

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kommissarischer geschäftsführender Direktor:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Stahl

Bildung von Myofibroblasten durch reaktive Sauerstoffspezies  
abhängige Mechanismen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katharina Maria Puschmann

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan

Referent: Prof. Dr. Brenneisen

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Klöcker

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Biomaterials, 2011, 32:2918-29.

Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions.

Alili L, Sack M, Karakoti AS, Teuber S, Puschmann K, Hirst SM, Reilly CM, Zanger K, Stahl W, Das S, Seal S, Brenneisen P.

Institute of Biochemistry & Molecular Biology I, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, 40225 Duesseldorf, Germany.

Bioscience Reports, 2013, accepted.

Fibroblast-to-myfibroblast switch is mediated by NAD(P)H oxidase generated reactive oxygen species

Alili L, Sack M, Puschmann K, Brenneisen P.

Institute of Biochemistry & Molecular Biology I, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, 40225 Duesseldorf, Germany.

---

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1	Aufbau und Funktion der Haut	1
1.2	Hautkrebs und Prozesse der Hautkrebsentstehung	3
1.3	Tumor-Stroma-Interaktion	6
1.4	Myofibroblasten und deren molekulare Mechanismen der Transdifferenzierung	8
1.5	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	11
1.6	Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	15
1.7	Fragestellung	18

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

2.1.1	Versuchsmaterialien	19
2.1.2	Puffer und Lösungen	21
2.1.3	Antikörper	23
2.1.4	Assays / Kits	23
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.6	Geräte	24
2.1.7	Software	25

### 2.2 Zellen und zellbiologische Methoden

2.2.1	Zellen	25
2.2.2	Isolation von Fibroblasten aus Biopsien	25
2.2.3	Kultivierung der Zellen	26
2.2.4	Mykoplasmentest	27
2.2.5	Zytotoxizitätstest	27
2.2.6	Herstellung von Zelllysaten und Proteinbestimmung	29
2.2.7	Allgemeine Versuchsbedingungen	29
2.2.8	Herstellung von konditioniertem Medium	30

<b>2.3</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	
2.3.1	Immunzytochemie	30
2.3.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot (SDS-Page, Elektronentransfer und Immundetektion)	31
2.3.3	Enzyme-linked immuno assay (ELISA)	32
2.3.4	Immunologischer Nachweis Oxidierter Proteine (Oxy-Blot)	33
2.3.5	RNA-Isolierung und reverse Transkription	34
<b>3. Ergebnisse</b>		
3.1	TGF $\beta$ 1-abhängige Expression und Lokalisation von $\alpha$ SMA in Fibroblasten	36
3.2	TGF $\beta$ 1-abhängige Transkription von $\alpha$ SMA nach TGF $\beta$ 1 in Fibroblasten	38
3.3	Untersuchung einer autokrinen Wirkung durch TGF $\beta$ 1 auf Fibroblasten	39
3.3.1	Wirkung von konditioniertem Medium ( CM <sup>HDFnachTGF</sup> ) auf Fibroblasten	40
3.3.2	Quantifizierung von TGF $\beta$ 1 in konditionierten Medien (CM <sup>HDFnachTGF</sup> ) von Fibroblasten	42
3.3.3	Wirkung von konditioniertem Medium ( CM <sup>HDFnachTGF</sup> ) auf Fibroblasten in Abhängigkeit von der Anzahl der wiederholten Mediumwechsel im Anschluss an den Stimulationsprozess	47
3.4	Zeitverlauf der von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) abhängigen Transdifferenzierung von Fibroblasten	49
3.5	Proteinoxidation nach TGF $\beta$ 1-induzierter Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies	51
3.6	Abhängigkeit der Expression von $\alpha$ SMA von der NAD(P)H-Oxidase	53
3.7	Abhängigkeit der Transkription von $\alpha$ SMA von der NAD(P)H-Oxidase	56
3.8	NAD(P)H-Oxidase als Quelle der reaktiven Sauerstoffspezies	57
3.9	Einfluss von MAPK auf die Bildung von Myofibroblasten	58
3.10	Abhängigkeit der Transkription von $\alpha$ SMA von p38	63

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1	Tumor-Stroma-Interaktion	64
4.2	Parakrin wirkendes TGF $\beta$ 1 induziert Transdifferenzierung von Fibroblasten	65
4.3	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermitteln die TGF $\beta$ 1-induzierte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten	68
4.4	MAPK induzieren den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten	71
4.5	Der Status Quo der Mesenchymal-Mesenchymalen Transition (MMT)	73
<b>5.</b>	<b>Perspektiven</b>	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>78</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>92</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>93</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut stellt das größte Sinnesorgan des Menschen dar. Ihre Oberfläche beträgt in Abhängigkeit von der Körpergröße 1,5 bis 1,8m<sup>2</sup> und ihr Gewicht bei einer Dicke von 1,5 bis 4 mm je nach Körperregion etwa 3 kg, mit Subkutis sogar 11 bis 15 kg [Schiebler und Schmidt, Anatomie, Springer-Verlag 2003].

Für den menschlichen Organismus erfüllt sie lebenswichtige Funktionen. Als unmittelbare Kontaktfläche zur Außenwelt schützt die Haut vor physikalischen (UV-Strahlung), mechanischen, chemischen, thermischen und mikrobiellen Einwirkungen. Als Sinnesorgan der Peripherie besitzt die Haut verschiedene Rezeptoren und freie Nervenendigungen für unterschiedliche Reize wie Berührung, Schmerz und Temperatur. Von großer Bedeutung für den Organismus ist die Stoffwechselfunktion der Haut bezüglich der Homöostase des Wasserhaushalts und Konstanthaltung der Körpertemperatur durch Wärmeabgabe sowie Verdunstung von Schweiß [Schiebler und Schmidt, Anatomie, Springer-Verlag 2003].

Der Aufbau der Haut gliedert sich in drei Schichten: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut).



Abb. 1: Aufbau der Haut (Quelle: Examensarbeit Claudia Küper 2007, <http://www.grin.com>, verändert)

Die Epidermis (Oberhaut) bildet als äußerste Hautschicht die eigentliche Schutzhülle gegenüber der Umwelt und besitzt ein großes Regenerationsvermögen. Es handelt sich um mehrschichtig, verhornendes Plattenepithel, dessen Dicke abhängig von Geschlecht, Alter und Lokalisation durchschnittlich 0,1 mm beträgt. Da die Epidermis keine Blutgefäße besitzt, erfolgt die Ernährung über Diffusion aus der wesentlich gefäßreicheren Dermis (Lederhaut). Man unterscheidet histologisch insgesamt fünf Schichten der Epidermis: Stratum corneum (Hornschicht), Stratum lucidum (Glanzschicht), Stratum granulosum (Körnerzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und Stratum basale (Basalschicht).

Die Neubildung von Epithelzellen erfolgt in den untersten Zelllagen. Von hier gelangen die Zellen zur Oberfläche, wobei es in den mittleren Zelllagen zur Verhornung kommt. Schließlich bilden sich oberflächlich Hornschuppen, die abgestoßen werden [Schiebler und Schmidt, Anatomie, Springer-Verlag 2003].

Die Epidermis besteht zu ca. 85% aus Keratinozyten, welche durch Desmosomen zusammengehalten werden. Neben den Keratinozyten kommen in der Epidermis weitere Zelltypen vor: die melaninproduzierenden Zellen des Pigmentsystems (Melanozyten) und dendritische Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen).

Ein Keratinozyt durchläuft verschiedene Differenzierungsstadien in einem Zeitraum von ca. 30 Tagen. Abhängig von der jeweiligen Schicht der Epidermis stellt sich der Keratinozyt morphologisch entsprechend dar. Die Basalmembran, bestehend aus der Lamina lucida externa, Lamina densa und Lamina lucida interna, trennt die Epidermis von der Dermis. Durch Proliferation sorgen die Basalzellen, welche direkt auf der Basalmembran sitzen, für eine kontinuierliche Erneuerung der Haut. Neugebildete Zellen wandern unter Umstrukturierung der Keratinfilamente in die oberen Zellschichten ein, wo sie zu kernlosen Keratinozyten differenzieren. Im Stratum spinosum wirken die Keratinozyten stachelig und flachen zunehmend ab. In dieser Epidermisschicht werden erstmals Keratinsome, das sind membranbegrenzte Vakuolen bestehend aus Doppellipidmembranen, so genannte Odland-Bodies, sichtbar. Das Stratum granulosum ist morphologisch geprägt von intrazellulären Keratohyalin granula, einem Gemisch verschiedener Proteineinheiten. Hier beginnt die Keratinisierung. Im stark lichtbrechenden Stratum lucidum sind die Zellen stark abgeplattet, liegen dicht beisammen und die Zellgrenzen sind nicht mehr sichtbar. Die oberste Schicht, das Stratum corneum, stellt mit seinen flach und fest gepackten, kernlosen Keratinozyten die eigentliche Permeabilitätsbarriere dar. Zwischen den Keratinozyten befinden sich epidermale Lipide.

Die Dermis bildet das bindegewebige Gerüst der Haut, bestehend aus Bindegewebsfasern, wie Kollagen-, Elastin- und Retikulinfasern und verschiedenen Zellen, wie Myofibroblasten, Histiozyten, Mastzellen und Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten). Die Zwischenräume der einzelnen Bestandteile beinhalten eine Art Füllmasse aus Polyglykanen, auch Extrazelluläre Matrix (EZM) genannt. Diese sogenannten Glykosaminoglykane sind mit Hilfe von Fibronectin mit dem Bindegewebsgerüst zu Proteoglykanen verbunden, und können Wassermoleküle reversibel aufnehmen. Daraus resultiert ein hohes Wasserbindungsvermögen. Fibroblasten sind für die Synthese und den Abbau von Strukturproteinen verantwortlich [Ross et al., 1995; Brenneisen et al., 1996; Kielty et al., 1997]. Weitere Bestandteile der Dermis sind zahlreiche Blut- und Lymphgefäße, sensible und vegetative Nervenendigungen, Haarfollikel, Talgdrüsen, apokrine und ekkrine Drüsen sowie Sinneszellen (Mechano-, Chemo-, und Thermorezeptoren). Es liegt eine scharfe Grenze gegenüber der Epidermis vor, der Übergang zur Subkutis dagegen ist fließend. Man unterscheidet histologisch das Stratum reticulare, welches kontinuierlich in die tiefer gelegene Subkutis übergeht, von dem Stratum papillare, welches wellenförmig den Übergang zur Epidermis darstellt.

Als Subkutis bezeichnet man das Unterhautfettgewebe, welches mit zahlreichen Blutgefäßen durchzogen ist. Es besteht aus locker, lamellär angeordnetem Bindegewebe mit eingelagerten Adipozyten. Zu den Aufgaben der Subkutis gehören die Speicherung von Nährstoffen, Isolation des Körpers gegen Kälte und Abpolsterung gegen Stöße.

Das sensible Gleichgewicht der verschiedenen Gewebeschichten der Haut kann durch Kanzerogene wie UV-Strahlung entscheidend gestört werden [Stein et al., 1989; Scharffetter et al., 1991; Scharffetter-Kochanek et al., 1992; Petersen et al., 1992; Herrmann et al., 1993; Wlaschek et al., 1993, 1994, 1995, 1997; Koivukangas, 1994; Scharffetter-Kochanek, 1997; Brenneisen et al., 1998, 2000, 2002]. UVB-Exposition führt vermutlich über eine gestörte Zell-Matrix-Interaktion und durch ein Ungleichgewicht zwischen Matrix-Synthese und Matrix-Abbau zur Photoalterung [Brenneisen et al., 1998, 2000] zu erheblichen Störungen in Prozessen wie der Wundheilung und zur Begünstigung von Tumorinvasion und Metastasierung in der Tumorprogression [Canfield et al., 1986].

## **1.2 Hautkrebs und Prozesse der Hautkrebsentstehung**

Nach Informationen der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) steigt die Hautkrebshäufigkeit stetig an. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge treten weltweit jedes

Jahr 2-3 Millionen neue Fälle von hellem Hautkrebs und mehr als 130.000 neue Fälle von schwarzem Hautkrebs auf.

Unter dem Begriff Hautkrebs werden verschiedene Krebserkrankungen der Haut zusammengefasst. Man unterscheidet den so genannten schwarzen Hautkrebs (malignes Melanom) vom hellen Hautkrebs (Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom).

Das maligne Melanom der Haut ist die bösartigste Form von Hautkrebs. 2008 erkrankten in Deutschland fast 18.000 Menschen an einem malignen Melanom. Männer und Frauen waren etwa zu gleichen Teilen betroffen [Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2007/08]. Das Risiko, im Laufe des Lebens ein Melanom zu entwickeln, beträgt in Deutschland etwa 1:200, in Australien bereits 1:50. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Frauen bei 60 Jahren, Männer erkranken im Mittel 6 Jahre später. Das Melanom geht von den pigmentbildenden Zellen der Haut oder Schleimhaut aus, den so genannten Melanozyten. Als Ursachen gelten eine starke UV-Belastung mit wiederkehrenden Sonnenbränden (insbesondere im Kindesalter) sowie eine erbliche Veranlagung. Entscheidend für die Prognose ist eine frühzeitige Erkennung und Entfernung des Tumors.

Basalzellkarzinome (Basaliome) entstehen aus Zellen der so genannten Basalzellschicht der Haut. Die Tumoren können aggressiv in das umgebende Gewebe hineinwachsen und dabei auch Knorpel und Knochen befallen. Sie hingegen bilden äußerst selten Metastasen. Das Basalzellkarzinom gehört in Mitteleuropa zu den häufigsten bösartigen Tumoren überhaupt. In Deutschland erkranken pro Jahr ca. 100 pro 100.000 Einwohner. Als nachgewiesene Ursachen gelten starke UV-Belastung sowie eine erbliche Neigung im Zusammenhang mit einem hellen Hauttyp.

Als Hautkrebsvorstufe gilt die aktinische Keratose, welche durch UV-Licht verursacht wird. Sie befindet sich ausschließlich an den so genannten „Lichtterrassen“, also chronisch sonnenexponierten Arealen des Körpers und gilt als Vorstufe des Plattenepithelkarzinoms.

Das Plattenepithelkarzinom (auch Spinaliom, Stachelzellkarzinom) ist der zweithäufigste bösartige Hauttumor. In Mitteleuropa treten jedes Jahr etwa 20 bis 30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner auf. Bei Männern tritt die Erkrankung zwei bis fünf Mal häufiger auf als bei Frauen [Robert Koch Institut: Krebs in Deutschland 2005/2006]. Es ist das Paradebeispiel für einen durch Sonnenlicht ausgelösten Tumor. Hierbei spielt offensichtlich die kumulative Sonnenexposition („UV-Lebenszeitkonto“) eine entscheidende Rolle. In sonnenreichen Ländern ist die Zahl der Erkrankungsfälle um das Zehn- bis Zwanzigfache erhöht [Szejmies et al, Tumoren der Haut, Thieme Verlag 2010]. Bei immunsupprimierten Menschen ist die Inzidenz erhöht und die Prognose schlechter.

Bei der Entstehung von Hauttumoren spielen epigenetische und genetische Veränderungen eine wichtige Rolle, welche durch chemische oder physikalische Umwelteinflüsse induziert werden können oder spontan entstehen [Barrett JC, Shelby MD; 1992]. Folge sind neoplastische Zellen mit einer unvollkommenen Differenzierung, welche sich ungehemmt teilen und über Blut- und Lymphgefäße metastasieren.

Heute weiß man, dass die Karzinogenese ein hochkomplexer Vorgang ist und aus einem Mehrstufenmodell besteht, welches noch unverstanden ist. Früher ging man von einem Dreistufenmodell aus, bestehend aus Initiation, Promotion und Progression. Dieser Prozess ist historisch experimentell anhand der Maushautkarzinogenese gut belegt und dient als Grundlage für die Identifizierung karzinogenesrelevanter Gene und zellulärer Mechanismen [Marks und Furstenberger; 1983, 1990, 1995]. Der mehrstufige Karzinogeneseprozess konnte auch in menschlichen Epithelzellen mit der Auslösung von geno- und phänotypischen Veränderungen sowohl in vivo als auch in vitro nachgewiesen werden [Grafström et al., 1996].

Die Initiation stellt den ersten Schritt der Karzinogenese dar, und führt durch eine Mutation zu einer Veränderung des genetischen Materials. Wird diese Veränderung nicht per DNA-Reparatur beseitigt oder die Zelle durch Apoptose entfernt, persistiert diese Mutation, wird an die Tochterzellen weitergegeben und ist damit irreversibel. Morphologisch unterscheiden sich diese mutierten Zellen nicht von den umliegenden Zellen.

Die Tumorpromotion stellt den nächsten wichtigen Schritt der Karzinogenese dar. Die initiierten Zellen unterliegen einem Wachstumsreiz, zum Beispiel durch Hormone oder entzündliche Prozesse, und werden in morphologisch erkennbare, präneoplastische Zellen überführt. Diese gutartige Krebsvorstufe wächst zunächst nur begrenzt und metastasiert nicht. Aufgrund der instabilen DNA steigt bei jeder Zellproliferation das Risiko für weitere neue Mutationen.

Im Stadium der Progression findet die eigentliche maligne Transformation statt [Pilot et al; 1989]. Nach dem heutigen Wissen geht man davon aus, dass die maligne Transformation vor allem durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen ausgelöst wird [Weinberg et al; 1996]. Mutierte Tumorsuppressorgene, auch Onkogene genannt, sind für die Kontrolle des Zellzyklus und die Zellteilung zuständig. Nach weiteren Mutationen enddifferenzieren die Zellen zunehmend, sie verdrängen gesundes Gewebe und metastasieren lymphogen und/oder hämatogen. Typische Charakteristika maligner Zellen sind die Hyperproliferation und die Immortalität, die durch fehlende Kommunikation über gap junctions gekennzeichnet ist [Trosko und Ruch, 1998]. Der Verlust der Zell-Zell-Kommunikation bei Basaliomen und

Plattenepithelkarzinomen der Haut schützt die Tumorzellen vor Apoptosesignalen aus dem Stromalen Gewebe. Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus auf einer fehlenden Expression der Connexine 26 und 43 beruht [Tada und Hashimoto, 1997].

### 1.3 Tumor-Stroma-Interaktion

Schon im Jahr 1889 wurde von Stephan Paget mit seiner „Seed and Soil“- Hypothese die Vermutung aufgestellt, dass für die Verbreitung und das Wachstum von malignen Zellen eine besondere Affinität der Tumorzellen für das Umgebungsmilieu notwendig ist [Paget, The distribution of secondary growth in cancer of the breast. Lancet 1, 571-573, 1889].

Heutige Hypothesen beruhen auf dem Wissen, dass Tumorstromawachstum und Tumorstromaverbreitung von multiplen Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem umliegenden Stromalen Gewebe abhängig sind [Welch et al., 2000].

Die Invasion und Metastasierung stellt einen komplexen Vorgang dar und beschreibt die Fähigkeit von Tumoren, invasiv in das umliegende Gewebe einzudringen, Anschluss an Gefäße des Lymph- und Blutsystems zu erhalten, um dann den Primärtumor zu verlassen und Sekundärtumore (Metastasen) auszubilden [Müller und Fusenig, 2002]. Ein wesentliches Malignitätskriterium ist erfüllt, wenn die Tumorzelle die Basalmembran durchdringt und dadurch von der Epidermis in die Dermis gelangt. Dieser Prozess der Tumorstromaprogression von Karzinomzellen der Haut wird in drei wesentliche Schritte unterteilt [Liotta und Kohn, 2001]. Zunächst kommt es zur Adhäsion von Tumorzellen an die Basalmembran. Es folgt die Degradation der Basalmembran und zuletzt migrieren die Tumorzellen durch die degradierte Basalmembran von der Epidermis in die Dermis. Die Tumorzellen invadieren in das subepitheliale Bindegewebe. Dort kommt es zum Einbruch der Tumorzellen in Lymph- und/oder Blutgefäße und es folgen Tumorstromabsiedlungen in regionäre Lymphknoten. Von dort gelangen die malignen Zellen über das Lymphabflusssystem in die Blutbahn und bilden Absiedlungen in der Peripherie durch Embolisierung der Endstrombahn oder Adhärenz an das Epithel. Im Anschluss an das Durchdringen der endothelialen Basalmembran kommt es zur Invasion des subendothelialen Bindegewebes mit Befall des entsprechenden Organparenchyms [Liotta und Kohn, 2001].

Während des invasiven Tumorstromawachstums spielt der kontrollierte lokale Abbau der extrazellulären Matrix durch Proteolyse und die Interaktion der Tumorzellen mit strukturellen und zellulären Bestandteilen des peritumoralen Gewebes eine entscheidende Rolle [Löffek et al., 2006]. Bestandteile des Tumorstromas sind neben einer Vielzahl von Matrixkomponenten

Zellen des Bindegewebes wie Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, sowie Entzündungs- und Immunzellen wie dendritische Zellen und Makrophagen.

Tumorstroma-assoziierte Fibroblasten repräsentieren den überwiegenden Anteil des Tumorstromas von soliden Tumoren und ihren Metastasen. Diese Fibroblasten weisen eine aktivierte, myofibroblastische Differenzierung auf [Bhowmick et al, 2004, Desmouliere et al, 2004, Tsujino et al, 2007]. Diese Fibroblasten spielen eine wesentliche pathophysiologische Rolle für die Tumorprogression und die Angiogenese [Orimo et al, 2005, Weinberg 2006]. Die organspezifischen ortsständigen Fibroblasten werden durch Mediatoren wie TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1) und PDGF (platelet derived growth factor) rekrutiert [Bhowmick et al, 2004, Rudmik et al, 2005]. Der transformierende Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 ist ein Wachstumsfaktor, der durch die Tumorzelle sezerniert wird und Fibroblasten zu Myofibroblasten transdifferenzieren lässt, die die Tumordinvasion fördern [Cat et al., 2006].

Es findet eine dynamische Interaktion zwischen neoplastisch veränderten Zellen und den „normalen“ Zellen statt. Diese Interaktion wird auf der einen Seite durch Zell-Zell-Kontakte, auf der anderen Seite durch Zell-Matrix-Kontakte vermittelt [Löffek et al, 2006].

Tumorzellen sind in der Lage, entweder über direkte Zell-Zell-Kontakte (z.B. Cadherine) oder über die Sekretion löslicher Faktoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren) Einfluss auf die Zellteilung und die Proteinsynthese stromaler Zellen auszuüben.

Bei der Adhäsion und Migration von Tumorzellen spielen so genannte Integrine eine wichtige Rolle. Dabei handelt es sich um heterodimere Glykoproteine, welche an der Zelloberfläche lokalisiert sind, und durch Bindung an Glykoproteine der extrazellulären Matrix (EZM) Einfluss auf Motilität, Invasion und Zellwachstum haben. Integrine stellen eine Verbindung mit Hilfe von zyttoplasmatischen Domänen zwischen der EZM und Komponenten des Zytoskeletts her und erfüllen somit eine wichtige Rolle bei der zellulären Signaltransduktion [Aplin et al., 1999; Giancotti et al., 1999]. Neben den Integrinen beeinflussen Veränderungen der Expression oder Veränderungen der Struktur von E-Cadherinen die maligne Progression. E-Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, die epitheliale Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Es konnte nachgewiesen werden, dass E-Cadherin-negative Epithelialtumoren zur Invasion neigen, während die Mehrzahl E-Cadherin-positiver Mammakarzinome seltener invadieren [Sommers et al., 1991; Thompson et al., 1994; Pierceall et al., 1995].

Zu wichtigen Zytokinen und Wachstumsfaktoren bei der Interaktion von Tumorzellen und dem stromalen Gewebe gehören neben TGF $\beta$ 1 und PDGF auch FGF (Fibroblast growth factor), IL-1 und VEGF (vascular endothelial growth factor).

Durch die Synthese proteolytischer Enzyme und die Sekretion dieser Matrix-degradierender Proteasen wird die Invasion der Tumorzellen erleichtert [Löffek et al. 2006]. Dazu werden Proteinase (Serin-Proteinase, Cystein-Proteinase, Asparagin-Proteinase und Metalloproteinase) durch Tumorzellen oder von Stromal-Zellen nach Stimulation durch die Tumorzellen produziert. Dabei begünstigt die Expression von Matrix-Metalloproteinase (MMPs) die Degradation der EZM, was die Invasion der Tumorzellen erheblich erleichtert [Matrisian, 1992; Kahari und Saarialho-Kere, 1997].

Morphologische Hinweise auf Stromal-Beteiligung an Invasion und Metastasierung geben Desmoplasie und die Bildung verschiedener Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM). Desmoplasie beschreibt das Wachstum von Fibroblasten und die konsequente Bildung von Kollagen um das Tumorgewebe [Kunz-Schughart und Knuechel, 2002].

Den strukturellen Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM) kommt neben der strukturgebenden Funktion auch eine Rolle in der Signaltransduktion zu. Die EZM stellt ein Reservoir für Zytokine und Wachstumsfaktoren dar, welche durch proteolytische Spaltung von Matrixproteinen freigesetzt werden können [Löffek, 2006].

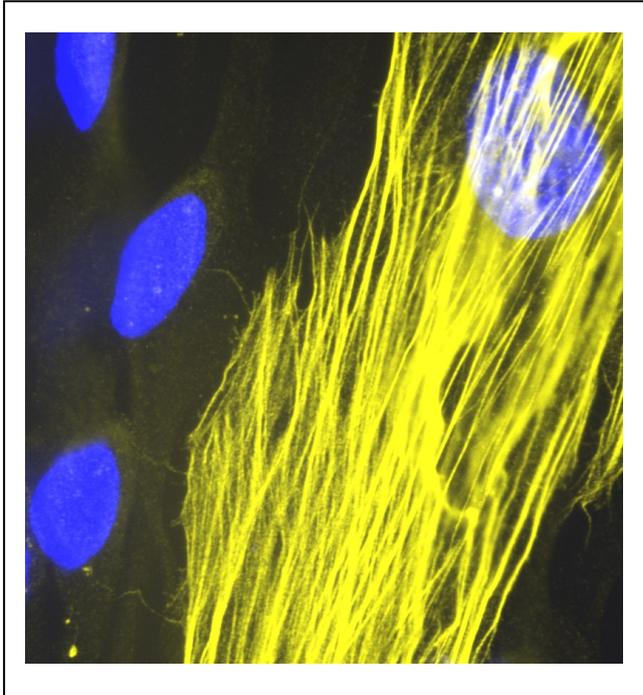
#### **1.4 Myofibroblasten und deren molekulare Mechanismen der Transdifferenzierung**

Myofibroblasten stellen eine Zwischenform zwischen glatter Muskelzelle und Fibroblast dar. Sie besitzen kontraktile Aktin- und Myosinfilamente und verfügen über eine hohe endogene Produktion von Kollagen. Bei Ereignissen wie Wachstum, Entwicklung und Wundheilung des Gewebes sind Myofibroblasten beteiligt [Gabbiani, und Ryan, 1971]. Während der Wundheilung entstehen Myofibroblasten transient aus Fibroblasten, welche durch aktivierte Makrophagen zur Zellteilung angeregt werden. Gemeinsam wandern sie in das Wundgebiet ein und stimulieren die Proliferation und die Einwanderung von weiteren Myofibroblasten und Immunzellen. Über eine verstärkte Produktion von Typ III Kollagen, der Vorstufe des Bindegewebs-Netzwerkes vom Typ I Kollagen, kommt es unter anderem zur Narbenbildung. Ist die Wundheilung abgeschlossen, verschwinden die Myofibroblasten durch Apoptose [Desmouliere, 1995].

Myofibroblasten stehen pathophysiologisch auch mit Entzündungsreaktionen, Asthma, der Entstehung von Polypen der Nasenschleimhäute und Fibrosen, sowie auch mit verschiedenen Krebserkrankungen in Verbindung [Bajaj-Elliot et al., 1997; Wang et al., 1997; Doucet et al., 1998; Powell et al., 1999].

Im Rahmen der Kommunikation und gegenseitigen Beeinflussung von stromalen und tumorösen Zellen spielen Myofibroblasten, in diesem Zusammenhang auch „cancer associated fibroblasts“ (CAF) genannt, eine entscheidende Schlüsselrolle [Lorusso, 2008].

Myofibroblasten treten verstärkt an der Invasionsfront von Tumoren auf [DeWever und Mareel, 2002]. Warum sie gerade dort auftreten und wie sie dem Tumor nutzen, ist bislang noch nicht vollständig geklärt.



**Abb. 2: Myofibroblast.** Immunzytochemischer Nachweis von  $\alpha$ SMA.

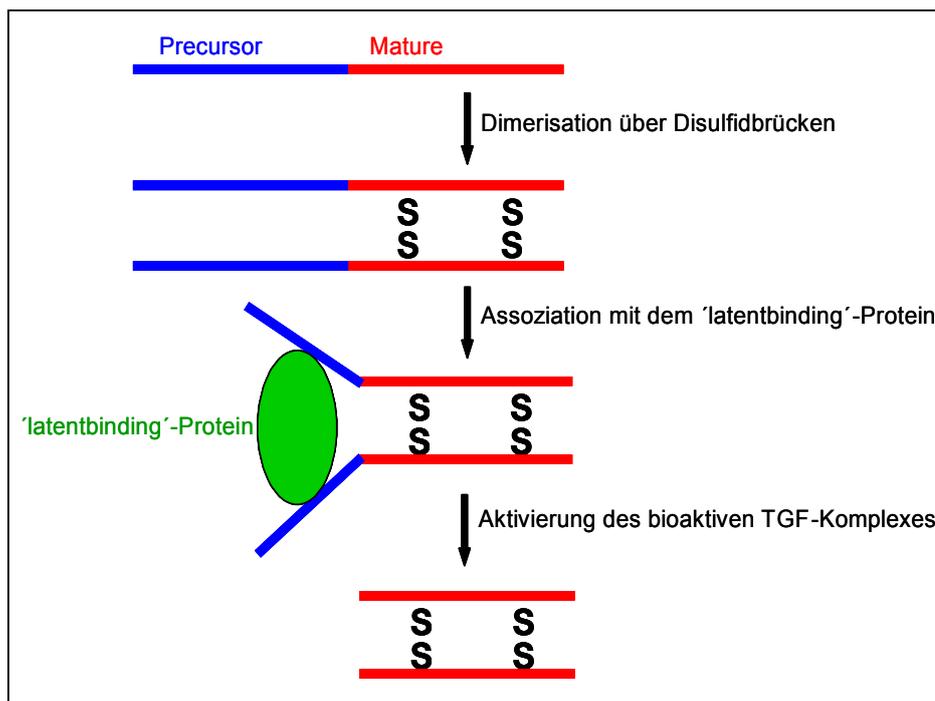
Immunologisch werden Myofibroblasten hauptsächlich durch die Proteine  $\alpha$ -smooth muscle Aktin ( $\alpha$ SMA) und Vimentin charakterisiert [Räsänen et al, 2010]. Durch Reorganisation des Aktins wird am Mikrofilamentsystem der Zelle das  $\alpha$ SMA gebildet, wodurch die Zelle die Fähigkeit zur Kontraktion erhält. Neben diesen kontraktilen Mikrofilamentbündeln, wie sie in Abbildung 2 zu sehen sind, den so genannten „stress fibers“, besitzen Myofibroblasten interzelluläre gap junctions. Dabei handelt es sich um Zellverbindungen, bestehend aus Zusammenschlüssen von Transmembrankanälen. Mit Hilfe dieser Kanäle ist eine Zelle in der Lage mit ihren Nachbarzellen direkt und/oder indirekt zu interagieren und Stoffaustausch zu betreiben [Trosko und Ruch, 1998; Stuhlmann et al., 2003].

