

Aus der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie

(Prof.Dr.rer.nat.Dr.med.C.F.Hess)

im Zentrum Radiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Experimentelle Untersuchung zur Wirkung
von in Tumorzellen produziertem Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF)
auf die proliferative Aktivität und Strahlenreaktion von Tumoren und Normalgewebe**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Susanne Grüger

aus Herford

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. A. Hille

II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. Mößner

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 28. März 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Kopf-Hals-Tumoren	8
1.1.1	Stadieneinteilung Kopf-Hals-Tumoren	8
1.2	Mukositis	9
1.3	KGF	11
1.4	Fragestellung	12
2	Material	14
2.1	Chemikalien	14
2.2	Zubehör	16
2.3	Geräte	16
3	Methoden	17
3.1	Keratinozyten-Wachstumsfaktor (rHuKGF, KGF)	17
3.2	Verwendete Antikörper	17
3.3	Verwendete Tumorzellen	17
3.4	Kulturbedingungen von verwendeten Tumorzellen	18
3.4.1	Umsetzen und Ausimpfen der Zellen	19
3.5	Kulturbedingungen von verwendeten Fibroblasten DF-19	19
3.6	Kulturbedingungen von verwendeten primären Keratinozyten und HaCat-Keratinozyten	19
3.6.1	Umsetzen und Ausimpfen der primären Keratinozyten	21
3.6.2	Umsetzen und Ausimpfen der HaCat-Zellen	21
3.7	Gewinnung der Tumorzellüberstände	21
3.8	Bestrahlung	22
3.9	Messung von lebenden Zellen mit dem CellTiter Blue Viability Assay	23
3.9.1	CellTiter-Blue-Versuche mit Tumorzellen	23
3.9.1.1	Proliferation der Tumorzellen mit und ohne rHuKGF	23

3.9.1.2	Proliferation der Tumorzellen mit und ohne KGF-Antikörper	24
3.9.1.3	Proliferation der bestrahlten Tumorzellen mit und ohne KGF-Antikörper	25
3.9.1.4	AK-Test mit ZMK-1-Zellen	25
3.9.2	CellTiter-Blue-Versuche mit primären Keratinozyten	25
3.9.2.1	Proliferation der primären Keratinozyten in Abhängigkeit von rHuKGF	25
3.9.2.2	Proliferation und Strahlensensibilität der primären Keratinozyten in Abhängigkeit vom KGF-Antikörper	25
3.9.2.3	Proliferation und Strahlensensibilität der primären Keratinozyten nach Zugabe von Tumorzellüberständen und KGF-Antikörper	26
3.10	ELISA Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay	27
3.10.1	Vorbereitungen	28
3.10.2	Versuchsablauf	28
3.11	Proteinnachweis mittels Western-Blot	29
3.11.1	Herstellung der Lysate	29
3.11.2	Western-Blot	30
3.11.3	Vorbereitungen:	30
3.11.4	Versuchsablauf:	30
3.12	Real Time PCR zum Nachweis von KGF und KGFR	31
3.13	Statistik	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Proliferation der Tumorzellen unter dem Einfluss von KGF	33
4.2	Proliferation der Tumorzellen unter dem Einfluss von KGF-Antikörper	35
4.3	Proliferation von bestrahlten Tumorzellen unter dem Einfluss von KGF-AK	38
4.4	Wirkung des KGF-Antikörpers auf die Proliferation der ZMK-1-Zellen	42
4.5	Beeinflussung der Proliferation epithelialer Zellen durch rekombinantes humanes KGF (rHuKGF)	45
4.6	Beeinflussung der Proliferation von bestrahlten primären Keratinozyten nach Zugabe von rHuKGF und KGF-AK	46

4.7	Nachweis von KGF in Zellüberständen mittels ELISA	49
4.8	Wirkung des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf die Proliferation der primären Keratinozyten	50
4.9	Wirkung des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf die Strahlensensibilität der primären Keratinozyten	53
4.10	KGF- und KGF-Rezeptor (KGFR)-Nachweis mittels Western-Blot	56
4.11	Nachweis von KGF und KGF-Rezeptor auf RNA-Ebene mittels PCR	58
5	Diskussion	60
6	Zusammenfassung	65
7	Literaturverzeichnis	67

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Neutralisierungskurve für den KGF-Antikörper bei Anwesenheit von 15 – 25 µg/ml KGF. (R&D Systems, Minneapolis, USA)	24
Abb. 2-6: Proliferation ohne und nach Zugabe von 0,2µg/mlKGF	34
Abb. 7-11: Proliferation nach Zugabe von 2µg/ml KGF-Antikörper bzw. IgG-Antikörper....	37
Abb. 12-16: Proliferation der mit 1 Gray bestrahlten Zelllinien nach Zugabe von 2µg/ml KGF-Antikörper bzw. IgG-Antikörper	39
Abb. 17-21: Proliferation der mit 4 Gray bestrahlten Zelllinien nach Zugabe von 2µg/ml KGF-Antikörper bzw. IgG-Antikörper	41
Abb. 22-25: Proliferation der ZMK-1-Zellen nach Zugabe von 1, 5, 10, 20µg/ml KGF- bzw. IgG-Antikörper.....	44
Abb. 26: Wachstumskurven der primären Keratinozyten nach Zugabe von 0, 0,2 (2%), 0,5 (5%) und 1,0 (10%) µg/ml KGF	45
Abb. 27-28: Proliferation der bestrahlten primären Keratinozyten (1 Gray) nach Zugabe von KGF- bzw. IgG-Antikörper.....	47
Abb. 29-30: Proliferation der bestrahlten primären Keratinozyten (4 Gray) nach Zugabe von KGF- bzw. IgG-Antikörper.....	48
Abb. 31-36: Proliferation der primären Keratinozyten nach Zugabe von Tumorzellüberständen	52
Abb. 37-42: Proliferation der bestrahlten primären Keratinozyten nach Zugabe von Tumorzellüberständen.....	55
Abb. 43: KGF-Nachweis mittels Western-Blot	56
Abb. 44: KGF-Rezeptor-Nachweis mittels Western-Blot.....	57
Abb. 45: Wirkung der Bestrahlung auf die KGF-Expression in Keratinozyten, Tumorzellen und Fibroblasten.....	59
Abb. 46: Wirkung der Bestrahlung auf die KFG-Rezeptor-Expression in primären Keratinozyten und immortalisierten Keratinozyten (HaCat)	59

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Stadieneinteilung der Kopf-Hals-Tumore.....	8
Tab. 2: Übersicht über den Ursprungstumor, dessen Staging, das Alter und Geschlecht der jeweiligen Patienten	18
Tab. 3: Optimale Zellzahl zur Gewinnung der Überstände der jeweiligen Zelllinie	22
Tab. 4: Strahlendosispunkte in Gray und die jeweilige Bestrahlungszeit in Minuten	23
Tab. 5: Schema KTZ + Antikörper	26
Tab. 6: Schema KTZ + Tumorzellüberstand.....	27
Tab. 7: Proliferation ohne und mit Zugabe von 0,2µg/ml KGF.....	35
Tab. 8: Proliferation nach Zugabe von KGF-Antikörper (+AK) und IgG-Antikörper (-AK)	37
Tab. 9-10: Proliferation nach Zugabe von 2µg/ml KGF-Antikörper (+AK) bzw. IgG-Antikörper (-AK) an bestrahlten Zelllinien.....	42
Tab. 11-14: Proliferation der ZMK-1-Zellen nach Zugabe von 1, 5, 10 und 20 µg/ml KGF-Antikörper (+AK) und IgG-Antikörper (-AK).....	44
Tab. 15: Vergleich der Wachstumskurven nach Zugabe von 0, 0,2 (2%), 0,5 (5%) und 1,0 (10%)µg/ml rHuKGF	46
Tab. 16-17: Proliferation nach Zugabe von KGF- bzw. IgG-Antikörper, 1 Gray	47
Tab. 18-19: Proliferation nach Zugabe von KGF- bzw. IgG-Antikörper, 4 Gray	49
Tab. 20: Durchschnittlich ermittelte KGF-Konzentrationen in den Tumorzellüberständen....	49
Tab. 21-26: Proliferation der primären Keratinozyten nach Zugabe von Tumorzellüberständen	53
Tab. 27-31: Proliferation nach Zugabe von Tumorzellüberständen.....	56

1 Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Tumoren

Kopf-Hals-Tumoren machen etwa sechs Prozent aller Krebserkrankungen bei Männern und etwa zwei Prozent bei Frauen aus. Ätiologisch besteht ein relativ eindeutiger Zusammenhang mit dem Konsum von Alkohol und Tabak. Zusätzlich sind eine mangelnde Mundhygiene, genetische Faktoren sowie Umwelteinflüsse an der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren beteiligt. Zudem steht ein Zusammenhang mit Virusinfektionen und Immundefekten zur Diskussion. Nach dem Ursprungsgewebe werden Karzinome, Sarkome und Lymphome unterschieden. Bei der überwiegenden Zahl der von der Schleimhaut ausgehenden Tumore handelt es sich um Plattenepithelkarzinome. Bei den Lymphomen überwiegt das Non-Hodgkin-Lymphom.

Die Therapie umfasst insbesondere die operative Therapie, die Laserchirurgie sowie die Strahlen- und Chemotherapie. Die therapeutische Vorgehensweise ist von der Lokalisation und dem Tumorstadium abhängig (Boenninghaus 2007).

1.1.1 Stadieneinteilung Kopf-Hals-Tumoren

Die Stadieneinteilung der Kopf-Hals-Tumoren basiert auf dem TNM-System der United Union against Cancer (UICC):

Tab. 1: Stadieneinteilung der Kopf-Hals-Tumore (UICC)

Stadium	Kopf-Hals-Tumoren		
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
VI	T4	N1-3	M0
	T1-4	N0-N1	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Fortsetzung S.9

T-Primärtumor	N-Regionale Lymphknoten	M-Fernmetastasen
T0 Primärtumor unbekannt	N0 Keine Metastasen	M0 Keine Fernmetastasen
Tis Carcinoma in situ	N1 M. in einem ipsilat. LK, ≤ 3cm	M1 Fernmetastasen
T1 Tumor ≤2cm		
T2 Tumor >2cm<4cm	N2 M.>3cm<6cm	
T3 Tumor>4cm	N2a M. in einem ipsilat. LK	
T4 Tumor infiltrierte angrenzende Strukturen	N2b M. in multiplen ipsilat. LK N2c M. in bilateralen oder kontralateralen LK N3 M.>6cm in LK	

1.2 Mukositis

Bei der Mukositis handelt es sich um eine Entzündung der Mundschleimhaut, die zu den häufigsten Komplikationen der Radio-Chemo-Therapie bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren zählt.

Üblicherweise zeigen sich einen Monat nach Beginn einer Strahlentherapie die ersten Schleimhautveränderungen. Die WHO unterscheidet vier Schweregrade.

Im Stadium 1 bestehen lediglich lokal begrenzte entzündliche Veränderungen, die für die Patienten meist nur mit geringen Schmerzen assoziiert sind.

Im Stadium 2 treten im Verlauf flache Geschwürbildungen auf.

Im Stadium 3 vertiefen sich die Ulzerationen, so dass die Patienten bei zunehmender Schmerzsymptomatik kaum noch feste Speisen zu sich nehmen können.

Das Stadium 4 ist durch tiefe Geschwüre und Nekrosen charakterisiert, die eine orale Nahrungsaufnahme verhindern.

In Ausprägung von Grad III und IV kommt es zum einen durch mögliche Therapiepausen und Abbrüche zu einer Gefährdung des kurativen Therapieziels, zum anderen kommt es zu einer

erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten. Bei neutropenischen Patienten erhöht sich zudem das Risiko einer Sepsis, die mit erhöhter Letalität verbunden ist.

Hinsichtlich der Pathogenese der radiogenen oralen Mukositis wurde bisher von einer direkten zytotoxischen Wirkung der Strahlentherapie auf die basalen Epithelzellen ausgegangen. Aktuellere Untersuchungen zeigen jedoch, dass zuvor eine Schädigung des Gefäß-Bindegewebsystem und Reaktionen in allen Mukosabereichen vorausgehen, bevor durch Schädigung der Epithelzellen eine gestörte Regeneration, Atrophie und Ulzerationen resultieren (MASCC Guidelines 2006).

Nach den MASCC Guidelines werden 5 Phasen der Mukositis unterschieden:

1. Initiierung
2. Hochregulierung und Erzeugung von Messenger-Signalen
3. Signalübertragung und Amplifikation
4. Ulzeration und Inflammation
5. Wundheilung.

Zur Prophylaxe und Therapie der Mukositis wurden von der MASCC folgende Guidelines erstellt:

A. Basispflege

1. Basis-Mundpflege
2. Mundpflege-Protokolle und Patientenanleitung
3. Symptomatische Therapie (Schmerztherapie systemisch und topisch).

B. Mukositisprophylaxe unter Strahlentherapie

1. individuelle 3-D-Bestrahlungsplanung und Mittelblock
2. Benzydamin
topisch angewandt, antiinflammatorisch, analgetisch, antimikrobiell.

C. Mukositisprophylaxe unter Chemotherapie

1. Kryotherapie
2. Aciclovir, nicht routinemäßig.

D. Mukosistherapie unter Chemotherapie (außer Hochdosisprotokolle)

1. Chlorhexidin.

E. Mukositisprophylaxe unter Hochdosis-Chemotherapie

1. KGF bei Patienten mit einer hämatologischen Erkrankung, die eine Hochdosis-Chemotherapie mit Ganzkörperbestrahlung und autologer Stammzelltransplantation erhalten haben.
2. Kryotherapie
3. Lasertherapie.

1.3 KGF

Der Keratinozyten-Wachstumsfaktor (FGF-7) gehört zur Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, von denen bisher 22 Mitglieder mit einem Molekulargewicht von 17-34 kDa identifiziert wurden.

KGF wurde initial aus dem Medium von humanen embryonalen Lungenfibroblasten isoliert mit einem Molekulargewicht von 26-28 kDa (Rubin et al. 1995). Die KGF-cDNA kodiert für ein 194 Aminosäuren-Protein (Finch et al. 1989).

KGF wird im Normalgewebe von mesenchymalen Zellen, vorrangig Fibroblasten, sezerniert.

Zielzellen des Wachstumsfaktors sind epitheliale Zellen in verschiedenen Geweben, z.B. Epidermis, Haarfollikeln, Lungenepithel, Corneaepithel, Drüsenepithel, Prostataepithel, Urothel, orales und gastrointestinales Schleimhautepithel etc. (Rubin et al. 1995).

Die Wirkung der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren wird über FGF-Rezeptoren vermittelt, von denen bisher vier Subtypen bekannt sind (FGFR1-FGFR4). Hierbei handelt es sich um Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die aus einer extrazellulären Region, die drei immunglobulin-ähnliche Domänen besitzt, und einer intrazellulären Tyrosinkinase-region bestehen.

Durch alternatives Spleißen der Exons resultieren zusätzliche Varianten der Rezeptoren mit unterschiedlichen Ligandenbindungsaffinitäten (Johnson und Williams 1993, Powers et al. 2000).

Der Rezeptor für KGF wird aus dem FGFR2-Gen kodiert mit den Splicevarianten IIIb und IIIc (Drugan et al. 1997).

KGF bindet lediglich an den FGFR 2 IIIb, der in epithelialen Zellen exprimiert wird, während die IIIc-Variante in mesenchymalen Zellen exprimiert wird (Carstens et al. 1998, 2000).

Zu den vielfältigen Wirkungen von KGF zählen die Stimulation der Proliferation, die Modifikation von Migrations- und Differenzierungsvorgängen und die Wundheilung.

Insgesamt führt die systemische Applikation von KGF zu einer epithelialen Hyperproliferation und Hyperplasien in verschiedenen Organsystemen (Rubin et al. 1995).

Klinische Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass KGF die Strahlentoleranz von normalen epithelialen Zellen verbessert. Eine relevante Wirkung von KGF auf die Strahlenreaktion von Tumorzellen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Hille et al. 2003, Ning et al. 1998).

1.4 Fragestellung

Die radiogene Mukositis der Mundschleimhaut ist eine der häufigsten Nebenwirkungen der Radio-Chemo-Therapie im Kopf-Hals-Bereich und ist mit 86% der häufigste Grund für Therapiepausen während der Bestrahlung (Herrmann et al. 1994).

Aufgrund der kurzen Tumorverdopplungszeit der Kopf-Hals-Tumoren von 3-5 Tagen (Withers et al. 1988), können dementsprechende Therapiepausen zu einer Abnahme der lokalen Tumorkontrolle und somit verzögerten Heilung von Kopf-Hals-Tumoren führen.

In diesem Zusammenhang ist der Keratinozytenwachstumsfaktor KGF von großer Bedeutung, der eine wesentliche Rolle bei der Induktion der Proliferation und Modulation der Differenzierung von epithelialeem Gewebe einnimmt. Dieses Wirkprofil bietet die Grundlage zur Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der akuten Strahlenfolgen an Haut und Schleimhäuten durch exogene Zufuhr von KGF.

Eine Vielzahl experimenteller und klinischer Studien haben die durch KGF induzierte verbesserte Strahlentoleranz normaler Epithelien belegt (Brizel et al. 2001, 2002, Meropol et al. 2003).

Vor Beginn der klinischen Anwendung muss jedoch sicher gestellt sein, dass KGF nicht zu einer gesteigerten Proliferation und Strahlentoleranz der Tumoren führt.

Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass KGF nur einen geringen bis keinen Effekt auf die Proliferation der Tumorzellen gezeigt hat. Eine Beeinflussung der Strahlensensibilität konnte nicht nachgewiesen werden (Hille et al. 2003, Ning et al. 1998).

Der Mechanismus dieser selektiven KGF-Wirkung ist bisher nicht bekannt. Ein Nachweis der KGF-Rezeptorexpression in primären Tumorzellen des Kopf-Hals-Bereiches ergab auffallend geringe Werte, während die KGF-mRNA-Expression in allen Tumorzellen unerwartet hohe Werte erreichte. Zudem gelang mittels ELISA ein Proteinnachweis in den Tumorzellüberständen, dessen biologische Bedeutung bisher nicht bekannt ist.

