TGF- $\beta$ 1 mRNA nach Photonen- und Schwerionenbestrahlung, der nur minimal (bis 1,6 fach beim Zellstamm EU2A) erhöht war, stieg der Gesamtgehalt von TGF- $\beta$ 1 im Zellkulturüberstand verschiedener Hautfibroblasten bis 96 Stunden nach Photonenbestrahlung deutlich an. Noch deutlicher war die Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ 1-Komplexes eine Stunde nach Photonenbestrahlung, vor allem beim Zellstamm EU2A. Zusätzlich war eine signifikante Phosphorylierung von Smad2 in verschiedenen Hautfibroblasten sowohl nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung als auch nach Photonenbestrahlung feststellbar. Diese Aktivierung von Smad2 nach Bestrahlung konnte mit einem Antikörper gegen TGF- $\beta$ 1 oder mit einem spezifischen Furin-Inhibitor auf Kontrollniveau reduziert werden.

Außerdem konnte eine signifikante Induktion von p21 auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Zellstämmen nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Ein Teil dieser Aktivierung ist wahrscheinlich auf strahleninduziertes, aktives TGF- $\beta$ 1 zurückzuführen, da sich das p21-Signal mit dem Furin-Inhibitor abschwächen ließe. Schließlich konnte durch Analyse des PMF:MF-Verhältnisses verschiedener Zellstämme mit und ohne Bestrahlung eine TGF- $\beta$ 1-abhängige Verschiebung des Differenzierungsmuster nach Photonenbestrahlung gezeigt werden.

Diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle der strahleninduzierten Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 und Phosphorylierung von Smad 2 im Prozess der terminalen Differenzierung von humanen Hautfibroblasten hin. Sie geben Hinweise auf mögliche Interventionsstrategien zur Blockade der zellulären Prozesse, die der Fibrose zugrunde liegen. Außerdem bietet die Analyse des PMF:MF-Verhältnisses eine potentielle Möglichkeit, Voraussagen über das Fibroserisiko von Bestrahlungspatienten zu erhalten.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002) *Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends*, 3. erweiterte Ausgabe, Saarbrücken
- [2] Perez, C. A., Brady L. W. (1998) *Principles and Practice of Radiation Oncology*, Lippincott-Raven, Philadelphia
- [3] Leaver, D. (2001) *Principles and Practice of Radiation Therapy, Second Edition*, Mosby, C. M. Washington
- [4] Blakely, E. A., Tobias, C. A., Ngo, F. Q. H. und Curtis, S. B. (1980), *Biological and Medical Research with Accelerated Heavy Ions at the BEVALAC 1977-1980*, Berkeley, 1980, 73-86
- [5] Kraft, G. (1997) In: Amaldi, U., Larsson, B., Lemoigne, Y. (Hrg.) *Advances in Hadrontherapy*, Elsevier, Amsterdam
- [6] Kraft, G. (1990) *Strahlenther. Onkol.* **166**, 10-13
- [7] Turesson, I. (1990) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **19**, 1569-1574
- [8] Tucker, S. L., Turesson, I., Thames, H.D. (1992) *Eur. J. Cancer.* **28A**, 1783-1791
- [9] Bentzen, S. M., Overgaard, M., Overgaard, J. (1993) *Eur. J. Cancer* **29A**, 1373-1376
- [10] Remy, J., Wegrowski, J., Crechet, F., Martin, M., Daburon, F. (1991) *Radiat. Res.* **125**, 14-19
- [11] Rubin, P., Finkelstein, J., Shapiro, D. (1992) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **24**, 93-101
- [12] Rodemann, H. P., Bamberg, M. (1995) *Radiother. Oncol.* **35**, 83-90