In der vorliegenden Arbeit wird im Rahmen der Bildung des Proteins  $\alpha$ SMA und der daraus resultierenden Umwandlung des Fibroblasten in einen persistierenden Myofibroblasten, im Unterschied zum transienten Myofibroblasten, welcher bei der Wundheilung gebildet wird,

von einem Transdifferenzierungsprozess gesprochen. Im klassischen Sinn versteht man unter Transdifferenzierung die Umwandlung von Zellen, die einem der drei Keimblätter angehören, zu Zellen eines anderen Keimblatts. Bei Veränderungen im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) lösen die Wachstumsfaktoren TGF $\beta$ 1 und PDGF einen solchen Transdifferenzierungsprozess aus, bei dem epitheliale Zellen Eigenschaften von mesenchymalen Zellen erlangen [Gotzmann et al., 2006]. In dieser Arbeit ist die Transdifferenzierung von Fibroblasten durch mesenchymal-mesenchymale Transition (MMT) charakterisiert. Der transformierende Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 ist ein Wachstumsfaktor, der durch die Tumorzelle sezerniert wird und Fibroblasten zu Myofibroblasten transdifferenzieren lässt [Cat et al, 2006].

Die TGF $\beta$ -Familie verfügt über eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die sich in ihrer Polypeptidstruktur ähneln. Sie sind verantwortlich für eine große Anzahl biologischer Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Motilität, Adhäsion oder Apoptose [Bierie und Moses, 2006].

Es sind fünf Isoformen des TGF $\beta$  bekannt, wobei TGF $\beta$ 1 mit seinen 390 Aminosäuren die von Zellen am häufigsten sezernierte Isoform darstellt. TGF $\beta$ 1 wird als latenter Komplex mit einer Größe von 290 kDa gebildet. Wie in Abbildung 3 dargestellt, setzt sich dieser latente Komplex aus bioaktivem TGF $\beta$  (25 kDa), dem 'latency-associated'-Peptid (LAP, 75 kDa) und dem 'latent TGF $\beta$  binding'-Protein-1 (LTBP1, 190 kDa) zusammen. LTBP1 ist mit LAP über eine Disulfidbrücke verbunden und wird für den Zusammenbau und die Sezernierung des latenten TGF $\beta$ -Komplexes benötigt. LAP und das bioaktive TGF $\beta$  sind nicht-kovalent miteinander verbunden. Der latente TGF $\beta$ -Komplex, das heißt die Verknüpfung der einzelnen Untereinheiten, verhindert die Initiierung der Signaltransduktionskaskade. Die Aktivierung des Komplexes kann durch zahlreiche Proteinasen, wie beispielsweise Plasmin, Cathepsine oder Matrix-Metalloproteinasen, erfolgen und setzt das bioaktive TGF $\beta$ 1 ins Mikromillieu frei.



**Abb. 3: Aufbau des latenten TGF-β1-Komplexes und Aktivierung von bioaktivem TGFβ1**

(Quelle: Dissertation von B.Cat Mesenchymal-mesenchymale Transition: Oxidativer Stress und Tumorinvasion, 2007)

Bioaktives TGFβ1 bindet an einen heterodimeren Zelloberflächenrezeptor, welcher über zwei transmembrane Serin/Threonin-Kinasen (Typ I und II) verfügt. Als Folge kommt es zu einer ROS-abhängigen Signalkaskade, welche z.B. in Fibroblasten zu einer Expression von αSMA und damit zur Bildung von Myofibroblasten führt.

### 1.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden ständig und überall im Organismus bei verschiedenen biologischen Prozessen gebildet. Eine der wichtigsten endogenen Quellen für ROS im Organismus sind die Mitochondrien, wo sie als Nebenprodukt der Zellatmung anfallen. Während der oxidativen Phosphorylierung wird molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) durch Elektronentransferreaktionen über die Atmungskettenkomplexe zu Wasser ( $H_2O$ ) reduziert. Bei unvollständiger Reduktion können hoch reaktive Metabolite wie z.B. das Superoxidradikalanion als Nebenprodukte der Atmungskette in den Mitochondrien entstehen. In einer Reihe von enzymatischen und nichtenzymatischen Folgereaktionen können aus dem Superoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) weitere Radikale und andere reaktive Intermediate gebildet werden. Aufgrund ihres Reaktionsverhaltens werden die genannten Intermediate unter der Bezeichnung reaktive Sauerstoffverbindungen (Reactive Oxygen Species = ROS)

zusammengefasst. ROS können in freie Radikale, wie zum Beispiel Hydroxylradikale ( $\text{HO}\cdot$ ), Peroxylradikale ( $\text{ROO}\cdot$ ), Alkoxyradikale ( $\text{RO}\cdot$ ), und nicht-radikalische Verbindungen wie das Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) und organische Peroxide ( $\text{ROOH}$ ), eingeteilt werden [Brenneisen et al., 2002].

Chemische und physikalische Agentien wie UV-Strahlung führen ebenfalls zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von ROS [Herrmann et al., 1993; Brenneisen et al., 1998].

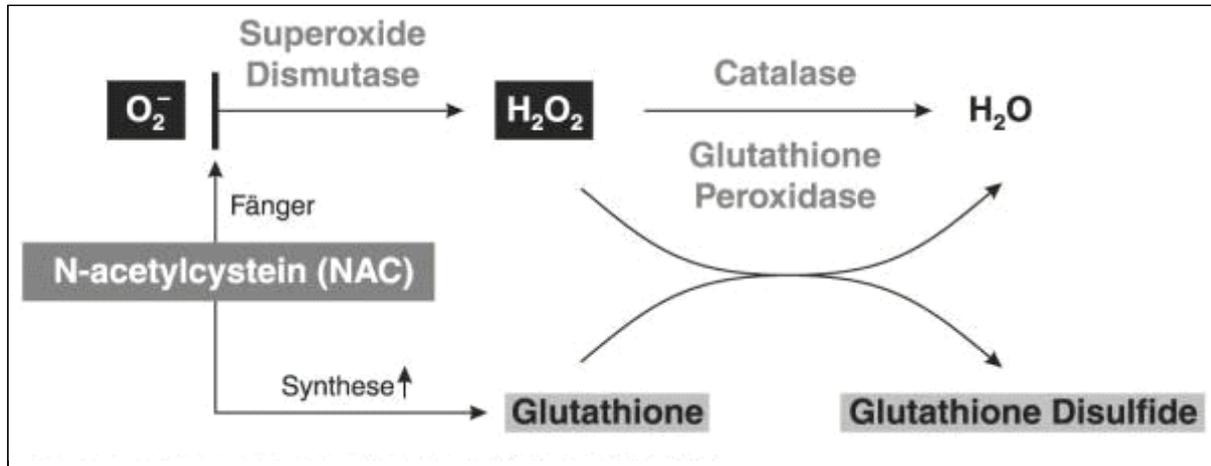
Es konnte gezeigt werden, dass ROS eine zentrale Rolle während intrazellulärer Signalkaskaden spielen [Poli et al., 2004; Aslan und Ozben, 2005; Chiarugi, 2005], was zu physiologischen oder pathologischen Veränderungen wie beispielsweise Zellzyklus-Progression [Boonstra und Post, 2004], Apoptose oder Zellalterung [Gourlay und Ayscough, 2005; Johann et al., 2006] führt. Desweiteren werden ROS mit kardiovaskulären und neurodegenerativen Krankheiten, aber auch mit Krebs in Verbindung gebracht [Sies, 1991].

Oxidativer Stress beschreibt eine Stoffwechsellage, der eine Auslenkung des Gleichgewichts zwischen Prooxidantien auf der einen Seite und dem Netzwerk der Antioxidantien auf der anderen Seite zugunsten der Prooxidantien zugrunde liegt [Sies, 2000, 1997, 1986, 1985]. Um ROS-induzierten Schäden entgegenwirken zu können, besitzt der Organismus enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Systeme. Dazu zählen die Superoxid-Dismutase (SOD), die  $\text{O}_2\cdot^-$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert, die Katalase, welche Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser umsetzt, und die Glutathion-Peroxidasen, die  $\text{H}_2\text{O}_2$  ebenfalls in  $\text{H}_2\text{O}$  reduzieren. Neben den zellulären antioxidativen Systemen gibt es chemische Verbindungen mit antioxidativen Eigenschaften, so genannte ROS-Fänger. Zu diesen zählen beispielsweise N-Acetylcystein, Trolox, ein Vitamin E-Derivat, Vit. C oder Selen. Apocynin ist ein selektiver Hemmstoff der NADH-Oxidase, ein membrangebundenes Enzym, welches Sauerstoff zu Hyperoxid unter Verbrauch von NADH reduziert.

N-Acetylcystein ist ein synthetisches zellpermeables Antioxidans. Die Funktion des N-Acetylcysteins als Radikalfänger ergibt sich aus seiner chemischen Struktur. Die freie SH-Gruppe kann direkt mit ROS, wie Hydroxylradikalen und Wasserstoffperoxiden, interagieren und dabei freie Thiolgruppen zu einer Disulfidbindung oxidieren [Aruoma OI, Halliwell B et al, 1989; Gillissen A., Jaworska M. et al, 1997].

Verwendung in der Medizin findet NAC als Expektoranz zur Herabsetzung der Sputumviskosität, aufgrund seiner Fähigkeit Disulfidbrücken des Bronchialsekrets in Mukoproteinen zu spalten. Darüber hinaus sind weitere Indikationen für NAC die akute Paracetamolintoxikation sowie die Prophylaxe der kontrastmittelinduzierten Nierenschädigung. NAC unterstützt die Synthese von Glutathion. Wie Abbildung 4 zeigt,

stellt Cystein das überwiegende Substrat für die Glutathionsynthese da, und ist damit eine Vorstufe des reduzierten Glutathions [Cotgreave I. und Moldeus P., 1991; Raftos JE et al, 2006].



**Abb. 4: Die Wirkung von N-Acetylcystein**

(Quelle: Tossios P, Mehlhorn U, Blickpunkt der Mann 2004; 2 (3): 36-39 ©)

Durch ROS induzierte Ereignisse in der Zelle können mit Hilfe von Antioxidantien verringert oder sogar verhindert werden.

Die biologische Konsequenz der Bildung von zu hohen Konzentrationen an ROS besteht in der Fähigkeit, biologische Makromoleküle wie DNA, Lipide, Kohlenhydrate und Proteine zu verändern bzw. zu schädigen [Halliwell und Gutteridge 1989].

Proteine können auf unterschiedliche Weise durch Akkumulation von reaktiven Spezies geschädigt werden. Entweder reagieren ROS direkt durch Oxidation mit Proteinen und führen so zur Bildung von Carbonylen, oder ROS reagieren indirekt über Moleküle wie Kohlenhydrate oder Lipide, wobei die daraus entstehenden Produkte dann mit Proteinen weiter reagieren [Levine et al., 2001]. Durch diese oxidative Proteinmodifikation kann es zu Strukturveränderungen in Form von Fragmentierungen, Cross-Links und Fehlfaltungen der Proteine kommen. Daraus resultiert eine veränderte Zellhomöostase durch Verlust der Enzymaktivität und der Proteinfunktion [Berlett BS, Stadtman ER, 1997].

Eine häufige oxidative Modifikation von Proteinen ist die Einführung von Carbonylgruppen in Proteinseitenketten. Für die Entstehung von Proteincarbonylen gibt es unterschiedliche Mechanismen [Frank et al., 2000]. In Anwesenheit von redoxaktiven Metallionen, wie z.B. Fe(III), Co(II) und Cu(II), können diese unter Komplexbildung an die Proteinseitenketten binden und zur Bildung von Carbonylgruppen führen. Bei diesem Vorgang spricht man von metallkatalysierter Proteinoxidation. Von besonderer Bedeutung sind hierbei v.a. die

Aminosäuren Histidin, Arginin, Lysin und Prolin [Requena et al., 2001]. Wenn Eisensalze an der Oxidation organischer Substrate mit Wasserstoffperoxid beteiligt sind, spricht man auch von der Fenton Reaktion ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}\cdot + \text{HO}^- + \text{Fe}^{3+}$ ). Es ist bekannt, dass UVB-Strahlung zu einem erhöhten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt in der Zelle führt, was wiederum über die Fenton-Reaktion die Bildung von Hydroxylradikalen, die die Zelle stark schädigen können, fördert [Brenneisen et al., 1998, Brenneisen et al., 2002].

Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass Proteincarbonyle durch Folgeprodukte der Lipidperoxidation, wie z.B. Malondialdehyd (MDA) oder 4-Hydroxynonenal (4-HNE) entstehen. Sie binden an die Seitenketten von Aminosäuren und verändern so die Proteinstruktur. MDA besitzen als Produkte der Lipidperoxidation mutagene und karzinogene Eigenschaften [Marnett, 1999]. Bekannt ist, dass hohe Dosen von UVA Lipidperoxidation in der Membran von Fibroblasten induzieren [Moliere et al., 1991] und damit UV-Strahlung mit Hautalterung und Photokarzinogenese in Verbindung steht.

Neben der metallkatalysierten Proteinoxidation und der Lipidperoxidation kann die Maillard-Reaktion (Glucosidierung und Glycoxidation) durch Bildung so genannter *advanced glycation end products* (AGE's) zur Entstehung von Carbonylen führen [Frank et al., 2000], wobei die zuletzt genannte Möglichkeit der Carbonylbildung nach Frank eher bei Patienten mit Diabetes Mellitus und bei Dialysepatienten in Betracht zu ziehen ist. Damit ist sie eher weniger in Verbindung mit degenerativen Erkrankungen [Shacter et al., 2000] und Alterungsprozessen mit der Bildung von Carbonylen, wie es bei der metal-catalyzed oxidation (MCO) der Fall ist, [Berlett et al., 1997] zu sehen.

Als Marker für oxidativen Stress wurden in der vorliegenden Arbeit Proteincarbonyle bestimmt.

## 1.6 Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind eine heterogene Gruppe von Proteinkinasen. Wichtige Mitglieder der MAPK-Familie sind die extrazellular-regulierten Kinasen (ERK), die Jun-N-Terminalen Kinase (JNK) und die p38-Kinase. Sie sind in der Lage, eine Vielzahl von extrazellulären Signalen in den Zellkern zu vermitteln und so verschiedene zelluläre Antworten zu übertragen [English et al. 1999; Widmann et al. 1999; Hazzalin und Mahadevan 2002]. Dabei spielen sie eine wichtige Rolle bei physiologischen und pathophysiologischen zellulären Prozessen wie der Regulation der Embryogenese, der Entzündung, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstum, der Proliferation und Apoptose

[Zang W, Liu HT 2002]. Die Aktivierung der MAPK erfolgt über Stressoren (z.B. Hyperosmolarität, UV-Bestrahlung, oxidativer Stress, mitogene Wachstumsfaktoren) und proinflammatorische Stimuli (z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren). Verschiedene Rezeptoren an der Zelloberfläche übertragen die Signale in die Zellen. Es folgt ein mehrstufiger intrazellulärer Signaltransduktionsweg bestehend aus verschiedenen Phosphorylierungskaskaden. Bei diesen Kinasen handelt sich um Serin/Threonin- und Thyrosin-Kinasen, welche nukleäre und zytoplasmatische Proteine phosphorylieren, aber auch die Fähigkeit zur Autophosphorylierung besitzen. Wie auch Abbildung 6 zeigt, akkumulieren aktivierte MAPK im Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, und diese dadurch aktivieren oder inhibieren. Durch diesen Mechanismus wird eine Vielzahl von Zielgenen reguliert. Über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. STAT-1, p53, ATF-2, Elk-1) führen diese intrazellulären Signaltransduktionswege zu Veränderungen der Genexpression und damit zu Veränderungen des Zellmetabolismus [Braham und Mc Clay, 2006; Cuenda und Rousseau, 2007]. Die Aktivierung über mitogene Stimuli erfolgt vorzugsweise über die ERK-Signalkaskade und führt zu Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung. Dieser Signaltransduktionsweg ist bei 30% aller Krebsarten hyperaktiviert [Garnett und Marais, 2004]. Die Aktivierung über stress-induzierende Stimuli läuft über den p38- und JNK-Signaltransduktionsweg und führt zu Inflammation, Wachstum, Apoptose und Differenzierung.

### **Die p38-MAPK-Kaskade**

Die p38-Kinasen kontrollieren die Funktion von Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen aber auch anderer Proteine. Die p38-Kinase ist ein 38 kDa großes Protein, wobei vier p38-Isoformen bekannt sind: p38 alpha, p38 beta, p38 gamma, p38 delta [Widmann et al., 1999; Kyriakis und Avruck 2001]. Durch verschiedene Stimuli, wie oxidativer Stress, UV-Strahlung, verschiedene proinflammatorische Zytokine (TNF, IL-1, TGF- $\beta$ ) oder über GTPasen der Rho-Familie (Rac) kann p38 aktiviert werden.

Laut Kulisz et al. werden die p38-MAPK durch mitochondriale ROS im Rahmen von oxidativem Stress durch Hypoxie phosphoryliert [Kulisz et al., 2002]. Auch in renalen tubulären Rattenzellen werden die p38-MAPK ROS-abhängig über TGF $\beta$ 1 aktiviert, und spielen dadurch eine Schlüsselrolle bei der tubulointestinalen Nierenfibrose [Rhyu DY et al, 2005]. Weitere Studien bestätigen, dass p38 ein wichtiger Regulator bei der Tumorprogression ist [Bradham, 2006]. Nach Bulavin et al. besitzt die p38-Kinase eine

tumorunterdrückende Aktivität aufgrund eines negativen Effekts auf den Zellzyklus. Ebenfalls besitzt sie die Fähigkeit, andere Tumorsuppressoren zu aktivieren [Bulavin et al. 1999; Bulavin und Fornace 2004]. In weiteren Studien wird die Funktion der p38-Stress-induzierten Signalkaskade als zellulärer Tumorsupressor durch Regulierung von Zellproliferation, Zelltransformation, Zellinvasion und Zelltod diskutiert [Loesch und Chen, 2008].

## 1.7 Fragestellung

Viele Untersuchungen zur Krebsentstehung befassen sich mit den intrazellulären Mechanismen, die eine normale Zelle zur Tumorzelle entarten lassen. Gerade aber während der Invasion eines Tumors spielt die Interaktion zwischen den Tumorzellen und ihrem Umfeld, ihrem Mikromilieu, eine wichtige Rolle. Durch parakrin wirkende Wachstumsfaktoren und Zytokine beeinflussen Tumorzellen ihr Mikromilieu zu ihren Gunsten. Damit stellt die Tumor-Stroma-Interaktion einen entscheidenden Schritt während der Tumorprogression dar.

In dieser Arbeit liegt der Fokus der Untersuchungen nicht auf den Tumorzellen. Diese sind genotypisch instabil und stellen als eine heterogene Gruppe eine schwer zu untersuchende Population dar. Um die zellulären Vorgänge während der Tumor-Stroma-Interaktion studieren zu können, wurden humane dermale Fibroblasten, die Bestandteil des Stromas sind, verwendet, welche genomische Stabilität aufweisen. Gerade diese Stabilität stellt eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer Therapieansätze (stromale Therapie) dar.

Der Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 ist für die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu  $\alpha$ SMA-exprimierenden Myofibroblasten, welche verstärkt an der Invasionsfront von Tumoren auftreten, verantwortlich. Über die zur Expression von  $\alpha$ SMA führenden Signalkomponenten und deren zeitliches Auftreten ist wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, welche molekularen Mechanismen dem TGF $\beta$ 1 vermittelten Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten zugrunde liegen. Da reaktive Sauerstoffspezies (ROS) an der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beteiligt sind, liegt der Schwerpunkt der Arbeit auf der von TGF $\beta$ 1 initiierten und von ROS abhängigen Signalkaskade. Dabei spielt auch die Frage nach einem autokrinen Mechanismus eine Rolle.

Die Identifizierung weiterer Signalkomponenten und deren zeitliche Einordnung in die  $\alpha$ SMA-Signalkaskade ist Hauptteil der hier vorliegenden Dissertation.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Versuchsmaterialien

Aceton p.A.	Merck, Darmstadt
AG1295 (PDGF-Inhibitor)	Calbiochem, San Diego, USA
Anisomycin	Sigma, Missouri, USA
Apocynin	Calbiochem, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat) analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (bovines Serumalbumin) 98%	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
DAPI	Molecular Probes, Karlsruhe
Diphenyliodonium 98%	Sigma, Taufkirchen
DMEM (Dublecco's modified Eagle's Meium)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin)	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
EDTA electrophoresis grade	ICN Biomedicals, Ohio USA
Essigsäure (Eisessig) 100% p. A.	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Molecular Probes, Karlsruhe
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fettfreies Milchpulver blotting grade	Roth, Karlsruhe
Fluoromount C	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Gentamycin solution	Sigma, Taufkirchen
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin $\geq 99,9\%$ p.A.	Roth, Karlsruhe
Glycerin p.A.	Roth, Karlsruhe
HCl konz. p.A.	Merck, Darmstadt
Inhibitoren: SB 202190 (p-38)	Sigma, Missouri, USA
SP 600125 (JNK)	Sigma, Missouri, USA

UO 400126 (ERK)	Sigma, Missouri, USA
Iodacetamid	BioRad, München
KCl	Invitrogen, Karlsruhe
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MTT 98% (TLC)	Sigma, Taufkirchen
NAC	Merck, Darmstadt
NaCl <sub>2</sub> p. A	Merck, Darmstadt
Na-EDTA p.A.	Sigma, Taufkirchen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> p. A	Merck, Darmstadt
OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit	Chemicon, USA
Penicillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, Taufkirchen
Ponceau-S-Solution 0,1% in 5% acetic acid	Sigma, Taufkirchen
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Proteinmarker	Fermentas, St.Leon Rot
SDS Ultra Pure ≥ 99%	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Super Signal West Pico	Pierce, Rockford
Suramin	Sigma, Deisenhofen
Temed 99%	Roth, Karlsruhe
TGFβ1, recombinant from human	R&D Systems, Wiesbaden
Tris Pufferan® ≥ 99,9%	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Sigma, Deisenhofen
Ziegennormalserum	Sigma, Taufkirchen

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I	0,3M Tris 10% (v/v) MeOH pH 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris 10% (v/v) MeOH pH 10,4
Blockierlösung	3% Ziegennormalserum in TBST (1x)
Blocking/Dilution Puffer	1% BSA PBS-T
Carnoy's Fixativ	Methanol/Eisessig, 3:1
Coomassie Blue-Färbelösung	0,05% Coomassie Brilliant Blue 20 % MeOH 7,5 % Essigsäure
DAPI-Färbelösung	0,05 µg/ml, Verdünnung: 1/500 in McIlvaine-Puffer
Einfriermedium	DMEM-Medium mit 20% FCS 5% DMSO
Kathodenpuffer	25 mM Tris 10% (v/v) MeOH 40mM Glycin pH 9,4
Lysepuffer	0,5% SDS Phosphatase Inhibitor Cocktail I (Verdünnung 1/1000)

	Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Verdünnung 1/1000)
Milchpulver-TBST (1x)-Lösung	5% fettfreies Milchpulver 50 mM Tris 150mM NaCl 0, 1% (v/v) Tween 20 pH 7,5
MTT-Lösung	10% MTT in DMEM
PBS	140 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS-T	140 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,05% Tween 20
Ponceau S-Lösung	0,1% PonceauS (w/v) 5% (v/v) Essigsäure Sigma, Taufkirchen
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Sammelgel	720 µl Rotiphorese Gel 40 (37,5:1) 650 µl Tris 0,5 M, pH 6,8 3,5 ml dH <sub>2</sub> O 50 µl SDS 10% (w/v) 50 µl APS 10% (w/v) 5 µl TEMED
TBST 10x	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween 20 pH 7,5

Trenngel	4,8 ml dH <sub>2</sub> O 2,5 ml Rotiphorese Gel 40 (37,5:1) 2,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8 100 µl SDS 10% (w/v) 100 µl APS 10% (w/v) 4 µl TEMED
Tris-Lösung	2M Tris Base 30% Glycerin 19% β-Mercaptoethanol
Trypsin-EDTA: PBS (1:1)	0,5g/L Trypsin 0,2g/L Na-EDTA PBS

### 2.1.3 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Mouse anti human αSMA	Sigma, Deisenhofen
Mouse anti human αTubulin	Sigma, Deisenhofen
Rabbit anti human GPx1	LabFrontier, Seoul Südkorea
Polyclonal goat anti human HGF	R&D Systems, Wiesbaden
Polyclonal goat anti human IL-6	R&D Systems, Wiesbaden
Polyclonal goat anti human TGF-β2	R&D Systems, Wiesbaden
Phospho-p38-Antibody	CellSignaling, Danvers, USA

#### Sekundäre Antikörper

Alexa-488-gekoppeltes α-Maus IgG	Molecular Probes, Karlsruhe
Goat-α-mouse-HRP-gekoppelt	DAKO, Schweden
Goat-α-rabbit-HRP-gekoppelt	Dianova, Hamburg

### 2.1.4 Assays / Kits

DuoSet ELISA, human TGF-β1	R&D Systems, Wiesbaden
----------------------------	------------------------

Detection Kit, OxyBlot (Protein Oxidation)	Chemicon, USA
RNeasy-Kits	Qiagen, Hilden
LightCycler FastStart:	
DNA Master SYBR Green I Reaction Mix	Roche, Mannheim

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Zellkultur-Materialien	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläschen	Assistent
Kryotubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Gelkassetten (1,5 mm)	Invitrogen, Karlsruhe
Nitrozellulose-Membran Hybond-C Extra	GE Healthcare, Freiburg
Whatman-Filterpapiere	Roth, Karlsruhe
Bio-Max-Film	Kodak, Stuttgart
Filmkassette BAS Cassette 2040	FujiFilm Photo Film GmbH, Düsseldorf
Objekträger	Engelbrecht, Edermünde

### 2.1.6 Geräte

Analysenwaage AB 204-S	Mettler Toledo, Schweiz
CCD Kamera (ORCA II) Digital Kamera	Hamamatsu, Japan
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Clean Air Sterilbank	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Criterion Electrophorese-Kammer	BioRad, München
Elektro-Blot-Apparatur	Roth, Karlsruhe
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop Axiovert 100 TV	Carl Zeiss, Oberkochen
Heraeus Inkubator	Kendro, Langenselbold
ImageScanner	UMAX, Taiwan
Magnet-Rührer	Janke+Kunkel IKAMAG <sup>®</sup> RCT, Staufen
Mikrotiter Plate Reader	Pharmacia Biotech, Freiburg
Milli-Q Anlage	Millipore, Eschborn
Neubauer-Zählkammer	Brand, Göttingen
Photometer Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg

Powersupplier Power Pac Basic™	BioRad, München
LightCycler 2.0	Roche, Mannheim
RM-5-Assistant Rollschüttler	Braun, Melsungen
Schüttler Rotamax 120	Heidolph-Instruments, Schwabach
Ultrasonic Disintegrater No. 7100	M.S.E., Lorch
Vortexer	Janke+Kunkel Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Köttermann, Düsseldorf

### **2.1.7 Software**

Aqua Cosmos  
Photoshop CS3  
Power Point  
Excel  
Prism Graph Pad

## **2.2 Zellen und zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Zellen**

HDF – humane dermale Fibroblasten:

HDF Zellen sind humane sekundäre Hautfibroblasten, die von Praeputien gesunder 3 bis 6-jähriger Jungen stammen und durch Zirkumzisionen gewonnen wurden. Die zur Isolation der Zellen verwendeten Biopsien erhielten wir freundlicherweise von Dr. Meyer aus der Praxis-Klinik Grevenbroich. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen den Passagen 2 bis 17 verwendet.

### **2.2.2 Isolation von Fibroblasten aus Biopsien**

Vor Beginn der Isolierung wurden die Biopsien in kaltem PBS gewaschen und daraufhin erneut 1 min in PBS plus 20 µg/ml Gentamycin gewaschen. Anschließend wurde das Fettgewebe großzügig mit einem Skalpell entfernt, wobei darauf zu achten war, dass die Biopsie nicht austrocknet. Dann wurde die Biopsie in möglichst kleine Stücke, die nicht größer als 5 mm waren, zerteilt. Diese Stücke wurden mit der Dermisseite nach unten auf

einer Petrischale plaziert und 10 min angetrocknet. Anschließend wurde die Petrischale mit DMEM, das mit 20 % FCS supplementiert wurde, aufgefüllt, bis die Hautstücke komplett mit Medium bedeckt waren. Die Schalen sollten möglichst wenig bewegt werden, um das Ablösen der Hautstücke zu verhindern. Nach einigen Tagen wuchsen zuerst epitheliale Zellen aus der Biopsie. Unter diesen wuchsen dann einige Tage später die Fibroblasten heraus. Nachdem die Fibroblasten einen gewissen Konfluenzgrad erreicht hatten, wurden sie trypsinisiert und im Folgenden unter Aufrechterhaltung des hohen Serumanteils weiterkultiviert. Da nur Fibroblasten das stark serumhaltige Medium überleben, konnten sie auf diese Weise von den übrigen Zellen getrennt werden [Fleischmeyer et al., 1990; Bayreuther et al., 1992].

### 2.2.3 Kultivierung der Zellen

Die Hautfibroblasten wurden in Dulbecco`s modified Eagle`s Medium (DMEM), das mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) supplementiert wurde, in einer wasserdampfgesättigten, auf 37°C temperierten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert. Nach Erreichen einer 80-90%-igen Konfluenz wurden alle Zellen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA:PBS Lösung von den Kulturflaschen abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 2 bis 5 min durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, die Zellen resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder -schalen überführt.

Zur Kontrolle des Zellwachstums wurde die kummulative Populationsdichte (CPD) bestimmt. Diese errechnet sich wie folgt:

$$PD = \frac{\ln(\text{Zellzahl der geernteten Zellen}) - \ln(\text{ingesäte Zellzahl})}{\ln 2}$$
$$CPD = \sum PD$$

Abb. 5: Berechnung der kummulativen Populationsdichte (CPR)

Die Fibroblasten wurden bis zu einer CPD von 17 verwendet. Alle kultivierten Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmenkontamination untersucht.

