

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR STRAHLENTHERAPIE  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. GUIDO HILDEBRANDT

# „EINFLUSS IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DIE TUMOR-ENDOTHELZELL-INTERAKTIONEN *IN VITRO*“

INAUGURALDISSERTATION  
ZUR  
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES  
DOKTOR DER MEDIZIN  
DER  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

SIMONE SOPHIE MARIA BROESE (GEB. BRINKER)

AUS WISMAR

ROSTOCK | 2020

DEKAN: PROF. DR. MED. E. REISINGER

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00003141](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003141)

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. MED GUIDO HILDEBRANDT

EINRICHTUNG: UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

KLINIK UND POLIKLINIK FÜR STRAHLENTHERAPIE

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. MED. STEFFEN EMMERT

EINRICHTUNG: UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

KLINIK UND POLIKLINIK FÜR DERMATOLOGIE UND VENEROLOGIE

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. RER. NAT. FRANZ RÖDEL

EINRICHTUNG: UNIVERSITÄTSKLINIKUM FRANKFURT

KLINIK FÜR STRAHLENTHERAPIE UND ONKOLOGIE

JAHR DER EINREICHUNG: 2020

JAHR DER VERTEIDIGUNG: 2021

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

SCHRÖDER S., BROESE S., BAAKE J., JUERß D., KRIESEN S., HILDEBRANDT G., MANDA K. (2019)  
Effect of ionizing radiation on human EA.hy926 endothelial cells under inflammatory conditions  
and their interactions with A549 tumour cells. *J. Immunol. Res.* 9645481.

**INHALTSVERZEICHNIS**

---

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	TUMORERKRANKUNGEN .....	1
1.2	BEZIEHUNG ZWISCHEN ENTZÜNDUNG UND KARZINOMEN.....	1
1.3	DIE ROLLE DER ENDOTHELZELLEN .....	4
1.4	METASTASEN .....	5
1.5	TUMORTHERAPIE.....	5
1.6	RADIOTHERAPIE .....	6
1.7	ZIELSTELLUNG .....	7
<b>II.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>8</b>
2.1	VERWENDETE ZELLINIEN .....	8
2.2	KULTIVIERUNG DER ZELLEN .....	8
2.2.1	KULTIVIERUNG DER A549-ZELLEN .....	8
2.2.2	KULTIVIERUNG DER EA.HY926-ZELLEN.....	8
2.3	BESTRAHLUNG MIT DEM LINEARBESCHLEUNIGER.....	8
2.4	ZUGABE VON TNF- $\alpha$ UND SYNCHRONISATION DER ZELLEN .....	9
2.5	MESSUNG DER VIABILITÄT NACH BESTRAHLUNG .....	9
2.6	SCRATCH-ASSAY.....	10
2.7	MULTIPLEX-ASSAY .....	10
2.8	ADHÄSIONSASSAY .....	11
2.9	AUSWERTUNG DER DATEN UND STATISTISCHE ANALYSEN.....	12
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>13</b>
3.1	VIABILITÄT UNTER BESTRAHLUNG .....	13
3.2	MIGRATION .....	16
3.3	KONZENTRATION DER INFLAMMATORISCHEN MARKER.....	17
3.3.1	IL-8 .....	18
3.3.2	MCP-1 .....	20
3.3.3	P-SELEKTIN .....	22

---

3.3.4	E-SELEKTIN .....	23
3.3.5	VCAM-1 .....	24
3.3.6	ICAM-1 .....	26
3.3.7	VEGF .....	27
3.4	ADHÄSION DER A549-TUMORZELLEN AN DIE EA.HY926-ENDOTHELZELLEN .....	29
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>31</b>
4.1	ZELLVIABILITÄT UNTER BESTRAHLUNG .....	31
4.2	MIGRATION .....	31
4.3	KONZENTRATION DER INFLAMMATORISCHEN MARKER .....	33
4.3.1	ENTZÜNDUNGSMARKER IL-8 UND MCP-1 .....	34
4.3.2	ADHÄSIONSMOLEKÜLE VCAM-1, ICAM-1, E-SELEKTIN UND P-SELEKTIN .....	35
4.3.3	WACHSTUMSFAKTOR VEGF .....	37
4.4	ADHÄSION .....	37
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>40</b>
<b>VI.</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>42</b>
<b>VII.</b>	<b>THESEN .....</b>	<b>43</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>45</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>52</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>53</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

- Abb. 1:** Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Weges
- Abb. 2:** Schematische Darstellung eines Objektträgers mit Kratzern im Zellrasen.
- Abb. 3:** Absorption als Maß für die Viabilität der EA.hy926-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe in serumreduziertem Medium gemessen mittels WST-1-Tests.
- Abb. 4:** Absorption als Maß für die Viabilität der EA.hy926-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe in serumfreien Medium gemessen mittels WST-1-Tests.
- Abb. 5:** Absorption als Maß für die Viabilität der Tumorzellen A549 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe in serumreduziertem Medium gemessen mittels WST-1-Tests.
- Abb. 6:** Absorption als Maß für die Viabilität der Tumorzellen A549 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe  $\alpha$  in serumfreiem Medium gemessen mittels WST-1-Tests.
- Abb. 7:** Migration der A549-Tumorzellen 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe.
- Abb. 8:** A549-Zellen 48 h nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  (links) und mit Zugabe von TNF- $\alpha$  (rechts).
- Abb. 9:** Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.
- Abb. 10:** Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.
- Abb. 11:** Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von MCP-1 im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.

- Abb. 12:** Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von P-Selektin im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.
- Abb. 13:** Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von E-Selektin im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung
- Abb. 14:** Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von VCAM-1 im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung
- Abb. 15:** Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von ICAM-1 im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.
- Abb. 16:** Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von VEGF im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.
- Abb. 17:** Einfluss ionisierender Strahlung (IR) auf die Adhäsion der Tumorzellen A549 an die EA.hy926-Zellen ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe 24 h nach Bestrahlung.

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

BSA	Bovines Serum Albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
FBS	fetales Kälberserum
HIF1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM -1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MW	Mittelwert
NF- $\kappa$ B	Nuclear Faktor- $\kappa$ B
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PMN	polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten
RAS-Gen	Rat Sarcoma Gen
RET	Rearranged During Transfection
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SD	Standardabweichung
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transkription 3
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WST-1	Water Soluble Tetrazolium



## **I. EINLEITUNG**

### **1.1 TUMORERKRANKUNGEN**

In Deutschland erkrankten im Jahr 2016 492.090 Menschen neu an Krebs, 229.827 verstarben im selben Jahr an einer Krebserkrankung. Damit sind diese nach den Herz- und Kreislauferkrankungen die häufigste Todesursache. Obgleich bei den Männern die Lunge mit 13,9 % nur die zweithäufigste Tumorlokalisation darstellt, ist das Lungenkarzinom die häufigste Krebstodesursache (23,5 % der Krebssterbefälle). Bei den Frauen ist der Anteil seit 1975 auf das Doppelte angestiegen, so dass Lungenkrebs aktuell die zweithäufigste Todesursache unter den Karzinomen ist (15,7 % der Krebssterbefälle; ROBERT KOCH-INSTITUT, 2019).

Inzwischen konnten einige Faktoren identifiziert werden, die das Risiko erhöhen, an einem Tumorleiden zu erkranken. Die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms wird durch Rauchen stark erhöht. Raucher mit 40 Packyears (Zahl der täglich gerauchten Packungen multipliziert mit der Zahl der Raucherjahre) haben ein 10-fach höheres Krebsrisiko im Vergleich zu Nichtrauchern. Berufliche Karzinogene sind für nur 5 % aller Lungenkarzinome verantwortlich, wobei vor allem Asbest eine große Rolle spielt (HEROLD, 2015).

Das chronische Einatmen von giftigen Stoffen wie Zigarettenrauch und andere Luftschadstoffe, führt zu einer erhöhten Konzentration von ROS (Reactive Oxygen Species), durch welche es zu einer Schädigung von Zellbestandteilen kommen kann. Dies führt zu einer Entzündungsreaktion und bei einer starken Schädigung der DNA zur Tumorgenese (VALAVANIDIS *et al.*, 2013).

### **1.2 BEZIEHUNG ZWISCHEN ENTZÜNDUNG UND KARZINOMEN**

In dem Übersichtsartikel von (COLOTTA *et al.*, 2009) wird ein enger Zusammenhang zwischen Entzündung und Tumorentwicklung bzw. -wachstum festgestellt. Aus epidemiologischen Studien ist bekannt, dass chronische Entzündungen das Risiko, an einem malignen Tumor zu erkranken, erhöhen. Die Gabe von nicht-steroidalen Antiphlogistika ist hingegen mit einem Schutz vor verschiedenen Tumoren verbunden.

In den meisten Tumoren findet sich ein entzündliches Mikroklima, welches durch die Einwanderung von Leukozyten und die Ausschüttung von Zytokinen charakterisiert ist (BALKWILL UND MANTOVANI, 2001). Bisher konnten zwei Signalwege identifiziert werden, durch die diese Verbindung zwischen Tumor und Inflammation vermittelt wird: Der intrinsische Weg und der extrinsische Weg. Der intrinsische Signalweg wird durch genetische Veränderungen aktiviert, welche Neoplasien begünstigen. Diese Veränderungen fördern außerdem durch die Ausschüttung inflammatorischer Marker auch die Entstehung eines entzündlichen Mikroklimas (MANTOVANI *et al.*, 2008). Dies kann beispielsweise am RET-Protoonkogen (Rearranged During Transfection) gezeigt werden, welches im kausalen Zusammenhang mit der Pathogenese des pa-

pillären Schilddrüsenkarzinoms steht. So führt eine Umlagerung des Gens durch chromosomale Inversion oder Translokation zudem zu einer Hochregulierung zahlreicher Gene, die für inflammatorische Proteine kodieren (BORELLO *et al.*, 2005).

Der extrinsische Signalweg wird durch chronische Entzündungen aktiviert, welche das Risiko, an einem Tumor zu erkranken, erhöhen. Exemplarisch sei Colitis ulcerosa, eine entzündliche Darmerkrankung genannt, welche zu einem erhöhten Risiko führt, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Des Weiteren führt die Infektion mit *Helicobacter pylori* zu einem erhöhten Risiko für ein Magenkarzinom (ITZKOWITZ *et al.*, 2004, PARSONNET *et al.*, 1991).

Durch Entzündungen werden unabhängig von der Genese Leukozyten aktiviert, welche Radikale freisetzen. Die erhöhte Konzentration von ROS und RNS (Reaktive Nitrogen Species) führt zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen, DNA-DNA-Verknüpfungen, sowie einer Vielzahl von weiteren DNA-Veränderungen (TOYOKUNI *et al.*, 2008). Wenn die körpereigenen Reparaturmechanismen diese Variationen nicht beheben, kann dies zu dauerhaften Mutationen führen, durch welche Tumore entstehen können. Dies geschieht, wenn beispielsweise durch die Mutation Onkogene aktiviert werden (FEDERICO *et al.*, 2007).