Deshalb soll in dieser Arbeit folgender Zusammenhang geklärt werden:

„Führt die KGF-Expression in Tumorzellen zu einem biologisch aktiven Protein, das die proliferative Aktivität oder die Strahlenreaktion von Tumoren und ggf. die Reaktion der Normalgewebe beeinflusst?“

2 Material

2.1 Chemikalien

Tumorzell-Nährlösung:

DMEM T 043-05, Biochrom, Berlin

RPMI T 121-05, Biochrom, Berlin

FKS (inaktiv) S 0115, Biochrom, Berlin

Insulin K 3510, Biochrom, Berlin

Hydrocortison It 2270, Sigma, St.Louis, USA

EGF W 0001-500

Ethanolamin K 3530

Phosphoethanolamin K 3540

Keratinocyten-Nährlösung I (PromoCell/Heidelberg):

Keratinocyte Basal Medium 2 +

0,4% Bovine Pituitary Extract

0,125ng/ml Epidermal Growth Factor, rec.human

5µg/ml Insulin, human

0,33µg/ml Hydrocortison

10 µg/ml Transferrin, human

0,39µg/ml Epinephrine

0,15 mM CaCl₂

HaCat-Nährlösung:

DMEM T 043-05, Biochrom, Berlin

FKS (inaktiv) S 0115, Biochrom, Berlin

Glutamin

Fibroblasten-Nährlösung:

DMEM T 043-05, Biochrom, Berlin

FKS S 0115, Biochrom, Berlin

PBS (Merck, Darmstadt):

Natriumchlorid 8,0 g

Kaliumchlorid 0,2 g

Natriumdihydrogenphosphat 1,15g

Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 g

Proteinisolation:

Lyse-Puffer:

50mM Tris pH 7,4 T6791, Sigma, St. Louis, USA

150mM NaCl S9888, Sigma, St. Louis, USA

2mM EDTA G5134, Sigma, St. Louis, USA

2mM EGTA G0396, Sigma, St. Louis, USA

0,1mM Na Vanadat S6508, Sigma, St. Louis, USA

25mM β -Glycerolphosphat G6376, Sigma, St. Louis, USA

0,2% Triton X-100 112298, Merck, Darmstadt

0,3% NP40 N0896 Sigma, St. Louis, USA

PBS (KTZ) +EDTA:

Trypsin L2153, Biochrom, Berlin

Trypsin (KTZ) 1:250 L2103, Biochrom, Berlin

KGF(rHu) Cat.No DKG00, Amgen Inc. Thousand Oaks, USA

Anti-human KGF/FGF-7 R&D Systems, Minneapolis, USA

Antibody (monoclonal) MAB 251 Clone 29522; AF-251-NA

MouseIgG Isotype R&D Systems, Minneapolis, USA

Control Antibody

Kollagen	L 7220, Biochrom, Berlin
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Äthanol	Merck, Darmstadt
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg

2.2 Zubehör

Gewebekulturflaschen blau	136196, Nunc, Roskilde, Dänemark
Gewebekulturflaschen rot	658 175, Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen blau groß	144903, Nunc, Roskilde, Dänemark
6er Well-Platten	140675, Nunc, Roskilde, Dänemark
12er Well-Platten	150628, Nunc, Roskilde, Dänemark
96er Well-Platten	167008, Nunc, Roskilde, Dänemark
Elisa-Kit, Quantikine	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.3 Geräte

Autoclav, Modell Bioclav, Schütt, Göttingen

Brutschrank (37°C, 5% CO₂), Heraeus, Hanau

Sterile Werkbank, Hera Safe, Heraeus, Hanau

Sterilisator, Memmert, Schwabach

Mikroskop, Zeiss, Jena

Zentrifuge , Heraeus, Hanau

Mikroplatten-Leser, Tecan, Männedorf, Schweiz

Bestrahlungsgerät Stabilipan, Siemens, München

Western-Blot, Bio Rad, Hercules, USA

3 Methoden

3.1 Keratinozyten-Wachstumsfaktor (rHuKGF, KGF)

Das verwendete rekombinante KGF wurde von der Firma Amgen Inc., Thousand Oaks, CA zur Verfügung gestellt. Es wurde in Escherichia-coli-Stämmen produziert, mittels der konventionellen Chromatographie gereinigt und auf Endotoxine getestet. Das rHuKGF wurde unmittelbar vor jedem Versuch frisch angesetzt und mit einer Konzentration von 0,2µg/ml verwendet.

3.2 Verwendete Antikörper

KGF-Antikörper zur Neutralisation der biologischen Aktivität von humanem KGF: MAB

2511 Clone 29568, Verhältnis 1:250, R&D Systems, Minneapolis, USA

KGF-Antikörper für ELISA, Western-Blot: AF-251-NA, SD02

KGFR-Antikörper: MAB665 Clone 98707, Verhältnis 1:250, R&D Systems, Minneapolis, USA

Actin-IgG1-Antikörper: Verhältnis 1:1000, Santa Cruz, Santa Cruz, USA.

Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten.

3.3 Verwendete Tumorzellen

Die für die Versuche verwendeten Tumorzellen stammen ursprünglich aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Die primären Zellkulturen wurden zwischen 1991 und 1999 am Universitätsklinikum Göttingen gewonnen und kultiviert. Die Zellen verfügen über ein einlagiges Wachstum (Monolayer), eine Zellverdopplungszeit im exponentiellen Wachstum von ca. 24-48 Stunden und ein Subkulturintervall von 3-4 Tagen. Die Tumorzellen wurden in der 1.-3. Passage verwendet.

Tab. 2: Übersicht über den Ursprungstumor, dessen Staging, das Alter und Geschlecht der jeweiligen Patienten

Zellcode	Ursprungs-Tumor	Staging	Alter/Geschlecht d. Patienten
BW-255	Oropharynx-Ca G2	T4 N2 M0	45/m
ZMK-1	Oropharynx-Ca G2	T4 N2 M0	49/m
GR-145	Oropharynx-Ca G2	T3 N2 M0	45/m
OH-65	Larynx-Ca G2	T4 N2 M0	61/m

3.4 Kulturbedingungen von verwendeten Tumorzellen

Um eine Kontamination zu vermeiden wurden alle Arbeitsschritte unter keimarmen Bedingungen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Züchtung der Zellen erfolgte in sterilen Gewebekulturflaschen der Firma Nunc aus Polystyrol.

Die verwendete Nährlösung bestand aus folgenden Komponenten:

DMEM und RPMI im Verhältnis 50:50

FKS 10% (inaktiviert)

5µg/ml Insulin

0,5µg/ml Hydrocortison

0,1 µg/µl EGF

12,22 mg/ml Ethanolamin

28,22mg/ml Phosphoethanolamin.

Die Nährlösung wurde nach Bedarf frisch angesetzt und vor Gebrauch im Wasserbad erwärmt. Das Nährmedium DMEM wurde aus Trockenpulver hergestellt und mit 0,5% Penicillin und Streptomycin versetzt. RPMI wurde ebenfalls aus Trockenmedium hergestellt und mit Natriumhydrogencarbonat, Hepes, Glucose sowie Penicillin und Streptomycin versetzt. Das Kälberserum wurde zur Inaktivierung 30 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad erhitzt und anschließend in kleinen Portionen bei -20°C tiefgefroren. Erst kurz vor seiner Verwendung wurde es wieder aufgetaut. Die anderen Bestandteile wurden ebenfalls bei -20°C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad bei 37°C erwärmt.

Die Kultur der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre.

3.4.1 Umsetzen und Ausimpfen der Zellen

Um den Zellen ausreichend Platz und Nährstoffe zu garantieren wurden sie zweimal wöchentlich unter keimarmen Bedingungen in neue Flaschen umgesetzt und mit frischer Nährlösung versorgt. Dazu wurde die gebrauchte Nährlösung zunächst abgesaugt und anschließend zweimal mit PBS gespült. Zur enzymatischen Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche wurde Trypsin hinzugefügt und die Flasche anschließend bei 37°C für 5-10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension verdünnt, auf neue Flaschen aufgeteilt und mit frischer Nährlösung versehen.

Für einen Versuch wurden die Zellen unter denselben Bedingungen gewonnen und anschließend mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Nach Verdünnung mit Tumornährlösung wurden 2000 Zellen pro Well in 100 µl Nährlösung beim 96 Well-Format ausgeimpft. Eine zuvor durchgeführte Testreihe mit unterschiedlichen Zellzahlen zeigte ein optimales Wachstum bei 2000 Zellen.

Anschließend wurden die Platten wieder bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert und nach 24, 48, 72 und 96 Stunden die Messungen durchgeführt.

3.5 Kulturbedingungen von verwendeten Fibroblasten DF-19

Die verwendeten Fibroblasten DF-19 wurden aus einer Biopsie von einem männlichen Spender gewonnen und in der 3.-5. Passage verwendet. Die Kulturbedingungen entsprechen denen der Tumorzellen. Bei den Fibroblasten handelt es sich um KGF-produzierende Zellen, die in unseren Versuchen als Kontrolle verwendet wurden.

3.6 Kulturbedingungen von verwendeten primären Keratinozyten und HaCat-Keratinozyten

Primäre Keratinozyten in der 2.-4. Passage wurden von Fr. Dr. Beate Volkmer, Abt. Molekulare Zellbiologie, Dermatologisches Zentrum Buxtehude zu Verfügung gestellt. Die Keratinozyten wurden aus Hautbiopsien isoliert, die während dermatologischer Eingriffe gewonnen wurden. Überschüssiges Fettgewebe wurde entfernt und die Hautbiopsie anschließend in ca. 0,5 cm² große Fragmente geteilt. Die einzelnen Fragmente wurden dreimal für jeweils zehn Minuten in Gentamycin (0,2mg/ml) gewaschen. Anschließend wurde die Haut über Nacht bei 4°C in Thermolysin (0,5mg/ml) inkubiert. Dann wurde die Epidermis von der Dermis getrennt und in 0,04%iges EDTA aufgenommen. Nach Zugabe von 0,1

%igem Trypsin/EDTA erfolgte die Inkubation der Hautproben für sechs Minuten bei 37°C, wobei die Proben alle zwei Minuten während der Inkubation geschüttelt wurden. Durch die Zugabe von DMEM und 10%igem FKS wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt. Nachdem die Zellen anschließend für zehn Minuten bei 200U zentrifugiert wurden, wurden sie in 1-2ml Keratinozytennährlösung der Firma Promocell GmbH aufgenommen.

Bei den HaCat-Zellen handelt es sich um immortalisierte Keratinozyten (Boukamp et al. 1988), die von der ATCC gekauft wurden.

Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte unter keimarmen Bedingungen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Züchtung der primären Keratinozyten erfolgte in sterilen Gewebekulturflaschen aus Polystyrol, die zuvor kollagenisiert wurden.

Dazu wurden die Kulturflaschen zunächst mit 2,5 ml steril filtriertem Kollagen (EK 10µg/ml) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Kollagen abgenommen und die Flaschen erst mit 3ml PBS und danach mit sterilem Aqua dest. gespült. Nachdem die Flaschen in der Werkbank getrocknet waren, wurden sie steril verpackt.

Die verwendete Nährlösung bestand aus folgenden Komponenten:

Keratinocyte Basal Medium 2 +

0,4% Bovine Pituitary Extract

0,125ng/ml Epidermal Growth Factor, rec.human

5µg/ml Insulin, human

0,33µg/ml Hydrocortison

10 µg/ml Transferrin, human

0,39µg/ml Epinephrine

0,15 mM CaCl₂

Die Nährlösung wurde von der Firma PromoCell aus Heidelberg bezogen und erst kurz vor der Verwendung angemischt.

Die Kultur der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre.

3.6.1 Umsetzen und Ausimpfen der primären Keratinozyten

Um den Zellen ausreichend Platz und Nährstoffe zu garantieren, wurden sie einmal wöchentlich unter keimarmen Bedingungen in neue Flaschen umgesetzt und mit neuer Nährlösung versorgt. Dazu wurde zunächst die alte Nährlösung abgesaugt und anschließend 0,1% EDTA hinzugefügt. Nachdem die Flaschen für ca. acht Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden, konnte das EDTA abgesaugt werden und Primi-Trypsin hinzugefügt werden. Nach einer weiteren dreiminütigen Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von DMEM und 10% FKS gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension für zehn Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert. Die überschüssige Lösung wurde abgesaugt, die Zellsuspension mit Nährlösung verdünnt, auf neue Flaschen aufgeteilt und mit frischer Nährlösung versehen.

Für einen Versuch wurden die Zellen unter denselben Bedingungen gewonnen und anschließend mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Nach Verdünnung mit Keratinozytennährlösung wurden 2000 Zellen pro Well beim 96-Well-Format ausgeimpft. Eine zuvor durchgeführte Testreihe mit unterschiedlichen Zellzahlen zeigte ein optimales Wachstum bei 2000 Zellen.

Anschließend wurden die Platten wieder bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert und nach 24, 48, 72 und 96 Stunden die Messungen durchgeführt.

3.6.2 Umsetzen und Ausimpfen der HaCat-Zellen

Die HaCat Zellen wurden im Wasserbad angetaut und anschließend in 4ml Nährlösung bestehend aus DMEM mit 10 % FKS und 2 % Glutamin aufgenommen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gefüttert und der Überstand in eine neue Flasche umgesetzt. Nach zwei Tagen zeigte sich ein konfluentes Zellwachstum, so dass die Nährlösung abgesaugt wurde und die Zellen mit einer EDTA-Lösung gespült wurden. Nach Zugabe von 2ml EDTA erfolgte eine 2-5 minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C, bis sich die ersten Lücken im Zellrasen zeigten. Die EDTA-Lösung wurde abgesaugt und 1,5ml EDTA/Trypsin hinzugefügt. Nach erneuter kurzzeitiger Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen für die weiteren Versuche in Nährlösung aufgenommen werden.

3.7 Gewinnung der Tumorzellüberstände

Zunächst wurde für jede Zellreihe im Rahmen eines Vorversuchs die Zellzahl pro Well unter Verwendung von 12er Well-Platten der Firma Nunc ermittelt, die zu einem maximalen Wachstum über fünf Tage führte, wobei zwischen 50.000 und 300.000 Zellen/Well ausgeimpft wurden. Die Untersuchung führte zu folgendem Ergebnis:

Tab. 3: Optimale Zellzahl zur Gewinnung der Überstände der jeweiligen Zelllinie

GR-145	75.000
OH-65	125.000
BW-255	75.000
ZMK-1	100.000
DF-19	75.000

Um die Überstände mit dem sezernierten KGF der Tumorzellen zu gewinnen, wurde am ersten Tag die jeweils optimale Zellzahl in 2ml Tumornährlösung in 12er Well-Platten ausgeimpft. Nach 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C wurde die Nährlösung vorsichtig abgesaugt und 1ml Keratinozytennährlösung hinzugefügt. Nach weiteren 72 Stunden konnten die Überstände gewonnen werden und direkt im Anschluss ein ELISA zur Bestimmung der KGF-Konzentration in den Überständen durchgeführt werden. Die restlichen Überstände wurden bei -70°C bis zu ihrer weiteren Verwendung eingefroren.

3.8 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einer Röntgenanlage der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Göttingen:

- Anodenspannung: 200kV, Stromstärke: 20mA
- Dosisleistung: 1,32 Gy/min
- Filter: 0,5mm Kupferfolie
- Gleichmäßigkeit der Feldausleuchtung > 98%
- Abstand Fokus-Zellschicht: 30 cm.

Das Röntgengerät wird regelmäßig von den Physikern der Klinik für Strahlentherapie geprüft.

Die Zellen wurden in Suspension in einem Zellröhrchen bestrahlt, welches in einer Plexiglashalterung in einem Wasserbad positioniert wurde.

Die Bestrahlungszeiten der einzelnen Dosispunkte waren:

Tab. 4: Strahlendosispunkte in Gray und die jeweilige Bestrahlungszeit in Minuten

0	0
1	0,84
2	1,60
3	2,34
4	3,12

3.9 Messung von lebenden Zellen mit dem CellTiter Blue Viability Assay

Der CellTiter Blue dient der indirekten Messung der Zellzahl. Dabei nutzt er die Fähigkeit lebender Zellen, bestimmte Substrate zu reduzieren und diese in ein pinkfarbendes fluoreszierendes Endprodukt umzusetzen. Der metabolische Zustand einer Zelle korreliert hierbei mit der Menge an umgesetztem Substrat. Tote Zellen verlieren die Fähigkeit, Substrate zu reduzieren, und generieren aus diesem Grund keine Farbreaktion.

Bei dem verwendeten Substrat handelt es sich um Resazurin, welches durch zelluläre Enzyme in das pinkfarbene Resorfin umgewandelt wird, das stark fluoreszierende Eigenschaften besitzt. Zur Durchführung des Experiments wurden 96-Well-Platten verwendet, die jeweils mit einer definierten Zellzahl und gegebenenfalls weiteren Substraten in 100µl Nährlösung beimpft wurden.

Vor den Messungen wurde das CellTiter-Blue-Reagenz im Wasserbad aufgetaut und 20µl in jedes Well gegeben. Anschließend wurde die Platte vorsichtig geschüttelt und dann in den Zellinkubator unter Standardbedingungen gestellt. Während der gesamten Versuchsdurchführung wurde das Reagenz vor direkter Lichteinstrahlung geschützt. Nach einer optimalen Inkubationszeit von 210 Minuten, welche im Rahmen von Vorversuchen ermittelt wurde, konnte das entstandene Farbsignal bei einer Wellenlänge von 560/590nm mittels des Tecan Elisa-Readers photometrisch gemessen werden.

3.9.1 CellTiter-Blue-Versuche mit Tumorzellen

3.9.1.1 Proliferation der Tumorzellen mit und ohne rHuKGF

Um das differenzierte Wachstum der Tumorzellen BW-255, ZMK-1, GR-145, OH-65 und der Fibroblasten DF-19 in Abhängigkeit vom Keratinozyten-Wachstumsfaktor aufzuzeigen, wurden die Proliferation der Zellen mit Hilfe des CellTiter-Blue-Viability-Assay (CTB) gemessen. Dazu wurden jeweils 2000 Zellen in 100 µl Nährlösung pro Well in 96-Well-

Platten ausgeimpft. Für jede Zellreihe wurden vier Triplets mit und ohne rHuKGF ausgeimpft, von denen jeweils eins nach 24, 48, 72 und 96 Stunden gemessen wurde. Die verwendete rHuKGF-Menge betrug 0,2µg/ml und wurde kurz vor dem Ausimpfen mit der Zellsuspension gründlich vermischt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

3.9.1.2 Proliferation der Tumorzellen mit und ohne KGF-Antikörper

Um einen eventuellen Effekt des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf das Wachstum der Tumorzellen nachzuweisen, wurde mit dem CellTiter Blue die Proliferation der Zellen nach Zugabe von KGF-Antikörper und als Negativkontrolle nach Zugabe von einem unspezifischen IgG-Antikörper erstellt. Die benötigte Antikörpermenge von jeweils 2 µg Antikörper pro ml Nährlösung (s. Abb. 1) wurde mittels des zuvor durchgeführten ELISA ermittelt. Sie ist ausreichend um 15 – 25 ng/ml KGF zu 80 % zu neutralisieren. Da in den Tumorzellkulturen höchsten 140 pg/ml KGF gemessen wurden, kamen zunächst 2 µg/ml Antikörper zur Anwendung.

Ansonsten war der Versuchsaufbau mit dem CTB mit und ohne Zugabe von rHuKGF identisch und wurde ebenfalls dreimal durchgeführt.