#### 2.2.4 Mykoplasmentest

Bei Mykoplasmen handelt es sich um zellwandlose, von einer Zytoplasmamembran umgebene Bakterien, welche Zellen parasitär befallen. Mykoplasmen können das geregelte Zellwachstum beeinflussen bzw. die Reaktionen von Zellen auf bestimmte Stimuli verändern. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass Ergebnisse in Experimenten verfälscht werden können. Da Mykoplasmen lichtmikroskopisch nicht zu sehen sind, bleiben sie ohne eine geeignete Detektionsmethode unerkant. Aus diesem Grund wurden in regelmäßigen Abständen die Zellen mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes Bisbenzimid auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen in 3,5 cm Zellkulturschalen bis zur Subkonfluenz (70%) kultiviert. Anschließend wurden sie zweimal in PBS gewaschen und für 10 min in 1 ml Carnoy's Fixativ fixiert. Danach erfolgte zweimaliges Waschen der Zellen mit McIlvaine-Puffer und eine 15-minütige Inkubation in 1 ml DAPI-Lösung. Nach zweimaligem Waschen mit dH<sub>2</sub>O konnte das Deckgläschen mit den Zellen auf einen Objektträger mit 20 µl Einbettmedium (Fluoromount C) fixiert werden. Innerhalb der nächsten 20 min wurden die gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350nm und einer Emissionswellenlänge von 460nm auf Mykoplasmen kontrolliert. Durch den Farbstoff Bisbenzimid (DAPI) wird selektiv DNA angefärbt. Nicht kontaminierte Kulturen zeigten eine hellblaue Fluoreszenz, welche ausschließlich auf den Zellkern beschränkt ist. Zellkulturen mit Mykoplasmen zeigten neben dem fluoreszierenden Zellkern eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der äußeren Zellmembran und zwischen den Zellen. Die Mykoplasmen erschienen entweder als gleichmäßig über die Zytoplasmamembran verteilte Partikel oder sie bildeten Aggregate auf der Zelloberfläche und/oder zwischen den Zellen. Kontaminierte Zellen wurden autoklaviert und entsorgt.

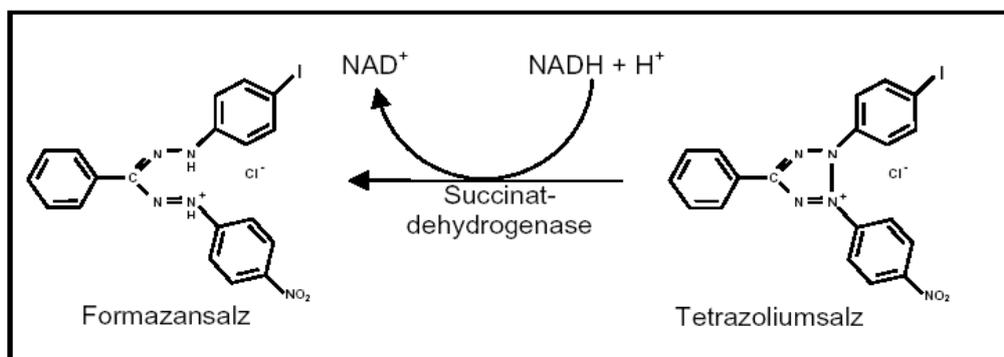
#### 2.2.5 Zytotoxizitätstest

Zellen in einer Zellkultur können auf bestimmte Stressfaktoren, wie die Inkubation mit chemischen Agenzien, reagieren. Der MTT-Test dient dazu, die Vitalität der Zellen nach Applikation bestimmter Chemikalien zu bestimmen.

Bei diesem Test nehmen lebende metabolisch aktive Zellen das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) auf und wandeln dieses durch eine mitochondriale Dehydrogenase in ein blaues, unlösliches

Formazansalz um. Die Absorption des Formazansalz wird als Maß für die Vitalität der Zellen angesehen und kann photometrisch bestimmt werden.

Hierzu wurden Zellen in 24-well-Platten eingesät und bei ca. 80% Zellkonfluenz mit den jeweiligen Chemikalien für eine bestimmte Zeit behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zur Aufnahme des Tetrazoliumsalses mit einer 10%igen MTT-Lösung in DMEM für zwei bis drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Aufnahme wird das Tetrazoliumsals von einer mitochondrialen Succinatdehydrogenase chemisch modifiziert. Es werden Wasserstoffionen von dem Enzym auf das Tetrazoliumsals übertragen, wodurch der Tetrazoliumring gespalten wird und ein blaues, unlösliches Formazansalz entsteht (siehe Abbildung 6).



**Abb. 6: Bildung von Formazansalz aus Tetrazoliumsals durch die Succinat-Dehydrogenase als Parameter für die Vitalität von Zellen**

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das MTT-haltige DMEM abgesaugt, die Zellen wurden gewaschen und mit DMSO solubilisiert. Das in DMSO gelöste Formazan wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm quantifiziert. Der Nullabgleich erfolgte dabei durch Messung von reinem DMSO. Die Vitalität der Zellen bzw. die Zytotoxizität einer Behandlung wurde als Prozent der Formazan-Bildung der behandelten Zellen, verglichen mit der Formazan-Bildung unbehandelter Zellen bestimmt:

$$\% \text{ Vitalität} = \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (unbehandelte Zellen)}} \times 100$$

**Abb. 7: Berechnung der Vitalität von behandelten Zellen (OD = optische Dichte)**

### 2.2.6 Herstellung von Zellysaten und Proteinbestimmung

Nach Ablauf der jeweiligen Experimente, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1% SDS lysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Zellysate mittels DC Protein Assay (Bio Rad) bestimmt. Zur Erstellung einer Proteinstandardkurve wurde eine serielle Verdünnungsreihe von BSA (Rinderserumalbumin) hergestellt und deren Proteinkonzentrationen parallel zu den Proben bestimmt. Mit Hilfe des Computerprogramms Prism 3.0 wurde der Proteingehalt der Proben ermittelt.

Zunächst wurden in einer Einmalküvette 100µl des Reagent A mit 10 µl einer Probe für 1 min inkubiert. Anschließend wurden 750 µl Reagent B in das Gemisch pipettiert und es folgte eine weitere Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Im Folgenden konnte die optische Dichte bei 750 nm nach Kalibrierung des Photometers gegen einen Leerwert (1% SDS) bestimmt werden und aus den Daten des BSA-Proteinstandards konnte der Proteingehalt des Zellysats berechnet werden.

### 2.2.7 Allgemeine Versuchsbedingungen

Verwendete Lösungen wurden mit dH<sub>2</sub>O aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Alle im Ergebnisteil gezeigten Experimente wurden mindestens dreimal (n=3), in speziell gekennzeichneten Fällen mindestens zweimalig (n=2), unabhängig voneinander durchgeführt. Dabei wurden alle Proben pro durchgeführten Versuch doppelt untersucht. Alle verwendeten Substanzen wurden vor Verwendung mittels MTT-Test auf Toxizität überprüft. Die Zellen wurden ausschließlich mit Konzentrationen behandelt, die nach 72 h Inkubation eine Überlebensrate von >80 % erzielten. Alle Experimente wurden mit CM<sup>HDF</sup>, serumfreiem konditioniertem Medium (CM) von dermalen Fibroblasten (HDF) durchgeführt. Das serumhaltige Medium auf den Versuchszellen wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Meist über Nacht wurden die Versuchszellen auf diese Weise inkubiert, sodass bei allen Experimenten mindesten 4 Stunden serumfreies Medium (CM<sup>HDF</sup>) vor Versuchsbeginn auf den Zellen war.

Bei allen Versuchen mit der Western Blot Methode wurde nach Gewinnung der Proben der Proteingehalt bestimmt und auf einheitliche Werte angepasst. Nach der Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran wurde die Ladung der einzelnen Blots durch Färbung mit Ponceau-S-Lösung visualisiert und damit kontrolliert.

### 2.2.8 Herstellung von konditioniertem Medium (CM)

Zur Herstellung von konditioniertem Medium (CM<sup>HDF</sup>) wurde das serumhaltige Medium nach zweimaligem Waschen mit PBS oder serumfreiem Medium gegen serumfreies Medium getauscht. Die Überstände dieser unstimulierten Zellen, die lösliche Faktoren in das Medium sezernieren, wurden gesammelt und auf unbehandelte Fibroblasten gegeben.

Zur Herstellung von konditioniertem Medium (CM<sup>HDFnachTGF</sup>) wurde eine 10 minütige Behandlung mit rekombinantem TGFβ1 durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit serumfreiem Medium gewaschen. Dieses nach „x“ Stunden gesammelte konditionierte Medium wurde dann auf unbehandelte, synchronisierte Fibroblasten gegeben.

Zur Herstellung von konditioniertem Medium (CM<sup>HDFnachTGF 8h, 16h, 24h</sup>) wurden die Zellen für 10 Minuten mit TGFβ1 stimuliert und anschließend mit serumfreiem Medium gewaschen. Daraufhin wurden zeitabhängig nach 8, 16 und 24 Stunden die Zellüberstände gesammelt und auf unbehandelte, synchronisierte Fibroblasten gegeben.

Zur Herstellung von konditioniertem Medium (CM<sup>HDFnachTGF 0-4h, 4-16h, 16-24h</sup>) wurden die Zellen für 10 Minuten mit TGFβ1 stimuliert und anschließend mit serumfreiem Medium gewaschen. Daraufhin wurden die Zellüberstände in verschiedenen Zeitfenstern 0-4, 4-16 und 16-24 Stunden isoliert. Dabei wurden vor Isolierung des zweiten und dritten Zeitfensters die Zellen erneut mit serumfreiem Medium gewaschen. Dieses konditionierte Medium wurde dann auf unbehandelte, synchronisierte Fibroblasten gegeben.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Immunzytochemie

Das in Myofibroblasten exprimierte Protein αSMA konnte mit Hilfe dieser Methode durch fluoreszierende sekundäre Antikörper sichtbar gemacht werden.

Die Zellen wurden auf Glasplättchen in Ø 3,5cm Zellkulturschalen bis zur Subkonfluenz kultiviert. Zu Beginn wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und für 5 min mit Methanol (-20°C) fixiert. Anschließend wurde das Methanol entfernt und die Zellen wiederum mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einer Blockierlösung für 60 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper (Verdünnung: 1:1000 (v/v) in TBST mit 1 % Ziegennormalserum) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen für je 15 min mit TBST wurden die fixierten Zellen mit Alexa 488-gekoppelten IgG-Sekundärantikörpern anti-Maus (Verdünnung: 1:1000 (v/v) in TBST) für

das  $\alpha$ SMA-Protein für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde erneut viermal je 15min mit TBST gewaschen. Anschließend wurden die Zellen einer DAPI-Färbung unterzogen. Dafür wurden die Zellen für 10 min in DAPI-Färbelösung (Verdünnung: 1/500 in McIlvaine-Puffer) inkubiert und anschließend für weitere 30 min mit TBST gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Glasplättchen mit einem Tropfen Fluoromount C auf einem Objektträger fixiert und mit einem Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop, das mit einer CCD Kamera (ORCA II) verbunden war, ausgewertet.

### **2.3.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)**

Die Western-Blot-Methode wurde für den Nachweis von Proteinen, wie z.B. dem  $\alpha$ SMA, welches ein Marker für Myofibroblasten darstellt, eingesetzt. Bei dieser Methode werden Proteine aufgrund eines elektrischen Feldes aus einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen.

### **Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Bei dieser Methode wandern Proteine in einem elektrischen Feld durch ein dreidimensionales Netzwerk aus Acrylamid und Bis-Acrylamid. Es erfolgt eine Auftrennung der Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts. Für die Protein-Gelelektrophorese wurde das System nach Laemmli et.al (1970) verwendet.

Zunächst wurde das Trenngel in eine Gelkassette gegossen und nach der Polymerisierung mit dem Sammelgel überschichtet. Bei der Probenvorbereitung wurde das Zelllysate mit einem Überschuss an SDS auf 95° C für 5min erhitzt, um die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zu zerstören. Zusätzlich wurden Schwefelbrücken zwischen Cysteinen durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) aufgebrochen. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Zunächst wurde ein Strom von 20mA angelegt. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Elektrophorese mit 50 bis 60 mA fortgesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in einer X-Cell-II Elektrophoresekammer mit 1x SDSPAGE Laufpuffer. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde ein Protein-Molekulargewichtsmarker auf dem Gel mitgeführt.

### **Elektotransfer und Immundetektion**

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine von dem PAGE-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Elektronentransfer erfolgte mittels Semidry-Blotting in einem diskontinuierlichen Puffersystem.

Zu Beginn wurden pro Gel sechs Whatman Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Je zwei Blatt Filterpapier wurden in Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer getränkt. Die Blotmembran wurde zur Aktivierung kurz in Wasser geschwenkt. Die Graphitelektroden der Blotkammer wurden befeuchtet. Auf die Anode wurden zwei Blatt Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer I, zwei Blatt Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer II, die Nitrozellulose-Membran, das Trenngel und zwei Blatt Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer platziert. Nach Auflegen der Kathode wurde für 1,5 h ein Strom von 60 mA angelegt. Nach dem Transfer wurden die Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S angefärbt, um sehen zu können, ob die Proteinbanden auf die Membran übertragen wurden, und ob die Proteinbanden im gleichen Verhältnis zueinander aufgetragen waren. Damit diente die Färbung mit Ponceau S zusätzlich als Ladekontrolle. Die Membran wurde anschließend mit 1x TBST entfärbt und nachfolgend für 1 Stunde bei RT in Blockierungspuffer (5% Milchpulver in 1x TBST) inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:1000 in Blockierungspuffer) inkubiert. Am folgenden Tag nach viermal 15 minütigem Waschen in 1x TBST wurde die Membran für 2 Stunden mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20.000 in TBST) bei RT inkubiert. Im Anschluss daran folgten wiederholt mehrere Waschdurchgänge mit TBST. Die Detektion erfolgte mit dem Super Signal Pico Chemilumineszenz-System und einem Chemilumineszenz-Film. Dazu wurden die beiden Nachweisreagenzien (Luminol-Lsg., Pierce Biotechnology, Rockford IL) im Verhältnis 1:1 vermischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und mit einem Bio-Max-Film in einer Filmkassette platziert. Der Film wurde über mehrere Minuten exponiert und anschließend in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

### **2.3.3 Enzyme-linked immuno assay (ELISA)**

Die ELISA-Methode wurde für den Nachweis von humanem TGFβ1 verwendet. Die Durchführung der Methode richtete sich nach den Anweisungen des Herstellers.

Zur Beschichtung der 96-well Platten wurden 360µg Capture-Antikörper pro 1ml PBS verwendet. Es wurden je 100 µl/well aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach

dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die Wells mit 300µl einer Blockier-Lösung (5%Tween 20, 5% Sucrose in PBS) für 1h bei RT blockiert. Die Blockierlösung wurde entfernt und verschiedene Konzentrationen des Standards und die Proben aufgetragen und bei RT für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Wells viermal mit PBS-T gewaschen und mit einem biotinylierten Detection-Antikörper (100 µl/well, 54 µg/ml) für 2 h bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS-T folgte eine Behandlung mit 500 µl eines HRP (horseradish-peroxidase)-konjugierten Streptavidin-Antikörpers für 20 min bei RT. Es wurde erneut mit PBS-T gewaschen und die 96-well Platte abschließend für die Farbentwicklung mit 100µl einer 3,3,5,5-Tetramethylbenzidin (TMB)-Peroxidase Lösung für 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl einer 1M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)-Lösung gestoppt. Die Absorbtion wurde bei 450 nm mit einem Mikrotiter-Plattenleser gemessen, wobei der Referenzfilter auf 650 nm eingestellt wurde. Die Konzentration des Wachstumsfaktors konnte anhand des Standards mit Hilfe der Software EXCEL berechnet werden.

#### **2.3.4 Immunologischer Nachweis oxidierter Proteine (Oxy-Blot)**

Zunächst wurden dermale Fibroblasten in 3,5 cm Zellkulturschalen kultiviert. Bei Subkonfluenz (ca. 70%) wurden die Zellen für unterschiedlich lange Zeit mit 10ng/ml rekombinanten TGF-β1, mit 1ng/ml Apocynin oder 5 mM NAC behandelt. Als technische Positivkontrolle wurden Fibroblasten mit 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 45 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen und es folgte der Nachweis von oxidierten Proteinen mit Hilfe des OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Chemicon, USA). Die Durchführung der Methode richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

Zunächst wurden 5 µl des Zelllysats mit 5 µl 12%-iger SDS-Lösung vermischt, um eine Endkonzentration von 6% SDS zu erreichen. Anschließend wurden 10 µl 1x 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (DNPH) hinzupipettiert und die Probe wurde für 20 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Im Folgenden wurden 7,5 µl Neutralisations-Lösung hinzugegeben, um die Derivatisierung zu stoppen. Daraufhin wurden die Proben auf eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetragen und wie beschrieben auf Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Nitrozellulose-Membran wurde für 1 h in Blocking/Dilution Puffer blockiert und anschließend über Nacht bei 4°C schüttelnd mit einem Rabbit anti-DNP Antikörper (Verdünnung 1:150 in Blocking/Dilution Puffer) inkubiert. Die Membran wurde zweimal für 15 min mit PBS-T und weitere zweimal für 5 min gewaschen. Der Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit IgG HRP-gekoppelt) wurde für 2 h in Blocking/Dilution Puffer (Verdünnung

1:300) inkubiert. Es wurde erneut zweimal mit PBS-T für 15 min und weitere zweimal für 5 min gewaschen. Zum Nachweis der Bindung wurden die beiden Nachweisreagenzien (Luminol-Lösung, Verstärker-Lösung; Pierce Biotechnology, Rockford IL) im Verhältnis 1:1 vermischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und mit einem Bio-Max-Film in einer Filmkassette platziert. Der Film wurde über 15 min exponiert und anschließend entwickelt und fixiert. Daraufhin wurde der Film mit Hilfe des ImageScanners digitalisiert.

### 2.3.5 RNA-Isolierung und reverse Transkription

Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Dabei binden Nukleinsäuren in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silicamembran, von der DNA, Proteinverunreinigungen und Salze in zwei Waschschritten entfernt werden. Die RNA wird mit Wasser von der Matrix eluiert. Bei der RNA-Isolierung aus transient transfizierten Zellen wurde das RNA-Lysat mit DNase I (Qiagen, Hilden) behandelt, um Plasmid-DNA vor der reversen Transkription zu entfernen. Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurden photometrisch durch Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Die RNA wurde unter Verwendung des Enzyms *Superscript II RNase H- Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Karlsruhe) für die Synthese komplementärer DNA (cDNA, *complementary DNA*) eingesetzt. Dazu wurde 1 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 10 µl zusammen mit 1 µM Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer für 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann wurden 10 µl des folgenden Reaktionsansatzes hinzugefügt:

4 µl 5-fach Reaktionspuffer (Invitrogen)

2 µl DTT (100 mM)

1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)

2.5 µl Wasser

0.5 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen)

Die reverse Transkription erfolgte in einem Thermocycler für 1 h bei 42°C und wurde darauf durch Denaturieren des Enzyms (5 min, 65°C) beendet. Die so erhaltene cDNA wurde nach Verdünnung mit Wasser im Verhältnis 1:5, für die Real-Time PCR verwendet.

Genes	Primer (5'-3')
$\alpha$ SMA	Forward: CTGTTCCAGCCATCCTTCAT Reverse: TCATGATGCTGCTGTTGTAGGTGGT
HPRT1	Forward: ATTCTTTGCTGACCTGCTGGATT Reverse: CTTAGGCTTTGTATTTTGCTTTTC

**Abb. 8:** Sequenzen der Primer für die Real-time RT-PCR

### Real-Time PCR

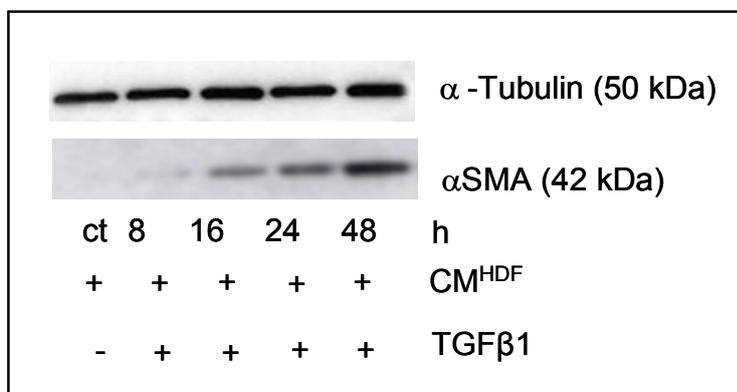
Die Real-Time PCR wurde in einem *LightCycler 2.0* (Roche) unter Verwendung des *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Reaction Mix* (Roche) durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 3 mM MgCl<sub>2</sub>, die in Abbildung 10 dargestellten *forward* und *reverse* Primer (je 0.5  $\mu$ M), 2  $\mu$ l 10-fach Reaktionspuffer (*LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*) und 4  $\mu$ l im Verhältnis 1:5 verdünnter cDNA (dies entspricht 40 ng revers transkribierter RNA) in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l. Die PCR wurde in Glaskapillaren im *LightCycler 2.0* mit folgendem Temperatur- und Zeitprofil durchgeführt: initiale Denaturierung der DNA und Hitzeaktivierung der Taq DNA Polymerase für 10 min bei 95°C, zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung (10 sec bei 95°C), Primer-Anlagerung (5 sec bei einer primerspezifischen Temperatur) und Elongation (primerspezifische Elongationszeit bei 72°C). Die Sequenzen der für die Real-Time PCR verwendeten Primerpaare sind in der vorherigen Tabelle angegeben. Der Zyklus aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation wurde 50 Mal wiederholt. Um die Spezifität des Amplifikats zu überprüfen, wurde im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurve (60-95°C) aufgenommen.

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) mit Hautfibroblasten untersucht. Dazu wurden dermale Fibroblasten mit dem in Überständen (konditioniertem Medium, CM) von SCL-1 enthaltenen Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 behandelt. Dabei stand die durch TGF $\beta$ 1 ausgelöste, intrazelluläre Signaltransduktionskaskade bezüglich der Expression von  $\alpha$ SMA im Zentrum des Interesses. Um die Transdifferenzierung von humanen dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten genauer untersuchen zu können, wurden Experimente bezüglich eines durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gesteuerten Signalwegs, als auch bezüglich eines autokrinen Wirkmechanismus durchgeführt.

#### 3.1 TGF $\beta$ 1 abhängige Expression und Lokalisation von $\alpha$ SMA in Fibroblasten

Um eine zeitabhängige Expression von  $\alpha$ SMA nach der Stimulation mit TGF $\beta$ 1 zu demonstrieren, wurden die Zellen für unterschiedliche Zeit mit rekombinantem TGF $\beta$ 1 behandelt.



**Abb. 9: TGF $\beta$ 1 führt zu einer zeitabhängigen Expression von  $\alpha$ SMA in dermalen Fibroblasten.**

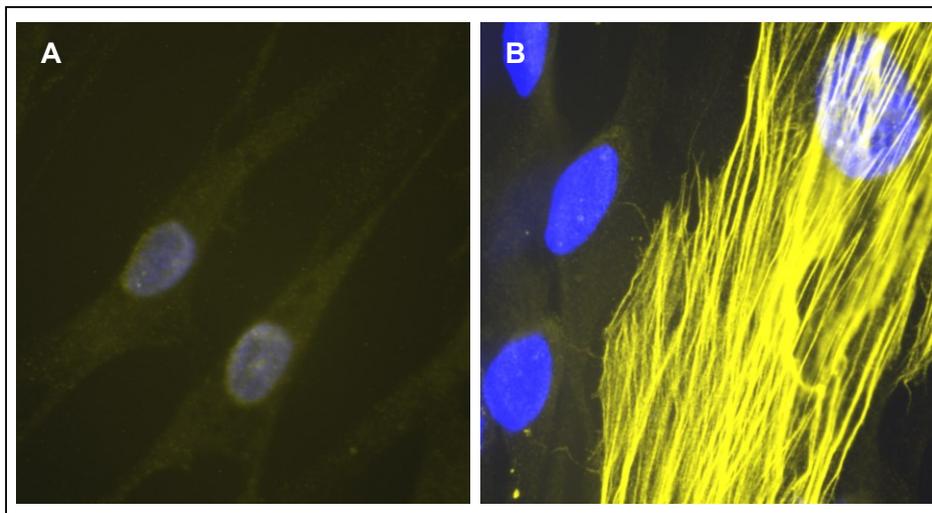
Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt, und anschließend mit rekombinantem TGF $\beta$ 1 (10ng/ml) für 8, 16, 24 und 48 Stunden behandelt. Die Kontrollzellen wurden parallel mit serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend folgte die Immundetektion auf  $\alpha$ SMA mittels Western-Blot-Analyse. Als Ladekontrolle erfolgte die Immundetektion auf  $\alpha$ Tubulin n=5.

In unbehandelten Fibroblasten konnte keine Expression von  $\alpha$ SMA nachgewiesen werden (Abb. 9). Acht Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation zeigte sich eine sehr schwache Expression von  $\alpha$ SMA, nach 16 und 24 Stunden konnte eine steigende Expression von  $\alpha$ SMA

nachgewiesen werden. Die maximale Expression von  $\alpha$ SMA findet sich hier nach 48 Stunden Inkubationszeit.

Zusammenfassend lässt sich eine Korrelation zwischen der Dauer der Inkubation mit TGF $\beta$ 1 und der Expression von  $\alpha$ SMA nachweisen.

Die Ergebnisse des Western-Blots wurden durch immunzytochemische Daten gestützt. Gleichzeitig sollte der Frage nach der räumlichen Anordnung der durch TGF $\beta$ 1-Stimulation gebildeten Stressfasern geklärt werden.



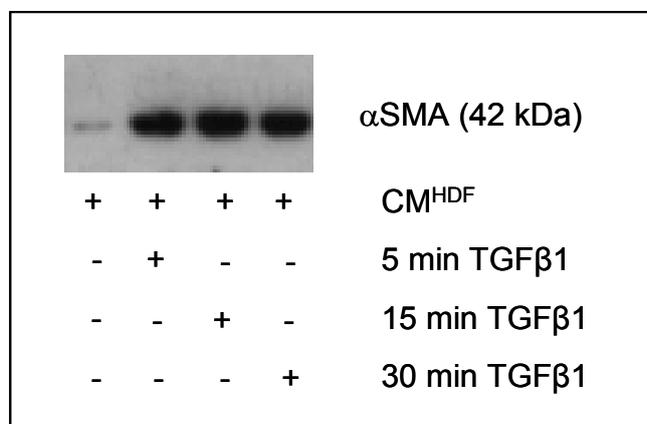
**Abb. 10: Immunzytochemischer Nachweis von  $\alpha$ SMA nach TGF $\beta$ 1-Behandlung.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Im Anschluss daran folgte die Behandlung der Fibroblasten mit rekombinantem TGF $\beta$ 1 für 48 Stunden (Abb B). Die Kontrollzellen wurden parallel mit serumfreiem Medium inkubiert (Abb. A). Anschließend wurden die Zellen gegen das Protein  $\alpha$ -SMA gefärbt n=2.

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden in serumfreiem Medium zeigten die Kontrollzellen keine Stressfasern (Abb. 10A). Dagegen konnten 48 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation immunzytochemisch deutlich die einzelnen Stressfasern intrazellulär nachweisen werden (Abb. 10B). Die Bildung der Stressfasern ist typisch für die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten, und beruht auf TGF $\beta$ 1-induzierter  $\alpha$ SMA-Expression.

Bei den vorhergehenden Experimenten war während der gesamten Inkubationszeit rekombinantes TGF $\beta$ 1 im Zellkulturmedium anwesend. Daraus ergab sich die Frage, ob eine kurzzeitige Inkubation der Zellen mit TGF $\beta$ 1 ausreicht, um die zu  $\alpha$ SMA führende Signalkaskade zu initiieren.

Für diese Untersuchung wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten mit TGF $\beta$ 1 behandelt. Es folgte die Immundetektion auf  $\alpha$ SMA mittels Western Blot Analyse.



**Abb. 11: Die Expression von  $\alpha$ SMA nach 48h ist unabhängig von der Inkubationszeit mit TGF $\beta$ 1.**

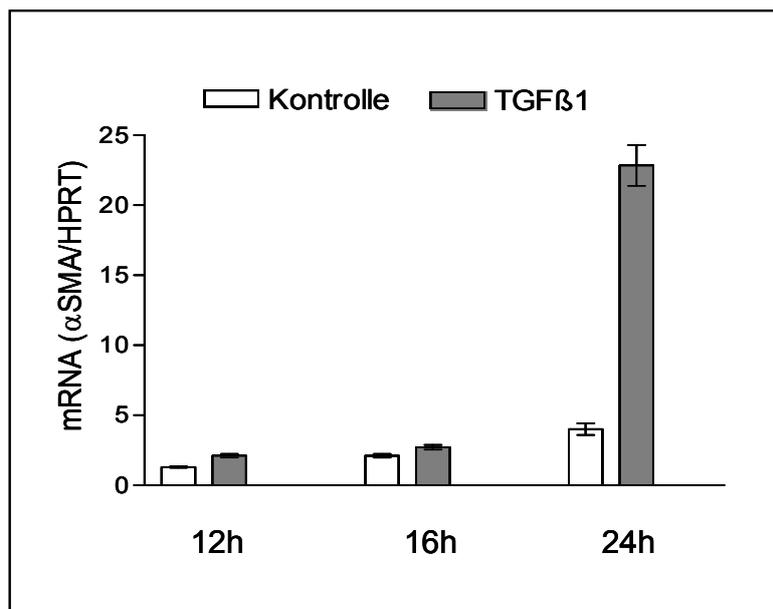
Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Anschließend wurden die Fibroblasten mit TGF $\beta$ 1 (5ng/ml) für 5, 15 und 30 Minuten behandelt. Das TGF $\beta$ 1-haltige Medium wurde jeweils durch serumfreies Medium nach zweimaligem Waschen ersetzt. Die Zellen wurden für insgesamt 48 Stunden inkubiert. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten n=2.

Nach einer Gesamtinkubationszeit von 48 Stunden zeigten die unbehandelten Kontrollzellen eine geringe Expression von  $\alpha$ SMA (Abb 11). Die TGF $\beta$ 1 stimulierten Zellen wiesen eine deutlich höhere  $\alpha$ SMA-Expression auf. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede bezüglich des  $\alpha$ SMA-Proteingehaltes der Fibroblasten nach unterschiedlicher Behandlungsdauer mit TGF $\beta$ 1.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die TGF $\beta$ 1-Expositionszeit in allen folgenden Versuchen auf 10 Minuten beschränkt. Die Zellen wurden nach der TGF $\beta$ 1-Behandlung zweimalig mit serumfreiem Medium gewaschen und weiter inkubiert bzw. behandelt.