- [13] Burger, A., Löffler, H., Bamberg, M., Rodemann, H. P. (1998) *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 401-408
- [14] Bayreuther, K., Rodemann, H. P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., Francz, P. I. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5112-5116
- [15] Bayreuther, K., Rodemann, H. P., Francz, P. I., Maier, K. (1988) *J. Cell. Sci. Suppl.* **10**, 115-130
- [16] Rodemann, H. P. (1989) *Differentiation* **42**, 37-43
- [17] Rodemann, H. P., Bayreuther, K., Francz, P. I., Dittmann, K., Albiez, M. (1989) *Exp. Cell. Res.* **180**, 84-93
- [18] Rodemann, H. P., Peterson, H. P., Schwenke, K., von Wangenheim, K. H. (1991) *Scanning Microsc.* **5**, 1135-42,1142-1153
- [19] Rodemann, H. P., Müller, G. A. (1991) *Am. J. Kidney Dis.* **17**, 684-686
- [20] Rodemann, H. P., Binder, A., Burger, A., Güven, N., Löffler, H., Bamberg, M. (1996) *Kidney. Int. Suppl.* **54**, S32-36
- [21] Bayreuther, K., Francz, P. I., Gogol, J., Kontermann, K. (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **663**, 167-179
- [22] Bumann, J., Santo-Höltje, L., Löffler, H., Bamberg, M., Rodemann, H. P. (1995) *Strahlenther. Onkol.* **171**, 35-41
- [23] Herskind, C., Bentzen, S. M., Overgaard, J., Overgaard, M., Bamberg, M., Rodemann, H. P. (1998) *Radiother. Oncol.* **47**, 263-269
- [24] Herskind, C., Johansen, J., Bentzen, S. M., Overgaard, M., Overgaard, J., Bamberg, M., Rodemann, H. P. (2000) *Acta. Oncol.* **39**, 383-388

- [25] Hakenjos, L., Bamberg, M., Rodemann, H. P. (2000) *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 503-509
- [26] Von Pfeil, A., Hakenjos, L., Herskind, C., Dittmann, K., Weller, M., Rodemann, H. P. (2002) *Int. J. Radiat. Biol.* **78**, 331-339
- [27] Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Goeddel, D. V. (1986) *J. Biol. Chem.* **261** (10), 4377-4379
- [28] Roberts, A. B., Sporn, M. B. (1990) In: *Peptide Growth Factors and Their Receptors*, Springer-Verlag, New York
- [29] Martin, M., Lefaix, J., Delanian, S. (2000) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **47** (2), 277-290
- [30] Fuji, D., Brissendon, J. E., Derynck, R., Francke, U. (1986) *Somat. Cell Mol. Genet.* **12**, 281-288
- [31] Ehrhart, E. J., Segarini, P., Tsang, M. L., Carroll, A. G., Barcellos-Hoff, M. H. (1997) *FASEB J.* **11**, 991-1002
- [32] Lawrence, D. A. (2001) *Mol. Cell. Biochem.* **219**, 163-170
- [33] Munger, J. S., Harpel, J. G., Gleizes, P. E., Mazzieri, R., Nunes, I., Rifkin, D. B. (1997) *Kidney Int.* **51**, 1376-1382
- [34] Massague, J. (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 597-641
- [35] Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Bell, J. R., Assoian, R. K., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Goeddel, D. V. (1985) *Nature* **316**, 701-705
- [36] Van Obberghen-Schilling, E., Kondaiah, P., Ludwig, R. L., Sporn, M. B., Baker, C. C. (1987) *Mol. Endocrinol.* **1**, 693-698
- [37] Jullien, P., Berg, T. M., Lawrence, D. A. (1989) *Int. J. Cancer* **43**, 886-891

- [38] Lyons, R. M., Keski-Oja, J., Moses, H. L. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 1659-1665
- [39] Lyons, R. M., Gentry, L. E., Purchio, A. F., Moses, H. L. (1990) *J. Cell Biol.* **110**, 1361-1367
- [40] Miyazono, K., Heldin, C. H. (1989) *Nature* 338 (6211), 158-160
- [41] Abe, M., Oda, N., Sato, Y. (1998) *J. Cell Physiol.* 174 (2), 186-193
- [42] Barcellos-Hoff, M. H. (1993) *Cancer Res.* **53**, 3880-3886
- [43] Grainger, D. J., Wakefield, L., Bethell, H. W., Farndale, R. W., Metcalfe, J. C. (1995) *Nat. Med.* **1**, 932-937
- [44] Leitlein, J., Aulwurm, S., Waltereit, R., Naumann, U., Wagenknecht, B., Garten, W., Weller M., Platten M. (2001) *J. Immunol.* **166**, 7238-7243
- [45] Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E., Leduc, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10618-10624
- [46] Dubois, C. M., Blanchette, F., Laprise, M. H., Leduc, R., Grondin, F., Seidah, N. G. (2001) *Am. J. Pathol.* **158**, 305-316
- [47] Molloy, S. S., Thomas, L., Van Slyke, J. K., Stenberg, P. E., Thomas, G. (1994) *EMBO J.* **13**, 18-33
- [48] Molloy, S. S., Anderson, E. D., Jean, F., Thomas, G. (1999) *Trends Cell Biol.* **9**, 28-35
- [49] Vey, M., Schäfer, W., Berghofer, S., Klenk, H. D., Garten, W. (1994) *J. Cell Biol.* **127**, 1829-1842
- [50] Nakayama, K. (1997) *Biochem. J.* **327**, 625-635

