

**Mesenchymal-mesenchymale Transition:
Oxidativer Stress und Tumorinvasion**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bahar Cat

aus Köln

Oktober 2007

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

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Brenneisen

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2007

Für meinen Vater

Inhalt

1.	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Einleitung	1
1.1.1	Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	1
1.1.2	Der Myofibroblast: Aufbau und Funktion	4
1.1.3	Prozesse der Karzinogenese	6
1.1.3.1	Das Plattenepithelkarzinom	8
1.1.3.2	Tumor-Stroma-Interaktionen während der Tumorprogression	9
1.1.3.3	Wachstumsfaktoren und Signalkaskaden während der Tumorprogression	12
1.1.3.4	Die Smad-Proteine als Mediatoren der TGF β 1-Signalkaskade	15
1.1.3.5	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) während der Tumorprogression	17
1.1.4	Die Nutzung von Hautäquivalenten	20
1.2	Fragestellung	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Versuchsmaterialien	22
2.2	Puffer und Lösungen	24
2.3	Antikörper	28
2.3.1	Primäre Antikörper	28
2.3.2	Sekundäre Antikörper	29
2.4	Enzyme und Primer (PCR)	29
2.5	Verbrauchsmaterialien	29
2.6	Geräte	30
2.7	Software	30

2.8	Zellen und zellbiologische Methoden	31
2.8.1	HDF – humane dermale Fibroblasten	31
2.8.2	SCL-1	31
2.8.3	HepG2	31
2.8.4	Isolierung von Fibroblasten aus Biopsien	32
2.8.5	Kultivierung der Zellen	32
2.8.6	Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	33
2.8.7	Herstellung von konditioniertem Medium/Zellüberstand (CM)	34
2.8.8	Mykoplasmentest	34
2.8.9	Vitalitätsbestimmung (MTT-Test)	35
2.8.10	Allgemeine Versuchsbedingungen	37
2.8.11	Proteinbestimmung	37
2.8.12	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Messung)	37
2.8.13	Aufreinigung von Selenoprotein P	38
2.8.14	Herstellung von Dermis- und Hautäquivalenten	38
2.8.15	Invasionsassay	40
2.9	Molekularbiologische Methoden	42
2.9.1	Reverse Transkriptase-PCR	42
2.9.2	Agarose-Gelelektrophorese	44
2.9.3	siRNA-Transfektion	45
2.10	Biochemische Methoden	47
2.10.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.10.2	Immunologischer Nachweis (Western-Blot)	48
2.10.3	Immunzytochemie	49
2.10.4	Zytokin-Antikörper Array	49
2.10.5	Enzyme-linked immuno assay (ELISA)	50
2.10.6	Lipidperoxidationsassay	50
2.10.7	NADH-Oxidase Aktivitätsmessung	52
2.10.8	Immunologischer Nachweis Oxidierter Proteine (OxyBlot)	53

2.10.9	Aufreinigung oxidiertes Proteine für die zwei-dimensionale Gelelektrophorese	53
2.10.10	Isoelektrofokussierung (IEF)	54
2.11	Statistik	56
3.	Ergebnisse	57
3.1	TGFβ1-induzierte Transdifferenzierung von humanen dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten	57
3.2	Reaktive Sauerstoffspezies als Vermittler der TGFβ1-induzierten Transdifferenzierung	60
3.3	TGFβ1-vermittelte Bildung von Lipidhydroperoxiden	67
3.4	Der ROS-induzierte Signalweg ist unabhängig von der Smad2-Phosphorylierung	70
3.5	Die NADH-Oxidase beeinflusst die TGFβ1-vermittelte ROS-Produktion	76
3.6	Die PKC aktiviert die ROS/TGFβ1-bedingte αSMA-Expression	80
3.7	Oxidierung von Zielstrukturen durch TGFβ1-induzierte ROS	85
3.8	TGFβ1-induzierte Transdifferenzierung in Dermis- und Hautäquivalenten: ein <i>in-vivo</i> Modell	91
3.9	Myofibroblasten sind essentiell für die Invasionskapazität von Tumorzellen <i>in-vitro</i>	94
3.10	Invasion von SCL-1 Zellen in Hautäquivalenten	99
4.	Diskussion	102
4.1	Parakrin wirkendes TGFβ1 induziert die Transdifferenzierung von dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten	103
4.2	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermitteln die TGFβ1-induzierte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten	104

4.3	Antioxidantien unterbinden die durch mesenchymal-mesenchymale Transition verstärkte Tumorprogression	105
4.3.1	NAC verhindert die mesenchymal-mesenchymale Transition von Fibroblasten	106
4.3.2	TGFβ1 initiiert Lipidperoxidation in dermalen Fibroblasten	106
4.3.3	Selen als Schutz gegen ROS und Tumorprogression	107
4.4	Die der MMT zugrunde liegende Signalkaskade: der Status quo	109
4.4.1	ROS-unabhängige Beteiligung von Smad an der Transdifferenzierung	110
4.4.2	Die Proteinbiosynthese als mögliches ROS-Target	111
4.5	Myofibroblasten unterstützen die Tumordinvasion	112
4.6	Stromale Therapie mittels Antioxidantien: neues Konzept zur Verhinderung der Tumorprogression	113
5.	Perspektiven	116
6.	Zusammenfassung	117
7.	Summary	118
8.	Literaturverzeichnis	119
	Danksagung	131
	Erklärung	132

Abkürzungen

αSMA	α - smooth muscle actin
APS	Ammoniumpersulfat
Asc2P	Ascorbinsäure-2-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
cc-GAG	Kollagen-Chitosanglykosaminoglykan
cGPx	cytosolische Glutathion-Peroxidase
DAPI	Bisbenzimid
dH₂O	destilliertes Wasser
DMEM	Eagle´s Medium, nach Dubblecco´s Modifikation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
dNTP	Deoxyribonukleotid Triphosphat
DPI	Diphenyliodonium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fötales Kälberserum
FeSO₄	Eisen-II-sulfat
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
HBSS	Hanks buffered saline solution
HCl	Salzsäure
H₂DCF-DA	2,7-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
HDF	humane dermale Fibroblasten
HE	Hematoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor

4-HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
H₂SO₄	Schwefelsäure
IEF	Isoelektrofokussierung
IL-6	Interleukin 6
KCL	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumhydrogencarbonat
LOOH	Lipidhydroperoxide
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
min	Minute
MF	Myofibroblast
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mM	mMol/L
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMT	Mesenchymal-mesenchymale Transition
MTT	Tetrazoliumsalz3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
Na₂HPO₄	Natriumhydrogenphosphat
Na₂SeO₃	Natriumselenit
NHEK	Normale humane endotheliale Keratinozyten
nM	nmol/L
nm	Nanometer
µm	Mikrometer
µM	µmol/L
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
RT	Raumtemperatur
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

rpm	Rotationen pro Minute
SARA	Smad anchor for receptor activation
SCL-1	Plattenepithelkarzinomzellen der Linie SCL-1
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
siRNA	small interference RNA
SOD	Superoxid-Dismutase
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Lösung
TBST	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) TritonX100
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGFα	Transforming growth factor-alpha
TGFβ1	Transforming growth factor-beta 1
rTGFβ1	rekombinantes Transforming growth factor-beta 1
TIMP-1	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1
TMB	3,3,5,5-Tetramethylbenzidin
TPA	Phorbolster
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZZK	Zell-Zell-Kommunikation

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

1.1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut stellt das größte Sinnesorgan des Menschen dar und schirmt den Körper gegen die Außenwelt ab, dient aber gleichzeitig als unmittelbare Kontaktfläche zur Umwelt. Bei einer Fläche von rund 2 m² und einer durchschnittlichen Dicke von 7 bis 9 mm wiegt die Haut etwa 5 bis 10 kg, was etwa 15% des Körpergewichts ausmacht. Sie dient als schützende Barriere gegenüber physikalischen, chemischen oder mikrobiellen Einwirkungen und übernimmt vielfältige Stoffwechselfunktionen. Die Haut lässt sich in drei Schichten unterteilen: Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Corium oder Dermis) und Unterhaut (Subcutis). Die Epidermis dient dem Verdunstungsschutz, Strahlungsschutz, einer wasserdichten Abdeckung und ist zugleich ein Bildungsort von Haaren und Nägeln. Sie setzt sich aus fünf Schichten zusammen: Hornschicht (*stratum corneum*), Glanzschicht (*stratum lucidum*), Körnerzellschicht (*stratum granulosum*), Stachelzellschicht (*stratum spinosum*) und Basalschicht (*stratum basale*). *Stratum spinosum* und *stratum basale* werden auch als *stratum germinativum* (Regenerationsschicht) zusammengefasst, da sich hier aus epidermalen Stammzellen durch mitotische Teilungen neue Zellen bilden.

Neugebildete Zellen wandern in die oberen drei Zellschichten (Verhornungsschicht) ein, wo es zu einer Umstrukturierung der Keratinfilamente kommt. Die Zellen differenzieren zu kernlosen Korneozyten (Hornzellen) aus, um schließlich ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel zu bilden. Durch regelmäßiges Ablösen der äußeren Schichten des *stratum corneum* kann sich die Epidermis innerhalb von 27 Tagen erneuern. In der Epidermis sind auch die melaninbildenden Zellen des Pigmentsystems (Melanozyten), dendritische Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen) und Sinneszellen, die als Mechano-, Chemo-, und Thermorezeptoren fungieren können enthalten.

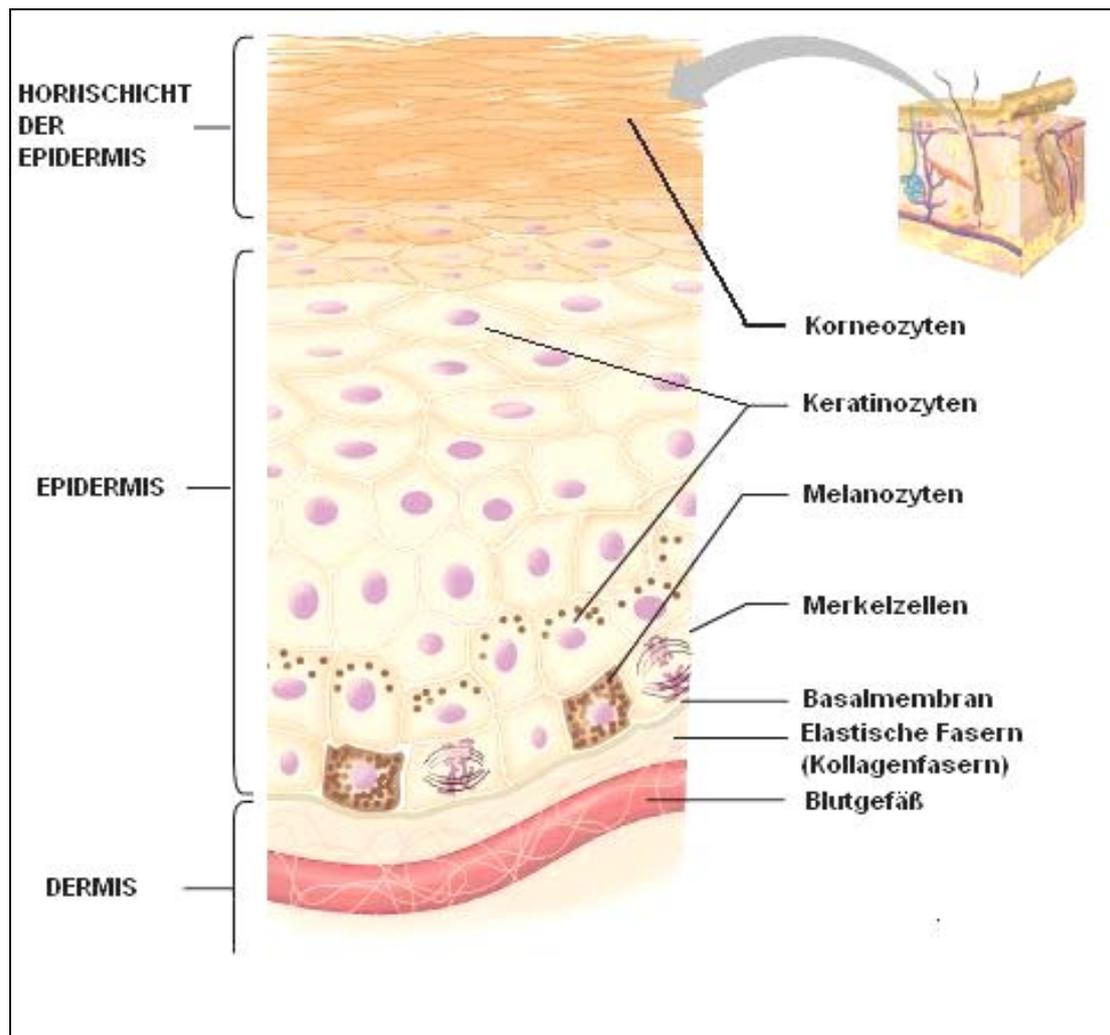


Abbildung 1.1.1: Aufbau der menschlichen Haut (Quelle: Internet: <http://www.rath.de/hautgefaehrdung.html>, verändert).

Die Basalmembran, die aus *lamina lucida externa*, *lamina densa* und *lamina lucida interna* besteht, trennt die Epidermis und die Dermis voneinander. Das *stratum basale* ist die unterste Schicht der Epidermis. Die Basalzellen sitzen direkt der Basalmembran auf, die die Epidermis von der Dermis scharf abgrenzt. Durch Proliferation sorgen die Basalzellen als Mutterzellen für die kontinuierliche Erneuerung der Haut. Die Tochterzellen werden durch die rege Zellteilung in weiter außen gelegene Schichten verschoben. Dort durchlaufen sie verschiedene Entwicklungsstadien. Die Basalmembran ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix und bietet eine Haftfläche für die angrenzenden Zellen. Laminine sind Glykoproteine, die einen wichtigen Bestandteil der Basalmembran bilden und die Adhäsion von Zellen an die Basalmembran fördern. Sie können die biologische Aktivität dieser Zellen regulieren und

steuern so die Bildung der Matrix [Boudreau et al., 1995]. Aufgrund ihrer selektiven Permeabilität bildet die Basalmembran eine Filtrationsschranke.

Das *stratum spinosum*, die Stachelzellschicht, folgt der Basalschicht. In ihr werden erstmals die sogenannten Keratinosome, membranbegrenzte Vakuolen, (Odland-Bodies) sichtbar. Sie enthalten die Vorläufersubstanzen der epidermalen Lipide in Form von scheibenförmig (lamellar) angeordneten Doppellipidmembranen. Im *stratum granulosum* beginnt die Verhornung (Keratinisierung) der Keratinozyten. Den Namen Körnerschicht erhält sie durch ihr Aussehen, welches durch die Anwesenheit der sogenannten Keratohyalingranula, einem Gemisch verschiedener Proteinstrukturen, bedingt ist. Das *stratum lucidum* ist die sogenannte Glanzschicht, da sie stark lichtbrechend ist. Die Zellen sind stark abgeplattet und liegen dicht beisammen. Zellgrenzen sind nicht mehr erkennbar. Neben dem Keratohyalin, einer Vorstufe des Keratins, enthalten die Granula sogenannte Filaggrine, die Kittsubstanz des Hautgerüsts. Das *stratum corneum* ist die oberste Schicht der Epidermis. Zwischen den Hornzellen (Korneozyten) liegen die epidermalen Lipide. Die Hornschicht, insbesondere deren unteres Drittel, bildet die Permeabilitätsbarriere, die eigentliche Barrierschicht der Haut gegen exogene Faktoren.

Die Dermis ist wie die Epidermis in unterschiedliche Schichten wie Papillarschicht (*stratum papillare*) und Geflechschicht (*stratum reticulare*) unterteilt. Das *stratum reticulare* bildet den unteren Teil der Dermis. Diese geht kontinuierlich in die tiefergelegene Subcutis (Unterhaut) über. Fibroblasten, Mastzellen und Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) bilden zusammen die Geflechschicht. Das *stratum papillare* bildet die scharfe, wellenförmige Grenze zur Epidermis. Die wellenförmige Struktur vergrößert dabei die Kontaktfläche zur Epidermis. In diesem Bereich liegen zusätzlich Kapillarschlingen, die die Versorgung der Epidermis sicherstellen, initiale Lymphgefäße, Nervenendigungen, die bis in die Epidermis verzweigt sind, so wie Mechano-, Chemo-, und Thermorezeptoren. So wird eine optimale Nährstoffversorgung der untersten Epithelschicht der Epidermis, den Basalzellen, über die in den Papillarkörpern verlaufenden Blutgefäße sichergestellt. Den Raum zwischen zellulären und faserigen Elementen (Interstitium) füllt eine gallertartige Flüssigkeit aus, die sogenannte Interzellulärschicht. Faserige Elemente und Interzellulärschicht bilden gemeinsam die extrazelluläre Matrix (EZM), in der sich die Zellen bewegen und miteinander interagieren können. Kollagenfasern im *stratum reticulare* bilden ein dichtes Netzwerk, das überwiegend parallel zur Körperoberfläche ausgerichtet ist und in dessen Maschen sich Fasern des elastischen

Bindegewebes verzweigen. Als eigenständige Strukturen der Haut sind Haarfollikel, Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen in die Dermis eingebettet. Das Bindegewebe der Haut ist in komplexer Weise aus Strukturproteinen und Bindegewebszellen (Fibroblasten) aufgebaut, wobei die Fibroblasten für die Synthese und den Abbau dieser Strukturproteine verantwortlich sind. Zu ihnen werden verschiedene multifunktionelle Glykoproteine, Proteoglykane und Faserproteine wie Elastin und unterschiedliche Kollagene gezählt [Ross et al., 1995; Brenneisen et al., 1996; Kielty et al., 1997]. Kollagene spielen in der Haut eine besondere Rolle, da sie von struktureller und funktioneller Bedeutung sind. Kollagen Typ VII beispielsweise, das sehr lang und stäbchenförmig erscheint, verbindet die Epidermis mit der Dermis und ist selber mit anderen Strukturproteinen der Basalmembran wie Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen und Kalinin vernetzt. Wie die Vernetzung erfolgt, ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt. Kollagen Typ I ist das Strukturprotein, das in der Dermis am häufigsten vorkommt und insbesondere für deren Reißfestigkeit und Stabilität verantwortlich ist [Van der Rest et al., 1991; Fleischmajer et al., 1990]. Der Abbau einzelner Bindegewebsproteine wird in kontrollierter Weise durch Enzyme, die zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen gehören, reguliert. Die Aktivität dieser Matrix-Metalloproteinasen wiederum wird durch Inhibitoren (TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases) kontrolliert, die von Fibroblasten synthetisiert werden [Docherty et al., 1992; Matrisian, 1992; Kahari et al. 1997; Kugler, 1999]. Letztendlich garantiert ein ausgeglichenes Verhältnis der Synthese von Strukturproteinen auf der einen Seite und der Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren auf der anderen Seite die Funktion des Bindegewebes der Haut.

1.1.2 Der Myofibroblast: Aufbau und Funktion

Einen weiteren wichtigen Zelltyp in der Bindegewebsschicht der Haut stellen Myofibroblasten dar. Myofibroblasten sind parakrine Zellen, die primär an Ereignissen wie Wachstum, Entwicklung und Wundheilung des Gewebes beteiligt sind. Sie stellen eine Zwischenform zwischen glatter Muskelzelle und Fibroblast dar und enthalten kontraktile Aktin- und Myosin-Filamente, sowie eine hohe endogene Produktion von Kollagen. Myofibroblasten entstehen während der Wundheilung aus Fibroblasten, welche durch aktivierte Makrophagen zur Zellteilung angeregt werden. Diese Myofibroblasten wandern mit den Makrophagen in das Wundgebiet hinein. Indem Makrophagen Leukozyten ersetzen, stimulieren sie die Einwanderung von weiteren Myofibroblasten sowie deren Proliferation.

Diese verstärken ihrerseits die Produktion von Kollagen Typ III (retikuläre Fasern), die Vorstufe des Bindegewebs-Netzwerkes vom Kollagen Typ I, und tragen so zur Narbenbildung bei.

Häufig stehen Myofibroblasten auch mit pathologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen, Asthma, Polypen der Nasenschleimhäute, Fibrosen und mit verschiedenen Krebserkrankungen in Verbindung [Bajaj-Elliot et al., 1997; Wang et al., 1997; Doucet et al., 1998; Powell et al., 1999]. Morphologisch sind Myofibroblasten durch kontraktile Mikrofilamentbündel, sogenannten „*stress fibers*“, und interzellulären *gap junctions* definiert, die eine der häufigsten Zellverbindungen darstellen. *Gap junctions* sind Zusammenschlüsse von Transmembrankanälen, die die Zytoplasmen benachbarter Zellen direkt miteinander verbinden. Dabei stellt jede Zelle jeweils Halbkanäle (Connexone) zur Verfügung, die gemeinsam den vollständigen Kanal bilden. Mit Hilfe dieser Kanäle ist eine Zelle in der Lage mit ihren Nachbarzellen direkt und/oder indirekt zu interagieren und Stoffaustausch zu betreiben [Stuhlmann et al., 2003; Trosko und Ruch, 1998]. Obwohl Myofibroblasten über *gap junctions* verfügen, ist die interzelluläre Kommunikation aufgrund ihrer Kontraktilität jedoch fraglich.

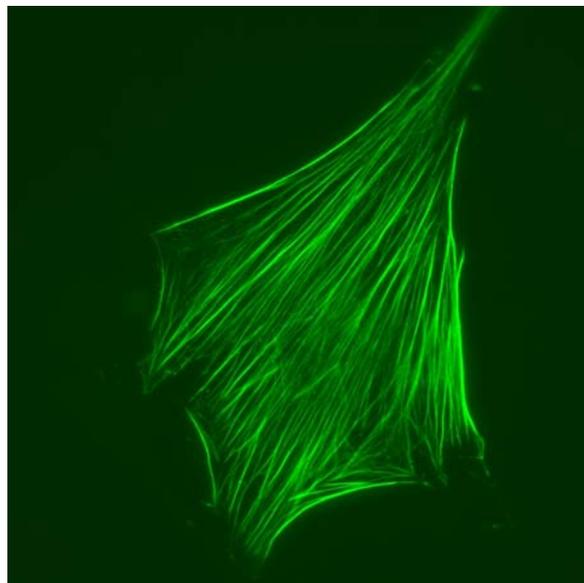


Abbildung 1.1.2: Morphologie eines Myofibroblasten. Immuncytochemischer Nachweis von α SMA

Immunologisch sind Myofibroblasten durch das α -smooth muscle Aktin (α SMA) und dem Vimentin charakterisiert. Das Protein α SMA wird am Mikrofilamentsystem der Zelle, durch Reorganisation des Aktins, gebildet und ermöglicht der Zelle zu kontrahieren.

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].

1.1.3 Prozesse der Karzinogenese

Bei der neoplastischen Transformation epidermaler Zellen handelt es sich um einen Mehrstufenprozess, dem epigenetische und genetische Veränderungen zugrunde liegen. Dieser Prozess trägt maßgeblich zu der Entwicklung von Hauttumoren, wie beispielsweise Basaliomen, Plattenepithelkarzinomen oder Melanomen, bei [Yuspa, 1998; Matsumura et al., 2002]. Diese Art der Veränderung führt zu einem Ungleichgewicht der zellulären Homöostase, die durch drei Kommunikationsprozesse aufrechterhalten wird. Neben der extrazellulären Kommunikation mittels Wachstumsfaktoren/Zytokine und der intrazellulären Kommunikation mittels sekundärer Botenstoffe und intrazellulären Signalkaskaden, spielt auch die interzelluläre Kommunikation über *gap junctions* eine wichtige Rolle. Die Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) mittels *gap junctions* ermöglicht beispielsweise die Vermittlung von Signalen zur Wachstumskontrolle, aber auch von Apoptosesignalen. Um ein ungehindertes Wachstum des Tumors zu gewährleisten, unterbinden Tumorzellen die ZZK in ihrer Umgebung durch Zytokine und schützen sich so vor Apoptosesignalen aus dem stromalen Gewebe.

Frühe Ereignisse der Karzinogenese sind Initiation und Promotion, die durch chemische Kanzerogene ausgelöst werden. Mutationen, die durch DNA-Schäden verursacht werden, bilden die Grundlage für die Initiation, die irreversibel verläuft. Eine Mutation entsteht während der Initiation in der Regel in Tumorsuppressorgenen, die für die Kontrolle des Zellzyklus und der Zellteilung zuständig sind. Mutierte Tumorsuppressorgene, werden als Onkogene bezeichnet, die dadurch charakterisiert sind, dass sie das Wachstum und die Proliferation der Zelle fördern.

Die Tumorpromotion hingegen basiert auf epigenetischer Grundlage und ist reversibel. Initiierte Zellen geben während der Proliferation ihren DNA-Schaden an die Tochterzellen weiter. Die instabile DNA dieser Zellen fördert das Risiko für weitere Mutationen in Tumorsuppressorgenen. Tumorpromotoren induzieren Veränderungen der epidermalen Homöostase und formen so eine für die Expansion der initiierten Zellen günstige Umgebung. Onkogene exprimieren Proteine, die eine wichtige Rolle bei der zellulären Signaltransduktion, der Wachstumskontrolle und der Genregulation von Tumorzellen spielen. Viele dieser Wachstumsfaktoren, wie EGF, PDGF, TGF α und TGF β 1, können aber auch die ZZK unterbinden. Wenn Onkogene vermehrt gebildet werden, führt dies zu einer neoplastischen Transformation einer Zelle. Durch die erhöhte Zellproliferation entsteht ein präneoplastischer Zellhaufen, der eine gutartige Krebsvorstufe darstellt, der sogenannte benigne Tumor. Dieser wächst zunächst nur begrenzt und metastasiert vorerst nicht. Ein frühes Ereignis in der Transformation von einer Zelle in eine Tumorzelle ist die Mutation und Aktivierung des *ras^{Ha}*-Gens. Phenotypische Konsequenzen von *ras*-Mutationen werden durch Aktivierung der Gene für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), der Proteinkinase C (PKC) α und AP-1 und die Inaktivierung der PKC δ durch Phosphorylierung der Tyrosinreste verursacht. Aus diesen Ereignissen resultieren Hyperproliferation, Aktivierung weiterer Gene und verspätete terminale Differenzierung, zelluläre Prozesse, die charakteristisch für die premaligne Progression sind. Das Proto-Onkogen *c-fos* reguliert das Zellwachstum, die Differenzierung und die Transformation und ist deshalb essentiell für die maligne Umwandlung der Zellen, da die durch *c-fos* induzierten Signalkaskaden zu der Sezernierung angiogenetischer und proteolytischer Faktoren führen [Yuspa, 1998].

Hyperproliferation und Immortalität sind typische Charakteristika maligner Tumoren, die durch fehlende Kommunikation über *gap junctions* gekennzeichnet ist [Trosko und Ruch, 1998]. Der Verlust der ZZK bei Basaliomen und Plattenepithelkarzinomen der Haut steht mit einer fehlenden Expression der Connexine 26 und 43 und mit dem Verlust der Translokation der Connexine an die Membranoberfläche in Verbindung, wie am Modell der Hautkarzinogenese an der Maus gezeigt werden konnte [Tada und Hashimoto, 1997].

1.1.3.1 Das Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom der Haut wird auch Spinaliom oder Stachelzellkarzinom genannt und ist neben dem Basaliom der zweithäufigste Hauttumor. Dieses Karzinom ist ein maligner Tumor, der von den Stachelzellen der Epidermis ausgeht. In Westeuropa erkranken jedes Jahr pro 100.000 Einwohner 20 Personen an Basalzellkarzinomen. In sonnenreichen Ländern ist die Zahl der Erkrankungsfälle für diese Tumore um das Zehn- bis Zwanzigfache erhöht. Bei Männern tritt die Erkrankung zwei bis fünf Mal häufiger auf als bei Frauen. Diese Beobachtung ist zum Teil auf die erhöhte Exposition gegenüber kanzerogenen Noxen in Berufen, die bevorzugt von Männern durchgeführt werden, zurückzuführen. Chronische Sonnenbestrahlung stellt einen weiteren wesentlichen Faktor für die Entstehung dieser Karzinome dar. Röntgenbestrahlungen und die Einwirkung von Chemikalien wie beispielsweise Arsen, polyzyklische Kohlenwasserstoffe, Teer, Tabak oder Ruß begünstigen zusätzlich die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen. Tumorwachstum kann außerdem durch chronische Virusinfektionen an Schleimhäuten gefördert werden [Aubin et al., 2003].

Spinaliome treten meist erst im fortgeschrittenen Alter zwischen 70 und 80 Jahren auf. Plattenepithelkarzinome entwickeln sich primär auf lichtgeschädigter Haut, also an Wangen, Nase, Lippen oder auf dem Kopf.



Abbildung 1.1.3: Fortgeschrittenes Plattenepithelkarzinom der Haut (Quelle: Jeffrey L. Melton, M.D., verändert).

Das Spinaliom ist ein solider epithelialer Tumor, dessen Zellen groß und plasmareich sind. Invasive Plattenepithelkarzinome bestehen aus atypischen epithelialen Tumorzellformationen, die über die Epidermis hinaus in die unterliegende Dermis reichen. Diese Zellen neigen wie die Keratinozyten des *stratum spinosum* der Epidermis zur Verhornung und bilden sogenannte Hornperlen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt je nach Größe und Lokalisation des Tumors zwischen 68% und 80% [Dt. Krebsgesellschaft, 2002].

Vorläufer der Plattenepithelkarzinome sind „aktinische Keratosen“, die durch scharf begrenzte, gerötete Hautareale charakterisiert sind und in der Regel eine fest haftende Schuppe tragen. Plattenepithelkarzinome können aus diesen durch einen mehrstufigen Prozess entstehen. Der erste Schritt findet auf molekularer Ebene statt. Karzinogene verursachen DNA-Schäden, die durch eine Reihe von Reparaturmechanismen (Exzisionsreparatur) bis zu einem gewissen Grad reparabel sind. Quantitative und/oder qualitative Überschreitung der Reparatursfähigkeit führt durch somatische Mutation zum Entstehen einer malignen Zelle und später eines malignen Tumors. Etwa 80-90% dieser Tumore können entfernt werden, wobei 10-20% der Tumore jedoch überwuchern und zu der Bildung eines Karzinoms und später zu der Bildung von Metastasen in entfernten Organen oder Geweben führen. Während der Metastasierung in tiefere Hautschichten spielen molekulare Interaktionen zwischen Tumorzellen und den um den Tumor liegenden gesunden Zellen eine entscheidende Rolle.

1.1.3.2 Tumor-Stroma-Interaktionen während der Tumorprogression

Um Invadieren und Metastasieren zu können, setzt die Tumorzelle die zellulären Kontrollmechanismen außer Kraft, was in einer unkontrollierten Proliferation der Tumorzelle resultiert. Invasion und Metastasierung beschreiben die Fähigkeit von Tumoren, den Primärtumor zu verlassen, in das umgebende Stroma einzudringen, Angiogenese anzuregen und an entfernten Orten Sekundärtumore zu formen [Müller und Fusenig, 2002]. Dabei stellt die Invasion den entscheidenden Schritt der Tumorprogression dar. Wenn Tumorzellen die Basalmembran durchdringen und somit von der Epidermis in die Dermis gelangen, erfüllen sie ein wesentliches Definitionskriterium der Malignität, das invasive Wachstum, das durch Veränderungen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen gekennzeichnet ist. Tumorzellen sind in der Lage ihre stromale Umgebung zu verändern, sodass sie dem Tumor eine hilfreiche und unterstützende Funktion in der Progression bieten. Morphologische Hinweise auf

stromale 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]. Physiologische Invasion, wie sie beispielsweise bei der Wundheilung auftritt, und maligne Invasion verwenden dieselben molekularen Mechanismen. Ein entscheidender Unterschied liegt darin, dass maligne Invasion beharrlich weiterläuft, während die physiologische Invasion gestoppt wird, wenn sie nicht mehr benötigt wird. Neovaskularisierung, Wundheilung und neuronales Wachstum während der Embryogenese sind Beispiele für physiologische Invasion. Tumorzellen stimulieren stromale Zellen kontinuierlich, um die physiologische Invasion weiterzuführen [Liotta und Kohn, 2001].

Die Tumor-Stroma-Interaktion kann durch Zell-Zell-Kontakt aber auch auf molekularer Ebene, über Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine, EZM-Proteine, Proteinasen, Proteinase-Inhibitoren und über Lipid-Produkte, stattfinden. Vermutlich wird die Invasion von Tumorzellen in dem Bindegewebe der Haut wesentlich durch Fibroblasten beeinflusst [De Wever und Mareel, 2003]. Der transformierende Wachstumsfaktor TGF β 1 ist ein Wachstumsfaktor, der durch die Tumorzelle sezerniert wird und Fibroblasten zu Myofibroblasten transdifferenziert. Daneben ist Angiogenese ein weiterer wichtiger Aspekt der Tumor-Stroma-Interaktion. Die Angiogenese eines Tumors wird primär durch den vaskularisierenden endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) vorangetrieben, indem er Blutgefäße in Richtung des Tumors anzieht, um diesen mit Nährstoffen und Sauerstoff zu beliefern und die Metastasierung über den Blutkreislauf zu erleichtern. Eine Vaskularisierung erlaubt außerdem die Kommunikation zwischen dem Primärtumor und seinen Metastasen [Carmeliet und Jain, 2000].

Die Invasion von Tumorzellen von der Epidermis in die Dermis erfolgt in drei wesentlichen Schritten:

1. Adhäsion von Tumorzellen an die Basalmembran
2. Degradation der Basalmembran
3. Migration der Tumorzellen durch die degradierte Basalmembran von der Epidermis in die Dermis

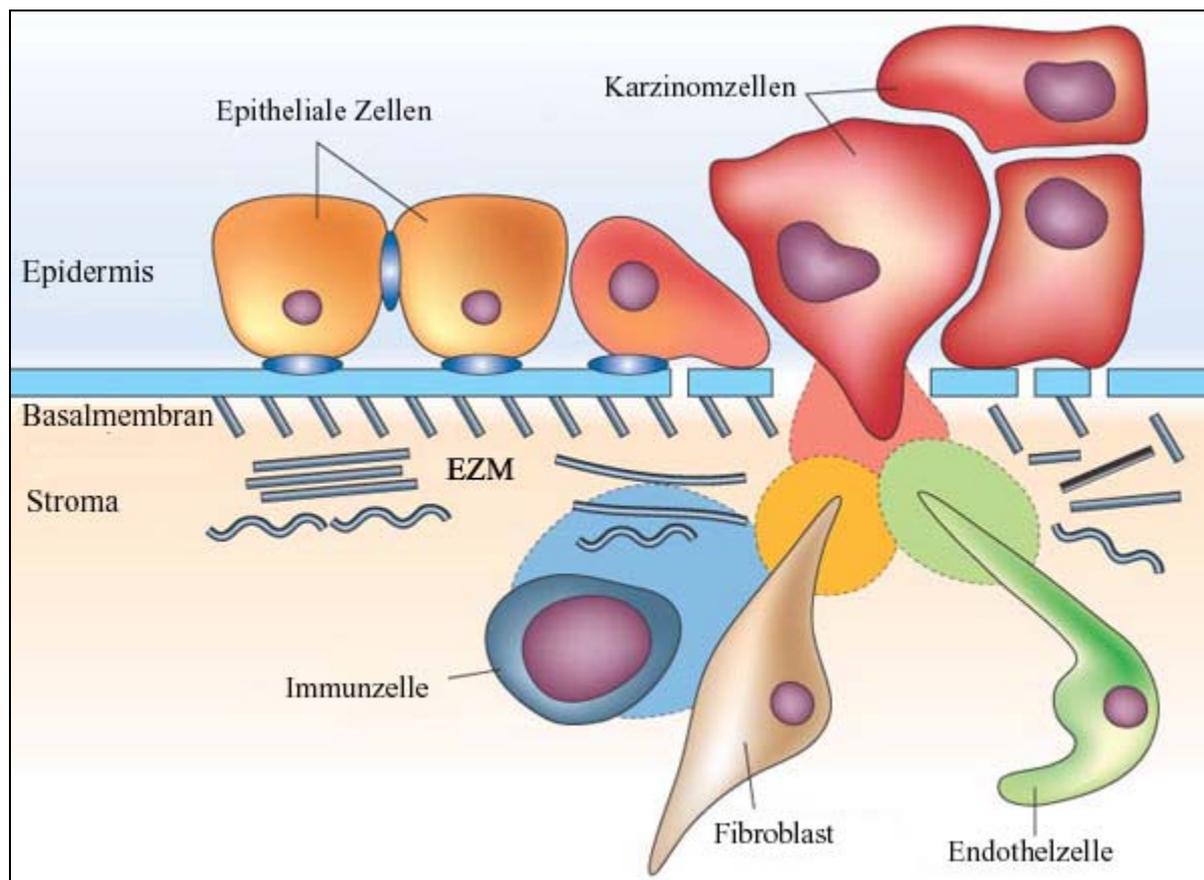


Abbildung 1.1.4: Tumorprogression von Karzinomzellen in der Haut (Liotta und Kohn, 2001, verändert).

Abbildung 1.1.4 zeigt die Invasion von Tumorzellen in das subepitheliale Bindegewebe und den aktiven Abbau wichtiger Bestandteile, um Anschluss an das Blutgefäßsystem zu erlangen. Während dieses Ereignisses kommt es verstärkt zu Tumor-Stroma-Interaktionen, die die Invasion der Tumorzellen positiv beeinflussen können [Liotta und Kohn, 2001]. Nach Verlust der Zell-Zell-Adhäsion kommt es zum Einbruch der Tumorzellen in die Lymph- und/oder Blutgefäße. Die Tumorzellen dringen in das Lymphsystem ein, wo es vermehrt zu der Bildung von Zellclustern in den regionalen Lymphknoten kommt. Von dort gelangen die Tumorzellen weiter über die Lymphabflusswege in die Blutbahn. Metastasen bilden sich in entfernten Geweben durch Adhärenz der Tumorzellen an das Epithel. Nach Durchdringen der endothelialen Basalmembran, invadieren die Tumorzellen in das subendotheliale Bindegewebe. Im nächsten Schritt befallen sie das Parenchym des betreffenden Organs und formen dort einen Sekundärtumor.

Um migrieren zu können adhären Tumorzellen mit Hilfe von Integrinen an bestimmte Glykoproteine der EZM. Integrine sind heterodimere Glykoproteine (α - und β -Untereinheiten), die zum Beispiel Motilität, Invasion, Zellwachstum und Zellmorphologie der

Tumorzellen beeinflussen und sind an der Zelloberfläche lokalisiert. Diese Integrine verbinden die EZM, mit Hilfe von zytoplasmatischen Domänen, mit den Komponenten des Zytoskeletts. Auf diese Weise erfüllen die Integrine eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion [Aplin et al., 1999; Giancotti et al., 1999]. Der Kontakt der Integrine mit den Proteinen der EZM aktiviert Rho-Proteine der kleinen GTP-ase. Umgekehrt beeinflussen die Proteine aus der Rho- und Ras-Gruppe die Fähigkeit der Bindung von Integrinen an ihre Liganden.

Die maligne Progression wird außerdem auch durch Veränderungen der Expression oder der Struktur von E-Cadherinen oder Cateninen beeinflusst. E-Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, die epitheliale Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Ein Verlust von E-Cadherin kann zu einem Zusammenbruch zellulärer Verbände führen. E-Cadherine werden als Tumorsuppressoren angesehen, da 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].

Tumorzellen können mittels lokaler Proteolyse durch die Basalmembran und weiter in das Bindegewebe wandern. Dazu werden Proteinase (Serin-Proteinase, Cystein-Proteinase, Asparagin-Proteinase und Metalloproteinase) durch Tumorzellen oder von Stromazellen nach Stimulation durch die Tumorzellen produziert. Die Expression von Matrix-Metalloproteinase (MMPs) begünstigt die Degradation der EZM, welches die Invasion der Tumorzelle erheblich erleichtert [Matrisian, 1992; Kahari und Saarialho-Kere, 1997]. Auch die Expression verschiedener Zytokine während der Tumorprogression erleichtert die Invasion der Tumorzellen maßgeblich. Der transformierende Wachstumsfaktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) spielt als Tumorsuppressor auf der einen Seite, aber auch durch seine onkogenen Aktivitäten eine komplexe Rolle während der Karzinogenese [de Caestecker et al., 2000].

1.1.3.3 Wachstumsfaktoren und Signalkaskaden während der Tumorprogression

Die TGF β -Familie verfügt über eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die sich in ihrer Polypeptidstruktur ähneln. Jedes dieser Wachstumsfaktoren ist verantwortlich für eine große Anzahl biologischer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Motilität, Adhäsion oder Apoptose. TGF $\beta 1$ ist ein multifunktionelles Zytokin, das während zahlreicher Erkrankungen produziert wird. Eine übermäßige Aktivierung des TGF $\beta 1$ kann zu Vernarbungsprozessen

unterschiedlicher Gewebetypen und daraus resultierend zu gestörten Organfunktionen führen. TGF β 1 spielt auch während des Wachstums verschiedener solider Tumore eine wichtige Rolle. Die zelltyp-abhängige Sekretion des TGF β 1 kann durch verschiedene Stimuli wie beispielsweise durch Steroide oder durch Wachstumsfaktoren wie EGF induziert werden, aber auch inhibiert werden. TGF β 1 beeinflusst aber auch die Expression des eigenen Gens, was während des Wundheilungsprozesses wichtig ist. TGF β 1 kann mit der extrazellulären Matrix (EZM) im Komplex mit Betaglykan oder Decorin assoziiert sein. Diese Komplexe ermöglichen die Lagerung der biologisch inaktiven Form des TGF β 1. Der Mechanismus der Freisetzung des TGF β 1 aus diesen Reservoirs ist jedoch bisher weitgehend unbekannt.

Das Zytokin TGF β 1 stellt ein Schlüsselmolekül im Wundheilungsprozess der Haut und während der Transdifferenzierung von Fibroblasten des Bindegewebes zu Myofibroblasten dar. Es spielt aber auch eine entscheidende Rolle bei der Transformation von stromalem Gewebe um einen Tumor. Der Wachstumsfaktor wird durch die Tumorzellen sezerniert und wirkt parakrin bereits in nanomolaren Konzentrationen chemotaktisch auf Fibroblasten. Myofibroblasten spielen eine wichtige Rolle bei der Invasion von Tumorzellen, da sie verstärkt an der Invasionsfront von Tumoren auftreten [De Wever und Mareel, 2002]. Warum sie dort auftreten und wie sie dem Tumor nutzen, ist bisher noch unklar.

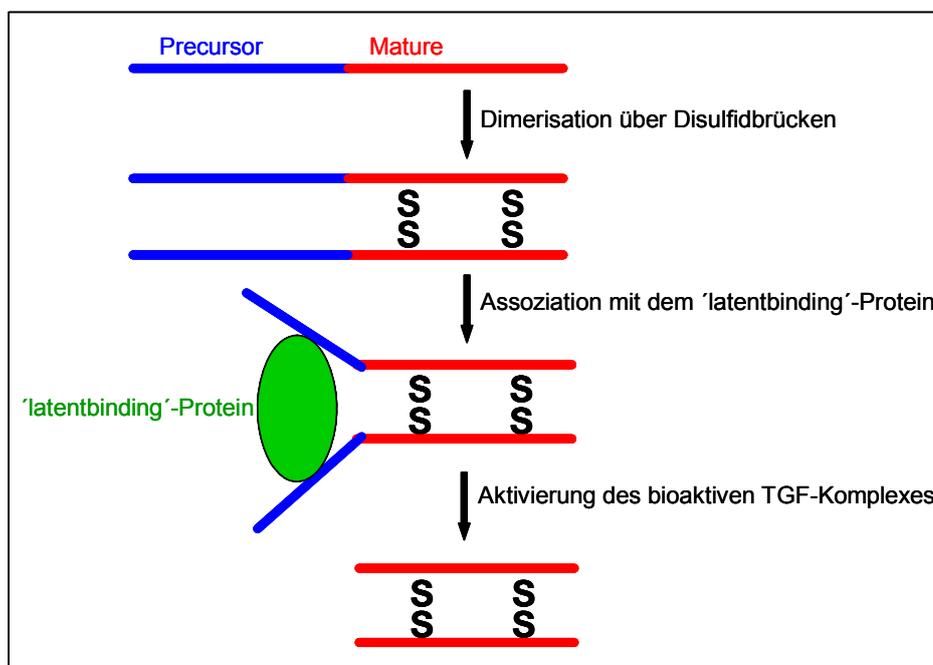


Abbildung 1.1.5: Aufbau des latenten TGF- β 1-Komplexes und Aktivierung von bioaktivem TGF β 1

Es sind fünf Isoformen des TGF β bekannt, wobei TGF β 1 mit seinen 390 Aminosäuren die von Zellen am Häufigsten sezernierte Isoform darstellt. Die TGF β -Isoformen werden durch unterschiedliche Gene kodiert, die jeweils über eine Länge von 100 Kilobasen und je sieben Exons verfügen.