### 3.2 TGF $\beta$ 1 abhängige Transkription von $\alpha$ SMA nach TGF $\beta$ 1 in Fibroblasten

Nachdem 48 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation ein Maximum an  $\alpha$ SMA-Protein detektiert werden konnte, sollte der Zeitpunkt der Bildung der dazu gehörenden mRNA genauer untersucht werden. Mit Hilfe der Real-Time-PCR-Methode wurden die zuvor unterschiedlich lange mit TGF $\beta$ 1 behandelten Proben aufgearbeitet.



**Abb. 12: TGFβ1 erhöht die Transkription von αSMA in Fibroblasten.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Im Anschluss daran folgte die 10 minütige Behandlung der Fibroblasten mit rekombinantem TGFβ1 (5ng/ml) und einer anschließenden Inkubationszeit von 12, 16 und 24 Stunden. Die Kontrollzellen wurden parallel mit serumfreiem Medium inkubiert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte mit Hilfe der Real-Time-PCR-Methode n=3.

Die Behandlung mit rekombinantem TGFβ1 führte nach 24 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung des αSMA-mRNA-Gehaltes (Abb.12). Im Vergleich zu den Kontrollzellen war die Menge an αSMA-mRNA nach 24 Stunden um den Faktor 5 größer. Nach 12 und 16 Stunden lässt sich eine nur geringe Erhöhung αSMA-mRNA nach TGFβ1-Behandlung messen (Abb 12).

### 3.3 Untersuchung einer autokrinen Wirkung durch TGFβ1 auf Fibroblasten

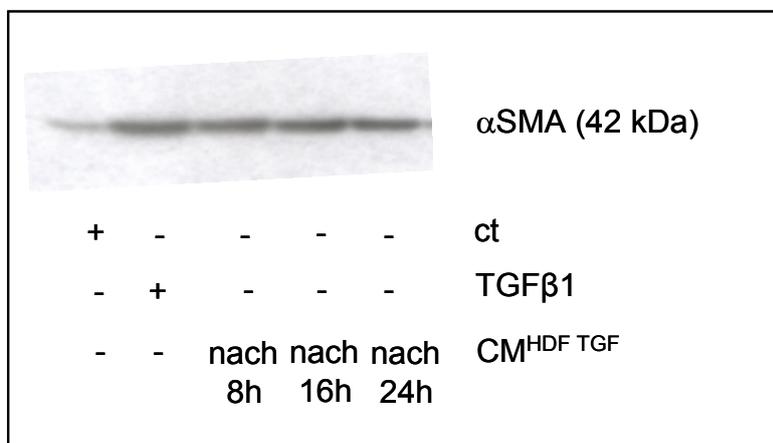
In den Untersuchungen zum zeitlichen Erscheinen von αSMA wurde deutlich, dass die αSMA-mRNA und das αSMA-Protein erst zu vergleichsweise späten Zeitpunkten nachgewiesen werden konnten. Wie auch z.B. die Matrix-Metalloproteinasen (MMT) [Brenneisen et al. 1998, Wlaschek et al. 1994] oder die Metallothioneine (MT) [Muhammad Zafarullah et al. 1992] scheint αSMA zu den „late responsive genes“ zu gehören.

Aufgrund dieser Tatsache stellte sich hier die Frage nach einem durch TGFβ1 initiierten zellulären Mechanismus. Aus diesem Grund lag es nahe, im Folgenden die Möglichkeit eines autokrinen Wirkmechanismus zu untersuchen.

### 3.3.1 Wirkung von konditioniertem Medium (CM<sup>HDFnachTGF</sup>) auf Fibroblasten

Es sollte der Effekt von konditioniertem Medium (CM), von zuvor mit TGFβ1 stimulierten Fibroblasten (CM<sup>HDFnachTGF</sup>) auf unbehandelte Zellen untersucht werden. Durch die Wirksamkeit der Zellüberstände auf die Fibroblasten sollte neben TGFβ1 [Stuhlmann et al. 2004] ein weiterer möglicher löslicher Faktor, welcher für den zeitlich verzögerten Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten von Bedeutung ist, identifiziert werden können.

Fibroblasten wurden mit Zellüberständen von TGFβ1-stimulierten Fibroblasten behandelt. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde mit Hilfe des Western Blot Verfahrens die αSMA-Proteinmenge detektiert.



**Abb. 13: Wirkung von konditioniertem Medium (CM<sup>HDFnachTGF</sup>) auf Fibroblasten.**

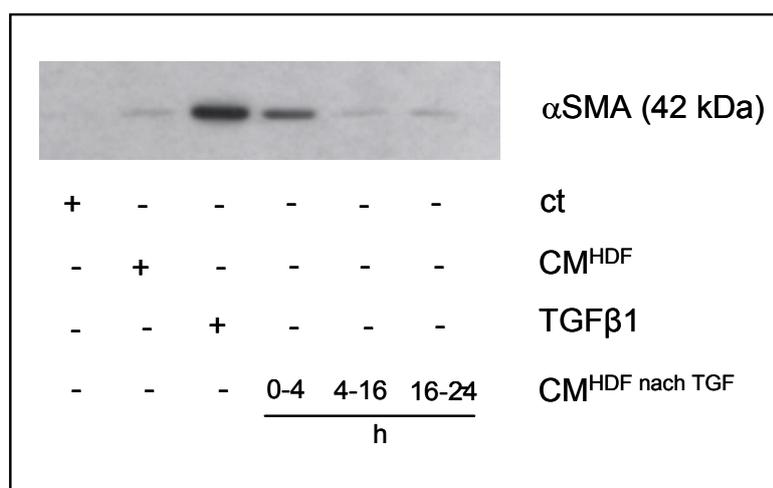
Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden die Fibroblasten auf serumfreies Medium gesetzt, bevor eine 10-minütige Behandlung mit rekombinantem TGFβ1 (10ng/ml) durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit serumfreiem Medium gewaschen. Daraufhin wurden zeitabhängig nach 8, 16 und 24 Stunden die Zellüberstände (CM<sup>HDFnachTGF 8h, 16h, 24h</sup>) isoliert. Diese Überstände wurden dann auf unbehandelte, synchronisierte Fibroblasten gegeben. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten und als Positivkontrolle wurden Zellen untersucht, welche ausschließlich mit rekombinantem TGFβ1 für 48 Stunden behandelt wurden n=1.

Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten eine deutlich geringere αSMA-Proteinmenge als die mit TGFβ1 stimulierten Kontrollzellen nach 48 Stunden Inkubationszeit. Ebenfalls eine erhöhte αSMA-Expression zeigten die Fibroblasten, welche mit den Zellüberständen der TGFβ1-stimulierten Fibroblasten behandelt wurden (CM<sup>HDFnachTGF 8h, 16h, 24h</sup>).

Dieses Experiment zeigt, dass alle Fibroblasten auf das konditionierte Medium (CM<sup>HDFnachTGF 8h, 16h, 24h</sup>) mit einer Expression von αSMA reagiert haben (Abb. 13). Damit wird zunächst die

Existenz eines löslichen Faktors in den Zellüberständen bestätigt, welcher für die Transdifferenzierung von Fibroblasten verantwortlich ist.

Um eine genauere zeitliche Einordnung in die  $\alpha$ SMA-Signalkaskade zu bekommen, sollte im Folgenden die Wirkung von konditioniertem Medium ( $\text{CM}^{\text{HDFnachTGF}}$ ) aus verschiedenen Zeitfenstern auf Fibroblasten untersucht werden. Es folgte eine Immundetektion auf das Protein  $\alpha$ SMA.



**Abb. 14: Wirkung von konditioniertem Medium ( $\text{CM}^{\text{HDFnachTGF}}$ ) aus verschiedenen Zeitfenstern auf Fibroblasten.**

Die Fibroblasten wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Als Positivkontrolle wurden Zellen untersucht, welche ausschließlich mit rekombinantem TGF $\beta$ 1 (10ng/ml) für 48 Stunden behandelt wurden und als Negativkontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten. Bei der Herstellung von konditioniertem Medium ( $\text{CM}^{\text{HDF}}$ ) wurden die Überstände unstimulierter Zellen gesammelt, auf Fibroblasten gegeben und als zweite Negativkontrolle verwendet. Bei der Herstellung von konditioniertem Medium ( $\text{CM}^{\text{HDFnachTGF}}$ ) wurde eine 10 minütige Behandlung mit rekombinantem TGF $\beta$ 1 durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit serumfreiem Medium gewaschen. Daraufhin wurden die Zellüberstände in verschiedenen Zeitfenstern 0-4, 4-16 und 16-24 Stunden ( $\text{CM}^{\text{HDFnachTGF 0-4h, 4-16h, 16-24h}}$ ) isoliert. Dabei wurden vor Isolierung des zweiten und dritten Zeitfensters die Zellen erneut mit serumfreiem Medium gewaschen. Dieses konditionierte Medium wurde dann auf unbehandelte, synchronisierte Fibroblasten gegeben. Die Inkubationszeit der mit Überständen behandelten Zellen betrug 48 Stunden n=3.

Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten ebenso wie die mit  $\text{CM}^{\text{HDF}}$  behandelten Zellen eine deutlich geringere  $\alpha$ SMA-Proteinmenge, als die mit rekombinantem TGF $\beta$ 1 stimulierten Kontrollzellen nach 48 Stunden Inkubationszeit (Abb.14).

Die  $\alpha$ SMA-Expression der mit konditioniertem Medium aus dem ersten Zeitfenster 0-4 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation ( $\text{CM}^{\text{HDFnachTGF 0-4h}}$ ) behandelten Fibroblasten ist deutlich

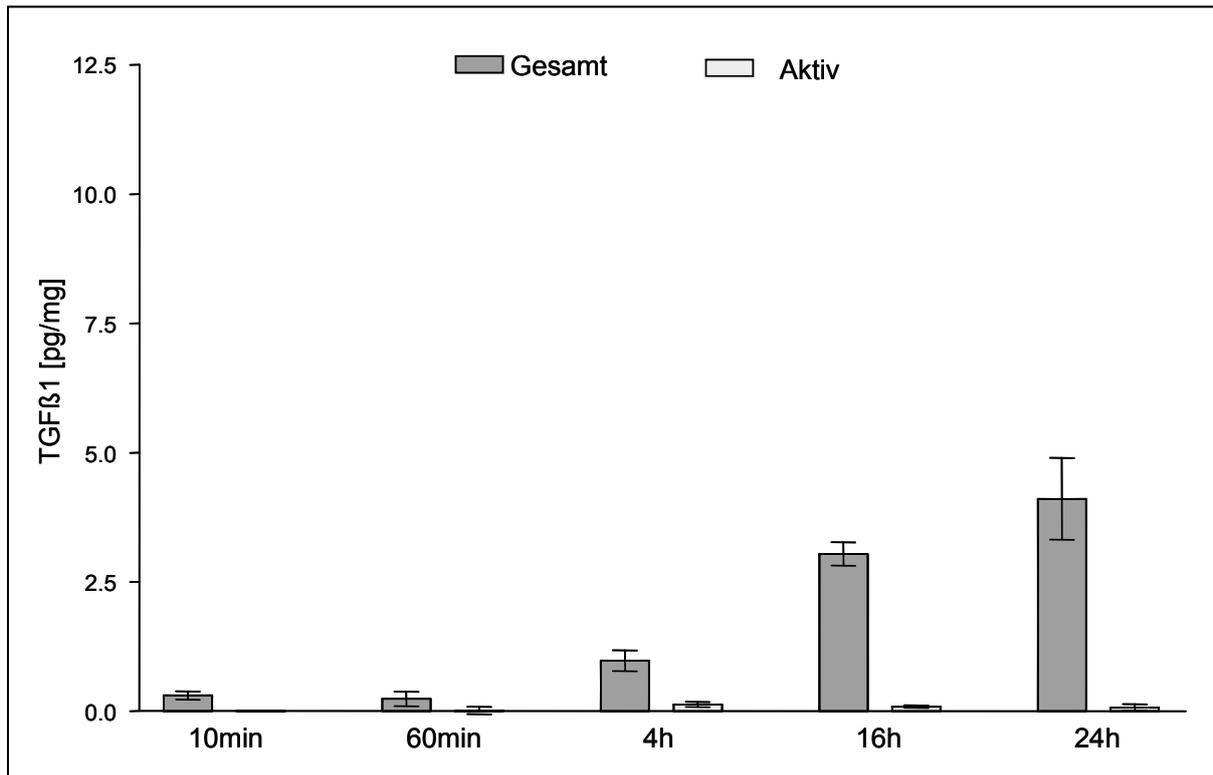
erhöht im Vergleich zu den Zellen, welche mit konditioniertem Medium aus dem zweiten Zeitfenster 4-16 Stunden ( $\text{CM}^{\text{HDFnachTGF}}_{4-16\text{h}}$ ) und dritten Zeitfenster 16-24 Stunden ( $\text{CM}^{\text{HDFnachTGF}}_{16-24\text{h}}$ ) nach TGF $\beta$ 1-Stimulation behandelt wurden. Deren  $\alpha$ SMA-Expression ist vergleichbar hoch wie die der mit  $\text{CM}^{\text{HDF}}$  behandelten Kontrollzellen (Abb.15).

Das konditionierte Medium aus dem ersten Zeitfenster nach TGF $\beta$ 1-Stimulation zeigt Wirkung auf die Fibroblasten in Form von erhöhter Expression von  $\alpha$ SMA. Damit wird entweder die Existenz eines möglichen löslichen Faktors, welcher kurzfristig sezerniert wird und für die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten eine wichtige Rolle spielen könnte bestätigt, oder es könnte sich um eine Fehlmessung handeln. Am ehesten denkbar wäre ein Eliminierungsproblem des rekombinanten TGF $\beta$ 1 von der Zelloberfläche der Fibroblasten und damit aus den Zellüberständen.

Um dieser These nachzugehen sollte im Folgenden mit Hilfe der ELISA-Technik (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) die Menge an TGF $\beta$ 1 in Fibroblastenüberständen quantifiziert werden.

### **3.3.2 Quantifizierung von TGF $\beta$ 1 in konditionierten Medien ( $\text{CM}^{\text{HDFnachTGF}}$ ) von Fibroblasten**

Zur Messung der Menge an TGF $\beta$ 1 in Fibroblastenüberständen wurde ein Immunoassay-Verfahren verwendet. Die Messung erfolgte für die Gesamtmenge (aktives und inaktives TGF $\beta$ 1) an TGF $\beta$ 1.

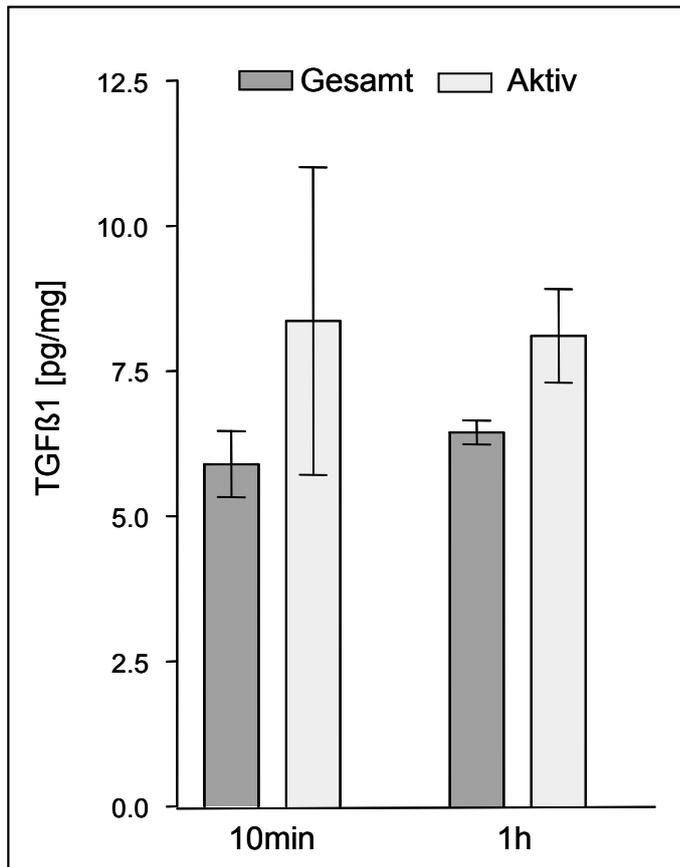


**Abb. 15: Zeitabhängigkeit der TGFβ1-Sekretion unstimulierter Fibroblasten.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Anschließend wurden die Zellüberstände nach 10 Minuten, 60 Minuten, 4 Stunden, 16 Stunden, 24 Stunden isoliert und aufgearbeitet. Dabei wurde sowohl die Gesamtmenge an TGFβ1 (dunkler Balken), als auch die aktive Menge an TGFβ (heller Balken) bestimmt. Alle Zeitwerte hatten im Versuchsaufbau den Endpunkt nach 24 Stunden  $n=1$ . Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. .

Über die Zeit von 24 Stunden stieg die detektierbare Gesamtmenge an TGFβ1 stetig an (Abb. 15). Bei der detektierten Menge an TGFβ1 handelte es sich fast ausschließlich um inaktives TGFβ1. Dieses Ergebnis legt nahe, dass unbehandelte Fibroblasten über die Zeit eine zunehmende Menge an inaktivem TGFβ sezernieren.

Um Informationen über die Menge an TGFβ1 in konditioniertem Medium TGFβ1-stimulierter Zellen ( $CM^{HDF_{nachTGF}}$ ) zu bekommen, erfolgte die Messung von TGFβ1 nach dem Immunoassay-Verfahren.

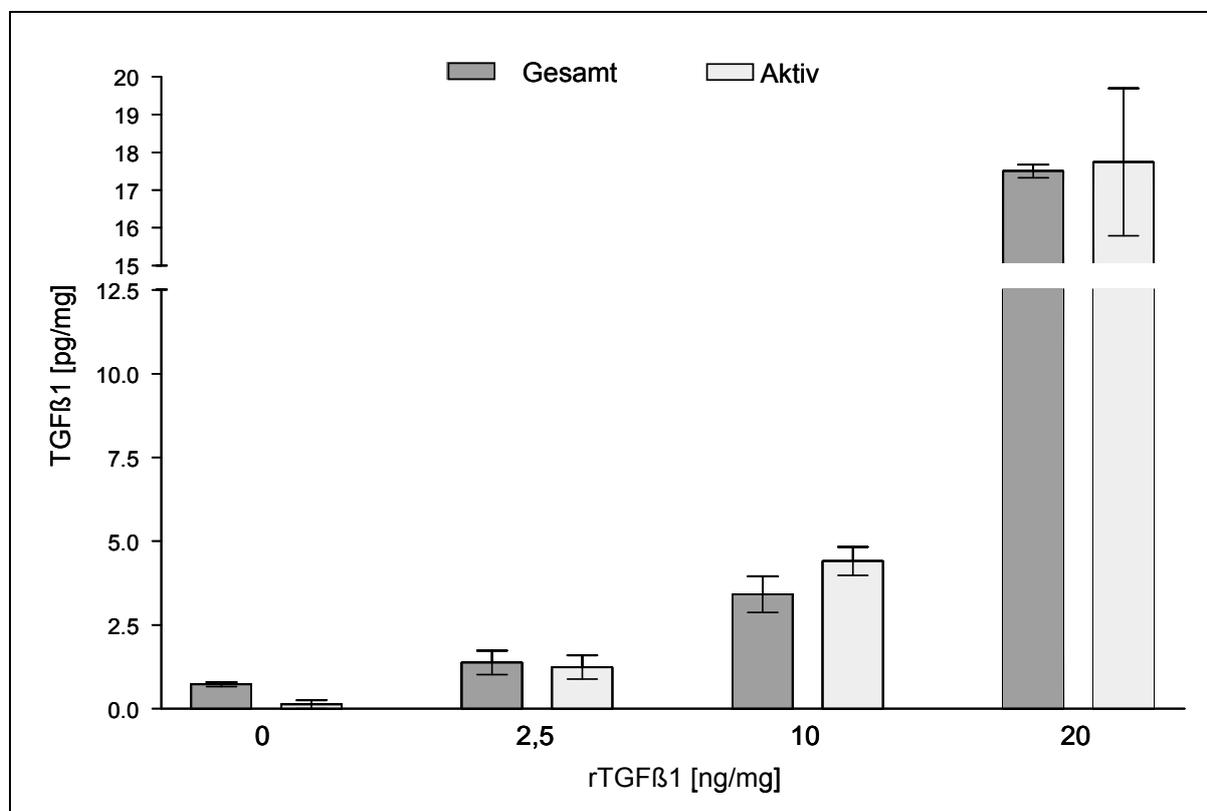


**Abb. 16: Menge an TGFβ1 in konditioniertem Medium (CM<sup>HDFnachTGF 10min., 1h</sup>) TGFβ1-stimulierter Fibroblasten.**

Die Zellen wurden auf serumfreies Medium gesetzt. Anschließend wurden die Hautfibroblasten für 10 Minuten mit TGFβ1 (10ng/ml) behandelt, dann zweimalig mit serumfreiem Medium gewaschen und im Folgenden mit serumfreiem Medium weiter inkubiert. Nach 10 Minuten und nach 1 Stunde wurden die Zellüberstände (CM<sup>HDFnachTGF 10min., 1h</sup>) isoliert und aufgearbeitet. Dabei wurde sowohl die Gesamtmenge an TGFβ1 (dunkler Balken), als auch die aktive Menge an TGFβ1 (helle Säule) bestimmt n=1. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. .

Die Menge an detektierbarem TGFβ1 in konditioniertem Medium TGFβ1-stimulierter Zellen und anschließenden Waschvorgängen war nach 10 Minuten (CM<sup>HDFnachTGF 10min</sup>) und nach 1 Stunde (CM<sup>HDFnachTGF 1h</sup>) nahezu identisch. Es zeigte sich schon nach 10 Minuten eine hohe TGFβ1-Menge im Zellüberstand. Nach 1 Stunde zeigt sich eine vergleichbar hohe TGFβ1-Menge im Zellüberstand. Es wird ebenfalls deutlich, dass es sich bei den analysierten TGFβ1-Mengen aus den Zellüberständen, um fast ausschließlich aktives TGFβ1 handelt. Damit liegt die Vermutung nahe, dass das zur Stimulation verwendete rekombinante TGFβ1 durch die Waschschritte nicht vollständig entfernt werden konnte.

Um diese These weiter zu stützen, sollte in einem weiteren Versuchsansatz geklärt werden, ob eine stetige Zunahme der Stimulationskonzentration an rekombinatem TGF $\beta$ 1 mit der zu messenden Menge an TGF $\beta$ 1 in den Zellüberständen im ELISA korreliert.



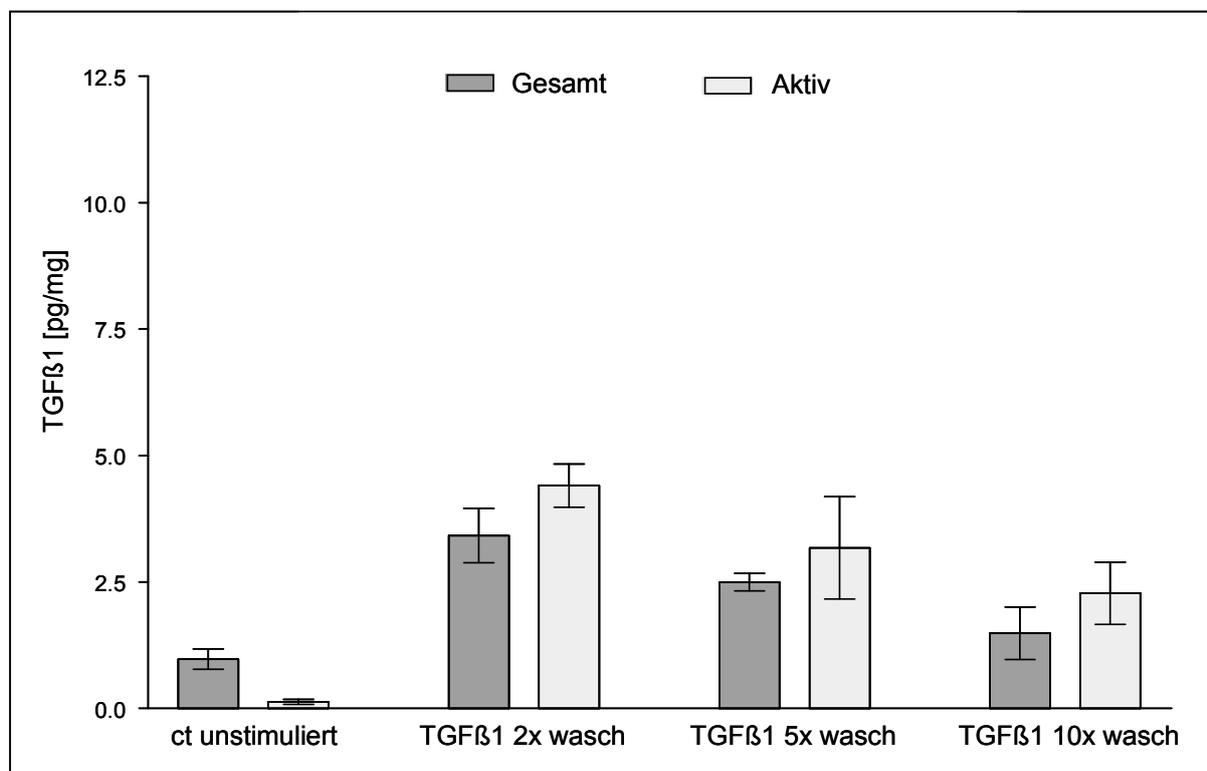
**Abb. 17: Korrelation der TGF $\beta$ 1-Stimulationsmenge mit der TGF $\beta$ 1-Menge in konditioniertem Medium TGF $\beta$ 1-stimulierter Fibroblasten (CM<sup>HDFnachTGF 4h</sup>).**

Die Zellen wurden auf serumfreies Medium gesetzt. Anschließend wurden die Hautfibroblasten für 10 Minuten mit unterschiedlichen TGF $\beta$ 1-Mengen (2,5, 10 und 20ng/ml TGF $\beta$ 1) behandelt, dann zweimalig mit serumfreiem Medium gewaschen und im Folgenden mit serumfreiem Medium für weitere 4 Stunden inkubiert (CM<sup>HDFnachTGF 4h</sup>). Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten. Die Zellüberstände wurden isoliert und es wurde sowohl die Gesamtmenge an TGF $\beta$ 1 (dunkler Balken), als auch die aktive Menge an TGF $\beta$ 1 (heller Balken) bestimmt n=1. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. .

Unbehandelte Kontrollzellen zeigten eine minimale Menge an TGF $\beta$ 1 im Zellüberstand, wobei es sich um inaktives TGF handelte. Mit steigender TGF $\beta$ 1-Stimulationskonzentration ließ sich eine steigende TGF $\beta$ 1-Menge in den Zellüberständen detektieren. Dabei handelte es sich um ausschließlich aktives TGF $\beta$ 1.

Aufgrund dieser Ergebnisse bestätigt sich die Tatsache, dass es sich bei der gemessenen TGF $\beta$ 1-Menge um rekombinantes TGF $\beta$ 1 aus dem Stimulationsprozess handelt.

Ein weiterer Versuchsansatz soll diese These ebenfalls bestätigen. Die TGF $\beta$ 1-Menge in Zellüberständen von TGF $\beta$ 1-stimulierten Zellen wurde in Abhängigkeit von mehrfach durchgeführten Mediumwechseln bestimmt.



**Abb. 18: Korrelation der TGF $\beta$ 1-Menge in konditioniertem Medium TGF $\beta$ 1-stimulierter Fibroblasten mit der Anzahl an wiederholten Mediumwechsel, bei gleichbleibender TGF $\beta$ 1-Stimulationskonzentration.**

Die Zellen wurden auf serumfreies Medium gesetzt. Anschließend wurden die Hautfibroblasten für 10 Minuten mit gleichen TGF $\beta$ 1-Mengen (10ng/ml) behandelt, und anschließend unterschiedlich oft (2 mal, 5 mal und 10 mal) mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Fibroblasten für 4 Stunden inkubiert. Als Kontrollzellen dienen unbehandelte Fibroblasten. Die Zellüberstände wurden isoliert und es wurde die Gesamtmenge an TGF $\beta$ 1 bestimmt n=1. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. .

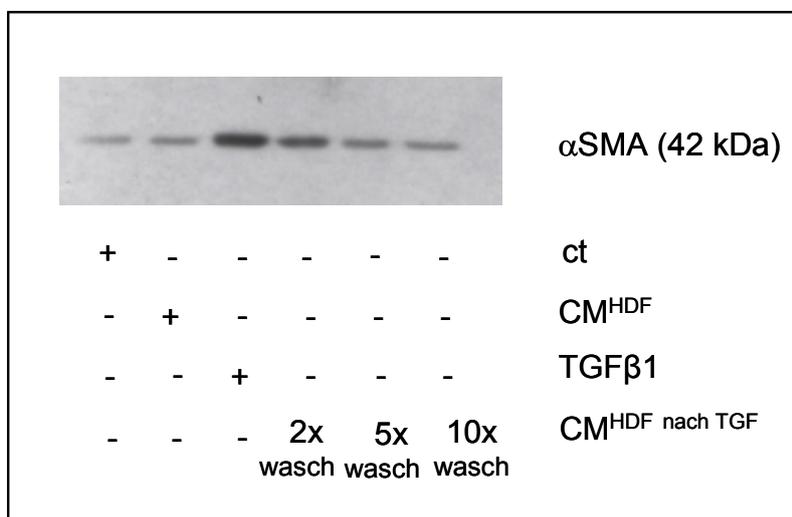
Nach 4 Stunden zeigten die unbehandelte Kontrollzellen eine basale Menge an endogenem TGF $\beta$ 1 im Zellüberstand (Abb. 18). In den Zellüberständen der TGF $\beta$ 1-stimulierten Zellen, zeigte sich in Abhängigkeit von der Anzahl der durchgeführten Mediumwechsel eine unterschiedlich hohe TGF $\beta$ 1-Menge. Die maximal detektierte Menge an TGF $\beta$ 1 ließ sich im Anschluss an die zweimaligen Mediumwechsel nach der TGF $\beta$ 1-Stimulation nachweisen. Die TGF $\beta$ 1-Menge in den Zellüberständen sank mit der Anzahl der durchgeführten Mediumwechsel.

Hiermit erhärtet sich der Verdacht, dass es sich bei der Bestimmung der TGF $\beta$ 1-Menge in den Zellüberständen um nur das zur Stimulation benutzte rekombinante TGF $\beta$ 1 handelt.