Beide Signalwege führen zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Drei Faktoren sind bisher dafür bekannt, dass sie dominieren: Nuclear Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Signal Transducer and Aktivator of Transkription 3 (STAT3) und Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ; MANTOVANI *et al.*, 2008). Diese Transkriptionsfaktoren koordinieren die Synthese von inflammatorischen Markern wie Zytokinen und Chemokinen sowie die Synthese von Adhäsionsmolekülen.

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt zum Beispiel zu einer Induktion sowohl pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) als auch Adhäsionsmolekülen wie Intercellular Cell Adhesion Protein 1 (ICAM-1) und Vascular Cell Adhesion Protein (VCAM-1; MULTHOFF *et al.*, 2011). Eine erhöhte Konzentration von IL-8 führt zur Ausschüttung weiterer Zytokine und zur Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten. Zudem wird die Angiogenese und die Proliferation verstärkt (PALENA *et al.*, 2012). Die Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen wird durch die vermehrte Ausschüttung von MCP-1 vermittelt (DESHMANE *et al.*, 2009). Die eingewanderten Monozyten und Granulozyten wiederum schütten weitere proinflammatorische Zytokine und Chemokine aus und verstärken die Inflammation. So bildet sich ein entzündliches Mikroklima auch in Tumoren, die nicht durch eine Inflammation entstanden sind. Dieses Phänomen wird als Cancer Related Inflammation bezeichnet (COLOTTA *et al.*, 2009).

Das Mikroklima führt zu einer niedrigen Apoptoserate der Tumorzellen und fördert die Proliferation sowie ein invasives Wachstum, zudem wird die Angiogenese verstärkt, wie die Abb. 1 zeigt (AGGARWAL UND GEHLOT, 2009).

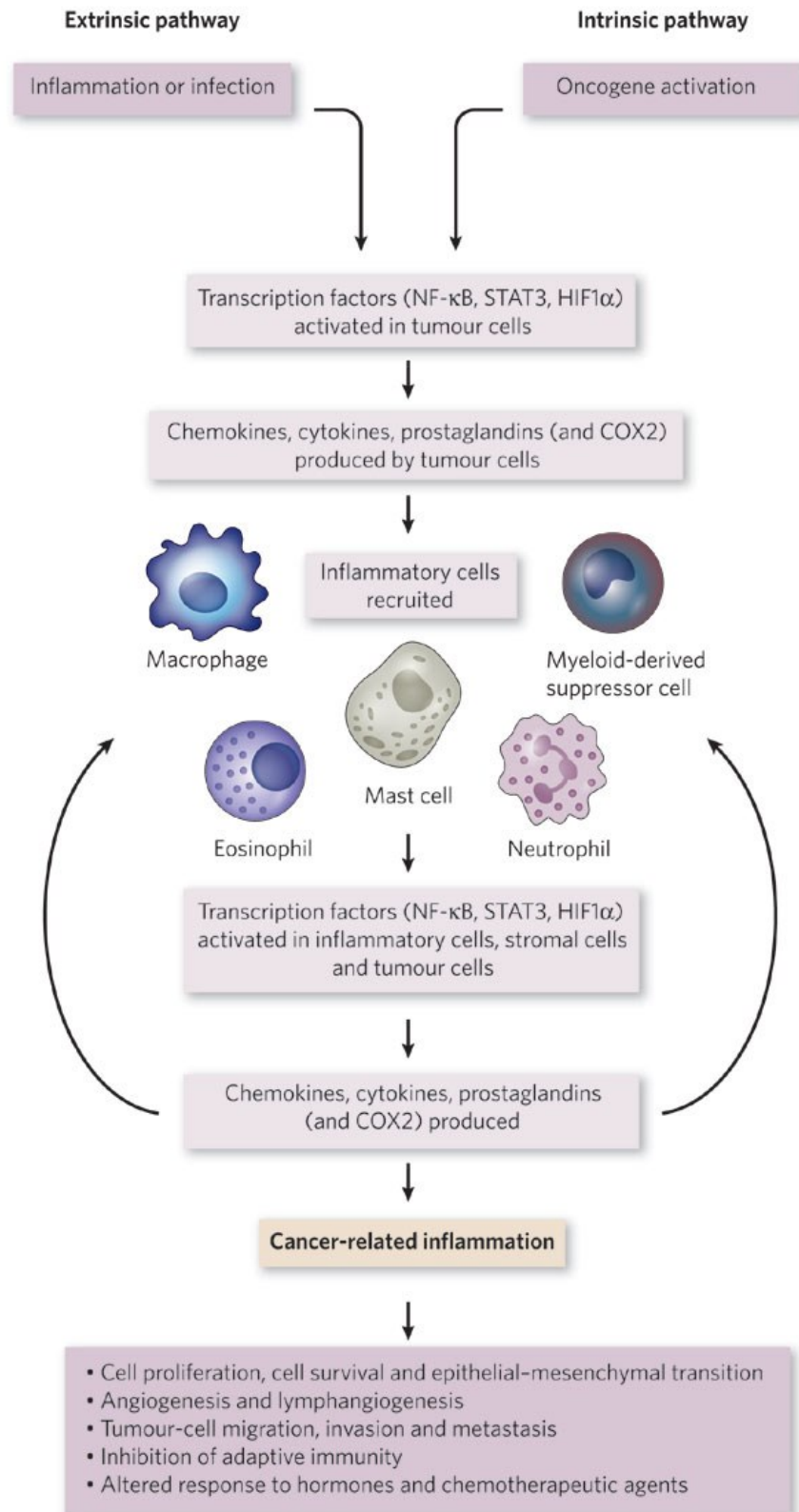


Abb. 1: Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Weges (MANTOVANI *et al.*, 2008).

Zudem steigern Entzündungen das Risiko der Entstehung von Metastasen. Zum Beispiel konnte die Aktivierung von NF- $\kappa$ B mit der Metastasierung des Prostatakarzinoms in Verbindung gebracht werden (ISMAIL *et al.*, 2004). Hohe Konzentrationen des Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), einem pro-inflammatorischen Chemokin, konnten auch mit einer erhöhten Inzidenz von Metastasen bei Brust-, Kolon-, Prostata- und Halstumoren assoziiert werden (BORSIG *et al.*, 2014).

Die Zytokine aktivieren im entzündlichen Mikroklima nicht nur die Leukozyten, sondern auch weitere Zellen, wie beispielsweise die Endothelzellen. Dies führt zu einer vermehrten Ausschüttung inflammatorischer Zytokine. Daher sind die Endothelzellen ein wichtiger Bestandteil bei der Entstehung eines entzündlichen Mikroklimas.

### 1.3 DIE ROLLE DER ENDOTHELZELLEN

---

Die Aktivierung der Endothelzellen mit inflammatorischen Markern führt unter anderem zu einer erhöhten Expression dieser Adhäsionsmoleküle, welche essenziell für die Adhäsion von Leukozyten bei der Entzündungsreaktion und Tumorzellen bei der Metastasenbildung sind (CHIRIVI *et al.*, 1994). In der frühen Phase der Zelladhäsion verlangsamen Selektine wie E- und P-Selektin die, an der Gefäßwand entlang rollenden Zellen und führen zu einer Adhäsion an den Endothelzellen. Neben den Selektinen bewirken noch weitere Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 eine Adhäsion der Zellen und fördern zudem den Austritt aus dem Gefäßsystem (HARJUNPÄÄ *et al.*, 2019).

Endothelzellen spielen auch eine tragende Rolle bei der Angiogenese, welche das Tumorstadium fördert. Erst durch die Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff über die Gefäße wird ein Wachstum ermöglicht (FOLKMAN, 1992). In der Arbeit von DOME (DOME *et al.*, 2007) werden verschiedene Entstehungsarten der Blutgefäße in Tumoren beschrieben. Die Gefäße können ausgehend von einem bestehenden Blutgefäß in das Tumorgewebe einsprießen oder der Tumor kann in einem bestehenden Gefäßnetz wachsen. Gefäße können sich auch durch Spaltung vermehren, aus endothelialen Vorläuferzellen neubilden oder durch glomeruläre Angiogenese in den Tumor einsprießen. Die Zellen von hochmalignen Tumoren können auch die Eigenschaften von Endothelzellen annehmen und so ein Gefäßsystem ausbilden.

Es wurden zudem die Auslöser der Angiogenese beschrieben. Der Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) fördert sowohl die Einsprießung von Gefäßen als auch die Entstehung aus endothelialen Vorläuferzellen sowie die glomeruläre Angiogenese (DOME *et al.*, 2007). Die Expression von VEGF konnte zudem mit Metastasenbildung, einer schlechten Prognose und einer erhöhten Rezidivrate in Verbindung gebracht werden (AGGARWAL UND GEHLOT, 2009).

## 1.4 METASTASEN

Die Entstehung von Metastasen ist eine häufige und zumeist letale Komplikation von soliden Tumorerkrankungen. Bei diesen Tumoren ist eine definitive Heilung in den meisten Fällen nur möglich, wenn die gesamte Tumormasse entfernt werden kann. Bestehen mehrere Metastasen, ist eine komplette Entfernung oft nicht möglich, wodurch die Heilungschance für den Patienten stark sinkt. Beim Bronchialkarzinom beispielsweise sinkt die 5-Jahresüberlebensrate auf 2 %, wenn Fernmetastasen gebildet wurden (GOLDSTRAW *et al.*, 2007). In diesen Fällen wird meist eine palliative Therapie empfohlen, bei der nicht die Heilung, sondern die Symptommelinderung im Mittelpunkt steht.

Die Bildung einer Metastase erfolgt in mehreren Schritten. Um in den Blutkreislauf zu gelangen, müssen die Tumorzellen durch das Gewebe zu den Blutgefäßen migrieren und dort die Basalmembran und das Epithel durchbrechen. Dies wird oft mit der epithelialen-mesenchymale-Transition (EMT) in Zusammenhang gebracht (THIERY *et al.*, 2002). Dies ist ein Prozess, der physiologisch während der embryonalen Entwicklung stattfindet. Die Zellen verlieren dabei ihre epithelialen Charakteristika und zeigen Eigenschaften mesenchymaler Zellen. Zum Beispiel ändert sich die Zellmorphologie von einer kubischen zu einer spindelförmigen Zellform, es kommt zu Änderungen der Zell-Zell-Kontakte und die Zellen können durch die extrazelluläre Matrix migrieren (BOYER UND THIERY *et al.*, 1993). Vieles spricht dafür, dass EMT die Tumorzellen befähigt, in den Blutkreislauf zu migrieren; jedoch konnte dies bisher nicht eindeutig bewiesen werden (YANG UND WEINBERG, 2008). Teilweise gelangen die Tumorzellen auch über die Lymphgefäße in die Blutbahn (CHAMBERS *et al.*, 2002). Die Aufgabenstellung dieser Arbeit ist jedoch auf die hämatogene Metastasierung begrenzt.