- [51] Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massague, J. (1994) *Nature* **370**, 341-347
- [52] Massague, J. (1996) *Cell* **85**, 947-950
- [53] Massague, J. (1998) *Annu Rev Biochem.* **67**, 753-791
- [54] Heldin, C. H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997) *Nature* **390**, 465-471
- [55] Attisano, L., Wrana, J. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 188-194
- [56] Hu, P.P., Shen, X., Huang, D., Liu, Y., Counter, C., Wang, X.F. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 35381-35387
- [57] Shi, Y., Massague, J. (2003) *Cell* **113**, 685-700
- [58] Derynck, R., Gelbart, W. M., Harland, R. M., Heldin, C. H., Kern, S. E., Massague, J., Melton, D. A., Mlodzik, M., Padgett, R. W., Roberts, A. B., Smith, J., Thomsen, G. H., Vogelstein, B., Wang, X. F. (1996) *Cell* **87**, 173
- [59] Kretschmar, M., Massague, J. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 103-111
- [60] Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C. H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997) *EMBO J.* **16**, 5353-5362
- [61] Chen, Y.G., Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., Massague, J. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2144-2152
- [62] Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., Wang, X. F. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5545-5549
- [63] Sugiyama, A., Nagaki, M., Shidoji, Y., Moriwaki, H., Muto Y. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 539-543

- [64] Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S. J. (1993) *Cell* **75**, 805-816
- [65] Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. (1993) *Nature* **366**, 701-704
- [66] Sherr, C. J., Roberts, J. M. (1995) *Genes Dev.* **9**, 1149-1163
- [67] Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V., Kastan, M. B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7491-7495
- [68] El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1993) *Cell* **75**, 817-825
- [69] El-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill D. E., Wang, Y., et al. (1994) *Cancer Res.* **54**, 1169-1174
- [70] Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge S. J., Reed S. I. (1994) *Cell* **76**, 1013-1023
- [71] Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., Wahl, G. M. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2540-2551
- [72] Lopez Cardozo, B., Zoetelief, H., van bekkum, D., Zurcher, C., Hagenbeck, A. (1985) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **11**, 907-914
- [73] Brocheriou, C., Verola, O., Lefaix, J. L., Daburon, F. (1986) *Br. J. Radiol. Suppl.* **19**, 101-104
- [74] Bentzen, S. M., Thames, H. D., Overgaard, M. (1989) *Radiother. Oncol.* **15**, 267-274

- [75] Bentzen, S. M., Overgaard, M., Thames, H. D., Christensen, J. J., Overgaard, J. (1989) *Int. J. Radiat. Biol.* **56**, 711-715
- [76] Maasilta, P., Salonen, E. M., Vaehri, A., Kivisaari, L., Holsti, L. R., Mattson, K. (1991) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **20**, 973-980
- [77] Rodemann, H. P. (1993) In: *Cell and Tissue Culture models in Dermatological Research*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
- [78] Rodemann, H. P., Bayreuther, K., Pfliederer, G. (1989) *Exp. Cell. Res.* **182**, 610-621
- [79] Spadinger, I., Marples, B., Matthews, J., Skov, K. (1994) *Radiat. Res.* **138**, 21-24
- [80] Fournier, C., Scholz, M., Weyrather, W. K., Rodemann, H.P., Kraft, G. (2001) *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 713-722
- [81] Johansen, J., Bentzen, S. M., Overgaard, J., Overgaard, M. (1994) *Int. J. Radiat. Biol.* **66**, 407-412
- [82] Johansen, J., Bentzen, S. M., Overgaard, J., Overgaard, M. (1996) *Radiother. Oncol.* **40**, 101-109
- [83] Peacock, J., Ashton, A., Bliss, J., Bush, C., Eady, J., Jackson, C., Owen, R., Rega, J., Yarnold (2000) *J. Radiother. Oncol.* **55**, 173-178
- [84] Russell, N. S., Lara, P. C., Grummels, A., Hart, A. A., Coco-Martin, J. M., Bartelink, H., Begg, A. C. (2000) *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 231-240
- [85] Finkelstein, J. N., Johnston, C. J., Baggs, R., Rubin, P. (1994) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **28**, 621-631
- [86] Martin, M. , Vozenin, M. C., Gault, N., Crechet, F., Pfarr, C. M., Lefaix, J. L. (1997) *Oncogene* **15**, 981-989