### 3.3.3 Wirkung von konditioniertem Medium (CM<sup>HDFnachTGF</sup>) auf Fibroblasten in Abhängigkeit von der Anzahl der wiederholten Mediumwechsel im Anschluss an den Stimulationsprozess

Da vorherige Experimente gezeigt haben, dass konditioniertes Medium (CM<sup>HDFnachTGF 0-4h</sup>) TGF $\beta$ 1-stimulierter Fibroblasten Wirkung auf unstimulierte Zellen in Form einer erhöhten Expression von  $\alpha$ SMA zeigt (Abb.15), musste dieses Ergebnis nach den Erkenntnissen aus weiteren Versuchen (Abb.17, 18 und 19) bezüglich der Möglichkeit der auch hier wirksam werdenden Eliminierungsproblematik aus den Zellüberständen überprüft werden.

Es folgte die Untersuchung der Wirkung konditioniertem Medium TGF $\beta$ 1-stimulierter Zellen (CM<sup>HDFnachTGF</sup>) auf Fibroblasten in Abhängigkeit von der Anzahl der wiederholten Mediumwechsel im Anschluss an den Stimulationsprozess mit Hilfe des Western Blot Verfahrens.



**Abb. 19: Wirkung von konditioniertem Medium TGF $\beta$ 1-stimulierter Zellen (CM<sup>HDF nach TGF</sup>) auf Fibroblasten in Abhängigkeit von der Anzahl der wiederholten Mediumwechsel im Anschluss an den Stimulationsprozess.**

Alle Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Als Positivkontrolle wurden Zellen untersucht, welche ausschließlich mit rekombinantem TGF $\beta$ 1 (5ng/ml) für 48 Stunden behandelt wurden und als Negativkontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten. Bei der Herstellung von konditioniertem Medium (CM<sup>HDF</sup>) wurden die Überstände unstimulierter Zellen gesammelt, auf Fibroblasten gegeben und als zweite Negativkontrolle verwendet. Bei der Herstellung von konditioniertem Medium (CM<sup>HDFnachTGF</sup>) wurde eine 10

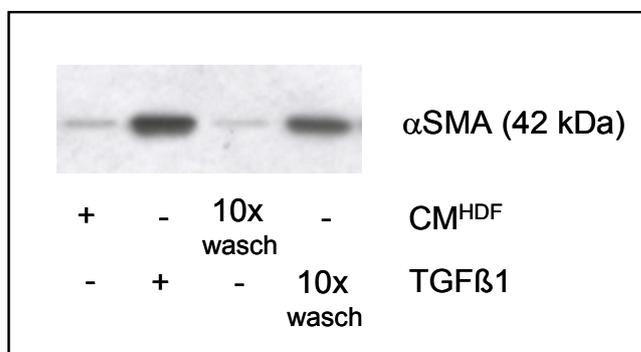
minütige Behandlung mit rekombinantem TGF $\beta$ 1 durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen unterschiedlich oft (2 mal, 5 mal, 10 mal) mit serumfreiem Medium gewaschen und für insgesamt 48 Stunden inkubiert. Es folgte eine Immundetektion auf  $\alpha$ SMA n=2.

Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten ebenso wie die mit CM<sup>HDF</sup> behandelten Zellen eine deutlich geringere  $\alpha$ SMA-Proteinmenge, als die mit rekombinantem TGF $\beta$ 1 stimulierten Kontrollzellen nach 48 Stunden Inkubationszeit.

Die  $\alpha$ SMA-Expression der Zellen, welche mit dem CM<sup>HDF</sup> nach TGF<sup>F</sup> behandelt wurden, welches im Anschluss an den Stimulationsprozess zweimaligen Mediumwechseln unterlag, war deutlich erhöht, im Vergleich zu mehrfach durchgeführten Mediumwechseln im Anschluss an den Stimulationsprozess. Werden die Zellen im Anschluss an die TGF $\beta$ 1-Stimulation mehr als 5 mal mit serumfreiem Medium gewaschen, und damit häufiger als es der normalen Versuchsprozedur entspricht, zeigen die mit diesen Zellüberständen behandelten Fibroblasten eine vergleichbar hohe  $\alpha$ SMA-Proteinmenge, wie die Kontrollzellen (Abb. 19).

Damit ist die in Abbildung 15 dargestellte Wirksamkeit von Zellüberständen (CM<sup>HDF</sup>nachTGF<sup>F</sup>) widerlegt. Der Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit von Zellüberständen stimulierter Zellen auf unbehandelte Fibroblasten und der Anzahl der durchgeführten Mediumwechsel im Anschluss an den Stimulationsprozess ist damit bewiesen.

Für das weitere Vorgehen war es wichtig zu wissen, ob die unphysiologischen mehrfach durchgeführten Waschvorgänge zu einer Beeinflussung der  $\alpha$ SMA-Expression über mögliche Stressvorgänge in der Zelle führen. Um dieser Vermutung nachzugehen, folgte ein weiterer Versuchsansatz.



**Abb. 20: Mehrfach durchgeführte Mediumwechsel beeinflussen die Expression von  $\alpha$ SMA nicht.**

Subkonfluente Fibroblasten wurden auf serumfreies Medium gesetzt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Hautfibroblasten. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen ausschließlich mit TGF $\beta$ 1 (10ng/ml) behandelt. Es wurden sowohl die unbehandelte Kontrollfibroblasten, als auch die mit TGF $\beta$ 1 behandelten Zellen im Anschluss an den Stimulationsprozess 10mal mit serumfreiem Medium gewaschen. Nach 48 Stunden Gesamtkubationszeit wurden die Fibroblasten immunologisch auf  $\alpha$ SMA untersucht n=1.

Die unbehandelten Kontrollzellen wiesen ebenso wie die 10-fach gewaschenen Kontrollzellen ohne TGF $\beta$ 1-Stimulation eine geringe  $\alpha$ SMA-Expression auf. Die TGF $\beta$ 1-stimulierten Kontrollzellen zeigten ebenso wie die 10-fach gewaschenen TGF $\beta$ 1-behandelten Zellen eine erhöhte  $\alpha$ SMA-Expression (Abb.20). Soweit beurteilbar scheint damit die  $\alpha$ SMA-Signalkaskade trotz der wiederholten Mediumwechsel nicht beeinflusst zu sein.

Ein autokriner Wirkmechanismus ausgelöst durch TGF $\beta$ 1 ist anhand der durchgeführten Experimente nicht sicher auszuschließen, erscheint aber aufgrund der bisherigen Ergebnisse unwahrscheinlich zu sein.

Die vorherigen Untersuchungen bezüglich eines durch TGF $\beta$ 1 ausgelösten autokrinen Mechanismus haben sich als schwierig dargestellt. Daraus ergab sich, dass im weiteren Verlauf der Arbeit vermehrt die intrazellulären Effekte des Transdifferenzierungsprozesses von Fibroblasten zu Myofibroblasten im Mittelpunkt standen.

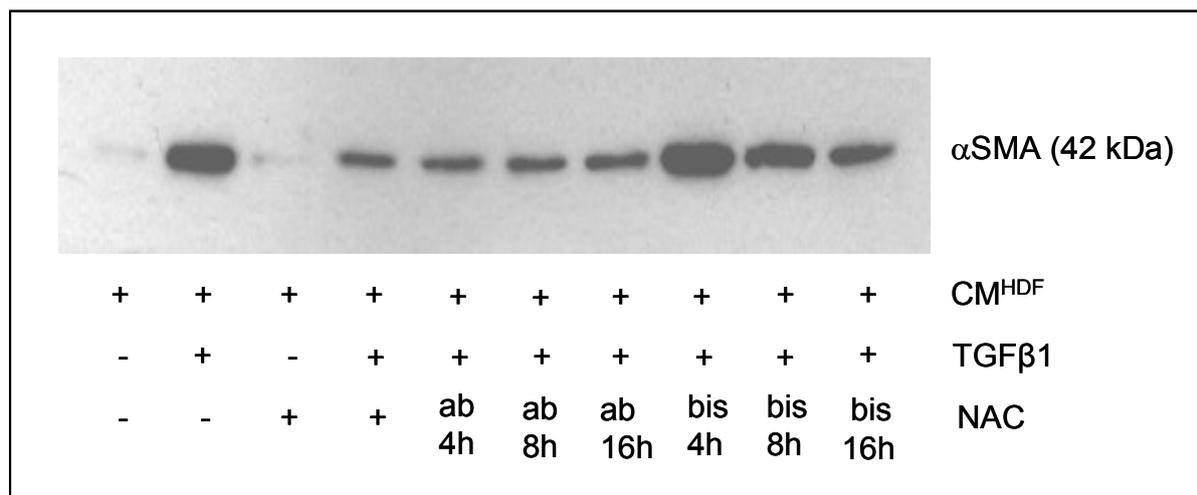
### **3.4 Zeitverlauf der von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) abhängigen Transdifferenzierung von Fibroblasten**

Es ist bekannt, dass TGF $\beta$ 1 den Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies ROS innerhalb der Zelle erhöhen kann [Thannikal und Fanburg, 2000]. Durch den Einsatz von antioxidativ wirkenden Substanzen wie N-acetyl-L-cystein (NAC), Selen und wasserlöslichen alpha-Tocopherol, einem Inhibitor der Lipidperoxidation, konnte die durch TGF $\beta$ 1 initiierte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten vermindert werden [Cat et al. 2006]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die durch TGF $\beta$ 1 vermittelte parakrine Wirkung in Form von verminderter Zell-Zell-Kommunikation über gap junctions durch den Einsatz von Antioxidantien verhindert werden konnte [Stuhlmann et al., 2004].

Um die Abhängigkeit der zur Expression von  $\alpha$ SMA führenden Signalkaskade von reaktiven Sauerstoffspezies genauer charakterisieren zu können, wurde das antioxidativ wirksame N-acetyl-L-cystein (NAC) eingesetzt. Die Funktion des NAC als Radikalfänger ergibt sich aus seiner chemischen Struktur. Die freie SH-Gruppe kann direkt mit Prooxidantien, wie

Hydroxylradikalen, Wasserstoffperoxiden und Stickstoffmonoxiden (-SOH, -SO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H) reagieren, oder nitosyliert (-SNO) werden [Aruoma et al, 1998].

Um die von ROS abhängigen Signalvorgänge zeitlich besser einordnen zu können, wurden Fibroblasten im Anschluss an die TGFβ1-Stimulation für unterschiedlich lange Zeit mit NAC behandelt. Dabei wurde zeitabhängig nach der Stimulation das NAC hinzugegeben, oder das NAC war schon während der Stimulationsphase wirksam und wurde zeitabhängig entfernt.



**Abb. 21: Zeitabhängigkeit der αSMA-Expression von NAC.**

Alle Zellen wurden auf serumfreies Medium gesetzt und insgesamt für eine Versuchszeit von 48 Stunden inkubiert. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten oder Zellen die lediglich mit NAC (5mM) behandelt wurden. Die Positivkontrollen bestanden aus TGFβ1-stimulierten Zellen (10ng/ml) und aus Fibroblasten, welche 4 Stunden mit NAC vorinkubiert, anschließend mit TGFβ1 behandelt und nach 10 minütiger Stimulationszeit weiter mit NAC inkubiert wurden. Die Versuchszellen wurden zeitabhängig unterschiedlich lange mit NAC behandelt. Zum einen wurde jeweils 4, 8, und 16 Stunden nach TGFβ1-Behandlung NAC auf die Zellen hinzugegeben. Zum anderen wurde nach 4-stündiger NAC-Vorinkubationszeit und anschließender TGFβ1-Behandlung das NAC-haltige Medium nach 4, 8 und 16 Stunden nach TGFβ1-Stimulation entfernt und durch serumfreies Medium ersetzt. Um eine mögliche Interaktion auszuschließen war während der TGFβ1-Stimulation das NAC jeweils für 10 Minuten nicht anwesend. Die αSMA-Expression der Zellen wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse dargestellt n=6.

Unbehandelte Kontrollzellen zeigten, sowie ausschließlich mit NAC behandelte Zellen, eine basale αSMA-Menge. Die nur mit TGFβ1 behandelten Fibroblasten wiesen eine deutlich erhöhte αSMA-Expression im Vergleich zu den mit NAC und TGFβ1 behandelten Zellen auf. Bei Zugabe des NACs nach 4, 8 und 16 Stunden nach TGFβ1-Stimulation zeigte sich ein verminderter αSMA-Proteingehalt. Wurde das NAC durch Mediumwechsel von den Zellen entfernt, war 4 Stunden nach Stimulation ein etwa vergleichbar hohes αSMA-Signal wie bei den ausschließlich mit TGFβ1-behandelten Zellen zu detektieren. Je länger das NAC nach

Stimulation mit TGF $\beta$ 1 auf den Fibroblasten blieb, desto weniger  $\alpha$ SMA wurde gebildet, so dass bei Entfernen des NACs 16 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation nur noch eine geringe  $\alpha$ SMA-Expression nachgewiesen werden konnte (Abb.21).

Zunächst ließ sich feststellen, dass in Anwesenheit von NAC die  $\alpha$ SMA-Expression nach TGF-Stimulation geringer war, als bei alleiniger TGF $\beta$ 1-Behandlung, wobei der  $\alpha$ SMA-Proteingehalt nicht vollständig auf Höhe der unbehandelten Kontrollzellen zurück gegangen ist. Damit unterliegt die Transdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten einem ROS-vermittelten Prozess.

Desweiteren zeigte dieser Versuch, dass die reaktiven Sauerstoffspezies einen späten Effekt auf das  $\alpha$ SMA-Signaling haben müssen, denn auch bei einer NAC-Zugabe erst nach 8 und 16 Stunden nach Stimulation stellte sich noch eine antioxidative Wirkung ein.

Desweiteren zeigte das vorliegende Experiment, dass der antioxidative Effekt in den Fibroblasten zeitlich an die NAC-Anwesenheit gebunden ist. Entfernt man das NAC innerhalb der ersten 4 Stunden der Signaltransduktionskaskade, stellte sich nach 48 Stunden Inkubationszeit nach TGF $\beta$ 1-Stimulation eine vergleichbar hohe  $\alpha$ SMA-Proteinmenge dar wie die ausschließlich mit der TGF $\beta$ 1-behandelten Kontrollzellen. Je länger das antioxidativ wirksame NAC nach TGF $\beta$ 1-Stimulation auf den Zellen blieb, desto geringer war die  $\alpha$ SMA-Expression nach 48 Stunden Inkubationszeit.

Daraus kann man schließen, dass der Zeitraum zwischen 4 und 16 Stunden hauptsächlich entscheidend für die ROS-abhängige  $\alpha$ SMA-Signalkaskade ist.

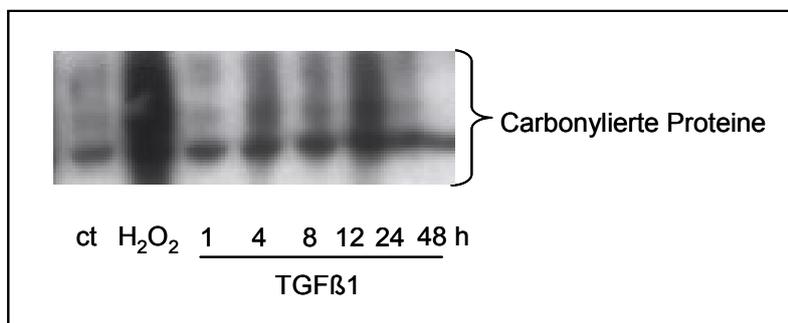
In den folgenden Untersuchungen sollte das Auftreten und die Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies im zellulären System direkt anhand von oxidierten Proteinen nachgewiesen werden.

### **3.5 Proteinoxidation nach TGF $\beta$ 1-induzierter Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies**

Ein Biomarker für das Vorhandensein von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im zellulären System sind carbonylierte Proteine, die als Sekundärprodukte bei oxidativem Stress entstehen. Carbonyle entstehen durch Oxidation von Proteinseitenketten und geben einen Hinweis zum oxidativen Status einer Zelle.

Proteincarbonyle können mittels eines modifizierten Western-Blots nachgewiesen werden (Oxyblot-Verfahren: siehe Material/Methoden). Von besonderem Interesse war es

herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt die oxidierten Proteine in der durch TGF $\beta$ 1 induzierten Signalkaskade entstehen.



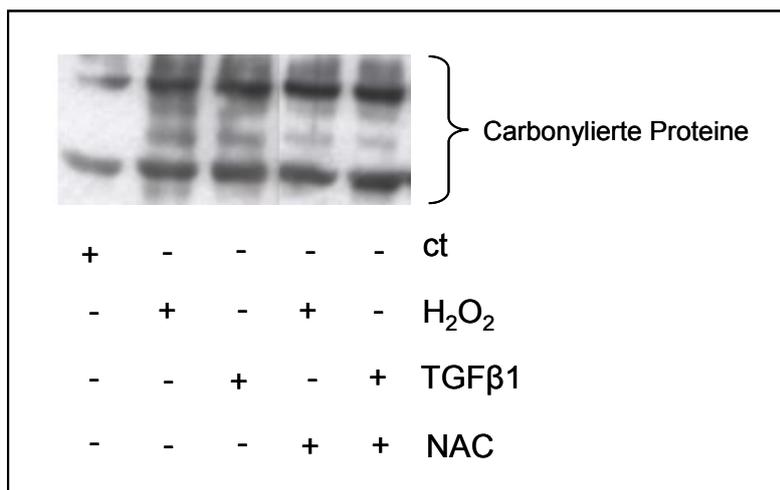
**Abb. 22: TGF $\beta$ 1-initiierte ROS oxidieren Proteine. Zeitlicher Verlauf des Carbonylstatus der Zellen nach TGF $\beta$ 1-Behandlung.**

Subkonfluente Fibroblasten wurden auf serumfreies Medium gesetzt, mit TGF $\beta$ 1 (10ng/ml) behandelt und anschließend für unterschiedlich lange Zeit (1, 4, 8, 12, 24 und 48 h) inkubiert. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten. Um die methodische Korrektheit der Messung zu überprüfen, wurden Zellen als Positivkontrolle mit Wasserstoffperoxid (250 $\mu$ M) für 45 Minuten behandelt. Die Proteincarbonyle wurden aufgearbeitet und mittels Western-Blot detektiert n=4.

Unbehandelte Kontrollzellen zeigten eine geringe Menge an carbonylierten Proteinen. Nach der Behandlung mit Wasserstoffperoxid konnte ein deutlich erhöhtes Signal in den Fibroblasten detektiert werden. Nach TGF $\beta$ 1-Stimulation zeigte sich nach 4, 8, 12 und 24 Stunden ein erhöhter Carbonylstatus in den Zellen, wobei nach 12 Stunden ein Maximum der Menge an Carbonylen zu messen war. Nach 48 Stunden wurde die geringste Menge an Proteincarbonylen detektiert (Abb.22).

Anhand dieses Versuches konnte ein durch TGF $\beta$ 1 induzierter oxidativer Stress in Fibroblasten durch die Detektion von Proteincarbonylen in einem Zeitfenster zwischen 4 und 24 Stunden nach Stimulation und einem Maximum bei 12 Stunden nachgewiesen werden.

Ausgehend von dieser Grundlage stellte sich im weiteren Verlauf die Frage nach einer möglichen Inhibition der Carbonylbildung durch Antioxidantien. Im Speziellen sollte die Wirkung von NAC auf die Bildung von Proteincarbonylen untersucht werden.



**Abb. 23: Wirkung von NAC auf die Bildung von Proteincarbonylen.**

Subkonfluente Fibroblasten wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten und Zellen, welche ausschließlich mit TGFβ1 (10ng/ml) behandelt wurden. Um die methodische Korrektheit der Messung zu überprüfen, wurden Zellen als Positivkontrolle mit Wasserstoffperoxid (250μM) für 45 Minuten behandelt. Die Versuchszellen wurden für 4 h mit NAC (5mM) vorinkubiert, dann erfolgte die Behandlung mit Wasserstoffperoxid für 45 Minuten oder mit TGFβ1 für eine Inkubationszeit von 12 Stunden. Anschließend wurden die Proteincarbonyle aufgearbeitet und mittels Western-Blot detektiert n=2.

Unbehandelte Kontrollzellen wiesen eine geringe Carbonylmenge intrazellulär auf. Nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid als Positivkontrolle konnten nach 45 Minuten und nach Behandlung mit TGFβ1 konnten nach 12 Stunden deutlich vermehrt Proteincarbonyle nachgewiesen werden. Zellen, welche jedoch mit NAC und TGFβ1 oder NAC und Wasserstoffperoxid behandelt wurden, wiesen weniger Proteincarbonyle auf, im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollzellen (Abb.23).

Das antioxidativ wirkende NAC kann die Bildung von Proteincarbonylen, die durch Behandlung der Zellen mittels TGFβ1 und Wasserstoffperoxid entstehen können, verhindern.

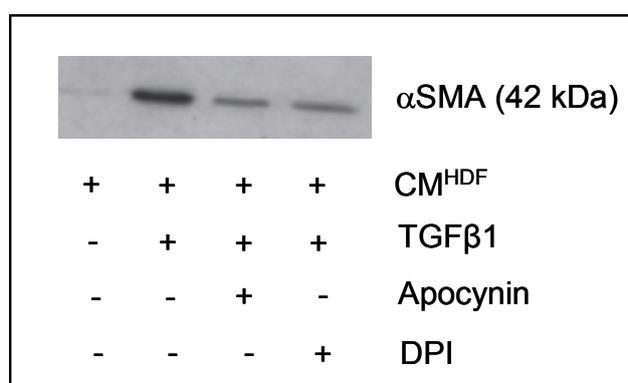
### 3.6 Abhängigkeit der Expression von αSMA von der NAD(P)H-Oxidase

Da die Bildung von Carbonylen ein Bioparameter für das Vorhandensein und die Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies im zellulären System ist, stellte sich die Frage nach der Quelle der ROS.

Es ist bekannt, dass in Lungenfibroblasten eine erhöhte NAD(P)H-Oxidase-Aktivität nach TGFβ1-Behandlung vorliegt [Thannikal et al., 1995]. In den vorausgehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei der TGFβ1-induzierten Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten vermehrt ROS entstehen. Die NAD(P)H-Oxidase produziert

hauptsächlich Superoxid, das in Wasserstoffperoxid dismutiert werden kann. Peroxide wurden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation in dermalen Fibroblasten gemessen [Cat et al. 2006]

Um eine mögliche Wirkung der NAD(P)H-Oxidase auf den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu testen, und eine bessere Vorstellung bezüglich der zeitlichen Einordnung in die  $\alpha$ SMA-Signalkaskade zu bekommen, wurde die Wirkung von Diphenyliodonium (DPI, ein allgemeiner Inhibitor von Flavoproteinen) und Apocynin (ein spezifischer Inhibitor der NAD(P)H-Oxidase) auf den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten getestet.



**Abb. 24: TGF $\beta$ 1 induziert die NAD(P)H-Oxidase.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten und ausschließlich für 48 Stunden mit TGF $\beta$ 1 (10ng/ml) behandelte Zellen. Die Versuchszellen wurden mit Apocynin (1mM) und DPI (5 $\mu$ M) für 1 Stunde vorbehandelt, dann erfolgte die Stimulation mit TGF $\beta$ 1 und die Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde eine Immundetektion bezüglich des Proteins  $\alpha$ SMA durchgeführt n=2.

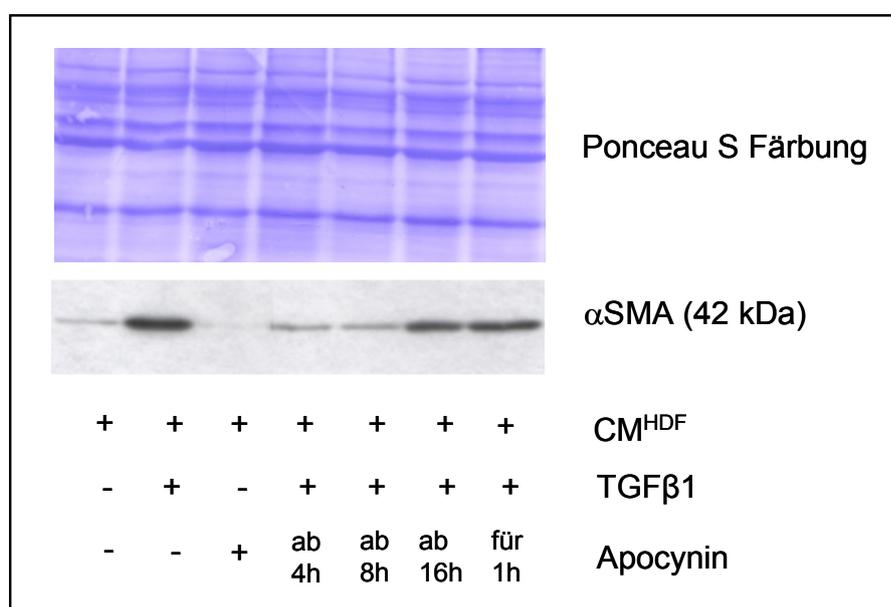
Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten eine nur geringe  $\alpha$ SMA-Expression nach 48 Stunden Inkubationszeit. Die mit TGF $\beta$ 1-behandelten Zellen wiesen eine deutlich höhere  $\alpha$ SMA-Expression auf. Sowohl DPI, als auch Apocynin konnten die Menge an  $\alpha$ SMA nach TGF $\beta$ 1-Stimulation signifikant vermindern, jedoch nicht komplett verhindern, da die Menge an detektiertem  $\alpha$ SMA hier noch deutlich über dem der unbehandelten Zellen liegt (Abb.24).

Die NAD(P)H-Oxidase scheint demnach eine wichtige Rolle während der intrazellulären ROS-Produktion nach TGF $\beta$ 1-Behandlung bezüglich der zur  $\alpha$ SMA-Expression führenden Signalkaskade zu spielen.

Aus dieser Erkenntnis heraus stellte sich die Frage nach der zeitlichen Einordnung der NAD(P)H-Oxidase in die TGF $\beta$ 1-induzierte Signalkaskade. Es folgte eine

Zeitverlaufsanalyse, bei welcher Fibroblasten mit TGF $\beta$ 1 stimuliert und zu unterschiedlichen Zeiten mit Apocynin behandelt wurden.

Zuvor durchgeführte Experimente in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass es bezüglich der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität einen frühen Peak (10 Minuten) und einen späten Peak (8 Stunden) im Anschluss an die Stimulation von Fibroblasten mit TGF $\beta$ 1 gibt. Es bestand die Frage, in welchem Zusammenhang dieser biphasische Aktivitätsverlauf mit der Expression von  $\alpha$ SMA steht. Im Besonderen galt es zu klären, welcher dieser beiden Peaks von Bedeutung für das Protein  $\alpha$ SMA ist.



**Abb. 25: Zeitabhängigkeit der  $\alpha$ SMA-Expression von Apocynin 48 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten, Zellen die ausschließlich mit TGF $\beta$ 1 (10ng/ml), und Zellen die ausschließlich mit Apocynin (1mM) für 48 Stunden behandelt wurden. Bei weiteren Ansätzen wurde 4, 8 und 16 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation Apocynin hinzugegeben. Desweiteren wurden, um den bekannten frühen Peak der NAD(P)H-Oxidase untersuchen bzw. blockieren zu können, die Zellen für eine Stunde mit Apocynin vorbehandelt, anschließend mit TGF $\beta$ 1 stimuliert, für eine weitere Stunde mit Apocynin behandelt, dann mit serumfreiem Medium gewaschen und im Folgenden ohne die Anwesenheit von Apocynin weiterinkubiert. Nach insgesamt 48 Stunden erfolgte die Immundetektion bezüglich des Proteins  $\alpha$ SMA n=3.

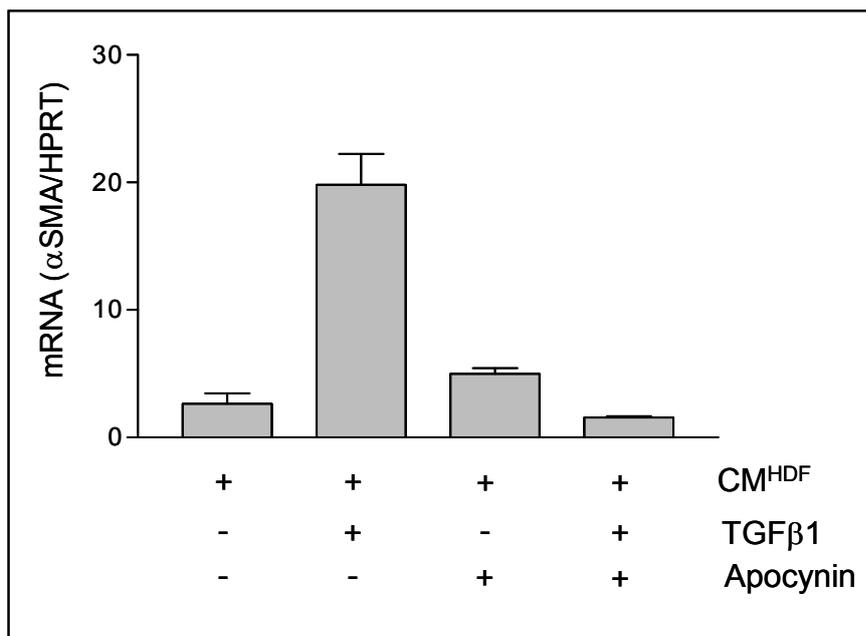
Sowohl unbehandelte Kontrollzellen, als auch Zellen, welche ausschließlich mit Apocynin behandelt wurden, zeigten eine basale Expression von  $\alpha$ SMA nach 48 Stunden Inkubation. Die TGF $\beta$ 1-Kontrollzellen wiesen ein deutlich erhöhtes  $\alpha$ SMA-Signal auf. Bei Zugabe von Apocynin 4 und 8 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation konnte eine verminderte  $\alpha$ SMA-

Proteinmenge detektiert werden. Bei Zugabe nach 16 Stunden war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten, so dass hier die  $\alpha$ SMA-Menge vergleichbar hoch war wie bei den ausschließlich mit TGF $\beta$ 1-behandelten Zellen. Bei Vorinkubation der Zellen mit Apocynin, anschließender TGF-Stimulation, mit anschließender Apocyninbehandlung für 1 Stunde, und einer weiteren Inkubation von 47 Stunden ohne Apocynin, zeigte sich eine erhöhte  $\alpha$ SMA-Menge, vergleichbar mit der  $\alpha$ SMA-Expression der TGF $\beta$ 1-behandelten Zellen (Abb.25). Durch die Vorinkubation der Zellen mit Apocynin und der Inkubation der Fibroblasten mit Apocynin innerhalb der ersten Stunde nach TGF $\beta$ -Stimulation konnte der Anstieg der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität innerhalb der ersten Stunde der  $\alpha$ SMA-Signalkaskade verhindert werden. Demnach scheint der frühe NAD(P)H-Oxidase-Peak zunächst eine eher untergeordnete Rolle für die  $\alpha$ SMA-Signalkaskade zu spielen.