TGF β 1 wird als latenter Komplex mit einer Größe von 290 kDa gebildet. Dieser latente Komplex setzt sich aus bioaktivem TGF β (25 kDa), dem 'latency-associated'-Peptid (LAP, 75 kDa) und dem 'latent TGF β 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 β -Komplexes benötigt. LAP und das bioaktive TGF β sind nicht-kovalent miteinander verbunden. Der latente TGF β -Komplex, das heißt die Verknüpfung der einzelnen Untereinheiten, verhindert die Signaltransduktionskaskade. Die Aktivierung des Komplexes kann durch zahlreiche Proteinasen, wie beispielsweise Plasmin, Cathepsine oder Matrix-Metalloproteinasen, erfolgen und setzt das bioaktive TGF β ins Mikromillieu frei, welches dann die TGF β 1-Signaltransduktionskaskade in den Fibroblasten in Gang setzt. Genaue Mechanismen der Aktivierung des TGF β 1 sind jedoch nicht bekannt.

Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Fähigkeiten wird die TGF β -Rezeptorfamilie in zwei Gruppen unterteilt: Typ I-Rezeptoren (TGF β RI) und Typ II-Rezeptoren (TGF β RII). Sie sind Glykoproteine mit einer Größe von 50 kDa und 70 kDa und verfügen über ein 500-570 Aminosäuren großes Core-Polypeptid. Die extrazelluläre Region ist mit ihren 150 Aminosäuren relativ kurz, N-glykosyliert und enthält 10 oder mehr Cysteine, wobei drei dieser Cysteine in der Nähe der Transmembran-Sequenz ein Cluster bilden [Wrana et al., 1994]. Die bioaktive, dimere Form des TGF β 1 unterstützt die Zusammenführung des Typ I- und des Typ II-Rezeptors, indem es einen heterotetrameren Rezeptor-Komplex bildet. Dabei bindet TGF β 1 spezifisch an TGF β RII, was zu einer Rekrutierung des TGF β RI führt. Die cytoplasmatische Region des TGF β RI wird am Ser165 durch TGF RII phosphoryliert, ein Prozess, der ligandenabhängig ist. TGF β RI enthält eine hoch konservierte SSGSGS-Region mit über 30 Aminosäuren, die sogenannte GS-Domäne (Proteinkinase-Domäne). Die ligand-induzierte Phosphorylierung der Serine und Threonine in der TSSSGSGS-Sequenz des TGF β RI durch den Typ II-Rezeptor ist notwendig für eine Aktivierung und die nachfolgende Signalkaskade [Souchelnytzkyi et al., 1996; Wrana et al., 1994].

Bisher ist noch unklar, ob die Aktivierung des Typ I-Rezeptors einer Erhöhung in dessen Kinaseaktivität, dem Auftreten von Substratbindungsstellen oder einer Kombination aus

beiden Mechanismen zugrunde liegt. Der Typ I-Rezeptor phosphoryliert sein Substrat, die Smad-Proteine, an den Serin-Resten, wobei die Typ II-Rezeptoren sich selbst und den Typ I-Rezeptor an Serin- und Threonin-Resten, aber nicht an den Tyrosinen phosphoryliert [Mathews und Vale, 1993; Bassing et al., 1994].

1.1.3.4 Die Smad-Proteine als Mediatoren der TGF β 1-Signalkaskade

Die Proteine der Smad-Familie wurden früh als Substrate der Typ I-Rezeptorkinasen identifiziert. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Transduktion von Rezeptor-Signalen zu bestimmten Zielgenen im Zellkern. Strukturell und funktionell werden die Smads in drei Gruppen unterteilt:

1. Smads, die direkte Substrate der TGF β -Rezeptorkinasen darstellen (R-Smads).
2. Smads, die während der Signalkaskade mit den rezeptor-regulierten Smads interagieren.
3. inhibitorische Smads, die die Signaltransduktion der beiden anderen Smadgruppen verhindern (I-Smads).

Die Smad-Familie verfügt über hoch konservierte MH1- und MH2-Sequenzen. Homologe dieser drei Klassen wurden erstmals in *Xenopus*, *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* identifiziert [Attisano und Wrana, 2000].

Smad2 und Smad3 gehören zu den rezeptor-regulierten Smads (R-Smads) und werden durch den aktivierten TGF β RI phosphoryliert (Abbildung 1.1.6). Sie induzieren die Transkription von TGF β 1- und Aktivin-Reportergen und können Wachstum inhibieren [Derynck und Zhang et al., 2003]. In unphosphoryliertem Zustand liegen die Smad-Proteine als Homo-Oligomere im Cytoplasma der Zellen vor. Sie werden nach Assoziation mit dem Rezeptor an ihren Serin-Resten im C-Terminus phosphoryliert, was zu der Dissoziation des R-Smad und des Rezeptors führt. Die Interaktion zwischen dem Rezeptor und den R-Smads ist ein kritisches Moment während der Initiation der intrazellulären Signalkaskade durch TGF β 1. Dieses Ereignis wird maßgeblich durch das Protein SARA (Smad anchor for receptor activation) reguliert. SARA bindet spezifisch unphosphoryliertes Smad2/3 und rekrutiert es zu der Zellmembran, wo die Rezeptoren lokalisiert sind. Nach Aktivierung des TGF β 1-Signalweges durch die Phosphorylierung des Smad2/3 kommt es zu einer Dissoziation des

SARA-Proteins von dem Smad2/3. Die Signalkaskade der rezeptor-regulierten Smads2/3-Proteine benötigt anschließend die Interaktion mit Smad4. Smad 4 assoziiert mit Smad2/3 nach ihrer Phosphorylierung durch den Rezeptor zu einem heteromeren Komplex [Kretschmar et al., 1997]. Obwohl Smad4 den rezeptor-regulierten Smads in ihrer Struktur sehr ähnlich ist, wird es in der Regel nicht direkt durch den TGFβRI phosphoryliert.

Anschließend wird dieser Komplex in den Zellkern transportiert, wo er mit anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription von Zielgenen durch spezifische Bindung an den Promotor beginnt [De Wever und Mareel, 2003]. Smads regulieren die transkriptionelle Antwort durch die Rekrutierung von Co-Aktivatoren und Co-Repressoren.

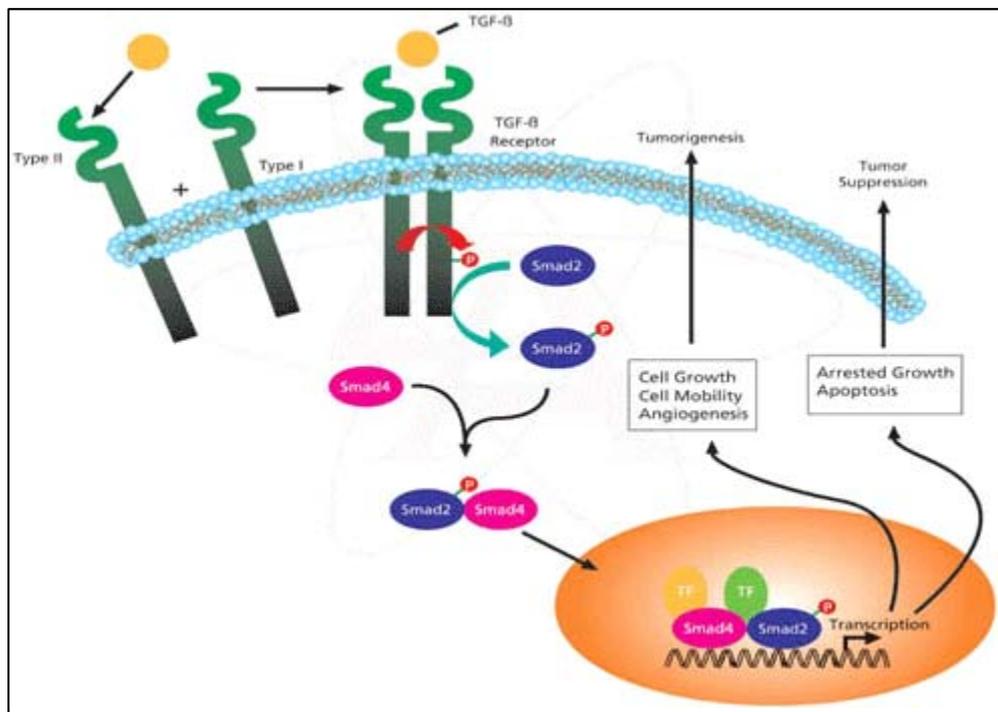


Abbildung 1.1.6: Molekularer Mechanismus der TGFβ1-Signalkaskade (Quelle: Internet, Sigma-Aldrich, <http://www.sigma-aldrich.com>).

Die I-Smads Smad6 und Smad7 stellen Inhibitoren der TGFβ1-Signalkaskade dar. Inhibitorische Smads interagieren als negatives Feedback der Zelle, das die Intensität und die Dauer einer TGFβ1-Signalkaskade reguliert. Die I-Smads formen stabile Komplexe mit den aktivierten Rezeptoren und blockieren so die Assoziation und Phosphorylierung der R-Smads. Die Regulation der I-Smads kann neben TGFβ1, Aktivin oder BMP auch durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), oder dem Interferon-γ (INF-γ) erfolgen.

Es ist beschrieben, dass die Transdifferenzierung von Fibroblasten durch TGF β 1 über den Smad-vermittelten Signalweg induziert wird. In Folge dessen exprimiert der Fibroblast das Protein α SMA am Cytoskelett der Zelle, was ihn zum Myofibroblasten macht [de Wever und Mareel, 2002]. Jedoch ist bisher noch nicht geklärt, ob die Transdifferenzierung zum Myofibroblasten auch über einen Smad-unabhängigen Signalweg induzierbar ist.

1.1.3.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) während der Tumorprogression

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen in aeroben Organismen während des intrazellulären Metabolismus als Nebenprodukte im zellulären Stoffwechsel hauptsächlich in den Mitochondrien. ROS wurde früh als Abwehrmolekül, das durch Neutrophile produziert wurde, für die Zerstörung extrazellulärer Pathogene wie beispielsweise Bakterien angesehen. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass ROS eine zentrale Rolle während intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden und einer Vielzahl zellulärer Prozesse spielt [Poli et al., 2004; Aslan und Ozben, 2005; Chiarugi, 2005]. Jedoch kann erhöhtes ROS-Signaling in physiologischen oder pathologischen Veränderungen wie beispielsweise Zellzyklus-Progression [Boonstra und Post, 2004], Apoptose oder Zellalterung [Gourlay und Ayscough, 2005; Johann et al., 2005] resultieren.

Molekularer Sauerstoff (O_2) ist essentiell für das Überleben aller aeroben Organismen. Er wird während der Oxidativen Phosphorylierung durch Elektronentransferreaktionen über die Atmungskettenkomplexe zu H_2O reduziert. Während dieser Elektronentransferreaktionen können aber auch nur teilweise reduzierte, hoch reaktive Metabolite des O_2 entstehen. ROS können in freie Radikale, wie zum Beispiel das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale (HO^{\cdot}), Peroxylradikale (ROO^{\cdot}), Alkoxyradikale (RO^{\cdot}) und nicht-radikalische Verbindungen wie das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singulett-Sauerstoff (1O_2) und organische Peroxide ($ROOH$), eingeteilt werden [Brenneisen et al., 2002]. Neben intrazellulärer ROS-Entwicklung können auch Wachstumsfaktoren/Zytokine, wie beispielsweise TGF β 1 den intrazellulären ROS-Gehalt stark erhöhen, indem sie die Expression von antioxidativen Enzymen hemmen [Kayanoki et al., 1994; Islam et al., 1997]. Membran-assoziierte Oxidasen und andere zelluläre Enzyme stellen Hauptquellen für Wachstumsfaktor-/Zytokin-induzierte ROS-Produktion dar [Thannickal und Fanburg, 2000].

Oxidativer Stress [Sies, 1985, 1986] in der Zelle kann durch ultraviolette Strahlung, die mit intrazellulären Chromophoren interagiert, ausgelöst werden [Tyrell, 1996, Brenneisen et al.,

1998, 2000]. UV-Strahlung wird mit Hautalterung und Photokarzinogenese in Verbindung gebracht, wobei die Dosis- und die Zeitabhängigkeit für die Tumorentwicklung noch unklar ist. Bekannt ist allerdings, dass hohe Dosen von UVA Lipidperoxidation in der Membran von Fibroblasten induzieren [Moliere et al., 1991]. ROS spalten Lipidradikale von Membranlipiden ab, was zu einer Anhäufung von Lipidhydroperoxiden in der Zelle führt und so die Peroxidation vorantreibt. Es konnte gezeigt werden, dass α - und β -ungesättigte Aldehyde und Malondialdehyd (MDA), welche Produkte der Lipidperoxidation sind, mutagenetische und karziogenetische Eigenschaften besitzen [Marnett, 1999]. UVB-Strahlung führt zu einem erhöhten H_2O_2 -Gehalt in der Zelle, was wiederum über die Fenton-Reaktion ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}\cdot + \text{HO}^- + \text{Fe}^{3+}$) die Bildung von Hydroxylradikalen, die die Zelle stark schädigen können, fördert [Brenneisen et al., 1998].

Um einem hohen intrazellulären ROS-Gehalt entgegenzuwirken, verfügt die Zelle über enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Systeme. Dazu zählen die Superoxid-Dismutase (SOD), die $\text{O}_2\cdot^-$ in H_2O_2 reduziert, die Katalase und die Glutathion-Peroxidasen, die H_2O_2 in H_2O reduzieren. Es entwickelt sich *Oxidativer Stress*, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung von Pro-Oxidantien und der antioxidativen Kapazität der Zelle zum Schutz vor Schäden oxidativen Ursprungs kommt [Sies, 1997]. *Oxidativer Stress* wird auch mit humanen Erkrankungen, wie kardiovaskulären und neurodegenerativen Krankheiten, aber auch mit Krebs in Verbindung gebracht [Sies, 1991].

Neben den zellulären antioxidativen Systemen gibt es auch chemische Verbindungen mit antioxidativen Eigenschaften, sogenannte ROS-Fänger. Zu diesen zählen beispielsweise N-acetyl-L-cysteine (NAC; Abbildung 1.1.7), Trolox, ein Vitamin E-Derivat, Selen, oder Apocynin, ein NADH-Oxidase-Hemmer.

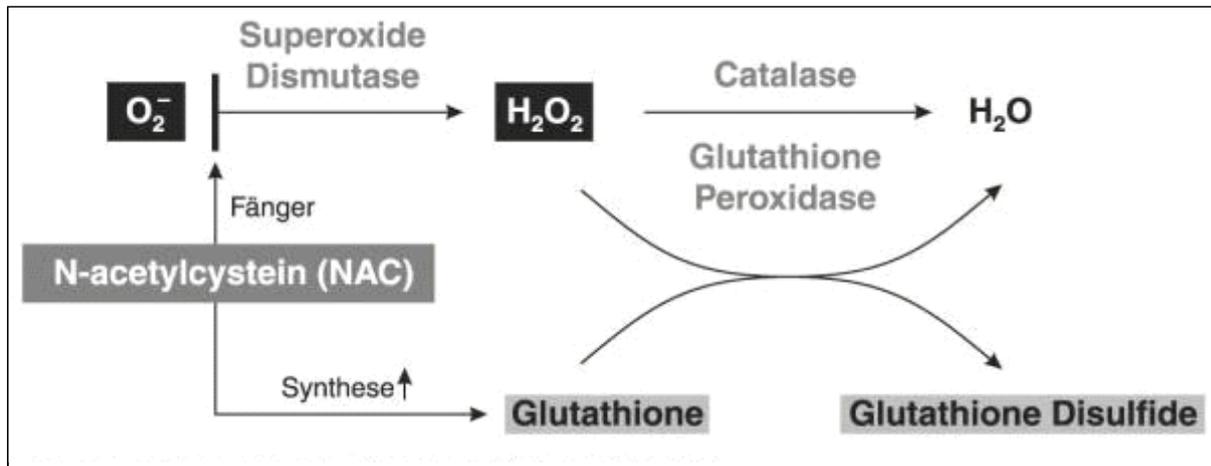


Abbildung 1.1.7: Die Wirkung von N-Acetylcystein (Quelle: Tossios P, Mehlhorn U, Blickpunkt der Mann 2004; 2 (3): 36-39 ©).

N-Acetylcystein ist ein Aminothiold und stellt die Vorstufe des reduzierten Glutathions (GSH) dar. Das zellgängige Antioxidans wird in die intrazellulären Glutathion-Reservoirs aufgenommen und wird bei erhöhtem Gehalt von Oxidantien für die antioxidative Antwort der Zelle in Form von Glutathion verwendet (Abbildung 1.1.7). Glutathion ist das am Häufigsten vorkommende Thiol der Zelle. Wasserstoffperoxid wird durch das Selenoenzym Glutathion-Peroxidase (GPx) zu Alkohol oder Wasser reduziert, wobei Glutathion (GSH) bei dieser Reaktion als Elektronen-Donor fungiert.

Selenverbindungen sind von besonderem Interesse, da sie bereits therapeutisch eingesetzt werden. Ihnen werden protektive Eigenschaften zugeschrieben, die in erster Linie mit der Glutathion-Peroxidase zusammenhängen, da sie über Selen verfügt [Schrauzer, 2000]. Die Glutathion-Peroxidase schützt die DNA und andere zelluläre Komponenten vor Schädigungen durch Oxidantien. Auch die Thioredoxin-Reduktase und andere Selenoproteine, die über Selen in Form von Selenocystein verfügen, sind von großer Bedeutung im Zusammenhang mit Selen und seinen antioxidativen Eigenschaften. In frühen unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass in Regionen der Vereinigten Staaten mit hohem Selen-Verbrauch die Todesraten durch Krebserkrankungen niedriger waren als in Regionen mit niedrigerem Selenverbrauch [Shamberger und Frost, 1969; Schrauzer und Rhead, 1971].

1.1.4 Die Nutzung von Hautäquivalenten

Seit einigen Jahren wird für die Untersuchung von chemischen Substanzen das Ziel verfolgt, die Zahl der dafür notwendigen Tierversuche zu reduzieren. Daher werden rekonstruierte Hautmodelle für die pharmazeutische, die kosmetische und die dermatologische Forschung von immer größerer Bedeutung. Der Einsatz von *in-vitro*-Methoden in der Zell-Forschung ist ebenso wichtig wie die Nutzung von *in-vivo*-Testverfahren. Komplexe Ganzhautmodelle, wie beispielsweise das Phenion[®] Full Thickness Skin Model, verfügen sowohl über eine Dermis wie auch über eine Epidermis. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu menschlicher Haut können Substanzen entweder durch externe Applikation oder auch durch systemische Behandlung über Wachstumsfaktoren getestet werden. Dies erleichtert *in-vitro*-Studien verschiedener zellbiologischer Veränderungen, wie zum Beispiel die Proteinsynthese oder –expression nach verschiedenen Stimuli. Die Ganzhautmodelle tragen weitgehend zu der Beantwortung zell-spezifischer Fragen durch die Nutzung der Zellen in ihrem physiologischen Umfeld bei.

Die für diese Arbeit verwendete rekonstruierte Haut wird unterstützt durch ein Kollagen-Glykosaminoglykan-Chitosan-Biopolymer, in das humane Keratinozyten und dermale Fibroblasten kokultiviert werden, um ein Gewebe zu reproduzieren, das der *in-vivo*-Architektur der normalen menschlichen Haut und den komplexen Interaktionen zwischen Epidermis und Dermis äquivalent ist [Schlotmann et al., 2001]. Außerdem ermöglicht dieses Modell die separate Untersuchung epidermaler oder dermaler Prozesse. Drei-dimensionale Ganzhautmodelle besitzen gegenüber Monolayer-Zellkulturen und Epidermismodellen wichtige Vorteile. So können diese Modelle für Langzeit-Studien eingesetzt werden, wobei sich die Zellen in ihrem physiologischen Umfeld befinden, indem Epidermis/Dermis-Interaktionen berücksichtigt werden können. Ein weiterer Vorteil beinhaltet die Expression der differenzierten Keratinozyten-Marker, wie beispielsweise das Zytokeratin 10, Filagrin oder die Transglutaminase, gleichzeitig aber auch die Proteine der Basallamina wie Laminin, β -Integrin1 oder Kollagen Typ IV, die für verschiedene Tests als Kontroll-Marker für intakte Haut hinzugezogen werden können.

Dieses *in-vitro*-System gibt grundlegende Informationen über Mechanismen von Reaktionen, die intrazelluläre Prozesse induzieren, und ermöglicht so die Quantifizierung inflammatorischer Mediatoren.

1.2 Fragestellung

Die Invasion von Tumorzellen stellt den entscheidenden Schritt während der Tumorprogression dar. Während der Metastasierung des Primärtumors in entfernte Gewebe spielen Interaktionen zwischen Tumorzellen und das sie umgebende Stroma, die sogenannte Tumor-Stroma-Interaktion, hinsichtlich ihrer Invasionskapazität eine entscheidende Rolle. Tumorzellen können mit Hilfe von Wachstumsfaktoren ihr Mikromilieu zu ihren Gunsten positiv beeinflussen.

Diese Doktorarbeit befasst sich nicht mit der Untersuchung der Tumorzellen, da diese genotypisch instabil sind und somit eine heterogene und daher schwer zu untersuchende Population bilden, sondern mit dermalen Fibroblasten, die genomische Stabilität aufweisen. Diese Stabilität, die in diesem neuen Forschungskonzept von großem Nutzen ist, stellt eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze dar.

Eine erhöhte Expression des Wachstumsfaktors TGF β 1 durch die Tumorzellen führt zu einer gestörten homologen Zell-Zell-Kommunikation stromaler Fibroblasten über *gap junctions* [Stuhlmann et al., 2003]. Diese gestörte interzelluläre Kommunikation erfolgt über eine TGF β 1-abhängige Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [Stuhlmann et al., 2003, 2004]. TGF β 1 ist ebenfalls für die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die an der Invasionsfront von Tumoren verstärkt auftreten, verantwortlich [De Wever und Mareel, 2002].

Da Myofibroblasten scheinbar eine wichtige Rolle während der Metastasierung von Tumoren spielen, befasst sich die hier vorliegende Arbeit mit der Frage, welche molekularen Mechanismen dem TGF β 1-vermittelten Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu Grunde liegen. Dabei liegt der Fokus der Arbeit auf der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch tumor-sezerniertes TGF β 1 in Fibroblasten und deren Relevanz auf den Transdifferenzierungsprozess. Weiter wird der Einfluss von Myofibroblasten auf die Invasionskapazität von Hauttumorzellen untersucht. Dieser Arbeit unterliegt die Hypothese, dass mittels Mikronährstoffen die Signalkaskade, die der Transdifferenzierung von stromalen Fibroblasten zu Myofibroblasten zugrunde liegt, verhindert werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsmaterialien

Aceton p.A.	Merck, Darmstadt
Agarose electrophoresis grade	Invitrogen, Karlsruhe
Allstars Negative siRNA AF 488	Qiagen, Hilden
Apocynin	Calbiochem, Darmstadt
APS analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
BHT	Sigma, Taufkirchen
Bio-Lyte [®] 3/10 Ampholyte	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Albumin from bovine serum (BSA) 98%	Sigma, Taufkirchen
CHAPS analytical grade	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
DAPI	Molecular Probes, Karlsruhe
Dispase II	Roche Diagnostics, Penzberg
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix	Qiagen, Hilden
Diphenyliodonium 98%	Sigma, Taufkirchen
2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)	Sigma, Taufkirchen
DTT	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA electrophoresis grade	ICN Biomedicals, Ohio USA
Essigsäure (Eisessig) 100% p. A.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Molecular Probes, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fettfreies Milchpulver blotting grade	Roth, Karlsruhe
Fluoromount C	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Gentamycin solution	Sigma, Taufkirchen
Glycin $\geq 99,9\%$ p.A.	Roth, Karlsruhe
Glycerin p.A.	Roth, Karlsruhe
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe

H ₂ DCF-DA	MoBiTec, Göttingen
H ₂ SO ₄ konz. p.A.	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Sigma, Taufkirchen
HCl konz. p.A.	Merck, Darmstadt
HGF, recombinant human	R&D Systems, Wiesbaden
HGF ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
IL-6 ELISA Kit	Hölzel Diagnostika, Köln
Iodacetamid	BioRad, München
KCl	Invitrogen, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Sigma, Taufkirchen
Kollagen Typ I	Roche Diagnostics, Penzberg
Kollagenase, <i>Clostridium Hystolyticum</i> (235U/mg)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin f. biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt
Lipidhydroperoxidation Kit	Cayman Chemicals, Grünberg
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
Mineralöl	BioRad, München
MTT 98% (TLC)	Sigma, Taufkirchen
NAC	Merck, Darmstadt
NaCl ₂ p. A	Merck, Darmstadt
Na-EDTA p.A.	Sigma, Taufkirchen
Na ₂ HPO ₄ p. A	Merck, Darmstadt
Na ₂ SeO ₃ p.A.	Merck, Darmstadt
OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit	Chemicon, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, Taufkirchen
Penicillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
PonceauS	Sigma, Taufkirchen
RayBio® HumanCytokineAntibody Array V Kit	Hölzel Diagnostika, Köln
ReadyStrip IPG Strips, 11 cm, pH 4-7	BioRad, München
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Ro 31-8220	Merck, Darmstadt

Ro 32-0432	Merck, Darmstadt
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
RPMI-1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
SDS Ultra Pure $\geq 99\%$	Roth, Karlsruhe
siRNA_SMAD2	Qiagen, Hilden
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Temed p.A. 99%	Roth, Karlsruhe
TGF β 1, recombinant from human	R&D Systems, Wiesbaden
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma, Taufkirchen
Tris Pufferan [®] $\geq 99,9\%$	Roth, Karlsruhe
Trolox for hplc	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
VEGF, recombinant, human	R&D Systems, Wiesbaden
VEGF ELISA Kit	Hölzel Diagnostika, Köln
Ziegennormalserum	Sigma, Taufkirchen
Zitronensäure	Sigma, Taufkirchen

2.2 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I

0,3M Tris
10% (v/v) MeOH
pH 10,4

Anodenpuffer II

25mM 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	0,05µg/ml, Verdünnung: 1/500 in McIlvaine-Puffer
DNPH-Lösung	20 mM DNPH 2M HCl
Einfriermedium	DMEM-Medium mit 20% FCS 5% DMSO
Equilibrierungspuffer I	20 mM Harnstoff 2% SDS 0,375 Tris-HCl (pH 8,8) 20 % Glycerin 2 mM DTT
Equilibrierungspuffer II	20 mM Harnstoff 2% SDS 0,375 Tris-HCl (pH 8,8) 20 % Glycerin 4% Iodacetamid
Kathodenpuffer	25mM Tris 10% (v/v) MeOH 40mM Glycin pH 9,4
Luminol- und Verstärker-Lösung	Pierce, Rockford USA

McIlvaine-Puffer	50mM Zitronensäure 100mM Na ₂ HPO 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 50mM Tris 150mM NaCl 0, 1% (v/v) Tween 20 pH 7,5
MTT-Lösung	10% MTT in DMEM
PBS	140mM NaCl 10mM Na ₂ HPO ₄
PBS-T	140mM NaCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 0,05% Tween 20
Ponceau S-Lösung	0,1% PonceauS (w/v) 5% (v/v) Essigsäure Sigma, Taufkirchen
PSG-Puffer	100 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM NaCl 5 mM Glucose pH 7,4

Rehydrierungspuffer	8M Harnstoff 2% CHAPS 50 mM Dithiothreitol 0,2% (w/v) Bio-Lyte [®] 3/10 Ampholyte Bromphenolblau BioRad, München
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 ₂ O 50 µl SDS 10% (w/v) 50 µl APS 10% (w/v) 5 µl TEMED
TAE-Puffer (1x)	40mM Tris 20mM Essigsäure 1mM EDTA
TBST 10x	50mM Tris 150mM NaCl 0,1% (v/v) Tween 20 pH 7,5
Trenngel	4,8 ml dH ₂ 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
10x-Puffer für PCR	200 mM Tris-HCl 500 mM KCL 15 mM MgCl ₂ pH 8,3
x-tremeGene siRNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Penzberg

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre Antikörper

Maus anti human α SMA	Sigma, Deisenhofen
Rabbit anti human Phospho-Smad2 (Ser465/467)	Cell Signalling, Frankfurt a.M.
Rabbit anti human Smad2	Cell Signalling, Frankfurt a.M.
Maus anti human Cytokeratin	Biomeda, Dänemark
Rabbit anti-DNP	Chemicon,USA
Rabbit anti human Phospho-PKC (pan Thr514)	Cell Signalling, Frankfurt a.M.
Rabbit anti human PKC (pan α β γ)	Biomol, Hamburg
Mouse anti human α Tubulin	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 VEGF	R&D Systems, Wiesbaden
Neutralizing anti-TGF β 1	R&D Systems, Wiesbaden

2.3.2 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
HRP-konjugierter Streptavidin-Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden

2.4 Enzyme und Primer (PCR)

Superscript RNase H-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq Polymerase	Quiagen, Hilden

α SMA-sense	5'-AGGAAGGACCTCTATGCTAACAAT-3'
α SMA-antisense	5'-AACACATAGGTAACGAGTCAGAGC-3'

HPRT-sense	5'-ATTCTTTGCTGACCTGCTGGATT-3'
HPRT-antisense	5'-CTTAGGCTTTGTATTTGCTTTTC-3'

2.5 Verbrauchsmaterialien

Zellkultureinsätze	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkultur-Materialien	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläschen	Assistent
Kryotubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
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
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Vivaspin 15R-Konzentratorsäulen	Vivascience, Hannover
Papier-Wicks für die Isoelektrofokussierung	BioRad, München

2.6 Geräte

Analysenwaage AB 204-S	Mettler Toledo, Schweiz
Bio-Rad PROTEAN [®] IEF cell	BioRad, München
Bio-Rad PROTEAN [®] IEF Tray	BioRad, München
CCD Kamera (ORCA II) Digital Kamera	Hamamatsu, Japan
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Clean Air Sterilbank	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Criterion Electrophorese-Kammer	BioRad, München
Diana III Raytest-Kamera	Raytest, Straubenhardt
Elektro-Blot-Apparatur	Roth, Karlsruhe
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop Axiovert 100 TV	Carl Zeiss, Oberkochen
Heraeus Inkubator	Kendro, Langenselbold
Magnet-Rührer	Janke+Kunkel IKAMAG [®] RCT, Staufen
Mikrotiter Plate Reader	Pharmacia Biotech, Freiburg
Mikrowelle	Braun, Melsungen
Milli-Q Anlage	Millipore, Eschborn
Neubauer-Zählkammer	Brand, Göttingen
Photometer Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Powersupplier Power Pac Basic [™]	BioRad, München
Primus 96 plus PCR-Maschine	MWG AG Biotech, Schweden
RM-5-Assistent 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

2.7 Software

AIDA Image Analyzer v.3.1
Aqua Cosmos
Diana III Camera Control
Photoshop CS3

Power Point

Prism 3.0, Graph Pad

2.8 Zellen und zellbiologische Methoden

2.8.1 HDF – humane dermale Fibroblasten

HDF Zellen sind humane sekundäre Hautfibroblasten, die von Praeputien gesunder 2 bis 12-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 12 verwendet.

2.8.2 SCL-1

Die Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL-1 sind wenig differenzierte menschliche Plattenepithelkarzinomzellen der Haut, die ursprünglich aus dem Karzinom einer 74-jährigen Frau stammen [Boukamp et al., 1982]. Die Zellen erhielten wir freundlicherweise von Prof. Dr. Norbert Fusenig aus dem DKFZ in Heidelberg.

2.8.3 HepG2

HepG2-Zellen sind humane Hepatomzellen aus einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen kaukasischen Jungen. Diese Zelllinie stammt aus der European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC No.: 85011430). Die Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. J. Bode von der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen den Passagen 12 bis 40 verwendet.

2.8.4 Isolierung 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 plziert 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, konnten sie trypsinisiert und im Folgenden unter Aufrechterhaltung des hohen Serumanteils weiterkultiviert werden. Nur Fibroblasten überleben das stark serumhaltige Medium [Fleischmeyer et al., 1990; Bayreuther et al., 1992].

2.8.5 Kultivierung der Zellen

Die Hautfibroblasten und die SCL1-Zellen 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 bestimmt. Diese errechnet sich wie folgt:

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

→ CPD = ΣPD

Die Fibroblasten wurden bis zu einer CPD von 17 verwendet. Die SCL1-Zellen wurden unabhängig ihrer CPD verwendet. Alle kultivierten Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmenkontamination untersucht.

HepG2-Zellen wurden in RPMI-Medium, das mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) supplementiert wurde, in einer wasserdampfgesättigten, auf 37°C temperierter Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert. Nach Erreichen einer 70-80%-igen Konfluenz wurden alle Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA:PBS Lösung (1:1) von den Kulturflaschen abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 10 bis 15 min durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, die Zellen resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf Kulturflaschen oder -schalen überführt.

2.8.6 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Alle Zellen wurden zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA:PBS Lösung abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 2 bis 5 min durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml in speziellen Kryotubes bei -80°C eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden schnell aufgetaut und in eine 75 cm² Kulturflasche mit Komplettmedium überführt. Um den DMSO-Gehalt des Mediums auf unter ein Prozent zu reduzieren und dadurch einer Membranschädigung vorzubeugen, wurde sowohl nach 4 bis 5 h als auch nach 24 h ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.8.7 Herstellung von konditioniertem Medium/Zellüberstand (CM)

Für die Invasionsassays wurde konditioniertes Medium von SCL-1 Zellen (CM^{SCL}), humanen Hautfibroblasten (CM^{HDF}) und Myofibroblasten (CM^{MF}) gewonnen. Dafür wurden 1×10^6 SCL-1 Zellen bis zur Subkonfluenz (ca. 70%) und $1,5 \times 10^5$ Hautfibroblasten bis zur Konfluenz in 175 cm^2 Zellkulturflaschen gezüchtet, um gleiche Zellzahlen zu gewährleisten. Das serumhaltige Medium wurde nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS gegen 15 ml serumfreies Medium ausgetauscht und der Überstand nach 48 h gesammelt.

Um Überstand von Myofibroblasten zu gewinnen wurden 3×10^4 Fibroblasten in 3,5 cm Zellkulturschalen eingesät und bis zur Subkonfluenz (70%) gezüchtet. Nachdem das serumhaltige Medium entfernt wurde, wurden die subkonfluenten Fibroblasten in CM^{HDF} , entweder für 4h mit 5 mM NAC, für 24 h mit $0,5 \mu\text{M Na}_2\text{SeO}_3$ oder für 24 h mit $50 \mu\text{M}$ Trolox vorinkubiert. Sowohl 10 ng/ml rekombinantes TGF β 1 ($CM^{HDF,TGF}$) alleine als auch in Kombination mit den Antioxidantien ($CM^{HDF,TGF,Antioxidant}$) wurde für weitere 24 oder 48 h hinzugefügt. Anschließend wurde $CM^{HDF,TGF}$ und $CM^{HDF,TGF,Antioxidant}$ gegen 1 ml serumfreies Medium ausgetauscht und der Überstand für 48 h gesammelt. Nachdem Zelltrümmer durch Abzentrifugieren aus den gewonnenen Überständen entfernt wurden, konnten diese entweder direkt für Experimente weiterverwendet oder bei -80°C bis zu zwei Wochen aufbewahrt werden.

2.8.8 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Bei Mykoplasmen handelt es sich um zellwandlose, von einer Zytoplasmamembran umgebene Bakterien, welche parasitär Zellen befallen. Mykoplasmen können das geregelte Zellwachstum beeinflussen bzw. die Reaktionen von Zellen auf bestimmte Stimuli verändern. Da sie lichtmikroskopisch nicht zu sehen sind, bleiben sie ohne eine geeignete Detektionsmethode unerkannt. Die Zellkultur wurde mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes Bisbenzimid kontrolliert. Zellen wurden mit einer Dichte von etwa 1000 Zellen/cm^2 auf einem Deckgläschen in einer 3,5 cm Zellkulturschale kultiviert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden die subkonfluenten Zellen auf dem Deckgläschen mit 2 ml 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 dH₂O 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 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm 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.

2.8.9 Vitalitätsbestimmung (MTT-Test)

Der MTT-Test dient dazu, die Vitalität von Zellen in der Zellkultur insbesondere nach der Applikation bestimmter Stressfaktoren wie Inkubation mit chemischen Agenzien zu bestimmen. Bei diesem Test wird das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden, metabolisch aktiven Zellen durch eine mitochondriale Dehydrogenase in ein blaues, unlösliches Formazansalz umgewandelt. Die Absorption des Formazansalz wird als Maß für die Vitalität der Zellen angesehen und kann photometrisch bestimmt werden.

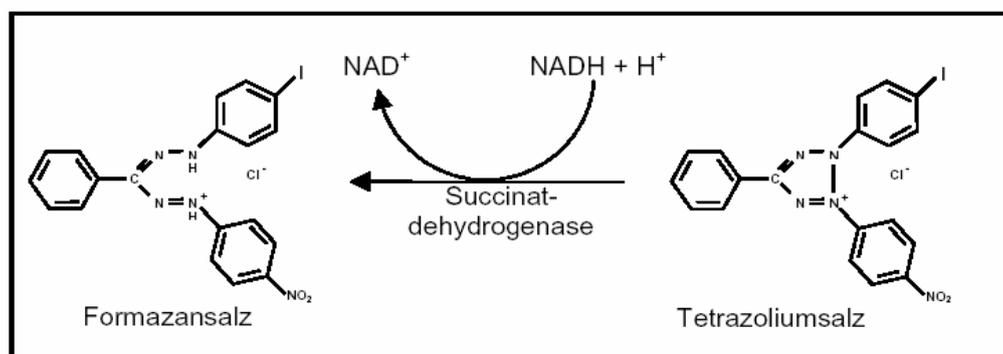


Abbildung 2.1: Bildung von Formazansalz aus Tetrazoliumsalz durch die Succinat-Dehydrogenase als Parameter für die Vitalität von Zellen

Zur Aufnahme des Tetrazoliumsalzes wurden die Zellen mit einer 10%-igen MTT-Lösung in DMEM für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Aufnahme wird das Tetrazoliumsalz von einer mitochondrialen Succinatdehydrogenase chemisch modifiziert. Es werden Wasserstoffionen von dem Enzym auf das Tetrazoliumsalz übertragen, wodurch der Tetrazoliumring gespalten wird und ein blaues, unlösliches Formazansalz entsteht (Abbildung 2.1). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das MTT-haltige DMEM abgesaugt und die Zellen 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:

$$\% \text{ Vitalität} = \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (unbehandelte Zellen)}} \times 100$$
$$\% \text{ Zytotoxizität} = [1 - \text{OD (behandelte Zellen)} / \text{OD (unbehandelte Zellen)}] \times 100$$

Abbildung 2.2: Berechnung der Vitalität von behandelten Zellen und der Zytotoxizität von Agenzien

2.8.10 Allgemeine Versuchsbedingungen

Verwendete Lösungen wurden mit dH₂O aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Alle im Ergebnisteil gezeigten Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Signifikanzen wurden nach dem ANOVA-Test ermittelt. 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. Bis zum Zeitpunkt des Experiments befanden sich alle Zellen in Kompletmedium. Alle Experimente wurden in HDF konditioniertem Medium (CM^{HDF}) durchgeführt.

2.8.11 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen erfolgten auf Basis der Methode nach Lowry unter Einsatz kommerziell erhältlicher Lösungen (BioRad, DC) gegen Standards aus Rinderserumalbumin (BSA) nach Angaben des Herstellers. 100 µl des Reagent A wurden zu 10 µl einer Probe dazugegeben und für 1 min inkubiert. Zu dem Gemisch wurden anschließend 750 µl des Reagent B pipettiert und für weitere 5 min inkubiert. Danach wurde die OD photometrisch bei 750 nm gemessen. Aus den Daten des BSA-Proteinstandard konnte der Proteingehalt der Proben berechnet werden.

2.8.12 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Messung)

Der intrazelluläre ROS-Gehalt in Hautfibroblasten nach Zugabe von rekombinantem TGFβ1 konnte mithilfe der Dichlorofluorescein-Messung untersucht werden. Die Methode wurde wie bereits beschrieben [Stuhlmann et al., 2004] durchgeführt. Subkonfluente Monolayer-Kulturen von Hautfibroblasten wurden mit 20 mM 2, 7-Dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF-DA) in PSG-Puffer für 15 min im Dunkeln inkubiert. Nachdem die Zellen dreimal mit PSG-Puffer gewaschen wurden, folgte eine Behandlung mit rekombinantem TGFβ1 (10 ng/ml)/PSG. Um eine PKC-vermittelte Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehaltes zu analysieren, wurden die Hautfibroblasten vor der Behandlung mit rekombinantem TGFβ1 mit dem PKC-Inhibitor Ro 31-8220 (1µM) für 1 h in CM^{HDF} vorinkubiert. Die ROS-Generation

konnte als Folge der Oxidation des H₂DCF-DA und der Fluoreszenz (Excitation 488 nm, Emission 515-540 nm) ermittelt werden. Es wurde an einem Zeiss Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop mit einer CCD (charge coupled device)-Kamera über 15 min gemessen.

2.8.13 Aufreinigung von Selenoprotein P

Die humane HepG2-Zelllinie [Hill et al., 1996] wurde in RPMI-1640-Medium mit 10% FCS in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatten, wurde das Medium gegen serumfreies RPMI-1640 Medium, das mit 100 nM Natriumselenit (Na₂SeO₃) angereichert wurde, ausgetauscht und für 48 h inkubiert. Der Überstand mit dem sezernierten Selenoprotein P wurde gesammelt und Zelltrümmer durch Zentrifugation aus dem Überstand entfernt. Durch Ultrazentrifugation wurde der Zellüberstand mit Hilfe von Vivaspin 15R-Konzentratorsäulen mit einer 30 kDa-Cut-Off-Hydrosart-Membran 40-fach konzentriert. Der Selengehalt der konzentrierten HepG2-Zellüberstände wurde fluorimetrisch wie beschrieben gemessen [Schomburg et al., 2003], wobei 150 µl des konzentrierten Überstandes für die Methode eingesetzt wurden. Die Konzentration des Na₂SeO₃ aus dem Überstand konnte mittels einer Standardkurve verschiedener Selenkonzentrationen in H₂O (1 nM bis 10 µM) bestimmt werden. Die Konzentration des Selenoprotein P konnte anhand der Selenkonzentration aus der entnommenen Probe des Überstandes berechnet werden, wobei davon auszugehen war, dass das Selenoprotein P über 10 Selen pro Molekül als Selenocystein verfügt.