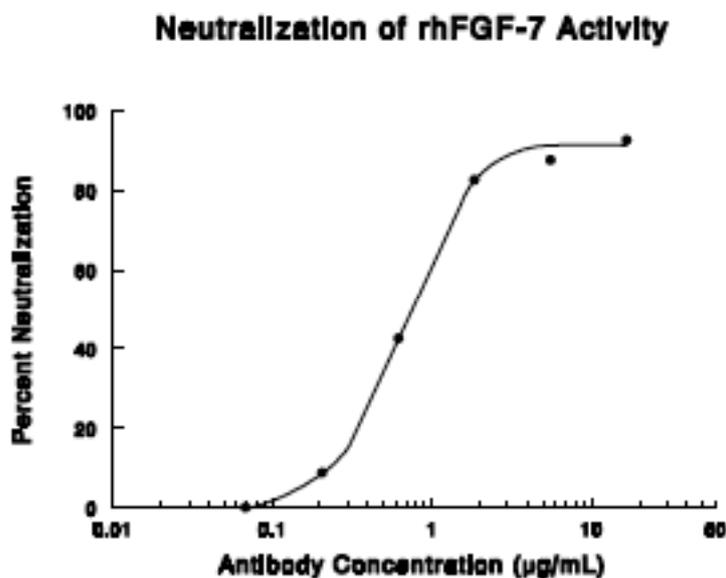


Abb. 1: Neutralisierungskurve für den KGF-Antikörper bei Anwesenheit von 15 – 25 µg/ml KGF. (R&D Systems, Minneapolis, USA)

3.9.1.3 Proliferation der bestrahlten Tumorzellen mit und ohne KGF-Antikörper

Um einen eventuellen Effekt des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf die Strahlensensibilität der Tumorzellen nachzuweisen, wurde der oben genannte Versuch zudem mit bestrahlten Zellen durchgeführt. Nach Zugabe des Antikörpers wurde die Zellsuspension nach einer einstündigen Inkubationszeit im Röhrchen mit 1 Gray bzw. 4 Gray bestrahlt und anschließend auf die Platten verteilt. Der Versuch wurde jeweils dreimal wiederholt.

3.9.1.4 AK-Test mit ZMK-1-Zellen

Nachdem der hinzugefügte KGF-Antikörper keine Wirkung auf die Proliferation der Tumorzellen zeigte, wurde ein erneuter Antikörper-Test mit ZMK-1-Zellen durchgeführt, bei denen sich im ELISA die höchste KGF-Menge im Überstand zeigte.

Für diesen Versuch wurden jeweils Triplets mit 2000 ZMK-1-Zellen in 100 µl Nährlösung und 1 µg, 5µg, 10µg und 20 µg/ml KGF-Antikörper ausgeimpft und nach 24, 48, 72 und 96 Stunden gemessen. Durch diesen Versuch sollte ausgeschlossen werden, dass sich aufgrund einer zu geringen Antikörpermenge im vorherigen Versuch keine Wirkung des KGF-Antikörpers auf das Wachstum der Tumorzellen zeigte. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

3.9.2 CellTiter-Blue-Versuche mit primären Keratinozyten

3.9.2.1 Proliferation der primären Keratinozyten in Abhängigkeit von rHuKGF

In diesem Versuch sollte die positive Wirkung des rHuKGF auf die Proliferation der primären Keratinozyten gezeigt werden. Es wurden jeweils Triplets mit 2000 primären Keratinozyten und 0, 0,2, 0,5 und 1,0µg/ml rHuKGF ausgeimpft. Die Messungen erfolgten nach 24, 48, 72 und 96 Stunden mittels des CellTiter Blue. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

3.9.2.2 Proliferation und Strahlensensibilität der primären Keratinozyten in Abhängigkeit vom KGF-Antikörper

Der Versuch sollte die Wirkung des KGF-Antikörpers auf die Proliferation und Strahlensensibilität der primären Keratinozyten aufzeigen.

Hierfür wurden die 96-Well-Platten nach folgendem Muster beimpft:

Tab. 5: Schema KTZ + Antikörper

Zellzahl/Well	KGF	Antikörper
2000	-	-
2000	0,2µg/ml KGF	-
2000	-	IgG
2000	-	KGF
2000	0,2µg/ml KGF	KGF
2000	0,2µg/ml KGF	IgG

Es wurden jeweils vier Triplets angefertigt für die Messungen mittels CellTiter Blue nach 24, 48, 72 und 96 Stunden. Zur Überprüfung der Strahlensensibilität wurden zwei weitere Versuche nach dem oben genannten Muster durchgeführt, wobei die primären Keratinozyten zuvor mit 1 Gray und 4 Gray bestrahlt wurden. Die Versuche wurden jeweils zweimal wiederholt.

3.9.2.3 Proliferation und Strahlensensibilität der primären Keratinozyten nach Zugabe von Tumorzellüberständen und KGF-Antikörper

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Wirkung des von Tumorzellen produzierten KGFs auf die Proliferation und Strahlensensibilität der primären Keratinozyten zu zeigen.

Hierfür wurden die 96-Well-Platten nach folgendem Muster beimpft:

Tab. 6: Schema KTZ + Tumorzellüberstand

Zellzahl/Well	Überstand	Antikörper
2000	BW-255	+KGF-AK
2000	ZMK-1	+KGF-AK
2000	GR-145	+KGF-AK
2000	OH-65	+KGF-AK
2000	DF-19	+KGF-AK
2000	KTZ-Nährlösung	+KGF-AK
2000	BW-255	+IgG
2000	ZMK-1	+IgG
2000	GR-145	+IgG
2000	OH-65	+IgG
2000	DF-19	+IgG
2000	KTZ-Nährlösung	+IgG

Zur Beurteilung der Strahlensensibilität wurde ein Ansatz mit zuvor mit 4 Gray bestrahlten primären Keratinozyten durchgeführt. Die Messungen wurden erneut mittels CellTiter-Blue nach 24, 48, 72 und 96 Stunden durchgeführt. Der Versuch mit den unbestrahlten primären Keratinozyten wurde zweimal wiederholt.

3.10 ELISA Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

Beim ELISA handelt es sich um eine immunologische Nachweismethode, bei der spezifische Antigene oder Antikörper an ein Trägerprotein gebunden werden. Diese Methode diente der quantitativen Bestimmung von KGF in den Tumorzellüberständen, aus der sich die benötigte KGF-Antikörpermenge für die weiteren Versuche ergab. In unserem Fall war die Mikrotiterplatte mit einem monoklonalen KGF-Antikörper beschichtet, die das KGF aus den zugegebenen Proben bindet. Nachdem alle ungebundenen Substanzen durch mehrfaches Waschen entfernt wurden, wurde ein enzymmarkierter, KGF-spezifischer, polyklonaler Antikörper hinzugefügt. Nach Zugabe eines Substrates ergab sich eine Farbreaktion, deren Intensität photometrisch gemessen wurde.

3.10.1 Vorbereitungen

Zunächst wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt.

Waschpuffer:

Wenn sich Kristalle im Waschpufferkonzentrat gebildet hatten wurden diese durch vorsichtiges Rühren aufgelöst. Zur Herstellung des Waschpuffers wurden 20ml Waschpufferkonzentrat in 480 ml destilliertem Wasser gelöst.

Substratlösung:

Die Farbreagenzien A und B wurden 15 Minuten vor Ihrer Verwendung zu gleichen Teilen vermischt. Dabei mussten die Substanzen vor Lichteinfall geschützt werden.

KGF-Standard:

Die Zugabe von 1 ml destilliertem Wasser zum Standard ergab eine Standardlösung mit einer KGF-Konzentration von 20.000 pg/ml. Nach einer 15minütigen Durchmischung der Standardlösung wurde die Verdünnungsreihe angelegt. Dazu wurden zunächst 900 µl des Kalibrator-Verdünnungsmittels in das 2000 pg/ml Polypropylenröhrchen und 500 µl in alle weiteren gefüllt. Anschließend wurden 100 µl der Standardlösung in das erste Röhrchen gemischt und dann aus diesem 500 µl in das zweite Röhrchen und so weiter bis zu einer minimalen Konzentration von 15,625 pg/ml. Wir verwendeten 1000 pg/ml als höchsten Standard und das Kalibrator-Verdünnungsmittel als Nullstandard.

3.10.2 Versuchsablauf

1. Vorbereitung der Reagenzien und des Standards
2. Zugabe von 100 µl Eichverdünnungslösung in alle Wells
3. Zugabe von 100 µl Probe oder Standardlösung
4. Inkubation für 3 Stunden bei Raumtemperatur
5. Verwerfen der Überstände, mehrfache Waschung mit der Waschpufferlösung und gründlich Entfernung der Reste
6. Zugabe von 200 µl des KGF-Konjugates in alle Wells
7. Inkubation für 105 Minuten bei Raumtemperatur

8. Verwerfen der Überstände, mehrfache Waschung mit der Waschpufferlösung und gründlich Entfernung der Reste
9. Zugabe von 200 µl Substratlösung in alle Wells
10. Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schutz der Platte vor Lichteinfall
11. Zugabe von 50 µl Stopplösung in alle Wells
12. Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm.

3.11 Proteinnachweis mittels Western-Blot

Um die Expression von KGF und dem KGF-Rezeptor in den Keratinozyten, Tumorzellen und Fibroblasten nachzuweisen, wurden deren Lysate für einen Western-Blot verwendet.

3.11.1 Herstellung der Lysate

Um die Proteine zu isolieren wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Abschaben der Zellen vom Flaschenboden und Aufnahme in kaltem PBS
2. 10 Minuten bei 4 °C und 1500 upm abzentrifugieren
3. Waschen mit kaltem PBS
4. 10 Minuten bei 4 °C und 1500 upm abzentrifugieren
5. Zellen in kaltem Lyse-Puffer aufnehmen
6. 1-2 Stunden bei 4°C auf dem Orbitalschüttler lysieren
7. Nach 1 Stunde einen Tropfen unter dem Mikroskop kontrollieren
8. Nach ausreichender Lyse 10 Minuten bei 4°C und 13000 upm abzentrifugieren
9. Überstand abnehmen und bei –80°C lagern
10. Für die Proteinbestimmung gleich einen Teil abnehmen.

3.11.2 Western-Blot

Zur Vorbereitung der gewonnenen Proteine wurden diese zunächst mit derselben Menge SDS Spaltpuffer in einen E-cup pipettiert und die entstandene Lösung für 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

Trenngele aus 10% Acrylamid und Trennpuffer (45,5g TRIS-Base, 1,0g SDS in 250 ml, pH 8,8) wurden in die Glaskassette eingefüllt und anschließend mit Propanol übergossen. Nach Abschluss der Polymerisation (45-60 Minuten) konnte das Propanol entfernt werden und ein 2%iges Sammelgel, sowie ein Trennkamm hinzugefügt werden. In die entstandenen Geltaschen wurde zunächst der Laufpuffer und dann 60 µg der zuvor vorbereiteten Proteine eingefüllt und anschließend die Elektrophorese mit 15mA durchgeführt. Für die immunologische Detektion von Proteinen wurden diese elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Western-Blot). Zum Transfer wurde ein elektrisches Feld mit 200mA und 10 Volt für 30 Minuten angelegt. Zur Kontrolle wurde anschließend eine Färbung der Nitrocellulose mit Ponceau-S-Rot-Lösung durchgeführt und die Membran danach unter fließendem Wasser abgespült. Der weitere Verlauf richtete sich nach dem Protokoll des verwendeten Western Breeze Kit der Firma Invitrogen.

3.11.3 Vorbereitungen:

Blocking Solution:

Zur Herstellung von 20ml Blocking Solution werden 14ml gefiltertes Wasser, 4ml Blocker/Diulent (Part A) und 2ml Blocker/Diulent (Part B) vermischt.

Primärantikörper-Lösung:

Hierzu wurde der Antikörper in 10ml Blocking Solution gelöst.

Antikörper-Waschlösung:

Hierzu wurden 10ml der im Kit enthaltenen Waschlösung mit 150ml gefiltertem Wasser verdünnt.

3.11.4 Versuchsablauf:

1. 30minütige Inkubation der Membran mit Blocking Solution zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen.
2. Abspülen der Membran mit 20ml Wasser für 5 Minuten (2x)

3. 60 min Inkubation mit 10ml Primärantikörper-Lösung
4. 5 min Waschen der Membran mit 20ml Antikörper-Waschlösung (3x)
5. 30 min Inkubation mit 10ml Sekundärantikörper-Lösung
6. 5 min Waschen der Membran mit 20ml Antikörper-Waschlösung (3x)
7. Abspülen der Membran mit 20ml Wasser für 5 Minuten (2x)
8. Inkubation mit 5ml Chromogenic Substrat bis lila Banden entstehen (1-60 min)
9. Abspülen der Membran mit 20ml Wasser für 5 Minuten (2x)
10. Trocknen der Membran an der Luft auf einem sauberen Filterpapier.

3.12 Real Time PCR zum Nachweis von KGF und KGFR

Die Vorbereitung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) und anhand der Instruktionen des Herstellers.

Es wurden lediglich die Proben verwendet, die eine OD_{260}/OD_{280} Ratio zwischen 1,7 und 2,0 ergaben. Unter Verwendung von Primern und Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde zunächst 1,0 μ g DNA mittels reverser Transkriptase gewonnen.

Hierfür wurde die RNA zunächst zur Anlage der Primer für 10 Minuten auf 60°C erhitzt. Anschließend wurde für die reverse Transkriptase die Temperatur für 10 Minuten auf 42°C gesenkt, gefolgt von 50 Minuten bei 25°C und 5 Minuten bei 95°C. Die entstandene cDNA wurde vor der Verwendung zur Real-Time PCR ausgiebig gewaschen.

Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression für KGF und KGFR erfolgte mittels RT-PCR unter Verwendung des Thermocyclers ABI PRISM 7700 (Perkin-Elmer-Applies Biosynthesis, Foster City, Ca; USA). Als Primer wurden folgende Sequenzen der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) verwendet:

KGF forw: ggC AAT CAA Agg ggT ggA

KGF rev: CCT CCg TTg TgT gTC CAT TTA

FGFR4 forw: Cgg CCT CTC CTA CCA gTC T

FGFR4rev: TgC Cgg Aag AgC CTg AC

Aktin forw: gCATCOCOCAAAGTTCACAA

Aktin rev: AggACTgggCCATTCTCCTT.

Die PCR erfolgte mittels des PCR-Master-Mix for Sybr Green 1 von Eurogentec (Seraing, Belgien) unter folgenden Konditionen:

- 2 Minuten 50°C
- 10 Minuten 95°C
- 40 Zyklen: 15 Sekunden 95°C und 1 Minute 60°C.

Alle Experimente erfolgten in zweifacher Ausführung.

Die quantitative Genexpression wurde mit Hilfe des delta-delta-CT-Wertes berechnet. Beim CT-Wert (auch Schwellenwert-Zyklus genannt) handelt es sich um den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Bei unseren Berechnungen der Expression von KGF und dem FGFR-2 Rezeptor wird die unterschiedliche Expression als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes angegeben. Die CT-Werte werden hierbei voneinander abgezogen (ΔCt), die beiden ΔCt -Werte der einzelnen Gruppen (mit und ohne Bestrahlung) voneinander abgezogen ($\Delta\Delta Ct$ -Wert) und in die Gleichung n-fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ eingesetzt.

3.13 Statistik

Zunächst wurden alle Daten auf den 24h Wert normiert. Anschließend wurden für alle Messzeitpunkte die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Zur Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede wurde der Student-t-Test verwendet. Das Signifikanzniveau p beträgt 0,05 und bezieht sich in den initialen Versuchen auf den Vergleich der mit den KGF behandelten mit den unbehandelten Zellen. In den weiteren Versuchen wurden zudem die Gruppen der mit dem KGF-Antikörper und dem IgG Antikörper behandelten Zellen sowie die Gruppen der bestrahlten und unbestrahlten Zellen auf signifikante Unterschiede überprüft.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt.

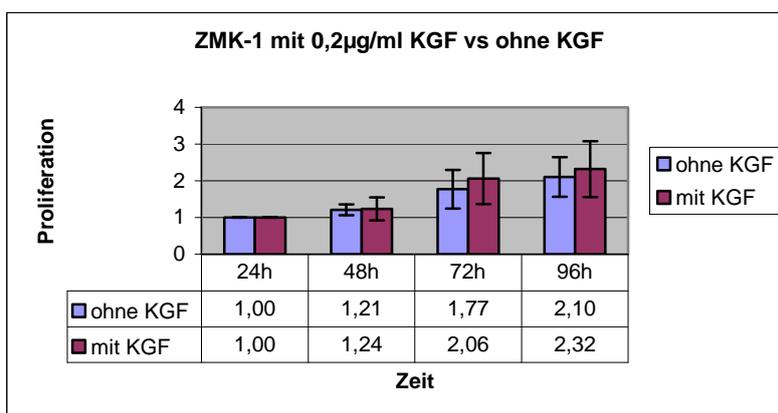
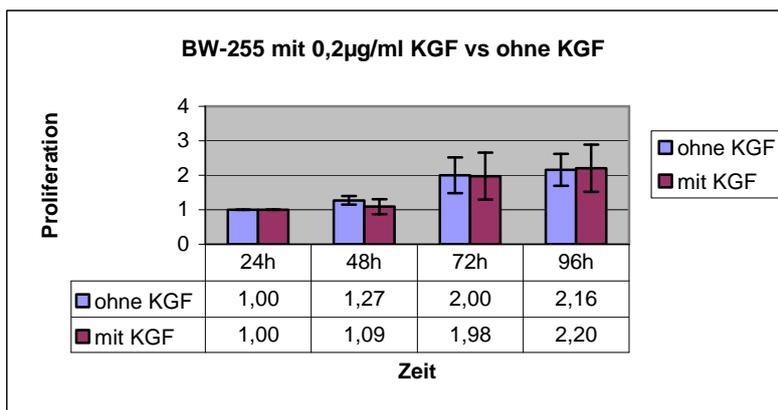
4 Ergebnisse

4.1 Proliferation der Tumorzellen unter dem Einfluss von KGF

Um einen eventuell vorhandenen Effekt von KGF auf die Proliferation der Tumorzellen nachzuweisen, wurde das Zellwachstum über 96h nach Zugabe von 0,2µg/ml rHuKGF mittels des CellTiterBlue-Viability-Test gemessen. Als Kontrolle wurde zudem die Wirkung von KGF auf die Proliferation von DF-19-Zellen untersucht, die zu den KGF-produzierenden Zellen zählen.

Um zu prüfen, ob die Zugabe von rHuKGF zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Proliferation der Tumorzellen führt, wurden die p-Werte der einzelnen Messergebnisse mittels des t-Tests ermittelt (Tab.7).

Es zeigte sich bei allen Zelllinien kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.