Um die Gefäße zu verlassen, müssen die Zellen an das Endothel adhären, ähnlich wie Leukozyten beim Austreten aus der Blutbahn. Diese Interaktion wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt (CHIRIVI *et al.*, 1994). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass Selektine und Integrine eine wichtige Rolle bei der Adhäsion spielen (BENDAS UND BORSIG, 2012). Die Zellen müssen anschließend in dem Gewebe anfangen zu proliferieren und erneut eine Angiogenese auslösen (CHAMBERS *et al.*, 2002).

## 1.5 TUMORTHERAPIE

Bei jedem Patienten, der an einem malignen soliden Tumor erkrankt ist, wird zunächst ein Staging, bei dem die Tumorausbreitung untersucht wird und eine zytologische Untersuchung des Tumorgewebes, das sogenannte Grading, durchgeführt. Die Therapie wird individuell an die Situation des Patienten angepasst. Bei soliden Tumoren kommt der chirurgischen Entfernung eine Schlüsselrolle zu. In vielen Fällen wird die Heilungschance durch eine Kombination mit einer Chemo- oder Radiotherapie entscheidend verbessert. Dies konnte unter anderem für

das Magen- und das Lungenkarzinom belegt werden (KANDA *et al.*, 2015; HORN UND SANDLER, 2007). Bei einigen Tumorentitäten kommt zudem eine Antikörper- oder Hormontherapie zur Anwendung (MEDEN *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2007). Ist das Tumorwachstum bereits weit fortgeschritten, kann in manchen Fällen durch eine Chemo- oder Radiotherapie die Tumormasse soweit reduziert werden, dass eine Operation möglich ist. Ebenso kommen der Chemo- und der Radiotherapie in der palliativen Therapie eine entscheidende Aufgabe zu. Es werden beispielsweise Knochenmetastasen bestrahlt, um Schmerzen zu lindern und Knochenbrüche zu verhindern. Der entscheidende Vorteil der Radiotherapie gegenüber der Chemotherapie ist, dass sie nur lokal im Bestrahlungsgebiet wirkt und somit die Zellen nur dort betroffen sind bei gleichzeitiger Schonung des gesunden Normalgewebes.

### 1.6 RADIOTHERAPIE

---

Bei der Radiotherapie wird das betroffene Gewebe mit ionisierender Strahlung behandelt. Es wird die Teletherapie von der Brachytherapie unterschieden. Bei der Teletherapie wird das betroffene Gebiet von außen bestrahlt. Bei der Brachytherapie werden radioaktive Stoffe in die Nähe oder in das zu bestrahlende Gewebe eingebracht.

In der Teletherapie wird meist hochenergetische Photonenstrahlung genutzt, da diese eine günstige Tiefenwirksamkeit besitzt. Sie zählt zu den indirekt ionisierenden Strahlen, da durch die Wechselwirkung mit dem Gewebe sekundäre Elektronen entstehen, welche dann ionisierend auf das umgebende Gewebe wirken. Diese können direkt an Zellbestandteile angreifen oder indirekt durch Radiolyse von Wasser zur Bildung von Hydroxylradikalen führen, welche dann die Zellbestandteile schädigen. Je nach Ausmaß der Beeinträchtigung kann es zur Nekrose, Apoptose oder zum Proliferationsstopp kommen. Die Bestrahlungsdosis richtet sich nach der Tumorerkrankung und nach dem Allgemeinzustand des Patienten. Beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom wird meist eine Einzeldosis von 1,8 Gy – 2 Gy verwendet (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN E.V., *Deutschen Krebsgesellschaft e.V.*, *Deutschen Krebshilfe*, 2018).

Durch die Bestrahlung von Tumorgewebe kommt es zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B, welches, wie oben beschrieben, eine wichtige Rolle bei der Entzündungskaskade spielt (LI UND KARIN, 1998). Auch viele weitere proinflammatorische Zytokine und Chemokine unter anderem TNF $\alpha$  und ICAM-1 werden aktiviert (MULTHOFF UND RADONS, 2012).

Allerdings zeigt eine niedrigdosierte Strahlung wiederum eine anti-inflammatorische Wirkung (ARENAS *et al.*, 2012). Diese Effekte konnten ab einer Bestrahlungsdosis von niedriger als 1,0 Gy beobachtet werden. (RÖDEL *et al.*, 2015; DERLOCH *et al.*, 2016); Strahlung in diesem Bereich wird zur Behandlung entzündlicher Prozesse eingesetzt, beispielsweise bei Arthrosen,

Ellenbogensyndrom und Fasciitis plantaris (DEGRO-AG „RADIOTHERAPIE GUTARTIGER ERKRANKUNGEN“, 2018) Daher wurde in dieser Arbeit ein Dosisbereich von 0,1 Gy bis 6 Gy untersucht.

### 1.7 ZIELSTELLUNG

---

Die Bestrahlung hat je nach Bestrahlungsdosis eine pro- oder antiinflammatorische Wirkung. Unabhängig von der Bestrahlung kann sowohl im Tumor- als auch im umliegenden Gewebe ein entzündliches Mikroklima nachgewiesen werden, welches eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren sowie deren Metastasenbildung spielt. Endothelzellen als Bestandteil des Mikroklimas interagieren dabei auf verschiedenen Ebenen mit den Tumorzellen.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels verschiedener *in vitro*-Experimente den Einfluss ionisierender Strahlung unter Einfluss eines entzündlichen Mikroklimas auf die Tumor-Endothelzellinteraktion zu ermitteln. Es sollten die Effekte der Bestrahlung im Bereich von 0 Gy bis 6 Gy auf Endothel- und Tumorzellen untersucht werden, um ggf. weitere Therapieoptionen, wie beispielsweise immunmodulierende Therapieansätze zu ermitteln. Hierfür sollten Zellen der hybriden Endothelzelllinie EA.hy926 sowie der Tumorzelllinie A549 verwendet werden. Ein entzündliches Mikroklima wurde durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$  simuliert. Um die Auswirkungen auf die Endothelzellen beurteilen zu können, wurde die Sekretion verschiedener inflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren gemessen. Der Einfluss auf die Metastasenbildung sollte mittels Migrationsassay und Adhäsionsassay ermittelt werden.

## **II. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 VERWENDETE ZELLINIEN**

In der vorliegenden Arbeit wurden die adhärent wachsenden humanen Zelllinien EA.hy926 und A549 verwendet. Die A549-Zellen, welche ursprünglich aus einem Adenokarzinom der Lunge gewonnen wurden, stammten von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland). EA.hy926 ist eine Endothelzelllinie, die durch die Fusion von A549 und Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) entwickelt wurde und von der American Type Culture Collection (ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) bezogen wurde.

### **2.2 KULTIVIERUNG DER ZELLEN**

#### **2.2.1 KULTIVIERUNG DER A549-ZELLEN**

Das Nährmedium für die A549-Zellen enthielt Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Lonza Group, Basel, Schweiz), 10 % fetales Kälberserum (FBS; Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland).

Die Zellen wurden passagiert, bevor sie zu 80 % konfluent waren. Zunächst wurde das Medium, die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; PAA Laboratories GmbH, Coelbe, Deutschland) und 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung (GE Healthcare) auf 37°C erwärmt. Das alte Nährmedium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin behandelt. Nachdem sich die Zellen gelöst hatten, wurde die Reaktion mit FBS-haltigem Nährmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Nährmedium resuspendiert, die Zellen in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.

#### **2.2.2 KULTIVIERUNG DER EA.HY926-ZELLEN**

Das Nährmedium für die EA.hy926-Zellen enthielt DMEM mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 % Natriumpyruvat (Merck Milipore).

Die EA.hy926-Zellen wurden in gleicher Weise wie die A549-Zellen passagiert, bevor sie höchstens zu 80 % konfluent waren.

### **2.3 BESTRAHLUNG MIT DEM LINEARBESCHLEUNIGER**

Die Bestrahlung erfolgte am Linearbeschleuniger der Marke Oncor Impression Plus der Firma Siemens AG (Erlangen, Deutschland) mit einer Dosisrate von 3,75 Gy/min und einer Energie von 6 MV.



Die Zellen wurden mit 0,1 Gy; 0,5 Gy; 2 Gy; 4 Gy und 6 Gy bestrahlt. Als Kontrolle dienten mit 0 Gy scheinbestrahlte Zellen, welche zusammen mit den anderen Zellen in den Bestrahlungsraum transportiert, jedoch nicht bestrahlt wurden.

### **2.4 ZUGABE VON TNF- $\alpha$ UND SYNCHRONISATION DER ZELLEN**

Die Zellen wurden in den Versuchen synchronisiert, um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, da die Zellen je nach Zellzyklusstadium eine andere Strahlensensibilität zeigen. Durch Serumentzug fehlten den Zellen Wachstumsreize, sodass sich die Zellen nicht mehr teilten und von der G1-Phase nicht in die S-Phase übertraten, sondern in der G0-Phase arretierten.

Um ein entzündliches Mikroklima zu simulieren und den Einfluss der Entzündung zu untersuchen, wurden jeweils der Hälfte der Proben TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) zugesetzt. Hierfür wurden 2 h vor der Bestrahlung das Medium durch serumreduziertes Medium mit 0,5 % FBS oder serumfreies Medium, je nach Versuch ersetzt. Bei der Hälfte der Wells wurden dem frischen Nährmedium noch 10 ng/ml TNF- $\alpha$  hinzugefügt.

### **2.5 MESSUNG DER VIABILITÄT NACH BESTRAHLUNG**

Um die metabolische Aktivität der Zellen nach Bestrahlung zu messen, wurde ein Water-Soluble-Tetrazolium-Assay (WST-1; Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Mittels zellulärer mitochondrialer Succinat-Tetrazolium Dehydrogenasen in intakten Zellen wird das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz WST-1 in ein dunkelrotes Formazan umgewandelt. Dieser Farbumschlag kann spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden, so können Rückschlüsse auf die Aktivität der Dehydrogenasen und somit auf die Viabilität der Zellen gezogen werden. Als Referenzwellenlänge diente 650 nm.