Es lässt sich zusammenfassend ableiten, dass die NAD(P)H-Oxidase in einem Zeitraum von 4 bis 8 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation von essentieller Bedeutung für die  $\alpha$ SMA-Signalkaskade ist.

### **3.7 Abhängigkeit der Transkription von $\alpha$ SMA von der NAD(P)H-Oxidase**

Nachdem in Abb. 24 und 25 die Abhängigkeit der NAD(P)H-Oxidase auf die  $\alpha$ SMA-Expression gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden die Wirkung der NAD(P)H-Oxidase auf die Transkription von  $\alpha$ SMA untersucht werden.



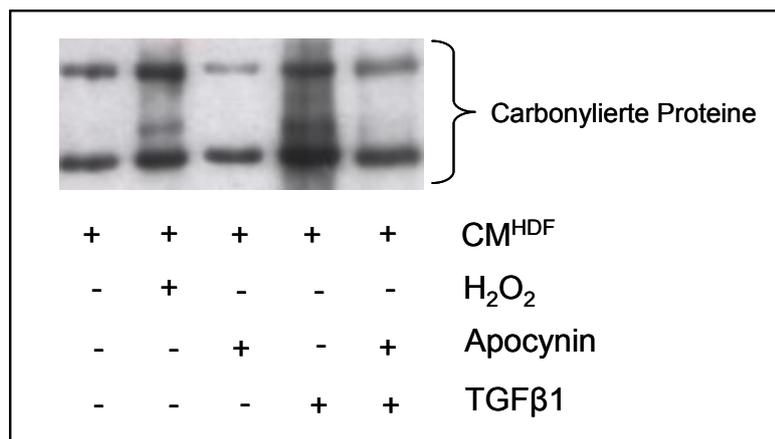
**Abb. 26: Abhängigkeit der αSMA-mRNA von der NAD(P)H-Oxidase.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten, Zellen, welche ausschließlich für 24 Stunden mit TGFβ1 (5ng/ml) oder ausschließlich mit Apocynin (1mM) für 24 Stunden behandelt wurden. Weitere Zellen wurden mit Apocynin für 1 Stunde vorbehandelt. Anschließend folgte die Behandlung mit TGFβ1 für 24 Stunden. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte mit Hilfe der Real-Time-PCR-Methode n=2. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. .

Die Behandlung mit rekombinantem TGFβ1 führte im Vergleich zu den Kontrollzellen nach 24 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung des Gehaltes an αSMA-mRNA (Abb.26). Apocynin konnte durch die Hemmung der NAD(P)H-Oxidase die Bildung der αSMA-mRNA vollständig verhindern.

### 3.8 NAD(P)H-Oxidase als Quelle der reaktiven Sauerstoffspezies

In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass zum einen durch die Hemmung der NAD(P)H-Oxidase die αSMA-Bildung vermindert werden konnte, und zum anderen durch TGFβ1-Behandlung Proteincarbonyle in Fibroblasten gebildet wurden. Wenn man nun davon ausgeht, dass die gemessenen Carbonyle Folgeprodukte der NAD(P)H-Oxidase sind, galt es die Abhängigkeit der Carbonyle von der NAD(P)H-Oxidase direkt zu untersuchen. Hierzu wurden Fibroblasten mit TGFβ1 und Apocynin für 12 Stunden behandelt und anschließend mit Hilfe des Oxy-Blot-Verfahrens analysiert.



**Abb. 27: Wirkung von Apocynin auf die Bildung von Proteincarbonylen 12 Stunden nach TGF-Stimulation.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gestetzt. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte subkonfluente Fibroblasten, sowie Zellen welche ausschließlich 12 Stunden mit Apocynin (1mM), 45 Minuten mit Wasserstoffperoxid (250μM) oder 12 Stunden mit TGFβ1 (10ng/ml) behandelt wurden. Weitere Zellen wurden mit Apocynin für 1 Stunde vorbehandelt, dann folgte die Stimulation mit TGFβ1 und die weitere Inkubation mit Apocynin für 12 Stunden. Die Proteincarbonyle wurden aufgearbeitet und mittels Western-Blot detektiert n=3.

Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten sowohl wie die Zellen, welche ausschließlich mit Apocynin behandelt wurden, eine geringe Menge an Proteincarbonylen. Nach Behandlung der Zellen für 45 Minuten mit Wasserstoffperoxid und nach 12 Stunden mit TGFβ1 konnte eine deutlich erhöhte Proteincarbonylmenge detektiert werden. Durch Apocynin konnte die Bildung von Proteincarbonylen deutlich vermindert werden (Abb.27).

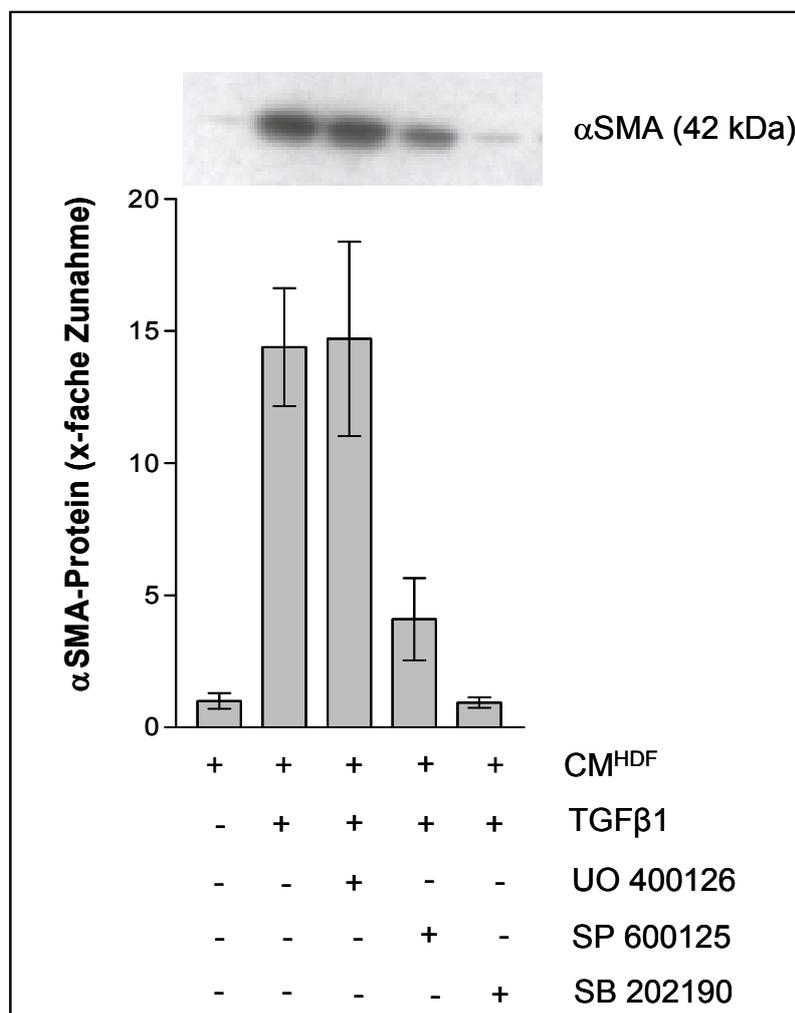
Aufgrund dieser Ergebnisse bestätigte sich die Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen der Bildung von ROS durch die NAD(P)H-Oxidase und der daraus resultierenden Bildung von Proteincarbonylen bestand.

### 3.9 Einfluss von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) auf die Bildung von Myofibroblasten

In Fibroblasten aus der Adventitia von Gefäßzellen fanden sich Hinweise, dass ROS, generiert durch die NAD(P)H-Oxidase, zu einer Aktivierung von MAPK und schließlich zu einer Differenzierung in Myofibroblasten führen [Shen WL et al, 2006].

Um den Einfluss der MAPK auf den Transdifferenzierungsprozess von humanen dermalen Fibroblasten zu testen, wurden die Fibroblasten mit verschiedenen Inhibitoren der jeweiligen Kinasen (UO 400126 = ERK-Inhibitor, SP 600125 = JNK-Inhibitor, SB 202190 = p38-

Inhibitor) behandelt und dessen Wirkung auf die  $\alpha$ SMA-Expression mittels Immunoblot detektiert.



**Abb. 28: Wirkung von MAPK-Inhibitoren auf den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte subkonfluente Fibroblasten und ausschließlich mit TGF $\beta$ 1 (10ng/ml) behandelte Zellen. Weitere Fibroblasten wurden eine Stunde mit dem jeweiligen spezifischen MAPK-Inhibitor (UO 400126 = ERK-Inhibitor, SP 600125 = JNK-Inhibitor, SB 202190 = p38-Inhibitor) behandelt (je 10 $\mu$ M), anschließend für 10 Minuten mit TGF $\beta$ 1 stimuliert und für die folgenden 48 Stunden mit dem jeweiligen Inhibitor weiterinkubiert. Mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens wurde das Protein  $\alpha$ SMA detektiert n=3. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. .

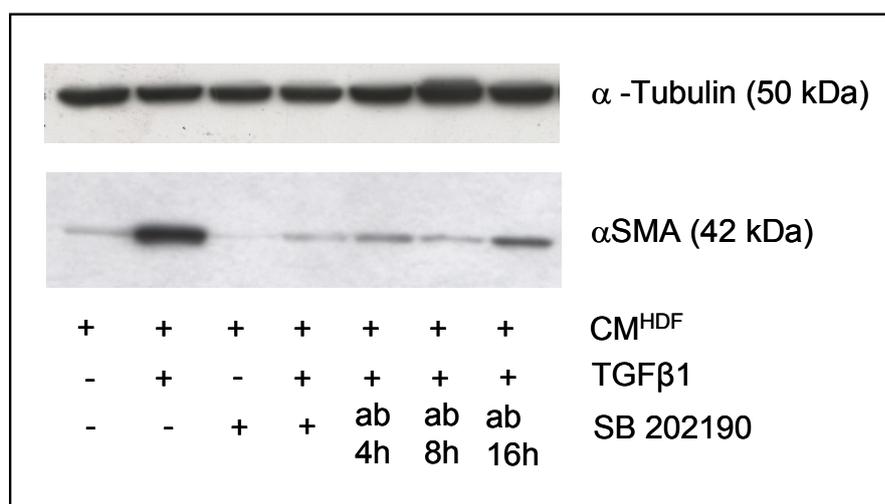
Unbehandelte Kontrollfibroblasten zeigten eine basale  $\alpha$ SMA-Expression. Die nur mit TGF $\beta$ 1 behandelten Zellen zeigten eine deutlich erhöhte  $\alpha$ SMA-Proteinkonzentration, im Vergleich zu den Kontrollzellen eine 15-fache Zunahme der  $\alpha$ SMA-Expression (Abb.28). Durch die Inkubation der Fibroblasten mit einem spezifischen p38-Inhibitor lies sich die  $\alpha$ SMA-Bildung nach TGF $\beta$ 1-Stimulation komplett verhindern. Die  $\alpha$ SMA-Expression stimmte mit der basalen  $\alpha$ SMA-Expression der unbehandelten Kontrollzellen überein. Der JNK-Inhibitor

verminderte die Bildung des Proteins  $\alpha$ SMA auf das 5-fache. Der ERK-Inhibitor zeigte keine Wirkung bezüglich der verminderten Bildung von  $\alpha$ SMA. Die  $\alpha$ SMA-Expression stimmte mit der  $\alpha$ SMA-Expression der mit TGF $\beta$ 1-stimulierten Kontrollzellen überein.

Es zeigte sich, dass der spezifische p38-Inhibitor SB 202190 den größten inhibitorischen Effekt auf die Expression von  $\alpha$ SMA hat.

Im Folgenden sollte die p38-Kinase im Fokus weiterer Untersuchungen stehen und die zeitliche Einordnung von p38 in die  $\alpha$ SMA-Signalkaskade wurde untersucht.

Dazu wurde eine Zeitverlaufsanalyse durchgeführt, bei welcher Fibroblasten mit TGF $\beta$ 1 stimuliert, und zu unterschiedlichen Zeiten mit dem spezifischen p38-Inhibitor SB 202190 behandelt wurden.



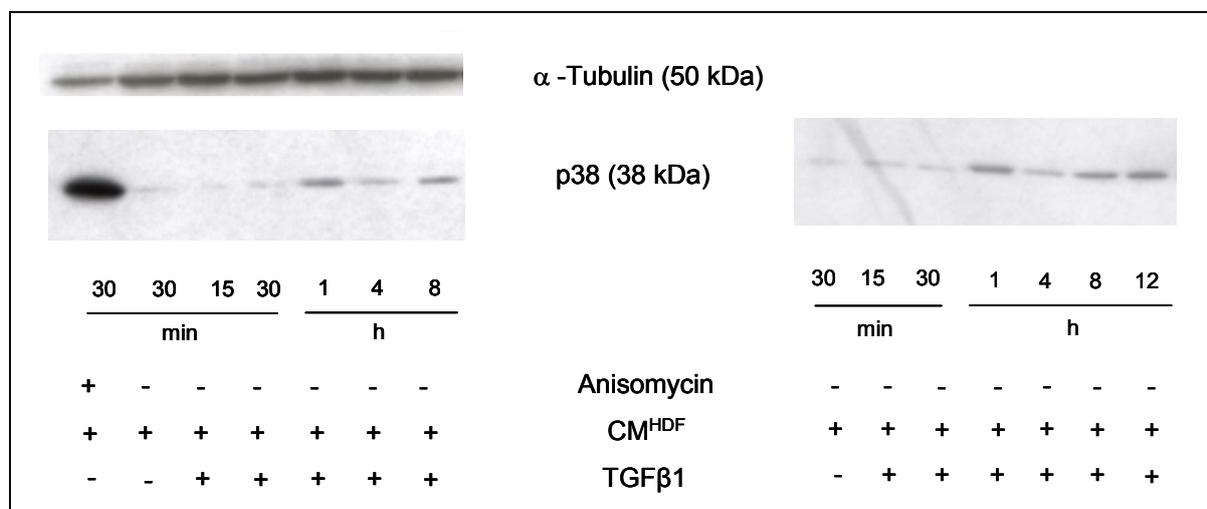
**Abb. 29: Zeitabhängige Hemmung der Expression von  $\alpha$ SMA durch einen spezifischen p38-Inhibitor.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten und Zellen die mit TGF $\beta$ 1 (10ng/ml) für 48 Stunden behandelt wurden. Als weitere Kontrolle dienten Fibroblasten, welche ausschließlich mit dem p38-Inhibitor (10 $\mu$ M) inkubiert wurden. Des weiteren wurden Fibroblasten für eine Stunde vor TGF $\beta$ 1-Stimulation mit dem p-38-Inhibitor vorinkubiert, anschließend für 10 Minuten mit TGF $\beta$ 1 stimuliert, und daraufhin weiter mit dem p38-Inhibitor behandelt. Bei den weiteren Versuchszellen wurde 4, 8 und 16 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation SB 202910 hinzugegeben. Nach 48 Stunden folgte die Immundetektion bezüglich des Proteins  $\alpha$ SMA n=2.

Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten eine basale  $\alpha$ SMA-Expression. Nach TGF $\beta$ 1-Stimulation konnte die maximalen  $\alpha$ SMA-Expression detektiert werden. Die  $\alpha$ SMA-Proteinmenge stellte sich sowohl bei Zellen, welche während des gesamten Stimulationsprozesses mit dem p38-Inhibitor behandelt wurden, als auch bei Zellen, welche

erst 4 und 8 Stunden nach TGF-Stimulation mit dem p38-Inhibitor inkubiert wurden, deutlich vermindert dar. Bei Zugabe des Inhibitors 16 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation zeigte sich eine gering hemmende Wirkung bezüglich der Expression von  $\alpha$ SMA (Abb. 29).

Damit wurde deutlich, dass die p38 Kinase innerhalb der ersten 8 Stunden eine wichtige Rolle in der zu SMA-führenden Signaltransduktionskaskade zu spielen scheint. Im Folgenden galt es diese These weiter zu untersuchen. Eine Aktivitätsmessung von p38 nach TGF $\beta$ 1-Stimulation wurde als Zeitverlaufsanalyse durchgeführt. Aufgrund des zuvor ermittelten Zeitraumes (Abb. 29) wurden Fibroblasten bis maximal 12 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation untersucht. Als Maß der Aktivität der p38-Kinase ist eine Phosphorylierung von T180 (Threonin)/Y(Tyrosin)182 beschrieben [Wang L et al, 2011]. Als technische Positivkontrolle wurden Fibroblasten mit Anisomycin behandelt. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Antibiotikum, welches aus *Streptomyces griseolus* isoliert wird, zur Hemmung der Proteinsynthese und zur Apoptose in verschiedenen Zellen führt, und MAPK, vor allem p38 und JNK aktiviert (Xiong W et al, 2006; Li JY et al, 2011).



**Abb. 30: Zeitabhängige Darstellung von phospho-p38 nach TGF $\beta$ 1-Stimulation.**

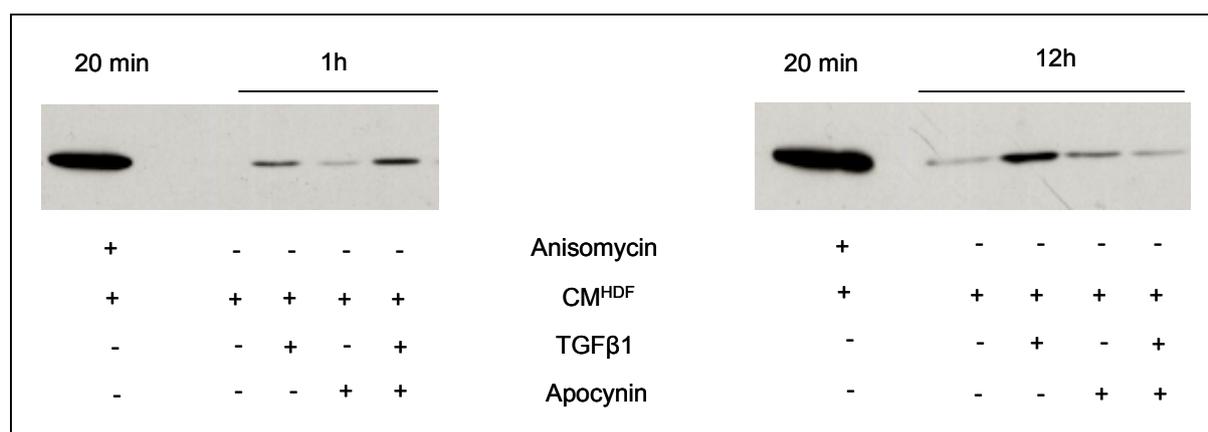
Subkonfluente Fibroblasten wurden mit serumfreiem Medium vorinkubiert und nach TGF $\beta$ 1-Stimulation (10ng/ml) für unterschiedlich lange Zeit inkubiert (15 und 30 Minuten, sowie 1, 4, 8 und 12 Stunden). Als Kontrollzellen dienen unbehandelte Fibroblasten (30 min.). Als technische Kontrolle wurden die Fibroblasten für 30 Minuten mit Anisomycin (0,5 $\mu$ g/ml) behandelt. Es folgte eine Immundetektion mit phosphospezifischem Antikörper gegen p38. Die Immundetektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle n=4.

Die mit Anisomycin behandelten Kontrollzellen zeigten nach 30 Minuten ein deutliches Signal, während die unbehandelten Fibroblasten zur gleichen Zeit ein minimales Signal an aktivem p38 zeigten. Im Anschluss an die TGF $\beta$ 1-Stimulation zeigte sich ein biphasischer

Verlauf von phospho-p38, mit einem Peak nach 1 Stunde und einem zweiten Anstieg nach 8 Stunden (Abb. 30).

Wie auch in Abbildung 30 gezeigt werden konnte scheint die p38-Kinase im Zeitraum bis zu 12 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation eine wichtige Rolle innerhalb der  $\alpha$ SMA-Signaltransduktionskaskade zu spielen.

Angesichts der Tatsache, dass in der Arbeitsgruppe von Prof. Brenneisen ein ähnlicher Verlauf der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität nach TGF $\beta$ 1-Stimulation bekannt war, und zusätzlich Hinweise vorliegen, dass ein Zusammenhang von ROS, generiert durch die NAD(P)H-Oxidase, zu einer Aktivierung von p38 und zu einer Transdifferenzierung von Gefäßfibroblasten führen kann [Shen WL et al, 2006], sollte im Folgenden die Abhängigkeit der beiden phospho-p38-Peaks von der NAD(P)H-Oxidase untersucht werden.



**Abbildung 31: Abhängigkeit der p38-Peaks von der NAD(P)H-Oxidase.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Als Positivkontrolle wurden die Fibroblasten für 20 Minuten mit Anisomycin (0,5 $\mu$ g/ml) behandelt. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten (1h und 12h) und mit 10ng/ml TGF $\beta$ 1-stimulierte Zellen (1h und 12h). Als weitere Kontrollzellen dienten Fibroblasten, welche ausschließlich mit Apocynin (1mM) behandelt wurden. Die Versuchszellen wurden eine Stunde mit Apocynin (1mM) präinkubiert, anschließend 10 Minuten mit TGF $\beta$ 1 stimuliert und dann für 1 bzw. 12 Stunden mit Apocynin weiterbehandelt. Anschließend folgte die Immundetektion auf phospho-p38 n=3(1h), n=1(12h).

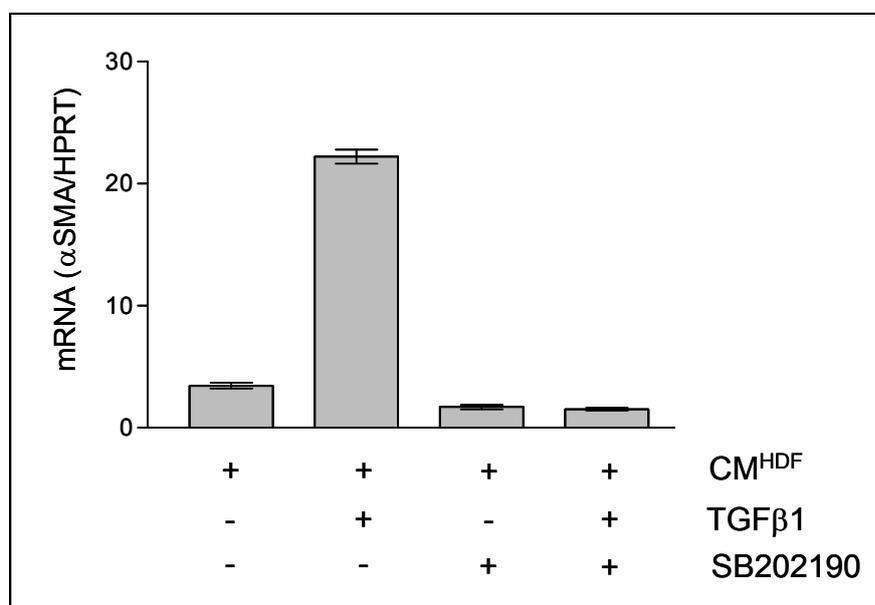
Die mit Anisomycin behandelten Kontrollzellen zeigten nach 20 Minuten ein deutliches Signal, die unbehandelten Fibroblasten zeigten nach 1 und 12 Stunden ein minimales Signal an aktivem p38. Die alleinige Behandlung der Zellen mit TGF $\beta$ 1 zeigte sich nach 1 und 12 Stunden eine erhöhte phospho-p38-Menge. In Anwesenheit von Apocynin lässt sich der erste phospho-p38-Peak 1 Stunde nach TGF $\beta$ 1-Stimulation nicht verhindern, die Aktivität von p38 stellt sich vergleichbar mit der Aktivität der Kontrollzellen nach TGF $\beta$ 1-Stimulation da. Im

Gegensatz zu dem zweiten Peak nach 12 Stunden, welcher eine deutlich reduzierte phospho-p38-Menge markiert zeigt (Abb. 31).

Anhand des durchgeführten Versuchs zeigte sich eine Abhängigkeit des späten phospho-p38-Peaks von der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase. Der frühe Peak scheint zum jetzigen Stand der Forschung nicht direkt abhängig von der NAD(P)H-Oxidase zu sein.

### 3.10 Abhängigkeit der Transkription von $\alpha$ SMA von p38

Nachdem in Abbildung 28 und 29 die Abhängigkeit der p38-Kinase auf die  $\alpha$ SMA-Expression gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden deren Wirkung auf die  $\alpha$ SMA-mRNA untersucht werden.



**Abb. 32: Abhängigkeit der  $\alpha$ SMA-mRNA von p38-Kinasen.**

Die Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Fibroblasten, TGF $\beta$ 1-stimulierte Zellen (5ng/ml) und Zellen, welche ausschließlich mit dem p38-Inhibitor SB202190 behandelt wurden. Die Versuchszellen wurden zunächst mit dem p38-Inhibitor SB202190 (1 $\mu$ M) für 1 Stunde vorbehandelt. Anschließend folgte die TGF $\beta$ 1-Stimulation und es folgte die weitere Behandlung mit dem p38-Inhibitor für 24 Stunden. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte mit Hilfe der Real-Time-PCR-Methode n=2. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. .

Die Behandlung mit rekombinantem TGF $\beta$ 1 führte im Vergleich zu den Kontrollzellen nach 24 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung des  $\alpha$ SMA-mRNA-Gehaltes. Der p38-Inhibitor SB202190 konnte die Bildung von  $\alpha$ SMA-mRNA vollständig verhindern.

## 4. Diskussion

### 4.1 Tumor-Stroma-Interaktion

Aufgrund des sich stetig vergrößernden Ozonlochs und der damit einhergehenden erhöhten UV-Exposition wird in Zukunft mit einer erhöhten Inzidenz von Hautkrebes zu rechnen sein [De Gruijl et al., 2003; Diffey, 2004]. Durch erhöhte UVB-Strahlung kann es zu zahlreichen zellulären Veränderungen kommen, welche essentielle Prozesse wie Zellzyklus und Proliferation beeinflussen. Diese zellulären Veränderungen werden durch interzelluläre, extrazelluläre und intrazelluläre Kommunikationsprozesse hervorgerufen. [Brenneisen et al., 2002].

Während des mehrstufigen Vorgangs der Karzinogenese kommt es zu zahlreichen epigenetischen und genetischen Veränderungen [Grafström et. al., 1996]. Ein Tumor wird als maligne bezeichnet, wenn Zellen des Tumors den primären Entstehungsort verlassen, zu wandern beginnen und Metastasen ausbilden. Weitere typische Malignitätskriterien sind Hyperproliferation, Verlust der terminalen Differenzierung und Immortalität [Yuspa, 1998]. In Karzinomen wird eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen von Tumorzellen und stromalen Zellen sezerniert, wodurch Neovaskularisation, Tumorwachstum und Tumormigration während der Invasion von malignen Zellen begünstigt werden [de Wever and Mareel, 2003; Lazar-Molnar et al., 2000; Liotta and Kohn, 2001].

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf Prozessen der Tumorprogression. Dem entscheidenden Schritt während der Tumorprogression, der Tumorinvasion, und der damit verbundenen Tumor-Stoma-Interaktion, galt ein besonderes Interesse. Die Tumorprogression ist charakterisiert durch lokale Akkumulation extrazellulärer Matrixkomponenten und Bindegewebszellen um einen malignen Tumor herum [Bhowmick and Mosos, 2005; Zigrino et al., 2005; Liotta und Kohn, 2001]. Der extrazellulären Matrix (EZM) kommt neben der strukturgebenden Funktion auch eine Rolle in der Signaltransduktion zu. Die EZM stellt ein Reservoir für Zytokine und Wachstumsfaktoren dar, welche durch proteolytische Spaltung von Matrixproteinen freigesetzt werden können [Löffek, 2006]. Die Invasion von Tumorzellen im Bindegewebe der Haut wird im Wesentlichen durch Fibroblasten beeinflusst [De Wever und Mareel, 2003; Cat et al., 2006]. Fibroblasten werden von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen aktiviert, welche von den Tumorzellen sezerniert werden [Dvorak, 1986; Cat et al, 2006; Werth et al, 2008], und weisen dann eine myofibroblastische Differenzierung auf [Bhowick, 2004; Tsujino, 2007]. Es findet eine dynamische Interaktion

zwischen malignen Zellen und dem stromalen Gewebe statt, welche durch Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte vermittelt werden [Löffek, 2006]. Durch Sezernierung des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ 1 und daraus resultierender Schließung der gap junctions von Fibroblasten entgehen diese einer Wachstumskontrolle und Apoptose [Trosko und Ruch, 1998; Stuhlmann et al., 2004]. TGF $\beta$ 1 fördert die mesenchymal-mesenchymale Transition von Fibroblasten zu  $\alpha$ SMA-exprimierenden Myofibroblasten, die die Invasion unterstützen [Cat et al, 2006]. Nach Lorusso werden die Myofibroblasten in diesem Zusammenhang auch „cancer associated fibroblasts“ (CAF) genannt [Lorusso, 2008].

Über die an der Expression von  $\alpha$ SMA beteiligten Signalkomponenten, und vor allem deren zeitliches Erscheinen, ist wenig bekannt. Die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an der Expression von  $\alpha$ SMA konnte anhand von antioxidativ wirkenden Substanzen wie N-acetyl-L-cystein (NAC), Selen und dem wasserlöslichen Vitamin E-Derivat Trolox, nachgewiesen werden [Cat et al, 2006]. Weitere beteiligte zelluläre Strukturen sind die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MARK) und die Proteinkinase C [de Caester et al, 2000; Jinnin et al, 2005]. Die zeitliche Einordnung der ROS-abhängigen und ROS-unabhängigen Faktoren und die Identifizierung weiterer Signalkomponenten ist Hauptteil der hier vorliegenden Arbeit.

#### **4.2 Parakrin wirkendes TGF $\beta$ 1 induziert Transdifferenzierung von Fibroblasten**

Die Arbeit basiert auf der Hypothese, dass es durch die Tumor-Stroma-Interaktion zu zellulären Veränderungen mit Schwächung des stromalen Gewebes und Stärkung des tumorösen Gewebes kommt. In Folge dessen können maligne Zellen leichter migrieren. Nachdem gezeigt werden konnte, dass der transformierende Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 über Schließung der gap junctions zu einer gestörten Zell-Zell-Kommunikation führt [Stuhlmann et al., 2004], wurde untersucht, ob dieser parakrin wirkende Wachstumsfaktor auch für die Tumor-vermittelte Transdifferenzierung von humanen dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten verantwortlich ist. Histologisch unterscheidet man Myofibroblasten von Fibroblasten hauptsächlich durch deren erhöhte Expression des Proteins  $\alpha$ SMA. Charakteristisch für den Transdifferenzierungsprozess ist eine erhöhte Proliferation und Kollagensynthese [Serini und Gabbiani, 1999], neben einer verstärkten Expression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen, Proteasen und EZM-Proteinen [Powell et al., 1999]. In Leber- und Lungenfibroblasten konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$ 1 der wichtigste Wachstumsfaktor für die myofibroblastische Differenzierung ist [Barnes et al, 2011].