Fortsetzung S. 34

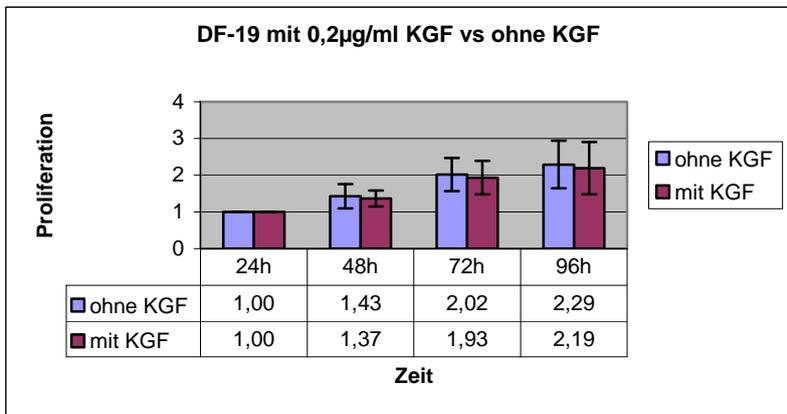
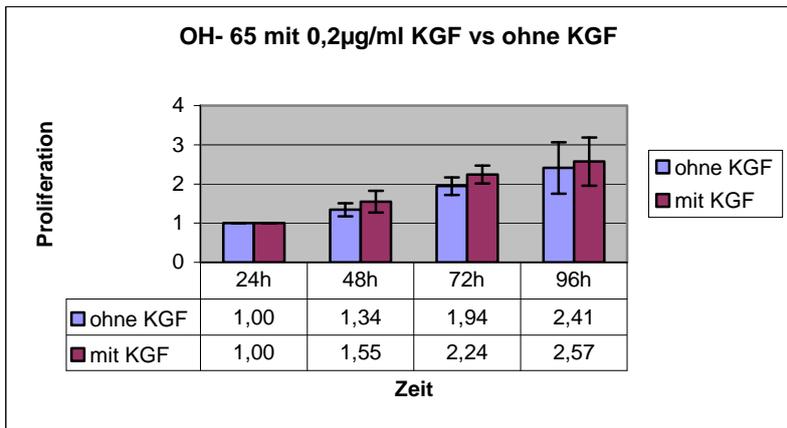
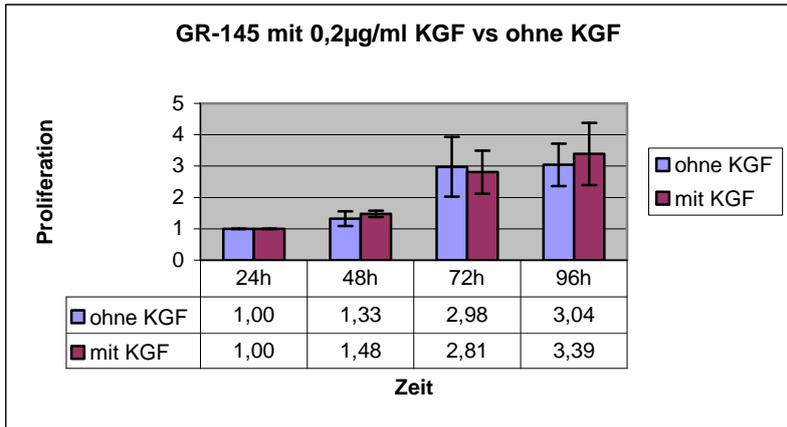


Abb. 2-6: Proliferation ohne und nach Zugabe von 0,2µg/mlKGF

Tab. 7: Proliferation ohne und mit Zugabe von 0,2µg/ml KGF

Zelllinie	Vergleich	p-Wert
BW-255	48-KGF vs 48+KGF	0,043
	72-KGF vs 72+KGF	0,924
	96+KGF vs 96-KGF	0,878
ZMK-1	48+KGF vs 48-KGF	0,807
	72+KGF vs 72-KGF	0,327
	96+KGF vs 96-KGF	0,498
GR-145	48+KGF vs 48-KGF	0,105
	72-KGF vs 72+KGF	0,673
	96+KGF vs 96-KGF	0,401
OH-65	48+KGF vs 48-KGF	0,077
	72+KGF vs 72-KGF	0,013
	96+KGF vs 96-KGF	0,601
DF-19	48-KGF vs 48+KGF	0,653
	72-KGF vs 72+KGF	0,709
	96-KGF vs 96+KGF	0,765

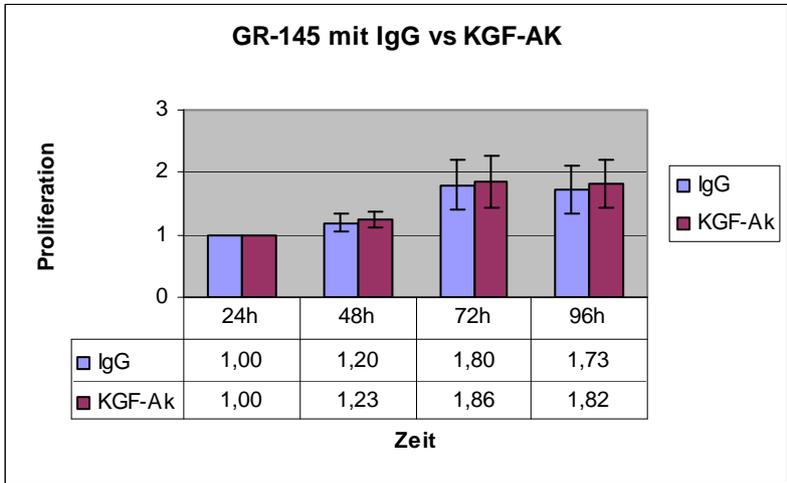
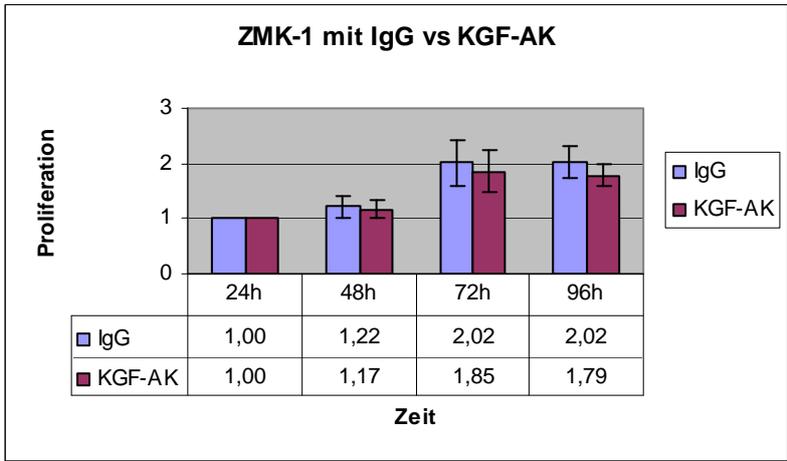
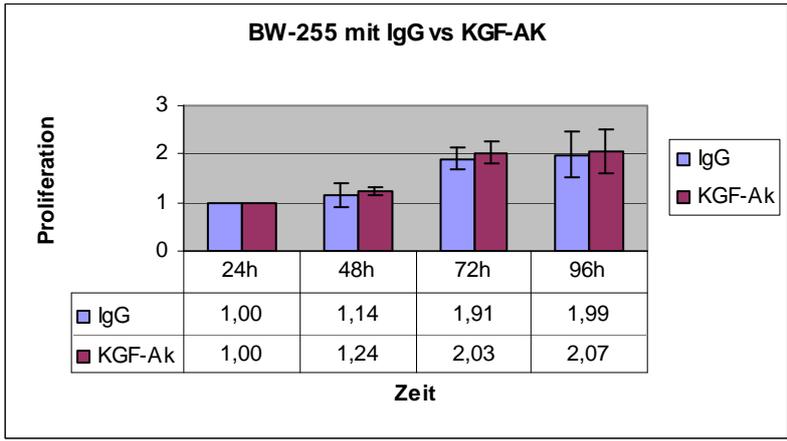
Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) bei allen verwendeten Zelllinien.

4.2 Proliferation der Tumorzellen unter dem Einfluss von KGF-Antikörper

Um einen eventuellen autokrinen Effekt des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf die Proliferation der Tumorzellen nachzuweisen, wurde das Zellwachstum nach Zugabe von 2µg/ml KGF-Antikörper gemessen. Der Kontrollgruppe wurde ein unspezifischer IgG-Antikörper hinzugefügt.

Um zu prüfen, ob die Zugabe des KGF-Antikörpers zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Proliferation der Tumorzellen führt, wurden die p-Werte der einzelnen Messergebnisse mittels des t-Tests ermittelt (Tab.8).

Hierbei ergab sich kein statistisch signifikanter Effekt auf die Proliferation der verwendeten Tumorzellen und Fibroblasten nach Zugabe des spezifischen KGF-Antikörpers.



Fortsetzung S.37

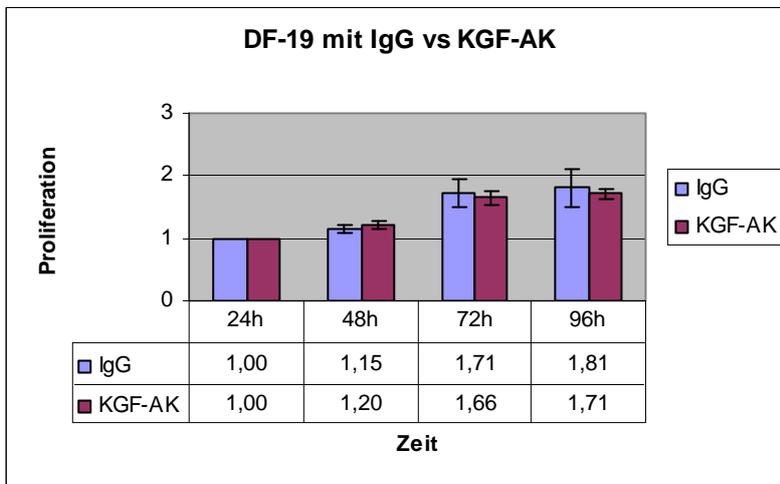
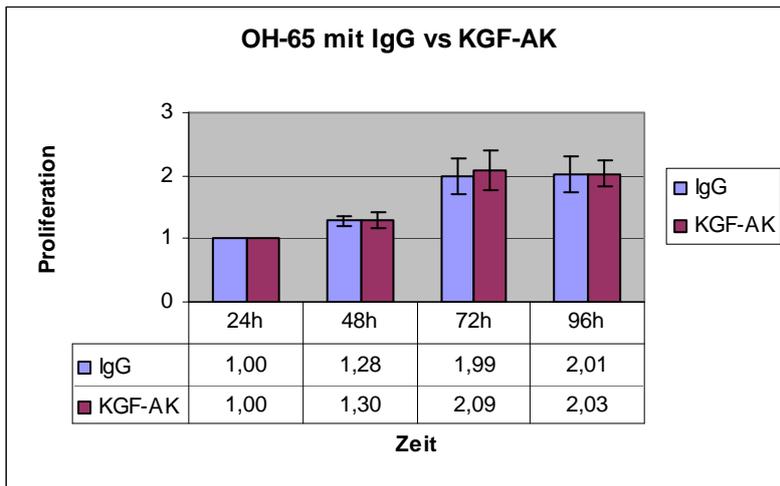


Abb. 7-11: Proliferation nach Zugabe von 2µg/ml KGF-Antikörper bzw. IgG-Antikörper

Tab. 8: Proliferation nach Zugabe von KGF-Antikörper (+AK) und IgG-Antikörper (-AK)

Zelllinie	Vergleich	p-Wert
BW-255	48+AK vs 48-AK	0,4611
	72+AK vs 72-AK	0,3449
	96+AK vs 96-AK	0,5263
ZMK-1	48-AK vs 48+AK	0,6449
	72-AK vs 72+AK	0,1650
	96-AK vs 96+AK	0,0521
GR-145	48+AK vs 48-AK	0,7786
	72+AK vs 72-AK	0,6378
	96+AK vs 96-AK	0,5233
OH-65	48+AK vs 48-AK	0,8816
	72+AK vs 72-AK	0,2709
	96+AK vs 96-AK	0,8149
DF19	48+AK vs 48-AK	0,4533
	72-AK vs 72+AK	0,4304
	96-AK vs 96+AK	0,1539

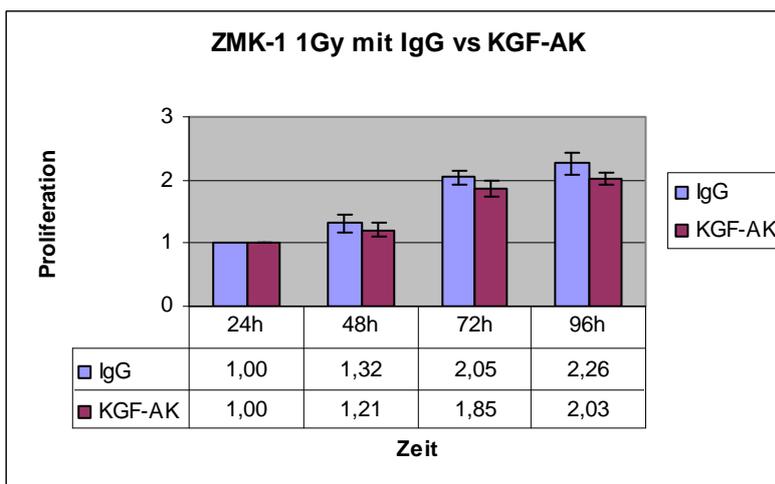
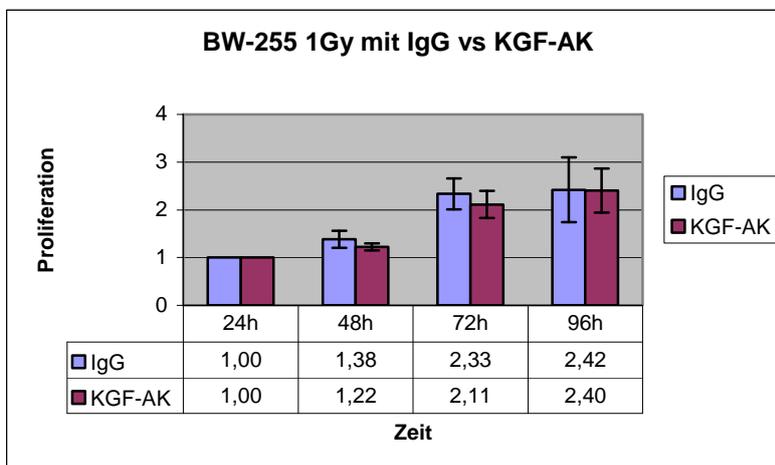
Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) bei allen Zelllinien.

4.3 Proliferation von bestrahlten Tumorzellen unter dem Einfluss von KGF-AK

Um einen eventuellen Effekt des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf die Strahlensensibilität der Zellen aufzuzeigen, wurden die Zelllinien zunächst mit 1 Gy bzw. 4 Gray bestrahlt und anschließend 2µg/ml KGF-Antikörper bzw. IgG-Antikörper hinzugefügt.

Um zu prüfen, ob die Zugabe des KGF-Antikörpers zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Proliferation der bestrahlten Tumorzellen führt, wurden die p-Werte der einzelnen Messergebnisse mittels des t-Tests ermittelt (Tab.9-10).

Hierbei zeigte sich lediglich bei den mit 1 Gray bestrahlten ZMK-1 Zellen ein signifikanter Effekt auf die Strahlenempfindlichkeit. Bei allen weiteren untersuchten Zelllinien führte die Zugabe des KGF-Antikörpers zu keiner Beeinflussung der Strahlenempfindlichkeit.



Fortsetzung S.39

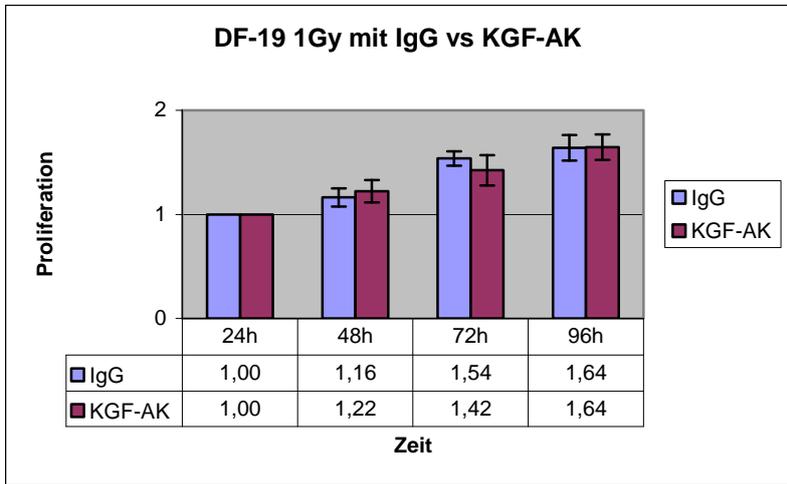
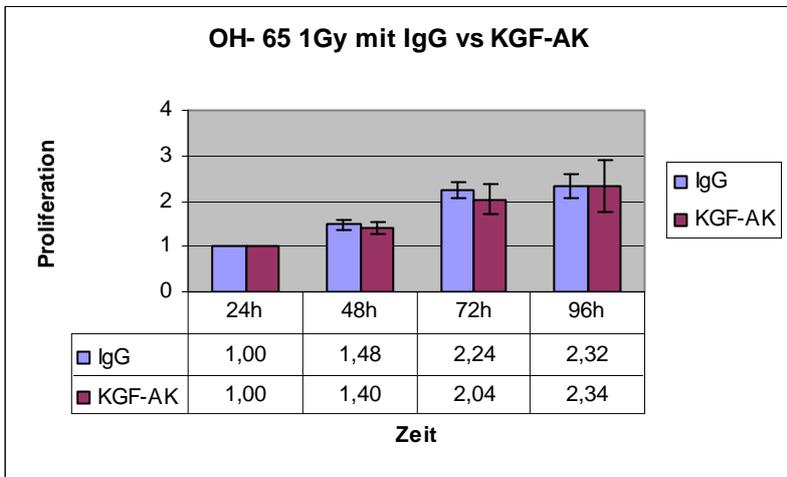
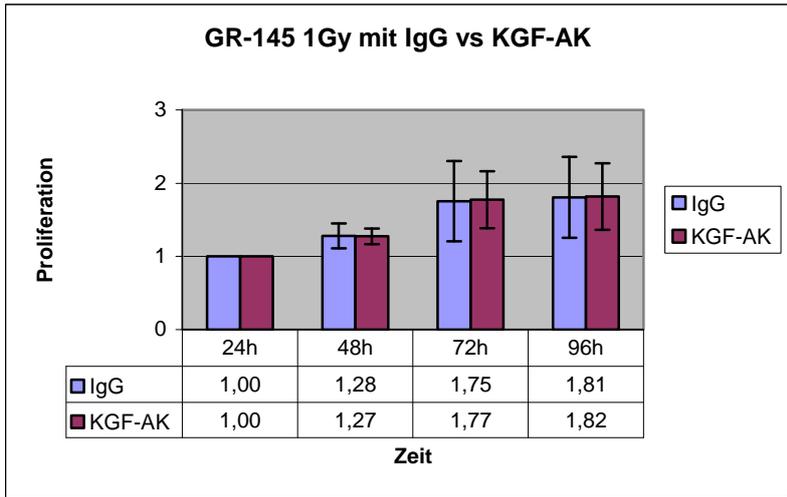
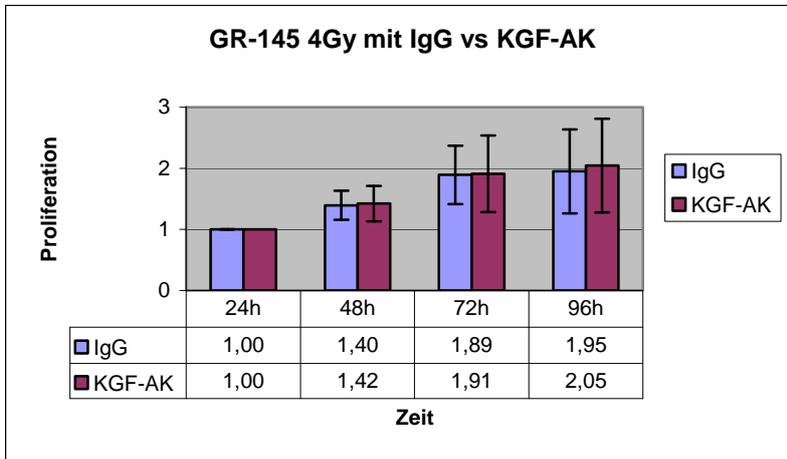
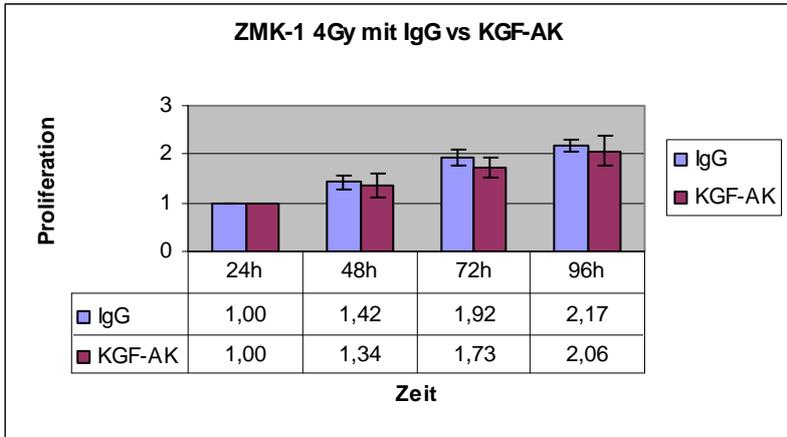
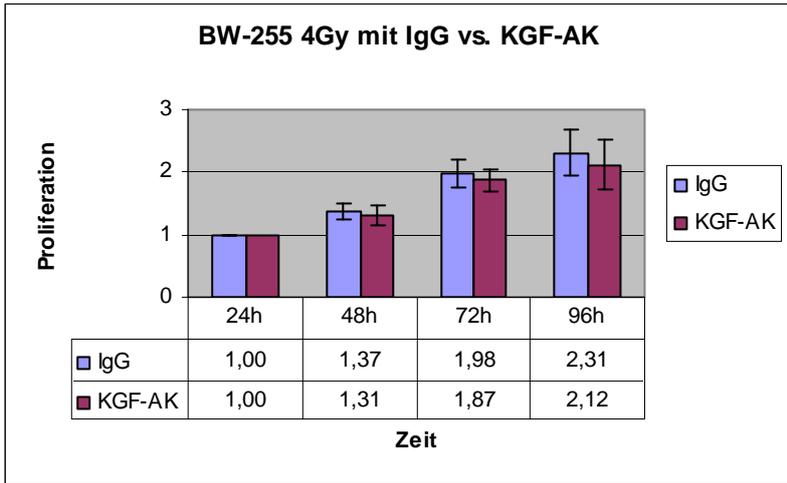


