

Inhaltsverzeichnis

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

3.7 Proteinbiochemische Methoden und morphologische Veränderungen	35
3 7 1 Behandlung der Zellen	35
3 7 2 Morphologische Veränderung	35
3.7.3 Proteinisolierung	36
3 7 4 Western Blot	36
3.7.5 Antikörper	38
4 ERGEBNISSE	39
4.1 Auswirkung von FG-3019 auf das Wachstumsverhalten der Zellen	39
4.1.1 Auswirkung von FG-3019 im klonogenen Assay	39
4 1 1 1 FG-3019 hemmt das klonogene Überleben von HPF	39
4 1 1 2 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben von NHDF	42
4 1 1 3 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben von HDMEC und HUVEC	43
4 1 1 4 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben von A549	47
4.1.2 Auswirkung von FG-3019 im Proliferations Assay	49
4 1 2 1 FG-3019 hemmt die Proliferation von HPF	49
4 1 2 2 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von NHDF	50
4 1 2 3 FG-3019 hemmt die Proliferation von HUVEC	51
4.1.2.4 FG-3019 zeigt keine signifikante Beeinflussung der Proliferation von A549	52
4.2 Auswirkung von FG-3019 auf die Vitalität von Zellen	53
4 2 1 FG-3019 hemmt die Vitalität von HPF	53
4 2 2 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Vitalität von NHDF	54
4 2 3 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Vitalität von HUVEC	55
4.2.4 FG-3019 hat keinen Einfluss auf die Vitalität von A549	56
4.3 Auswirkung von FG-3019 auf die Adhäsion von Zellen	57
4.3.1 FG-3019 reduziert leicht die Adhäsion von HPF	57
4.3.2 FG-3019 zeigt keinen Effekt auf das Adhäsionsverhalten von NHDF	58
4.3.3 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von HUVEC	59
4.3.4 FG-3019 beeinflusst das Adhäsionsverhalten von A549 nicht	60
4.4 Auswirkung der Migrationszeit auf die Migration und die Zellmorphologie von HPF und NHDF	61
4.4.1 Die Zeit beeinflusst das Migrationsverhalten und die Zellmorphologie von HPF	62
4.4.2 NHDF zeigen keine Migration im Migrations-Assay	62
4.5 Auswirkung von FG-3019 auf die Migration	63
4 5 1 FG-3019 reduziert die in-vivo Migration von HPF	63
4 5 2 FG-3019 zeigt keinen Einfluss auf die Migration von HDMEC	65
4.5.3 FG-3019 zeigt keinen Einfluss auf die Migration von HUVEC	67
4 5 4 FG-3019 hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von A549	68
4.6 Auswirkung von Bestrahlung kombiniert mit FG-3019 auf das klonogene Überleben	70
4 6 1 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von HPF unter Bestrahlung nicht	70
4.6.2 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von NHDF unter Bestrahlung nicht	71
4 6 3 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von HUVEC unter Bestrahlung nicht	72
4.6.4 FG-3019 beeinflusst das klonogene Überleben von A549 unter Bestrahlung nicht	74
4.7 Reaktion von mit TGF-β behandelten Zellen auf FG-3019	75
4 7 1 TGF- β hemmt das klonogene Überleben von HPF und FG-3019 attenuiert diesen Effekt	75
4 7 2 TGF- β und die zusätzliche Behandlung mit FG-3019 haben keine Auswirkung auf die Adhäsion von HPF	76
4 7 3 FG-3019 reduziert die durch TGF- β stimulierte Migration von HPF	77
4 7 3.1 Ergebnisse für 5 h Migrationszeit	78
4 7 3.2 Ergebnisse für 12 h Migrationszeit	80
4.7.3.3 Ergebnisse für 14 h Migrationszeit	81
4.8 Mikroskopische Untersuchung des Wachstums und der morphologischen Entwicklung von HPF und A549	83
4.8.1 A549	83
4 8.2 HPF	85

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