2.8.14 Herstellung von Dermis- und Hautäquivalenten

Drei-dimensionale Kollagen Dermismodelle wurden wie bereits beschrieben [Mauch et al., 1988] mit geringfügigen Veränderungen hergestellt. Lyophilisiertes Rattenschwanz-Kollagen Typ 1 wurde in einer 0,2 %-igen Essigsäure-Lösung aufgenommen und auf eine Konzentration von 3,2 mg/ml eingestellt. Humane Hautfibroblasten wurden mit einer Dichte von 1,2 x 10⁵ Zellen in 1x DMEM mit 5% FCS und 0,8 mg Kollagen/ml aufgenommen. Das Zell-Kollagen-Gemisch wurde anschließend für 24 h bei 37°C in unbeschichteten 3,5 cm Zellkulturschalen inkubiert. Die Hautfibroblasten in den Modellen waren in der Lage, die Gelmatrix zu kontrahieren. Das Medium wurde gegen serumfreies Medium oder serumfreies

Medium mit nicht-toxischen Konzentrationen von NAC (5 mM), Trolox (50 μ M) oder Na_2SeO_3 (0,5 μ M) ausgetauscht und für weitere 24 h vor Zugabe von rekombinantem TGF β 1 bei 37°C inkubiert. Nach 48 h Behandlung mit rekombinantem TGF β 1 wurde jedes Kollagen-Dermismodell fotografiert, um die Kontraktionsfähigkeit der (Myo)fibroblasten zu untersuchen. Dies konnte durch Vermessen der Dermis-Modell-Durchmesser ermittelt werden.

Um die α SMA-Expression der Fibroblasten untersuchen zu können, mussten diese zunächst aus dem Kollagen isoliert werden. Dafür wurden die Dermismodelle zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 mg/ml *Clostridium histolyticum* Kollagenase/PBS für 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Das Zell-Kollagenase-Gemisch wurde anschließend für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in Lysepuffer aufgenommen. Das Lysat wurde dann für die Western Blot-Analyse eingesetzt.

Die Hautäquivalente (Henkel KGaA, Düsseldorf) wurden nach Damour et al. (1994) und Schlotmann et al. (2001) hergestellt. Es wurden $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ Hautfibroblasten auf ein Kollagen-Chitosanglykosaminoglykan (cc-GAG)-Biopolymer aufgesät, das zuvor in ein 24-Well platziert wurde. Das Dermisäquivalent wurde für 14 Tage in DMEM mit 10% FCS und 50 μ g/ml Ascorbinsäure submers bei 37°C kultiviert, wobei das Medium alle 24 h erneuert wurde. $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ Humane epidermale Keratinozyten (NHEK) wurden auf das Dermisäquivalent gesät und für weitere 7 Tage in SFM-Keratinozytenmedium und 50 μ g/ml Ascorbinsäure kultiviert. Anschließend wurden die Hautäquivalente für weitere 14 Tage in einer Luft/Flüssigkeits-Phase (air-liquid interface) in Keratinozyten-SFM-Medium/50 μ g/ml Ascorbinsäure kultiviert. In dieser Phase können die Keratinozyten differenzieren und stratifizieren, bis sich eine Hornschicht bildet. Während dieser Phase wurde das Medium alle 24 h erneuert. Die Hautäquivalente wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert und in Parffin eingebettet. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 6 μ m angefertigt und anschließend mit Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Außerdem wurden Hautäquivalente für 3 Tage mit rekombinantem TGF β 1 oder in Kombination mit 5 mM NAC inkubiert. Um Lysate herzustellen, musste zunächst die Dermis von der Epidermis getrennt werden. Dafür wurden die Hautäquivalente mit PBS gewaschen, um überschüssiges Medium zu entfernen, und anschließend für 1 h mit Disapase II (2,4 U/ml) bei 37°C inkubiert. Die Dermis wurde für 30 min in 3 mg/ml *Clostridium histolyticum* Kollagenase/PBS bei 37°C schüttelnd inkubiert. Das Zell-Kollagenase-Gemisch wurde anschließend für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das

Zellpellet in Lysepuffer aufgenommen. Das Lysat wurde dann für die Western Blot-Analyse eingesetzt.

2.8.15 Invasionsassay

In einem Invasionsassay kann die Invasion von SCL1-Zellen durch eine Membran in Richtung eines Chemoattraktandes beobachtet werden.

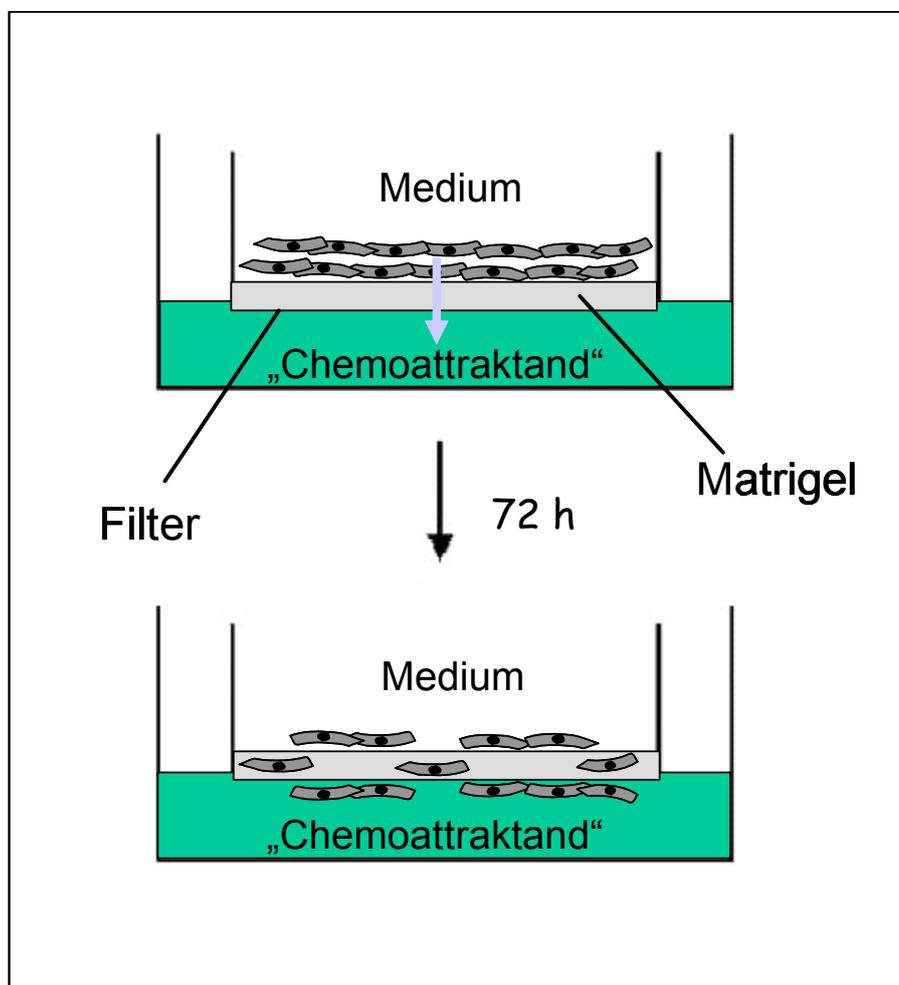


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Invasionsassays. Gezeigt ist ein Zellkultureinsatz mit Membran in einer Zellkulturschale. Auf der Oberseite der Membran sind Zellen dargestellt, die durch die Membran in Richtung eines Chemoattraktandes wandern können.

Dazu wurden 24-well Platten mit Zellkultureinsätzen, so genannten Transwells, von Becton Dickinson verwendet. Die Transwells besitzen an ihrer Unterseite eine Membran mit einem Durchmesser von 6,5 mm, die zusätzlich über Poren mit einer Porengröße von 8 μm verfügt. Vor Verwendung wurde die Innenseite der Transwells mit Matrigel von Becton Dickinson beschichtet. Das Matrigel beinhaltet dieselben Bestandteile der Basallamina der Haut. Durch die Beschichtung wird die Invasion von Zellen durch die Basalmembran simuliert (Abbildung 2.3).

Das Matrigel wurde für die Beschichtung 1:40 in kaltem PBS verdünnt. Anschließend wurden je 50 μl dieser Lösung in die Transwells pipettiert und vorsichtig geschwenkt, um eine lückenlose Beschichtung der Membran zu gewährleisten. Die Membran wurde dann mit 200 μl sterilem Wasser überschichtet und über Nacht steril getrocknet. Am nächsten Tag wurde die beschichtete Membran mit 100 μl sterilem Wasser rehydriert. Es wurden je 5×10^5 SCL1 Zellen in 400 μl serumfreiem Medium in die Transwells eingesät. 300 μl des Chemoattraktandes wurden in die Wells der Platte gegeben und das Transwell luftblasenfrei darin platziert. Als Chemoattraktant fungierten Überstände von Myofibroblasten (CM^{MF}), SCL1-Zellen (CM^{SCL}) und Zellen, die vor Behandlung mit rTGF- β 1 mit ROS-Inhibitoren vorinkubiert wurden. Der Invasionsassay wurde für 72 h bei 37°C inkubiert.

Für die Auswertung des Invasionsassays wurde zuerst das Medium der oberen Kammer abgesaugt und die Zellen auf dem Matrigel mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Zellen auf der Unterseite der Transwells wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann 5 min mit kaltem Methanol auf der Membran fixiert. Zur Entfernung des Methanols wurden die Zellen zuerst mit PBS und dann 2 bis 3 Mal mit dH_2O gewaschen. Die Transwells wurden dann für einige Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurden die invadierten Zellen auf der Unterseite des Transwells für 1 min mit einer Coomassie-Blue-Färbelösung angefärbt. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen, wurde die Unterseite der Transwells ein letztes Mal mit dH_2O gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Membranen wurden dann mit einem spitzen Skalpell aus den Transwells herausgeschnitten und mit einem Tropfen Fluoromount C und einem Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert. Die gefärbten Zellen konnten dann unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Reverse Transkriptase-PCR

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Fibroblasten wurde unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt: Die Zellen wurden nach Waschen mit PBS in 350 µl Buffer RLT (Lysepuffer) lysiert und in eine QIAshredder-Säule überführt. Das Lysat wurde 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurden 350 µl Ethanol (70%) zu dem Lysat pipettiert und dann auf eine RNeasy Mini-Säule überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm für 15 sec. Zu dem Überstand wurden 700 µl Buffer RW1 (Waschpuffer) zugefügt und erneut für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal mit 500 µl Buffer RPE durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde im letzten Schritt mit 25 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert und konnte anschließend für die Revertasereaktion eingesetzt werden.

Die Revertasereaktion (Umschreibung der RNA in cDNA) erfolgte unter Einsatz von 1 µg Gesamt-RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Die Umschreibung erfolgte in 60 min bei 42°C. Das Reaktionsgemisch enthielt neben der RNA:

- 100 Einheiten (Units) SuperscriptII Rnase H-Reverse Transcriptase in 50 mM Tris/HCl (pH 8,3)
- 75 mM KCl,
- 10 mM Dithiothreitol (DTT)
- 3 mM MgCl₂
- 1 mM dNTP
- oligo-dT (0.5 mg/20 ml)

100 ng cDNA (2 µl) wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt. Der PCR-Ansatz enthielt:

- 10x-Puffer
- 5 mM dNTP
- 5 mM Sense-Primer
- 5 mM Antisense-Primer
- 500 U/ml Taq Polymerase

Das Reaktionsvolumen betrug 20µl.

Die folgende Tabelle stellt das verwendete Pipettierschema dar:

Tabelle 2.1: Pipettierschema für den PCR-Ansatz. Das Endvolumen beträgt 20 µl.

Lösungen	Volumen (µl)
10x-PCR-Puffer	2
dNTP-Mix	0,4
α-SMA sense-Primer	0,2
α-SMA antisense-Primer	0,2
Template	2
Taq-Polymerase	0,1
H2O	15,1
Gesamtvolumen	20

Die humane Sequenz für α-SMA liegt, vom Transkriptionsstartpunkt aus, zwischen den Basenpaaren 922-1277.

Im Vorfeld wurde die PCR auf die αSMA-mRNA von unbehandelten Fibroblasten optimiert. Dabei wurde die optimale Zyklenzahl für die PCR ermittelt, die für unbehandelte Hautfibroblasten auf 25 festgelegt wurde, um eine mögliche Stimulation nach rTGFβ1-Behandlung untersuchen zu können. Die PCR für die αSMA-mRNA wurde nach folgendem Zyklus durchgeführt:

95°C → 3 min	}	25 Wiederholungen
94°C → 30 sec		
55°C → 30 sec		
72°C → 30 sec		
72°C → 5 min		

Die PCR für HPRT wurde nach folgendem Zyklus durchgeführt:

95°C → 3 min	}	31 Wiederholungen
94°C → 20 sec		
57°C → 30 sec		
72°C → 30 sec		
72°C → 5 min		

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe eines 1%-igen Agarosegels. Die Banden der PCR-Produkte konnten mit Ethidiumbromid (0,3 µg/ml Endkonzentration) sichtbar gemacht werden.

2.9.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht DNA der Größe nach aufzutrennen und anschließend sichtbar zu machen. Agarose bildet nach dem Erhitzen ein dreidimensionales Polymer aus Polysacchariden. Durch Anlegen einer Spannung wandert die negativ geladene DNA zur Anode und wird durch die Agarose-Gelmatrix der Größe nach aufgetrennt. Die Porengröße der Gelmatrix wird durch die Agarosekonzentration bestimmt. Die Agarosekonzentration muss an die Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente angepasst sein. Die folgende Tabelle zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente bei verschiedenen Agarose-Konzentrationen:

Tabelle 2.2: Auftrennung der DNA-Fragmente bei verschiedenen Agarose-Konzentrationen:

Agarosekonzentration (% (w/v))	Optimaler Trennbereich [kbp]
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Durch Zugabe des Interkalators Ethidiumbromid in die Gelmatrix konnte die DNA nach erfolgter Elektrophorese unter ultraviolettem Licht betrachtet werden. Die benötigte Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle erhitzt. Die Lösung sollte nach dem Kochen schlierenfrei sein. Nach Abkühlen auf unter 60°C wurde das Ethidiumbromid hinzugefügt (0,3 µg/ml Endkonzentration). Die noch flüssige Lösung wurde luftblasenfrei in ihr Bett gegossen und der Kamm aufgesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt. Nach Auftragen der Proben wurde eine Spannung von 100V für 15 min angelegt.

2.9.3 siRNA-Transfektion

Um die Signifikanz des Smad2-Proteins in der intrazellulären TGFβ1-Signalkaskade zu untersuchen, wurden humane dermale Fibroblasten mit siRNA behandelt, die spezifisch das Smad2-Protein herunterreguliert. Dafür wurden Fibroblasten in 3,5 cm Zellkulturschalen bis zur Subkonfluenz (ca. 70%) in FCS-haltigem Medium kultiviert. Um zunächst die Transfektionseffizienz der siRNA in Hautfibroblasten zu ermitteln, wurden verschiedene Konzentrationen einer AF-488-gekoppelten unspezifischen siRNA (Allstars Negative siRNA AF 488, Qiagen) über verschiedene Zeitpunkte getestet. Dafür wurde die siRNA in x-tremeGene siRNA Transfection Reagent (Roche) und serumfreiem Medium wie folgt aufgenommen:

Tabelle 2.3: Pipettierschema für einen siRNA-Ansatz . Das Endvolumen beträgt 100 µl.

Serumfreies DMEM	Transfektionsreagenz	siRNA
90 µl	10 µl	2 µg
97,5 µl	2,5 µl	0,5 µg
99 µl	1 µl	0,2 µg

Die siRNA-Ansätze wurden zusammenpipettiert und anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gemisch aus Transfektionsreagenz, siRNA und serumfreiem Medium in das Kompletmedium der Fibroblasten gegeben. Nach 8, 16, 24 und 48 h wurde die Transfektionseffizienz mit Hilfe eines Zeiss Axiovert Fluoreszenz-

Mikroskopes mit einer CCD (charge coupled device)-Kamera untersucht. Die Transfektionseffizienz betrug bereits nach 24 h 100%.

Um das Smad2-Protein herunterzuregulieren, wurden die Fibroblasten im nächsten Schritt mit verschiedenen Konzentrationen spezifischer validierter siRNA_Smad2 (Qiagen) behandelt. Dabei wurde nach dem Pipettierschema aus Tabelle 2.4 vorgegangen. Die Inkubation der Fibroblasten mit spezifischer siRNA erfolgte über 24 h. Nach der Inkubation wurde das Medium gegen konditioniertes Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 und 48 h bei 37°C inkubiert. Die Fibroblasten wurden in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und das Smad2-Protein anschließend mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 2.4). Die Untersuchung zeigte, dass das Smad2-Protein sowohl 24 h als auch 48 h nach siRNA-Behandlung um ca. 90% herunterreguliert werden konnte.

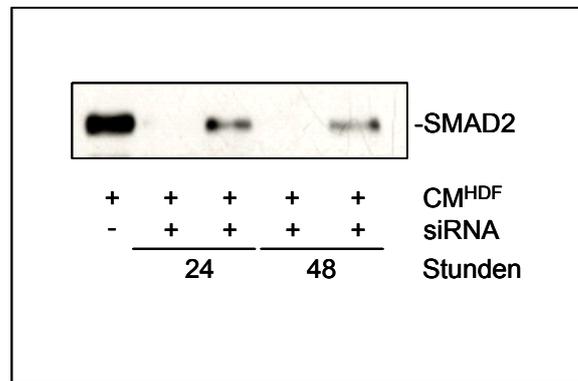


Abbildung 2.4: Analyse des Smad2-Proteins nach Behandlung der HDF mit 0,75 µg siRNA für 24 Stunden in serumfreien Medium gegen Smad2. Das Protein wurde 24 und 48 Stunden nach Inkubation mit der spezifischen siRNA mittels Western Blot-Analyse untersucht.

Um die Relevanz des Smad2-Proteins auf die αSMA-Expression nach Behandlung mit rekombinantem TGFβ1 zu analysieren, wurden die Fibroblasten zunächst für 24 h mit siRNA gegen Smad2 vorinkubiert. Das siRNA-haltige Medium wurde abgesaugt und gegen konditioniertes Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) mit rTGFβ1 (10 ng/ml) ausgetauscht und für weitere 48 h bei 37°C inkubiert. Die Fibroblasten wurden in Lysepuffer aufgenommen und die αSMA-Expression mit Hilfe der Western Blot-Analyse untersucht.

2.10 Biochemische Methoden

2.10.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In einem SDS-PAGE 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. Durch den Zusatz des amphiphilen Detergenz SDS, das sich an die Proteine anlagert, bilden sich Micellen mit konstant negativer Ladung pro Masseneinheit. Bei der Probenvorbereitung wurden die Proteine mit einem Überschuss an SDS auf 95° C erhitzt, um die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zu zerstören. Zusätzlich wurden Schwefelbrücken zwischen Cysteinen durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) aufgebrochen. Nach Auftrennung der Proteine ist das Gel für eine Fülle weiterer Bearbeitungen zugänglich: Färbung, immunologische Nachweise (Blotting) oder, bei radioaktiven Proteinproben, der Autoradiographie. Man kann die Proteine auch im Gel verdauen und wieder herauseluieren. Die chemische Kopolymerisierung der Acrylamidmonomere wurde durch Zugabe von APS und TEMED gestartet, wobei TEMED die Bildung freier Persulfatradikale katalysiert. Die Porengröße der Gelmatrix ist abhängig von der Konzentration der Acrylamidmoleküle. Es werden in der Regel Gele mit einer Acrylamid-Konzentration zwischen 6-15% verwendet. Über das Trenngel (pH 8,8) wird ein weitporiges Sammelgel mit pH 6,8 gesetzt, um das zeitgleiche Einlaufen der Proteinsuspension in das Trenngel zu erreichen und somit eine präzisere Auftrennung der Proteinbanden zu erreichen. Die folgende Tabelle zeigt die Auftrennung der Proteine bei verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen:

Tabelle 2.4: Auftrennung der Proteine bei verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen:

Proteingröße [kDa]	Acrylamid-Konzentration [% (w/v)]
12-43	15
16-68	10
36-94	7,5
57-212	5

2.10.2 Immunologischer Nachweis (Western-Blot)

Der Western-Blot wurde für den Nachweis von Proteinen, wie z.B. dem α 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. In dieser Arbeit wurden ein diskontinuierliches Puffersystem und als Nachweis HRP-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet.

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 h ein Strom von 60 mA angelegt.

Das Gel wurde nach dem Blotten in PonceauS-Lösung gefärbt, um sicherzustellen, dass die Proteinbanden vollständig auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Die Membran wurde zur Absättigung in 5% (w/v) fettfreiem Milchpulver/TBST für 1 h geschüttelt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (Verdünnung: 1/1000 (v/v) in TBST mit 1% (w/v) fettfreiem Milchpulver) inkubiert und anschließend viermal für je 15 min mit TBST gewaschen. Es folgte eine 2-stündige Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung: 1/20.000 (v/v) in TBST) und erneutes Waschen für 1 h. 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 mehrere Minuten exponiert und anschließend in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert. Die Proben wurden für den Western Blot in einer Gesamtkonzentration bis zu 20 μ g eingesetzt. Densitometrische Analysen der Western Blots wurden mit Hilfe einer Scion Image Software durchgeführt.

2.10.3 Immunzytochemie

Mit Hilfe dieser Methode konnten das in Myofibroblasten exprimierte Protein α SMA und Smad2 durch fluoreszierende sekundäre Antikörper sichtbar gemacht werden.

Die Zellen, die auf Glasplättchen kultiviert wurden, wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und für 5 min mit kaltem Methanol (-20°C) fixiert. Anschließend wurde das Methanol entfernt und die Zellen weitere zwei Mal 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 α SMA-Protein und mit Alexa 488-gekoppelten IgG-Sekundärantikörpern anti-Rabbit (Verdünnung: 1:1000 (v/v) in TBST) für das Smad2-Protein für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde erneut viermal je 15 min 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.

2.10.4 Zytokin-Antikörper Array

Die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren von (Myo-)Fibroblasten nach Behandlung mit rekombinantem TGF β 1 konnte mit Hilfe des Zytokin-Antikörper Arrays nachgewiesen werden.

Der humane Zytokin Array wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt: Die Membranen mit den darauf befindlichen Zytokin-Antikörpern wurden zunächst mit Blockierlösung blockiert und anschließend mit je 1 ml CM^{HDF} und CM^{MF} für 2 h bei RT inkubiert. Nachdem die Membranen zweimal mit PBS-T gewaschen wurden, wurden diese für weitere 2 h mit einem Cocktail aus primären Biotin-konjugierten Antikörpern bei RT behandelt. Anschließend wurden die Membranen mit je 2 ml Horseradish-Peroxidase-konjugiertem Streptavidin-Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen mit den Nachweisreagenzien (Luminol-Lösung,

Verstärker-Lösung; Pierce Biotechnology, Rockford IL) inkubiert. Die Membranen wurden in Folie eingeschweißt und mit einem Bio-Max-Light-Film in einer Filmkassette platziert. Der Film wurde über mehrere Minuten exponiert und anschließend in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

2.10.5 Enzyme-linked immuno assay (ELISA)

Es wurde die ELISA-Methode für die Wachstumsfaktoren VEGF, HGF und IL-6 nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. 96-well Platten wurden mit Capture-Antikörper beschichtet, indem für eine Platte 50 µl des Antikörpers in 10 ml PBS aufgenommen wurden. Es wurden je 100 µl/well aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-T wurden die Wells mit 250 µl einer 5% (w/v) BSA/PBS Lösung für 2 h 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 Antikörper (100 µl) für 1 h bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS-T folgte eine Behandlung mit 500 µl eines HRP-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 100 µl einer 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase Lösung für 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl einer 1M Schwefelsäure (H₂SO₄)-Lösung gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm mit einem Mikrotiter Plate Reader gemessen, wobei der Referenzfilter auf 650 nm eingestellt wurde. Die Konzentration der Wachstumsfaktoren konnte anhand des Standards mit Hilfe einer Graph Pad software (San Diego, CA) berechnet werden.

2.10.6 Lipidperoxidationsassay

Mit Hilfe dieses Assays konnte die Zunahme von Lipidhydroperoxiden innerhalb der Zelle nach Behandlung mit rTGFβ1 gemessen werden. Die Isolierung und Messung der Lipidhydroperoxide aus Fibroblasten wurde unter Verwendung des Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay Kit (Cayman Chemicals, Grünberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden HDF auf Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Das Experiment wurde mit subkonfluenten (ca. 80%) Zellen durchgeführt. Die Lyse der Zellen

erfolgte mit 500 µl dH₂O (+50 µM BHT). Zu dem Lysat wurden anschließend 500 µl Extract R hinzugefügt und kurz gevortext. Weiter wurde 1 ml kaltes Chloroform dazugegeben und gevortext. Das Gemisch wurde dann 5 min mit 1500 x g bei 0°C zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen, wobei für die weitere Extraktion nur die untere Chloroform-Phase verwendet wurde. Zu 500 µl der unteren Phase wurden 450 µl eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2:1) pipettiert. Im nächsten Schritt wurde das Chromophor vorbereitet, indem FTS-Reagent 1 und FTS-Reagent 2 im Verhältnis 1:1 vermischt wurden. 50 µl dieses Chromophors wurden dann zu den Proben dazugegeben und gevortext. Das fertige Gemisch aus Chromophor und Proben wurde anschließend 5 min bei RT inkubiert. Es bildete sich eine rote Lösung, dessen Absorption bei 500 nm aufgenommen wurde. Neben den Lipidhydroperoxiden wurden auch die konjugierten Diene bei 234 nm photometrisch gemessen, die aus der Chloroformphase extrahiert werden konnten. Die Menge der konjugierten Diene konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten berechnet werden ($\epsilon_{234} = 29,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Zu jedem Experiment wurde zusätzlich eine Standardmessung durchgeführt. Um verschiedene Konzentrationen für den Standard zu erhalten, wurde die Stammlösung mit dem Chloroform/Methanol wie folgt verdünnt:

Tabelle 2.5 Zusammensetzung des Hydroperoxid (HP)-Standards. Die Endkonzentration ist in nmol/ml angegeben:

	HP Standard (µl)	CH-CH₃OH (µl)	Endkonzentration HP (nmol)
A	0	950	0
B	10	940	0,5
C	20	930	1,0
D	30	920	1,5
E	40	910	2,0
F	60	890	3,0
G	80	870	4,0
H	100	850	5,0

In Diagramm 1 ist ein Beispiel für den HP-Standard dargestellt, mit dem der Lipidhydroperoxidgehalt der Proben berechnet werden konnte.

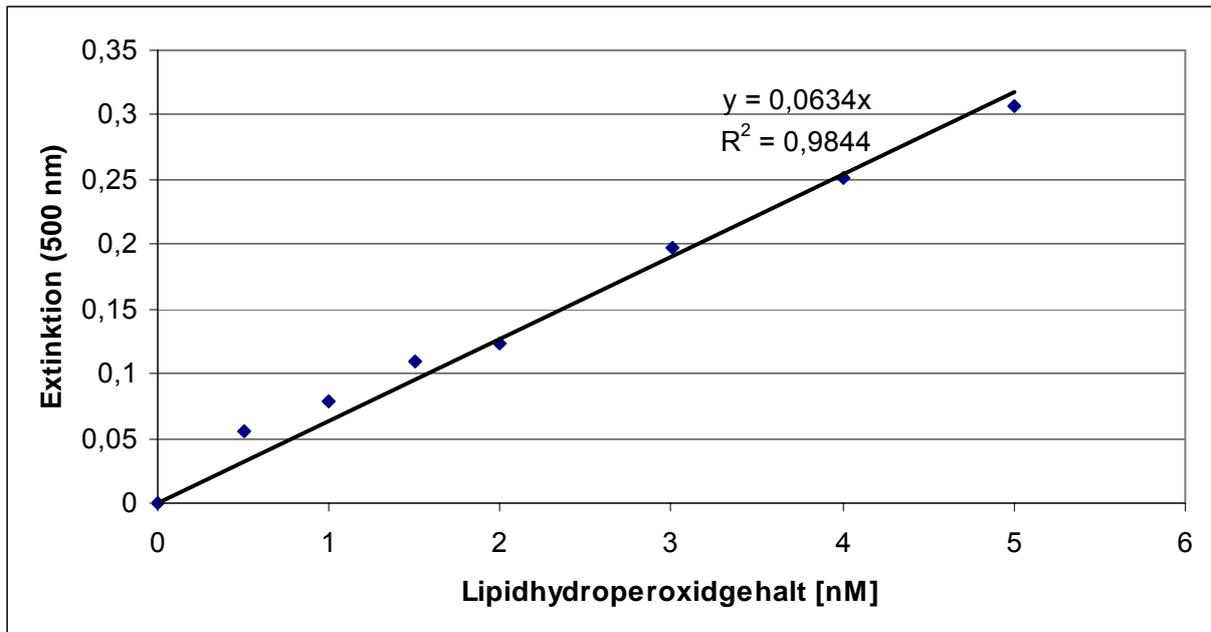


Diagramm 2.1: Graphische Darstellung eines HP-Standards zur Berechnung des Lipidhydroperoxidgehalts einer Probe

2.10.7 NADH-Oxidase Aktivitätsmessung

Um zu untersuchen, ob die NADH-Oxidase nach Behandlung mit rekombinantem TGF β 1 in die intrazelluläre Signalkaskade involviert ist, wurde eine Aktivitätsmessung durchgeführt. Dafür wurden subkonfluente Monolayer-Kulturen von Hautfibroblasten mit 1 mM Apocynin für 2 h in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) vorinkubiert. Die Fibroblasten wurden mit HBSS gewaschen und anschließend für 15 min mit rekombinantem TGF β 1 (10 ng/ml) oder 1,5 μ M TPA als Positivkontrolle in CM^{HDF} behandelt. Die Fibroblasten wurden erneut mit HBSS gewaschen und danach mit 250 μ M NADH in 1 ml HBSS für 5 min inkubiert. Die Überstände wurden gesammelt und die Abnahme des NADH aus dem Überstand bei 340 nm gemessen. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für NADH ($\epsilon_{340} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) konnte die durch die behandelten Zellen verbrauchte Menge an NADH berechnet werden.

2.10.8 Immunologischer Nachweis Oxidierter Proteine (OxyBlot)

Dermale Fibroblasten wurden bis zur Subkonfluenz (ca. 70%) in 3,5 cm Zellkulturschalen kultiviert. Die Fibroblasten wurden für 4, 8, 12, 24 und 48 h mit 10 ng/ml rekombinantem TGF β 1 behandelt. Als technische Positivkontrolle wurden Fibroblasten mit 250 μ M H $_2$ O $_2$ für 45 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen und oxidierte Proteine mit Hilfe des OxyBlotTM Protein Oxidation Detection Kit (Chemicon, USA) nachgewiesen. Die Methode wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden 5 μ l des Lysats mit 5 μ l 12%-iger SDS-Lösung vermischt, um eine Endkonzentration von 6% SDS zu gewährleisten. Zu der Probe wurden anschließend 10 μ l 1x 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (DNPH) hinzupipettiert und für 15 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden 7,5 μ l Neutralisations-Lösung hinzugegeben, um die Derivatisierung zu stoppen. Die derivatisierten Proben wurden anschließend auf ein 10%-iges SDS-PAGE aufgetragen und wie beschrieben auf Nitrozellulose-Membran geblotet. 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.

2.10.9 Aufreinigung oxidierter Proteine für die zwei-dimensionale Gelelektrophorese

Für die zwei-dimensionale Gelelektrophorese oxidierter Proteine wurden dermale Fibroblasten auf 6,5 cm Zellkulturschalen gesät und bis zur Subkonfluenz (ca. 70%) in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Die Zellen wurden entweder für 4 h mit 5 mM NAC, für 2 h mit 1 mM Apocynin, für 24 h mit 0,5 μ M Na $_2$ SeO $_3$ oder für 24 h mit 50 μ M Trolox vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/ml rTGF β 1 behandelt oder ohne Vorbehandlung

direkt mit 10 ng/ml rTGF β 1 behandelt. Die Behandlung mit rTGF β 1 erfolgte über 12 h. Die behandelten Fibroblasten wurden in 100 μ l 0,5% CHAPS mit 50 mM DTT lysiert. Das DTT wurde eingesetzt, um die Oxidation von Proteinen nach der Lyse zu verhindern. 100 μ l der Probe wurden zunächst mit 100 μ l einer 12%-igen CHAPS-Lösung gemischt. Dazu wurden 200 μ l DNPH-Lösung hinzupipettiert und für 30 min im Dunkeln bei RT derivatisiert. Die Derivatisierung wurde mit einer Tris-Lösung neutralisiert, bis eine Orangefärbung eintrat. Anschließend wurden zu der Probe 2 Volumen einer 20%-igen Trichloressigsäure-Lösung (TCA) hinzugefügt, um die in der Probe befindlichen Proteine zu fällen. Eine Proteinfällung ist notwendig, da die Probe für die nachfolgende Isoelektrofokussierung möglichst salzfrei sein muss. Die Proteine wurden über Nacht bei -80°C gefällt und für 45 min bei 14.000 rpm bei 4°C herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Proteinpellet mit 10-fachem Volumen des Pellets in eiskaltem Aceton aufgenommen und für 30 min bei 14.000 rpm bei 4°C herunterzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um überschüssiges TCA aus der Probe heraus zu waschen. Nach dem zweiten Waschvorgang wurde das Proteinpellet nach Zentrifugation getrocknet, um verbliebenes Aceton zu entfernen.

Das trockene Pellet wurde anschließend in 200 μ l Rehydrierungspuffer aufgenommen. Die Probe wurde für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um Schwebstoffe zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und für die Rehydrierung des ReadyStrip IPG Strip (11 cm, pH 4-7, BioRad) in ein Rehydrierungsgefäß überführt. Ein ReadyStrip IPG Strip wurde mit der Gelseite nach unten in die Probe platziert. Darüber wurden 2 ml Mineralöl (BioRad) luftblasenfrei pipettiert, um eine Austrocknung des ReadyStrip IPG Strips während der Rehydrierungsphase zu verhindern. Die Rehydrierung erfolgte über Nacht bei 20°C. Der mit der Probe gequollene ReadyStrip IPG Strip konnte anschließend für die Isoelektrofokussierung eingesetzt werden.

2.10.10 Isoelektrofokussierung (IEF)

Bei der Isoelektrofokussierung werden Proteine nach ihrem relativen Gehalt an sauren und basischen Aminosäureresten, d.h. ihrem Isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Legt man an den pH-Gradienten des mit Proteinen beladenen Isoelektrofokussierungsgels ein elektrisches Feld an, wandern die Proteine zu einer der beiden Elektroden, wobei sie verschiedene Bereiche des pH-Gradienten durchlaufen. Wird genau der pH-Wert erreicht, der dem

isoelektrischen Punkt des Proteins entspricht, so sind keine nach außen wirkenden Ladungen mehr vorhanden, sodass das Protein nicht mehr wandert.

Die mit der Probe rehydrierten ReadyStrip IPG Strips (11 cm, pH 4-7, BioRad) wurden in ein sauberes Bio-Rad PROTEAN[®] IEF Tray (Gefäß) überführt, wobei zuvor auf die Elektroden der IEF-Vorrichtung so genannte Papier-Wicks platziert und mit 8 µl dH₂O befeuchtet wurden. Die Papier-Wicks nehmen Salze oder andere nicht-amphotere Bestandteile der Probe, die eine korrekte IEF verhindern würden, auf. Abschließend wurden die ReadyStrip IPG Strips mit 2 ml Mineralöl luftblasenfrei überschichtet, um eine Austrocknung der Strips zu verhindern.

Die IEF wurde wie in Tabelle 2.6 gezeigt durchgeführt:

Tabelle 2.6: Isoelektrofokussierung eines 11 cm ReadyStrip IPG Strips in den pH-Bereichen 4-7

Volt	Zeit (h)	Volt-Stunden	Spannungsanstieg
250	1	-	Linear
8000	2,5	-	Linear
8000	-	20.000	Rapide
-	5,3	~ 30.000	

Nach der IEF wurden die ReadyStrip IPG Strips zunächst für 15 min mit Equilibrierungspuffer I und anschließend für 15 min mit Equilibrierungspuffer II bei RT inkubiert.

Während der Equilibrierung wird der ReadyStrip IPG Strip mit den Proteinen mit DTT zur Beseitigung von Disulfidbrücken reduziert und mit SDS beladen. SDS ist ein negativ geladenes Detergenz, dass mit seiner aliphatischen Seitenkette die Proteine bindet und sich mit seiner negativ geladenen Seitenkette von benachbarten negativ geladenen SDS Molekülen abstößt, was zu einer völligen Linearisierung der Proteinmoleküle führt. Nach der Equilibrierung können die in den ReadyStrip IPG Strips befindlichen Proteine in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) aufgetrennt werden.

2.11 Statistik

Für die statistische Analyse der Signifikanz in densitometrischen Auswertungen wurden nicht-parametrische Tests wie der Mann-Whitney-Test und der ANOVA Dunnett's Test durchgeführt. Vor der Studie wurden $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ und $***P < 0,001$ als Maß für die Signifikanz festgelegt. $*P > 0,05$ deutete auf keine Signifikanz hin.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Effekte von Plattenepithelkarzinomzellen auf humane dermale Fibroblasten untersucht. Für die Experimente wurden die Hautfibroblasten mit Überständen von SCL-1-Zellen oder mit dem darin enthaltenen Wachstumsfaktor TGF β 1 behandelt. Zusätzlich wurde sowohl mit Kokulturen der beiden Zelltypen als auch mit Dermis- und Hautäquivalenten gearbeitet. Es wurde der Einfluss von TGF β 1 auf die intrazelluläre, reaktive Sauerstoffspezies(ROS)-abhängige Signalkaskade während der Transdifferenzierung von dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten und deren Beteiligung an der Invasion von Tumorzellen untersucht.

3.1 TGF β 1-induzierte Transdifferenzierung von humanen dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten

Es wurde die Tumorzell- und die TGF β 1-induzierte α SMA-Expression in einem *in-vitro* Zellkulturmodell humaner dermaler Fibroblasten (HDF) mit Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) untersucht. Dafür wurden Fibroblasten-Monolayerkulturen zur Kontrolle in konditioniertem Medium von Fibroblasten (CM^{HDF}) für fünf Tage kultiviert. Diese Kulturen zeigten vereinzelt Myofibroblasten (Abbildung 3.1). Die Zellen der Kokultur-Experimente (Kokultur^{HDF,SCL}) wurden im Verhältnis 2:1 (Fibroblasten: SCL-1 Zellen) in serumhaltigen Medium eingesät. Nachdem die Zellen nach 12 bis 24 h adhärirten, wurde das serumhaltige Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Nach fünf Tagen erhöhte sich die Anzahl der Myofibroblasten in der Kokultur um ca. 75-90%. Es zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg α SMA-positiver Zellen in Monolayerkulturen von Fibroblasten, die für 48 h mit 10 ng/ml rekombinantem TGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF,TGF}) oder konditioniertem Medium von SCL-1-Zellen (CM^{SCL}) behandelt wurden. Durch die Behandlung der Hautfibroblasten mit CM^{SCL} plus 5 μ g/ml neutralisierendem Antikörper gegen TGF β 1 wurde die TGF β 1 induzierte α SMA-Expression bis zu 80% unterbunden.

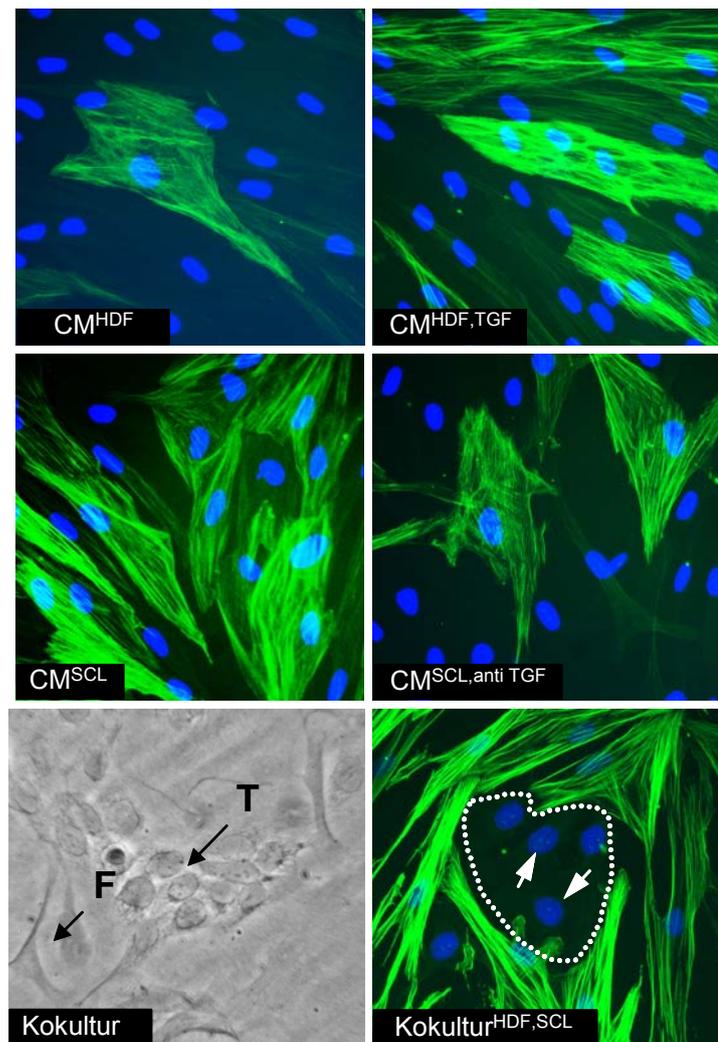


Abbildung 3.1: TGF β 1-induzierte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Subkonfluente humane dermale Fibroblasten (HDF) wurden in konditioniertem Kontroll-Medium (CM^{HDF}) kultiviert, mit 10 ng/ml rTGF β 1 in CM^{HDF} (CM^{HDF,TGF}), mit konditioniertem Medium von SCL-1-Zellen (CM^{SCL}) und mit konditioniertem Medium von SCL-1-Zellen mit 5 μ g neutralisierendem Antikörper gegen TGF β 1 (CM^{SCL,anti TGF}) für 48 h behandelt und anschließend gegen das Protein α SMA gefärbt. Zusätzlich wurden Kokulturen von HDFs und SCL-1-Zellen über 5 Tage kultiviert und anschließend im Durchlicht fotografiert (Kokultur) oder gegen α SMA gefärbt (Kokultur^{HDF,SCL}). Die gestrichelte weiße Linie umrahmt ein Tumorzell-Cluster, die weißen Pfeile zeigen die Kerne der Tumorzellen.

Um zu zeigen, dass die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten TGF β 1-abhängig ist, wurde der α SMA-Proteingehalt nach rTGF β 1-Zugabe und der Behandlung mit konditioniertem Medium von SCL-1 Zellen (CM^{SCL}) nach 48 h mit Hilfe der Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 3.2).

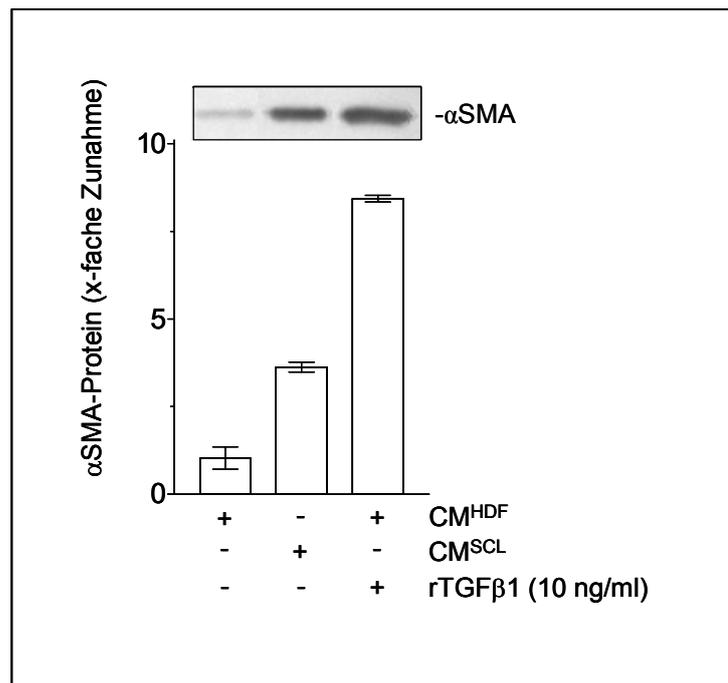


Abbildung 3.2: TGFβ1 induzierte αSMA-Expression humaner dermaler Fibroblasten. Subkonfluente HDFs wurden entweder mit 10 ng/ml rTGFβ1 in CM^{HDF} oder mit konditioniertem Medium von SCL-1-Zellen (CM^{SCL}) für jeweils 48 h behandelt. Der αSMA-Proteingehalt wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht (αSMA 42 kDa). Die densitometrische Analyse zeigt die x-fache Zunahme des Proteingehaltes im Gegensatz zu den Kontrollen (CM^{HDF}), die auf 1,0 gesetzt wurden. Die Analyse repräsentiert die Ergebnisse aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die Behandlung der Hautfibroblasten mit rekombinantem TGFβ1 führte zu einer 7,5-fachen Zunahme des αSMA-Proteingehaltes nach 48 h im Gegensatz zu den unbehandelten Fibroblasten. Die Inkubation mit konditionierten SCL-1-Zellüberständen (CM^{SCL}) führte zu einem 4-fachen Anstieg der αSMA-Expression (Abbildung 3.2). Auch nach 24 h wurde bereits eine 2-fache Erhöhung der αSMA-Expression beobachtet (Daten hier nicht aufgeführt). Für die weiteren Experimente wurde der 48 h Zeitwert gewählt, um sicherzustellen, dass nahezu alle Zellen αSMA-positiv waren.