Abb. 12-16: Proliferation der mit 1 Gray bestrahlten Zelllinien nach Zugabe von 2µg/ml KGF-Antikörper bzw. IgG-Antikörper



Fortsetzung S.41

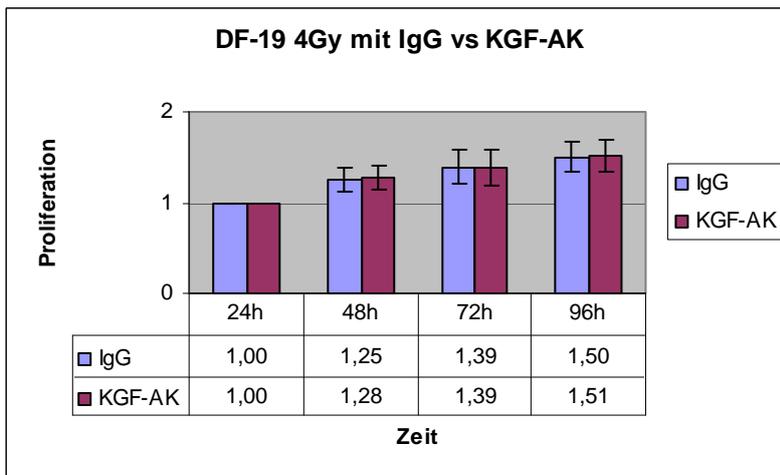
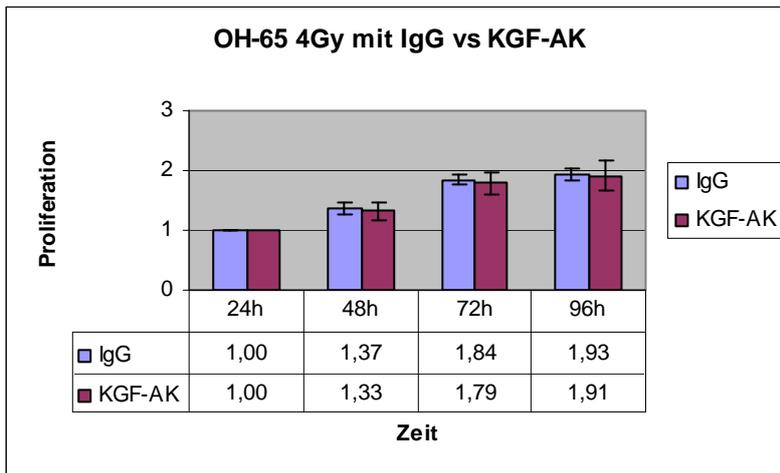


Abb. 17-21: Proliferation der mit 4 Gray bestrahlten Zelllinien nach Zugabe von 2µg/ml KGF-Antikörper bzw. IgG-Antikörper

Tab. 9-10: Proliferation nach Zugabe von 2µg/ml KGF-Antikörper (+AK) bzw. IgG-Antikörper (-AK) an bestrahlten Zelllinien

1 Gy			4 Gy		
Zelllinie	Vergleich	p-Wert	Zelllinie	Vergleich	p-Wert
BW-255	48-AK vs 48+AK	0,032	BW-255	48-AK vs 48+AK	0,352
	72-AK vs 72+AK	0,143		72-AK vs 72+AK	0,280
	96-AK vs 96+AK	0,957		96-AK vs 96+AK	0,301
ZMK-1	48-AK vs 48+AK	0,085	ZMK-1	48-AK vs 48+AK	0,431
	72-AK vs 72+AK	0,003		72-AK vs 72+AK	0,044
	96-AK vs 96+AK	0,002		96-AK vs 96+AK	0,357
GR-145	48-AK vs 48+AK	0,930	GR-145	48+AK vs 48-AK	0,824
	72+AK vs 72-AK	0,924		72+AK vs 72-AK	0,954
	96+AK vs 96-AK	0,963		96+AK vs 96-AK	0,783
OH-65	48-AK vs 48+AK	0,187	OH-65	48-AK vs 48+AK	0,555
	72-AK vs 72+AK	0,134		72-AK vs 72+AK	0,508
	96+AK vs 96-AK	0,921		96-AK vs 96+AK	0,864
DF19	48+AK vs 48-AK	0,207	DF19	48+AK vs 48-AK	0,687
	72-AK vs 72+AK	0,057		72-AK vs 72+AK	0,935
	96+AK vs 96-AK	0,941		96+AK vs 96-AK	0,888

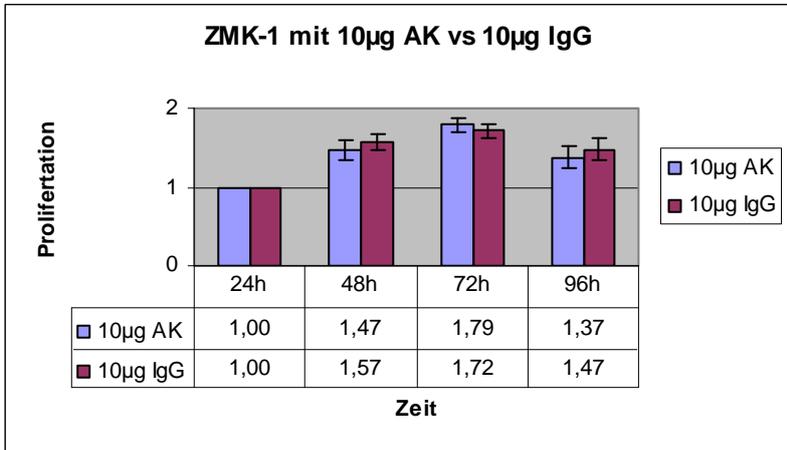
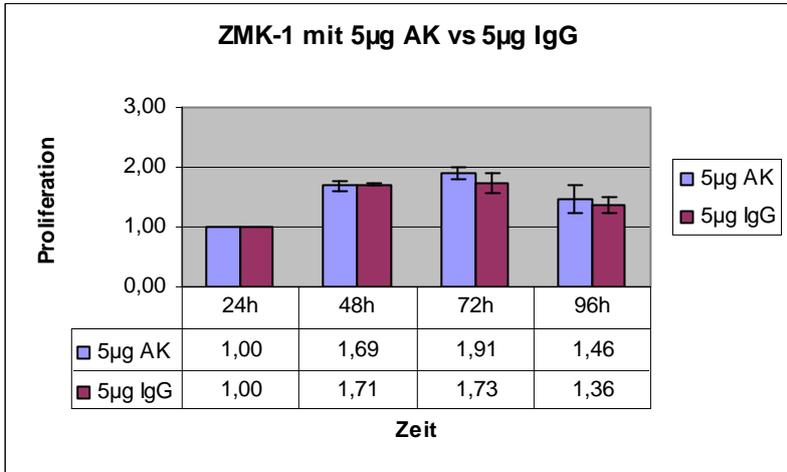
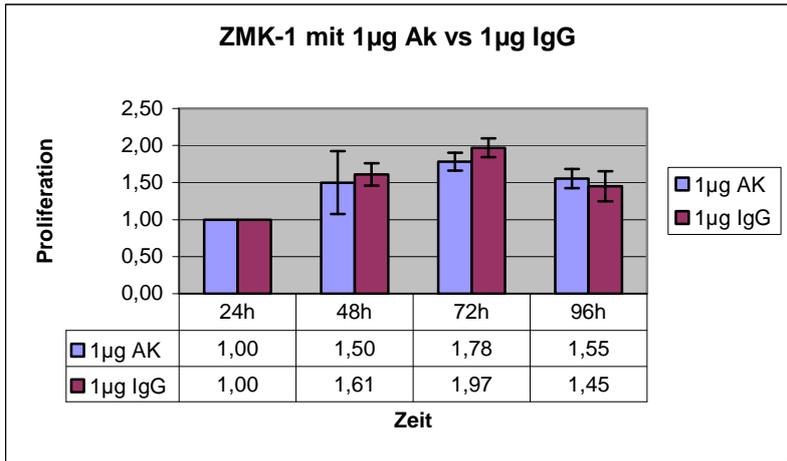
Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) bei den ZMK-1-Zellen nach Bestrahlung mit 1 Gray.

4.4 Wirkung des KGF-Antikörpers auf die Proliferation der ZMK-1-Zellen

Da sich in den zuvor durchgeführten Versuchen keine Wirkung des Antikörpers auf die Proliferation der Tumorzellen gezeigt hatte, sollte mit diesem Versuch eine zu geringe Antikörperkonzentration als Ursache ausgeschlossen werden. Nachdem im Elisa die maximale KGF-Menge bei den ZMK-1-Zellen gemessen wurde, wurde die Proliferation dieser Zellreihe über 96 Stunden nach Zugabe von 1, 5, 10 und 20µg/ml KGF-Antikörper gemessen. Als Kontrolle wurde ein unspezifischer IgG-Antikörper verwendet.

Um zu prüfen, ob die Zugabe des KGF-Antikörpers zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Proliferation der ZMK-1-Zellen führt, wurden die p-Werte der einzelnen Messergebnisse mittels des t-Tests ermittelt (Tab.11-14).

Unabhängig von der verwendeten Antikörperkonzentration zeigte sich kein Effekt des KGF-Antikörpers auf die Proliferation der ZMK-1-Zellen.



Fortsetzung S.44

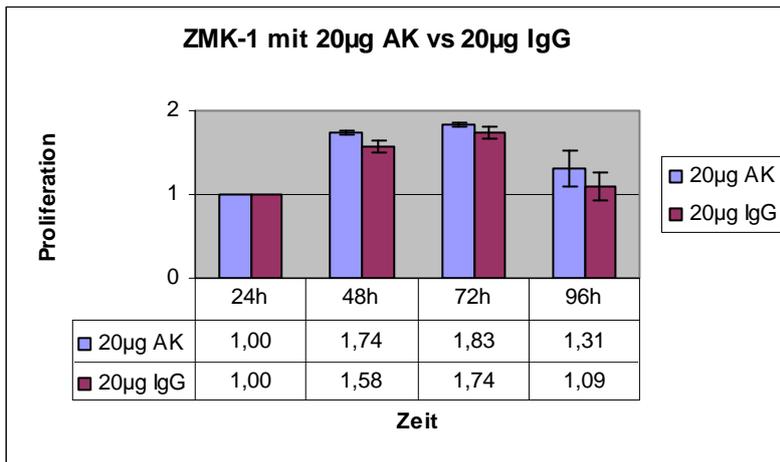


Abb. 22-25: Proliferation der ZMK-1-Zellen nach Zugabe von 1, 5, 10, 20µg/ml KGF- bzw. IgG-Antikörper

Tab. 11-14: Proliferation der ZMK-1-Zellen nach Zugabe von 1, 5, 10 und 20 µg/ml KGF-Antikörper (+AK) und IgG-Antikörper (-AK)

1µg AK	
Vergleich	p
lgG 48h vs. AK 48h	0,696
lgG 72h vs. AK 72h	0,140
AK 96h vs. lgG 96h	0,508
10µg AK	
Vergleich	p
48h+lgG vs. 48h+AK	0,387
72h+AK vs. 72h+lgG	0,392
96h+lgG vs. 96h+AK	0,417

5µg AK	
Vergleich	p
48h+lgG vs. 48h+AK	0,727
72h+AK vs. 72h+lgG	0,219
96h+AK vs. 96h+lgG	0,562
20µg AK	
Vergleich	p
48h+AK vs. 48h+lgG	0,054
72h+lgG vs. 72h+AK	0,176
96h+AK vs. 96h+lgG	0,224

4.5 Beeinflussung der Proliferation epithelialer Zellen durch rekombinantes humanes KGF (rHuKGF)

Um die positive Wirkung von rekombinantem humanen KGF auf die Proliferation von epithelialen Zellen aufzuzeigen, wurde ein CellTiter-Blue-Viability-Assay mit jeweils 2000 primären Keratinozyten nach Zugabe von 0, 0,2, 0,5 und 1,0 $\mu\text{g/ml}$ rHuKGF durchgeführt. Die unterschiedlichen KGF-Konzentrationen sollten dabei die optimale Konzentration für die weiteren Versuche ergeben. Um zu prüfen, ob die Zugabe des rHuKGFs zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Proliferation der primären Keratinozyten führt, wurden die p-Werte der einzelnen Messergebnisse mittels des t-Tests berechnet (Tab.15).

Dabei zeigte sich ein signifikanter Proliferationsanstieg bei allen verwendeten KGF-Konzentrationen. Da sich die Wachstumskurven nach Zugabe der unterschiedlichen KGF-Konzentrationen jedoch nicht signifikant unterschieden, wurde für die weiteren Versuche mit einer Zugabe von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ KGF gearbeitet.

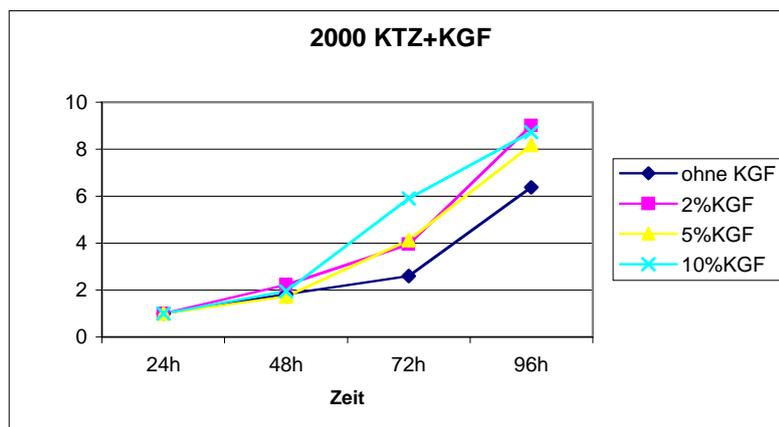


Abb. 26: Wachstumskurven der primären Keratinozyten nach Zugabe von 0, 0,2 (2%), 0,5 (5%) und 1,0 (10%) $\mu\text{g/ml}$ KGF

Tab. 15: Vergleich der Wachstumskurven nach Zugabe von 0, 0,2 (2%), 0,5 (5%) und 1,0 (10%)µg/ml rHuKGF

Vergleiche	p-Werte
48+2% vs. 48 ohne	0.4581
72+2% vs. 72 ohne	0.0195
96+2% vs. 96 ohne	< .0001
48h 5% vs. 48h ohne	0.6576
72h 5% vs. 72h ohne	< .0001
96h 5% vs. 96h ohne	0.3604
48h 10% vs. 48h ohne	0.6784
72h 10% vs. 72h ohne	< .0001
96h 10% vs. 96h ohne	< .0001
48h 10% vs. 48h 2%	0.4628
72h 10% vs. 72h 2%	< .0001
96h 10% vs. 96h 2%	0.4932
48h 5% vs. 48h 2%	0.1738
72h 5% vs. 72h 2%	0.6374
96h 5% vs. 96h 2%	< .0001
48h 10% vs. 48h 5%	0.5184
72h 10% vs. 72h 5%	< .0001
96h 10% vs. 96h 5%	< .0001

4.6 Beeinflussung der Proliferation von bestrahlten primären Keratinozyten nach Zugabe von rHuKGF und KGF-AK

In diesem Versuchsansatz sollte geprüft werden, ob sich ein Effekt vom rHuKGF auf die Strahlentoleranz der primären Keratinozyten durch Zugabe des spezifischen KGF-Antikörpers aufheben lässt.

Nach 96 Stunden zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte Strahlensensibilität der primären Keratinozyten. Durch Zugabe des KGF-Antikörpers konnte dieser Effekt aufgehoben werden.

Um zu prüfen, ob die Zugabe des KGF-Antikörpers zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Strahlentoleranz der primären Keratinozyten führt, wurden die p-Werte der einzelnen Messergebnisse mittels des t-Tests ermittelt (Tab.16-17).