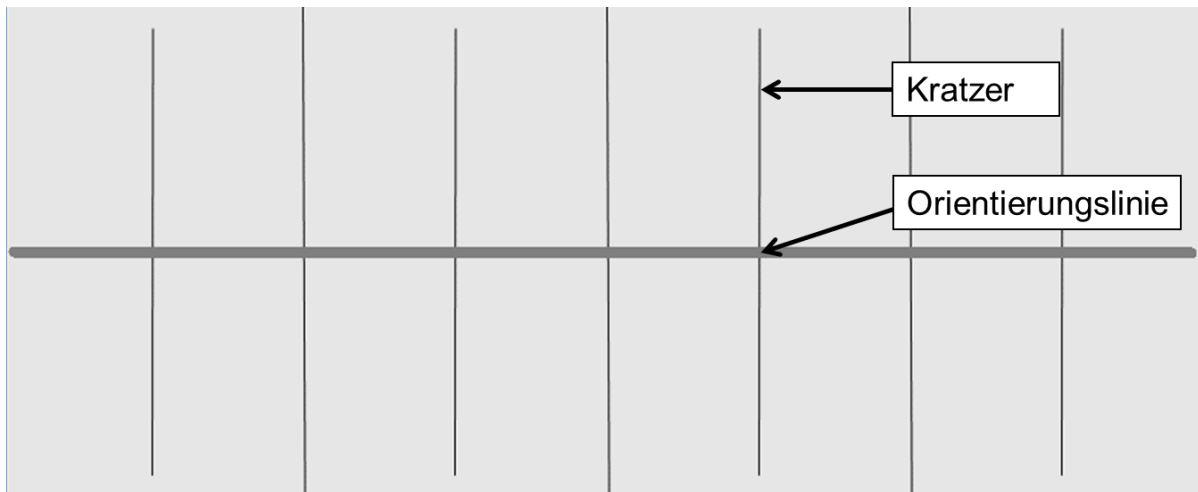
Der WST-1-Assay wurde sowohl mit den A549-Zellen als auch mit den EA.hy926-Zellen in Triplikaten durchgeführt. Für den Viabilitätstest wurden 96-Wellplatten genutzt. 24 h vor Bestrahlung wurden die Zellen in die Wells mit einer Einsaatdichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well in 0,2 ml Nährmedium ausgesät. 2 h vor der Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt und durch serumreduziertes Medium mit 0,5 % FBS oder serumfreies Medium ersetzt. Die Hälfte der Wells enthielt neben dem frischen Medium noch 10 ng/ml TNF- $\alpha$ . Mit serumreduziertem Nährmedium bzw. serumfreiem Medium gefüllte Wells dienten der Messung der Leerwerte, diese enthielten keine Zellen. Nach der Bestrahlung der Zellen wurde zur Messung der Viabilität den Wells 10  $\mu$ l WST-1 pro 100  $\mu$ l Medium hinzugegeben und diese für weitere 2 h inkubiert. Die Messung des Farbumschlags vom schwach rot gefärbten WST-1 zum dunkelroten Formazan erfolgte wie beschrieben mittels photometrischer Auswertung. Weitere Messungen nach 24 h und 48 h ermöglichten die Beurteilung der Viabilität im Verlauf.

## 2.6 SCRATCH-ASSAY

Mit Hilfe des Scratch-Assays kann das Migrationsverhalten von Zellen beurteilt werden. Es wird ein künstlicher Spalt im Zellrasen geschaffen und dokumentiert, wie die Zellen in den Spalt einwandern.

Für den Test wurden Objektträger mit 4 Wells verwendet. In jedes Well wurden  $9,6 \times 10^4$  A549-Zellen in 1 ml Medium ausgesät und für 48 h im Brutschrank inkubiert, um einen konfluenten Zellrasen zu erhalten. 2 h vor der Bestrahlung wurde das Nährmedium durch serumreduziertes Nährmedium mit 0,5 % FBS ersetzt. Bei dieser Serumkonzentration wird die Proliferation der Zellen minimiert, sodass die aktive Migration in den zellfreien Spalt optimal untersucht werden kann. Die Konzentration des FBS wurde in Vorversuchen ermittelt. Bei der Hälfte der Wells wurden 10 ng/ml TNF- $\alpha$  hinzugegeben.

Direkt nach der Bestrahlung wurden mit einer 10  $\mu$ l Pipettenspitze eine zellfreie Linie in jedes Well, senkrecht zu den Orientierungslinien, in den Zellrasen gekratzt (Abb. 2).



**Abb. 2: Schematische Darstellung eines Objektträgers mit Kratzern im Zellrasen. Die Wachstumsfläche pro Well beträgt 2,5 cm<sup>2</sup>.**

Danach wurden die Wells mit PBS vorsichtig gewaschen, um die abgelösten Zellen zu entfernen und anschließend serumreduziertes Medium mit bzw. ohne TNF- $\alpha$  hinzugegeben. Zur Dokumentation wurde danach die Mitte jedes Wells fotografiert. Zuvor wurde die Mitte der Wells mit einer Linie markiert. 24 h und 48 h nach der Bestrahlung wurden die einzelnen Wells an derselben Stelle erneut fotografiert und die Zellmigration auf diese Weise dokumentiert.

## 2.7 MULTIPLEX-ASSAY

Um die Konzentration von Interleukin-8 (IL-8), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), E-Selektin, P-Selektin, Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) und Vascular Cell Adhesion Protein 1 (VCAM-1) zu messen, wurde ein

---

human Multiplex-Assay der Firma R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) verwendet. Dazu wurden  $1,8 \times 10^5$  EA.hy926-Zellen in 1 ml Nährmedium pro Well in 24-Wellplatten ausgesät. Die Platten wurden für 24 h im Brutschrank kultiviert. 2 h vor Bestrahlung wurde das Nährmedium durch serumfreies Nährmedium ersetzt. In die Hälfte der Wells wurde zudem 10 ng/ml TNF- $\alpha$  zugegeben. Die Bestrahlung erfolgte mit den im Abschnitt 2.3 beschriebenen Dosen. 2 h, 5 h, 24 h, 48 h und 72 h nach der Bestrahlung wurden Zellkulturüberstände gesammelt und bis zur weiteren Analyse bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Überstände wurden nach der Anleitung des Herstellers vorbereitet und gemessen. Bei dem Multiplex-Assay wird ein Antigen-Antikörper-Sandwich gebildet. Hierbei wurden farbkodierte Polystyrenkugeln mit Antikörpern beschichtet. Über die Antikörper binden die gesuchten Analyten an die Polystyrenkugeln. Ein zweiter, an Biotin gebundener Antikörper, bindet spezifisch an die Analyten und bildet ein Antigen-Antikörper-Sandwich. An das Biotin bindet ein Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex. Mit Hilfe von zwei Lasern kann die Konzentration der gesuchten Analyten gemessen werden. Mittels der Farbkodierung der Polystyrenkugeln kann ein Laser mit einer Wellenlänge im roten Teil des Spektrums den Analyten klassifizieren und ein weiterer Laser mit einer Wellenlänge im grünen Teil des Spektrums klassifiziert das durch Phycoerythrin vermittelte Signal und bestimmt auf diesem Weg die Quantität. Die Messungen erfolgten an einem Bio-Plex® 200 Suspension Array System (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und die Datenauswertung mit der Software Bio-Plex Manager™ (Version 4.1).

## **2.8 ADHÄSIONSASSAY**

Der Einfluss der Bestrahlung und von TNF- $\alpha$  auf die Adhäsion von Tumorzellen an die Endothelzellen wurde mit einem Adhäsionsassay gemessen. Hierbei wurden gefärbte Tumorzellen für 2 h in ein Well mit einem konfluentem Zellrasen aus EA.hy926-Zellen gegeben. Für den Versuch wurden die Zellen zunächst getrennt inkubiert. Die A549-Zellen wurden dazu trypsinisiert und zentrifugiert, mit PBS gewaschen und im Anschluss mit Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE, Molecular Probes, Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland) Lösung (1,2 mM) für 10 min gefärbt. Dies ist ein Vitalfarbstoff, mit dessen Hilfe die A549-Zellen im Durchflusszytometer von den EA.hy926-Zellen unterschieden werden können. Im Anschluss wurden die Zellen 24 h bis zur Bestrahlung in T75 Flaschen kultiviert. Die EA.hy926-Zellen wurden ebenfalls 24 h vor der Bestrahlung in Duplikaten in einer 6-Wellplatte mit jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. 2 h vor Bestrahlung wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Das Vollmedium wurde sowohl bei den A549-Zellen, als auch bei den EA.hy926-Zellen, gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Bei den EA.hy926-Zellen wurde in zwei der vier Wells zum serumfreien Medium 10 ng/ml TNF- $\alpha$  hinzugefügt. Je nach Versuch wurden die Tumorzellen, die Endothelzellen oder beide Zellarten simultan bestrahlt und anschließend für

weitere 24 h kultiviert. 24 h nach der Bestrahlung wurden die A549-Zellen trypsinisiert, jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen zu den EA.hy926-Zellen hinzugegeben und für 2 h gemeinsam inkubiert. Anschließend wurden die Wells zweimal mit PBS gewaschen, um alle nicht-gebundenen A549-Zellen zu entfernen. Danach wurden alle Zellen zentrifugiert und in PBS mit 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA) resuspendiert und durchflusszytometrisch der Anteil der A549-Zellen in der Gesamtzellzahl quantifiziert. Mit Hilfe des BSA wurde die Apoptose der A549-Zellen bis zur Messung vermieden.