Um die Modulation des αSMA mRNA-Gehaltes von dermalen Fibroblasten nach Stimulation mit rekombinantem TGFβ1 herauszuarbeiten, wurde die RT-PCR-Methode eingesetzt. Dafür wurden subkonfluente HDF-Monolayerkulturen mit 10 ng/ml rTGFβ1 in konditioniertem Fibroblasten-Überstand (CM^{HDF}) für 3, 6, 12 und 24 h inkubiert.

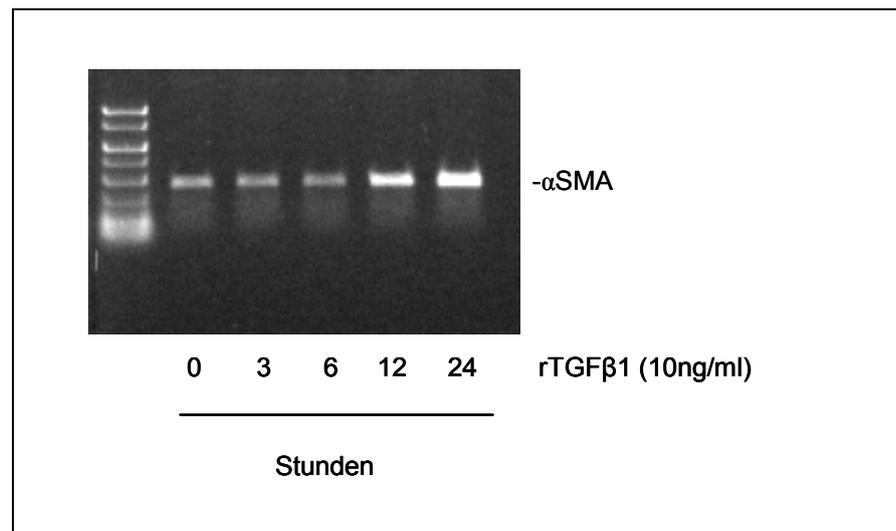


Abbildung 3.3: Modulation des α SMA mRNA-Gehaltes nach Stimulation subkonfluerter HDF mit 10 ng/ml rTGF β 1 für 3, 6, 12 und 24 h. Die humane Sequenz für α SMA liegt, vom Transkriptionsstartpunkt aus, zwischen den Basenpaaren 922-1277. Die Abbildung zeigt das Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel einer RT-PCR-Reaktion.

Die Behandlung mit rekombinatem TGF β 1 führte zu einer Erhöhung des α SMA mRNA-Gehaltes um 50% nach 12 h im Gegensatz zu den unbehandelten Kontroll-Zellen (0 h) und den Hautfibroblasten, die über 3 oder 6 h behandelt wurden. 24 h nach rTGF β 1-Stimulus erhöhte sich der α SMA mRNA-Gehalt auf 80% verglichen mit der Kontrolle.

Dieses Ergebnis zeigte, dass der Wachstumsfaktor TGF β 1 aus den SCL1-Zellüberständen eine maßgebliche Rolle während der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten spielt. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten die diesem Ereignis zugrunde liegende Signalkaskade mit rekombinatem TGF β 1 untersucht.

3.2 Reaktive Sauerstoffspezies als Vermittler der TGF β 1-induzierten Transdifferenzierung

TGF β 1 und Überstände von SCL-1-Zellen generieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in humanen dermalen Fibroblasten [Stuhlmann et al., 2004]. Um zu untersuchen, ob ROS in den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch TGF β 1 involviert sind, wurden die Antioxidantien N-Acetylcystein (NAC) und Selenit (Na₂SeO₃) für die folgenden Experimente eingesetzt.

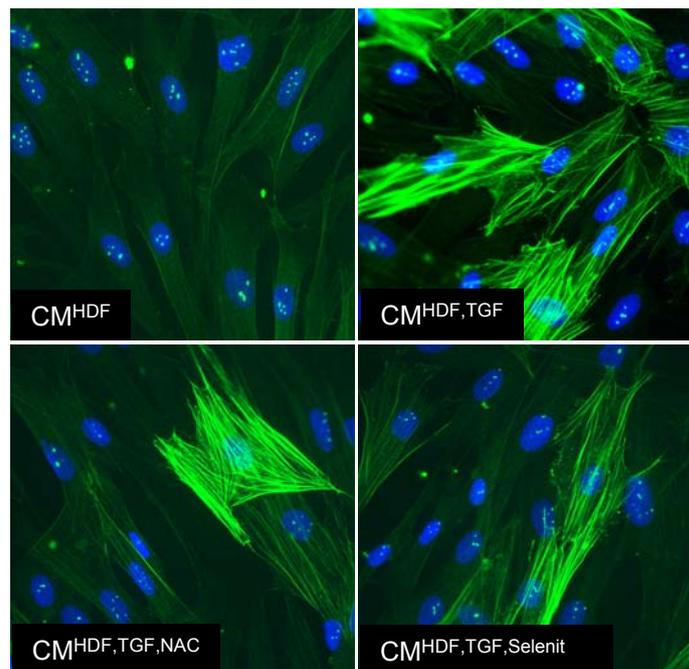


Abbildung 3.4: TGF β 1 induzierte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten nach Behandlung der HDF mit Antioxidantien. Subkonfluente humane dermale Fibroblasten (HDF) wurden in konditioniertem Kontroll-Medium (CM^{HDF}) kultiviert, mit 10 ng/ml rTGF β 1 in CM^{HDF} ($CM^{HDF,TGF}$), mit 5 mM NAC in CM^{HDF} für 4 h vor Behandlung mit 10 ng/ ml rTGF β 1 ($CM^{HDF,TGF,NAC}$) und mit 0,5 μ M Na_2SeO_3 in CM^{HDF} für 24 h vor Behandlung mit 10 ng/ ml rTGF β 1 ($CM^{HDF,TGF,Selenit}$) vorinkubiert und anschließend gegen das Protein α SMA gefärbt.

Nach 48-stündiger Behandlung der Hautfibroblasten mit rTGF β 1 ($CM^{HDF,TGF}$) erhöhte sich die Anzahl α SMA-positiver Zellen signifikant im Gegensatz zu unbehandelten Fibroblasten (CM^{HDF}). Sowohl N-Acetylcystein als auch Selenit erniedrigten die α SMA-Expression der Fibroblasten signifikant um etwa 50 – 80% ($CM^{HDF,TGF,NAC}$, $CM^{HDF,TGF,Selenit}$).

Die Verringerung der α SMA-Expression wurde in der Western Blot-Analyse bestätigt. Nach Behandlung mit rTGF β 1 kam es im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten zu einem signifikanten Anstieg der α SMA-Expression nach 48 h (Abbildung 3.5). Im Gegensatz dazu verhinderte NAC die Expression des α SMA-Proteins nach rTGF β 1-Behandlung. Selenit erniedrigte den Gehalt an α SMA-Protein signifikant um das 10-fache im Vergleich zu den Fibroblasten, die ausschließlich mit dem Wachstumsfaktor behandelt wurden. Fibroblasten, die zur Kontrolle ausschließlich mit den Antioxidantien behandelt wurden, zeigten wie die unbehandelten Zellen nur geringe α SMA-Expression.

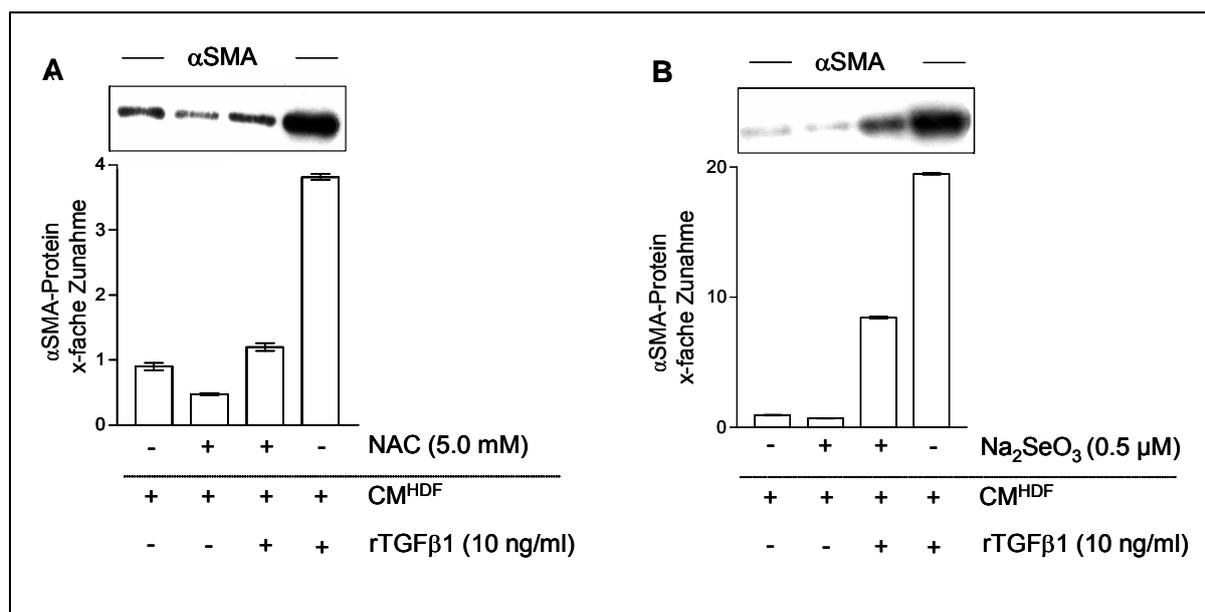


Abbildung 3.5: Antioxidantien (NAC, Na₂SeO₃) vermindern die TGFβ1-induzierte αSMA-Expression. (A) Subkonfluente HDFs wurden mit 5 mM NAC für 4 h und (B) mit 0,5 μM Na₂SeO₃ für 24 h in serumfreien Medium vorinkubiert. Das antioxidantienhaltige Medium wurde gegen konditioniertes Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) mit 10 ng/ml rTGFβ1 ausgetauscht und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Der αSMA-Gehalt der behandelten Zellen wurde mit der Western Blot-Analyse untersucht und densitometrisch analysiert (αSMA 42 kDa). Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Der Effekt von N-Acetylcystein (NAC) und Selenit (Na₂SeO₃) wurde auch auf die Expression der αSMA-mRNA untersucht. Der Zeitpunkt der Untersuchung wurde aufgrund des Ergebnisses der Zeitanalyse der αSMA-mRNA (Abbildung 3.6) auf 12 h nach Behandlung mit TGFβ1 festgelegt. Das 'housekeeping'-Gen HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) diente als Ladekontrolle.

Zwölf Stunden nach TGF1-Behandlung erhöhte sich die αSMA mRNA-Menge im Vergleich zu der mRNA-Menge unbehandelter Zellen signifikant. Sowohl die Zugabe von NAC als auch die Zugabe von Selenit hatten keinen Einfluss auf die αSMA-mRNA-Expression.

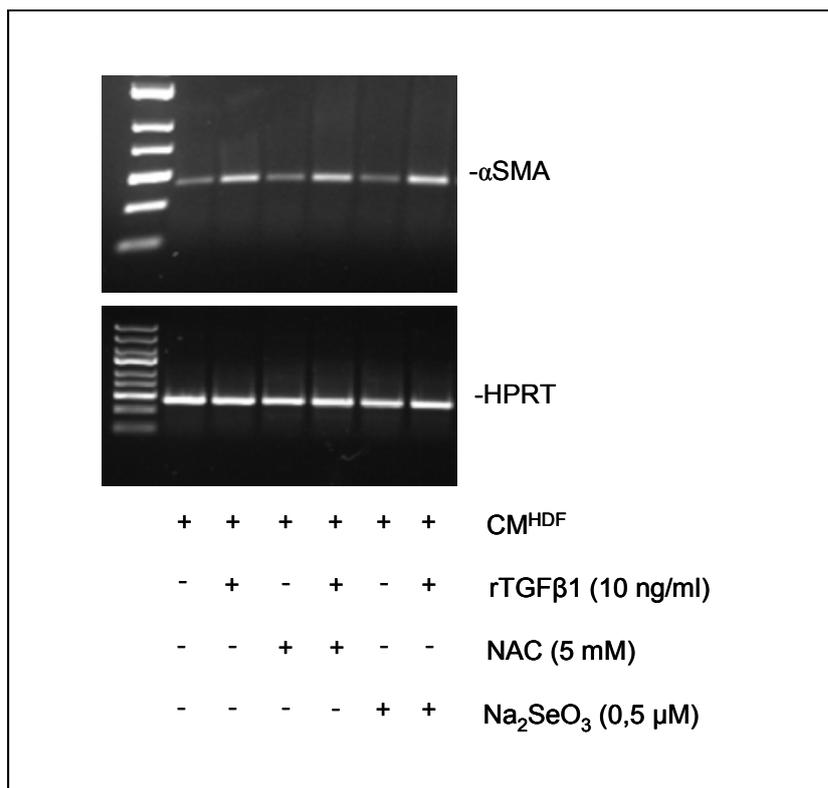


Abbildung 3.6: Modulation des α SMA mRNA-Gehaltes nach Stimulation subkonfluenten HDF mit 10 ng/ml rTGF β 1 für 12 h. Die Zellen wurden entweder mit 5 mM NAC für 4 h oder mit 0,5 μ M Na₂SeO₃ für 24 h vorinkubiert. Die Inkubation mit rTGF β 1 erfolgte ohne Antioxidantien. Zur Kontrolle der Ladung wurde die HPRT-mRNA aus derselben Probe amplifiziert und aufgetragen. Die humane Sequenz für α SMA liegt, vom Transkriptionsstartpunkt aus, zwischen den Basenpaaren 922-1277. Die Abbildung zeigt das Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel einer RT-PCR-Reaktion.

Es konnte mittels Selenoprotein P (SeP) KO-Mäusen gezeigt werden, dass SeP als Transporter von Selen fungiert [Hill et al., 2003; Schomburg et al., 2003]. Da Selen zu einer signifikanten Erniedrigung der α SMA-Expression führte, das heißt eine Transdifferenzierung des Fibroblasten zum Myofibroblasten verhindern konnte, wurde der Effekt von Selenoprotein P auf die Wachstumsfaktor-vermittelte Transdifferenzierung von Fibroblasten untersucht.

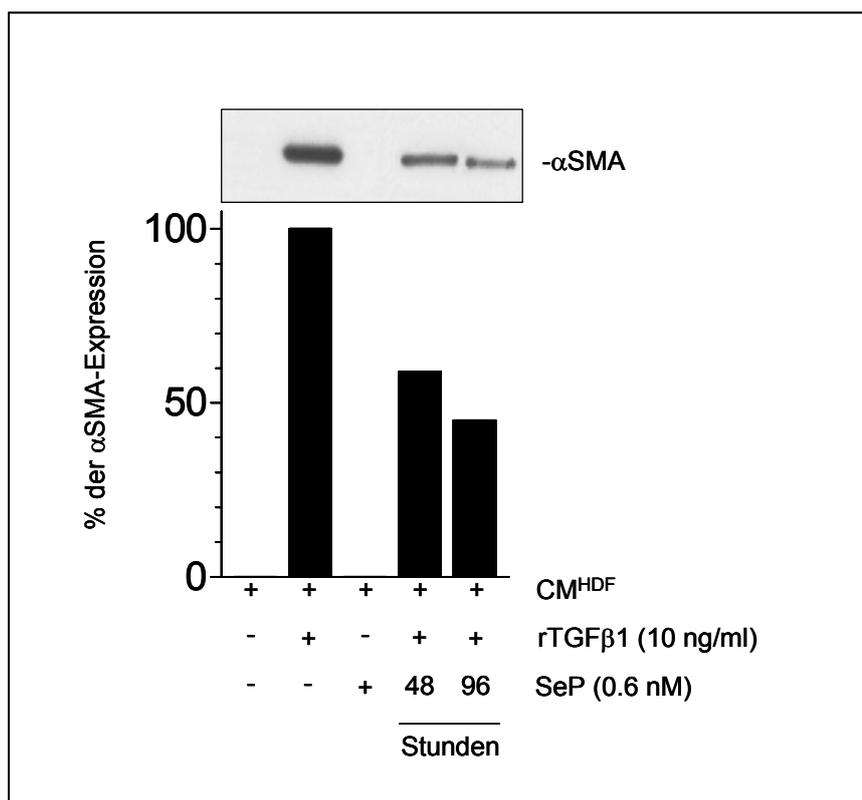


Abbildung 3.7: Selenoprotein P vermindert die α SMA-Expression in HDF. Subkonfluente HDFs wurden in konditioniertem HDF-Medium (CM^{HDF}) entweder mit 0,6 nM SeP für 48 h vor Zugabe von 10 ng/ml rTGFβ1 für weitere 48 h vorinkubiert oder mit SeP über 96 h zusammen mit rTGFβ1 behandelt. Die α SMA-Expression wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse untersucht (α SMA 42 kDa) und die prozentuale Abnahme der Expression mittels densitometrischer Analyse ermittelt, wobei die mit ausschließlich rTGFβ1-behandelten Fibroblasten auf 100 % festgelegt wurden.

Die Hautfibroblasten wurden entweder mit SeP für 48 h vorinkubiert und anschließend mit rTGFβ1 für weitere 48 h behandelt oder SeP wurde für 48 h vorinkubiert und rTGFβ1 wurde in das SeP-haltige Medium für weitere 48 h hinzugefügt, so dass die Fibroblasten über insgesamt 96 h mit dem SeP inkubiert wurden.

Fibroblasten, die mit rTGFβ1 inkubiert wurden, zeigten im Gegensatz zu unbehandelten Fibroblasten einen signifikanten Anstieg der α SMA-Expression nach 48 h, wobei die ausschließlich mit Selenoprotein P inkubierten Fibroblasten kein α SMA aufwiesen (Abbildung 3.7). Die Vorinkubation der Hautfibroblasten mit Selenoprotein P führte zu einer 45%-igen Erniedrigung der α SMA-Expression nach rTGFβ1-Stimulus. Die α SMA-Expression konnte um mehr als 50 % verhindert werden, wenn das Selenoprotein über die gesamte Behandlungsdauer von 96 h im Medium gegenwärtig war.

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Gruppen [Meewes et al., 2001] lassen den Entschluss zu, dass eine Selensupplementierung über die Aktivierung von selenhaltigen Enzymen zu einer antioxidativen Antwort führt. Um die Rolle der Selenenzyme während der Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten durch TGF β 1 zu analysieren, wurde der Effekt von Selenit auf den Proteingehalt der cytosolischen Glutathion-Peroxidase (cGPx) untersucht, da die cGPx im Gegensatz zu anderen antioxidativen Enzymen eine übergeordnete Rolle spielt [Steinbrenner et al., 2006].

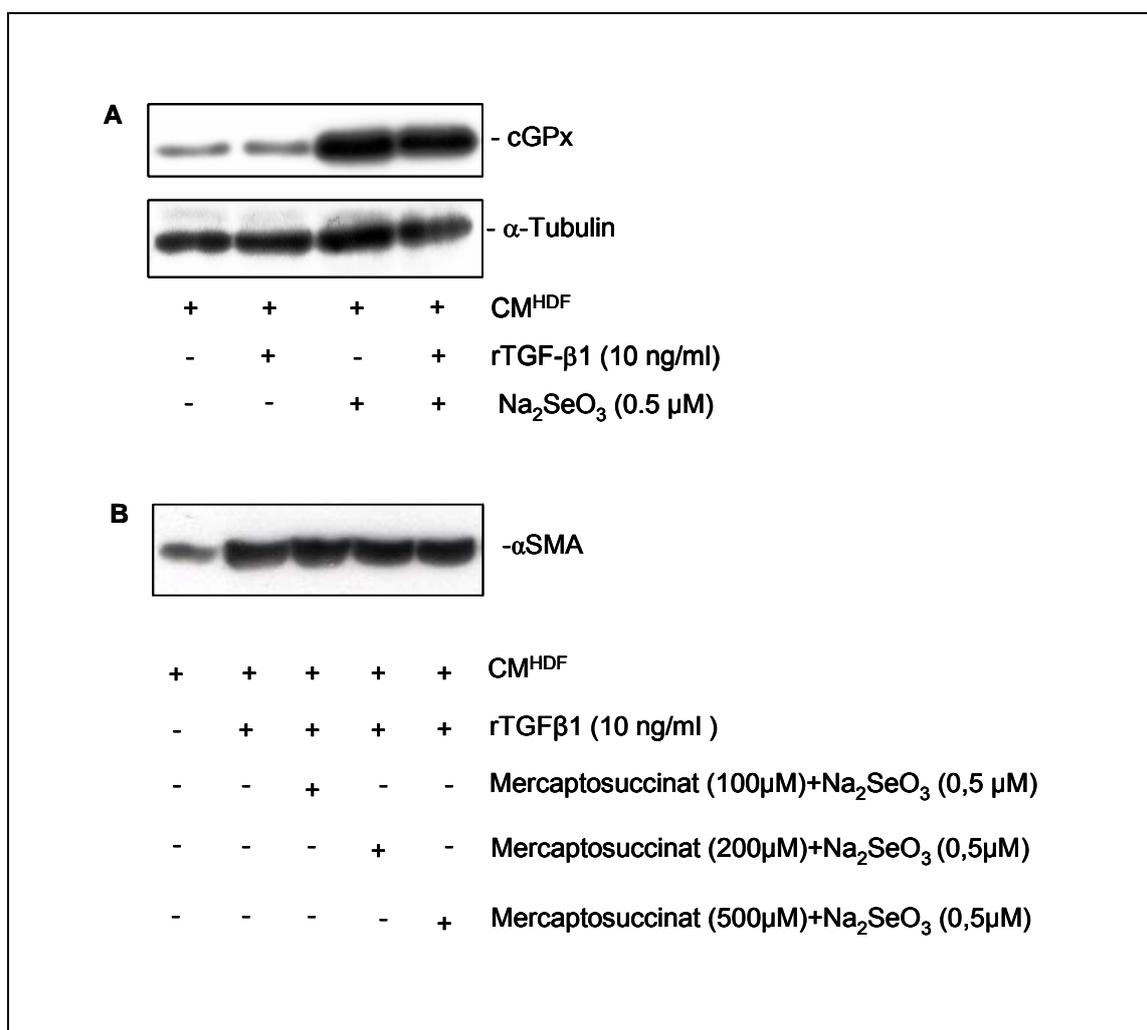


Abbildung 3.8: Selenit erhöht die cGPx1-Expression in HDF. (A) Subkonfluente HDF wurden mit 0,5 μ M Na₂SeO₃ in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) für 24 h inkubiert und anschließend der cGPx1-Gehalt der Zellen mittels Western Blot-Analyse untersucht (cGPx1 28 kDa). α -Tubulin wurde als Ladekontrolle analysiert (α -Tubulin 55 kDa). (B) Subkonfluente HDF wurden mit 0,5 μ M Na₂SeO₃ und mit verschiedenen Konzentrationen des cGPx-Inhibitors Mercaptosuccinat in konditioniertem Fibroblasten-Medium für 48 h inkubiert. Die α SMA-Expression der Zellen wurde untersucht (α SMA 42 kDa). Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Die Inkubation mit Selenit führte zu einer 2-3-fach höheren Expression der cytosolischen Glutathion-Peroxidase (cGPx) verglichen zu der cGPx-Expression unbehandelter Fibroblasten (Abbildung 3.8, A). Auch die Fibroblasten, die mit rTGF β 1 behandelt wurden, wiesen eine höhere cGPx-Expression auf. Zur Kontrolle der korrekten Ladung des Proteins wurde das Protein α -Tubulin in demselben Experiment untersucht.

Um die Involvierung der cGPx in den Transdifferenzierungsprozess der Fibroblasten zu bestätigen, wurden Fibroblasten zusätzlich zu Selenit mit dem GPx-Inhibitor Mercaptosuccinat behandelt und die α SMA-Expression untersucht. Mercaptosuccinat verhinderte die Selenit-vermittelte Erniedrigung der α SMA-Expression (Abbildung 3.8, B). Der α SMA-Gehalt ist mit dem Gehalt der Fibroblasten, die mit rTGF β 1 behandelt wurden vergleichbar.

Die Ergebnisse aus Abbildung 3.8 deuteten darauf hin, dass die cGPx in den ROS-abhängigen Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten involviert ist. Um diese Vermutung zu unterstützen, wurde auch der Effekt von Ebselen [2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one] auf die α SMA-Expression untersucht. Bei Ebselen handelt es sich um eine zellgängige selenoorganische Verbindung mit Glutathionperoxidase-Aktivität [Müller et al., 1984; Sies, 1993].

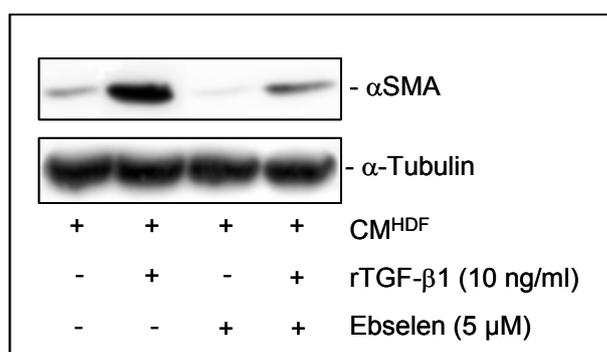


Abbildung 3.9: Ebselen vermindert die α SMA-Expression nach TGF β 1-Stimulus. HDFs wurden mit 5 μ M Ebselen für 24 h vorinkubiert. Das Ebselen-haltige Medium wurde gegen konditioniertes Fibroblasten-Medium mit 10 ng/ml rTGF β 1 ausgetauscht und die HDF für weitere 48 h inkubiert. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin untersucht (α -Tubulin 55 kDa). Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Die TGF β 1-vermittelte α SMA-Expression der Fibroblasten, die mit Ebselen vorbehandelt wurden, war um etwa 50-60% vermindert im Vergleich zu Fibroblasten, die ausschließlich

mit rTGF β 1 behandelt wurden (Abbildung 3.9). Fibroblasten, die zur Kontrolle nur mit Ebselen behandelt wurden oder nur mit konditioniertem Fibroblasten-Medium, zeigten keine α SMA-Expression. Dieses Experiment bestätigt den Schutz der ROS-vermittelten Transdifferenzierung von Fibroblasten durch die cGPx.

3.3 TGF β 1 induziert die Bildung von Lipidhydroperoxiden

Um die durch TGF β 1 generierten ROS-Typen zu charakterisieren, wurden die Hautfibroblasten mit Trolox, einem zellgängigen, wasserlöslichen Vitamin E-Derivat, behandelt. Trolox verhindert die ROS-abhängige Bildung von Lipidhydroperoxiden in der Zelle.

Die Bildung von Lipidhydroperoxiden durch TGF β 1 wurde analysiert, indem subkonfluente Fibroblasten mit Trolox vorbehandelt und der α SMA-Status dieser Zellen nach TGF β 1-Stimulus untersucht wurde.

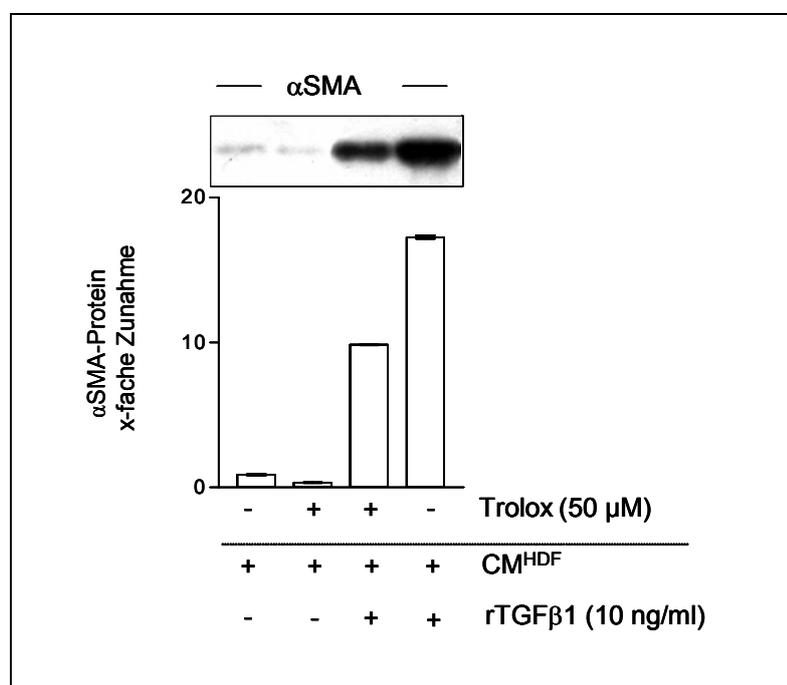


Abbildung 3.10: Trolox erniedrigt die TGF β 1-bedingte Transdifferenzierung von Fibroblasten. Der α SMA-Gehalt von HDFs, die mit 50 μ M Trolox für 24 h in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) und anschließend mit 10 ng/ml rTGF β 1 für weitere 48 h behandelt wurden, wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht (α SMA 42 kDa). Eine densitometrische Analyse wurde zur quantitativen Auswertung durchgeführt. Dabei wurde die x-fache Zunahme der α SMA-Expression ausgewertet.

Trolox verringerte die α SMA-Expression der mit rTGF β 1-behandelten Fibroblasten um etwa 50% im Vergleich zu den ausschließlich mit rTGF β 1-behandelten Fibroblasten (Abbildung 3.10). Ausschließlich mit Trolox-behandelte Fibroblasten zeigten, wie die unbehandelten Zellen, keine α SMA-Expression.

Die Beteiligung der Lipidhydroperoxide an der Initiation der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wurde mit einer direkten Messung von Lipidhydroperoxiden (LOOH) und konjugierten Dienen bestätigt [Kostyuk et al., 2003].

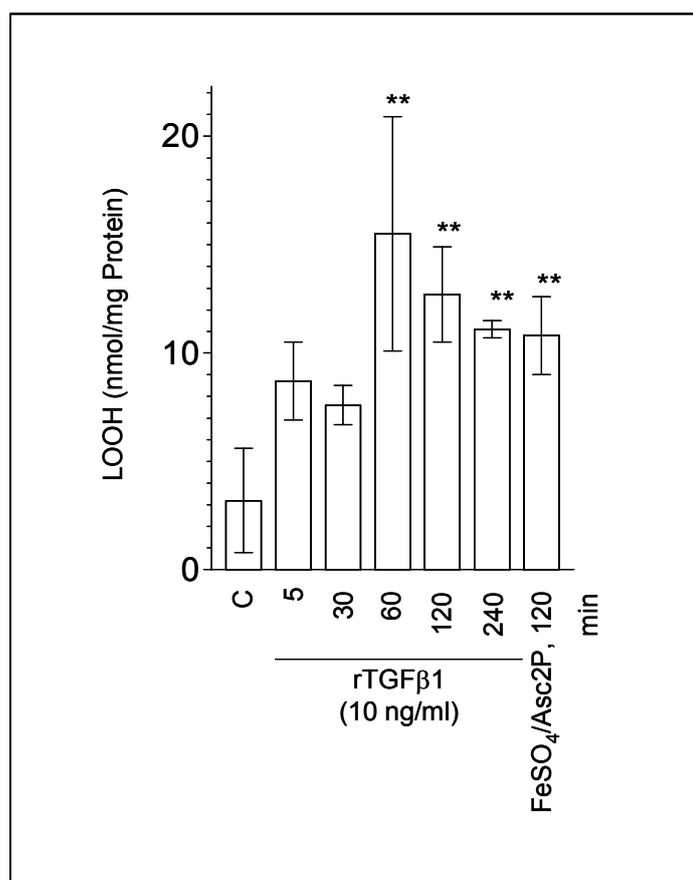


Abbildung 3.11: TGF β 1-induzierte Bildung von Lipidhydroperoxiden (LOOH). Gezeigt ist die Zeitverlauf-Analyse der Bildung von LOOHs in HDF-Lysaten nach Stimulation mit 10 ng/ml rTGF β 1 für verschiedene Zeitpunkte. Als Positivkontrolle für die Messung wurden Fibroblasten, die mit FeSO₄ und Asc₂P für 120 min behandelt wurden, eingesetzt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. ** $P < 0.01$ gegen unbehandelte Kontrollen (ANOVA, Dunnett's Test).

Fibroblasten wurden über verschiedene Zeitpunkte mit rTGF β 1 behandelt. Ein signifikanter Anstieg der LOOH-Menge um etwa das 5-fache im Gegensatz zu unbehandelten Fibroblasten wurde bereits nach 5 und 30 min gemessen. Die höchste Menge an LOOHs wurde nach 60 min gemessen, wobei der LOOH-Gehalt nach 120 min bis zu 240 min konstant hoch blieb (Abbildung 3.11). Als technische Kontrolle wurden die Fibroblasten mit einer Kombination

aus Eisen(II)-sulfat (FeSO_4) und Ascorbinsäure-2-phosphat (Asc2P) für 120 min behandelt. Auch bei diesen Fibroblasten erhöhte sich die Menge an intrazellulären Lipidhydroperoxiden signifikant.

Der Effekt von Antioxidantien auf die Bildung von Lipidhydroperoxiden wurde gemessen (Abbildung 3.12, A). Dafür wurden Fibroblasten mit NAC, Selenit oder Trolox vor der Behandlung mit TGF β 1 vorinkubiert. TGF β 1 erhöhte im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten die LOOH-Menge um etwa das 3-fache. Sowohl NAC, Selenit als auch Trolox verhinderten die Bildung von LOOHs vollständig. Auch die Fibroblasten, die ausschließlich mit den Antioxidantien behandelt wurden, wiesen keine LOOH-Bildung auf. Nach Behandlung der Fibroblasten mit rTGF β 1 für 2 h wurde eine Erhöhung der konjugierten Diene um etwa 80% im Gegensatz zu unbehandelten Fibroblasten gemessen (Abbildung 3.12, B). Die Antioxidantien NAC, Selenit und Trolox verhinderten die Bildung der konjugierten Diene vollständig.

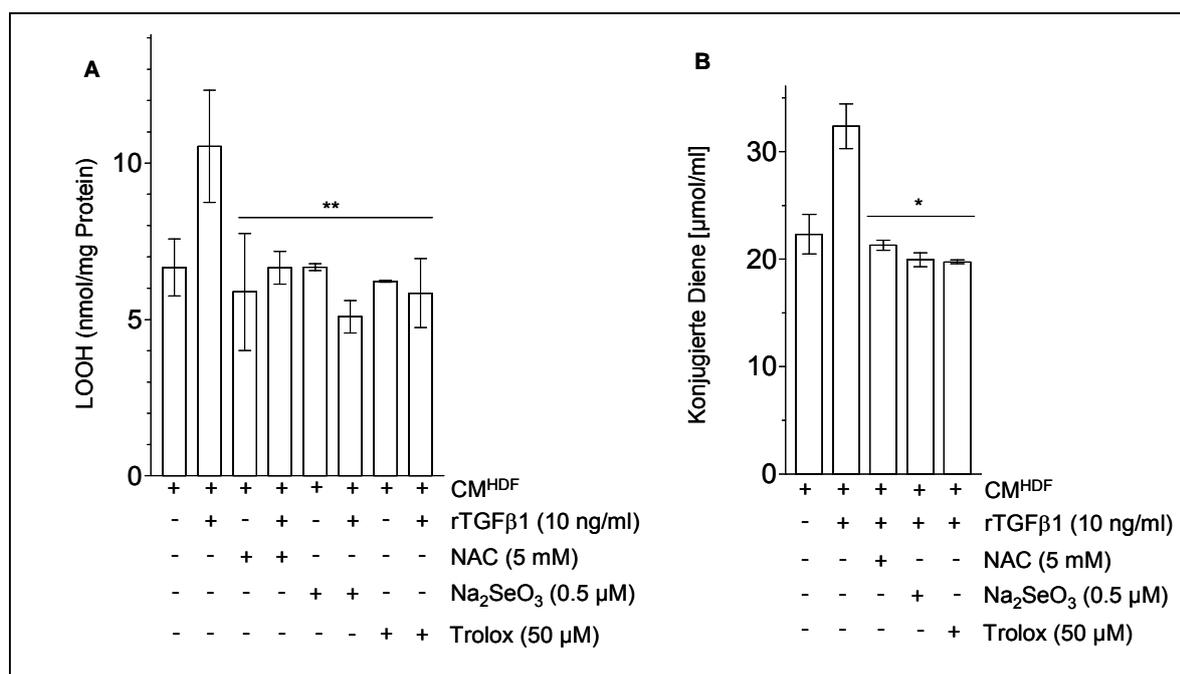


Abbildung 3.12: Antioxidantien vermindern den TGF β 1-induzierten LOOH-Gehalt in Fibroblasten. (A) Bildung der LOOHs in HDF-Lysaten nach Vorinkubation der HDF mit 5 mM NAC für 4 h und 0,5 μ M Na₂SeO₃ und 50 μ M Trolox für 24 h vor Behandlung mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium für 1 h. (B) Bildung konjugierter Diene in HDF-Lysaten nach Vorinkubation mit 5 mM NAC für 4 h und 0,5 μ M Na₂SeO₃ und 50 μ M Trolox für 24 h vor Behandlung mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) für 2 h. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. (A) ** $P < 0.01$ gegen rTGF β 1-behandelte HDF (ANOVA, Dunnett's Test). (B) * $P < 0.05$ gegen rTGF β 1-behandelte HDF (ANOVA, Dunnett's Test).

3.4 Der ROS-induzierte Signalweg ist unabhängig von der Smad2-Phosphorylierung

Aufgrund der TGF β 1-vermittelten ROS-Generierung und der damit induzierten α SMA-Expression, wurden potentielle Zielstrukturen von reaktiven Sauerstoffspezies während der TGF β 1-initiierten Signalkaskade untersucht. Da TGF β 1 eine Smad-abhängige Signalkaskade aktiviert [Heldin et al., 1997], wurde eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors während der Transdifferenzierung untersucht.

Zunächst wurden Experimente mit spezifischer siRNA gegen Smad2 durchgeführt, um die zentrale Rolle des Smad2-Proteins während der TGF β 1-Signalkaskade und die α SMA-Expression zu untersuchen.

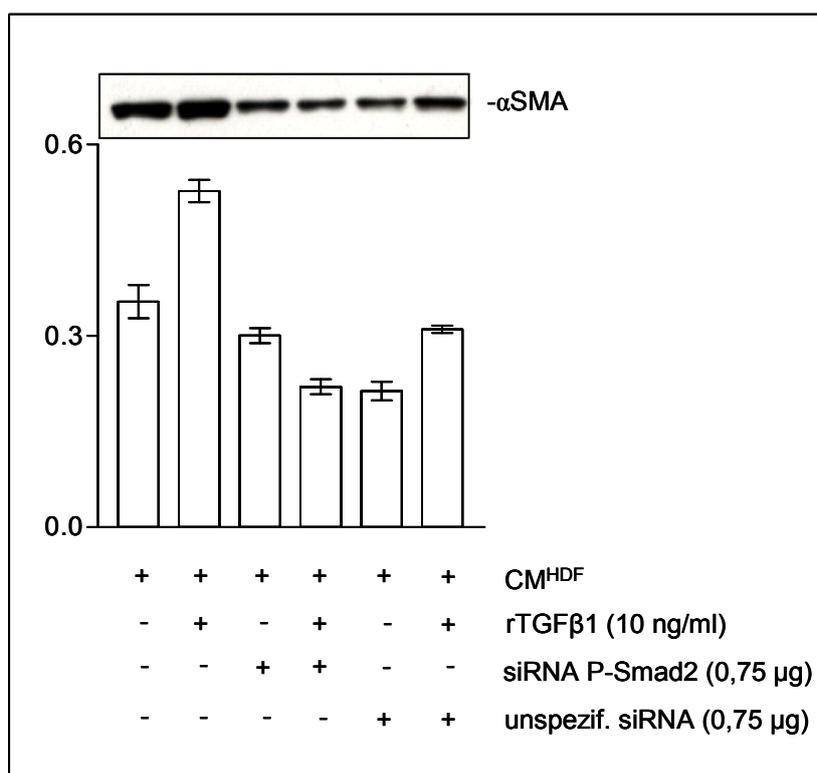


Abbildung 3.13: siRNA gegen das Smad2 Protein und dessen Wirkung auf die α SMA-Expression nach Behandlung mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}). HDFs wurden für 24 h mit 0,75 μ g siRNA in Transfektionsreagenz gegen Smad2 in serumfreien Medium behandelt. Das siRNA-haltige Medium wurde gegen konditioniertes Fibroblasten-Medium mit rTGF β 1 ausgetauscht. Nach 48 h wurde der α SMA-Gehalt der Zellen mittels Western Blot-Analyse untersucht (α SMA 42 kDa). Zur Kontrolle der spezifischen Bindung der siRNA gegen Smad2 wurden HDFs auch mit unspezifischer siRNA behandelt.

Eine Vorbehandlung der Fibroblasten mit siRNA gegen das Smad2-Protein führte zu einer verringerten α SMA-Expression nach TGF β 1-Stimulus im Vergleich zu dem α SMA-Gehalt der Fibroblasten, die ausschließlich mit rTGF β 1 behandelt wurden (Positivkontrolle). Fibroblasten, die zur Kontrolle mit unspezifisch bindender siRNA behandelt wurden zeigten wie die Positivkontrollen eine unveränderte α SMA-Expression.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten Smad2-abhängig ist, wurde auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors untersucht. Dafür wurden Fibroblasten über verschiedene Zeitpunkte mit rTGF β 1 behandelt, um anschließend die Smad2-Expression mittels Western Blot-Analyse zu analysieren.

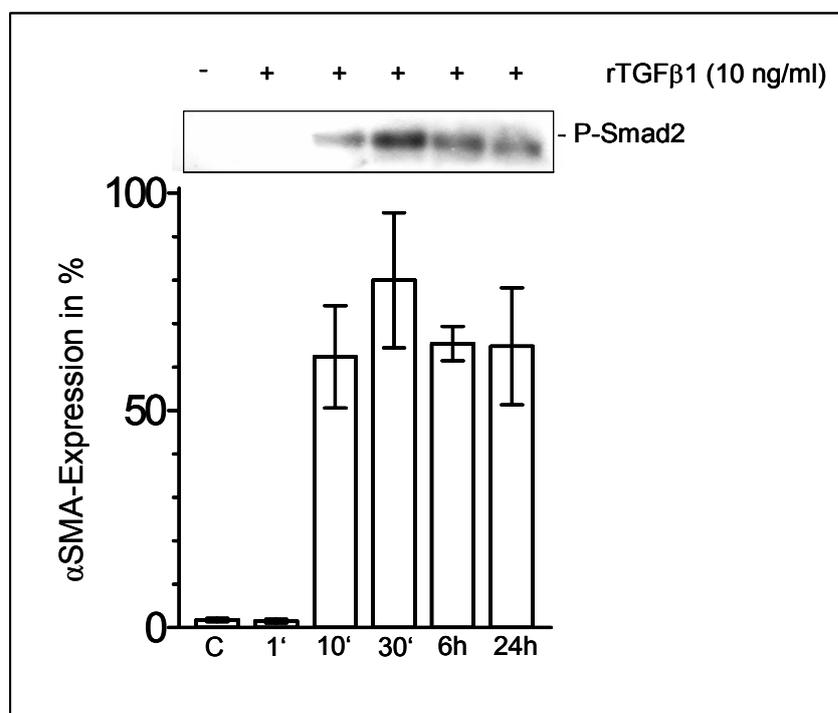


Abbildung 3.14: Phosphorylierung von Smad2. Subkonfluente HDF wurden für 15 min mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium behandelt. Das rTGF β 1-haltige Medium wurde gegen konditioniertes Fibroblasten-Medium ausgetauscht, die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten lysiert und mit Hilfe der Western Blot-Analyse auf die Phosphorylierung des Smad2-Proteins (P-Smad2 60 kDa) untersucht. Die Daten wurden densitometrisch analysiert, wobei die prozentuale α SMA-Expression der rTGF β 1-behandelten Fibroblasten gegen unbehandelte Kontrollen untersucht wurde.