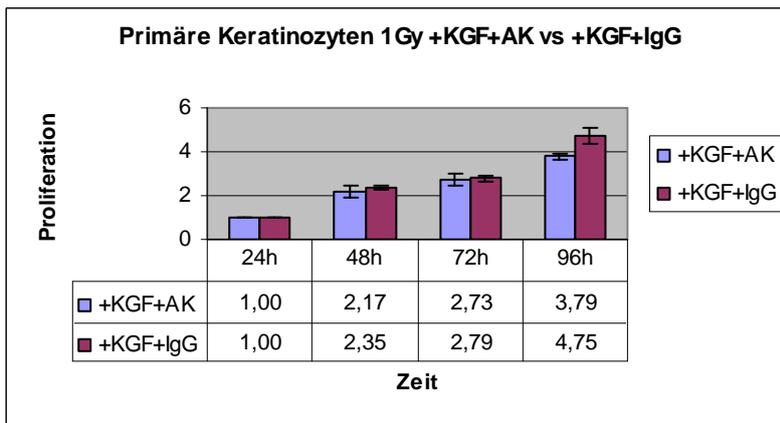
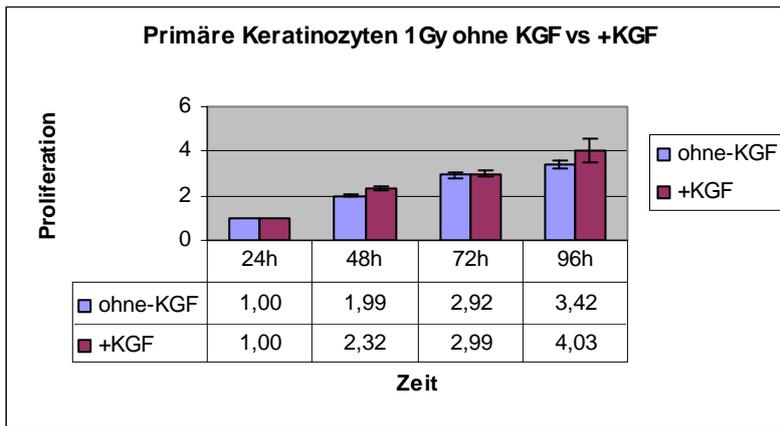


Abb. 27-28: Proliferation der bestrahlten primären Keratinozyten (1 Gray) nach Zugabe von KGF- bzw. IgG-Antikörper

Tab. 16-17: Proliferation nach Zugabe von KGF- bzw. IgG-Antikörper, 1 Gray

ohne vs +KGF	
Vergleich	p-Wert
48+KGF vs 48 ohne	0,0035
72+KGF vs 72 ohne	0,6852
96+KGF vs 96 ohne	0,1857

+KGF+IgG vs +KGF+AK	
Vergleich	p-Wert
48+KGF+IgG vs 48+KGF+AK	0,431
72+KGF+IgG vs 72+KGF+AK	0,7945
96+KGF+IgG vs 96+KGF+AK	0,0289

Ein weiterer Versuch mit Zellen, die zuvor mit 4 Gray bestrahlt wurden, ergab eine signifikante protektive Wirkung des KGF. Die zusätzliche Zugabe des KGF-Antikörpers führte auch hier erneut nach 72h zu einer verminderten Proliferation der primären Keratinozyten.

Um zu prüfen, ob die Zugabe des KGF-Antikörpers zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Strahlentoleranz der primären Keratinozyten führt, wurden die p-Werte der einzelnen Messergebnisse mittels des t-Test ermittelt (Tab.18-19).

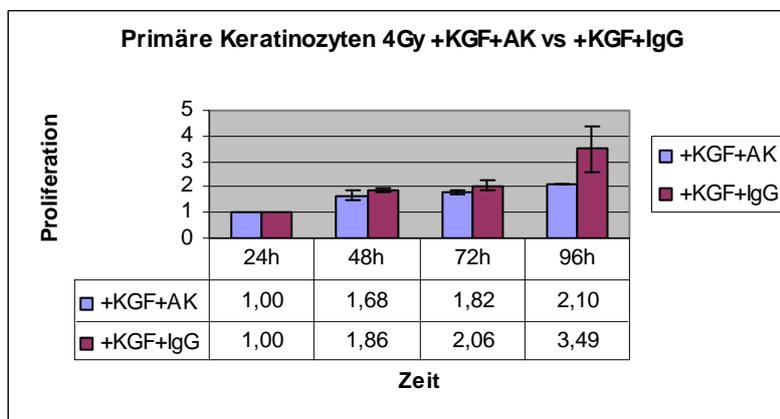
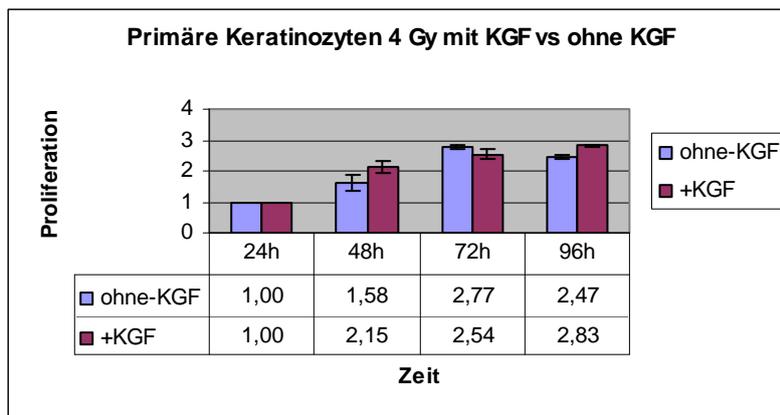


Abb. 29-30: Proliferation der bestrahlten primären Keratinozyten (4 Gray) nach Zugabe von KGF- bzw. IgG-Antikörper

Tab. 18-19: Proliferation nach Zugabe von KGF- bzw. IgG-Antikörper, 4 Gray

ohne vs +KGF	
Vergleich	p-Wert
48+KGF vs 48 ohne	0.1384
72 ohne vs 72+KGF	0,0292
96+KGF vs 96 ohne	0,0411

KGF+IgG vs KGF+AK	
Vergleich	p-Wert
48+KGF+IgG vs 48+KGF+AK	0,2372
72+KGF+IgG vs 72+KGF+AK	0,0316
96+KGF+IgG vs 96+KGF+AK	0,884

4.7 Nachweis von KGF in Zellüberständen mittels ELISA

Der ELISA wurde zum Nachweis von KGF in den Überständen der Tumorzellen und der Fibroblasten durchgeführt. Aus den gewonnenen Resultaten wurde anschließend die benötigte KGF-Antikörpermenge für die weiteren Versuche ermittelt.

In allen Tumorzellüberständen konnte KGF nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration von KGF wurde bei den ZMK-1-Zellen gemessen. Es wurden folgende Konzentrationen gemessen:

Tab. 20: Durchschnittlich ermittelte KGF-Konzentrationen in den Tumorzellüberständen

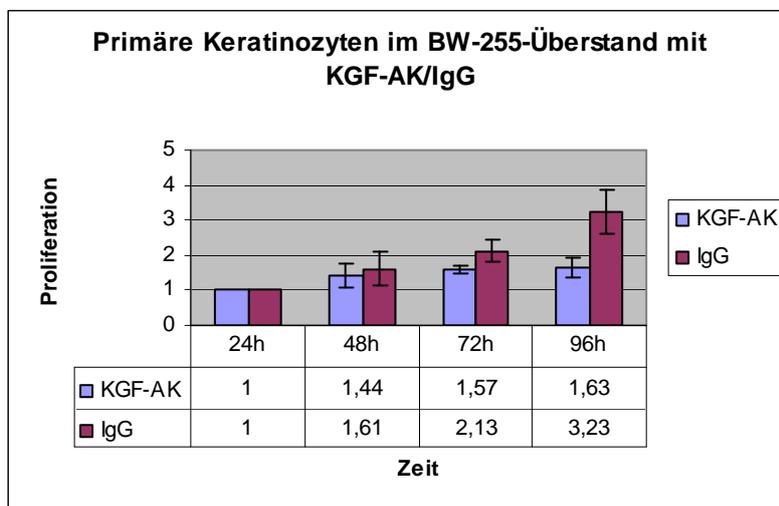
BW-255	95,5 pg/ml
GR-145	59,8 pg/ml
ZMK-1	329,0 pg/ml
OH-65	23,0 pg/ml
DF-19	23,7 pg/ml

4.8 Wirkung des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf die Proliferation der primären Keratinozyten

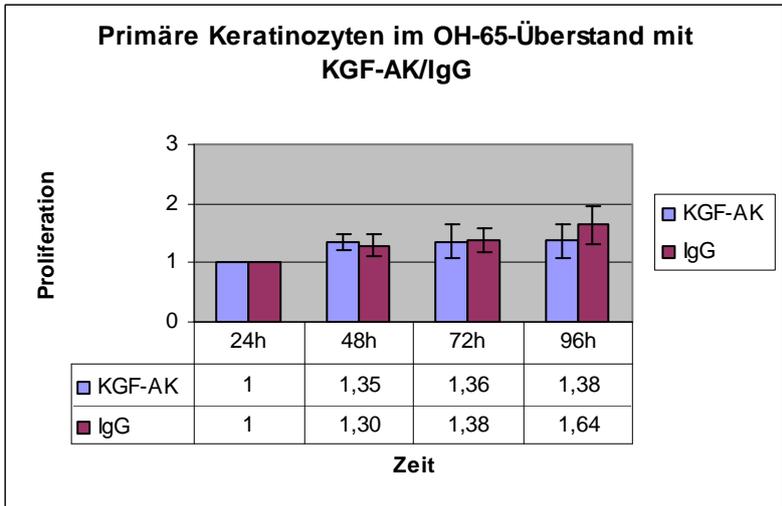
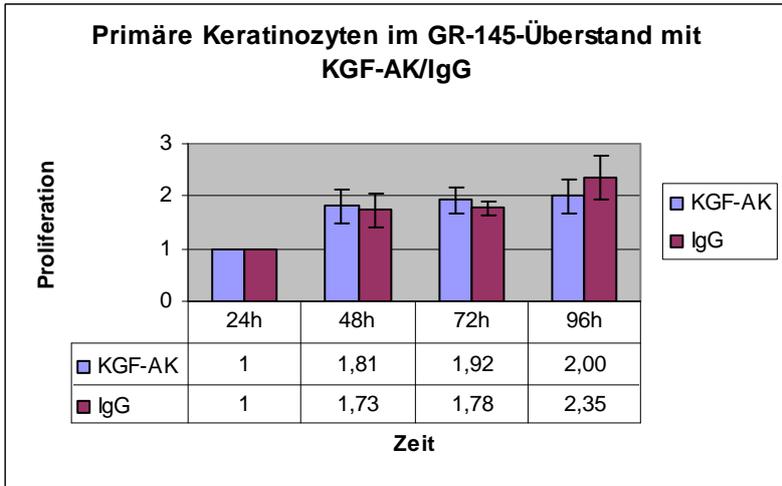
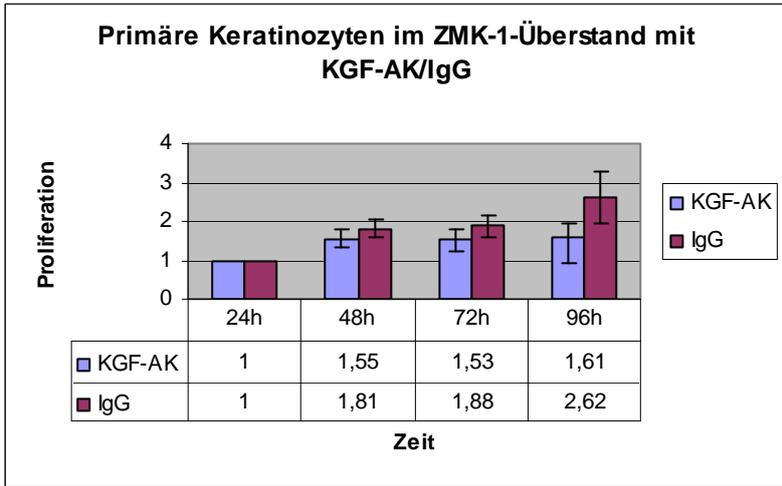
In diesem Versuch wurden die primären Keratinozyten in den zuvor gewonnenen Überständen der Tumorzellen in An- und Abwesenheit eines spezifischen KGF-Antikörpers (2µg/ml) ausgeimpft, um zu prüfen, ob das von den Tumorzellen sezernierte KGF eine positive Wirkung auf die Proliferation der primären Keratinozyten hat.

Es zeigte sich eine deutlich verringerte Proliferation durch die Zugabe des KGF-Antikörpers bei den Keratinozyten im BW-255-Überstand. Bei den Keratinozyten im ZMK-1- und DF19-Überstand kam es erst nach 72 Stunden zu diesem Effekt. Bei den Zellen im OH-65- und GR-145-Überstand sowie den primären Keratinozyten im spezifischen KGF-freien Medium ließ sich keine Wirkung des Antikörpers nachweisen.

Um zu prüfen, ob die Zugabe des KGF-Antikörpers zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Proliferation der im Tumorzellüberstand ausgeimpften primären Keratinozyten führt, wurden die p-Werte der einzelnen Messergebnisse mittels des t-Test ermittelt (Tab. 21-26).



Fortsetzung S.51



Fortsetzung S.52

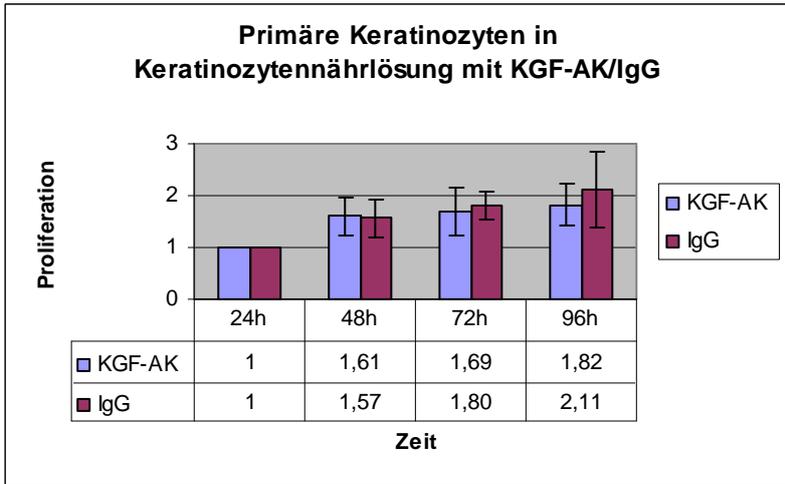
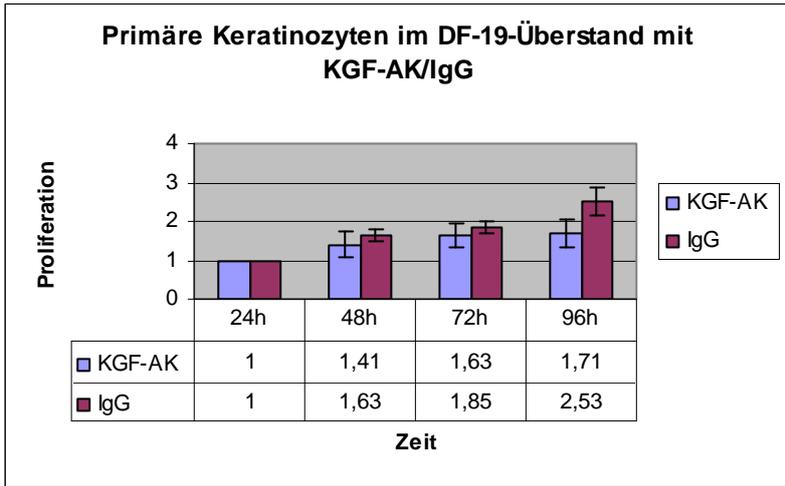


Abb. 31-36: Proliferation der primären Keratinozyten nach Zugabe von Tumorzellüberständen

Tab. 21-26: Proliferation der primären Keratinozyten nach Zugabe von Tumorzellüberständen

BW-255	
Vergleich	p-Wert
48h+AK vs. 48h+IgG	0,3985
72h+AK vs. 72h+IgG	0,0002
96h+AK vs. 96h+IgG	0,0000

GR-145	
Vergleich	p-Wert
48h+IgG vs. 48h+AK	0,6394
72h+IgG vs. 72h+AK	0,1442
96h+AK vs. 96h+IgG	0,0606

DF-19	
Vergleich	p-Wert
48h+AK vs. 48h+IgG	0,0916
72h+AK vs. 72h+IgG	0,0777
96h+AK vs. 96h+IgG	0,0002

ZMK-1	
Vergleich	p-Wert
48h+IgG vs. 48h+AK	0,0280
72h+AK vs. 72h+IgG	0,0156
96h+AK vs. 96h+IgG	0,0011

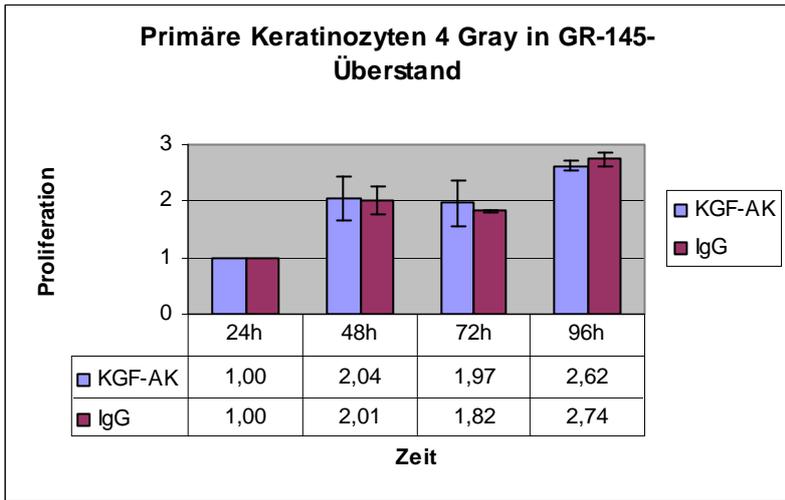
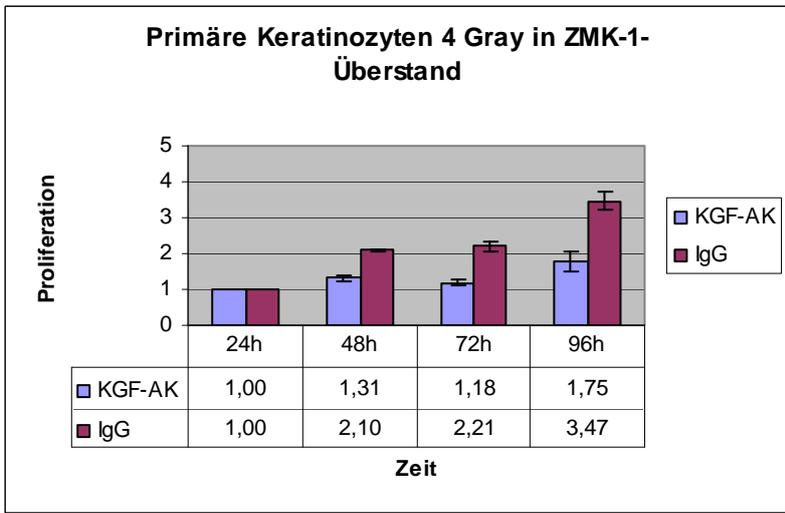
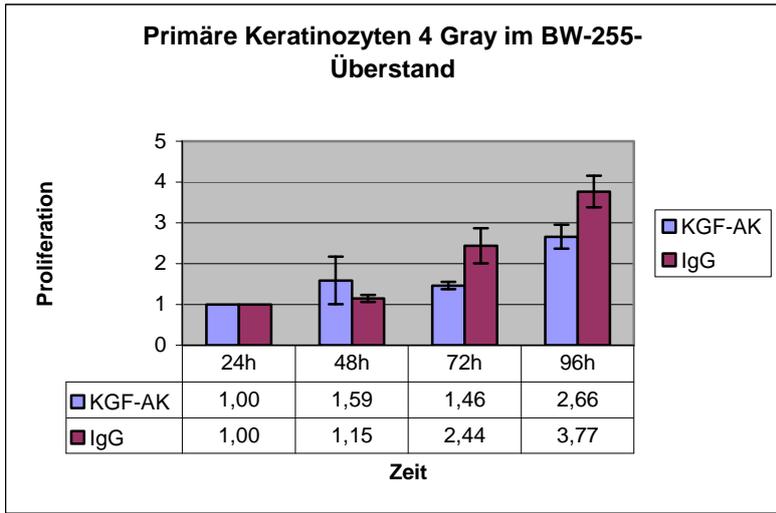
OH-65	
Vergleich	p-Wert
48h+IgG vs. 48h+AK	0,4705
72h+IgG vs. 72h+AK	0,8612
96h+AK vs. 96h+IgG	0,0879

KNL	
Vergleich	p-Wert
48h+AK vs. 48h+IgG	0,8399
72h+AK vs. 72h+IgG	0,5413
96h+AK vs. 96h+IgG	0,3168

4.9 Wirkung des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf die Strahlensensibilität der primären Keratinozyten

Um einen eventuellen Effekt des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf die Strahlensensibilität der primären Keratinozyten nachzuweisen, wurde der oben genannte Versuch nochmals mit bestrahlten primären Keratinozyten durchgeführt.

