

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der Aufbau der Lunge.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Definition der Lungenfibrose.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Pathogenese der Lungenfibrose.....</b>	<b>3</b>
1.3 1 Hypothese: Lungenfibrose als Resultat einer chronischen Entzündung .....	4
1.3 2 Hypothese: Ein außer Kontrolle geratener Heilungsprozess führt zur Lungenfibrose .....	6
<b>1.4 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Lungenfibrose.....</b>	<b>7</b>
1.4.1 Strukturelle Veränderungen bei einer Lungenfibrose .....	7
1.4.2 Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT). ....	9
1.4.3 Fibroblasten .....	10
1.4.4 Myofibroblasten .....	11
1.4.5 Transforming Growth Factor- $\beta$ .....	13
1.4.6 Connective Tissue Growth Factor .....	15
1.4.7 CTGF-Antikörper FG-3019 .....	17
<b>1.5 Bestrahlung der Lunge.....</b>	<b>19</b>
1.5 1 Strahlungsinduzierte Lungenfibrose .....	20
1.5 2 Pathogenese der strahlenbedingten Lungenfibrose .....	22
<b>2 FRAGESTELLUNG UND MOTIVATION .....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Zelllinien .....</b>	<b>26</b>
3.1 1 Human Pulmonary Fibroblasts (HPF) .....	26
3.1 2 Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) .....	26
3.1 3 Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC) .....	26
3.1 4 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) .....	26
3.1 5 Tumorzellen .....	27
<b>3.2 Verarbeitung von Zellen.....</b>	<b>27</b>
3.2.1 Auftauen und Kultivierung der Zellen .....	27
3.2.2 Subkultivierung von Zellen.. ....	28
3.2.3 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer .....	29
<b>3.3 Zusätze .....</b>	<b>29</b>
3.3 1 FG-3019 .....	29
3.3.2 TGF- $\beta$ .....	29
<b>3.4 Bestrahlung.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5 Zellversuche.....</b>	<b>30</b>
3.5.1 Klonogenes Assay.....	30
3.5.2 Proliferations-Assay.....	31
3.5.3 Bestimmung der Vitalität.....	31
3.5.4 Adhäsions-Assay .....	32
3.5.5 Migrations-Assay .....	32
3.5.5.1 Vorbereitung der Zellen .....	33
3.5.5.2 Migrationsexperiment .....	33
3.5.5.3 Farbung .....	34
3.5.5.4 Auswertung .....	34
<b>3.6 Statistische Analyse.....</b>	<b>35</b>

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

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