Die Zeitverlauf-Analyse zeigte einen signifikanten Anstieg des Phospho-Smad2 (P-Smad2) um etwa 65% bereits 10 min nach Behandlung mit rTGF β 1 im Gegensatz zu unbehandelten

Fibroblasten (C) oder Fibroblasten, die 1 min mit rTGFβ1 inkubiert wurden. Die Phosphorylierung des Smad2-Proteins nahm nach 30-minütigem rTGFβ1-Stimulus um 80% im Vergleich zu den Kontrollen weiter zu. Sechs und 24 h nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor blieb das Phospho-Smad2-Protein signifikant um 65% erhöht.

Um das Ergebnis der Western Blot-Analyse zu bestätigen, wurden Fibroblasten immunzytochemisch gegen das Smad2-Protein gefärbt. Es wurde die Kernlokalisierung des Smad2 aufgrund seiner Phosphorylierung untersucht.

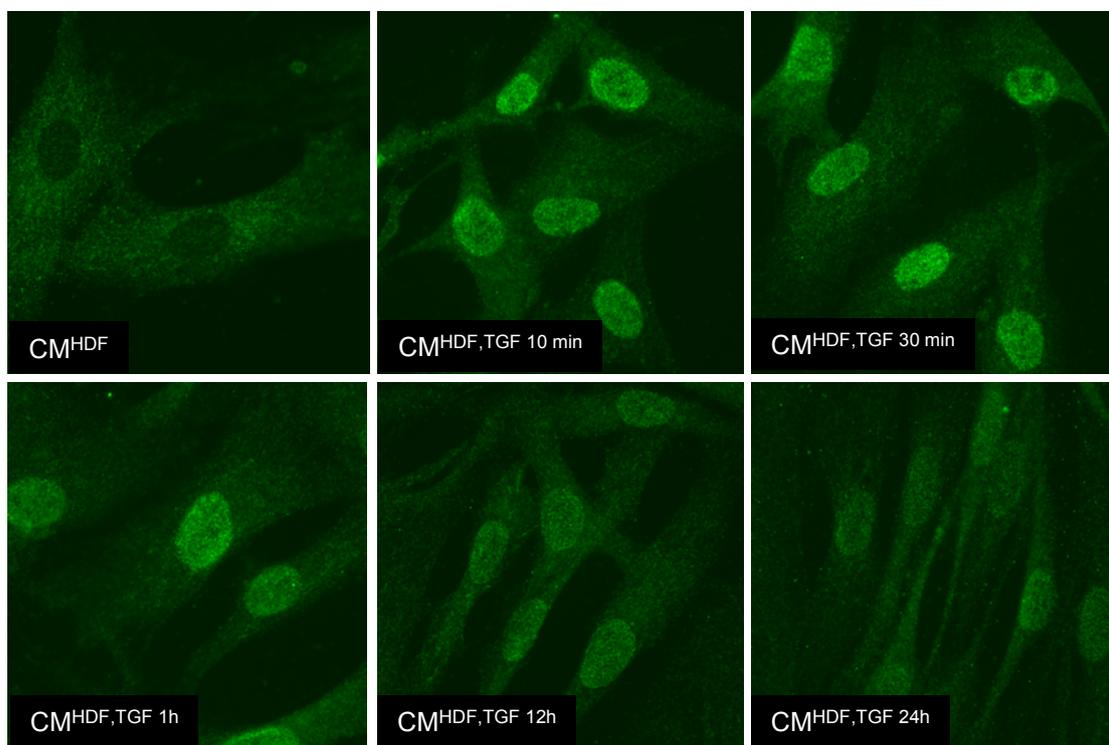


Abbildung 3.15: Immunzytochemischer Nachweis der Kernlokalisierung des Smad2-Transkriptionsfaktors nach rTGFβ1-Stimulus. Subkonfluente Fibroblasten wurden für 15 min mit 10 ng/ml rTGFβ1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) behandelt. Das Behandlungsmedium wurde gegen CM^{HDF} ausgetauscht und die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten immunzytochemisch gegen das Smad2-Protein gefärbt.

Bereits 10 min nach rTGFβ1-Behandlung der Hautfibroblasten ($CM^{HDF, TGF\ 10\ min}$) war eine Kernlokalisierung des Smad2-Transkriptionsfaktors der TGFβ1-Signalkaskade zu erkennen (Abbildung 3.15). Das Smad2-Protein befand sich bei unbehandelten Fibroblasten (CM^{HDF}) ausschließlich im Cytosol der Zelle. Auch längere Zeit nach rTGFβ1-Behandlung verblieb das Protein im Kern ($CM^{HDF, TGF\ 30\ min}$, $CM^{HDF, TGF\ 1h}$, $CM^{HDF, TGF\ 3h}$, $CM^{HDF, TGF\ 24h}$).

Eine mögliche Verbindung der TGF β 1-vermittelten ROS-Produktion mit der TGF β 1-initiierten Aktivierung von Smad2 wurde durch den Einsatz von Antioxidantien untersucht.

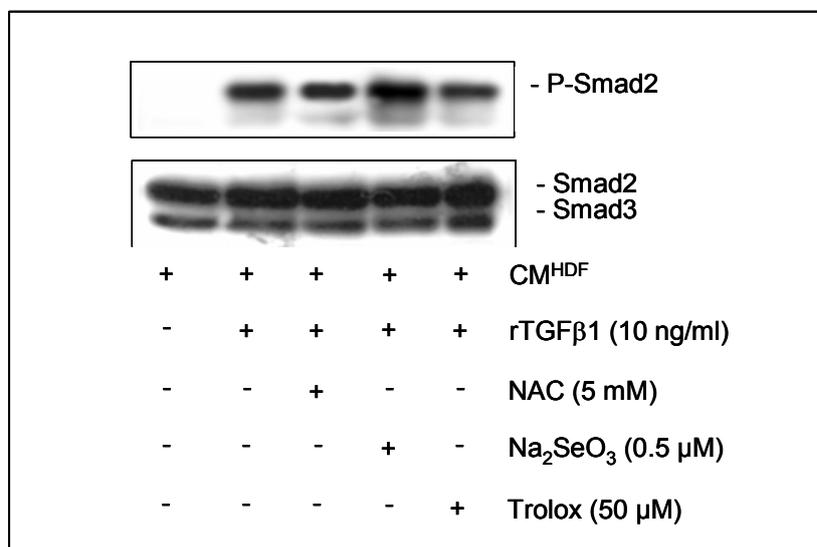


Abbildung 3.16: Antioxidantien haben keine Wirkung auf die Phosphorylierung des Smad2-Proteins. HDFs wurden mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) behandelt oder im Vorfeld mit 5 mM NAC für 4 h und mit 0,5 μ M Na₂SeO₃ oder 50 μ M Trolox für 24 h vorinkubiert. Die Phosphorylierung von Smad2 und Total-Smad2/3 wurden nach Behandlung mit Hilfe der Westerns Blot-Analyse untersucht (P-Smad2 60 kDa, Smad2/3 ca. 60 kDa).

Obwohl TGF β 1 zu einer frühen Phosphorylierung des Smad2 führt, ist diese Phosphorylierung unabhängig von der ROS-Generierung durch TGF β 1. Die Antioxidantien wirkten nicht auf die Phosphorylierung des Smad2 (Abbildung 3.16). Auch die Total-Smad-Konzentration wurde mit einem Antikörper untersucht, der endogenes Smad2 und Smad3 erkannte. Die Total-Smad-Konzentration war unverändert nach Behandlung der Fibroblasten mit den Antioxidantien und/oder rTGF β 1.

Die Kernlokalisierung des Smad2-Proteins wurde nach Vorinkubation der Fibroblasten mit den Antioxidantien N-Acetylcystein, Selenit und Trolox und anschließender rTGF β 1-Behandlung immunzytochemisch untersucht.

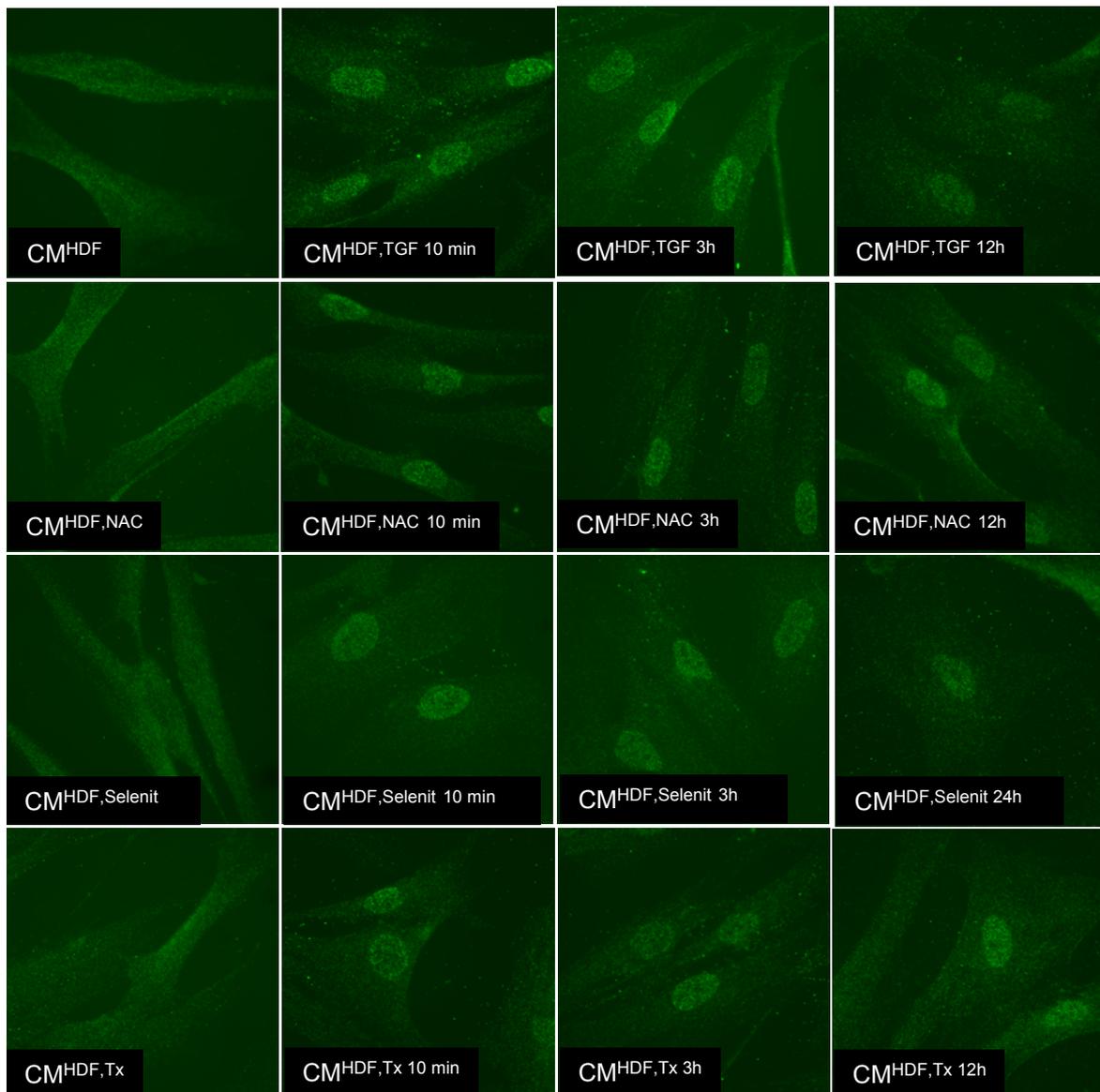


Abbildung 3.17: Antioxidantien-unabhängige Kernlokalisierung des Smad2-Proteins. HDFs wurden mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) für 15 min behandelt. Das rTGF β 1-haltige Medium wurde gegen CM^{HDF} ausgetauscht und das Smad2-Protein nach 10 min, 3 h oder 24 h gefärbt oder die Fibroblasten wurden vor rTGF β 1-Behandlung mit 5 mM NAC für 4 h oder 0,5 μ M Na₂SeO₃ und 50 μ M Trolox (Tx) für 24 h vorinkubiert und anschließend gefärbt.

Das Smad2-Protein war in der immunzytochemischen Untersuchung bei Fibroblasten, die mit rTGF β 1 behandelt wurden bereits nach 10 min (CM^{HDF,TGF 10 min}) kernlokalisiert. Auch nach längeren Zeitpunkten blieb das Smad2-Protein im Kern lokalisiert (CM^{HDF,TGF 3h}, CM^{HDF,TGF 12h}). Die Vorinkubation der Fibroblasten mit den Antioxidantien NAC, Selenit und Trolox hatte keinen Einfluss auf die Kernlokalisierung des Proteins (CM^{HDF,NAC}, CM^{HDF Selenit} und CM^{HDF,Tx}). Auch nach längeren Zeitpunkten wurde kein Effekt verzeichnet.

Die immunzytochemischen Ergebnisse aus Abbildung 3.17 wurden zusätzlich anhand einer Fraktionierung der Zelllysate nach TGFβ1-Behandlung in Cytosolfraction und Kernfraction und anschließender Western Blot-Analyse bestätigt.

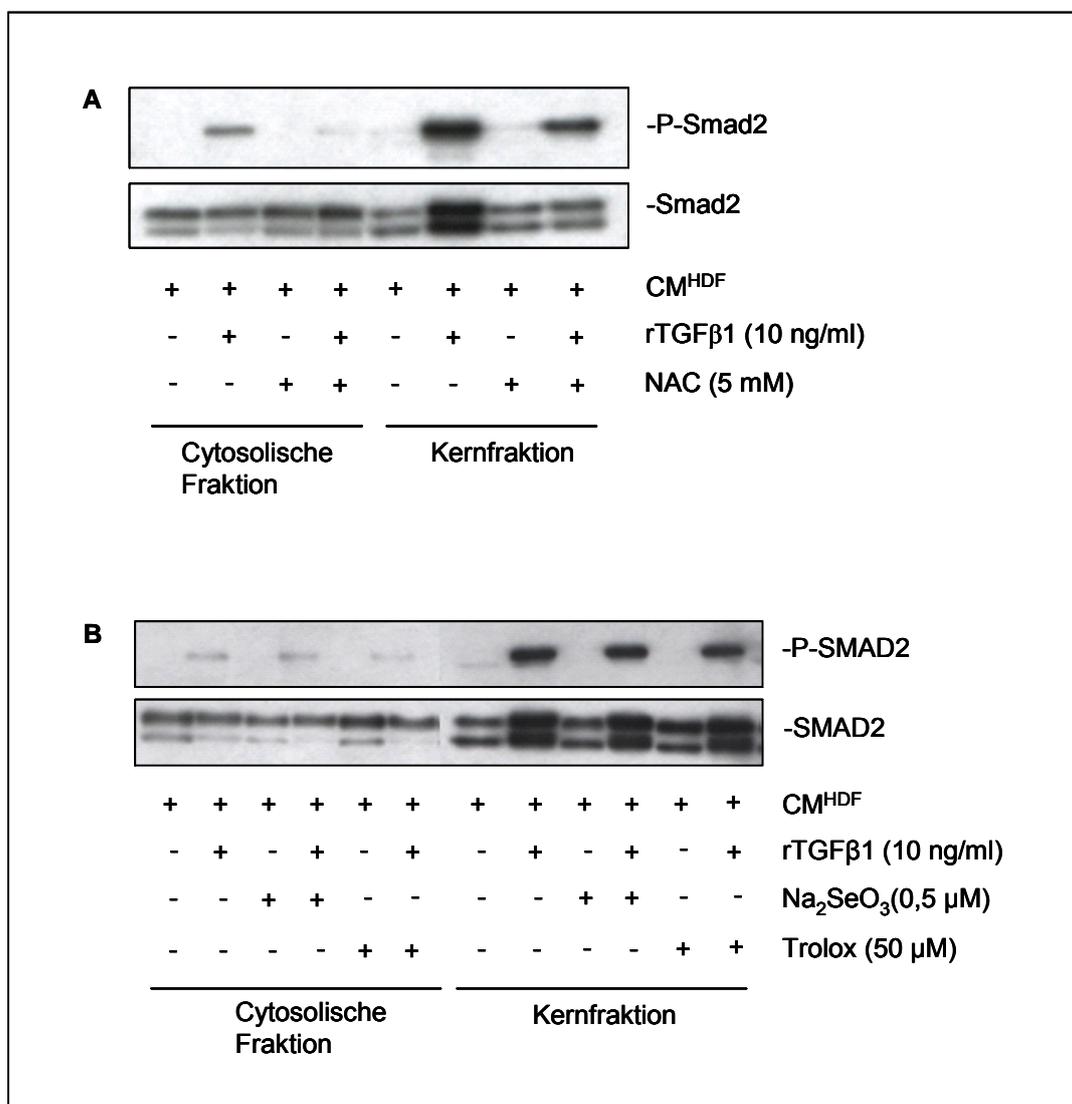


Abbildung 3.18 Antioxidantien haben keinen Einfluss auf die TGFβ1-vermittelte Kernlokalisation des Smad2-Proteins. HDFs wurden mit 10 ng/ml rTGFβ1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) für 15 min behandelt. Das rTGFβ1-haltige Medium wurde gegen CM^{HDF} ausgetauscht und die Zellen nach 10 min lysiert, oder die Fibroblasten wurden vor rTGFβ1-Behandlung mit (A) 5 mM NAC für 4 h oder (B) 0,5 μM Na₂SeO₃ und 50 μM Trolox für 24 h vorinkubiert und anschließend lysiert. Die Zelllysate wurden mit Hilfe eines Fraktionierungskits (Ne-Per, Pierce) in cytosolische Fraktionen und Kernfraktionen getrennt und für die Western Blot-Analyse eingesetzt (P-Smad2 60 kDa, Smad2 60 kDa).

Wie auch in der immunzytochemischen Untersuchung der Kernlokalisierung des Smad2-Proteins (Abbildung 3.17) hatte auch die Vorinkubation der Fibroblasten mit den Antioxidantien NAC, Selenit und Trolox keinen Einfluss auf die Kernlokalisierung des Proteins.

3.5 Die NADH-Oxidase beeinflusst die TGF β 1-vermittelte ROS-Produktion

Da gezeigt werden konnte, dass die Transdifferenzierung der Fibroblasten von TGF β 1 und Lipidhydroperoxiden abhängig ist, stellte sich nun die Frage, welche Quellen die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies vorantreiben, die zur Induktion der Lipidperoxidation führen. Im ersten Ansatz wurde die NAD(P)H-Oxidase untersucht. Sie produziert Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Lungenfibroblasten zeigen eine erhöhte NADH-Oxidase-Aktivität nach TGF β 1-Zugabe und somit eine erhöhte ROS-Produktion [Thannikal et. al., 1995]. Deshalb wurde die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase und ihre Wirkung auf die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten nach TGF β 1-Stimulus untersucht. Dafür wurden die Fibroblasten mit dem spezifischen NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor Apocynin behandelt. Nach 48-stündiger Behandlung der Hautfibroblasten mit rTGF β 1 erhöhte sich die Anzahl α SMA-positiver Zellen (CM^{TGF}) im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten (CM^{HDF}) signifikant. Fibroblasten, die mit Apocynin für 1 h vor rTGF β 1-Behandlung inkubiert wurden, zeigten im Gegensatz zu rTGF β 1-behandelten Zellen insgesamt weniger Myofibroblasten.

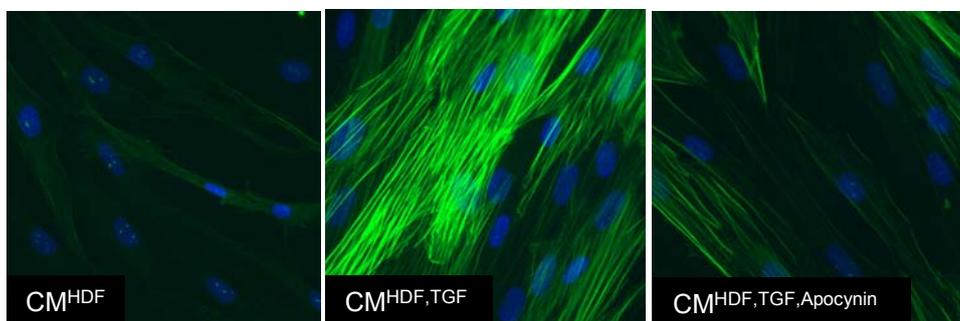


Abbildung 3.19: Immunzytochemischer Nachweis von Myofibroblasten nach rTGF β 1-Stimulus. Subkonfluente humane dermale Fibroblasten (HDF) wurden in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) kultiviert, mit 10 ng/ml rTGF β 1 in CM^{HDF} ($CM^{HDF,TGF}$) behandelt oder mit 1 mM Apocynin in CM^{HDF} für 1 h vor Behandlung mit 10 ng/ml rTGF β 1 ($CM^{HDF,TGF,Apocynin}$) vorinkubiert und anschließend gegen das Protein α SMA gefärbt.

Zur Bestätigung der immunzytochemischen Daten aus Abbildung 3.19 wurde die Wirkung der Inhibitoren Diphenyliodonium (DPI), das allgemein an Flavoproteine bindet, und Apocynin, das spezifisch die NAD(P)H-Oxidase blockiert, im folgenden Experiment eingesetzt, um die Wirkung der NAD(P)H-Oxidase auf die α SMA-Expression von Fibroblasten zu untersuchen.

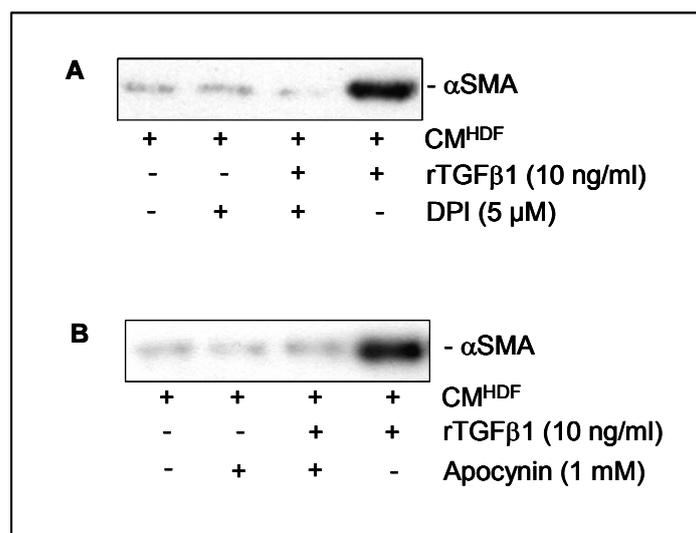


Abbildung 3.20: Western Blot-Analyse der α SMA-Expression in Fibroblasten, die vor Behandlung mit 10 ng/ml rTGF β 1 für 48 h mit (A) 5 μ M DPI und (B) 1 mM Apocynin in konditioniertem Kontroll-Medium (CM^{HDF}) für 1 h vorinkubiert wurden.

Der Western Blot (Abbildung 3.20, A) zeigte eine deutliche Verringerung der α SMA-Expression in den Fibroblasten, die mit rTGF β 1 und DPI inkubiert wurden. Im Gegensatz dazu war zu erkennen, dass der α SMA-Proteingehalt, der ausschließlich mit rTGF β 1 behandelten Fibroblasten, im Gegensatz zu den Kontroll-Fibroblasten, stark erhöht war. Auch die Fibroblasten, die mit Apocynin und rTGF β 1 inkubiert wurden, zeigten eine deutliche Verringerung der α SMA-Expression im Gegensatz zu Fibroblasten, die ausschließlich mit rTGF β 1 inkubiert wurden (Abbildung 3.20, B). Die Kontroll-Fibroblasten (CM^{HDF}) zeigten eine niedrige basale α SMA-Expression.

Die Verringerung der α SMA-Expression durch Apocynin und DPI ließ auf eine Involvierung der NAD(P)H-Oxidase während der intrazellulären ROS-Produktion nach TGF β 1-Behandlung schließen. Um die NAD(P)H-Oxidase in die Signalkaskade zeitlich einordnen zu können, wurde im folgenden Experiment eine Zeitverlauf-Analyse der ROS-

Generation nach Behandlung von Hautfibroblasten nach Behandlung mit rTGF β 1 durchgeführt.

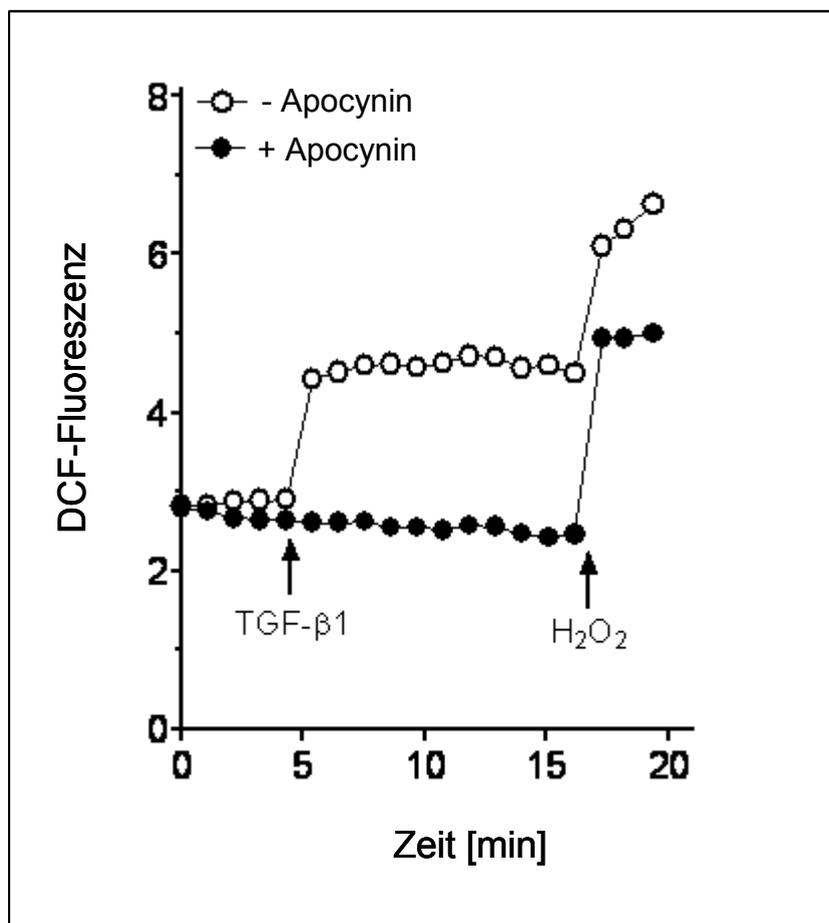


Abbildung 3.21: Die NADH-Oxidase führt zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären ROS-Produktion nach TGF β 1-Stimulus. Subkonfluente HDF wurden mit 1 mM des NAD(P)H-Oxidase-Inhibitors Apocynin vor Behandlung mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium oder 1 mM H₂O₂ als Positivkontrolle für die dargestellten Zeiten für 1 h vorinkubiert. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde über 20 min im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten beobachtet. Die dargestellten Pfeile zeigen den Zeitpunkt der rTGF β 1- oder H₂O₂-Zugabe. Die Experimente wurden als Triplikate durchgeführt.

Die Zugabe von rTGF β 1 5 min nach Beginn der DCF-Messung führte zu einem signifikanten Anstieg der mit dem ROS-Gehalt korrelierenden Fluoreszenz des 2,7-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetats (H₂DCF-DA) über die gemessene Zeitdauer von etwa 10 min. Dagegen verhinderte die Vorinkubation mit dem NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor Apocynin den rTGF β 1-induzierten Anstieg der Fluoreszenz und somit die ROS-Produktion innerhalb der Fibroblasten. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid nach 15 min, zeigten die

Zellen einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz. Die Zugabe des Wasserstoffperoxids diente in diesem Experiment als technische Kontrolle.

Um zu untersuchen, ob der frühe Anstieg des intrazellulären ROS-Gehaltes tatsächlich mit einer Zunahme der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase korreliert, wurde deren TGF β 1-abhängige Aktivität gemessen. Der Verbrauch an NADH spiegelt die Aktivität der NADH-Oxidase wider. Es wurde auch der NADPH-Verbrauch gemessen, um zu untersuchen, ob es sich bei der gemessenen Aktivität um die NADH-Oxidase oder NAD(P)H-Oxidase handelt (die Daten sind nicht aufgeführt). Da die behandelten Fibroblasten im Gegensatz zu NADH kein NADPH verbrauchten, wurde davon ausgegangen, dass die NADH-Oxidase die entscheidende Rolle während der TGF β 1-vermittelten intrazellulären ROS-Produktion spielt.

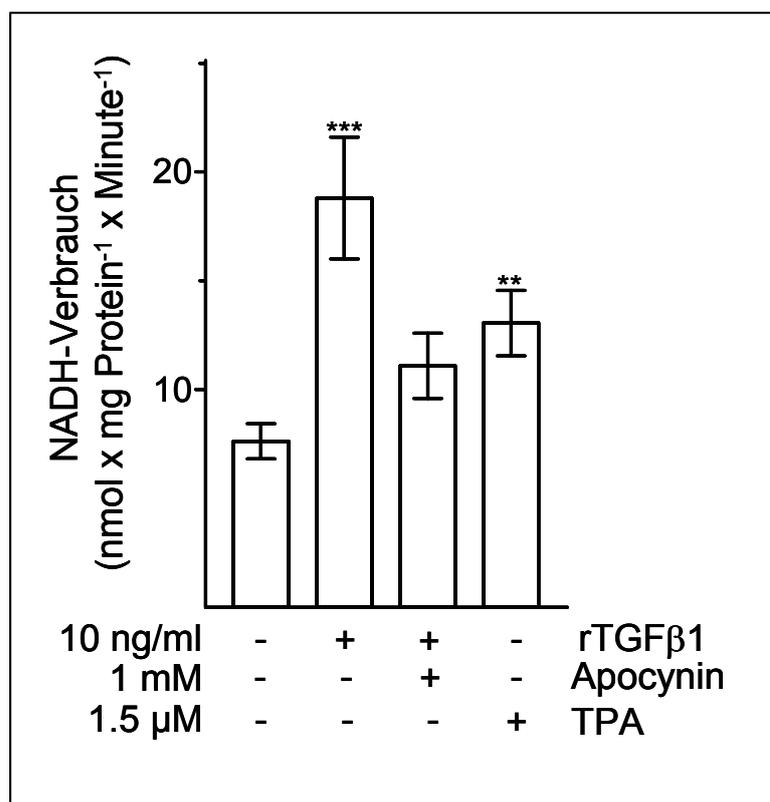


Abbildung 3.22: Die NADH-Oxidase wird durch TGF β 1 aktiviert. Subkonfluente HDF wurden mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium oder 1,5 μ M TPA für 15 min behandelt oder vor Behandlung mit rTGF β 1 mit 1 mM Apocynin für 1 h vorinkubiert. Das rTGF β 1-haltige Medium wurde gegen 250 μ M NADH in HBSS ausgetauscht und die HDF für 5 min inkubiert. Die NADH/HBSS-Lösung wurde gesammelt und der NADH-Verbrauch der HDF unmittelbar bei 340 nm photometrisch gemessen. Der Verbrauch wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für NADH ($\epsilon = 3400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnet. Der NADH-Verbrauch wird in nmol/mg Protein pro Minute angegeben. Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. *** $P < 0.001$ gegen unbehandelte Kontrollen (ANOVA, Dunnett's Test).

Die Zugabe von rTGF β 1 führte zu einem signifikanten Anstieg des NADH-Verbrauchs nach 5 min um etwa 30%. Eine Vorinkubation der Fibroblasten mit Apocynin vor rTGF β 1-Behandlung verringerte den NADH-Verbrauch der Zellen um ca. 40% im Vergleich zu rTGF β 1-behandelten Zellen und somit die Aktivität der NADH-Oxidase. Mit Phorbol ester (TPA) behandelte Fibroblasten, die als technische Kontrolle für dieses Experiment dienten, zeigten im Gegensatz zu unbehandelten Fibroblasten erhöhten NADH-Verbrauch (Abbildung 3.22).

3.6 Die PKC aktiviert die ROS/TGF β 1-bedingte α SMA-Expression

In den folgenden Experimenten wurde die Frage untersucht, wie die frühe Aktivierung der NADH-Oxidase reguliert wird. Eine Expression von Untereinheiten der Oxidase wurde dabei ausgeschlossen. TGF β 1 kann sowohl die Biosynthese extrazellulärer Matrixkomponenten [Suzuki et al., 1995] als auch die Aktivierung von Kinasen und Transkriptionsfaktoren wie die Proteinkinase C regulieren [Lim et al., 2005]. Weiter ist beschrieben, dass die PKC die NADH-Oxidase aktivieren kann [Jinnin et. al., 2005].

Zunächst wurde untersucht, ob die PKC einen Effekt auf die TGF β 1-vermittelte α SMA-Expression in Hautfibroblasten ausübt. Für die folgenden Experimente wurden spezifische PKC-Inhibitoren wie Ro 31-8220 und Ro 32-0432 eingesetzt.

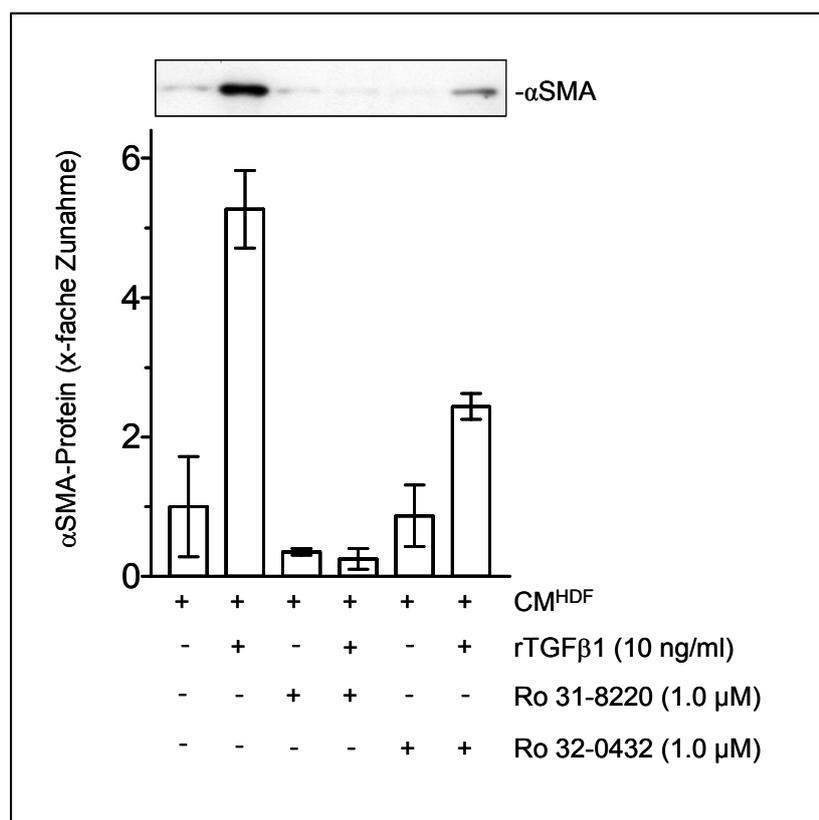


Abbildung 3.23: Die PKC ist an der TGFβ1-induzierten Transdifferenzierung maßgeblich beteiligt. HDFs wurden vor Zugabe von 10 ng/ml rTGFβ1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) mit 1 μM Ro 31-8220 oder 1 μM Ro 32-0432 in CM^{HDF} für 1 h vorinkubiert. Die Zellysate wurden mit der Western Blot-Analyse auf die αSMA-Expression untersucht. Das Ergebnis wurde densitometrisch analysiert und die x-fache Zunahme des αSMA-Proteins ermittelt. Das Ergebnis stellt Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

Ro 32-0432 ist ein selektiver zellgängiger PKC-Inhibitor, der spezifisch Ca²⁺-abhängige PKC-Isoformen, wie zum Beispiel die PKC α und die PKC β, inhibiert und weniger spezifisch für die Ca²⁺-unabhängigen Isoformen PKC δ und PKC ε ist [Haddad et al., 2005]. Dagegen inhibiert Ro-82-8220 alle PKC-Isoformen inklusive der PKC γ [Jimines-Sainz et al., 2003]. Die mit rTGFβ1-behandelten Zellen wiesen im Gegensatz zu den unbehandelten Fibroblasten nach 48 h einen 5-fach erhöhten αSMA-Gehalt auf. Der Ro 31-8220-Inhibitor verhinderte die rTGFβ1-induzierte αSMA-Expression vollständig, wohingegen der Ro 32-0432-Inhibitor die Expression des αSMA-Proteins bis zu 50% erniedrigte.

Um die Aktivierung der PKC nach TGF β 1-Stimulus zu analysieren, wurde eine Zeitverlaufsanalyse durchgeführt. Hierbei diente die Phosphorylierung von PKC als Maß für deren Aktivität [Inoguchi et al., 2003].

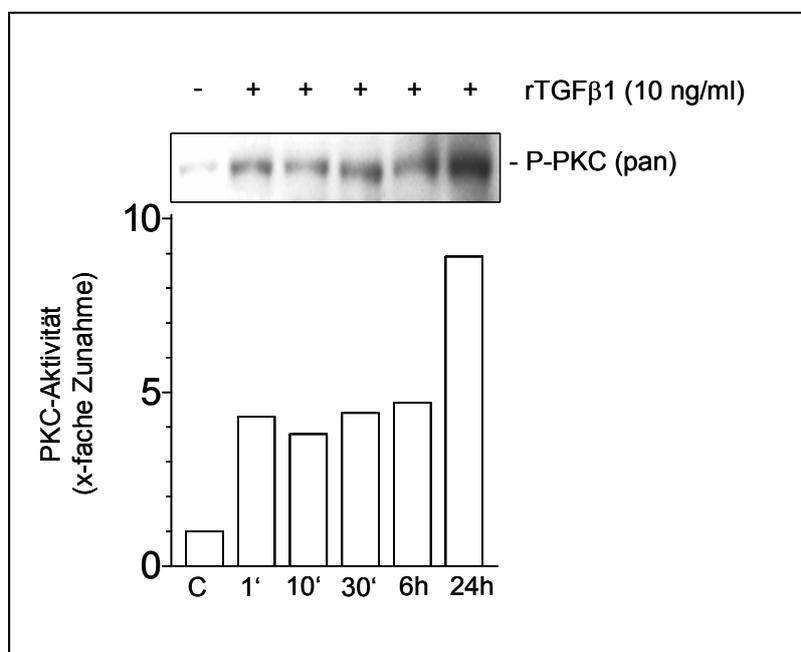


Abbildung 3.24: Zeitabhängige Phosphorylierung der PKC nach rTGF β 1-Zugabe. Die Phosphorylierung der PKC wurde nach verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung der HDFs mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem HDF-Medium (CM^{HDF}) untersucht. Die Zunahme der PKC-Phosphorylierung wurde mittels einer Western-Blot-Analyse und anschließend einer densitometrischen Analyse ermittelt.

Der phosphospezifische PKC (pan)-Antikörper detektiert endogene Isoformen der Proteinkinase C, wie der PKC α , β I, β II, γ , δ , ϵ , η und θ und Isoformen, die an dem Thr514 der PKC γ phosphoryliert sind. Bereits 1 min nach Stimulation der Fibroblasten mit TGF β 1 war eine Phosphorylierung der PKC um das 4-fache im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten zu erkennen (Abbildung 3.24). Die Phosphorylierung der PKC blieb über den untersuchten Zeitraum von 24 h erhalten.

Im folgenden Experiment wurde die Wirkung von Antioxidantien auf die Phosphorylierung der PKC untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Aktivierung der PKC eine Aktivierung der NADH-Oxidase induziert, die anschließend in einer Erhöhung der intrazellulären ROS-Menge resultiert, oder ob die durch TGF β 1-induzierte ROS-Generierung erst die Aktivierung der PKC bedingt, was eine erhöhte NADH-Oxidase-Aktivität induziert.

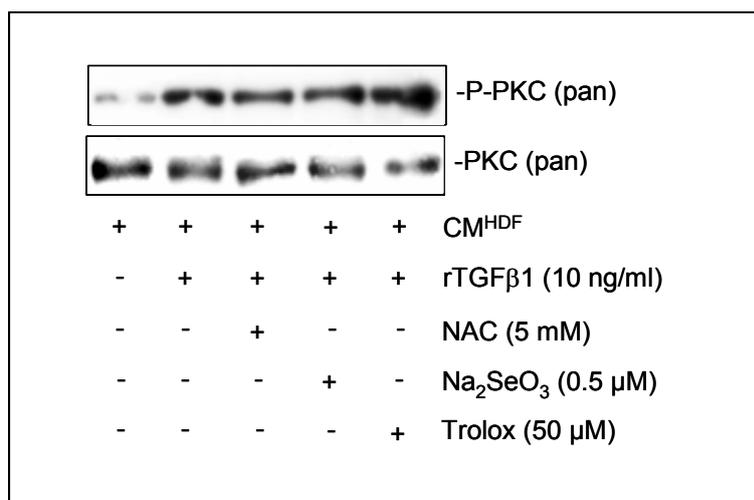


Abbildung 3.25: Die Aktivierung der PKC ist unabhängig von ROS. HDFs wurden mit 5 mM NAC für 4 h und 0,5 μM NaSeO₃ oder 50 μM Trolox für 24 h in konditionierten HDF-Medium (CM^{HDF}) vorinkubiert. Das antioxidantien-haltige Medium wurde gegen CM^{HDF} mit 10 ng/ml rTGFβ1 ausgetauscht und für 1 min inkubiert. Die Phosphorylierung der PKC und der Gesamt-PKC-Gehalt wurden mit Hilfe der Western Blot-Analyse untersucht.

Vor Behandlung der Fibroblasten mit rTGFβ1 für 1 min wurden die Zellen entweder mit NAC, Selenit oder Trolox vorinkubiert. Im Gegensatz zu unbehandelten Fibroblasten zeigten mit rTGFβ1-behandelte Zellen einen signifikanten Anstieg der Phospho-PKC, der auch in Kombination mit den eingesetzten Antioxidantien konstant blieb. Für die Untersuchung der Gesamtmenge an PKC wurde ein Antikörper eingesetzt, der die PKC-Isoformen α, β und γ erkennt. Nach rTGFβ1-Behandlung blieb die Gesamtmenge an PKC im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten unverändert. Auch die Vorinkubation der Fibroblasten mit den Antioxidantien vor rTGFβ1-Behandlung hatte keinen Effekt auf die Gesamtmenge der PKC. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die TGFβ1-induzierte ROS-Generierung der Phosphorylierung der PKC nachgeschaltet sein muss (Abbildung 3.25).

Um nun im umgekehrten Fall die Notwendigkeit der PKC auf die TGFβ1-vermittelte intrazelluläre ROS-Produktion zu untersuchen, wurde eine Zeitanalyse der ROS-Generierung von Fibroblasten nach TGFβ1-Stimulus unter dem Einsatz des PKC-Inhibitors Ro 31-8220 durchgeführt. Demnach sollte der PKC-Inhibitor die ROS-Produktion vermindern oder komplett verhindern können.