Hierbei ergab sich eine verminderte Strahlensensibilität nach Zugabe des KGF-Antikörpers bei den Zellen im BW-255-, ZMK-1- und DF19-Überstand. Bei den Keratinozyten im GR-145- und OH-65-Überstand sowie bei der Kontrolle in der Keratinozytennährlösung zeigte sich kein Effekt. Um zu prüfen, ob die Zugabe des KGF-Antikörpers zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Strahlentoleranz der in Tumorzellüberständen ausgeimpften primären Keratinozyten führt, wurden die p-Werte der einzelnen Messergebnisse mittels des t-Test ermittelt (Tab.27-31). Es zeigte sich eine statistisch signifikante Beeinflussung der Strahlentoleranz bei den primären Keratinozyten im BW-255-, ZMK-1- und DF-19-Überstand.



Fortsetzung S.55

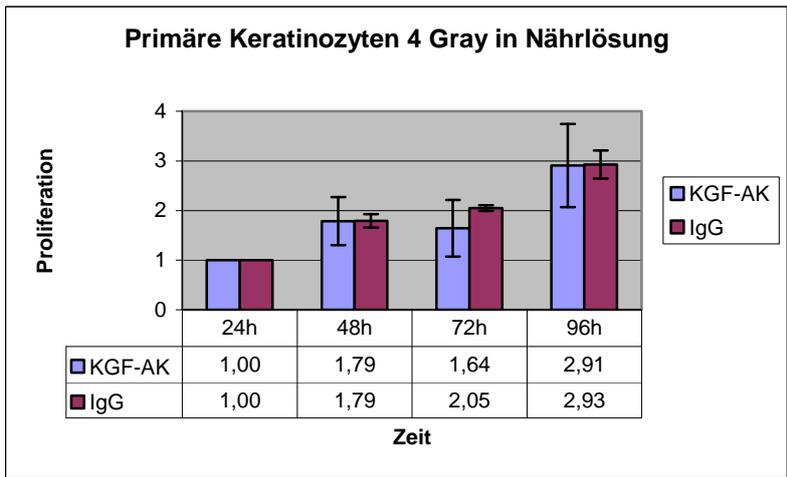
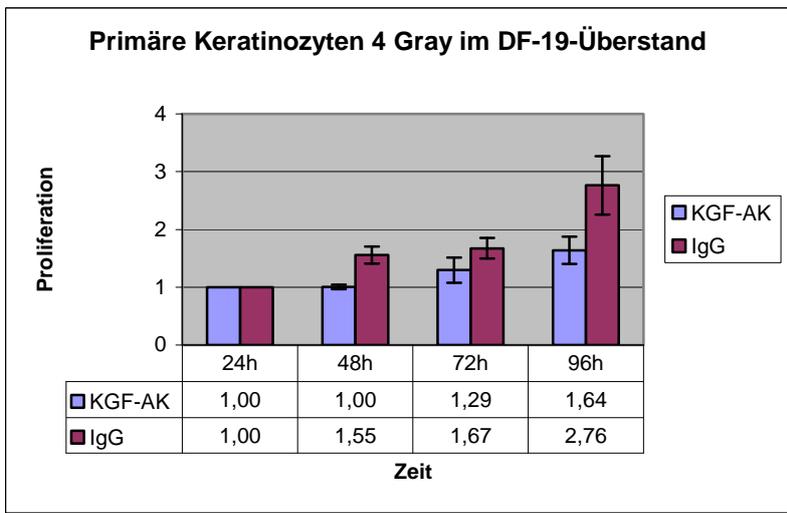
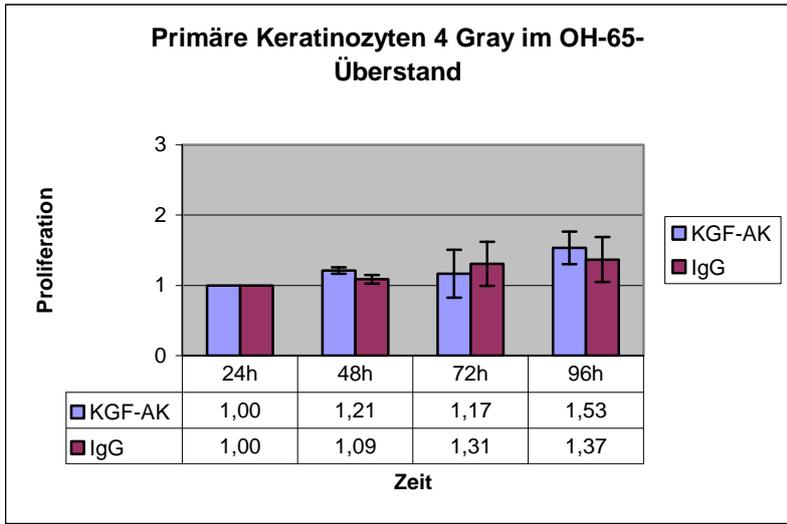


Abb. 37-42: Proliferation der bestrahlten primären Keratinozyten nach Zugabe von Tumorzellüberständen

Tab. 27-31: Proliferation nach Zugabe von Tumorzellüberständen

BW-255 4Gy	
Vergleich	p-Wert
48h+IgG vs. 48h+AK	0,2653
72h+AK vs. 72h+IgG	0,0183
96h+AK vs. 96h+IgG	0,0166

ZMK-1 4Gy	
Vergleich	p-Wert
48h+AK vs. 48h+IgG	0,0002
72h+AK vs. 72h+IgG	0,0004
96h+AK vs. 96h+IgG	0,0014

GR-145 4Gy	
Vergleich	p-Wert
48h+IgG vs. 48h+AK	0,9092
72h+IgG vs. 72h+AK	0,5548
96h+AK vs. 96h+IgG	0,2264

OH-65	
Vergleich	p-Wert
48h+IgG vs. 48h+AK	0,0563
72h+AK vs. 72h+IgG	0,6270
96h+IgG vs. 96h+AK	0,5072

DF-19 4Gy	
Vergleich	p-Wert
48h+AK vs. 48h+IgG	0,0035
72h+AK vs. 72h+IgG	0,0811
96h+AK vs. 96h+IgG	0,0254

4.10 KGF- und KGF-Rezeptor (KGFR)-Nachweis mittels Western-Blot

Zum Nachweis von KGF- und KGFR in den Tumorzelllinien, Fibroblasten und den Keratinozyten wurde ein Western-Blot durchgeführt. Die Tumorzelllinien wurden zuvor mit 4 Gray bestrahlt.

Hierbei konnte das KGF-Protein in allen Zelllinien nachgewiesen werden.

Der KGF-Rezeptor zeigte sich lediglich in den Keratinozyten.

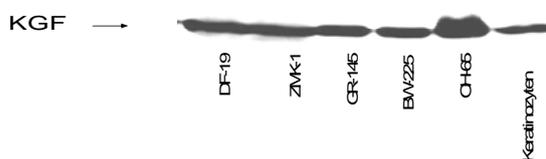


Abb. 43: KGF-Nachweis mittels Western-Blot

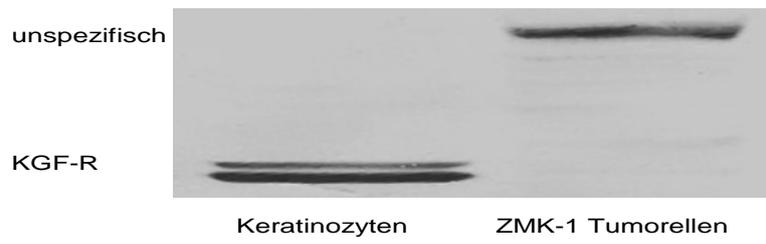


Abb. 44: KGF-Rezeptor-Nachweis mittels Western-Blot

4.11 Nachweis von KGF und KGF-Rezeptor auf RNA-Ebene mittels PCR

Nachdem bereits im ELISA in allen verwendeten Zelllinien und im Western-Blot bei allen Zelllinien eine KGF-Expression nachgewiesen wurde, wurde zudem ein Nachweis von KGF und dem KGF-Rezeptor auf RNA-Ebene mittels PCR versucht. Die PCR wurde bei allen in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien BW-255, ZMK-1, GR-145 und OH-65, den Fibroblasten DF-19, den primären Keratinozyten und zudem bei den HaCat-Zellen durchgeführt.

Der KGF-Nachweis gelang auf RNA-Ebene bei allen Tumorzelllinien und den Fibroblasten, wobei wie im zuvor durchgeführten ELISA die höchste Konzentration bei den ZMK-1-Zellen gemessen wurde. Auch bei den primären Keratinozyten und den HaCat-Zellen konnte eine KGF-Expression nachgewiesen werden.

Die Bestrahlung führte bei den primären Keratinozyten, HaCat-Zellen sowie bei den BW-255- und GR-145-Zellen zu einer vermehrten Transkript-Expression, während bei den OH-65 und den ZMK-1-Zellen eine verminderte Expression von KGF nachgewiesen wurde.

Bei den KGF-Rezeptoren bezog sich die PCR auf die Untergruppe FGFR2. Der FGFR2-Rezeptor konnte bei den Keratinozyten und den HaCat-Zellen nachgewiesen werden.

Im Bezug auf den FGFR2-Rezeptor kam es nach Bestrahlung zu einer gesteigerten Expression bei den Keratinozyten und den HaCat-Zellen, jedoch führte die 4-Gray-Dosis bei letzteren bereits zu einer verminderten Synthese.

Die KGF- bzw. FGFR-Expression ohne Bestrahlung wurde auf 1 normiert. Die Werte bei 1 und 4 Gray bzw. nach 6 und 24 Stunden geben somit an, um welchen Faktor sich die Expression durch die entsprechende Bestrahlung geändert hat.

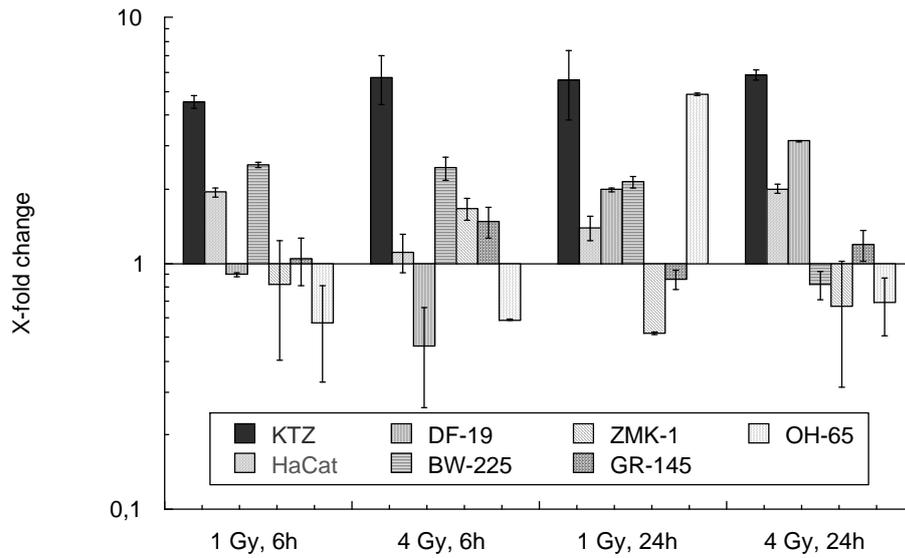


Abb. 45: Wirkung der Bestrahlung auf die KGF-Expression in Keratinozyten, Tumorzellen und Fibroblasten

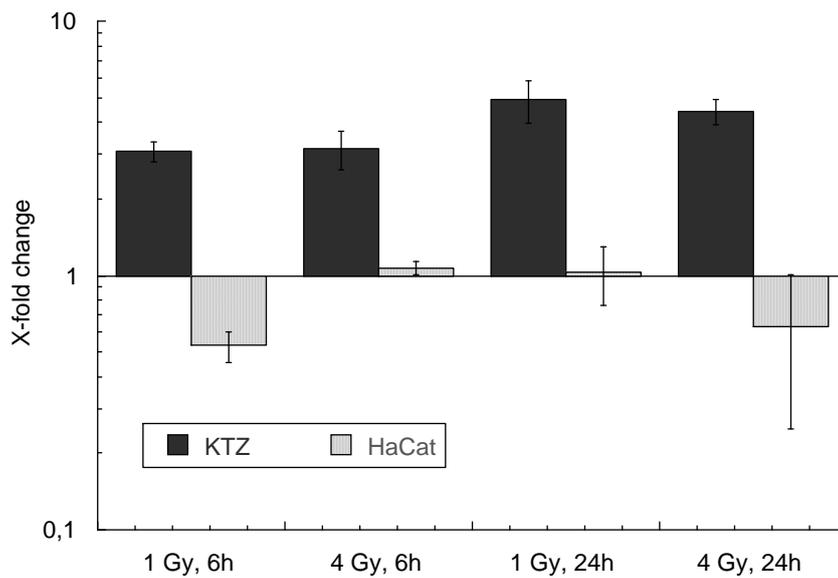


Abb. 46: Wirkung der Bestrahlung auf die KGF-Rezeptor-Expression in primären Keratinozyten und immortalisierten Keratinozyten (HaCat)

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung vom rHuKGF und von Tumoren produziertem KGF auf die proliferative Aktivität und Strahlensensibilität von epithelialen Tumoren und Keratinozyten untersucht werden.

Die radiogene Mukositis der Mundschleimhaut ist eine der häufigsten Nebenwirkungen der Radio-Chemo-Therapie im Kopf-Hals-Bereich und ist mit 86% der häufigste Grund für Therapiepausen während der Bestrahlung (Herrmann et al. 1994).

In diesem Zusammenhang ist der Keratinozytenwachstumsfaktor KGF von großer Bedeutung, zu dessen vielfältigen Wirkungen die Stimulation der Proliferation, die Modifikation von Migrations- und Differenzierungsvorgängen und die Wundheilung zählt. Dieses Wirkprofil bietet die Grundlage zur Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der akuten Strahlenfolgen an Haut und Schleimhäuten durch exogene Zufuhr von KGF.

Zahlreiche Studien haben einen protektiven und proliferativen Effekt von KGF auf normale epitheliale Gewebe, die einer Vielzahl toxischer Einflüsse ausgesetzt sind, ergeben. So ergab sich unter anderem ein protektiver Effekt von KGF auf alveoläre Epithelien nach durch Sauerstoff induzierten Verletzungen (Barazzone et al. 1999), eine verbesserte Strahlentoleranz von Lungengewebe (Chen et al. 2004), eine höhere Überlebensrate bei Mäusen nach Chemoradio- oder isolierter Radiotherapie (Farrell et al. 1998) und eine protektive Wirkung im Hinblick auf die durch Bleomycin induzierte Lungenfibrose (Sugahara et al. 1998).

Auch in dieser Arbeit zeigte sich nach Zugabe von rHuKGF ein deutlicher Proliferationsanstieg der primären Keratinozyten. Um die Wirkung vom KGF auf die Strahlentoleranz der primären Keratinozyten nachzuweisen, wurde die Proliferation von mit 1 und 4 Gray bestrahlten primären Keratinozyten nach Zugabe von rHuKGF gemessen. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Strahlentoleranz durch KGF. Diese protektive Wirkung konnte durch die Zugabe des KGF-Antikörpers aufgehoben werden.

Wie bereits in einer vorherigen Arbeit (Hille et al. 2003) konnte mittels ELISA in den Überständen von allen verwendeten Tumorzelllinien und den Fibroblasten das KGF-Protein nachgewiesen werden. Auch im Western-Blot fanden sich bei allen verwendeten Tumorzelllinien und den Fibroblasten KGF-spezifische Signale.

Mittels PCR untersuchten wir die KGF-Expression und die Auswirkung der Bestrahlung der untersuchten Zellreihen auf RNA-Ebene. Hierbei konnte ebenfalls bei allen untersuchten

Tumorzelllinien und den Fibroblasten eine KGF-Expression nachgewiesen werden. Die Bestrahlung führte in diesen Zellreihen jedoch zu keinem eindeutigen Effekt.

Überraschenderweise konnten wir auch eine KGF-mRNA- und Protein-Expression in den primären Keratinozyten nachweisen. Durch Bestrahlung kam es zudem zu einer gesteigerten Expression der mRNA. Zur Validierung der Ergebnisse wurden zudem die HaCat-Zellen untersucht. Auch hier konnte eine KGF-mRNA-Expression nachgewiesen werden und es zeigte sich ebenfalls eine gesteigerte Expression nach Bestrahlung der Zellen.

KGF wird im Normalgewebe von mesenchymalen Zellen, vorrangig Fibroblasten, sezerniert. Zielzellen des Wachstumsfaktors sind epitheliale Zellen in verschiedenen Geweben.

Eine KGF-Expression in normalen epithelialen Zellen konnte bisher nur selten nachgewiesen werden. Weng, Mohan und Wilson beschrieben die KGF-mRNA-Expression im Linsenepithel von Ratten (Weng et al. 1997). Spencer und Ka wiesen eine KGF-Expression im Endometrium von Schweinen nach (Ka et al. 2000). Parrott et al. wiesen KGF im Oberflächenepithel vom Ovar nach und Yamayoshi et al. beschrieb eine KGF-Expression in alveolären Epithelzellen der Lunge (Parrott et al. 2000, Yamayoshi et al. 2004).

Ein Nachweis von KGF in epithelialen Tumorzellen wurde bereits häufiger beschrieben. So wurde zuvor bereits bei einigen Pankreaskarzinom- und Brustkrebs-Zelllinien eine KGF-Expression nachgewiesen (Bansal et al. 1997, Siddiqi et al. 1995). Zudem gelang ein KGF-Nachweis in den epithelialen Zellen bei der benignen Prostatahyperplasie und Prostatakarzinomen (Planz et al. 1999). Auch in epithelialen Tumorzellen von colorektalen Karzinomen und Ösophaguskarzinomen konnte eine KGF-Expression nachgewiesen werden (Yoshino et al. 2007, Watanabe et al. 2000).