### **2.9 AUSWERTUNG DER DATEN UND STATISTISCHE ANALYSEN**

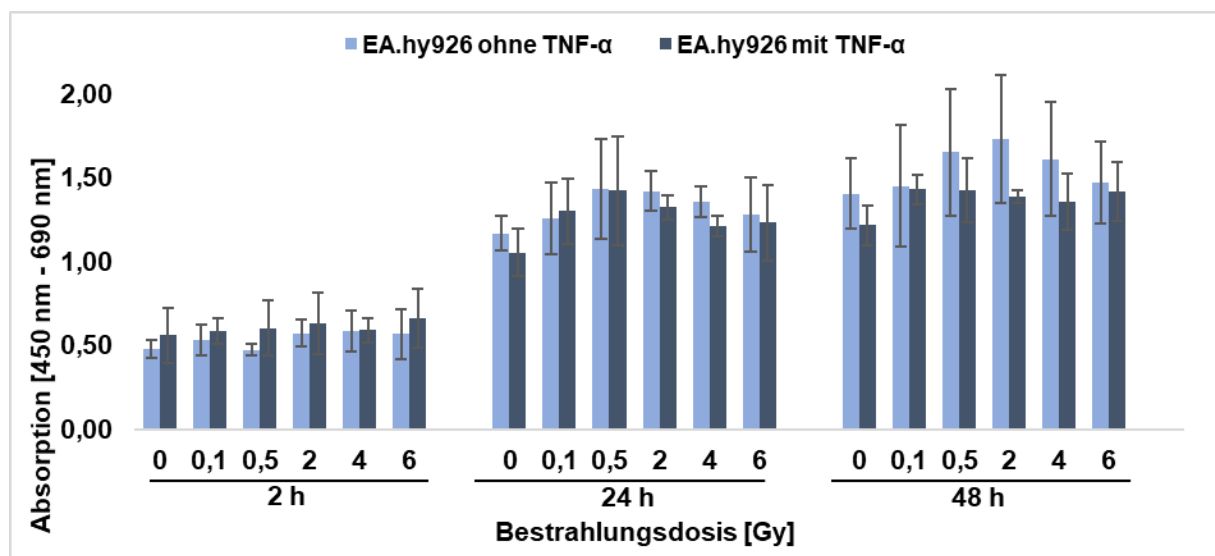
---

Bei den Ergebnissen sind alle Daten als Mittelwerte (MW) von drei bis sechs unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Innerhalb der Einzelversuche wurden Proben für die Messung inflammatorischer Marker jeweils in Einzelansätzen gemessen; Adhäsions- und Scratch-Assay erfolgten jeweils in Duplikaten und die Viabilitätsmessung in Triplikaten. Die statistische Signifikanz wurde mit STUDENTS t -Verteilung ermittelt, die Werte wurden auf \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  festgelegt.

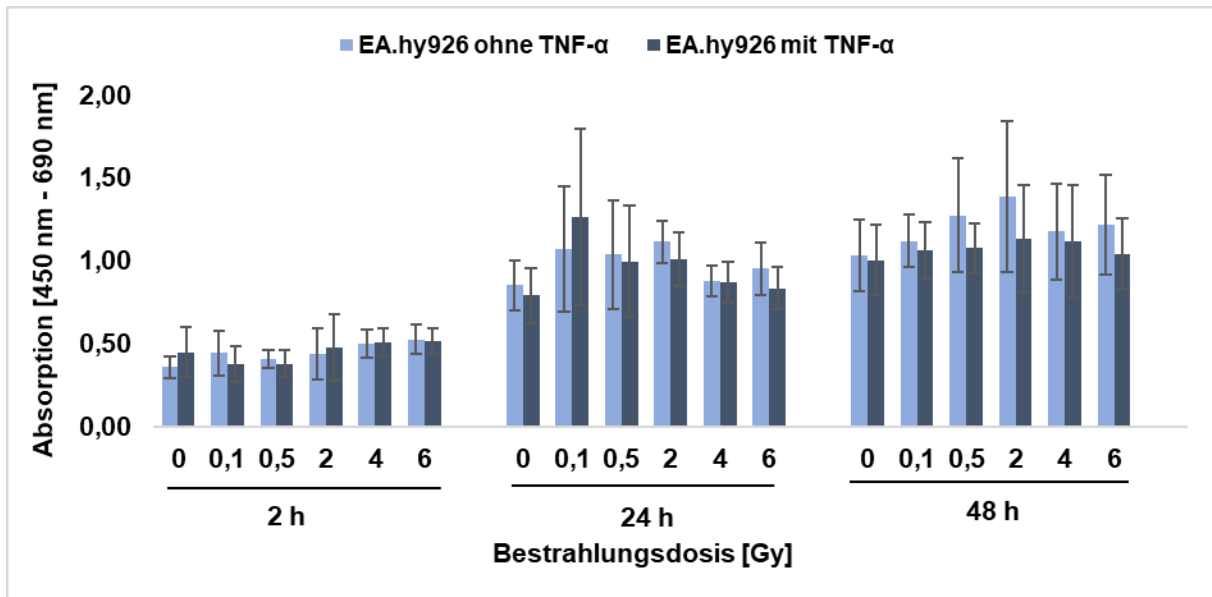
### III. ERGEBNISSE

#### 3.1 VIABILITÄT UNTER BESTRAHLUNG

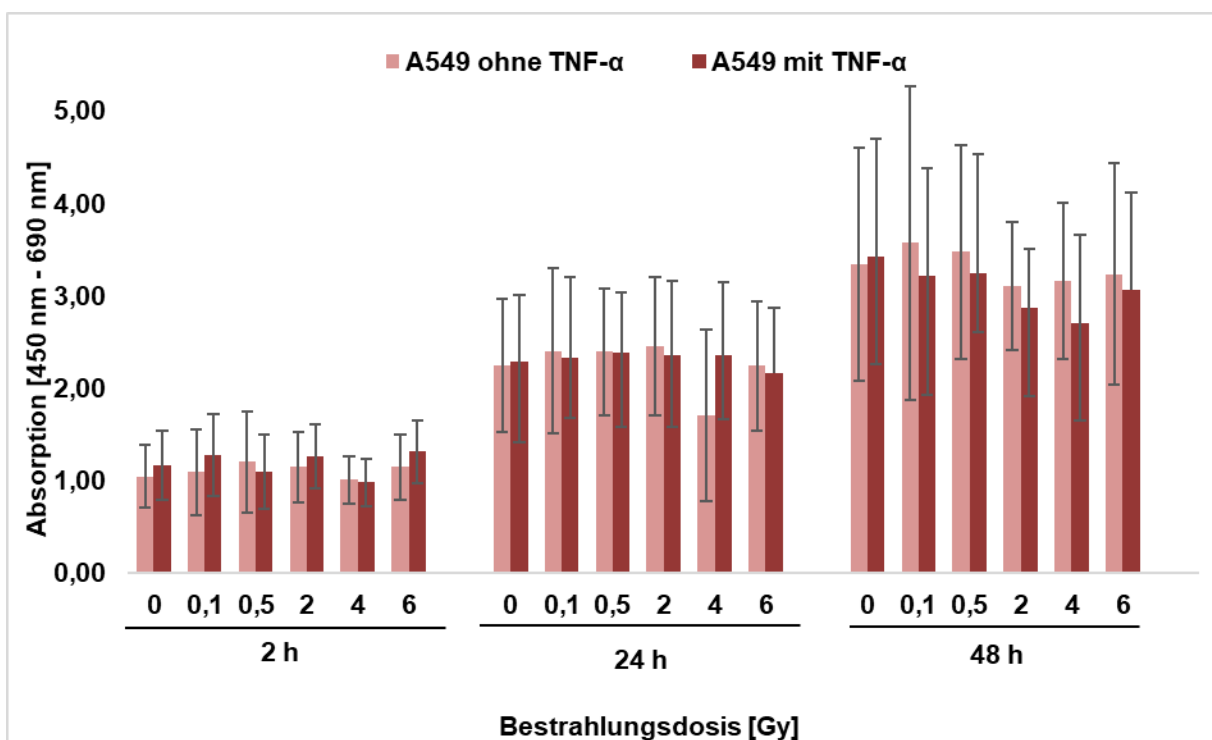
Um zu prüfen, ob die Bestrahlung und die Zugabe von TNF- $\alpha$  einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben, wurde ein WST-1 Test durchgeführt. Dieser Versuch half bei der Auswertung der nachfolgenden Versuche. Eine Änderung der Viabilität hätte starken Einfluss auf die Proteinsekretion, Migration und Adhäsion und damit auf die Ergebnisse der nachfolgenden Analysen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde, ebenso wie in den folgenden Experimenten, daher serumreduziertes (0,5 % FBS) (Abb. 3 und 5) und serumfreies Medium verwendet (Abb. 4 und 6).



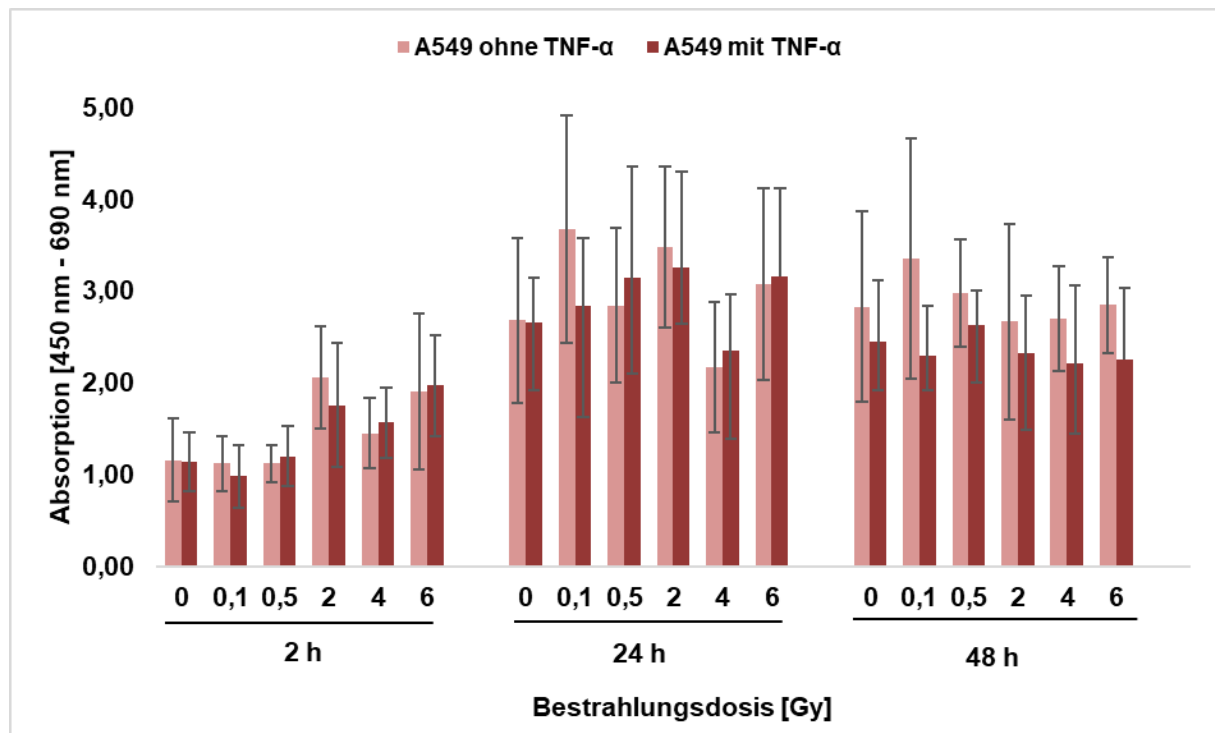
**Abb. 3: Absorption als Maß für die Viabilität der EA.hy926-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe in serumreduziertem Medium gemessen mittels WST-1-Tests.** Dargestellt sind MW $\pm$ SD, n=5.



**Abb. 4: Absorption als Maß für die Viabilität der EA.hy926-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe in serumfreien Medium gemessen mittels WST-1-Tests.** Dargestellt sind MW $\pm$ SD, n=5.