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz des rekombinanten transformierenden Wachstumsfaktors (TGF $\beta$ 1), welcher in Überständen von Tumorzellen zu finden ist, die Transdifferenzierung von Hautfibroblasten zu Myofibroblasten induziert. Mit Hilfe von immunzytochemischen Untersuchungen konnte nach 48 Stunden die für Myofibroblasten typische Anordnung in Stressfasern deutlich nachgezeigt werden (Abb. 10). Bei der zeitabhängigen Detektion der  $\alpha$ SMA-Expression mit Hilfe der Western-Blot-Analyse konnte 16 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation ein erhöhtes  $\alpha$ SMA-Signal detektiert werden, nach 48 Stunden zeigte sich die maximale Menge des  $\alpha$ SMA-Proteins (Abb. 9). Die Zunahme des  $\alpha$ SMA-Signals zeigt einen Anstieg des  $\alpha$ SMA-Proteingehaltes und ist damit ein Maß für die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Nachdem das Protein  $\alpha$ SMA sowohl immunologisch (Abb. 9) als auch immunzytochemisch (Abb. 10) nachgewiesen und zeitlich in das  $\alpha$ SMA-Signaling eingeordnet werden konnte, folgte die zeitabhängige Detektion der  $\alpha$ SMA-Transkription mit Hilfe der Real-Time-PCR-Methode. Die maximale Menge an  $\alpha$ SMA-mRNA 24 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation zu detektieren (Abb. 12). Nach 16 Stunden war nur eine geringe Erhöhung der  $\alpha$ SMA-mRNA zu messen.

Diese Ergebnisse werden durch die Studie von Ronnov-Jessen und Petersen [Ronnov-Jessen und Petersen, 1993] unterstützt, welche beschreibt, dass Fibroblasten auf humanem Drüsengewebe der Brust in-vitro durch Einwirkung des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ 1 zu Myofibroblasten transdifferenzieren. Ebenfalls finden sich Myofibroblasten an der Invasionfront verschiedener Krebsarten [Nakayama et al., 1998] und in der Umgebung von Lebermetastasen bei Darmkrebs [Olaso et al., 1997]. Auch De Wever und Mareel haben gezeigt, dass transdifferenzierte Fibroblasten (Myofibroblasten) verstärkt an der Invasionfront von Tumoren auftreten [De Wever und Mareel, 2002].

Bei den ersten Experimenten im Rahmen dieser Arbeit war nach TGF $\beta$ 1-Stimulation während der gesamten Inkubationszeit TGF $\beta$ 1 auf den Zellen anwesend. Daraus ergab sich die Frage, ob eine kurzzeitige Exposition der Zellen mit TGF $\beta$ 1 ausreicht, um zur Expression von  $\alpha$ SMA zu führen bzw. die Signalkaskade zu starten und aufrecht zu erhalten. Nach unterschiedlich langer Behandlungsdauer der Hautfibroblasten mit TGF $\beta$ 1 zeigten sich nach einer Gesamtinkubationszeit von 48 Stunden keine Unterschiede bezüglich des  $\alpha$ SMA-Proteingehaltes (Abb. 11). Daraus ergab sich folgende Schlussfolgerung: eine Stimulationzeit von wenigen Minuten genügt, um die  $\alpha$ SMA-Signalkaskade zu starten und aufrecht zu halten.

In den Untersuchungen zum zeitlichen Erscheinen von  $\alpha$ SMA wurde deutlich, dass die  $\alpha$ SMA-mRNA und das  $\alpha$ SMA-Protein erst zu vergleichsweise späten Zeitpunkten

nachgewiesen werden konnten. Wie auch z.B. die Matrix-Metalloproteinasen (MMT) (Brenneisen et al. 1998, Wlaschek et al. 1994) oder die Metallothioneine (MT) (Muhammad Zafarullah et al. 1992) gehört  $\alpha$ SMA zu den „late responsive genes“.

Aufgrund dieser Tatsache stellte sich hier die Frage nach einem durch TGF $\beta$ 1 initiierten zellulären Mechanismus.

Myofibroblasten sezernieren eine Reihe von Wachstumsfaktoren, wie HGF (hepatocyte growth factor), IL-6 (Interleukin -6) und PDGF (Platelet Derived Growth Factor) [Werth et al, 2008]. Ebenfalls ist bekannt, dass PDGF und TGF $\beta$ 1 die Migrationsfähigkeit von intestinalen Myofibroblasten beeinflussen [Leeb et al., 2002; Brenmoehl, 2007].

In der Literatur wird ein Zusammenhang in Myofibroblasten zwischen der autokrinen Produktion von Hic-5, einem Adhäsionsprotein, und TGF $\beta$ 1 in hypertrophem Narbengewebe beschrieben [Dabiri et al., 2008]. Auch im Rahmen der idiopathischen Lungenfibrose wird ein autokriner Mechanismus zwischen TGF $\beta$ 1 und Angiotensin in Myofibroblasten der Lunge diskutiert [Uhal et al., 2007].

Autokrine und parakrine Effekte stellen im Rahmen der Tumor-Stroma-Interaktion einen zentralen Mechanismus dar [Barnes et al, 2011, Räsänen et al, 2010, Pietras e al, 2010]. Bekannt ist ebenfalls, dass die extrazelluläre Matrix ein Reservoir für Wachstumsfaktoren und Zytokine darstellt, welche durch proteolytische Spaltung von Matrixproteinen freigesetzt werden können [Löffek et al, 2006].

In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt von Zellüberständen stimulierter Fibroblasten (konditioniertem Medium (CM<sup>HDFnachTGF</sup>)) auf unbehandelte Zellen untersucht werden, um neben TGF $\beta$ 1 (Stuhlmann et al. 2004) einen weiteren möglichen löslichen Faktor, welcher für den zeitlich verzögerten Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten von Bedeutung ist, identifizieren zu können.

Es zeigte sich ein positiver Effekt des konditionierten Mediums nach TGF $\beta$ 1-Stimulation (CM<sup>HDFnachTGF</sup>) auf unbehandelte Zellen in Form einer erhöhten Expression von  $\alpha$ SMA (Abb. 13), vor allem von Zellüberständen, welche im frühen Zeitfenster direkt nach TGF $\beta$ 1-Stimulation gewonnen wurden (Abb. 14). Mit Hilfe der ELISA-Technik konnte die TGF $\beta$ 1-Menge in Fibroblastenüberständen quantifiziert werden. Auch hier konnte schon ab dem ersten Messzeitpunkt die maximale TGF $\beta$ 1-Menge der gesamten Zeitverlaufsanalyse nachweisen werden (Abb. 26). Hinzu kam, dass es sich bei dieser gemessenen TGF $\beta$ 1-Menge um fast ausschließlich aktives TGF $\beta$ 1 handelte. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die TGF $\beta$ 1-Menge in den Zellüberständen abhängig von der Stimulationskonzentration und der Anzahl der durchgeführten Mediaustauschvorgängen ist (Abb. 17 und 18). Diese

Ergebnisse konnten in weiteren Kontrollexperimenten anhand der Western-Blot-Methode bestätigt werden. Nach repetitiven Mediumaustauschvorgängen ist die Wirksamkeit von konditioniertem Medium nach TGFβ1-Stimulation (CM<sup>HDFnachTGF</sup>) auf unbehandelte Zellen nicht mehr gegeben (Abb. 19).

Anhand der durchgeführten Versuche bestätigt sich das Vorliegen eines „Waschartefaktes“. Die zweimaligen Mediumaustauschvorgänge, welche im Anschluss an den Stimulationsprozess zum normalen Versuchsprozedere gehörten, konnten das zur Stimulation der Zellen verwendete TGFβ1 nicht vollständig eliminieren. Ein autokriner Mechanismus lässt sich nicht sicher ausschließen und bleibt weiterhin fraglich.

Die vorherigen Experimente bezüglich eines durch TGFβ1 ausgelösten autokrinen Mechanismus stellten sich schwierig dar. Daraus ergab sich, dass im weiteren Verlauf der Arbeit vermehrt die intrazellulären Effekte des Transdifferenzierungsprozesses von Fibroblasten zu Myofibroblasten im Mittelpunkt standen.

#### **4.3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermitteln die TGFβ1-induzierte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten**

Reaktive Sauerstoffspezies können während zellulärer Stoffwechselprozesse als Nebenprodukte, primär in Mitochondrien, gebildet werden. Oxidativer Stress beschreibt einen Zustand, in dem das Gleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien zu Gunsten der Prooxidantien verschoben ist [Zafarulah M et al, 2003]. Ein Zellsystem unter oxidativem Stress verliert die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies ausreichend zu neutralisieren bzw. zu eliminieren [Sies und Cadenas, 1985]. Eine Erhöhung intrazellulärer ROS kann zu physiologischen oder pathophysiologischen Veränderungen führen. Dabei kommt es beispielsweise zu Zellzyklus-Progression [Boonstra und Post, 2004], Apoptose oder Zellalterung [Gourlay und Ayscough, 2005; Johann et al., 2005], und zu Schädigungen von zellulären Lipiden, Proteinen, DNA und Signaltransduktionswegen [Sies, 1991]. Aufgrund dieser Schäden wird oxidativer Stress mit humanen Erkrankungen, wie kardiovaskulären und neurodegenerativen Krankheiten, aber auch mit Krebs in Verbindung gebracht [Sies, 1991]. Aber auch während intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden und einer Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse spielen reaktive Sauerstoffspezies als „second messenger“ eine zentrale Rolle [Poli et al., 2004; Aslan und Ozben, 2005; Chiarugi, 2005].

Die Überstände von SCL1-Zellen und TGFβ1 generieren ROS in humanen dermalen Fibroblasten [Stuhlmann et al., 2004; Alili et al, 2011]. Es ist bekannt, dass TGFβ1 den

Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der Zelle erhöhen kann, wodurch sowohl zelluläre Strukturen während der Signalkaskade als auch Transkriptionsfaktoren modifiziert werden [Thannikal und Fanburg, 2000; Dong Young Rhyu et al, 2005].

Um die ROS-Abhängigkeit der  $\alpha$ SMA-Signalkaskade genauer untersuchen zu können, wurden Versuche mit Hilfe des antioxidativ wirksamen N-Acetylcysteins (NAC) durchgeführt. N-Acetylcystein (NAC) reagiert mit Hydrogenperoxiden, Hydroxylradicalen und Superoxiden und wird sowohl in vivo als auch in vitro weit verbreitet als Antioxidans eingesetzt [Aruoma OI et al, 1989]. NAC ist ein synthetisches zellpermeables Antioxidans, welches in der Zelle zu Cystein hydrolysiert wird. NAC stellt die Vorstufe des reduzierten Glutathions dar und erhöht damit bei Gabe die Menge an intrazellulären Antioxidantien. Wasserstoffperoxid wird durch das Selenoenzym Glutathion-Peroxidase zu Wasser reduziert. An verschiedenen Tiermodellen wurde bereits beschrieben, dass NAC protektive Effekte gegen Lungenkrankheiten besitzt [Cotgreave, 1996].

Im Hinblick auf die Feststellung einer genaueren zeitlichen Einordnung der ROS-abhängigen Vorgänge wurde die NAC-Wirksamkeit zeitabhängig getestet. Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass das antioxidativ wirkende NAC der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1 entgegenwirkt und die Bildung von  $\alpha$ SMA vermindert (Abb. 21). Bei der zeitabhängigen Untersuchung der Wirkung von NAC auf das  $\alpha$ SMA-Signaling zeigte sich, dass die reaktiven Sauerstoffspezies einen späten Effekt auf den Transdifferenzierungsprozess haben. Die antioxidative Wirkung von NAC, und die damit verbundene Wirkung von ROS auf die  $\alpha$ SMA-Signalkaskade, scheint im Zeitraum zwischen 4 und 16 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation entscheidend zu sein (Abb. 21).

Neuerdings konnte durch die Arbeitsgruppe Brenneisen gezeigt werden, dass auf Ceroxid-basierende Nanopartikel ebenfalls die Expression von  $\alpha$ SMA in einem antioxidantienähnlichen Mechanismus verhindern [Alili et al, 2011].

Im Folgenden wurde die Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies im zellulären System direkt anhand von oxidierten Proteinen gemessen, welche Marker für den oxidativen Status einer Zelle sind. Die ROS-Folgeprodukte wurden in Form von Proteincarbonylen zeitabhängig untersucht. Die maximale Menge an Proteincarbonylen konnte nach 12- bis 16-stündiger Behandlung mit TGF $\beta$ 1 in Fibroblasten detektiert werden (Abb. 22), wobei die Carbonylbildung durch das antioxidativ wirkende NAC vermindert werden konnte (Abb. 23). Bei den während des Transdifferenzierungsprozesses vermehrt entstehenden ROS stellt sich die Frage nach möglichen Quellen für ihre Produktion. Da Carbonyle auf unterschiedlichste Weise entstehen können und im Speziellen bekannt ist, dass die NAD(P)H-Oxidase diese als

Folgeprodukte hervorruft, wurde die Abhängigkeit der  $\alpha$ SMA-Expression von der NAD(P)H-Oxidase untersucht. Einige Studien beschreiben die Wachstumsfaktor-/Zytokin-vermittelte Bildung von ROS während physiologischer Signalkaskaden durch membranlokalisierte Oxidasen, wie z.B. die NADH-Oxidase, in phagozytischen und nicht-phagozytischen Zellen [Jones et al., 1994; Hiran et al., 1997; Baraktutan et al., 1998]. Es ist bekannt, dass ebenfalls in Lungenfibroblasten eine erhöhte NAD(P)H-Oxidase-Aktivität nach TGF $\beta$ 1-Behandlung vorliegt [Thannikal et al., 1995].

Die NAD(P)H-Oxidase produziert primär Superoxid und sekundär Wasserstoffperoxid [Thannikal und Fanburg, 2000] und führt somit zu einer erhöhten ROS-Produktion. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die NAD(P)H-Oxidase eine wichtige Rolle während der intrazellulären ROS-Produktion nach TGF $\beta$ 1-Stimulation spielt, da mit Hilfe des spezifischen NAD(P)H-Oxidase-Inhibitors Apocynin die  $\alpha$ SMA-Produktion verhindert werden konnte (Abb. 24). Damit wird bestätigt, dass die NAD(P)H-Oxidase durch eine erhöhte Produktion von ROS auf die Transdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten Einfluss hat.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Carbonylbildung abhängig von der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase ist (Abb. 27). Damit konnte als Quelle für die ROS die NAD(P)H-Oxidase identifiziert werden.

Nachdem nun in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Bildung des Proteins  $\alpha$ SMA von der NAD(P)H-Oxidase abhängig ist, konnte dieser Zusammenhang auch auf der Ebene der mRNA bestätigt werden (Abb. 26). Der NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor Apocynin verhindert 24 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation die Bildung der  $\alpha$ SMA-mRNA. Auch in renalen tubulären Rattenepithelzellen konnte nachgewiesen werden, dass die antioxidative Wirkung von NAC und Apocynin die TGF $\beta$ 1-induzierten Effekte signifikant vermindern und damit eine Schlüsselrolle bei der TGF $\beta$ 1-vermittelten Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) im Rahmen der renalen tubulointestinalen Fibrose spielen [Ryhu Dong Young et al., 2005].

Aus ergänzenden Untersuchungen in der Arbeitsgruppe war bekannt, dass es bezüglich der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität einen frühen Peak (10 Minuten) und einen späten Peak (8 Stunden) nach TGF $\beta$ 1-Stimulation in Fibroblasten gab. Daher stellte sich die Frage nach der Bedeutung der beiden Peaks für das Protein  $\alpha$ SMA und die damit verbundene zeitliche Einordnung in die TGF $\beta$ 1-induzierte Signalkaskade.

Durch die Vorinkubation der Zellen mit Apocynin und der Inkubation der Fibroblasten mit Apocynin innerhalb der ersten Stunde nach TGF $\beta$ 1-Stimulation konnte der Anstieg der

NAD(P)H-Oxidase-Aktivität innerhalb der ersten Stunde nach TGF  $\beta$ 1-Stimulation verhindert werden. Die  $\alpha$ SMA-Expression nach 48 Stunden zeigte ein vergleichbar hohes Level wie das der TGF $\beta$ 1-Kontrollzellen. Anhand der durchgeführten Versuche scheint der frühe NAD(P)H-Oxidase-Peak zunächst eine eher untergeordnete Rolle für das  $\alpha$ SMA-Signaling zu spielen (Abb. 25). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass der frühe Peak über Quervernetzungen mit anderen zellulären Zwischenspielern in die  $\alpha$ SMA-Signalkaskade eingreift. Es wurde jedoch deutlich, dass die NAD(P)H-Oxidase innerhalb eines Zeitraumes von mindestens 8 Stunden nach TGF $\beta$ 1-Stimulation für den Transdifferenzierungsprozess von Bedeutung ist (Abb. 25). Auch neueste Untersuchungen in Fibroblasten der Lunge und Leber zeigen eindeutig, dass die ROS-induzierte Transdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten eine entscheidende Rolle nach TGF $\beta$ 1-Stimulation spielen und dass die reaktiven Sauerstoffspezies von der NAD(P)H-Oxidase-Familie stammen [Barnes und Gorin, 2011]. Hinweise auf den zeitlichen Zusammenhang der ROS-Generierung innerhalb der TGF $\beta$ 1-Signalkaskade finden in der Literatur keine Erwähnung.

#### 4.4 MAPK induzieren den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten

Eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli werden mit Hilfe von MAPK in zelluläre Antworten umgewandelt [English et al. 1999; Widmann et al. 1999; Hazzalin und Mahadevan 2002]. Dabei handelt es sich sowohl um physiologische als auch pathologische Prozesse. Man unterscheidet grundsätzlich drei verschiedene Gruppen der MAPK-Familie. Die p38 MAPKinasen, die extracellular-signal-related kinases (ERK) und die Jun-N-Terminus-Kinasen (JNK). Die Signalwege der MAPK bestehen aus mehrstufigen Phosphorylierungskaskaden und führen über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer veränderten Genexpression.

In der Literatur ist bekannt, dass TGF $\beta$ 1 zu einer Aktivierung von p38 MAPK führt und dadurch über eine Regulation der Genexpression die MLC-P (*myosin light chain phosphorylation*) in Epithelzellen voran treibt [Goldberg et al., 2002]. In Gefäßzellen konnte ebenfalls der Zusammenhang von TGF $\beta$ -induzierter  $\alpha$ SMA-Expression und p38 MAPK nachgewiesen werden [Martin-Garrido A. et al., 2010]. Auch in renalen tubulären Rattenepithelzellen konnte eine Aktivierung von MAPK (p38 und ERK) induziert durch TGF $\beta$ 1 gezeigt werden [Ryhu DY et al, 2005].

Bei Prozessen der Tumorprogression steht die Rolle der p38 Kinasen ebenfalls im Focus des Interesses. Aufgrund des negativen Einflusses von p38 auf die Zellprogression wird die

Funktion der p38 Kinasen als möglicher Tumorsuppressor diskutiert [Bulavin und Fornace, 2004; Loesch und Chen, 2008]. Damit stellt die p38-Signalkaskade einen möglichen pharmakologischen Angriffspunkt bei der Therapie von Malignomen dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Behandlung der Zellen mit Inhibitoren der jeweiligen MAPK gezeigt werden, dass die p38 Kinasen einen starken Einfluss auf den durch TGF $\beta$ 1 induzierten Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten haben (Abb. 28). Neben den p38 Kinasen zeigen die JNK einen schwachen Einfluss auf das  $\alpha$ -SMA-Signaling (Abb. 28). Auch wenn es Hinweise in der Literatur für eine TGF $\beta$ -induzierte Aktivierung von ERK1/2 in Nierenfibroblasten gibt [Bondi CD et al., 2010; Ryhu DY et al, 2005], scheinen die ERK in der vorliegenden Arbeit den Transdifferenzierungsprozess von Hautfibroblasten nicht zu beeinflussen (Abb. 28).

Bei der Untersuchung der zeitlichen Einordnung von p38 in den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten zeigte sich, dass die p38 Kinasen innerhalb der ersten 16 Stunden in die  $\alpha$ -SMA-Signalkaskade involviert sind (Abb. 29) und einen biphasischen Verlauf vorweisen (Abb. 30). Schon in vorherigen Studien konnte dieser biphasische Verlauf gezeigt werden. In Miesmuscheln ließ sich durch oxidativen Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biphasischer phospho-p38-Peak nach 15 Minuten und 1 Stunde auslösen, durch Exposition an der Luft bei 1 und 8 Stunden [Gaitanaki et al., 2004]. Auch in humanen Fibroblasten zeigte sich nach TGF $\beta$ 1-Stimulation eine biphasische p38-Aktivierung nach 6 und 12 Stunden [Meyer-ter-Vehn et al., 2006].

Daraus ergab sich die Frage nach möglichen Aktivierungsquellen von p38. In der Literatur ist bekannt, dass mitochondriale ROS die Phosphorylierung von p38 initiieren [Kulisz et al., 2002]. Damit steht die Phosphorylierung der p38-Kinasen in Zusammenhang mit oxidativem Stress.

Aus weiteren Experimenten in der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass der zeitliche Verlauf der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität Parallelen zum biphasischen Verlauf der Phosphorylierung von p38 aufweist. Aus diesem Grund sollte die Abhängigkeit der beiden p38-Peaks von der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität geklärt werden. Es zeigte sich, dass der erste p38-Peak unabhängig von der NAD(P)H-Oxidase zu sein scheint (Abb. 32). Wodurch jedoch der frühe p38-Peak ausgelöst wird und inwieweit dieser von Bedeutung für die  $\alpha$ -SMA-Signalkaskade ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden. In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen der Proteinkinase C (PKC) und Rac, einem Vertreter der small GTPasen der Rho-Familie, bei Prozessen der Zellinvasion beschrieben [Parsons und Adams, 2008]. Nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass die PKC bekannterweise bei Prozessen der

Tumorprogression in Interaktion mit ROS eine wichtige Rolle spielt [Wu WS, 2006], stellt dies einen möglichen Erklärungsansatz dar.

Der zweite p38-Peak scheint abhängig von der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität zu sein, dazu müssen jedoch noch weitere Untersuchungen folgen (Abb. 31). Auch El-Remessy konnte eine ROS-abhängige p38-Aktivierung, induziert durch die NAD(P)H-Oxidase, nachweisen [El-Remessy et al., 2008]. Bekannt ist, dass das Antioxidans NAC die TGF $\beta$ 1-induzierte Phosphorylierung von p38 vermindert [Rhyu DY et al, 2005, Zarfullah M et al, 2003].

Wie schon beschrieben, konnte mit Hilfe eines p38-Inhibitors die Bildung von  $\alpha$ SMA auf Proteinebene verhindert werden (Abb. 30, 31). Die Aktivierung von p38 führt bekannterweise über eine Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie STAT1, Elk-1, MEF2, MSK, CHOP [Bradham und McClay; 2006, Clerk und Sugden; 2006, Cuenda und Rousseau; 2007], zu einer veränderten Genexpression. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben dem Protein  $\alpha$ SMA auch die  $\alpha$ SMA-mRNA abhängig von der Aktivität der p38-Kinasen ist (Abb. 32).

Damit konnte ein Zusammenhang zwischen ROS, der NAD(P)H-Oxidase, p38 und  $\alpha$ SMA nachgewiesen werden.

#### **4.5 Der Status-Quo der Mesenchymal-Mesenchymalen Transition (MMT)**

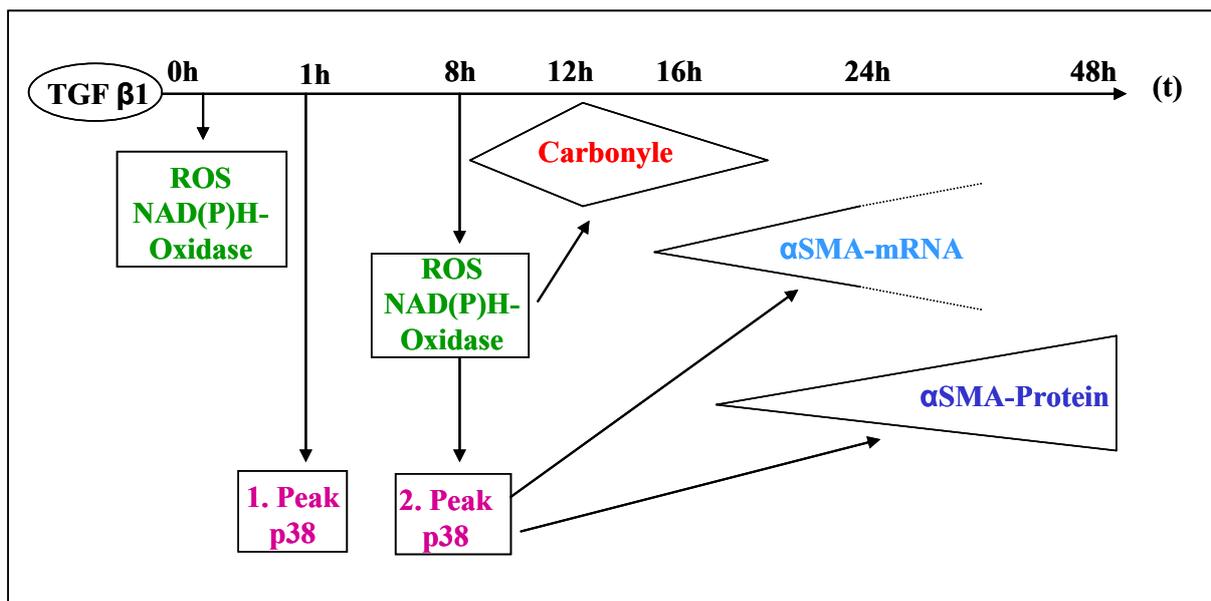
Wie schon beschrieben, mündet die durch TGF $\beta$ 1 induzierte Signalkaskade in der Bildung von  $\alpha$ SMA, einem Markerprotein für den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten in Myofibroblasten (MMT). Das  $\alpha$ SMA-Protein lässt sich beginnend nach 16 Stunden nachweisen und weist ein Maximum nach 48 Stunden auf. Die  $\alpha$ SMA-mRNA ist Stunden nach TGF-Stimulation in geringen Mengen nachweisbar und steigt im weiteren Verlauf des Signalings stark an.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Teile der Signaltransduktionskaskade zur Bildung des  $\alpha$ SMA-Proteins aufgeklärt und in zeitliche Zusammenhänge gebracht werden. Dabei sind gerade die frühen Ereignisse im Signaling noch unbekannt.

Reaktive Sauerstoffspezies werden durch die NAD(P)H-Oxidase gebildet und führen zu Oxidation von Zielstrukturen. In dieser Arbeit wurden Proteincarbonyle gemessen. Die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase ist in Zusammenhang mit der Aktivierung der p38-Kinase zu sehen. Die p38-Kinase weist wie die NAD(P)H-Oxidase eine biphasische Aktivität auf. Die Abhängigkeit des zweiten phospho-p38-Peaks von der NAD(P)H-Oxidase hat sich bestätigt. Experimente innerhalb der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass es innerhalb der ersten Minuten

nach TGF $\beta$ 1-Stimulation zu einer Aktivierung von Smads und der Proteinkinase C (PKC) kommt [Cat et al., 2006]. Es besteht die Möglichkeit, dass innerhalb der Signaltransduktionskaskade Querverbindungen zwischen den einzelnen Komponenten im Transdifferenzierungsprozess bestehen. In der Literatur wird eine Verbindung zwischen der klassischen TGF $\beta$ 1/Smad-Kaskade und dem Signaltransduktionsweg der Rho GTPasen, welche wiederum mit MAPK in Verbindung gebracht werden, in humanen Fibroblasten gezeigt [Vardouli et al., 2008]. Auch die Proteinkinase C steht in Interaktion mit Aktivatoren der MAPK im Rahmen von endothelialer Zellmigration und Angiogenese [Parsons und Adams, 2008] und TAK-1 bei Experimenten zur Erforschung von Prozessen während Hypoxie [Frazier et al., 2007].

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha$ SMA-mRNA abhängig von der p38-Kinase und der NAD(P)H-Oxidase ist. Vermutlich kommt es zu einer veränderten Genexpression und daraufhin zur Bildung des  $\alpha$ SMA-Proteins.



**Abb. 33: Der aktuelle Stand der Mesenchymal-Mesenchymalen Transition**

TGF $\beta$ 1 führt zu einer Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) über die NAD(P)H-Oxidase. Dies führt zeitabhängig zu einer biphasischen Aktivierung der MAPK p38 und zur Erhöhung von oxidierten Proteinen (Carbonyle). In Folge dessen ist zeitabhängig  $\alpha$ SMA auf mRNA- und auf Proteinebene nachweisbar.

## 5. Perspektiven

### **Stromale Therapie – Metastasierung als therapeutische Herausforderung**

Anhand der 5-Jahresüberlebensrate wird deutlich, welchen signifikanten Einfluss die Fähigkeit eines Tumors zu Metastasieren auf die Mortalität hat. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt im Stadium der Metastasierung weniger als 20% [Landis et al., 1998]. Die therapeutischen Möglichkeiten gestalten sich in einem fortgeschrittenen Tumorstadium nach wie vor schwierig, weswegen ein besseres Verständnis der zu Grunde liegenden molekularen und zellulären Prozesse der Tumormetastasierung benötigt wird. Tumormetastasierung wird durch genetische Veränderungen bei jedem Schritt vorangetrieben [Welch et al., 2000]. Diese genomische Instabilität von Tumorzellen und die Heterogenität der Zellpopulation innerhalb von Tumoren stellt ein Problem während der Tumorthherapie dar [Tozeren et al., 2005]. Außerdem werden Chemo- und Radiotherapien, welche zur Bekämpfung bei malignen Erkrankungen eingesetzt werden, oft von starken Nebenwirkungen begleitet [Birnbaum und Ready, 2005].