Im normalen Gewebe wird die Wirkung von KGF über die Interaktion mit dem KGF-Rezeptor vermittelt, von dem bisher vier Subtypen bekannt sind (FGFR1-FGFR4). Hierbei handelt es sich um Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die aus einer extrazellulären Region, die drei Immunglobulin-ähnliche Domänen besitzen und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Region bestehen.

Durch alternatives Spleißen der Exons resultieren zusätzliche Varianten der Rezeptoren mit unterschiedlichen Ligandenbindungsaffinitäten (Johnson und Williams 1993, Powers et al. 2000). Der Rezeptor für KGF wird aus dem FGFR2-Gen kodiert mit den Splicevarianten IIIb und IIIc (Drugan et al. 1997). KGF bindet lediglich an den FGFR 2 IIIb, der in epithelialen Zellen exprimiert wird, während die IIIc-Variante in mesenchymalen Zellen exprimiert wird (Carstens et al. 1998, 2000).

Der Nachweis von KGF in entzündlich veränderten oder malignen epithelialen Zellen lässt einen autokrinen Wirkmechanismus des von den Zellen produzierten KGFs vermuten.

Wie erwartet erfolgte mittels PCR und Western-Blot der KGF-Rezeptor-Nachweis in den primären Keratinozyten und den HaCat-Zellen. Nach Bestrahlung zeigte sich zudem eine gesteigerte Expression des KGF-Rezeptors bei den primären Keratinozyten und den HaCat-Zellen. Die Zugabe von rHuKGF führte folglich zu einer gesteigerten Proliferation der primären Keratinozyten im Cell-Titer-Blue-Test. Auch die Kultivierung der primären Keratinozyten in den Tumorzellüberständen führte zu einer gesteigerten Proliferation und radioprotektiven Wirkung. Vergleichbare Ergebnisse konnten bei der Kultivierung der primären Keratinozyten im Fibroblastenüberstand erzielt werden, wobei es sich hierbei um eine natürliche KGF-Quelle handelt. Da dieser proliferative Effekt zudem durch Zugabe des spezifischen KGF-Antikörpers aufgehoben werden konnte, zeigt sich anhand dieser Untersuchung, dass es durch das von Tumorzellen produzierte KGF zu einer gesteigerten Proliferation der unbestrahlten und bestrahlten primären Keratinozyten kommt und es sich folglich um ein aktives Protein handeln muss.

Nach diesen Erkenntnissen wäre rHuKGF eine potente präventive Therapie zur Reduktion von Schäden der normalen epithelialen Zellen im Rahmen von Radiotherapien maligner Tumoren, vorausgesetzt es handelt sich um eine selektive Wirkung auf normale epitheliale Zellen.

Palifermin (rHuKGF) wurde in den USA bereits im Jahr 2004 zur Prävention der Mukositis bei Patienten mit hämatologischen Tumoren vor einer Stammzelltherapie, zu deren Konditionierung eine hochdosierte Chemo- und Strahlentherapie durchgeführt wird, zugelassen. Es wird angenommen, dass auch Patienten mit epithelialen Tumoren und radiogen-bedingter Mukositis von einer KGF-Therapie profitieren könnten. Da epitheliale Zellen im Gegensatz zu Blutzellen jedoch den KGF-Rezeptor exprimieren, muss zuvor geklärt werden, ob KGF auch bei epithelialen Tumorzellen zu einer gesteigerten Proliferation oder verminderten Strahlentoleranz führt.

Ning und Shui untersuchten 10 Plattenepithelkarzinom-Zelllinien von Kopf-Hals-Tumoren, von denen sieben KGFR-mRNA exprimierten, bei denen sich nach einer zweitägigen Zugabe von rHuKGF keine Steigerung der Proliferation zeigte. Eine Zugabe von rHuKGF über mindestens sieben Tage führte zu einer leichten Steigerung der Proliferation in vier der sieben KGFR-mRNA-positiven und zwei der KGFR-mRNA negativen-Zelllinien. In der Vergleichsgruppe mit normalen Keratinozyten führte die KGF-Zugabe zu einem deutlichen

Proliferationsanstieg. Die Strahlensensibilität aller Tumorzelllinien wurde durch die KGF Zugabe nicht beeinflusst (Ning et al. 1998).

In einer weiteren Untersuchung zeigte sich lediglich bei 5 von 35 untersuchten epithelialen Tumorzelllinien ein dosisabhängiger signifikanter Proliferationsanstieg nach Zugabe von rHuKGF, trotzdem bei einer Vielzahl der Zellen der KGF-Rezeptor nachgewiesen wurde (Oelmann et al. 2004).

In einer anderen Untersuchung ergab sich in einer von acht Tumorzelllinien eine positive Wirkung auf die Proliferation nach Zugabe von rHuKGF. Die Strahlensensibilität wurde durch KGF nicht beeinflusst (Hille et al. 2003).

Im Rahmen der aktuellen Arbeit wurde die Wirkung von rHuKGF auf vier Tumorzelllinien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches mittels des Cell-Titer-Blue-Viability Assay untersucht. In allen untersuchten Tumorzellreihen zeigte sich keine Stimulation der Proliferation nach Zugabe von rHuKGF. Auch bei der von uns verwendeten Negativkontrolle den Fibroblasten zeigte sich kein proliferativer Effekt nach Zugabe von rHuKGF. Da in unserer Arbeit primäre Tumorzellkulturen verwendet wurden, kann eine Kontamination mit mesenchymalen Zellen nicht sicher ausgeschlossen werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für den ausbleibenden Effekt von rHuKGF auf die Proliferation und Strahlensensibilität der von uns untersuchten Tumorzelllinien ist der sehr geringe Nachweis des KGF-Rezeptors mittels Western-Blot und PCR. Allerdings konnte in einer Untersuchung von Drugan et al keine Korrelation zwischen der KGF-Rezeptor-Expression und der mitogenen Wirkung von KGF auf maligne Zellen der Mundschleimhaut nachgewiesen werden (Drugan et al. 1997).

Zusätzlich haben wir getestet, ob die Bestrahlung der Tumorzellen zu einer gesteigerten KGF-Rezeptor-Expression in den Tumorzellen führt. In der PCR konnte jedoch nach Bestrahlung mit 1 und 4 Gray kein eindeutiger Effekt auf die KGF-Rezeptor-Expression in den Tumorzellen nachgewiesen werden, während die Bestrahlung der primären Keratinozyten und der HaCat-Zellen zu einer gesteigerten KGF-Rezeptor-Expression führte.

Um einen eventuellen autokrinen Effekt des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf die Proliferation der Zellen aufzuweisen, wurden zunächst Wachstumskurven der Tumorzellen und der Fibroblasten nach Zugabe des KGF-Antikörpers erstellt. Bei der Kontrollgruppe wurde ein unspezifischer IgG-Antikörper hinzugefügt. Hierbei ergab sich bei keiner Zelllinie eine Auswirkung auf die Proliferation nach Zugabe des KGF-Antikörpers.

Um zusätzlich einen möglichen autokrinen Effekt des von den Tumorzellen produzierten KGFs auf die Strahlensensibilität der Zellen aufzuzeigen, wurden die Zelllinien nach Zugabe des KGF- bzw. IgG-Antikörpers mit 1 bzw. 4 Gray bestrahlt. Hierbei zeigte sich lediglich bei der ZMK-1-Zelllinie nach Bestrahlung mit 1 Gray eine Reduktion der Strahlentoleranz. Bei allen weiteren untersuchten Zelllinien führte die Zugabe des KGF-Antikörpers zu keiner Beeinflussung der Strahlenempfindlichkeit. Um eine zu geringe Antikörpermenge ursächlich auszuschließen, wurde der Versuch mit den ZMK-1-Zellen und KGF-Antikörperkonzentrationen von 1-20µg/ml wiederholt. Es ergab sich jedoch kein Effekt auf die Strahlentoleranz der untersuchten Tumorzelllinie.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine KGF-Expression in epithelialen Tumorzellen von Kopf-Hals-Tumoren, in primären Keratinozyten und immortalisierten Keratinozyten nachgewiesen werden.

Zudem ergab sich eine proliferative und protektive Wirkung von rHuKGF auf normale epitheliale Zellen, nicht jedoch auf die untersuchten Tumorzellen und es zeigte sich ein proliferativer und protektiver Effekt des von den Tumorzellen gebildeten KGFs auf die primären Keratinozyten.

Der KGF-Rezeptor konnte lediglich bei den Keratinozyten nachgewiesen werden.

Die unterschiedlichen Reaktionen der untersuchten Zelllinien auf die Zugabe von KGF lassen vermuten, dass im Zuge der Entartung der Tumorzellen der normale parakrine Mechanismus der KGF-Wirkung durch einen autokrinen Mechanismus ersetzt wurde.

Palifermin (rHuKGF) wurde in den USA bereits zur Prävention der Mukositis bei Patienten mit hämatologischen Tumoren vor einer Stammzelltherapie zugelassen. Bisherige Studien ergaben eine gute Verträglichkeit.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse unserer Arbeit ist rHuKGF eine potente präventive Therapie zur Reduktion von Schäden der normalen epithelialen Zellen im Rahmen von Radiotherapien maligner epithelialer Tumore.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des rHuKGF und von Tumoren produzierten KGF auf die proliferative Aktivität und Strahlensensibilität von epithelialen Tumoren und Keratinozyten untersucht.

Zahlreiche Studien haben einen protektiven und proliferativen Effekt von KGF auf normale epitheliale Gewebe, die einer Vielzahl toxischer Einflüsse ausgesetzt sind, ergeben. Auch in dieser Arbeit zeigte sich nach Zugabe von rHuKGF ein deutlicher Proliferationsanstieg der primären Keratinozyten und eine verbesserte Strahlentoleranz.

Mittels ELISA konnte in allen verwendeten Tumorzelllinien und den Fibroblasten das KGF-Protein nachgewiesen werden. Auch im Western-Blot fanden sich bei allen verwendeten Tumorzelllinien und den Fibroblasten KGF-spezifische Signale.

In der PCR konnte ebenfalls bei allen untersuchten Tumorzelllinien und den Fibroblasten eine KGF-Expression nachgewiesen werden. Die Bestrahlung führte in diesen Zellreihen jedoch zu keinem eindeutigen Effekt. Es zeigte sich zudem eine KGF-mRNA- und Protein-Expression in den primären Keratinozyten und den immortalisierten Keratinozyten. Durch Bestrahlung kam es bei beiden Zelllinien zu einer gesteigerten Expression.

Ein KGF-Rezeptor-Nachweis erfolgte mittels PCR und Western-Blot in den primären Keratinozyten und den HaCat-Zellen. Durch Bestrahlung resultierte auch hier eine gesteigerte Expression.

Mittels des Cell-Titer-Blue-Tests konnte eine gesteigerte Proliferation und radioprotektive Wirkung der primären Keratinozyten in den Tumorzell- und Fibroblastenüberständen nachgewiesen werden. Der Effekt konnte durch Zugabe des KGF-Antikörpers aufgehoben werden.

Die Zugabe von rHuKGF führte bei keiner der vier untersuchten Tumorzelllinien und den Fibroblasten zu einer Stimulation der Proliferation.

Die Zugabe des KGF-Antikörpers hatte ebenfalls bei keiner der untersuchten Tumorzelllinien und den Fibroblasten einen Effekt auf die Proliferation.

Hinsichtlich der Strahlensensibilität zeigte sich lediglich bei den ZMK-1-Zellen nach Bestrahlung mit 1 Gray ein geringer Effekt nach Zugabe des KGF-Antikörpers.

Dieses Ergebnis konnte im Rahmen eines erneuten Versuchsansatzes mit gesteigerten KGF-Antikörper-Konzentrationen nicht bestätigt werden.

In der PCR-Untersuchung führte die Bestrahlung zu keinem eindeutigen Effekt auf die KGF-Rezeptor-Expression in den Tumorzellen, während es bei den primären Keratinozyten und den HaCat-Zellen zu einer gesteigerten Expression kam.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine KGF-Expression in epithelialen Tumorzellen von Kopf-Hals-Tumoren, in primären Keratinozyten und immortalisierten Keratinozyten nachgewiesen werden.

Zudem ergab sich eine proliferative und protektive Wirkung von rHuKGF auf normale epitheliale Zellen, nicht jedoch auf die untersuchten Tumorzellen, und es zeigte sich ein proliferativer und protektiver Effekt des von den Tumorzellen gebildeten KGFs auf die primären Keratinozyten.

Der KGF-Rezeptor konnte lediglich bei den Keratinozyten nachgewiesen werden.

Die unterschiedlichen Reaktionen der untersuchten Zelllinien auf die Zugabe von KGF lassen vermuten, dass im Zuge der Entartung der Tumorzellen der normale parakrine Mechanismus der KGF-Wirkung durch einen autokrinen Mechanismus ersetzt wurde.

Palifermin (rHuKGF) wurde in den USA bereits zur Prävention der Mukositis bei Patienten mit hämatologischen Tumoren vor einer Stammzelltherapie zugelassen. Bisherige Studien ergaben eine gute Verträglichkeit.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse ist rHuKGF eine potente präventive Therapie zur Reduktion von Schäden der normalen epithelialen Zellen im Rahmen von Radiotherapien maligner epithelialer Tumoren.

7 Literaturverzeichnis

Bansal GS, Cox HC, Marsh S, Gomm JJ, Yiangou C, Luqmani Y, Coombes RC, Johnston CL (1997): Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human breast cancer. *Br J Cancer* 75, 1567–74.

Barazzone C, Donati YR, Rochat AF, Vesin C, Kan CD, Pache JC, Piguet PF (1999) : Keratinocyte growth factor protects alveolar epithelium and endothelium from oxygen-induced injury in mice. *Am J Pathol* 154, 1479–87.

Boenninghaus HG: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Springer Verlag, Berlin 2007

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988): Normal keratinisation in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-71.

Brizel DM, Herman T, Goffinet D, Sailer S, Agarwala S, Schwartz G, Venkatesan V, Cripps C, Meredith RF, Logan E, Yao B (2001): A phase I/II trial of escalating doses of recombinant human keratinocyte growth factor (rHuKGF) in head and neck cancer (HNC) patients receiving radiotherapy (RT) with concurrent chemotherapy (CCT). *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys* 51, 40.

Carstens RP, McKeehan WL, Garcia-Blanco MA (1998): An intronic sequence element mediates both activation and repression of rat fibroblast growth factor receptor 2 pre-mRNA splicing. *Mol. Cell Biol* 18, 2205-2217.

Carstens RP, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA (2000): An intronic splicing silencer causes skipping of the IIIb exon of fibroblast growth factor receptor 2 through involvement of polypyrimidine tract binding protein. *Mol. Cell Biol* 20, 7388-7400.

Chen L, Brizel DM, Rabbani ZN, Samulski TV, Farrell CL, Larrier N, Anscher MS, Vujaskovic Z (2004): The protective effect of recombinant human keratinocyte growth factor on radiation-induced pulmonary toxicity in rats. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys* 60, 1520–9.

Drugan CS, Stone A, Game Sm, Prime SS (1997): The mitogenic effect of KGF and the expression of its cell surface receptor on cultured and malignant human oral keratinocytes and on contiguous fibroblasts. *J. Oral Pathol Med* 26, 327-333.

Farrell CL, Bready JV, Rex KL, Chen JN, DiPalma CR, Whitcomb KL, Yin S, Hill DC, Wiemann B, Starnes CO et al. (1998): Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality. *Cancer Res* 58, 933–9.

Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA(1989): Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 245, 752-755.

Herrmann TH, Jakubek A, Trott KR (1994): The importance of the timing of a gap in radiotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiol. Oncol.*, 170, 545-549.

Hille A, Rave-Fraenk M, Pradier O, Damm C, Dörr W, Jackel MC, Christiansen H, Hess CF, Schmidberger H (2003): Effect of keratinocyte growth factor on the proliferation, clonogenic capacity and colony size of human epithelial tumour cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 79, 119-128.

Johnson DE, Williams LT (1993): Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv.Cancer Res.*60, 1-41.

Ka H, Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW (2000): Keratinocyte growth factor: expression by endometrial epithelia of the porcine uterus. *Biol Reprod* 62, 1772–8.

MASCC Guidelines 2006 zur Prophylaxe und Therapie der Mukositis bei Tumorthherapie.
www.mascc.org

Meropol NJ, Somer RA, Gutheil J, Pelley RJ, Modiano MR, Rowinsky EK, Rothenberg ML, Redding SW, Serdar CM, Yao B, Heard R, Rosen LS (2003). Randomized phase I trial of recombinant human keratinocytes growth factor plus chemotherapy: potential role as mucosal protectant. *J.Clin. Oncol.* 21, 1452-1458.

Ning S, Shui C, Khan WB, Benson W, Lacey DL, Knox SJ (1998): Effects of keratinocyte growth factor on the proliferation and radiation survival of human squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40, 177–87.

Oelmann E, Haghgu S, Kulimova E, Mesters RM, Kienast J, Herbst H, Schmitmann C, Kolkmeier A, Serve H, Berdel WE (2004): Influence of keratinocyte growth factor on clonal growth of epithelial tumor cells, lymphoma and leukemia cells and on sensitivity of tumor cells towards 5-fluorouracil in vitro. *Int J Oncol* 25, 1001–12.

Parrott JA, Kim G, Mosher R, Skinner MK (2000): Expression and action of keratinocyte growth factor (KGF) in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 167, 77-87.

Planz B, Aretz HT, Wang Q, Tabatabaei S, Kirley SD, Lin CW, McDouglas WS (1999): Immunolocalization of the keratinocyte growth factor in benign and neoplastic human prostate and its relation to androgen receptor. *Prostate* 41, 233-42.

Powers CJ, Mc Leskey SW, Wellstein A (2000): Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* 7, 165-197.

R&D Systems, Minneapolis, USA. rndsystems.com

Rubin JS, Bottaro DB, Chedid M, Miki T, Ron D, Cheon G, Taylor WG, Fortney E, Sakata H, Finch PW, Rochelle WJ (1995): Keratinocyte growth factor. *Cell Biol. Int.* 19, 399-411.

Siddiqi I, Funatomi H, Kobrin MS, Friess H, Büchler MW, Korc M (1995): Increased expression of keratinocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 309–15.

Sugahara K, Iyama K, Kuroda MJ, Sano K (1998): Double intratracheal instillation of keratinocyte growth factor prevents bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J Pathol* 186, 90–8.

UICC, International Union Against Cancer. www.uicc.org

Watanabe M, Ishiwata T, Nishigai K, Moriyama Y, Asano G (2000): Overexpression of keratinocyte growth factor in cancer cells and enterochromaffin cells in human colorectal cancer. *Pathol Int* 50, 363–72.

Weng J, Liang Q, Mohan RR, Li Q, Wilson SE (1997): Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, and other growth factor-receptor systems in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1543–54.

Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B (1988): The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* 27, 131-146.

Yamayoshi T, Nagayasu T, Matsumoto K, Abo T, Hishikawa Y, Koji T (2004): Expression of keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7 and its receptor in human lung cancer: correlation with tumour proliferative activity and patient prognosis. *J Pathol* 204, 110-8.

Yoshino M, Ishiwata T, Watanabe M, Matsunobu T, Komine O, Ono Y, Yamamoto T, Fujii T, Matsumoto K, Tokunaga A, Naito Z (2007): Expression and roles of keratinocyte growth factor and its receptor in esophageal cancer cells. *Int J Oncol* 31, 721-8.