**Abb. 5: Absorption als Maß für die Viabilität der Tumorzellen A549 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe in serumreduziertem Medium gemessen mittels WST-1-Tests.** Dargestellt sind MW $\pm$ SD, n=5.

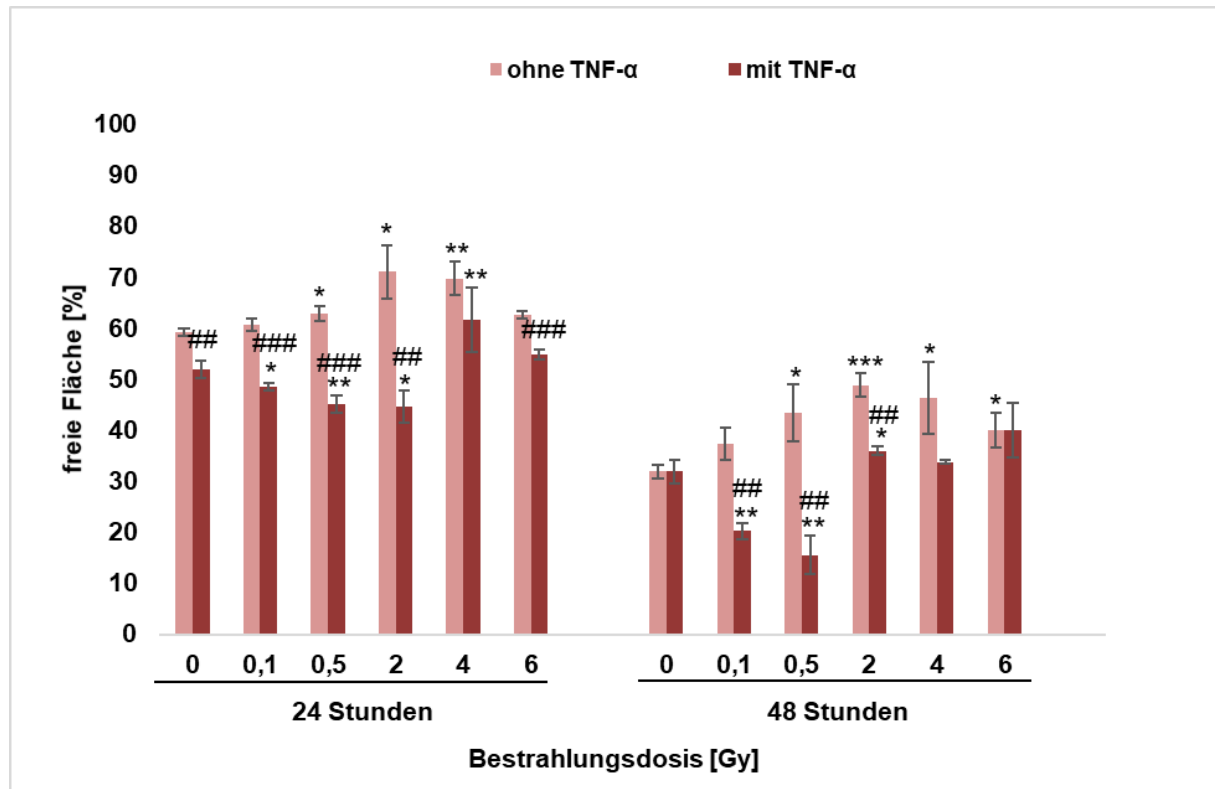


**Abb. 6: Absorption als Maß für die Viabilität der Tumorzellen A549 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe in serumfreiem Medium gemessen mittels WST-1-Tests.** Dargestellt sind  $MW \pm SD$ ,  $n=5$ .

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die A549-Zellen als auch die EA.hy926-Zellen 2 h, 24 h und 48 h nach der Bestrahlung vital waren. Über die ersten 24 h kam es bei allen Proben zu einem Anstieg der Viabilität der Zellen. Die Viabilität der A549-Zellen stieg dabei stärker an als die der EA.hy926-Zellen. In den Proben ohne TNF- $\alpha$  kam es im serumfreien Medium beispielsweise zu einer Absorption von 2,17 %-3,67 % bei den A549-Zellen (Abb. 6) und von 0,85 % - 1,12 % bei den EA.hy926-Zellen (Abb. 4). Zwischen den Messzeitpunkten 24 h und 48 h kam es bei der Verwendung von serumfreiem Medium nur noch zu einer geringen bzw. bei den A549-Zellen zu keiner Zunahme der Viabilität (Abb. 4 und Abb. 6). Im Vergleich dazu zeigte sich im serumreduzierten Medium nach den ersten 24 h ein weiterer Anstieg der Viabilität, wobei der Anstieg bei den A549-Zellen ebenfalls stärker war als bei den EA.hy926-Zellen (Abb. 3 und Abb. 5). Es konnte bei 0 Gy (ohne TNF- $\alpha$ ) ein Anstieg um 48 % bei den A549-Zellen und um 21 % bei den EA.hy926-Zellen gemessen werden.

### 3.2 MIGRATION

Mit Hilfe des Scratch-Assays kann die Migration von Zellen analysiert werden. Der Test wurde ausgeführt, um die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen A549 nach Bestrahlung mit verschiedenen Bestrahlungsdosen beurteilen zu können. Die Ergebnisse in Abb. 7 zeigen, wie viel Prozent der ursprünglichen freien Fläche nicht von Zellen bedeckt war.



**Abb. 7: Migration der A549-Tumorzellen 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe.** Die Ergebnisse zeigen, wie viel Prozent der ursprünglich freien Fläche noch nicht von Zellen bedeckt war. Dargestellt sind MW $\pm$ SD, n=3; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und ebenfalls mit/ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  bei 0 Gy; ###p<0,01; ####p<0,001 bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und mit gleicher Bestrahlungsdosis ohne TNF- $\alpha$ .

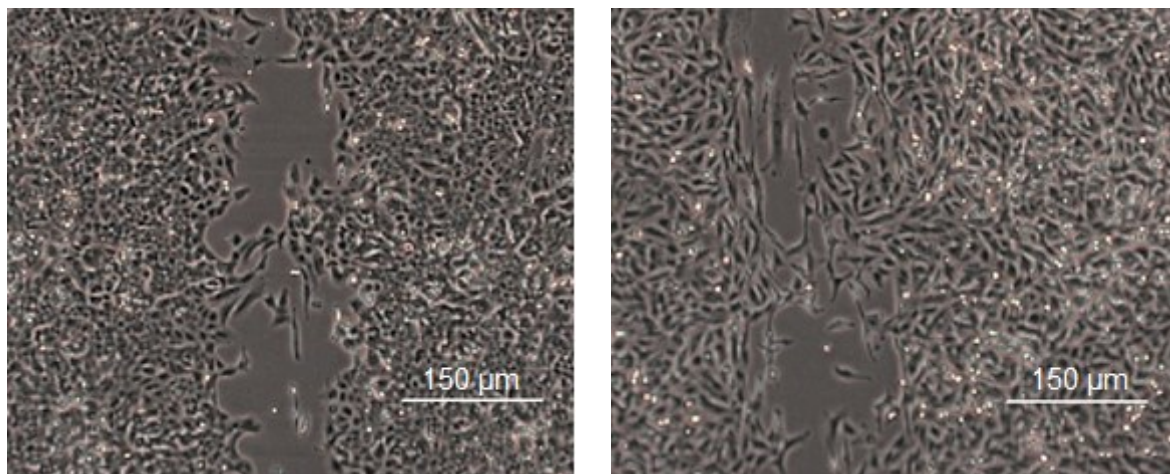
In allen Proben kam es über 24 h und 48 h zu einer Migration der Zellen in den Spalt und so zu einer Reduzierung der freien Fläche. Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy kam es beispielsweise in den Proben mit TNF- $\alpha$  nach 48 h zu einer Reduzierung auf 36 % der ursprünglich freien Fläche und bei den Proben ohne TNF- $\alpha$  auf 49 % der ursprünglich freien Fläche. Es zeigte sich sowohl ein Einfluss durch die Bestrahlung als auch durch die Zugabe von TNF- $\alpha$ .

In den Proben ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe führte die Bestrahlung zu beiden Zeitpunkten zu einer verminderten Migration im Vergleich zur scheinbestrahlten Kontrolle (Abb. 7). Signifikante Un-



terschiede zeigten sich 24 h nach Bestrahlung mit 0,5 Gy, 2 Gy und 4 Gy und 48 h nach Bestrahlung mit 0,5 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy. Die Hemmung war am stärksten bei 2 Gy (48,9 % bei 2 Gy im Vergleich zu 31,9 % bei 0 Gy nach 48 h).

Durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  änderte sich der Einfluss der Bestrahlung: Eine Bestrahlung mit 0,1 Gy; 0,5 Gy oder 2 Gy führte nach 24 h zu einem signifikant schnelleren Bewachsen der freien Fläche als in der scheinbestrahlten Probe. Die freie Fläche verkleinerte sich auf 48,5 % der ursprünglichen Fläche bei 0,1 Gy, 45,1 % bei 0,5 Gy und 44,6 % bei 2 Gy. Nach einer Bestrahlung mit 0 Gy waren hingegen 52,0 % unbewachsen. Nach 48 h zeigte sich bei 2 Gy eine signifikant verminderte Migration (36,0 % bei 2 Gy im Vergleich zu 31,9 % bei 0 Gy). Bei höheren Bestrahlungsdosen (4 Gy, 33,8 % und 6 Gy, 40,1 %) kam es, wie in den Proben ohne TNF- $\alpha$ , sowohl nach 24 h als auch nach 48 h zu einer Hemmung der Migration. 24 h nach Bestrahlung mit 4 Gy zeigte sich eine signifikant größere freie Fläche (61,6 %), als bei einer Bestrahlung mit 0 Gy (51,9 %). Zudem zeigte sich, wie in Abb. 8 dargestellt, nach der Behandlung mit TNF- $\alpha$  gehäuft eine veränderte Zellmorphologie mit vermehrt länglichen Zellen mit Pseudopodien.



**Abb. 8: A549-Zellen 48 h nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  (links) und mit Zugabe von TNF- $\alpha$  (rechts).** Nach Zugabe von TNF- $\alpha$  zeigen die Zellen länglichere Pseudopodien im Vergleich zu jenen ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe.