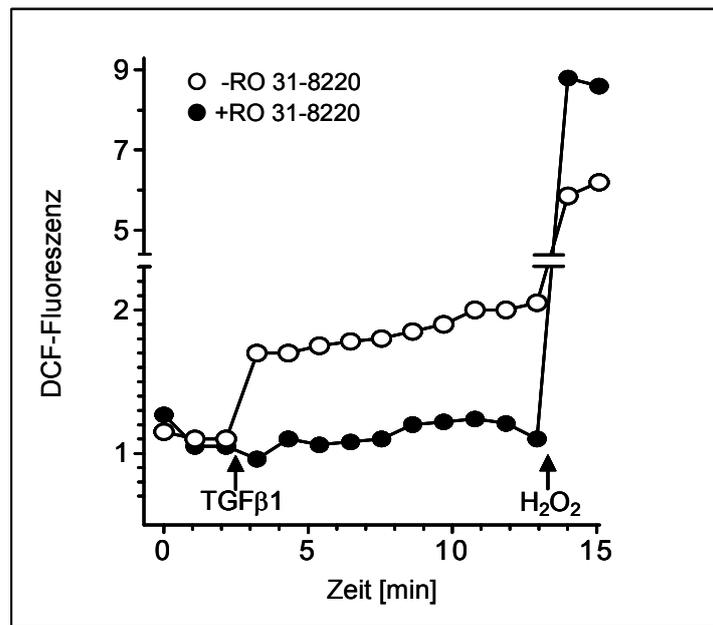


Abbildung 3.26: Die TGF β 1-vermittelte ROS-Produktion ist PKC-abhängig. Subkonfluente HDFs wurden mit 1 μ M Ro 31-8220 für 1 h inkubiert. Die Fluoreszenz wurde nach Zugabe von 10 ng/ml rTGF β 1 und 1 mM H $_2$ O $_2$ als Positivkontrolle in konditioniertem HDF-Medium gemessen. Die Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 15 min aufgenommen. Die dargestellten Pfeile zeigen den Zeitpunkt der rTGF β 1- oder H $_2$ O $_2$ -Zugabe. Die Experimente wurden als Triplikate durchgeführt.

Die Zugabe von TGF β 1 führte zu einem schnellen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz (Abbildung 3.26). Diese stieg kontinuierlich über die beobachtete Zeitdauer von 10 min. Die Zugabe von H $_2$ O $_2$ erhohnte die Fluoreszenz und somit die intrazelluläre ROS-Produktion zunehmend. Die Vorinkubation der Fibroblasten mit dem spezifischen PKC-Inhibitor Ro 31-8220 für 1 h verhinderte die TGF β 1-induzierte ROS-Generierung vollständig. Die Zugabe von H $_2$ O $_2$ zu den mit dem Inhibitor vorinkubierten Zellen, führte zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz. H $_2$ O $_2$ wurde in diesem Experiment als technische Kontrolle eingesetzt.

3.7 Oxidierung von Zielstrukturen durch TGFβ1-induzierte ROS

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass intrazellulär generierte reaktive Sauerstoffspezies nicht mit dem TGFβ1-induzierten Smad2-Transkriptionsfaktor reagieren. Deshalb ließ die frühe Bildung der ROS auf deren zentrale Rolle in einem parallelen Signalweg zu der Smad-Signalkaskade vermuten. Um die Frage zu klären, welche Zielstrukturen nach der ROS-Produktion durch diese modifiziert werden und in die 'downstream'-Signalkaskade involviert sind, wurden Hautfibroblasten für verschiedene Zeiteinheiten mit rTGFβ1 behandelt und anschließend die Oxidierung von Proteinen untersucht. Hierbei war wichtig zu ermitteln, wann ROS-modifizierte, d.h. oxidierte Proteine, nach TGFβ1-Behandlung entstehen.

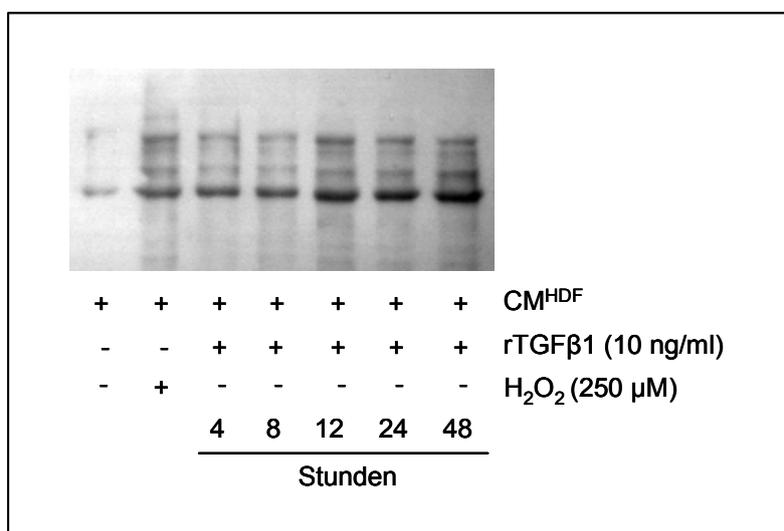


Abbildung 3.27: TGFβ1-initiierte ROS oxidieren Proteine. Subkonfluente HDF wurden entweder mit konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) oder mit rTGFβ1 in CM^{HDF} für 4, 8, 12, 24 und 48 h behandelt. Als Positivkontrolle wurden HDFs für 30 min mit 250 μM H₂O₂ in CM^{HDF} behandelt. Die Zellysate wurden mit Hilfe des Oxyblot-Kits (Chemicon) aufgearbeitet und für die Western Blot-Analyse eingesetzt. Das Ergebnis wurde in drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten bestätigt.

Unbehandelte Fibroblasten zeigten im Gegensatz zu Fibroblasten, die mit H₂O₂ behandelt wurden sehr geringe Mengen an oxidierten Proteinen. Nach 4 h und 8 h war ein erster Anstieg der Oxidierung von Proteinen zu verzeichnen. Nach 12-stündiger Behandlung mit rTGFβ1 wurde die Proteinoxidation stärker, was über 24 h bis zu 48 h nach rTGFβ1-Behandlung anhielt.

Die Transkription des α SMA-Proteins ist durch den Einsatz von Antioxidantien nicht herunter regulierbar (Abbildung 3.6), was die Vermutung zulässt, dass ROS erst post-transkriptionell Zielproteine modifiziert. Außerdem bestätigte das Ergebnis aus Abbildung 3.27, dass eine Oxidierung der Zielstrukturen durch reaktive Sauerstoffspezies, die zu der Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten beiträgt, 12 h nach TGF β 1-Stimulus auftritt. Für die weitere Untersuchung wurden deshalb Fibroblasten für 12 h mit rTGF β 1 und/oder Antioxidantien behandelt und die Proteinoxidierung mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese analysiert.

Mit Hilfe der Isoelektrofokussierung können Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) in einem pH-Gradienten aufgetrennt und anschließend in einem SDS-PAGE sichtbar gemacht werden. Um durch ROS oxidierte Proteine untersuchen zu können, wurden Proteinlysate der behandelten Proben zunächst mit einer DNPH-Lösung behandelt und anschließend für die weitere 2D-Gelelektrophorese eingesetzt.

Im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten zeigten mit rTGF β 1 für 12 h behandelte Fibroblasten einen neu hinzukommenden, oxidierten Proteinspot (Abbildung 3.28 B, Spot 1 rot umkreist). Nach Vorinkubation der Zellen mit dem Antioxidans NAC und anschließender rTGF β 1-Behandlung (Abbildung 3.28 D) war ein Protein nicht mehr oxidiert, wobei es sich dabei um ein Protein handelt, das sowohl bei behandelten als auch nicht behandelten Fibroblasten auftritt (Abbildung 3.28 B, Spot 4; A, Spot A, der inkorrekt aufgetrennt wurde und sich aus den Spots 2-4 der behandelten Fibroblasten (B) zusammensetzt). Die Behandlung der Fibroblasten mit NAC ohne Zugabe von rTGF β 1 zeigte keine Proteinoxidation.

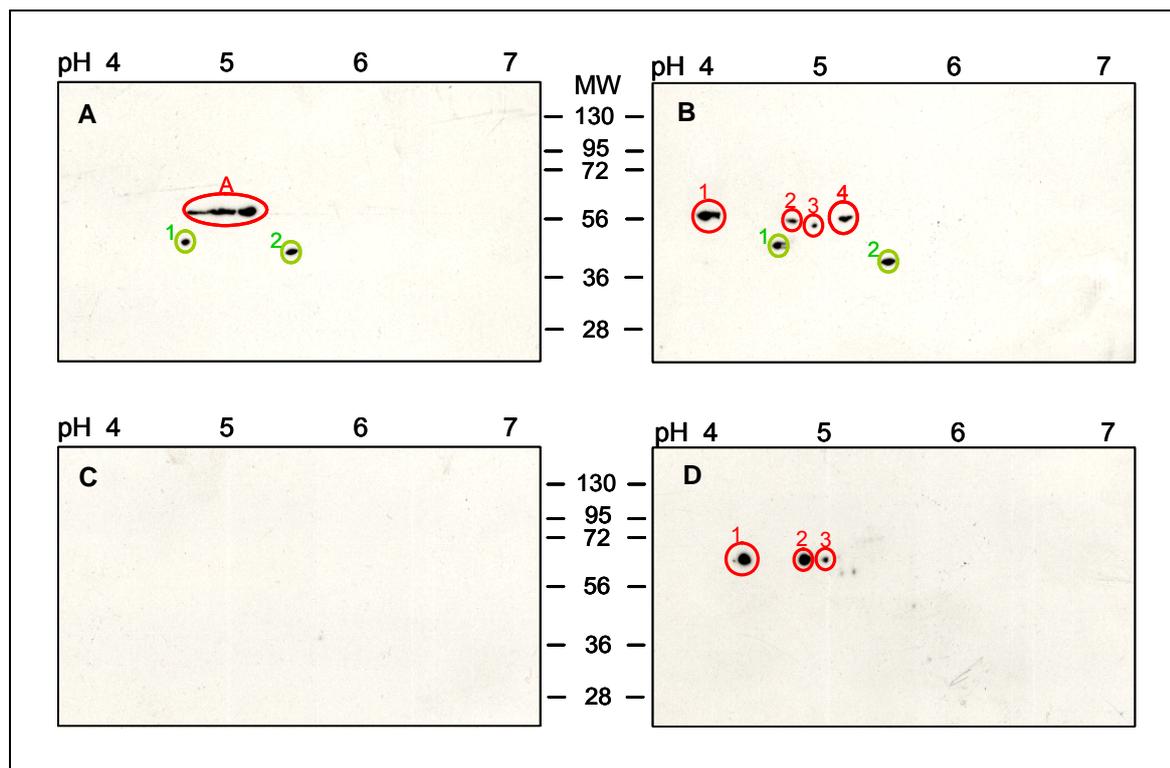


Abbildung 3.28: TGF β 1 oxidiert Proteine post-transkriptionell. Dargestellt sind die oxidierten Proteine von (A) unbehandelten Fibroblasten, (B) Fibroblasten, die für 12 h mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium behandelt wurden und Fibroblasten, die (C) entweder mit 5 mM NAC oder (D) in Kombination mit 10 ng/ml rTGF β 1 inkubiert wurden. Proteine, die sowohl in unbehandelten wie auch in rTGF β 1-behandelten Fibroblasten oxidiert waren, sind grün umkreist und Proteine, die nach rTGF β 1-Behandlung oxidiert waren, sind rot umkreist. In (A) unbehandelten Kontrollen stellt Spot A (rot umkreist) die Proteinspots 2-4 der behandelten Fibroblasten (B) dar. Es war davon auszugehen, dass sich die Proteine inkorrekt aufgetrennt hatten.

Fibroblasten, die im Vergleich zu rTGF β 1-behandelten Fibroblasten (Abbildung 3.29, B) mit dem NADH-Inhibitor Apocynin vorinkubiert und anschließend mit rTGF β 1 für 12 h behandelt wurden, zeigten nur ein oxidiertes Protein (rot 3, umkreist). Die Oxidierung von einem Protein durch rTGF β 1, dass möglicherweise in den Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten involviert ist, konnte mit dem Einsatz von Apocynin verhindert werden (Abbildung 3.29 D, Spot 1).

Fibroblasten, die zur Kontrolle ausschließlich mit Apocynin behandelt wurden, zeigten keinen Unterschied in der Anzahl der oxidierten Proteine im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten (Abbildung 3.29 A, C 1-2 grün umkreist).

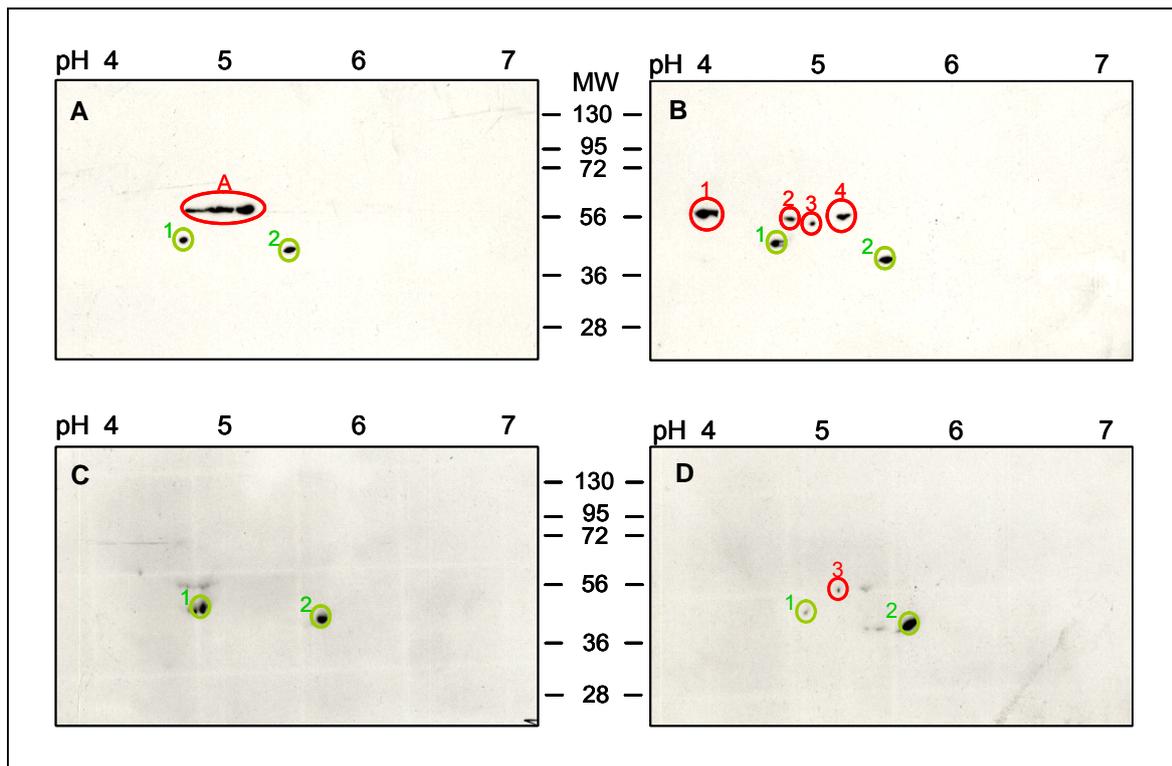


Abbildung 3.29: Die NADH-Oxidase ist für die post-transkriptionelle Oxidierung eines Proteins nach rTGFβ1-Stimulus verantwortlich. Gezeigt ist die Auftrennung der oxidierten Proteine nach 2D-Gelelektrophorese. Dargestellt sind oxidierte Proteine von (A) unbehandelten Fibroblasten, (B) Fibroblasten, die für 12 h mit 10 ng/ml rTGFβ1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium behandelt wurden und Fibroblasten, die (C) entweder mit 1 mM Apocynin für 1 h vorinkubiert oder (D) nach Vorinkubation mit 10 ng/ml rTGFβ1 behandelt wurden. Proteine, die sowohl in unbehandelten wie auch in rTGFβ1-behandelten Fibroblasten oxidiert waren, sind grün umkreist und Proteine, die nach rTGFβ1-Behandlung oxidiert waren, sind rot umkreist. In (A) unbehandelten Kontrollen stellt Spot A (rot umkreist) die Proteinspots 2-4 der behandelten Fibroblasten (B) dar. Es war davon auszugehen, dass sich die Proteine inkorrekt aufgetrennt hatten.

Eine Vorinkubation der Fibroblasten mit Selenit vor rTGFβ1-Behandlung verhinderte die Oxidierung von Proteinen durch rTGFβ1 vollständig (Abbildung 3.30, D). Auch Fibroblasten, die ausschließlich mit Selenit behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine oxidierten Proteine (Abbildung 3.30, C).

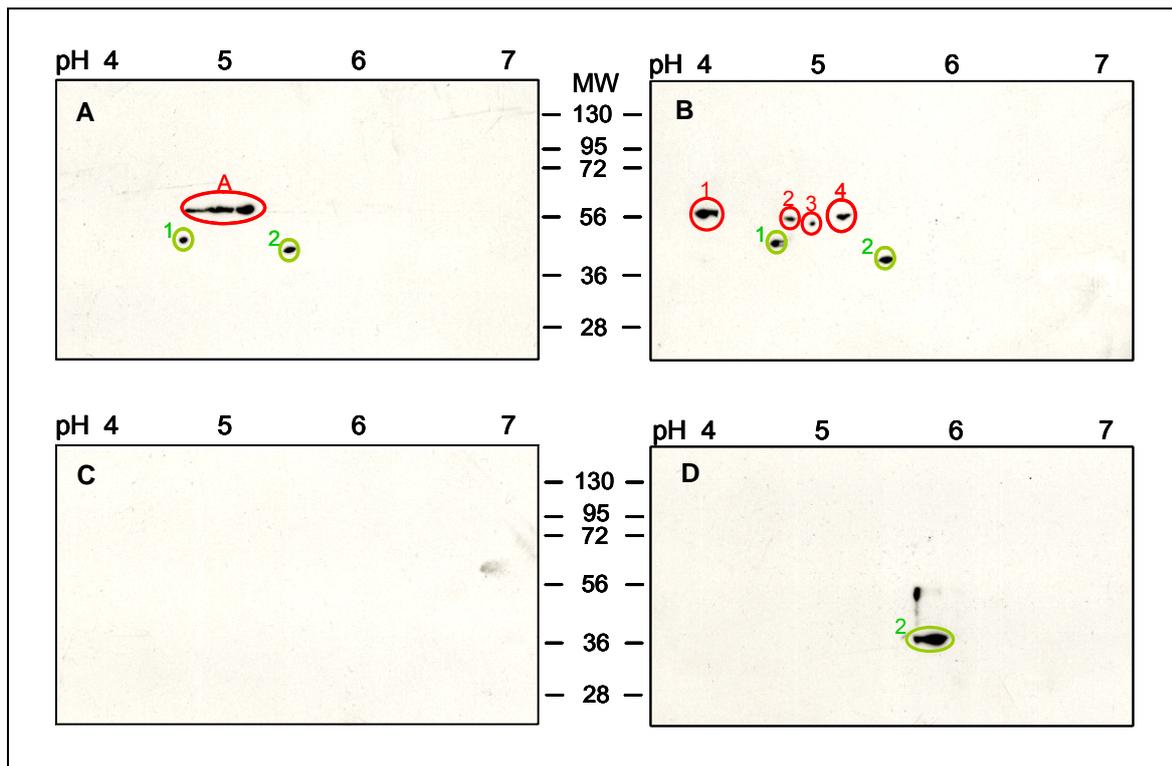


Abbildung 3.30: Selenit verhindert die post-transkriptionelle Oxidierung von Proteinen durch rTGF β 1. Gezeigt ist die Auftrennung der oxidierten Proteine nach 2D-Gelelektrophorese. Dargestellt sind oxidierte Proteine von (A) unbehandelten Fibroblasten, (B) Fibroblasten, die für 12 h mit 10 ng/ml rTGF β 1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium behandelt wurden und Fibroblasten, die (C) entweder mit 0,5 μ M Na₂SeO₃ für 24 h vorinkubiert oder (D) nach Vorinkubation mit 10 ng/ml rTGF β 1 behandelt wurden. Proteine, die sowohl in unbehandelten wie auch in rTGF β 1-behandelten Fibroblasten oxidiert waren, sind grün umkreist und Proteine, die nach rTGF β 1-Behandlung oxidiert waren, sind rot umkreist. In (A) unbehandelten Kontrollen stellt Spot A (rot umkreist) die Proteinspots 2-4 der behandelten Fibroblasten (B) dar. Es war davon auszugehen, dass sich die Proteine inkorrekt aufgetrennt hatten.

Abbildung 3.31 zeigt, dass das Vitamin E-Derivat Trolox die Fibroblasten vor Oxidierung von Proteinen durch rTGF β 1 schützt (D), da sowohl alle oxidierten Proteinspots der TGF β 1-behandelten Zellen (Abbildung 3.31, B, 2-4) als auch ein oxidiertes Protein, das möglicherweise wichtig für die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist, nach rTGF β 1-Behandlung (Abbildung 3.31, B, Spot 1, rot umkreist) bei einer Vorinkubation mit Trolox nicht mehr auftraten. Ausschließlich mit Trolox behandelte Zellen zeigten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen keine oxidierten Proteine.

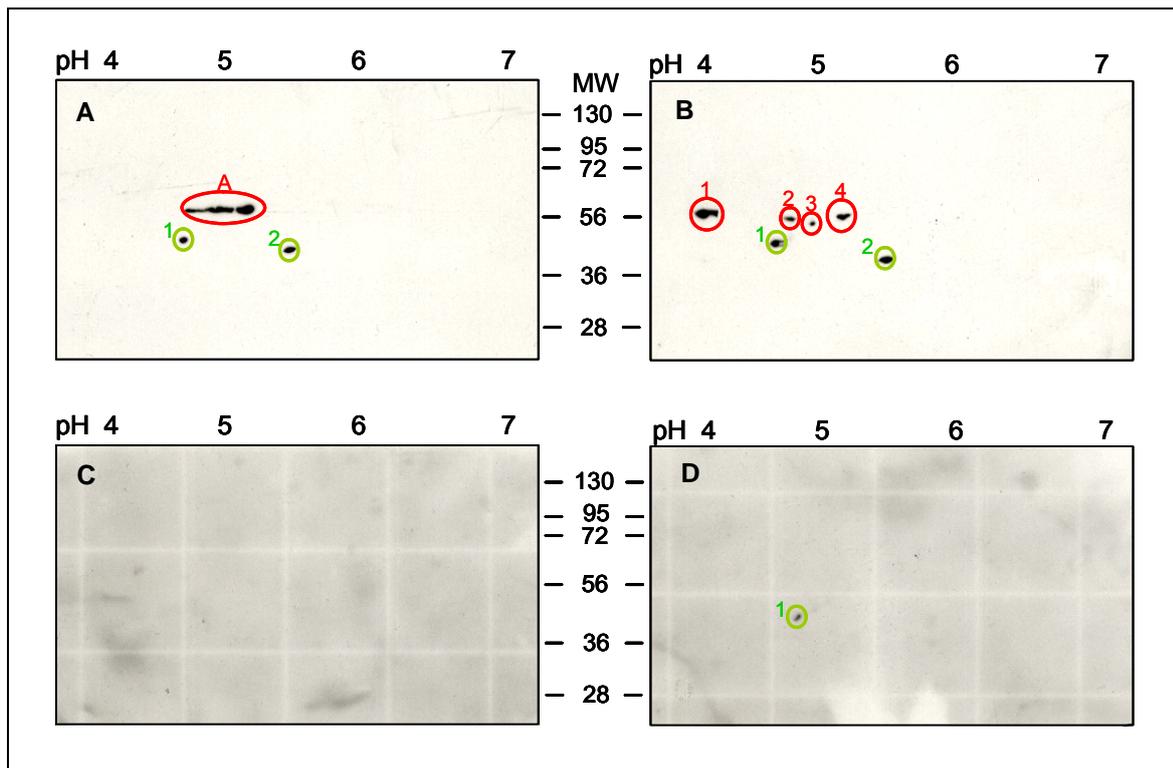


Abbildung 3.31: Lipidhydroperoxide sind an der Oxidierung von Proteinen durch rTGFβ1 beteiligt. Gezeigt sind oxidierte Proteine nach 2D-Gelelektrophorese. Dargestellt sind oxidierte Proteine von (A) unbehandelten Fibroblasten, (B) Fibroblasten, die für 12 h mit 10 ng/ml rTGFβ1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium behandelt wurden und Fibroblasten, die (C) entweder mit 50 μM Trolox für 24 h vorinkubiert oder (D) nach Vorinkubation mit 10 ng/ml rTGFβ1 behandelt wurden. Proteine, die sowohl in unbehandelten wie auch in rTGFβ1-behandelten Fibroblasten oxidiert waren, sind grün umkreist und Proteine, die nach rTGFβ1-Behandlung oxidiert waren, sind rot umkreist. In (A) unbehandelten Kontrollen stellt Spot A (rot umkreist) die Proteinspots 2-4 der behandelten Fibroblasten (B) dar. Es war davon auszugehen, dass sich die Proteine inkorrekt aufgetrennt hatten.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse schlussfolgern, dass ROS, die durch die NADH-Oxidase oder die Lipidoxidation generiert werden, Zielproteine, die für die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verantwortlich sind, erst nach der Transkription oxidieren.

Um artifizielle *in-vitro* Daten auszuschließen, wurde die Transdifferenzierung zusätzlich mit Hilfe von *in-vivo* Modellen untersucht.

3.8 TGFβ1-induzierte Transdifferenzierung in Dermis- und Hautäquivalenten: ein einfaches *in-vivo* Modell

Dreidimensionale Dermisäquivalente und Hautäquivalente, die wie die menschliche Haut *in vivo* aufgebaut sind [Schlotmann et al., 2001], wurden für Experimente eingesetzt, um zum einen artifizielle Ergebnisse aus der Monolayerkultur auszuschließen und zum anderen die bisherigen Ergebnisse in einer *in-vivo* ähnlichen Situation zu überprüfen. Myofibroblasten sind dadurch charakterisiert, dass sie in der Lage sind, Kollagengele (Dermisäquivalente) zu kontrahieren. *In-vivo* sind Myofibroblasten maßgeblich an der Wundkontraktion beteiligt. Eine Verkleinerung des Durchmessers in Dermisäquivalenten ist proportional zu der Erhöhung der Anzahl von Myofibroblasten [Arora und McCulloch, 1994].

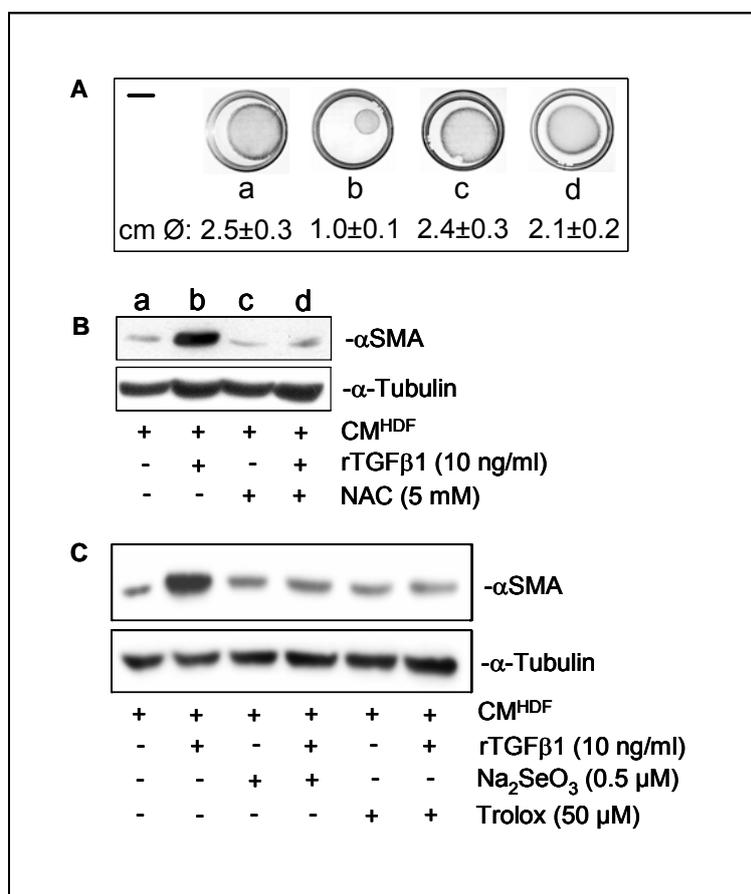


Abbildung 3.32: Antioxidantien verhindern die TGFβ1-vermittelte Transdifferenzierung von Fibroblasten in Dermisäquivalenten. Zwei Tage nach Einsäen der HDF in das Dermisäquivalent wurden diese mit 5 mM NAC, 0,5 μM Na₂SeO₃ oder 50 μM Trolox für 24 h vorinkubiert. Danach erfolgte die Behandlung mit 10 ng/ml rTGFβ1 für weitere 48 h. Entweder wurde der Durchmesser der Kollagengele gemessen (A) oder die Gele wurden mit Kollagenase (3mg/ml) aufgelöst und die αSMA-Expression der isolierten Fibroblasten mit Hilfe der Western Blot-Analyse (B, C) untersucht. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde zusätzlich gegen das α-Tubulin geblottet (B, C). Drei voneinander unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Balken, 1 cm.

Verglichen mit den Kollagengelen unbehandelter Fibroblasten (Abbildung 3.32 A, a) oder NAC-behandelter Fibroblasten (A, c), war eine signifikante Verkleinerung des Geldurchmessers von rTGF β 1-behandelten Fibroblasten (A, b) nach vier Tagen zu erkennen, was auf eine Erhöhung der Myofibroblastenzahl hindeutet. Fibroblasten, die vor rTGF β 1-Behandlung mit NAC vorinkubiert wurden, kontrahierten das Kollagengel nur gering im Gegensatz zu unbehandelten Fibroblasten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Expression von α SMA (Abbildung 3.32, B). Mit rTGF β 1-behandelte Fibroblasten in den Dermisäquivalenten zeigten im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten eine signifikante Erhöhung der α SMA-Expression. NAC-behandelte oder vor rTGF β 1-Behandlung mit NAC-vorinkubierte Fibroblasten in Dermisäquivalenten zeigten wie die unbehandelten Kontrollen keine α SMA-Expression. Diese Daten konnten durch den Einsatz der Antioxidantien Selenit und Trolox weiter bestätigt werden (Abbildung 3.32 C). Die in den Dermisäquivalenten befindlichen Fibroblasten, die entweder mit Selenit oder Trolox behandelt wurden, zeigten in der Western Blot-Analyse ebenso wie die unbehandelten Fibroblasten kein α SMA-Protein. rTGF β 1-behandelte Fibroblasten dagegen wiesen einen signifikanten Anstieg des α SMA-Proteins auf. Selenit und Trolox konnten die α SMA-Expression nach rTGF β 1-Zugabe vollständig verhindern.

Die Ergebnisse wurden zusätzlich durch den Einsatz von *in-vivo* Hautmodellen bestätigt. Paraffinschnitte von Hautäquivalenten wurden mit Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt (Abbildung 3.33). Die Hautäquivalente wurden außerdem entweder mit rTGF β 1 für 3 Tage behandelt oder mit NAC, Apocynin und Selenit für 4 Tage vorinkubiert (Abbildung 3.33). Nach rTGF β 1-Behandlung erhöhte sich die α SMA-Expression der in den Hautäquivalenten befindlichen Fibroblasten signifikant. Die Fibroblasten, die mit Apocynin oder Selenit behandelt wurden, zeigten eine Verringerung der α SMA-Expression um 60 – 80% im Vergleich zu Fibroblasten, die ausschließlich mit rTGF β 1 behandelt. NAC verhinderte die Erhöhung des α SMA-Proteins nach rTGF β 1-Behandlung um 50%, wobei die Behandlung der Fibroblasten mit NAC ohne rTGF β 1-Zugabe keine α SMA-Expression zeigte. Die Daten aus Abbildung 3.32 und 3.33 bestätigen die Ergebnisse aus den Fibroblasten-Monolayerkulturen, die zeigen, dass reaktive Sauerstoffspezies auch in der menschlichen Haut eine zentrale Rolle während der Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten spielen.

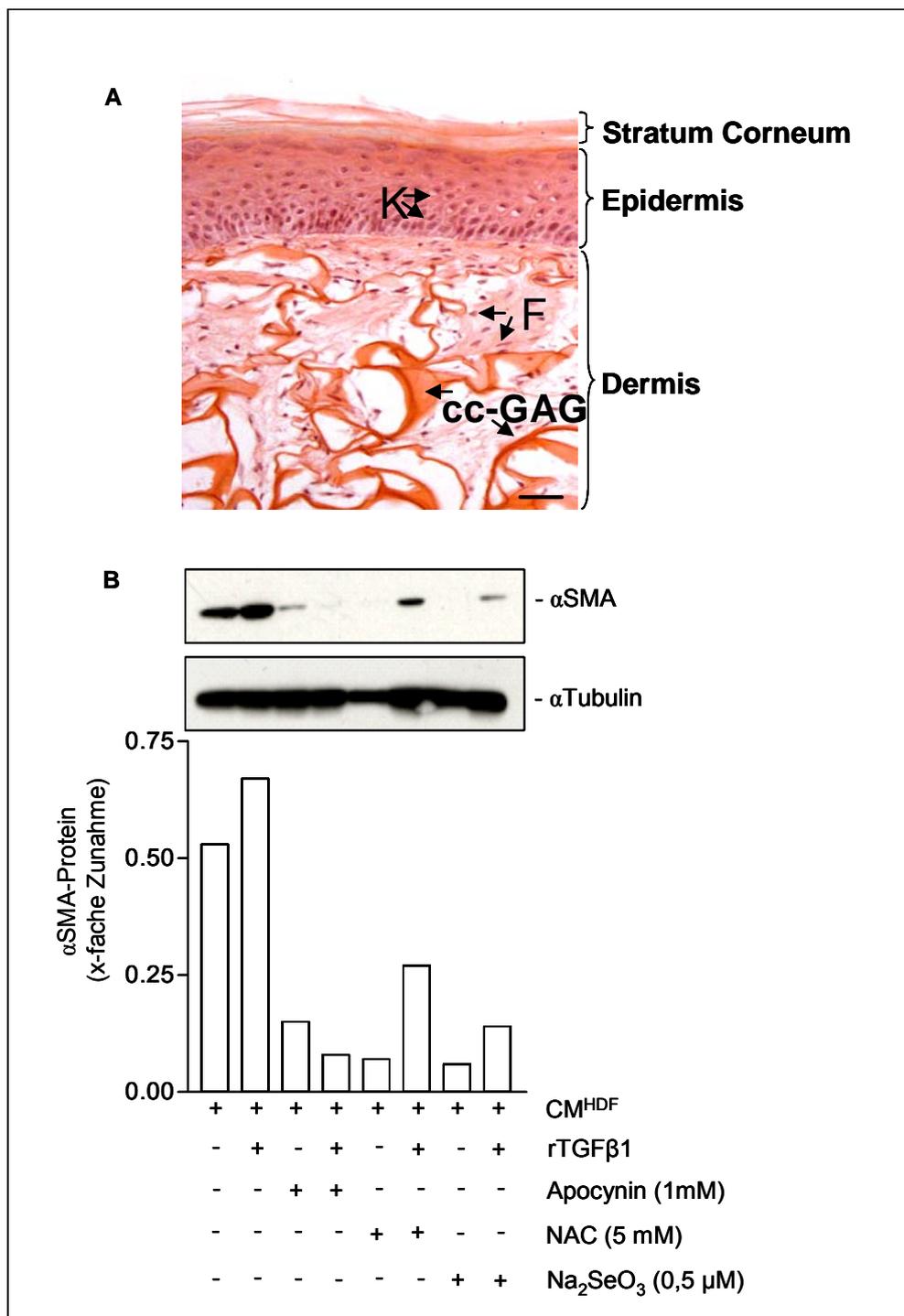


Abbildung 3.33: Antioxidantien verhindern die TGFβ1-vermittelte Transdifferenzierung von Fibroblasten in Hautäquivalenten. (A) Histologie des Hautäquivalents, cc-GAG, Kollagen-Chitosan-Glycosaminoglykan; F, Fibroblasten, K, Keratinozyten. Balken 1 μm. (B) Die Hautäquivalente wurden für 3 Tage mit 10 ng/ml rTGFβ1 in konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) behandelt oder vor rTGFβ1-Behandlung mit 5 mM NAC, 0,5 μM Na₂SeO₃ oder 1 mM Apocynin für 4 Tage vorinkubiert. Nach Dispase II-Behandlung (2,4 U/ml, 30 min bei 37°C) wurde die Dermis homogenisiert und das Lysat für die Western Blot-Analyse eingesetzt. Als Ladekontrolle diente das Protein α-Tubulin. Für die densitometrische Analyse des Western Blots wurde die x-fache Zunahme des αSMA-Proteins gegen unbehandelte Fibroblasten (CM^{HDF}) analysiert. Das Experiment wurde im Duplikat durchgeführt.

3.9 Myofibroblasten sind essentiell für die Invasionskapazität von Tumorzellen *in-vitro*

In Hinblick auf ihre Funktion spielen Myofibroblasten, die verstärkt an der Invasionsfront von Tumoren auftreten [de Wever und Mareel, 2002], eine zentrale Rolle während der Metastasierung. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die Verhinderung der Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten durch den Einsatz von Antioxidantien einen Effekt auf die Invasion von SCL-1-Zellen ausübt.

Dafür wurden subkonfluente Hautfibroblasten entweder mit konditioniertem Fibroblasten-Medium (CM^{HDF}) als Kontrolle, mit rTGF β 1 alleine (CM^{MF} ; MF, Myofibroblast) oder in Kombination mit NAC ($CM^{MF(NAC)}$), Selenit ($CM^{MF(Na_2SeO_3)}$) oder Trolox ($CM^{MF(Trolox)}$) für 48 h behandelt. Das Medium wurde gegen serum- und antioxidantienfreies Medium ausgetauscht und der Überstand nach weiteren 48 h gesammelt und für die Invasionsassays eingesetzt (Abbildung 3.34).

Die zu der Unterseite der Inserts gewanderten SCL-1-Zellen (gestrichelt umrandet in Abbildung 3.34) wurden für die quantitative Auswertung des Invasionsassays angefärbt. Dabei wurde beobachtet, dass die Zellen in Zell-Clustern durch die Matrigel-beschichtete Membran invadierten, eine Beobachtung, die auch für Brust- oder Darmkarzinome *in vivo* beschrieben wurde [Nabeshima et al., 1999; Sahai, 2005].

Der gesammelte Überstand von Myofibroblasten (CM^{MF}) verstärkte die Invasionskapazität von SCL-1-Zellen im Gegensatz zu Fibroblasten-Überstand (CM^{HDF}) um das 4-Fache. Der SCL-1-Überstand (CM^{SCL}) zeigte den geringsten chemoattraktiven Effekt auf die SCL1-Zellen. Die Inkubation von Zellen mit den Antioxidantien NAC ($CM^{MF(NAC)}$), Selenit ($CM^{MF(Na_2SeO_3)}$) oder Trolox ($CM^{MF(Trolox)}$) führte zu einer Erniedrigung der Invasion der Tumorzellen um 90% im Vergleich mit CM^{MF} , welches die Notwendigkeit der reaktiven Sauerstoffspezies während der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und die damit verbundene Verstärkung der Invasion von Tumorzellen widerspiegelt.

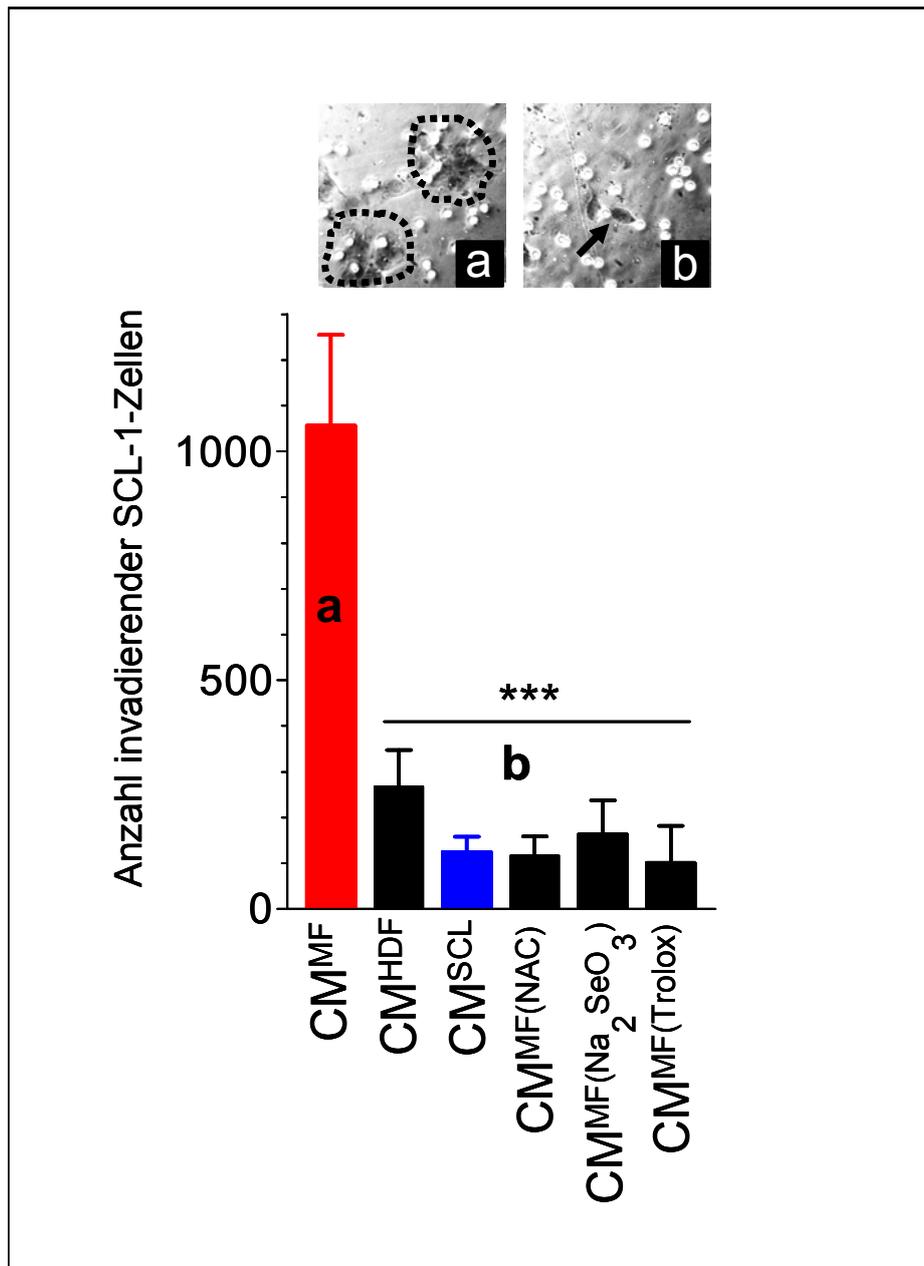


Abbildung 3.34: Die Verhinderung der Transdifferenzierung erniedrigt die Invasionskapazität von Tumorzellen. Subkonfluente HDFs wurden vor Behandlung mit 10 ng/ml rTGF β 1 mit 5 mM NAC (CM^{MF(NAC)}), 0,5 μ M Na₂SeO₃ (CM^{MF(Na₂SeO₃)}) oder 50 μ M Trolox (CM^{MF(Trolox)}) vorinkubiert. Das Medium wurde anschließend gegen serumfreies Medium ausgetauscht und der Überstand der behandelten HDFs über 48 h gesammelt und als Chemoattraktant für die SCL-1 Zellen für den Invasionsassay eingesetzt. Die Anzahl der invadierten SCL-1-Zellen durch die Matrigel-beschichtete Membran des Inserts wurde nach 72 h untersucht. Das Ergebnis zeigt fünf unabhängig voneinander durchgeführte Assays. Die durch die Membran invadierten Zellen wurden Coomassie-gefärbt (a,b, gestrichelt umrandete Zellen) und ausgezählt. *** $P < 0,001$ gegen CM^{MF} (ANOVA, Dunnett's Test).