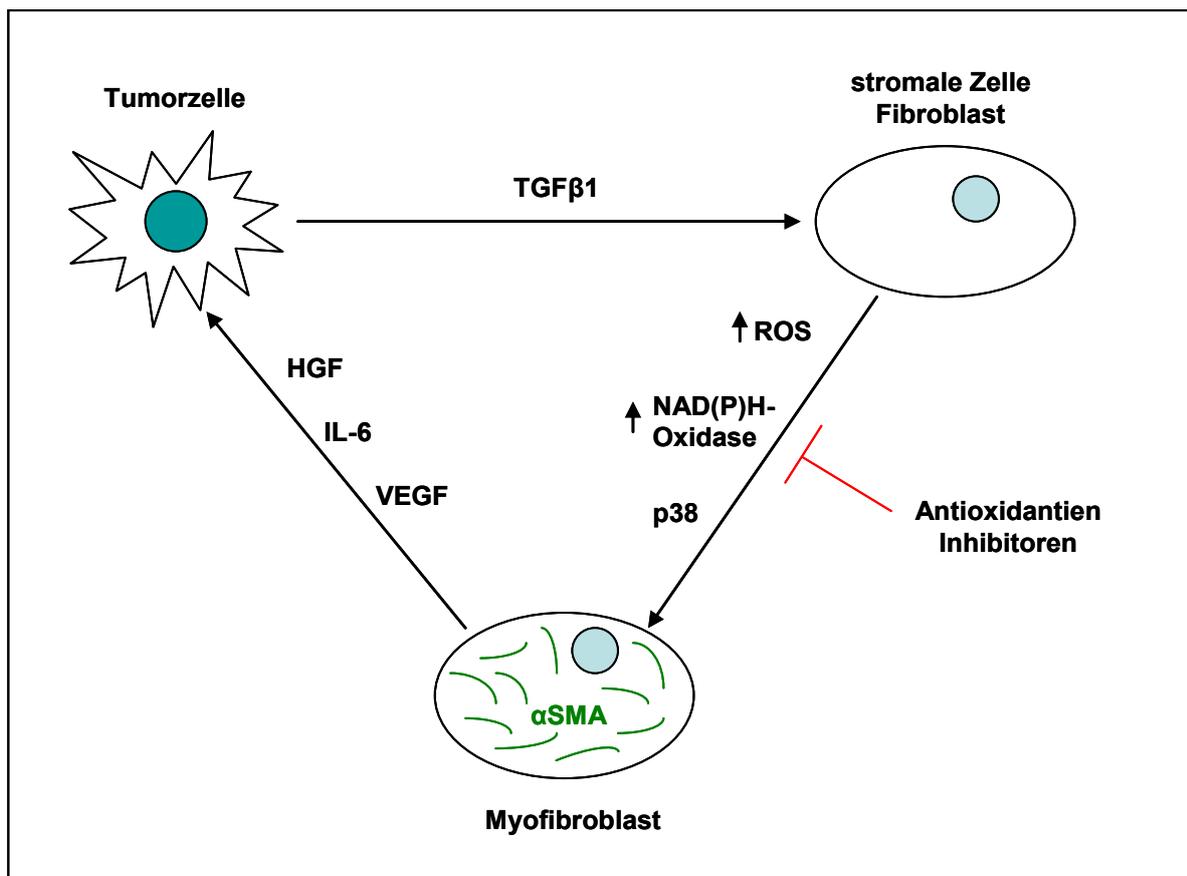
Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Schutz der humanen dermalen Fibroblasten durch Antioxidantien und Inhibitoren vor oxidativem Stress stellt einen wichtigen Aspekt der Tumor-Stroma-Interaktion da. Dabei rückt das Interesse für die Mechanismen der Tumorprogression des Stromalen Gewebes immer mehr in den Vordergrund. Ziel einer solchen „stromalen Therapie“ ist die Stärkung der gesunden Zellen gegen die Tumorzellen. Bekannt ist, dass antioxidantienreiche Diäten als Nahrungsmittelergänzungen das Risiko von Krebserkrankungen verringern können [Steinmetz und Potter, 1996].

Durch intensive Grundlagenforschung konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Blockierung von Kommunikation zwischen den Tumorzellen und dem sie umgebenden Bindegewebe hoffnungsvolle Ansätze für die Entwicklung neuer Therapieformen darstellt. Anhand von Mausmodellen konnte die Tumorprogression durch den Einsatz von synthetischen Proteaseinhibitoren, Integrin-Antagonisten und Inhibitoren von Zelloberflächenrezeptoren reduziert werden [Löffek et al., 2006]. Auch die selektive Aktivierung von stressaktivierten Signalkaskaden wie die der p38 MAPK zur Unterdrückung der Tumorprogression wird neuerdings diskutiert [Loesch und Chen, 2008].

Desweiteren zeigte der Einsatz von Ceroxid Nanopartikel (CNP, nanoceria) in Fibroblasten eine verminderte Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten und reduzierte die Invasion von Tumorzellen. Damit stellt diese Strategie einen vielversprechenden Ansatz für

mögliche neue Therapiekonzepte im Kampf gegen die Invasion und Metastasierung dar [Alili et al. 2011].

Möglicherweise kann durch stromale Therapie die Tumorprogression vermindert oder sogar verhindert werden. Damit stellt die Tumor-Stroma-Interaktion den Schlüssel zur Kontrolle der Metastasierung dar. Ziel der stromalen Interventionen soll eine verminderte Bildung sekundärer Tumore und Metastasen sein.



**Abb. 34: Die Tumor-Stroma-Interaktion und das Konzept der Chemoprävention**

Tumorzellen sezernieren den Wachstumsfaktor TGFβ1, der abhängig von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), der MAPK (p38) und der NAD(P)H-Oxidase zur Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten führt. Myofibroblasten sezernieren proinvasive Signale (Interleukin-6, IL-6; Hepatocyte growth factor, HGF; Vascular endothelial growth factor, VEGF) an Tumorzellen. Durch Einsatz von Antioxidantien (NAC) und Inhibitoren (Apocynin als Inhibitor der NAD(P)H-Oxidase, SB202190 als p38-Inhibitor) kann die Bildung des Myofibroblasten verhindert werden und damit die Invasion von Tumorzellen beeinflusst werden.

## 6. Zusammenfassung

Der Transformierende Wachstumsfaktor (TGF $\beta$ 1) wird von Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) sezerniert und führt zur Bildung des  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actins ( $\alpha$ SMA), ein Markerprotein für den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten in Myofibroblasten. Man vermutet, dass die Myofibroblasten, welche das reaktive Stroma an der Invasionsfront von Tumoren bilden, für die Tumorprogression unerlässlich sind. Ihre spezifische Funktion scheint es zu sein, Wachstumsfaktoren zu sezernieren, welche von den Tumorzellen für Metastasierungsprozesse benötigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit TGF $\beta$ 1 zu der Bildung von  $\alpha$ SMA-mRNA und zu der Bildung des  $\alpha$ SMA-Proteins in Fibroblasten führt.

Die durchgeführten Untersuchungen haben nachgewiesen, dass der TGF $\beta$ 1-vermittelte Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten, genauer gesagt die mesenchymal-mesenchymale Transition der Fibroblasten, von reaktiven Sauerstoffspezies abhängig ist. Als Quelle für die ROS konnte die NAD(P)H-Oxidase identifiziert werden. Innerhalb der ersten 16 Stunden nach TGF-Stimulation sind ROS in den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten involviert. Der maximale prooxidative Status der Zellen wurde zwischen 12 und 16 Stunden nach TGF-Stimulation anhand von oxidierten Proteinen detektiert.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die p38-MAPK für die Bildung der  $\alpha$ SMA-mRNA verantwortlich sind. Die Phosphorylierung der p38-Kinase ist von der NAD(P)H-Oxidase und damit auch von ROS abhängig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen den Zusammenhang zwischen ROS, der NAD(P)H-Oxidase und den p38-Kinasen, welche im Zusammenspiel zur Bildung des  $\alpha$ SMA-Proteins führen.

Die Aufklärung der zellulären Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem umliegenden stromalen Gewebe kann für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien bei der Therapie von malignen Erkrankungen von großer Bedeutung sein. Im Rahmen einer „stromalen Therapie“ könnten durch den Einsatz von Antioxidantien, Mikronährstoffen und verschiedenen Inhibitoren stressabhängiger Signaltransduktionswege in Zukunft stromale Zellen vor dem Einfluss von Tumorzellen geschützt werden.

**Abkürzungsverzeichnis:**

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BHT	2, 6-butyliertes Hydroxytoluen
BSA	Bovine serum albumine
CM	konditioniertem Medium
CNP	Ceroxid Nanopartikel
CPD	kummulative Populationsdichte
DAPI	Bisbenzimid
DFO	Desferrioxamin
DKG	Deutschen Krebsgesellschaft
DMEM	Eagle's Medium, nach Dubblecco's Modifikation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	Dinitrophenylhydrazin-Lösung
DPI	Diphenyliodonium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	epithelialen-mesenchymalen Transition
ERK	extrazellular-regulierten Kinasen
EZM	extrazellulären Matrix
FCS	fötale Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDF	humane dermale Fibroblasten
HO·	Hydroxylradikale
HRP	horseradish-peroxidase
IL-1	Interleukin 1
JNK	Jun-N-Terminalen Kinase
KCL	Kaliumchlorid

MAPK	mitogenaktivierten Proteinkinasen
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
MF	Myofibroblast
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MMT	mesenchymal- mesenchymale Transition
MTT	Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NAC	N-acetyl-L-cystein
NaCl	Natriumchlorid
NADH-Oxidase	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superoxid-Anion
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Real-Time
PDGF	platelet derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
RO <sup>·</sup>	Alkoxyradikale
ROO <sup>·</sup>	Peroxyradikale
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SCL-1	Plattenepithelkarzinomzellen der Linie SCL-1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxid-Dismutase
TBST	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) TritonX100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGFβ1	transforming growth factor β1
TMB	Tetramethylbenzidin
VEGF	vascular endothelial growth factor)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZZK	Zell-Zell-Kommunikation
αSMA	α-smooth muscle Aktin

**Literaturverzeichnis:**

- Alili L, Sack M, Karakoti AS, Teuber S, Puschmann K, Hirst SM, Reilly CM, Zanger K, Stahl W, Das S, Seal S, Brenneisen P. (2011) Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions. *Biomaterials*. Apr;32(11):2918-29.
- Aplin AE, Howe AK, Juliano RL (1999) Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 737-744.
- Aruoma OI, Bahorun T, Clement Y, Mersch-Sundermann V (2005) Inflammation, cellular and redox signalling mechanisms in cancer and degenerative diseases. *Mutat Res. Nov* 11;579(1-2):1-5.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.*;6(6):593-7.
- Aslan M, Ozben T (2003) Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antioxid Redox Signal.* Dec;5(6):781-8.
- Bajaj-Elliot M, Breese E, Poulson R, Fairclough PD, MacDonald TT (1997) Keratinocyte growth factor in inflammatory bowel disease. Increased mRNA transcripts in ulcerative colitis compared with Crohn's disease in biopsies and isolated mucosal myofibroblasts. *Am. J. Pathol.* 151: 1469-1476.
- Barnes JL, Gorin Y (2011) Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int.* May;79(9):944-56.
- Barrett JC, Shelby MD. (1992) Mechanisms of human carcinogens. *Prog Clin Biol Res.* 1992;374:415-34.
- Bayraktutan U, Draper N, Lang D, Shah AM (1998) Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary expressed in bovine pulmonary artery smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 38: 256-262.
- Bayreuther K, Francz PI, Rodemann HP. (1992) Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation. *Arch Gerontol Geriatr.* 15 Suppl 1:47-74.
- Berlett BS, Stadtman ER. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* Aug 15;272(33):20313-6.

- Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, Moses HL (2004) TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*. 2004 Feb 6;303(5659):848-51.
- Bhowmick NA, Moses HL. (2005) Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev*. Feb;15(1):97-101.
- Bierie B, Moses HL (2006) Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*. Jul;6(7):506-20.
- Birnbaum A, Ready N. (2005) Gefitinib therapy for non-small cell lung cancer. *Curr Treat Options Oncol*. Jan;6(1):75-81.
- Bondi CD, Manickam N, Lee DY, Block K, Gorin Y, Abboud HE, Barnes JL (2010) NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol*. Jan;21(1):93-102.
- Boonstra J, Post JA (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. Aug 4;337:1-13.
- Bradham C, McClay DR. (2006) p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle* Apr;5(8):824-8.
- Brenmoehl J, Rieder F, Leeb S, Schölmerich J, Rogler G (2007) Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut*. Jan;56(1):130-9.
- Brenneisen P, Blaudschun R, Bernards M, Wenk J, Wlaschek M, Mever-Ingold W, Schauen M, Krieg T, Scharfetter-Kochanek K (1998) Increased temperature: a potentially important side-effect of ultraviolet radiation treatment leading to induction of interstitial collagenase/matrix metalloproteinase-1. *Br. J. Dermatol*. 139: 537-539.
- Brenneisen P, Wenk J, Klotz LO, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, Sies H, Scharfetter-Kochanek K (1998) Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation mediated signalling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem*. 273: 5279-5287.
- Brenneisen P, Wenk J, Wlaschek M, Krieg T, Scharfetter-Kochanek K (2000) Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the damage –dependent signalling increase pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem*. 275: 4336-4344.
- Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K (2002) Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci*. Nov;973:31-43.

- Bulavin DV, Fornace AJ Jr (2004) p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res.*;92:95-118.
- Bulavin DV, Tararova ND, Aksenov ND, Pospelov VA, Pospelova TV (1999) Deregulation of p53/p21Cip1/Waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of E1A+cHara-ras transformed cells after gamma-irradiation. *Oncogene*. Oct 7;18(41):5611-9.
- Canfield PJ, Xu FN, Greenoak GE, Reeve VE, Gallagher CH, Wilkinson F (1986) Ultrastructure of ultraviolet radiation-induced hairless mouse skin carcinogenesis, with special reference to the epidermal-dermal junction. *Pathology* 18: 337-344.
- Cat B, Stuhlmann D, Steinbrenner H, Alili L, Holtkötter O, Sies H, Brenneisen P. (2006) Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci*. Jul 1;119(Pt 13):2727-38.
- Chiarugi P (2005) PTPs versus PTKs: the redox side of the coin. *Free Radic Res*. Apr;39(4):353-64.
- Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW et al. (1996) Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* 276: 1957-1963.
- Cotgreave I (1996) N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv. Pharmacol.* 38: 205.
- Cotgreave I, Moldéus P, Schuppe I (1991) The metabolism of N-acetylcysteine by human endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. Jun 21;42(1):13-6.
- Cuenda A, Rousseau S. (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. Aug;1773(8):1358-75.
- Dabiri G, Tumbarello DA, Turner CE, Van de Water L (2008) Hic-5 promotes the hypertrophic scar myofibroblast phenotype by regulating the TGF-beta1 autocrine loop. *J Invest Dermatol*. Oct;128(10):2518-25.
- De Caestecker M.P., Piek E., Roberts A.B. (2000). Role of transforming growth factor- $\beta$  signaling in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 1388-1402.
- De Gruijl FR, Longstreth J, Norval M, Cullen AP, Slaper H, Kripke ML, Takizawa Y, van der Leun JC (2003) Health effects from stratospheric ozone depletion and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 16-28. Erratum in: *Photochem. Photobiol. Sci.* 2003 Mar;2: 354.

- De Wever O, Mareel M (2002) Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol.Chem.* 383: 55-67.
- De Wever O, Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J. Pathol.* 200: 429-447.
- Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G (2004) The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol.*;48(5-6):509-17.
- Desmoulière A. (1995) Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int.* May;19(5):471-6.
- Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) Dt. Krebsgesellschaft (2002) Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien. *AWMF-Leitlinien-Register 032/022*: 1-7.
- Diffey B (2004) Climate change, ozone depletion and the impact on ultraviolet exposure of human skin. *Phys. Med. Biol.* 49: R1-11.
- Dissertation von Bahar Cat, Oktober 2007; Mesenchymal-mesenchymale Transition: Oxidativer Stress und Tumordinvasion
- Dong Young Rhyu, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST, Lee HB (2005) Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* Mar;16(3):667-75. Epub 2005 Jan 26.
- Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C Azzarone B (1998) Interleukin (IL)4 and IL-13 act on human lung fibroblasts, implication in asthma. *J.Clin. Invest.* 101: 2129-2139
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* Dec 25;315(26):1650-9.
- El-Remessy AB, Tang Y, Zhu G, Matragoon S, Khalifa Y, Liu EK, Liu JY, Hanson E, Mian S, Fattah N, Liou GI. (2008) Neuroprotective effects of cannabidiol in endotoxin-induced uveitis: critical role of p38 MAPK activation. *Mol Vis.*;14:2190-203.
- English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res.* Nov 25;253(1):255-70.
- Fleischmajer R, Perlsh JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R (1990) Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 580: 161-175.
- Frazier DP, Wilson A, Dougherty CJ, Li H, Bishopric NH, Webster KA (2007) PKC-alpha and TAK-1 are intermediates in the activation of c-Jun NH2-terminal kinase by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Apr;292(4):H1675-84.

- Furstenberger, G. and A. Kopp-Schneider (1995). Malignant progression of papillomas induced by the initiation--promotion protocol in NMRI mouse skin. *Carcinogenesis* 16(1): 61-9.
- Gabbiani G, Ryan GB, Majne G (1971) Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. May 15;27(5):549-50.
- Gaitanaki C, Kefaloyianni E, Marmari A, Beis I. (2004) Various stressors rapidly activate the p38-MAPK signaling pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *Mol Cell Biochem*. May;260(1-2):119-27.
- Giancotti FG, Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032.
- Gillissen A, Jaworska M, Orth M, Coffiner M, Maes P, App EM, Cantin AM, Schultze-Werninghaus G (1997) Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. *Respir Med*. Mar;91(3):159-68.
- Gillissen A, Schärling B, Jaworska M, Bartling A, Rasche K, Schultze-Werninghaus G (1997) Oxidant scavenger function of ambroxol in vitro: a comparison with N-acetylcysteine. *Res Exp Med (Berl)*.;196(6):389-98.
- Goldberg PL, MacNaughton DE, Clements RT, Minnear FL, Vincent PA (2002) p38 MAPK activation by TGF-beta1 increases MLC phosphorylation and endothelial monolayer permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Jan;282(1):L146-54.
- Gotzmann J, Fischer AN, Zojer M, Mikula M, Proell V, Huber H, Jechlinger M, Waerner T, Weith A, Beug H, Mikulits W (2006) A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene*. May 25;25(22):3170-85.
- Gourlay CW, Ayscough KR. (2005) Identification of an upstream regulatory pathway controlling actin-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Sci*. May 15;118(Pt 10):2119-32.
- Grafström RC, Dypbukt JM, Sundqvist K, Atzori L, Nielsen I, Curren RD, Harris CC. (1996) Pathobiological effects of acetaldehyde in cultured human epithelial cells and fibroblasts. *Carcinogenesis*. May;15(5):985-90.
- Halliwell B, Gutteridge MC (2002) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford Science Publications: 133 + 301.
- Hazzalin CA, Mahadevan LC. (2002) MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jan;3(1):30-40.

- Herrmann G, Wlaschek M, Lange TS, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter-Kochanek K (1993) UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 2: 92-97.
- Hiran TS, Moulton PJ, Hancock JT (1997) Detection of superoxide and NADPH oxidase in porcine articular chondrocytes. *Free. Radic. Biol. Med.* 23: 736-743.
- Jinnin M., Ihn H., Yamane K., Mimura Y., Asano Y., Tamaki K. (2005). Alpha2(I) collagen gene regulation by protein kinase C signalling in human dermal fibroblasts. *Nucleic Acids Res.* 33: 1337-1351.
- Johann AM, von Knethen A, Lindemann D, Brüne B (2006) Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and attenuates the oxidative burst. *Cell Death Differ.* Sep;13(9):1533-40.
- Jones SA, Wood JD, Coffey MJ, Jones OT (1994) The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett.* 355: 178-182.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6: 199-213.
- Kielty CM, Shuttleworth CA (1997) Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc. Res. Tech.* 38: 413-427.
- Koivukangas V, Kallioinen M, Autio-Harmainen H, Oikarinen A (1994) UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta. Derm. Venereol.* 74: 279-282.
- Kunz-Schughart LA, Knuechel R (2002) Tumor-associated fibroblasts (Part II): functional impact in tumor tissue. *Histol. Histopathol* 17: 623-637.
- Kyriakis JM, Avruch J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* Apr;81(2):807-69.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. (1998) Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin.* Jan-Feb;48(1):6-29.
- Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, Falus A (2000) Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine.* Jun;12(6):547-54.
- Leeb SN, Vogl D, Falk W, Schölmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. (2002) Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors.* Jun;20(2):81-91.
- Levine RL, Stadtman ER (2001) Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol.* Sep;36(9):1495-502.

- Li JY, Shen XJ, Deng H. Involvement of LMO4 in tumorigenesis associated epithelial-mesenchymal transition. (2011) *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. Jan;40(1):107-11.
- Liotta LA, Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411: 375-379.
- Loesch M, Chen G (2008) The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? *Front Biosci*. May 1;13:3581-93.
- Löffek S, Zigrino P, Mauch C. (2006) Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion and metastasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. Jun;4(6):496-502; quiz 503.
- Lorusso G, Rüegg C. (2008) The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol*. Dec;130(6):1091-103.
- Marks F., Furstenberger G. (1983). Multistage tumor promotion in skin. *Princess Takamatsu Symp* 14: 273-87.
- Marks F., Furstenberger G. (1990). The conversion stage of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11(12): 2085-92.
- Marnett LJ. (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*. Mar 8;424(1-2):83-95.
- Martin-Garrido A, Brown DI, Lyle AN, Dikalova A, Seidel-Rogol B, Lassègue B, San Martín A, Griendling KK (2011) NADPH oxidase 4 mediates TGF- $\beta$ -induced smooth muscle  $\alpha$ -actin via p38MAPK and serum response factor. *Free Radic Biol Med*. Jan 15;50(2):354-62.
- Matrisian LM (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays*. 14: 455-463.
- Meyer-Ter-Vehn T, Gebhardt S, Sebald W, Buttmann M, Grehn F, Schlunck G, Knaus P (2006) p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Apr;47(4):1500-9.
- Moliere P, Moysan A, Santus R, Huppe G, Maziere JC, Ertret L (1991) UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta* 1048: 261-268.
- Müller MM, Fusenig NE (2002) Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 70: 486-497.
- Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Naruse K, Kiyoku H, Hiroi M (1998) The role of myofibroblasts at the tumor border of invasive colorectal adenocarcinomas. *Jpn. J. Clin. Oncol*. 28: 615-620.

- Olaso E, Santisteban A, Bidaurrezaga J, Gressner AM, Rosenbaum J, Vidal-Vanaclocha F (1997) Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 26: 634-642.
- Orimo A, Weinberg RA. (2006) Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. Aug;5(15):1597-601.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. May 6;121(3):335-48.
- Paget S. (1998) The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev*. Aug;8(2):98-101.
- Parsons M, Adams JC. (2008) Rac regulates the interaction of fascin with protein kinase C in cell migration. *J Cell Sci*. Sep 1;121(Pt 17):2805-13.
- Petersen MJ, Hansen C, Craig S (1992) Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts. *J. Invest. Dermatol*. 99: 440-444.
- Pierceall WE, Woodard AS, Morrow JS, Rimm D, Fearon ER (1995) Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 11: 1319-1326.
- Pietras K, Ostman A (2010) Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. May 1;316(8):1324-31. Epub 2010 Mar 6.
- Pitot, H. C. (1989). Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 80(7): 599-607.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E (2004) Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*. May;11(9):1163-82.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999) Myofibroblasts I. Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol*. 277: C1-C19.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999) Myofibroblasts II. Interstitial subepithelial myofibroblasts. *Am. J. Physiol*. 277: C183-201.
- Raftos JE, Dwarthe TM, Luty A, Willcock CJ (2006) Direct measurement of the rate of glutathione synthesis in 1-chloro-2,4-dinitrobenzene treated human erythrocytes. *Redox Rep*. 2006;11(1):9-14.

- Räsänen K, Vaheri A. (2010) Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res.* Oct 15;316(17):2713-22.
- Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER (2001) Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 2;98(1):69-74.
- Rhyu Dong Young, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST, Lee HB (2005) Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* Mar;16(3):667-75. s.o.
- Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Auflage 2012
- Ronnov-Jessen L, Petersen OW (1993) Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implication for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab. Invest.* 68: 696-707.
- Ross J.M., McIntire L.V., Moake J.L., Rand J.H. (1995). Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiological flow conditions. *Blood* 85: 1826-1835.
- Rudmik LR, Magliocco AM. (2005) Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol.* Dec 15;92(4):347-59.
- Scharffetter K, Wlaschek M, Hogg A, Bolsen K, Schothorst A, Goerz G, Krieg T, Plewig G (1991) UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch. Dermatol. Res.* 283: 506-511.
- Scharffetter-Kochanek K (1997) Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention *Adv. Pharmacol.* 38: 639-655.
- Scharffetter-Kochanek K, Klein CE, Heinen G, Mauch C, Schaefer T, Adelman-Grill BC, Goerz G, Fusenig NE, Krieg TM, Plewig G (1992) Migration of a human keratinocyte cell line (HACAT) to interstitial collagen type I is mediated by the alpha 2 beta 1-integrin receptor. *J. Invest. Dermatol.* 98: 3-11.
- Schiebler TH und Schmidt W, Anatomie , Springer-Verlag, 8. Auflage 2003
- Serini G, Gabbiani G (1999) Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res.* Aug 1;250(2):273-83.
- Shacter E (2000) Protein oxidative damage. *Methods Enzymol.* 2000;319:428-36.

- Shen WL, Gao PJ, Che ZQ, Ji KD, Yin M, Yan C, Berk BC, Zhu DL (2006) NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species regulate angiotensin-II induced adventitial fibroblast phenotypic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 6;339(1):337-43.
- Sies H (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25: 1058-1071.
- Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91: 31S-38S.
- Sies H (1997) Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82: 291-295.
- Sies H, Cadenas E (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 311: 617-631.
- Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, Byers SW (1991) Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ.* 2: 365-372.
- Stein B, Rahmsdorf HJ, Steffen A, Litfin M, Herrlich P (1989) UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5169-5181.
- Steinmetz KA, Potter JD (1996) Vegetables, fruits and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 96: 1027-1039.
- Stuhlmann D, Ale-Agha N, Reinehr R, Steinbrenner H, Ramos MC, Sies H, Brenneisen P (2003) Modulation of homologous gap junctional communication of human dermal fibroblasts via paracrine factor(s) generated by squamous tumor cells. *Carcinogenesis* 24: 1737-1748.
- Stuhlmann D, Steinbrenner H, Wendlandt B, Mitic D, Sies H, Brenneisen P (2004) Paracrine effect of TGF $\beta$ 1 on downregulation of gap junctional communication between human dermal fibroblasts. *BBRC* 319: 321-326.
- Szeimies Rolf-M., Tumoren der Haut; Thieme Verlag 2010
- Tada J, Hashimoto K (1997) Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. *J. Cutan. Pathol.* 24 :628-635.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signalling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* 279: L1005-L1028.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (1995) Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem.* Dec 22;270(51):30334-8.

- Thompson EW, Torri J, Sabol M, Sommers CL, Byers S, Valverius EM, Martin GR, Lippman ME, Stampfer MR, Dickson RB (1994) Oncogene-induced basement membrane invasiveness in human mammary epithelial cells. *Clin. Exp. Metastasis*. 12: 181-194.
- Tözeren A, Coward CW, Petushi SP (2005) Origins and evolution of cell phenotypes in breast tumors. *J Theor Biol*. Mar 7;233(1):43-54.
- Tossios P, Mehlhorn U, Blickpunkt der Mann 2004; 2 (3): 36-39
- Trosko JE, Ruch RJ (1998) Cell-cell-communication in carcinogenesis. *Front Biosci*. 3: d208-236.
- Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. (2007) Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. Apr 1;13(7):2082-90.
- Uhal BD, Kim JK, Li X, Molina-Molina M. (2007) Angiotensin-TGF-beta 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages. *Curr Pharm Des.*;13(12):1247-56.
- Vardouli L, Vasilaki E, Papadimitriou E, Kardassis D, Stournaras C (2008) A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. *FEBS J*. Aug;275(16):4074-87.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. Mar 19;116(6):855-67.
- Wang L, Ko CY, Meyers EE, Pedroja BS, Pelaez N, Bernstein (2011) Concentration-dependent effects of transforming growth factor  $\beta$ 1 on corneal wound healing. *AM Mol Vis.*;17:2835-46.
- Wang QP, Escudier E, Roudot-Thoraval F, Abd al Samad I, Peanegre R, Coste A (1997) Myofibroblast accumulation induced by transforming growth factor- $\beta$  is involved in the pathogenesis of nasal polyps. *Laryngoscope* 107: 926-931.
- Weinberg RA, Orimo A (2006) Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. Aug;5(15):1597-601.
- Welch WJ, Tojo A, Wilcox CS. (2000) Roles of NO and oxygen radicals in tubuloglomerular feedback in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol*. May;278(5):F769-76.
- Werth C, Stuhlmann D, Cat B, Steinbrenner H, Alili L, Sies H, Brenneisen P (2008) Stromal resistance of fibroblasts against oxidative damage: involvement of tumor cell-secreted

- platelet-derived growth factor (PDGF) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activation. *Carcinogenesis*. 29(2):404-10
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*. Jan;79(1):143-80.
- Wlaschek M, Bolsen K, Herrmann G, Schwarz A, Wilmroth F, Heinrich PC, Goerz G, Scharffetter-Kochanek K (1993) UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived-collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage? *J. Invest. Dermatol.* 101: 164-168.
- Wlaschek M, Briviba K, Stricklin GP, Sies H, Scharffetter-Kochanek K (1995) Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol.* 104: 194-198.
- Wlaschek M, Heinen G, Poswig A, Schwarz A, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K (1994) UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem. Photobiol.* 59: 550-556.
- Wlaschek M, Wenk J, Brenneisen P, Briviba K, Schwarz A, Sies H, Scharffetter-Kochanek K (1997) Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro. *FEBS Lett.* 413: 239-242.
- Wu WS (2006) The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* Dec;25(4):695-705.
- Xiong W, Kojic LZ, Zhang L, Prasad SS, Douglas R, Wang Y, Cynader MS (2006) Anisomycin activates p38 MAP kinase to induce LTD in mouse primary visual cortex. *Brain Res.* Apr 26;1085(1):68-76.
- Yuspa SH (1998) The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *J. Dermatol. Sci.* 17: 1-7.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* Jan;60-20
- Zafarullah M, Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Gedamu L, Pelletier JP. (1992) Expression of c-fos, c-jun, jun-B, metallothionein and metalloproteinase genes in human chondrocyte. *FEBS Lett.* Jul 20;306(2-3):169-72.
- Zigrino P, Löffek S, Mauch C (2005) Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie.* Mar-Apr;87(3-4):321-8.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Bremen, 27.10.2013

---

Katharina Maria Puschmann

## **Danksagung**

Dank schuldet die Verfasserin Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Brenneisen für die Ermöglichung dieser Arbeit und die aktive Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Lirija Alili für ihre unerschütterliche Geduld, Dr. Bahar Cat und Dr. Dominik Stuhlmann. Für die hilfreichen Anregungen im Laboralltag und die große Unterstützung während der mehrjährigen Bearbeitungszeit danke ich Claudia Wyrich, Manuela Ewing, allen weiteren Laborkollegen und Franz Josef Grips. Herr Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Nicht zuletzt gilt ein herzliches Dankeschön Dr. med. Timur Anlasik und meiner Familie.