### 3.3 KONZENTRATION DER INFLAMMATORISCHEN MARKER

Für die Analyse von sieben inflammatorischen Markern (IL-8, MCP-1, P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1 und VEGF) im Kulturüberstand der EA.hy926-Zellen wurde ein Multiplex-Assay verwendet. Die Konzentrationen der Marker wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten (2 h, 5 h, 24 h, 48 h und 72 h) nach Bestrahlung gemessen. Es wurde sowohl der Einfluss

durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  als auch durch die Bestrahlung auf die Konzentration der Proteine untersucht. Die Ergebnisse aus den Analysen der einzelnen Marker sind in den nachfolgenden Kapiteln einzeln aufgeführt.

### 3.3.1 IL-8

Eine erhöhte Konzentration von IL-8 führt zu einer verstärkten Entzündungsreaktion durch Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und vermehrter Ausschüttung weiterer Zytokine, zum anderen führt sie zu einer vermehrten Proliferation und zur vermehrten Angiogenese (PALENA *et al.*, 2012). Die Ergebnisse der Konzentrationsmessung des Entzündungsmediators IL-8 sind in Abb. 9 (ohne TNF- $\alpha$ ) und aufgrund der stark variierenden Konzentrationsbereiche zusätzlich in Abb. 10 (mit/ohne TNF- $\alpha$ ) dargestellt.

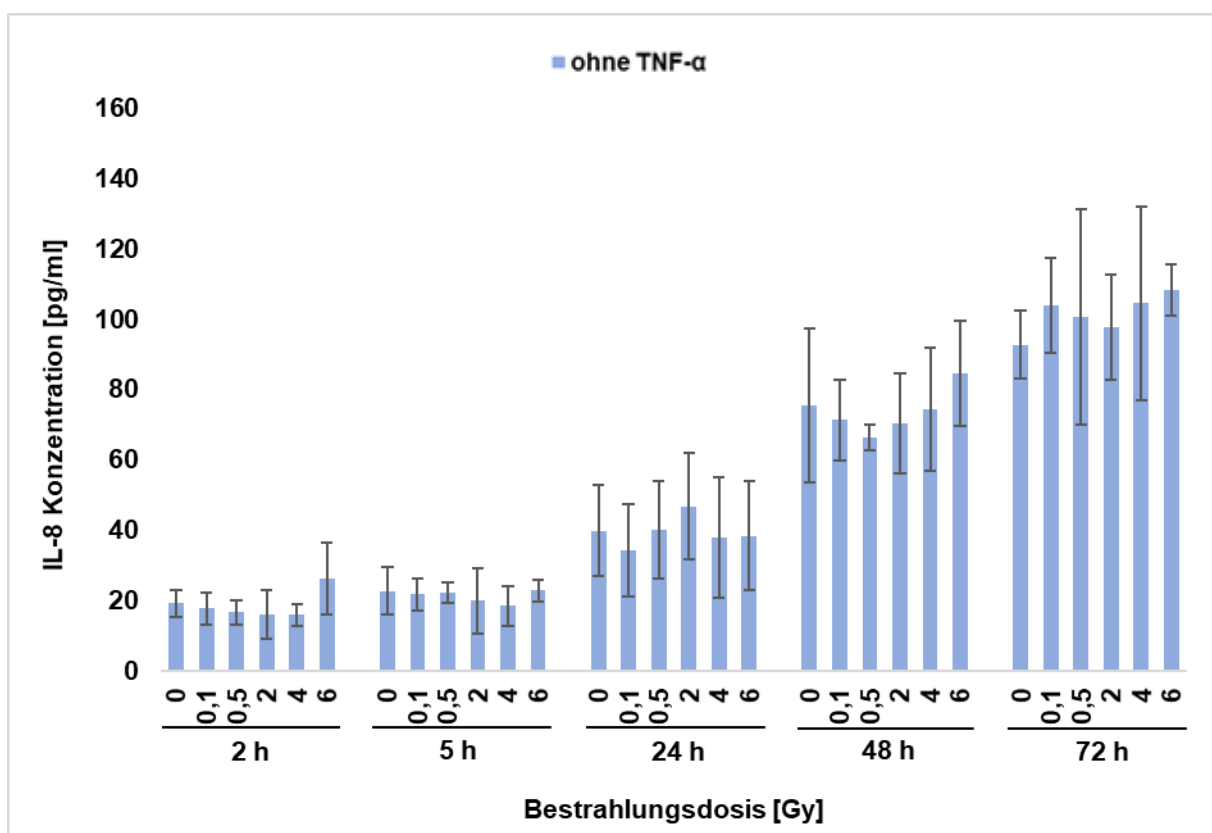
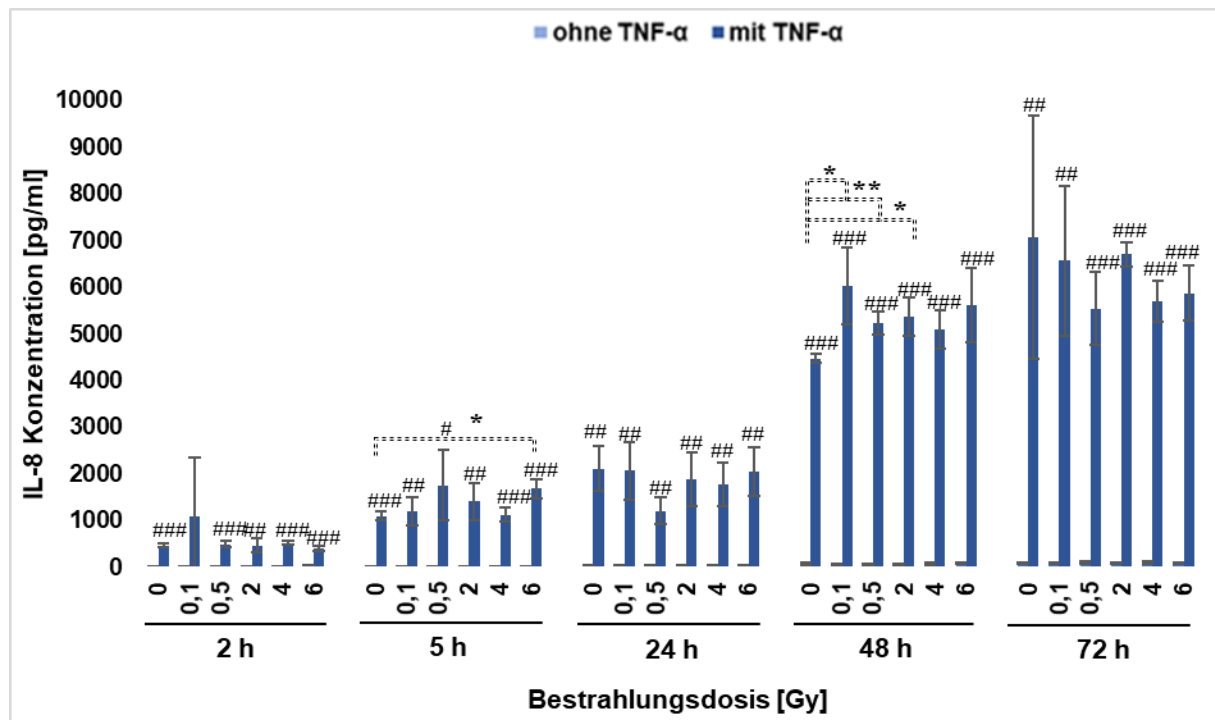


Abb. 9: Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung. Dargestellt sind MW $\pm$ SD, n=3.



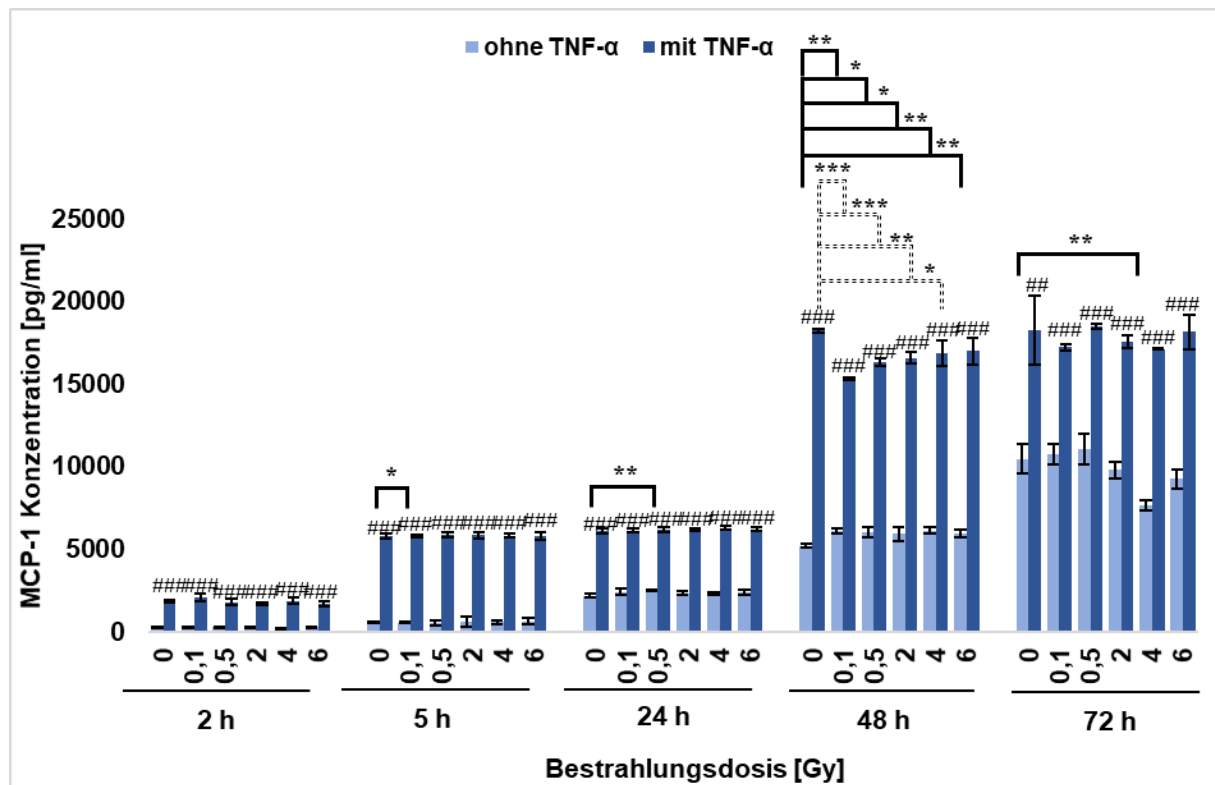
**Abb. 10: Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.** Dargestellt sind MW $\pm$ SD, n=3; \*p<0,05; \*\*p<0,01; bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und ebenfalls mit/ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  bei 0 Gy; #p<0,5; ##p<0,01; ###p<0,001 bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und mit gleicher Bestrahlungsdosis ohne TNF- $\alpha$ .