Aufgrund der Beobachtung, dass Myofibroblasten für die Invasion von Tumorzellen unerlässlich sind, stellte sich die Frage, welche löslichen parakrinen Faktoren der Myofibroblasten die Invasionskapazität der Tumorzellen erhöhen. Dafür wurden Überstände von Fibroblasten gegen Überstände von Myofibroblasten mittels Proteinarrays verglichen.

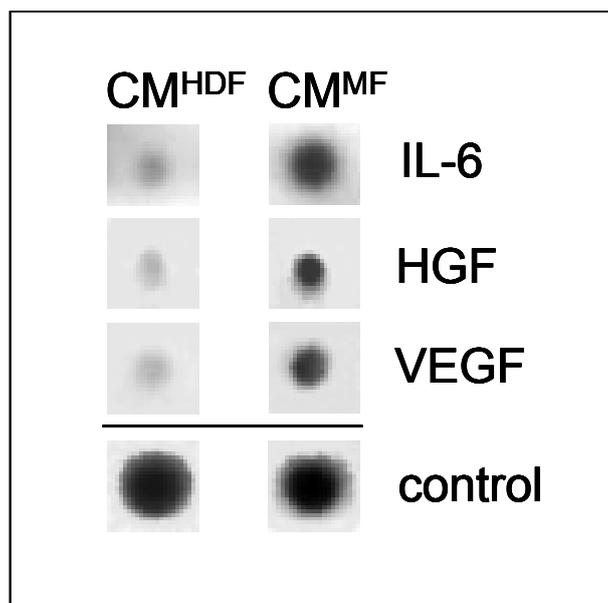


Abbildung 3.35: Erhöhte Expression von IL-6, HGF und VEGF in Myofibroblasten. Überstände von Myofibroblasten (CM^{MF}) wurden gegen Überstände von HDFs (CM^{HDF}), die über 48 h gesammelt wurden, verglichen. TIMP-1 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1) diente als Kontrollprotein in dem Array. Die Daten repräsentieren drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Überstände von Myofibroblasten (CM^{MF}) zeigten im Gegensatz zu Fibroblasten-Überständen (CM^{HDF}) erhöhte Proteinmengen von Interleukin-6 (IL-6), dem Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) und dem vaskularisierenden endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF; Abbildung 3.35).

Die Erhöhung dieser Wachstumsfaktoren wurde durch ELISA assays quantifiziert und ist als x-fache Zunahme (Abbildung 3.36) dargestellt. VEGF in Myofibroblasten-Überständen war im Vergleich zu Überständen von Fibroblasten um das 3-Fache, HGF um das 13-Fache und IL-6 um das 4,5-Fache erhöht. Die Vorinkubation der Zellen mit den Antioxidantien NAC, Selenit und Trolox verhinderte die Expression der Wachstumsfaktoren vollständig.

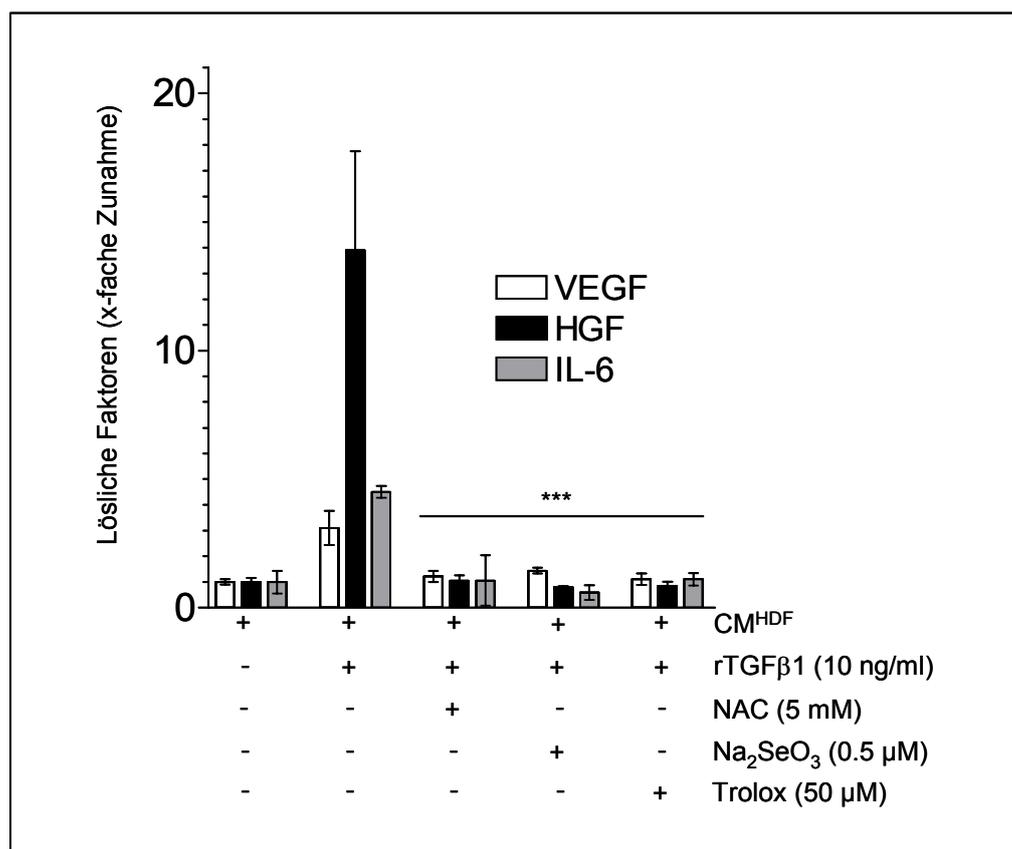


Abbildung 3.36: Verhinderung der Expression von IL-6, HGF und VEGF durch Antioxidantien. Subkonfluente HDFs wurden entweder mit 5 mM NAC für 4 h oder mit 0,5 μM Na₂SeO₃ oder 50 μM Trolox für 24 h vor Behandlung mit 10 ng/ml rTGFβ1 vorinkubiert. Das Antioxidantien- und rTGFβ1-haltige Medium wurde gegen serumfreies Medium ausgetauscht und der Überstand für 48 h gesammelt und für die ELISA gegen IL-6, HGF und VEGF eingesetzt. *** $P < 0,001$ gegen unbehandelte CM^{MF} (ANOVA, Dunnett's Test).

Myofibroblasten sezernieren verschiedene Zytokine, Chemokine und inflammatorische Mediatoren, die in Kombination die Invasion der Tumorzellen beeinflussen [de Wever und Mareel, 2003]. Um die Wichtigkeit von IL-6, HGF und VEGF, die durch Myofibroblasten sezerniert werden (Abbildung 3.36), für die Invasionskapazität von Tumorzellen zu untersuchen, wurden neutralisierende Antikörper gegen diese Wachstumsfaktoren entweder einzeln oder in Kombination in die Überstände von Myofibroblasten gegeben und die Chemoattraktivität dieser Überstände auf SCL-1-Zellen im Invasionsassay überprüft (Abbildung 3.37).

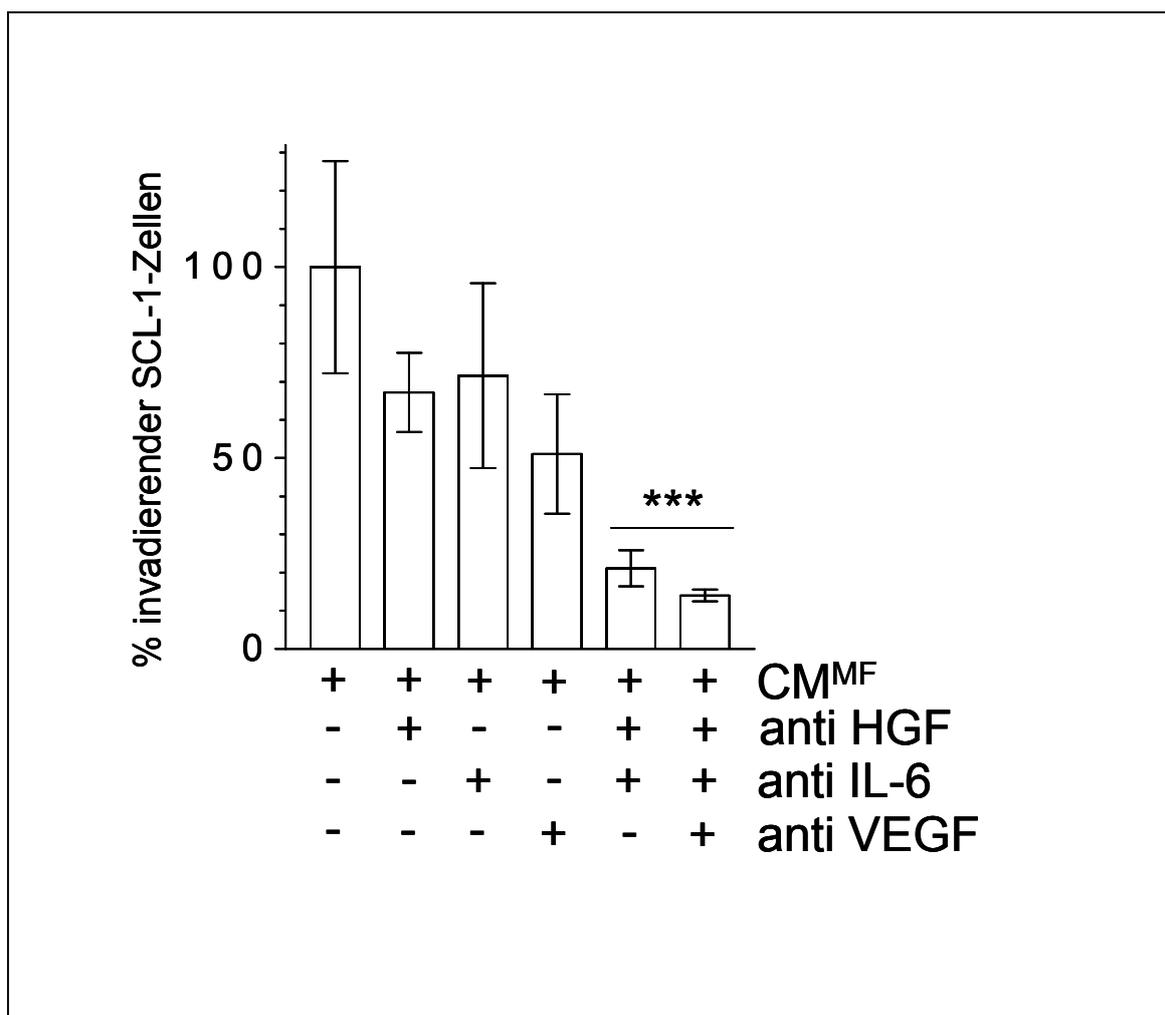


Abbildung 3.37: IL-6, HGF und VEGF fördern Tumorinvasion. Myofibroblasten-Überstände (CM^{MF}) wurden mit 5 µg/ml eines neutralisierenden Antikörpers gegen IL-6, HGF und VEGF einzeln oder in Kombination behandelt und die Chemoattraktivität dieser Überstände auf die Invasionskapazität von SCL-1 im Invasionsassay untersucht. Unbehandelte Überstände von Myofibroblasten dienten als Positivkontrolle und wurden auf 100 % gesetzt. Es wurden drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente ausgewertet. *** $P < 0,01$ gegen unbehandelte CM^{MF} (ANOVA, Dunnett's Test).

Die Einzelbehandlung mit den neutralisierenden Antikörpern hatte einen geringen Effekt auf die Invasionskapazität der SCL-1. Dagegen erniedrigte die Behandlung mit einer Kombination der Antikörper für IL-6 und HGF oder aller drei Wachstumsfaktoren die Invasion der Tumorzellen signifikant um 79% oder 86%.

3.10 Invasion von SCL-1 Zellen in Hautäquivalenten

Da das Invasionsmodell nur näherungsweise die *in-vivo* Situation widerspiegelt, wurden in erster Annäherung an ein *in-vitro* Tumor-Haut-Modell Experimente durchgeführt. Dafür wurden SCL-1-Tumorzellen in Hautäquivalente eingesetzt und deren Verhalten/Invasion durch die Epidermis über zehn Tage beobachtet.

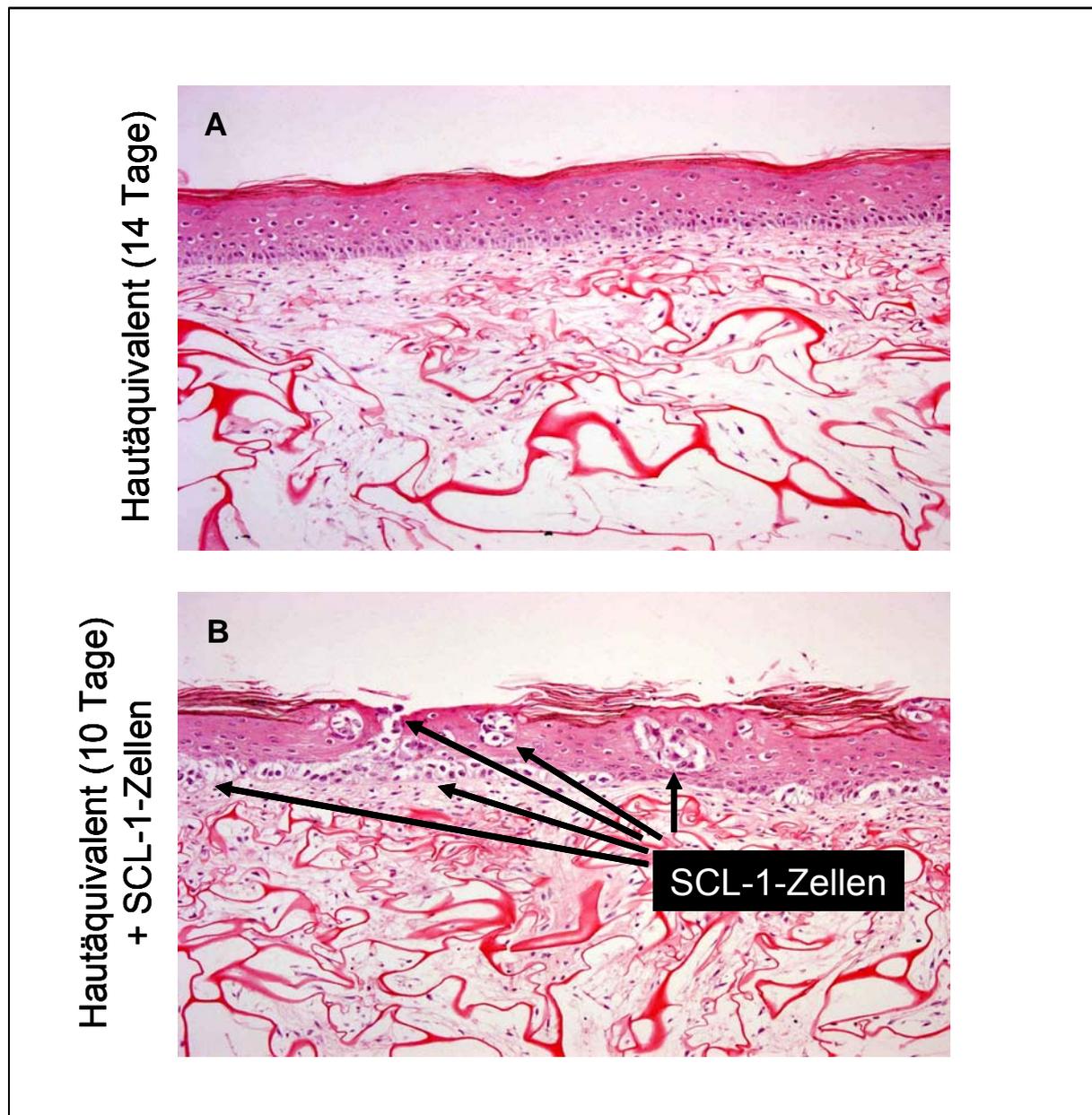


Abbildung 3.38: Invasion von Tumorzellen in Hautäquivalenten. (A) Unbehandelte Hautäquivalente. (B) 1×10^4 SCL-1-Zellen wurden in die Hautäquivalente eingesetzt. Nach 10 Tagen wurden Paraffin-Schnitte der Äquivalente mit Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Schwarze Pfeile zeigen Tumor-Zell-Cluster in der Epidermis.

Die Hematoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Schnitte aus Abbildung 3.38 zeigen unbehandelte Hautäquivalente und Hautäquivalente, in die SCL-1-Zellen eingesät wurden. Nach 10 Tagen war eine SCL-1-Zell-Cluster-Bildung in der Epidermis der Hautäquivalente zu erkennen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Tumorzell-Cluster die Epidermis ebenfalls nach außen hin durchstoßen und so die Hautstruktur zerstören. Dies ist ein Verhalten von Hauttumoren, das in *in-vivo* häufig beobachtet wird.

Außerdem wurde beobachtet, dass die SCL-1 Zellen bereits bis zur Basallamina migriert waren, was auf eine Invasion der Tumorzellen in die Dermis vermuten lässt. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die Schnitte der Hautäquivalente mit SCL-1 zusätzlich gegen β 1-Intergrin, einem Marker der an der Basallamina liegenden Keratinozyten, gefärbt.

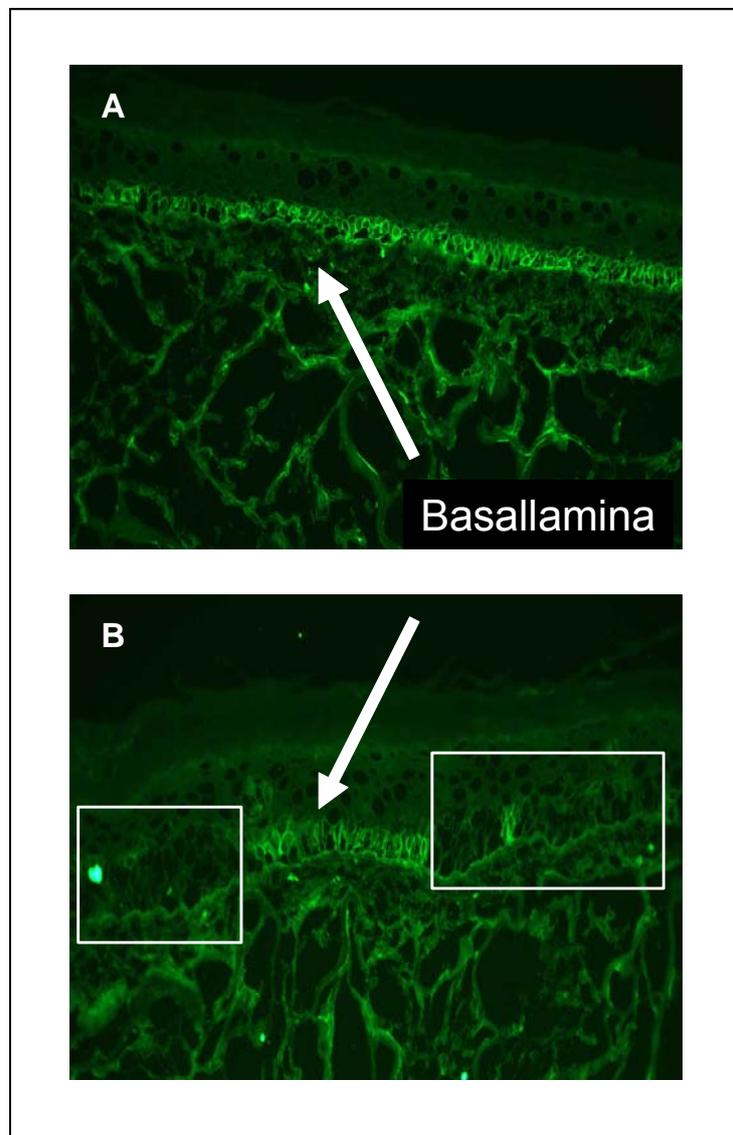


Abbildung 3.39: Invasion von Tumorzellen in Hautäquivalenten. (A) Unbehandelte Hautäquivalente. (B) 1×10^4 SCL-1-Zellen wurden auf die Hautäquivalente gesät. Nach 10 Tagen wurden Kryo-Schnitte der Äquivalente mit β 1-Integrin immunzytochemisch gefärbt.

Die $\beta 1$ -Intergrin-Färbung der unbehandelten Hautäquivalente (Abbildung 3.39 A) zeigte eine intakte Basallamina. Die Basallamina der Hautäquivalente, auf die SCL-1-Zellen gesät wurden, war nach 10 Tagen stark geschädigt (Abbildung 3.39, B, weiße Rahmen), was sich in einer unregelmäßigen Färbung des $\beta 1$ -Integrins äußerte. Diese unregelmäßige Färbung deutete auf einen Durchbruch der Basallamina durch die SCL-1-Zellen und somit eine Invasion in Richtung Dermis hin.

4. Diskussion

Der mehrstufige Prozess der Karzinogenese ist das Resultat einer gestörten zellulären Homöostase als Folge zahlreicher genetischer und epigenetischer Veränderungen. Dies führt zu Hyperproliferation und dem Verlust der terminalen Differenzierung [Yuspa, 1998]. Tumorzellen entgehen der Wachstumskontrolle und einer durch stromale Zellen initiierte Apoptose, indem sie durch Sezernierung des transformierenden Wachstumsfaktors TGF β 1 die Schließung der *gap junctions* stromaler Zellen bewirken [Stuhlmann et al., 2004; Trosko und Ruch, 1998].

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt im Vergleich zu anderen Studien auf der Progression des Tumors und nicht auf der Tumorinitiation und –promotion. Der entscheidende Schritt während der Tumorprogression ist die Invasion und die damit verbundene Tumor-Stroma-Interaktion. Ein Tumor wird als maligner Tumor bezeichnet, wenn Tumorzellen beginnen, den Primärtumor zu verlassen und in andere Gewebe zu invadieren, um Sekundärtumore/Metastasen zu bilden. Während der Invasion verändern Tumorzellen ihre stromale Umgebung derart, dass das Stroma eine für die Tumorzellen hilfreiche und die Invasion unterstützende Funktion übernimmt. Dazu stimulieren Tumorzellen stromale Zellen kontinuierlich, um die physiologische Invasion weiterzuführen [Liotta und Kohn, 2001]. Die Invasion von Tumorzellen im Bindegewebe der Haut wird wesentlich durch Fibroblasten beeinflusst [De Wever und Mareel, 2003, Cat et al., 2006]. Das Augenmerk der Medizin wird sich zunehmend in Richtung Hautkrebs orientieren müssen, da es aufgrund des sich vergrößernden atmosphärischen Ozonlochs und der damit einhergehenden erhöhten UV-Exposition vermehrt zur Bildung von Hauttumoren kommen wird [De Gruij et al., 2003; Diffey, 2004]. Erhöhte UVB-Strahlung kann zu zahlreichen biochemischen Veränderungen in der Zelle führen. So kommt es als Reaktion auf ultraviolettes Licht u.a. zu einer Regulierung bestimmter Gene, die für Signaltransduktion, Regulierung von Antioxidantien, Zellzykluskontrolle und Zerstörung des dermalen Bindegewebes der Haut verantwortlich sind [Brenneisen et al., 2002].

In der hier vorliegenden Doktorarbeit zur Tumor-Stroma-Interaktion wurde ein *in-vitro* Tumor-Stroma-Modell unter Verwendung von Ko- und Monolayerkulturen, Dermis- und Ganzhautmodellen aus der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL-1 und humanen dermalen Fibroblasten etabliert. Das Kokultur-Monolayermodell repräsentiert etwas vereinfacht die *in-*

vivo Situation eines Plattenepithelkarzinoms [Detmar, 2000] und ermöglicht die Untersuchung des Einflusses von Tumorzellen epithelialen Ursprungs auf dermale Fibroblasten.

In den Kokulturen formierten sich, wie auch *in-vivo* gezeigt [Blaudschun et al, 2002] Tumorzell-Cluster, die von Fibroblasten umwachsen wurden. Dieses Phänomen wurde auch in den Ganzhautmodellen beobachtet, welche die oberen Hautschichten Stratum Corneum, Epidermis und Dermis beinhalten und die darin eingesäten Zellen in ihrem physiologischen Umfeld zeigen. Die Tumorzellen migrierten in diesem Modell ebenfalls in Clustern durch die Epidermis in Richtung Dermis (Abbildung 3.38). Diese Modelle sind der menschlichen Haut in ihrem Aufbau am Ähnlichsten.

4.1 Parakrin wirkendes TGF β 1 induziert die Transdifferenzierung von dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Hypothese, dass Interaktionen der Tumorzellen mit dermalen Fibroblasten zu einer Veränderung und Schwächung des Stromas gegenüber dem Tumor führen. Tumorzellen können in Folge dessen leichter migrieren und in tiefere Hautschichten invadieren.

Der Transdifferenzierungsprozess beschreibt die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die beispielsweise durch Wachstumsfaktoren wie TGF β 1 oder PDGF induziert wird [Gotzmann et al., 2006]. In dieser Arbeit ist die Transdifferenzierung von dermalen Fibroblasten durch mesenchymal-mesenchymale Transition (MMT) charakterisiert, die in der Formation von Myofibroblasten resultiert und abhängig von parakrinem TGF β 1 und ROS ist. Stromale Fibroblasten transdifferenzieren zu Myofibroblasten, die verstärkt an der Invasionsfront von Tumorzellen auftreten [De Wever und Mareel, 2002]. Myofibroblasten werden histologisch von Fibroblasten hauptsächlich durch deren erhöhte Expression des Proteins α SMA unterschieden. Der Transdifferenzierungsprozess geht mit erhöhter Proliferation, erhöhter Kollagensynthese und einer scheinbar erniedrigten Motilität einher [Serini und Gabbiani, 1999]. Zudem werden eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine, wie auch EZM-Proteine und Proteasen verstärkt exprimiert [Powell et al., 1999].

Da schon gezeigt werden konnte, dass der transformierende Wachstumsfaktor TGF β 1 das Schließen der *gap junctions* und damit eine gestörte Zell-Zell-Kommunikation bewirkt [Stuhlmann et al., 2004], wurde die Frage untersucht, ob dieser parakrin wirkende

Wachstumsfaktor auch für die Tumor-vermittelte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verantwortlich ist. Ferner galt das Interesse der Hypothese, dass die gebildeten Myofibroblasten einen wichtigen Beitrag zur Invasion von Tumorzellen leisten.

Es wurde in dieser Arbeit bestätigt, dass stromale Zellen, die sich in der Nähe von Tumorzellen befanden, vermehrt transdifferenzierten (Abbildung 3.1). Die Bildung von Myofibroblasten wurde bei Prostatakrebs in Zusammenhang mit der Degradation der extrazellulären Matrix und der Invasion von Tumorzellen beobachtet [Tuxhorn et al., 2002]. Mit Hilfe der Western Blot-Analyse und immunzytochemischen Untersuchungen konnte auch in unserem Modell gezeigt werden, dass dermale Fibroblasten, die den löslichen Faktoren des Überstandes von Tumorzellen ausgesetzt waren, zu Myofibroblasten transdifferenzierten (Abbildung 3.2). Zusätzlich wurde durch den Einsatz von rekombinantem TGF β 1 bewiesen, dass der transformierende Wachstumsfaktor die Transdifferenzierung von dermalen Fibroblasten induziert. Dieses Ergebnis wird durch die Studie von Ronnov-Jessen und Petersen [Ronnov-Jessen und Petersen, 1993] unterstützt, welche beschreibt, dass Fibroblasten aus humanem Drüsengewebe der Brust *in-vitro* durch Einwirkung des Wachstumsfaktors TGF β 1 zu Myofibroblasten transdifferenzieren. Myofibroblasten treten auch an der Invasionsfront von Darmkrebszellen auf [Miura et al., 1993; Nakayama et al., 1998]. In Lebermetastasen des Darmkrebses sind die an den Tumor angrenzenden Zellen vorwiegend α SMA-positiv [Schürch et al., 1981; Olaso et al., 1997].

4.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermitteln die TGF β 1-induzierte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten

Oxidativer Stress beschreibt einen Zustand, indem das Gleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien zu Gunsten der Prooxidantien verschoben ist. Ein Zellsystem unter *oxidativem Stress* verliert die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies zu neutralisieren und zu eliminieren [Sies und Cadenas, 1985]. Wenn der intrazelluläre Gehalt an ROS nicht mehr reguliert werden kann, führt dies zu Schädigungen zellulärer Lipide, Proteine, DNA und zur Beeinträchtigung von Signaltransduktionswegen und anderer zellulärer Funktionen [Sies, 1986]. Aufgrund dieser Schädigungen wird *Oxidativer Stress* auch mit humanen Erkrankungen, wie kardiovaskulären und neurodegenerativen Krankheiten, Krebs und dem Alterungsprozess, in Verbindung gebracht [Sies, 1991]. ROS können während zellulärer Stoffwechselprozesse, primär in den Mitochondrien, als Nebenprodukte gebildet werden.

Einige Studien beschreiben die Wachstumsfaktor-/Zytokin-vermittelte Bildung von ROS während physiologischer Signalkaskaden durch membranlokalisierte Oxidasen, wie zum Beispiel die NADPH-Oxidase, in phagozytotischen und in nicht-phagozytotischen Zellen [Jones et al., 1994; Hiran et al., 1997; Bayraktutan et al., 1998]. Zytokine und Wachstumsfaktoren generieren in nicht-phagozytotischen Zellen ROS, die sowohl Zielstrukturen während der Signalkaskade als auch Transkriptionsfaktoren modifizieren [Finkel, 1998; Thannickal und Fanburg, 2000]. Der Wachstumsfaktor TGF β 1 stimuliert die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in verschiedenen Zelltypen [Kayanoki et al., 1994; Sanchez et al., 1996; Islam et al., 1997], und kann die Expression von enzymatischen Antioxidantien in einigen Zelltypen durch Modifikation redox-sensitiver Aminosäuren wie dem Cystein hemmen [Kayanoki et al., 1994; Islam et al., 1997; Herrlich und Bohmer, 2000; Jacob et al., 2003]. Die hier vorliegende Arbeit zeigt eine TGF β 1-initiierte und ROS-abhängige Transdifferenzierung dermaler Fibroblasten zu Myofibroblasten. Eine mesenchymal-mesenchymale Transition von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch parakrin wirkendes und die Generierung von ROS initiiierendes TGF β 1 wurde bisher nur im Rahmen dieser Arbeit beschrieben [Cat et al., 2006].

4.3 Antioxidantien unterbinden die durch die mesenchymal-mesenchymale Transition verstärkte Tumorprogression

Reaktionen zwischen ROS und biologischen Strukturen, aber auch unkontrollierter ROS-Produktion können durch natürliche oder synthetische Antioxidantien vorgebeugt werden. Mikronährstoffe wie Selen oder Zink, die wichtige Bestandteile protektiver Enzyme durch spezielle Aminosäuren (zum Beispiel Selenocystein oder Selenomethionin) oder strukturelle Komponenten (zum Beispiel Zinkfinger oder Zinkmetallthionin), darstellen [Klotz et al., 2003] zählen ebenfalls zu den antioxidativ wirkenden Substanzen. Diese Moleküle wirken während der enzymatischen Verteidigung durch die Superoxid-Dismutase, Katalase, Thioredoxin-Reduktasen und Glutathion-Peroxidasen mit [Sies, 1997].

4.3.1 NAC verhindert die MMT von Fibroblasten

N-Acetylcystein (NAC) ist ein synthetisches zellpermeables Antioxidans, das in der Zelle zu Cystein hydrolysiert wird und die GSH-Synthese vorantreibt. An verschiedenen Tiermodellen wurde bereits beschrieben, dass NAC protektive Effekte gegen Lungen-Krankheiten besitzt [Cotgreave, 1996]. Sowohl nicht-enzymatische Antioxidantien wie NAC und Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat, als auch Selenit, als Komponente enzymatischer Antioxidantien wie der Glutathion-Peroxidase, konnten in dieser Arbeit der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten in Gegenwart von TGF β 1 entgegenwirken (Abbildung 3.8). Dies führt zu dem Schluss, dass das von den Tumorzellen sezernierte TGF β 1 die zelleigene Kontrolle des intrazellulären ROS-Gehaltes durch enzymatische Antioxidantien in dermalen Fibroblasten ausschaltet. Dieser Effekt zugunsten prooxidativer Effekte scheint mit der MMT der Fibroblasten korreliert zu sein, da durch den Einsatz von exogenen Antioxidantien die Bildung von Myofibroblasten verhindert werden konnte.

4.3.2 TGF β 1 initiiert Lipidperoxidation in dermalen Fibroblasten

Die biochemische Umsetzung von Sauerstoff zu Wasser läuft über mehrere Zwischenstufen wie Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), dem Produkt der Ein-Elektronen-Reduktion des Sauerstoffs und des Hydroxylradikals (HO^{\cdot}), das durch Spaltung von H_2O_2 entsteht. Beides sind hochreaktive Spezies, die die Lipidperoxidation, bei der Lipidhydroperoxide entstehen, vorantreiben. Malondialdehyd (MDA), ein ungesättigtes Hydroxylaldehyd, ist eines von mehreren möglichen Endprodukten der Lipidperoxidation, das aus Lipidhydroperoxiden entsteht. Ein weiteres Endprodukt der Lipidperoxidation ist das 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE), das bei der Oxidation der Arachidonsäure entsteht. 4-HNE ist u.a. in der Lage, die Protein- und DNA-Synthese zu inhibieren, Enzyme zu inaktivieren, die interzelluläre Kommunikation durch *gap junctions* zu verhindern, aber auch die Migration von Zellen zu beeinflussen [Uchida et al., 1999]. Die Endprodukte der Lipidperoxidation können stabile Addukte mit nukleophilen Aminosäuren wie dem Cystein, Histidin und dem Lysin von Rezeptoren bilden und Moleküle der Signalkaskade, aber auch Transkriptionsfaktoren modifizieren [Petersen und Doorn, 2004]. Eine 4-HNE-abhängige Verstärkung der Apoptose durch TGF β 1 wurde in Darmkrebszellen festgestellt [Zanetti et al., 2003]. Intrazellulär gebildete ROS treiben den

Peroxidationsprozess voran, der zur Produktion von Lipidhydroperoxiden führt [Polte und Tyrell, 2003]. Die Stimulation von Lungenfibroblasten mit TGF β 1 führt zu einer schnellen ROS-Produktion, die wiederum einen Ca²⁺-Einstrom, die Aktivierung der MAPK und die phosphorylierungsabhängige AP-1-Aktivierung vorantreibt [Junn et al., 2000].

Eine Vielzahl natürlich vorkommender Antioxidantien-Systeme schützt die Lipidmoleküle der Zellmembranen vor oxidativer Zerstörung. Darunter stellt Vitamin E, ein Reduktionsmittel, eines der Wichtigsten dar. Die schützenden Eigenschaften des Vitamin E beruhen auf seiner Fähigkeit, die Lipidoxidation durch Reduktion radikalischer Zwischenprodukte zu unterbrechen. Dabei wird es zu einem α -Tocopheroxy-Radikal oxidiert, das aufgrund extensiver Delokalisierung und der sterischen Hinderung der Methylsubstituenten relativ reaktionsträge ist [Vollhardt, 2000]. Das wasserlösliche Trolox, ein Vitamin E-Derivat, verhindert die Lipidperoxidation von Zellen direkt [Gavino et al., 1981], indem es radikalische Zwischenprodukte der Lipidperoxidation reduziert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Trolox die Expression von α SMA weitgehend verhindern konnte, was zu dem Entschluss führt, dass die Lipidperoxidation eine wichtige Rolle während der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten in der Nähe von Tumoren spielt. Es konnte gezeigt werden, dass ein TGF β 1-Stimulus zu einer erhöhten Produktion von Lipidhydroperoxiden und konjugierten Dienen führte (Abbildung 3.11, 3.12), welches die Tatsache, dass TGF β 1 ebenfalls durch Erhöhung der Lipidperoxidation die Kollagensynthese vorantreibt, bestätigt [Geesin et al., 1991]. Auch die Expression von Matrix-Metalloproteinasen, die zu der Gruppe der Late-responsive-genes gehören, wie das α SMA auch, wird durch Lipidperoxidation induziert [Brenneisen et al., 1998].

4.3.3 Selen als Schutz gegen ROS und Tumorprogression

Selen ist ein essentielles Element, das von Menschen hauptsächlich über die Nahrung, wie beispielsweise Cerealien oder Fleisch, aufgenommen wird. Komplexe Kaskaden wandeln anorganische Selenkomponenten wie Selenat oder Selenit in organische Formen um, was enzymatisch katalysiert wird [Ip 1998]. Hydrogenselenid (H₂Se), das durch Glutathiongekoppelte Reaktionen aus Selenit (Se₂O₃²⁻) über Selenodiglutathion (GS-Se-SG) und Glutathionselenopersulfid (GS-SeH) gebildet wird, spielt eine zentrale Rolle. H₂Se wird sowohl als Substrat für die Synthese von Selenocystein (Sec) durch Cystein-Synthasen, aber

auch als Molekül für die Transformation in Selenophosphat ($\text{H}_2\text{SePO}_3^-$) durch Selenophosphat-Synthetasen angesehen. Beide Ereignisse sind für die Biosynthese der Selenoproteine notwendig. Selen wird dabei in Proteine als Selenocystein inkorporiert. Selenit ist ein wichtiger Bestandteil enzymatischer Antioxidantien, wie zum Beispiel der Glutathion-Peroxidase. Es hilft indirekt durch Reduktion der Metabolite die Membranintegrität aufrechtzuerhalten. Der katalytische Mechanismus der Selenocystein-enthaltenden Enzyme für die Reduktion von Hydroperoxiden (ROOH) umfasst die Oxidation der entsprechenden sauren Seitengruppe (R-SeOH), was zu einer Reduktion der Hydroperoxide in Alkohole führt [Sies, 1997].

Durch die Generation von ROS werden die stromalen Zellen geschwächt und stellen dadurch ein Angriffsziel für die Tumorzellen dar. Die durch TGF β 1 induzierte Lipidperoxidation konnte durch den Einsatz von Antioxidantien wie Selenit verringert werden. Dabei spielt möglicherweise das Selenoprotein P eine Rolle, das in der Lage ist, die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu vermindern (Abbildung 3.7). Selenoprotein P kann in verschiedene biologische Prozesse involviert sein, von denen einige den antioxidativen Status der Zelle aufrechterhalten. So zählen vier Glutathion-Peroxidasen, darunter die cytosolische GPx, zu den ersten identifizierten Selenoproteinen [Flohé et al., 1973].

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass während der TGF β 1/ROS-abhängigen Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten Endprodukte der Lipidperoxidation ROS-sensitive Proteine der Signalkaskade modifizieren, was in der Expression von α SMA resultiert. Möglicherweise wird die Translation durch ROS beeinflusst. Diese Hypothese wird zusätzlich durch die nach zwölf Stunden einsetzende Transkription der α SMA-mRNA der mit TGF β 1-behandelten Fibroblasten unterstützt, die unbeeinflusst von ROS ist (Abbildung 3.6). Ein Indiz für diese Vermutung ist ebenfalls die späte Oxidierung der Proteine durch ROS, die zwölf Stunden nach TGF β 1-Stimulus am Stärksten ist (Abbildung 3.27).

4.4 Die der mesenchymal-mesenchymalen Transition zugrunde liegende Signalkaskade: der Status quo

Die Initiation der Lipidperoxidation wird durch einen prooxidativen Status gefördert, sodass sich die Frage stellt, welche intrazellulären Systeme TGF β 1-vermittelte ROS-Produktion induzieren. Die ROS-Produktion in nicht-phagozytotischen Zellen kann über Signalkaskaden, nach Aktivierung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen, ausgelöst werden [Sundaresan et al., 1995; Bae et al., 1997]. Ferner wurde für Hepatozyten beschrieben, dass eine Translokation der Proteinkinase C zu der Membran und deren Aktivierung Lipidperoxidation verursachen kann [von Ruecker et al., 1989].

Inhibitoren der PKC zeigten in dieser Arbeit sowohl eine Verhinderung der TGF β 1-induzierten α SMA-Expression als auch eine Erniedrigung des intrazellulären ROS-Gehaltes (Abbildung 3.23, 3.26). Diese Ergebnisse lassen auf die Beteiligung der PKC während der Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten schließen. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass TGF β 1 in der Lage ist, via aktivem PKC δ α 2(I)-Kollagen in humanen dermalen Fibroblasten [Jinnin et al., 2005] und α 1(I)-Kollagen in humanen pulmonären Fibroblasten [Zhang et al., 2004] zu induzieren. Weiter wurde gezeigt, dass der PKC-Inhibitor Calphostin C die Differenzierung von Ratten-Aorta-Fibroblasten verhindert [Gao et al., 2003] und eine Differenzierung durch Transfektion der Zellen mit PKC α -Oligonukleotiden unterbunden wurde.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der PKC und der NADH-Oxidase wurde untersucht, da Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) die membran-assoziierte NAD(P)H-Oxidase in Fibroblasten durch die PKC aktivieren kann [Tanabe et al., 1997]. In primären humanen Lungenfibroblasten induziert TGF β 1 die Src-Kinase-abhängige Differenzierung zu Myofibroblasten und die Aktivierung der membranassoziierten NADPH-Oxidase [Thannickal und Fanburg, 2000]. In transformierten Fibroblasten scheinen Ras und Rac (GTP-bindende Proteine) direkt mit der Produktion des Superoxids ($O_2^{\cdot-}$) verknüpft zu sein [Irani et al., 1997]. Die NADPH-Oxidase produziert Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch Ein- und Zwei-Elektronenreduktionen aus O_2 [Thannickal und Fanburg, 2000]. Diese können innerhalb der Zelle zu erheblichen Schäden und letztendlich zu der Formation von Tumoren, beispielsweise der Haut, führen. H_2O_2 kann durch Plasmamembranen und das Cytosol zum Zellkern diffundieren und dort mit Metallionen als Bestandteil von Proteinen oder Ionen, die an die DNA gebunden sind, interagieren, um Hydroxylradikale zu bilden. Diese wiederum

können die DNA über kettenspezifische HO \cdot -Generation stark schädigen. Durch die Zerstörung der DNA kann es im Folgenden zu verschiedenen Erkrankungen wie beispielsweise Krebs kommen [Halliwell, 2002].

Um einen möglichen Einfluss der Produkte der NADPH-Oxidase auf die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu untersuchen, wurde der Inhibitor Apocynin, das spezifisch die NADPH-Oxidase blockiert, für die Experimente eingesetzt. Durch den Einsatz des Inhibitors konnte gezeigt werden, dass die NADPH-Oxidase einen relevanten Einfluss auf die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten durch die vermehrte ROS-Produktion nimmt, da die α SMA-Expression nach Behandlung mit TGF β 1 signifikant erniedrigt war.

4.4.1 ROS-unabhängige Beteiligung von Smad an der Transdifferenzierung

Die TGF β 1-induzierte Signaltransduktionskaskade, die zur mesenchymal-mesenchymalen Transition führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist beschrieben, dass TGF β 1 durch die Bindung an den TGF β 1-Rezeptor die Smad-Signalkaskade auslösen kann [Schiffer et al., 2000]. Neben der Smad-induzierten Transkription kann TGF β 1 aber auch andere Smad-unabhängige Signalwege, wie zum Beispiel den MAP-Kinase-, den PP2A/p70^{S6K}-, den RhoA- oder den TAK1/MEKK1-Signalweg, aktivieren. TGF β 1 induziert ebenfalls den Erk, JNK und p38 MAPK-Signalweg. Zellen, denen Smad4 fehlt, oder die vermehrt über inhibitorische Smad-Proteine verfügen, zeigen eine Smad-unabhängige Aktivierung der MAPK-Signalkaskade [Engel, 1999]. Obwohl diese Signalkaskaden oft miteinander kooperieren, können sie aber auch einander entgegenwirken. Smad7 beispielsweise, ein inhibitorisches Smad-Protein, kann die JNK-Aktivierung verstärken [Mazars, 2002]. Mutierte TGF β 1-Rezeptoren, die die Smad-Signalkaskade nicht aktivieren können, induzieren den p38 MAPK-Signalweg nach TGF β 1-Stimulus [Yu et al., 2002]. Die Mechanismen der Erk-, JNK- oder der p38 MAPK-Aktivierung sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Die JNK- und p38 MAPK-Signalkaskaden werden durch verschiedene MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) nach unterschiedlichen Stimuli induziert. Die Balance zwischen direkter und indirekter Aktivierung der Smad- und der MAPK-Signalkaskade nach TGF β 1-Stimulus ist oft Zelltyp-abhängig.