- [87] Barcellos-Hoff, M. H., Derynck, R., Tsang, M. L., Weatherbee, J. A. (1994) *J. Clin. Invest.* **93**, 892-899
- [88] Seong, J., Kim, S. H., Chung, E. J., Lee, W. J., Suh, C. O. (2000) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **46**, 639-643
- [89] Poncelet, A. C., de Caestecker, M. P., Schnaper, H. W. (1999) *Kidney Int.* **56**, 1354-1365
- [90] Derynck, R., Zhang, Y., Feng, X. H. (1998) *Cell* **95**, 737-740
- [91] Feng, X. H., Lin, X., Derynck, R. (2000) *EMBO J.* **19**, 5178-5193
- [92] Datto, M. B., Yu, Y., Wang, X. F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** (48), 28623-28628
- [93] Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., Moustakas, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 29244-29256
- [94] Moustakas, A., Kardassis, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6733-6738
- [95] Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A., Heldin, C. H. (2002) *Immunol. Lett.* **82**, 85-91
- [96] Kardassis, D., Papakosta, P., Pardali, K., Moustakas, A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 29572-29581
- [97] Namba, H., Hara, T., Tukazaki, T., Migita, K., Ishikawa, N., Ito, K., Nagataki, S., Yamashita S. (1995) *Cancer Res.* **55**, 2075-2080
- [98] Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Insinga, A., Imbriano, C., Piccolo, S. (2003) *Cell* **113**, 301-314
- [99] Kim, G. Y., Mercer, S. E., Ewton, D. Z., Yan, Z., Jin, K., Friedman, E. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 29792-29802

- [100] Ungefroren, H., Lenschow, W., Chen, W. B., Faendrich, F., Kalthoff, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 11041-11049
- [101] Ravanti, L., Häkkinen, L., Larjava, H., Saarialho-Kere, U., Foschi, M., Han, J., Kähäri, V.-M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 37292-37300
- [102] Hayashida, T., Poncelet, A. C., Hubchak, S. C., Schnaper, H. W. (1999) *Kidney Int.* **56**, 1710-1720
- [103] Blanchette, F., Rivard, N., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L., Dubois, C. M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 33986-33994
- [104] Watanabe, H., de Caestecker, M. P., Yamada, Y. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14466-14473
- [105] Chen, W. B., Lenschow, W., Tiede, K., Fischer, J.W., Kalthoff, H., Ungefroren, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 36118-36128

## **Danksagung**

Prof. Dr. H. P. Rodemann danke ich für die interessante Fragestellung, die Betreuung der Arbeit und die Bereitstellung eines hervorragenden wissenschaftlichen Umfelds.

Prof. Dr. H.-J. Machulla danke ich für die kurzfristige Übernahme der Berichterstattung im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen.

Dr. M. Bläse danke ich für seine kompetente Beratung und Hilfe bei allen Fragen im Labor.

Dr. M. Scholz möchte ich für die ausgezeichnete Planung und Betreuung der Bestrahlungen am SIS in Darmstadt danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. L. Santo-Höltje für ihre Hilfsbereitschaft, ihr offenes Ohr bei allen Problemen und die netten Gespräche.

Bei H. Löffler möchte ich mich für die Einführung in die Zellkultur und bei C. Mayer für die Einführung in die RNA- und Northern-Blot-Technik bedanken.

Bei A. Wildemann bedanke ich mich für ihre große Unterstützung bei der Aussaat vieler Kobis und bei der RNA- und Proteinisolierung.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie für die große Unterstützung über die vielen Jahre bedanken.

Bei allen Mitarbeitern in Tübingen und Darmstadt, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

## **Akademische Lehrer**

A. Blume, G. Eisenbrand, G. Himbert, C. G. Kreiter, H.-G. Kuball, W. Meyer, R. Memmer, F. Preuss, M. Regitz, H. P. Rodemann, O. J. Scherer, H. Sitzmann, W. Trommer, E. Vilsmaier, J. Wise