Smad-Proteine, insbesondere Smad3 und Smad4, zeigen sequenzspezifische Bindeaktivität an die DNA, ihre Bindungsaffinität ist aber verhältnismäßig gering. Smad2 kann nicht direkt an die DNA binden, ist jedoch für den Smad2/3-Smad4-Komplex notwendig. Weil Smad-Proteine die DNA nur mit geringer Affinität binden können, kooperieren sie mit anderen sequenzspezifischen Bindungsfaktoren, um effizient an die Promotoren zu binden [Ten Dijke und Hill, 2004]. Die Smad-Signalkaskade verläuft daher kinetisch relativ langsam.

Um die Frage zu klären, ob TGF β 1 die Transdifferenzierung von dermalen Fibroblasten über einen Smad-abhängigen Signalweg induziert, wurde der Gehalt an phosphoryliertem Smad2 nach Einsatz von Antioxidantien untersucht. Nach Behandlung der Fibroblasten mit TGF β 1 war eine Phosphorylierung von Smad2 zu erkennen. Eine erwartete Verringerung des Phospho-Smad2-Gehalts durch Vorbehandlung der Zellen mit NAC, Selenit und Trolox wurde jedoch nicht beobachtet. Dieses Ereignis wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit gezeigt. Die TGF β 1-induzierten Signalkaskaden werden innerhalb von Minuten aktiviert, wohingegen die Aktivierung des Smads zwar schnell erfolgt, eine Kernlokalisierung dieses Signalproteins jedoch über mehrere Stunden anhält (Abbildung 3.15), was die Vermutung über einen parallelen, ROS-vermittelten Signalweg unterstützt.

Die Tatsache, dass die Phosphorylierung des Smad2-Proteins durch den Einsatz von Antioxidantien in dieser Arbeit nicht beeinflusst werden konnte, ist ein Indiz dafür, dass die Transdifferenzierung der Fibroblasten durch den Wachstumsfaktor TGF β 1 durch eine weitere ROS-abhängige, zum Smad-Signalweg parallelen Kaskade ausgelöst wird. Es besteht die Vermutung, dass es zu einer frühen p38-Aktivierung durch TGF β 1-Stimulus kommt, die wiederum nachgeschaltete Kaskaden aktiviert. Um den Transdifferenzierungsprozess besser zu verstehen, wurden mögliche ROS-Targets untersucht.

4.4.2 Die Proteinbiosynthese als mögliches ROS-Target

Es wurde bereits früh beschrieben, dass Glutathion (GSH) eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem Zellwachstum spielt [Dan, 1966; Mano, 1971; Jocelyn, 1972]. Während der Translation gibt es zwei wichtige Ereignisse, die Initiation der Polypeptidkette und die Elongation der Polypeptidkette, die mit der Termination enden. In Retikulozyten wurde gezeigt, dass keine dieser beiden Translationsereignisse stattfindet, wenn die Konzentration an GSH (oder äquivalenten reaktiven Gruppen) sehr gering ist [Kosower und Kosower, 1973], d.h. ein Ungleichgewicht des GSH/GSSG-Status in Zellen zugunsten der

Konzentration an GSSG auftritt. Erst wenn sich eine normale GSH-Konzentration innerhalb der Zelle einstellt, setzt auch die Initiation der Polypeptidkette wieder ein. Der Initiationsprozess der Translation ist ebenfalls sensibel auf geringe Konzentrationen an intrazellulärem GSSG [Kosower und Kosower, 1973]. Die Zugabe von GSSG in Anwesenheit von GSH in Retikulozyten führte zu der Inhibition der Proteinbiosynthese [Kosower et al., 1972]. Möglicherweise wird der Glutathion-Status der Zelle nach TGF β 1-Stimulus durch reaktive Sauerstoffspezies beeinflusst, was sich auf die Proteinbiosynthese zugunsten der Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten auswirkt. Die Tatsache, dass die cytosolische Glutathion-Peroxidase nach TGF β 1-Behandlung nicht aktiv ist, sondern erst nach Selensupplementierung, bestätigt diese Annahme. Glutathion wird für die katalytische Aktivität der cGPx benötigt, da es mit dem Selensulfid ein Addukt bildet und ein weiteres Glutathion die aktive Form des Enzyms durch Angriff des Selensulfids regeneriert, wobei oxidiertes Glutathion entsteht.

4.5 Myofibroblasten unterstützen die Tumorinvasion

Die Tumorprogression findet in einem Mikromilieu statt, in dem es zu einer extrazellulären Kommunikation zwischen Tumor und Stroma mittels löslicher Faktoren kommt. Nach der Differenzierung eines Tumors zu einem invasiven Tumor kommt es zu einer Formation von Myofibroblasten an der Invasionsfront der Tumorzellen [de Wever und Mareel, 2002]. Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit mit Hilfe immunzytochemischer Ansätze verifiziert werden (Abbildung 3.1). Es stellte sich die Frage, warum Myofibroblasten scheinbar essentiell für die Invasion der Tumorzellen sind. Mit Hilfe etablierter Matrigel-Invasionsassays konnte gezeigt werden, dass die Invasion von Tumorzellen in der Haut durch Myofibroblasten um das Vier- bis Fünffache positiv beeinflusst wird. Die Invasion wurde verhindert, wenn die Tumorzell-vermittelte Transdifferenzierung durch den Einsatz von Antioxidantien unterbunden wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstumsfaktormuster von Myofibroblasten untersucht. Dabei zeigte sich, dass als Konsequenz der Transdifferenzierung die Mengen der von den Myofibroblasten sezernierten Wachstumsfaktoren HGF, IL-6 und VEGF signifikant erhöht waren, was sich stimulierend auf die Invasion der Tumorzellen auswirkte (Abbildung 3.35, 3.37). HGF wirkt in verschiedenen Zelltypen multifunktionell als Mitogen, Motogen

und Morphogen [Nakamura et al., 1989]. Der Wachstumsfaktor unterstützt Zellwachstum und Migration und stimuliert die Invasion von Prostata-Karzinomzellen. IL-6 gilt als pleiotropes Zytokin, das in sowohl physiologische als auch pathophysiologische Prozesse wie der Tumorprogression involviert ist [Lazar-Molnar et al., 2000]. VEGF, ein Wachstumsfaktor, der unerlässlich für die Angiogenese eines Tumors ist, wird durch Keratinozyten und dermale Fibroblasten sezerniert und ebenfalls mit der Invasion von Tumorzellen assoziiert [Sauter et al., 1999, Detmar et al., 2000]. Während der Vaskularisierung gelangen Blutgefäße, die den Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen und die Metastasierung durch den Blutkreislauf fördern, in Richtung des Tumors. Ferner erlaubt die Vaskularisierung die Kommunikation zwischen Primärtumor und Metastasen [Carmeliet und Jain, 2000]. Es konnte gezeigt werden, dass TGF β 1 in der Lage ist, in primären humanen Lungenfibroblasten die IL-6-mRNA- und Proteinexpression zu induzieren [Eickelberg et al., 1999] und in humanen Hautfibroblasten die VEGF-Expression voranzutreiben [Trompezinski et al., 2000]. Von Tumoren sezerniertes TGF β 1 induziert in oralen Fibroblasten einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotypen, der ebenfalls hohe Mengen an HGF sezerniert [Lewis et al., 2004]. HGF, das von Myofibroblasten produziert wird, zeigt proinvasive Signale bei Darmtumoren, durch cMet und/oder Rac-abhängige Signalkaskaden [de Wever et al., 2004]. Auch IL-6 [Arihiro et al., 2000] und VEGF [Mayr-Wohlfart et al., 2002] ermöglichen chemotaktische Motilität bei Brustkarzinom-Zelllinien und primären humanen Osteoblasten. Die Wachstumsfaktoren HGF, VEGF und IL-6 spielen sowohl bei der Tumorentwicklung als auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, bei der Tumordinvasion eine wichtige Rolle. Dabei konnte gezeigt werden, dass die drei Wachstumsfaktoren synergistisch auf die Invasion der Tumorzellen wirken. Die Wirkung der einzelnen Faktoren war dabei eher gering (Abbildung 3.37).

4.6 Stromale Therapie mittels Antioxidantien: neues Konzept zur Verhinderung der Tumorprogression

Chemo- und Radiotherapie, die zur Bekämpfung von Tumoren eingesetzt wird, wird von zahlreichen, starken Nebenwirkungen begleitet [Birnbbaum und Ready, 2005]. Bisher werden nur die Tumorzellen therapiert, was sich jedoch nicht als ausreichend herausgestellt hat. Ein Problem während der Krebstherapie stellt die Heterogenität der Zellpopulation innerhalb von Tumoren und die genomische Instabilität der Tumorzellen dar [Tozeren et al., 2005]. Die

stromale Therapie bezieht sich auf gesunde Zellen, die sich um den Tumor befinden. Ziel der stromalen Therapie ist die Stärkung der gesunden Zellen gegen die Tumorzellen. Da stromale Zellen genomische Stabilität aufweisen, könnte die stromale Therapie mit Hilfe von Antioxidantien als eine neue Strategie im Kampf gegen die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen dienen. Experimentelle Studien unterstützen den Einsatz von Antioxidantien als krebsvorbeugende Agenzien, da sie reaktive Sauerstoffspezies neutralisieren oder ihre Wirkung verhindern können [Borek, 1997].

Antioxidantienreiche Diäten als Nahrungsmittelergänzung könnten das Risiko von Krebserkrankungen erheblich verringern [Steinmetz und Potter, 1996]. Zellkultur-Studien haben bereits gezeigt, dass Vitamin E, Vitamin C, Selen und einige Phytochemikalien selektiv Apoptose in Tumorzellen auslösen können, wobei die gesunden Zellen verschont bleiben [Borek et al., 1994; Sigounas et al., 1997; Taper et al., 2004].

In einer unabhängigen Studie untersuchten Clark und Mitarbeiter [Clark et al., 1996] die Hypothese, dass Selen als Nahrungsmittelergänzung das Krebsrisiko verringern kann. Dazu wurden Patienten, die schon einmal an Hautkrebs erkrankt waren, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von 200 µg Selen pro Tag über mehrere Jahre die Krebs-Todesrate signifikant verringert hat. Zusätzlich nahm die Anzahl an Neuerkrankungen an Lungen-, Prostata-, und Darmkrebs erheblich ab. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Stärkung stromaler Zellen durch antioxidativ wirkende Substanzen wie Selenit, die Invasionskapazität der Tumorzellen stark vermindert. Einige antioxidativ wirkende Agenzien werden bereits als Supplement von Krebspatienten, die sich einer Chemotherapie unterziehen müssen, eingenommen. Deshalb ist es wichtig, die Wirkung von Antioxidantien in Zusammenhang mit der Metastasierung von Tumoren weiter zu untersuchen.

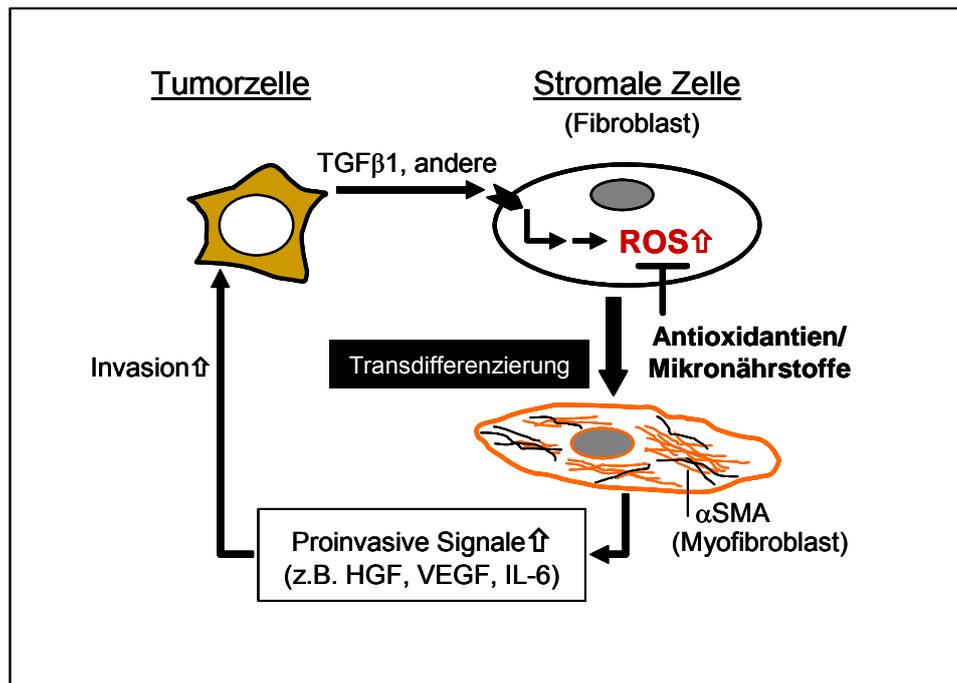


Abbildung 4.1: Neues Konzept der Chemoprävention gegen Tumorprogression. Tumorzellen sezernieren Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie beispielsweise TGFβ1, das ROS-abhängige molekulare Signalkaskaden initiiert, die in der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und der Sekretion proinvasiver Signale, die die Invasionskapazität der Tumorzellen stimulieren, resultieren. Diese Signale und die damit einhergehende Invasion der Tumorzellen könnten durch den Einsatz von Antioxidantien und/oder Mikronährstoffen verhindert werden.

Diese Doktorarbeit unterstützt ein neues Konzept eines chemopräventiven Ansatzes in der Tumorprogression. Durch die Stärkung von stromalen Zellen mittels Antioxidantien und Inhibitoren wird die Invasionskapazität der Tumorzellen signifikant verringert. Die Bildung sekundärer Tumore/Metastasen könnte dadurch längerfristig unterbunden werden, was letztendlich einen Fortschritt im Kampf gegen die hohe Krebs-Todesrate darstellt.

5. Perspektiven

Diese Arbeit gibt Hinweise darauf, dass Wasserstoffperoxid, Superoxid, aber auch Lipidhydroperoxide während der Transdifferenzierung generiert werden. Aus diesem Ergebnis resultiert die Frage, in wie weit die Produktion dieser Vielzahl von ROS tatsächlich maßgeblich für die Bildung von Myofibroblasten ist. Möglicherweise ist eine Akkumulation der verschiedenen ROS notwendig, um bestimmte Signalwege oder Modifikationen von Zielproteinen auszulösen. Die Tatsache, dass die Transkription des α SMA-Proteins unbeeinflusst von ROS ist, läßt vermuten, dass die Translation des Proteins ROS-sensitiv ist. Erste Hinweise konnten in dieser Arbeit mit Hilfe der Proteomanalyse erzielt werden. Eine genaue Charakterisierung ROS-modifizierter (Translations-) Proteine würde zu der Aufklärung dieser Frage beitragen. In diesem Zusammenhang müsste die Frage untersucht werden, welche dieser angeschalteten Signalwege letztendlich zu dem Transdifferenzierungsprozess dermalen Fibroblasten führt, oder ob eine Kombination mehrerer Kaskaden benötigt wird.

Ein weiterer zu untersuchender Aspekt ist die spezifische Funktion der Myofibroblasten während der Invasion von Tumorzellen. Dass die Rekrutierung von Myofibroblasten an der Invasionsfront von Tumorzellen für dessen Invasionskapazität unerlässlich ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Wachstumsfaktoren, die durch Myofibroblasten sezerniert werden, werden von Tumoren benötigt, um in entfernte Gewebe metastasieren zu können. Aber welchen weiteren Aufgaben unterliegen Myofibroblasten? Werden sie nur an der Invasionsfront gebildet oder wandern Myofibroblasten mit den Tumorzellen mit?

In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, ob TGF β 1 der einzige Wachstumsfaktor ist, der für die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten verantwortlich ist. Möglicherweise werden während der Invasion der Tumorzellen weitere Wachstumsfaktoren sezerniert, die die Invasion zusätzlich positiv beeinflussen.

Eine Verminderung der metastatischen Aktivität der Tumorzellen im Rahmen der Tumor-Stroma-Interaktion konnte in dieser Arbeit erzielt werden. Die intensive Erforschung von Mikronährstoffen, wie Selen, und antioxidativ wirkenden Substanzen im Kampf gegen den Krebs könnte zu neuen therapeutischen Ansätzen führen, um die Ausbreitung der Tumorzellen und die Bildung von Metastasen zu verhindern. Viele Studien befassen sich mit der Tumorinitiation und der -promotion, jedoch ist es mindestens genauso wichtig, sich den gesunden Zellen zu widmen und diese durch Stärkung mit Mikronährstoffen gegen Angriffe von Tumorzellen zu schützen.

6. Zusammenfassung

Myofibroblasten, die essentiell für die Tumorprogression sind, bilden das reaktive Stroma. In dieser Arbeit konnte durch ein *in-vitro*-Tumor-Stroma-Modell gezeigt werden, dass der **Transformierende Wachstumsfaktor (TGF β 1)**, der von Plattenepithelkarzinom-Zellen (SCL-1) sezerniert wird, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-abhängige Expression des α -Smooth-Muscle-Actins (α SMA), einem Biomarker für Myofibroblasten, induziert, die mit der mesenchymal-mesenchymalen Transition (MMT) während der Tumordinvasion einhergeht.

Sowohl eine ROS-abhängige Signalkaskade, an der die PKC und die NADH-Oxidase beteiligt sind, als auch die ROS-unabhängige Beteiligung von Smad spielen bei der MMT von Fibroblasten zu Myofibroblasten eine entscheidende Rolle. Die MMT geht mit einem veränderten Muster an durch Myofibroblasten sezernierte proinvasive Faktoren einher, die über einen parakrinen Wirkmechanismus die invasive Kapazität der Tumorzellen signifikant steigern. Die Möglichkeit, die Formation der Myofibroblasten durch den Einsatz von Antioxidantien und Mikronährstoffen zu verhindern, fördert anti-invasive und anti-metastasierende Strategien.

Da Invasion und Metastasierung nach wie vor das größte Problem der Krebstherapie darstellen, könnte die Aufklärung der zellulären Interaktionen zwischen Tumor und Stroma bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze sehr hilfreich sein. Dieses neue Konzept der Stromaltherapie, die den Schutz stromaler Zellen vor dem Einfluss von Tumorzellen durch den Einsatz von Antioxidantien und Mikronährstoffen beinhaltet, könnte die neue Basis für die Chemoprävention gegen Tumordinvasion darstellen.

7. Summary

Myofibroblasts, pivotal for tumor progression, populate the microecosystem of reactive stroma. Using an in vitro tumor-stroma model of skin carcinogenesis, this study shows that tumor-cell-derived **transforming growth factor β 1 (TGF β 1)** initiates reactive oxygen species-dependent expression of α -smooth muscle actin, a biomarker for myofibroblastic cells, being part of the mesenchymal-mesenchymal transition (MMT) during tumor invasion.

A ROS-dependent signaling pathway, which is induced by the protein kinase C (PKC) and the NADH-Oxidase, plays a pivotal role in the mesenchymal-mesenchymal transition of fibroblasts into myofibroblasts as well as the ROS-independent protein Smad. The MMT is characterized by the expression of proinvasive factors by myofibroblasts, which significantly increase the invasion capacity of tumor cells through paracrine mechanisms. The prevention of myofibroblast formation by the use of antioxidants promotes anti-invasive and anti-metastatic strategies.

To gain insight molecular processes mediating interactions between the tumor and the stroma would be helpful for the development of new therapeutical strategies, as invasion and metastases are the most common problems in cancer therapy. This novel concept of 'stromal therapy' that includes the protection of stromal cells against tumor cells by the use of antioxidants and micronutrients could be a new base for chemoprevention against tumor invasion.

8. Literaturverzeichnis

- Aplin A.E., Howe A.K., Juliano R.L.** (1999). Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 737-744.
- Arihiro K., Oda H., Kaneko M., Inai K.** (2000). Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast Cancer* 7: 221-230.
- Arora P.D., McCulloch C.A.** (1994). Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 159: 161-175.
- Aslan M., Ozben T.** (2003). Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antioxidants and Redox Signalling.* 5: 781-788.
- Attisano L., Wrana J.L.** (2000). Smads as transcriptional co-modulators. *Current opinion in Cell Biology* 12: 235-243.
- Aubin F., Humbey O., Guerrini J.S., Mougin C., Laurent R.** (2003). Non-melanoma skin cancers and human papillomavirus. *Ann. Dermatol. Venereol.* 130: 1131-1138.
- Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B.** (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272: 217-221.
- Bajaj-Elliot M., Breese E., Poulson R., Fairclough P.D., MacDonald T.T.** (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.
- Bassing C.H., Yingling J.M., Howe D.J., Wang T., He W.W., Gustafson M.L., Shah P., Donahoe P.K., Wang X.F.** (1994). A transforming growth factor beta type I receptor that signals to activate gene expression. *Science* 263: 87-89.
- Bayraktutan U., Draper N., Lang D., Shah A.M.** (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., Franz P.I., Gogol J., Kontermann K.** (1992). Terminal differentiation, aging, apoptosis, and spontaneous transformation in fibroblast stem cell systems in vivo and in vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 167-179.
- Birnbaum A., Ready N.** (2005). Gefitinib therapy for non-small cell lung cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* 6: 75-81.
- Blaudschun R., Brenneisen P., Wlaschek M., Meewes C., Scharfetter-Kochanek K.** (2000). The first peak of the UVB irradiation-dependant biphasic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) is due to phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and independent of autocrine transforming growth factor alpha. *FEBS Lett.* 474: 195-200.

- Boonstra J., Post, J.A.** (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1-13.
- Borek C.** (1997). Antioxidants and cancer. *Sci. Med (Phila)*. 4: 51-62.
- Borek C., Pardo F.** (1994). Vitamin E in apoptosis: a dual role. In: Paquier C, ed. *Biennial Meeting of the Society for Free Radicals Research International*. 327-331.
- Boudreau N., Myers C., Bissell M.J.** (1995). From laminin to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the ECM. *Trends. Cell. Biol.* 5: 1-4.
- Boukamp P., Tilgen W., Dzarlieva R.T., Breitkreutz D., Haag D., Riehl R.K., Bohnert A., Fusenig N.E.** (1982). Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin. *J. Natl. Cancer Inst.* 68: 415-427.
- Brenneisen P., Blaudschun R., Bernardis 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 L.O., 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 – dependant 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., Oh J., Wlaschek M., Wenk J., Briviba K., Hommel C., Herrmann G., Sies H., Scharfetter-Kochanek K.** (1996). Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* 64: 649-657.
- Brenneisen P., Sies H., Scharfetter-Kochanek K.** (2002). Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 973: 31-43.
- Canfield P.J., Xu F.N., Greenoak G.E., Reeve V.E., Gallagher C.H., Wilkinson F.** (1986). Ultrastructure of ultraviolet radiation-induced hairless mouse skin carcinogenesis, with special reference to the epidermal-dermal junction. *Pathology* 18: 337-344.
- Carmeliet P., Jain R.K.** (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257.
- 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.* 119: 2727-2738.

- Chiarugi P.** (2005). PTPs versus PTKs: The redox side of the coin. *Free Radical Research* 39: 353-364.
- Clark L.C., Combs G.F. Jr, Turnbull B.W. 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.
- Damour O., Gueugniaud P.Y., Berthin-Maghit M., Rousselle P., Berthod F., Sahuc F., Collombel C.** (1994). A dermal substrate made of collagen-GAG-chitosan for deep burn coverage: first clinical uses. *Clin. Mater.* 15: 273-276.
- Dan K.** (1966). Behaviour of SH groups in synchronous division. *Academic Press* 307
- De Caestecker M.P., Piek E., Roberts A.B.** (2000). Role of transforming growth factor- β signaling in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 1388-1402.
- Detmar M.** (2000). Tumor angiogenesis. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5: 20-23.
- De Gruijl F.R., Longstreth J., Norval M., Cullen A.P., Slaper H., Kripke M.L., Takizawa Y., van der Leun J.C.** (2003). Health effects from stratospheric ozone depletion and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 16-28. Erratum in: *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 354.
- Derynck R., Zhang Y.** (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 425: 577-584.
- Dt. Krebsgesellschaft** (2002). Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien. *AWMF-Leitlinien-Register* 032/022: 1-7.
- 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.
- De Wever O., Nguyen Q., Van Hoorde L., Bracke M., Bruyneel E., Gespach C., Mareel M.** (2004). Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* 18: 1016-1020.
- Diffey B.** (2004). Climate change, ozone depletion and the impact on ultraviolet exposure of human skin. *Phys. Med. Biol.* 49: R1-11.
- Docherty A.J., O'Connell J., Crabbe T., Angal S., Murphy G.** (1992). The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases. *Trends Biotechnol.* 10: 200-207.

- Doucet C., Brouty-Boye D., Pottin-Clemenceau C., Canonica G.W., 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
- Eickelberg O., Pansky A., Mussmann R., Bihl M., Tamm M., Hildebrand P., Perruchoud A.P., Roth M.** (1999). Transforming growth factor-beta 1 induces interleukin-6 expression via activating protein-1 consisting of JunD homodimers in primary human lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 274: 12933-12938.
- Engel M.E., McDonnell M.A., Law B.K., Moses H.L.** (1999). Interdependent SMAD and JNK signalling in transforming growth factor- β -mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 274: 37413-37420.
- Finkel T.** (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10: 248-253.
- Fleischmajer R., Perlish J.S., Burgeson R.E., Shaikh-Bahai F., Timpl R.** (1990). Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 580: 161-175.
- Flohé L., Gunzler W.A., Schock H.H.** (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32: 132-134.
- Gavino V.C., Miller J.S., Ikharebha S.O., Milo G.E., Cornwell D.G.** (1981). Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures. *J. of Lipid Res.* 22: 763-769.
- Gao P.J., Li Y., Sun A.J., Liu J.J., Ji K.D. Zhang Y.Z., Sun W.L., Marche P., Zhu D.L.** (2003). Differentiation of vascular myofibroblasts induced by transforming growth factor-beta 1 requires the involvement of protein kinase C alpha. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35: 1105-1112.
- Geesin J.C., Hendricks L.J., Gordon J.S., Berg R.A.** (1991). Modulation of collagen synthesis by growth factors: the role of ascorbate-stimulated lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 289: 6-11.
- Giancotti F.G., Ruoslahti E.** (1999). Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032.
- Gotzmann J., Fischer A.N., 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* 25: 3170-3185.
- Gourlay C.W., Ayscough K.R.** (2005). The actin cytoskeleton: A key regulator of apoptosis and ageing? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6: 583-589.
- Halliwell B., Gutteridge M.C.** (2002) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford Science Publications: 133 + 301.
- Haddad G.E., Coleman B., Zhao A., Blackwell K.N.** (2005). Regulation of atrial contraction by PKA and PKC during development and regression of eccentric cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: H695-H704.

- Heldin C.H., Miyazono K., ten Dijke P.** (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471.
- Herrmann G., Wlaschek M., Lange T.S., 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.
- Herrlich P., Bohmer F.D.** (2000). Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem. Pharmacol.* 59: 35-41.
- Hill K.E., Chittum H.S., Lyons P.R., Boeglin M.E., Burk R.F.** (1996). Effect of selenium on selenoprotein P expression in cultured liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1313: 29-34.
- Hiran T.S., Moulton P.J., Hancock J.T.** (1997). Detection of superoxide and NADPH oxidase in porcine articular chondrocytes. *Free. Radic. Biol. Med.* 23: 736-743.
- Inogushi T., Sonta T., Tsubouchi H., Etoh T., Kakimoto M., Sonoda N., Sato N., Sekiguchi N., Kobayashi K., Sumimoto H., Utsumi H., Nawata H.** (2003). Protein Kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: Role of vascular NAD(P)H Oxidase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 227-232.
- Ip C.** (1998). Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J. Nutr.* 128: 1845-1854.
- Irani K., Xia Y., Zweier J.L., Sollott S.J., Der C.J., Fearon E.R., Sundaresan M., Finkel T., Goldschmidt-Clermont P.J.** (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275:1649-1652.
- Islam K.N., Kayanoki Y., Kaneto H., Suzuki K., Asahi M., Fujii J., Taniguchi N.** (1997). TGF-beta1 triggers oxidative modifications and enhances apoptosis in HIT cells through accumulation of reactive oxygen species by suppression of catalase and glutathione peroxidase. *Free. Radic. Biol. Med.* 22: 1007-1017.
- Jacob C., Giles G.I., Giles N.M., Sies H.** (2003). Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42: 4742-4758.
- Jiminez-Sainz M.C., Fast B., Mayor F. Jr., Aragay A.M.** (2003). Signaling pathways for monocyte chemoattractant protein 1-mediated extracellular signal regulated kinase activation. *Mol. Pharmacol.* 64: 773-782.
- 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.
- Jocelyn P.C.** (1972). Biochemistry of the SH-group. *Academic Press*, 270.
- Johann A.M., von Knethen A., Lindemann D., Brune B.** (2005). Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferators-activated receptor-gamma and attenuates the oxidative burst. *Cell Death and Differentiation* 13: 1533-1540.

- Jones S.A., Wood J.D., Coffey M.J. Jones O.T.** (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.
- Junn E., Lee K.N., Ju H.R., Han S.H., Im J.Y., Kang H.S., Lee T.H., Bae Y.S., Ha K.S., Lee Z.W.** (2000). Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF-beta 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca²⁺ in TGF-beta 1-induced IL-6 expression. *J. Immunol.* 165: 2190-2197.
- Kahari V.M, Saarialho-Kere U.** (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6: 199-213.
- Kayanoki Y., Fujii J. Suzuki K., Kawata S., Matsuzawa Y., Taniguchi N.** (1994). Suppression of antioxidative enzyme expression by transforming growth factor-beta 1 in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 269:15488-15492.
- Kielty C.M., Shuttleworth C.A.** (1997). Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc. Res. Tech.* 38: 413-427.
- Klotz L.O., Kroncke K.D., Buchczyk D.P., Sies H.** (2003). Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.* 133: 1448S-1451S.
- 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.
- Kosower N.S., Vanderhoff G.A., Kosower E.M.** (1972). The effects of glutathione disulfide on initiation of protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 272: 623.
- Kosower N.S., Kosower E.M.** (1973). Effect of GSSG on protein synthesis. *Proceed. Biol. Chem.* 276-287.
- Kostyuk V.A., Kraemer T., Sies H., und Schewe T.** (2003). Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. *FEBS Lett.* 537: 146-150.
- Kretzschmar M., Liu F., Hata A., Doody J., Massagué J.** (1997). The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev.* 11: 984-995.
- Kugler A.** (1999). Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res.* 19: 1589-1592.
- Kunz-Schughart L.A., Knuechel R.** (2002). Tumor-associated fibroblasts (Part II): functional impact in tumor tissue. *Histol. Histopathol* 17: 623-637.
- Lazar-Molnar E., Hegyesi H., Toth S., Falus A.** (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 12: 547-554.

- Lewis M.P., Lygoe K.A., Nystrom M.L., Anderson W.P., Speight P.M., Marshall J.F., Thomas G.J.** (2004). Tumour-derived TGF- β 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependant invasion of squamous carcinoma cells. *Brit. J. of Cancer* 90: 822-832.
- Lim J.Y., Park S.J., Hwang H.Y., Park E.J., Nam J.H., Kim J., Park S.** (2005). TGF-beta 1 induces cardiac hypertrophic responses via PKC-dependent ATF-2 activation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39: 627-636.
- Liotta L.A., Kohn E.C.** (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411: 375-379.
- Mano Y.** (1971). Participation of the sulhydryl group of a protein synthesis in a cell-free system from sea urchin cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 146: 237.
- Marnett L.J.** (1999). Chemistry and biology of DNA-damage by malondialdehyde. *IARC Sci. Publ.* 150: 17-27.
- Mathews L.S., Vale W.W.** (1993). Characterization of type II activin receptors. Binding, processing and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 268: 1013-1018.
- Matrisian L.M.** (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays.* 14: 455-463.
- Matsumura Y., Ananthaswamy H.N.** (2002). Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front. Biosci.* 7: d765-d783.
- Mauch C., Hatamochi A., Scharfetter K. und Krieg T.** (1988). Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp. Cell Res.* 178: 493-503.
- Mayr-Wohlfart U., Waltenberger J., Hausser H., Kessler S., Gunther K.P., Dehio C., Puhl W., Brenner R.E.** (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 30: 472-477.
- Mazars A.** (2001). Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276: 36797-36803.
- Meewes C., Brenneisen P., Wenk J., Kuhr L., Ma W., Alikoski J., Poswig A., Krieg T., Scharfetter-Kochanek K.** (2001). Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA- induced phototoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 238-247.
- Miura S., Kodaira S., Hosoda Y.** (1993). Immunohistologic analysis of the extracellular matrix components of the fibrous stroma of human colon cancer. *J. Surg. Oncol.* 53: 36-42.
- Moliere P., Moysan A., Santus R., Huppe G., Maziere J.C., Ertret L.** (1991). UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta* 1048: 261-268.

- Müller A., Cadenas E., Graf P., Sies H.** (1984). A novel biologically active selenoorganic compound-I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). *Biochem. Pharmacol.* 33: 3235-3239.
- Müller M.M., Fusenig N.E.** (2002). Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 70: 486-497.
- Nabeshima K., Inoue T., Shimao Y., Kataoka H., Kono M.** (1999). Coherent migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histol. Histopathol.* 14: 1183-1197.
- Nakamura T., Nishizawa T., Hagiya M., Seki T., Shimonishi M., Sugimura A., Tashiro K., Shimizu S.** (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342: 440-443.
- 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 A.M., Rosenbaum J., Vidal-Vanaclocha F.** (1997). Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 26: 634-642.
- Petersen D.R., Doorn J.A.** (2004). Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 937-945.
- Petersen M.J., Hansen C., Craig S.** (1992). Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 99: 440-444.
- Pierceall W.E., Woodard A.S., Morrow J.S., Rimm D., Fearon E.R.** (1995). Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 11: 1319-1326.
- Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarotto E.** (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Current Medicinal Chemistry* 11: 1163-1182.
- Polte T., Tyrell R.M.** (2003). Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 1566-1574.
- Powell D.W., Mifflin R.C., Valentich J.D., Crowe S.E., Saada J.I., West A.B.** (1999). Myofibroblasts I. Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol.* 277: C1-C19.
- Powell D.W., Mifflin R.C., Valentich J.D., Crowe S.E., Saada J.I., West A.B.** (1999). Myofibroblasts II. Interstitial subepithelial myofibroblasts. *Am. J. Physiol.* 277: C183-201.
- Ronnov-Jessen L., Petersen O.W.** (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.
- Sahai E.** (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15: 87-96.
- Sanchez A., Alvarez M.A., Benito M., Fabregat I.** (1997). Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production, and glutathione depletion induced by transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 26: 935-943.
- Sauter E.R., Nesbit M., Watson J.C., Klein-Szanto A., Litwin S., Herlyn M.** (1999). Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 5: 775-782.
- Scharffetter-Kochanek K., Klein C.E., Heinen G., Mauch C., Schaefer T., Adelmann-Grill B.C., Goerz G., Fusenig N.E., Krieg T.M., 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.
- Scharffetter-Kochanek K.** (1997). Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention. *Adv. Pharmacol.* 38: 639-655.
- 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.
- Schiffer M., Gersdorff G., Bitzer M., Susztak K., Böttinger E.P.** (2000). Smad proteins and transforming growth factor beta signalling. *Kidney International* 58: S-45-S-52.
- Schlotmann K., Kaeten M., Black A.F., Damour O., Waldmann-Laue M., Förster T.** (2001). Cosmetic efficacy claims in vitro using a three-dimensional human skin model. *International Journal of Cosmetic Science* 23, 309-318.
- Schomburg L., Schweizer U., Holtmann B., Flohé L., Sendtner M., Köhrle J.** (2003). Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J.* 370: 397-402.
- Schrauzer G.N.** (2000). Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1864-1873.
- Schrauzer G.N., Rhead W.J.** (1971). Interpretation of the methylene blue reduction test of human plasma and the possible cancer protecting effect of selenium. *Experientia* 27: 1069-1071.
- Schürch W., Seemayer T.A., Lagace R.** (1981). Stromal myofibroblasts in primary invasive and metastatic carcinomas. A combined immunological, light and electron microscopic study. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 391: 125-139.
- Serini G., Gabbiani G.** (1999). Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell. Res.* 250: 273-283.

- Shamberger R.J., Frost D.V.** (1969). Possible inhibitory effect of selenium on human cancer. *CMAJ* 100: 682.
- 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.
- Sigounas G., Anagnostu A., Steiner M.** (1997). D1-alpha tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate and breast cancer cells. *Nutr. Cancer* 28: 30-35.
- Sommers C.L., Thompson E.W., Torri J.A., Kemler R., Gelmann E.P., Byers S.W.** (1991). Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ.* 2: 365-372.
- Souchelnytskyi S., ten Dijke P., Miyazono K., Heldin C.H.** (1996). Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular response. *EMBO J.* 16: 6231-6240.
- Stein B., Rahmsdorf H.J., 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.
- Steinbrenner H., Alili L., Bilgic E., Sies H., Brenneisen P.** (2006). Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *FRBM* 40: 1513-1523.
- Steinmetz K.A., Potter J.D.** (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 M.C., 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 TGFβ1 on downregulation of gap junctional communication between human dermal fibroblasts. *BBRC* 319: 321-326.
- Sundaresan M., Yu Z.X., Ferrans V.J., Irani K., Finkel T.** (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270: 296-299.

- Suzuki M., Asplund T., Yamashita H., Heldin C.H., Heldin P.** (1995). Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 involves activation of protein kinase C. *Biochem. J.* 307: 817-821.
- 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.
- Tanabe T., Otani H., Mishima K., Ogawa R., Inagaki C.** (1997). Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced oxyradical production in rheumatoid synovial cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 73: 347-351.
- Taper H.S., Jamison J.M., Gilloteaux J., Summers J.L., Calderon P.B.** (2004). Inhibition of the development of metastases by dietary vitamin c: K3 combination. *Life Sci.* 75: 955-967.
- Ten Dijke P., Hill C.S.** (2004). New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends biochem. sci.* 29: 265-673.
- Thannickal V.J., Fanburg B.L.** (2000). Reactive oxygen species in cell signalling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* 279: L1005-L1028.
- Thompson E.W., Torri J., Sabol M., Sommers C.L., Byers S., Valverius E.M., Martin G.R., Lippman M.E., Stampfer M.R., Dickson R.B.** (1994). Oncogene-induced basement membrane invasiveness in human mammary epithelial cells. *Clin. Exp. Metastasis.* 12: 181-194.
- Trompezinski S., Pernet I., Mayoux C., Schmitt D., Viac J.** (2000). Transforming growth factor-beta 1 and ultraviolet A1 radiation increase production of vascular endothelial growth factor but not endothelin-1 in human dermal fibroblasts. *Br. J. Dermatol.* 143: 539-545.
- Trosko J.E., Ruch R.J.** (1998). Cell-cell-communication in carcinogenesis. *Front Biosci.* 3: d208-236.
- Tozeren A., Coward C.W., Petushi S.P.** (2005). Origins and evolution of cell phenotypes in breast tumors. *J. Theor. Biol.* 233: 43-54.
- Tuxhorn J.A., Ayala G.E., Smith M.J.** (2002). Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodelling. *Clin. Cancer Res.* 8: 2912-2923.
- Tyrell R.M.** (1996). Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight – from models to reality. *BioEssays* 18: 139-148.
- Uchida K., Shiraishi M., Naito Y., Trii Y., Nakamura Y., Osawa T.** (1999). Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem.* 274: 2234-2242.
- Van der Rest M., Garrone R.** (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5: 2814-2823.

- Von Ruecker A.A., Han-Jeon B.G., Wild M., Bidlingmaier F.** (1989). Protein kinase C involvement in lipid peroxidation and cell membrane damage induced by oxygen-based radicals in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 836-842.
- Vollhardt K.P.C., Schore N.E.** (2000). *Organische Chemie*. Wiley-VCH: 1109-1111.
- Wang Q.P., Escudier E., Roudot-Thoraval F., Abd al Samad I., Peanegre R., Coste A.** (1997). Myofibroblast accumulation induced by transforming growth factor- β is involved in the pathogenesis of nasal polyps. *Laryngoscope* 107: 926-931.
- Wlaschek M., Bolsen K., Herrmann G., Schwarz A., Wilmroth F., Heinrich P.C., 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 G.P., 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.
- Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F., Masagué J.** (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *EMBO J.* 14: 2199-2208.
- Wrana J.L., Tran H., Attisano L., Arora K., Childs S.R., Massagué J., O'Connor M.B.** (1994). Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from drosophila melanogaster from an activin receptor complex. *Mol. Cell. Biol.* 14: 944-950.
- Yu L., Hebert M.C., Zhang Y.E.** (2002). TGF- β receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- β response. *EMBO J.* 21: 3749-3759.
- Yuspa S.H.** (1998). The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *J. Dermatol. Sci.* 17: 1-7.
- Zanetti D., Poli G., Vizio B., Zingaro B., Chiarpotto E., Biasi F.** (2003). 4-hydroxynonenal and transforming growth factor-beta 1 expression in colon cancer. *Mol. Aspects Med.* 24: 273-280.
- Zhang L., Keane M.P., Zhu L.X., Sharma S., Rozengurt E., Strieter R.M., Dubinett S.M., Huang M.** (2004). Interleukin-7 and transforming growth factor beta play counter-regulatory roles in protein kinase C-delta-dependent control of fibroblast collagen synthesis in pulmonary fibrosis. *J. Biol. Chem.* 279: 28315-28319.

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Peter Brenneisen für die Überlassung des überaus interessanten Themas bedanken. Er hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, diese Arbeit in seinem Labor anzufertigen, sondern stand mir stets unterstützend zur Seite und hatte immer gute und interessante Anregungen, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit sehr hilfreich waren. In seinem Labor habe ich gelernt, was wissenschaftliches Arbeiten heißt. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. Helmut Sies für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Joachim Ernst (Institut für Mikrobiologie) danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Mein Dank gilt auch meinen Laborkollegen Dragana Mitic, Dr. Holger Steinbrenner und Claudia Wyrich. Mein besonderer Dank gilt Dr. Dominik Stuhlmann, der mir mit sehr hilfreichen Anregungen und Tipps im Laboralltag stets zur Seite stand. Lirija Alili, Yasemin Ince und Niloofar Ale-Agha umarme ich ganz fest, weil alle drei immer die Gabe hatten, mich aus Frustrationsphasen zu ziehen und mich zum Lachen zu bringen. Auch die zahlreichen, witzigen Abende, die wir gemeinsam verbracht haben, werde ich niemals vergessen.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Mutter, Figen Cat, bedanken, die mich während des Studiums und der Doktorarbeit immer tatkräftig unterstützt hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne sie wäre ich niemals so weit gekommen. Danke! Besonders danke ich Berna Cat, dass sie mich auch in schwierigen Zeiten immer mit einem offenen Ohr und guten Ratschlägen aufgebaut hat. Außerdem hat sie mit viel Interesse meine Arbeit verfolgt.

Meinen größten Dank möchte ich jedoch Stefan Krause aussprechen, der die ein oder andere anstrengende Phase während dieser Dissertation geduldig ertragen, mich immer wieder aufgefangen und mir unglaubliche Kraft gegeben hat. Ohne Dich geht's halt nicht.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Brenneisen
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Joachim F. Ernst

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe, keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Alle Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, wurden als Entlehnung kenntlich gemacht.

Düsseldorf, 16. Oktober 2007