Die Konzentration von IL-8 stieg sowohl im Überstand der mit TNF- $\alpha$  behandelten Zellen als auch im Überstand der unbehandelten Zellen im zeitlichen Verlauf von 2 h bis 72 h nach Bestrahlung an (Abb. 9 und Abb.10). In Abb. 10 ist deutlich zu erkennen, dass durch die Behandlung der Zellen mit TNF- $\alpha$  die Konzentration von IL-8 stark anstieg, sodass bereits 2 h nach Bestrahlung mit 0 Gy die Proteinkonzentration in der Probe mit TNF- $\alpha$  24-fach höher war als in der unbehandelten Probe. 72 h nach Bestrahlung erreichten die Proben mit TNF- $\alpha$  einen mindestens 50-fach höheren Wert als die Proben ohne TNF- $\alpha$  mit gleicher Bestrahlungsdosis. Die Proben ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe (Abb. 9) zeigten 2 h, 5 h und 24 h nach Bestrahlung keinen signifikanten Einfluss durch die Bestrahlung. Nach 48 h zeigte sich in diesen Proben ein Abfall der Konzentration mit Anstieg der Bestrahlungsdosis bis 0,5 Gy. Ab 2 Gy kam es zu einem Anstieg, bis die Werte bei 6 Gy über denen der scheinbestrahlten Probe lagen (84,6 pg/ml im Vergleich zu 75,5 pg/ml). Nach 72 h zeigten alle bestrahlten Proben höhere IL-8-Konzentrationen als die scheinbestrahlte Probe. Die IL-8 Konzentration 72 h nach der Bestrahlung mit 6 Gy lag durchschnittlich 15,3 pg/ml höher als in der scheinbestrahlten Probe. Allerdings waren diese Unterschiede weder nach 48 h noch nach 72 h signifikant.

In den Proben mit TNF- $\alpha$ -Zugabe (Abb. 10) zeigte sich der Einfluss der Bestrahlung deutlicher: Bei 2 h war noch kein Unterschied zu der unbestrahlten Probe zu erkennen. 5 h nach Bestrahlung stieg die IL-8 Konzentration in den Proben, welche bestrahlt wurden, stärker an. Nach einer Bestrahlung mit 6 Gy kam es zu einem signifikant stärkeren Anstieg um 53 % im Vergleich zu der scheinbestrahlten Probe. Zum Messzeitpunkt 24 h nach der Bestrahlung wurde in den bestrahlten Proben eine niedrigere Konzentration gemessen als in der scheinbestrahlten Probe. Besonders deutlich ist bei Unterschied bei 2 Gy (1.209 pg/ml im Vergleich zu 0 Gy 2117 pg/ml). Nach 48 h hingegen verursachte die Bestrahlung einen Anstieg der IL-8-Konzentrationen bei allen Bestrahlungsdosen, der bei 0,1 Gy mit 6.020 pg/ml; 0,5 Gy mit 5.241 pg/ml und 2 Gy mit 5.371 pg/ml im Vergleich zu 0 Gy mit 4.473 pg/ml signifikant war. Nach 72 h ließ sich wiederum keine Erhöhung der Konzentration durch die Bestrahlung erkennen. Im Gegenteil, die IL-8-Konzentration war bei der scheinbestrahlten Probe mit 7.074,2 pg/ml höher als die Konzentration in den bestrahlten Proben, die zwischen 5.545,7 pg/ml und 6.708,9 pg/ml lagen. Allerdings zeigte sich hier eine hohe Standardabweichung.

### **3.3.2 MCP-1**

MCP-1 ist ebenso wie IL-8 ein Entzündungsmediator und bewirkt eine Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen ins Gewebe (DESHMANE *et al.*, 2009). Die Konzentrationen von MCP-1 in den Kulturüberständen der Endothelzellen EA.hy926 werden in Abb. 11 dargestellt.



**Abb.11: Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von MCP-1 im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.** Dargestellt sind  $MW \pm SD$ ,  $n=3$ ; \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und ebenfalls mit/ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  bei 0 Gy; ## $p<0,01$ ; ### $p<0,001$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und mit gleicher Bestrahlungsdosis ohne TNF- $\alpha$ .

Die Konzentration von MCP-1 stieg im Verlauf der Inkubationszeit in allen Proben an. Durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  kam es zu einem stärkeren Anstieg als in den Vergleichsproben ohne TNF- $\alpha$ . So lagen in den Proben mit TNF- $\alpha$  48 h nach Bestrahlung die gemessenen Konzentrationen zwischen 15.313 pg/ml und 18.231 pg/ml. In den Proben ohne TNF- $\alpha$  hingegen lagen die Konzentrationen zwischen 5.180 pg/ml und 6.075 pg/ml. Während die Konzentration in den Proben ohne TNF- $\alpha$  nach 48 h weiterhin deutlich anstieg (bei 4 Gy um 25,0 %, bei 0 Gy um 101,9 %), kam es in den Proben mit TNF- $\alpha$  zwischen 48 h und 72 h nach Bestrahlung zu einem geringeren Anstieg von max. 13,4 %. Dennoch war die Konzentration bei allen Messpunkten signifikant höher als in den Proben ohne TNF- $\alpha$ .

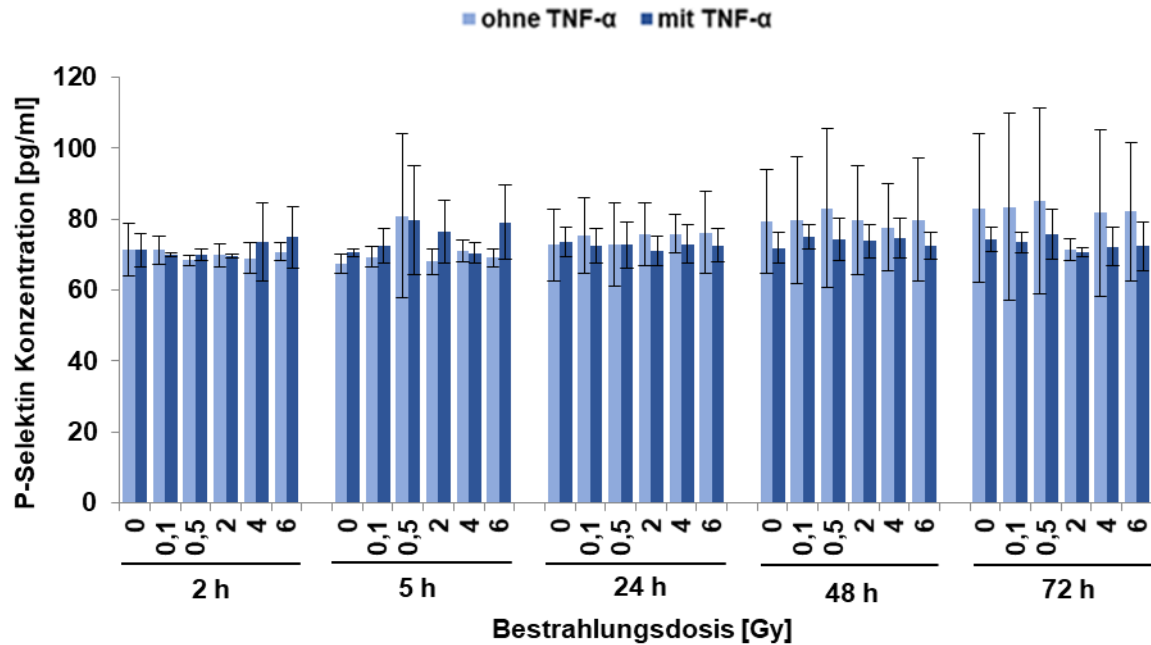
Die Bestrahlung hatte geringeren Einfluss auf die Konzentration als die Zugabe von TNF- $\alpha$ . Durch die Bestrahlung kam es innerhalb der ersten zwei Stunden zu keiner signifikanten Veränderung der MCP-1 Konzentration. Bei dem Messzeitpunkt 5 h nach der Bestrahlung mit 0,1 Gy zeigte sich in den Proben ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe eine signifikant niedrigere Konzentration

mit 544 pg/ml als in den scheinbestrahlten Proben mit 603 pg/ml. 24 h und 48 h nach Bestrahlung stieg die MCP-1 Konzentration in allen bestrahlten Proben, die nicht mit TNF- $\alpha$  behandelt wurden, stärker als in den nicht bestrahlten Proben an. 24 h nach Bestrahlung war der Unterschied bei 0,5 Gy signifikant (2.549 pg/ml im Vergleich zu 2.180 pg/ml bei 0 Gy). Bei dem Messpunkt 48 h nach Bestrahlung war dieser Unterschied mit einer Differenz von mindestens 753 pg/ml bei allen Bestrahlungsdosen signifikant. 72 h Stunden nach Bestrahlung wirkte sich die Bestrahlung je nach Dosis unterschiedlich aus. Nach einer Bestrahlung mit 0,1 Gy und 0,5 Gy kam es wie bei den früheren Messzeitpunkten zu einer um mindestens 290 pg/ml erhöhten MCP-1 Konzentration, bei höheren Dosen (2 Gy, 4 Gy, 6 Gy) verminderte sich die Konzentration durch die Bestrahlung. Bei 72 h und einer Dosis von 4 Gy zeigte sich eine signifikante Konzentrationsminderung auf 7.647 pg/ml im Vergleich zur unbestrahlten Probe mit einer Konzentration von 10.460 pg/ml.

Die Behandlung mit TNF- $\alpha$  bewirkte nicht nur einen starken Anstieg des Entzündungsmediators, sondern wirkte sich auch auf den Einfluss der Bestrahlung aus. Nach 2 h, 5 h und 24 h zeigte sich kein deutlicher Einfluss der Bestrahlung in den mit TNF- $\alpha$  behandelnden Proben. 48 h nach Bestrahlung kam es durch die Bestrahlung zu einer verminderten Konzentration von MCP-1. Bei 0,1 Gy (15.313 pg/ml), 0,5 Gy (16.323 pg/ml), 2 Gy (16.599 pg/ml) und 4 Gy (16.892 pg/ml) war der Unterschied zur unbestrahlten Probe (18.232 pg/ml) signifikant. Beim nächsten Messzeitpunkt (bei 72 h) lagen die MCP-1 Konzentrationen der bestrahlten Proben im Durchschnitt 756 pg/ml unter der nicht bestrahlten. Eine Ausnahme bildete die Bestrahlung mit 0,5 Gy.

### 3.3.3 P-SELEKTIN

In der Abb. 12 ist die Konzentration des Adhäsionsmoleküls P-Selektin aus den Kulturüberständen der EA.hy926-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. P-Selektin wird auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert und vermittelt die frühe Phase der Adhäsion von Leukozyten. (MOORE *et al.*, 1995)

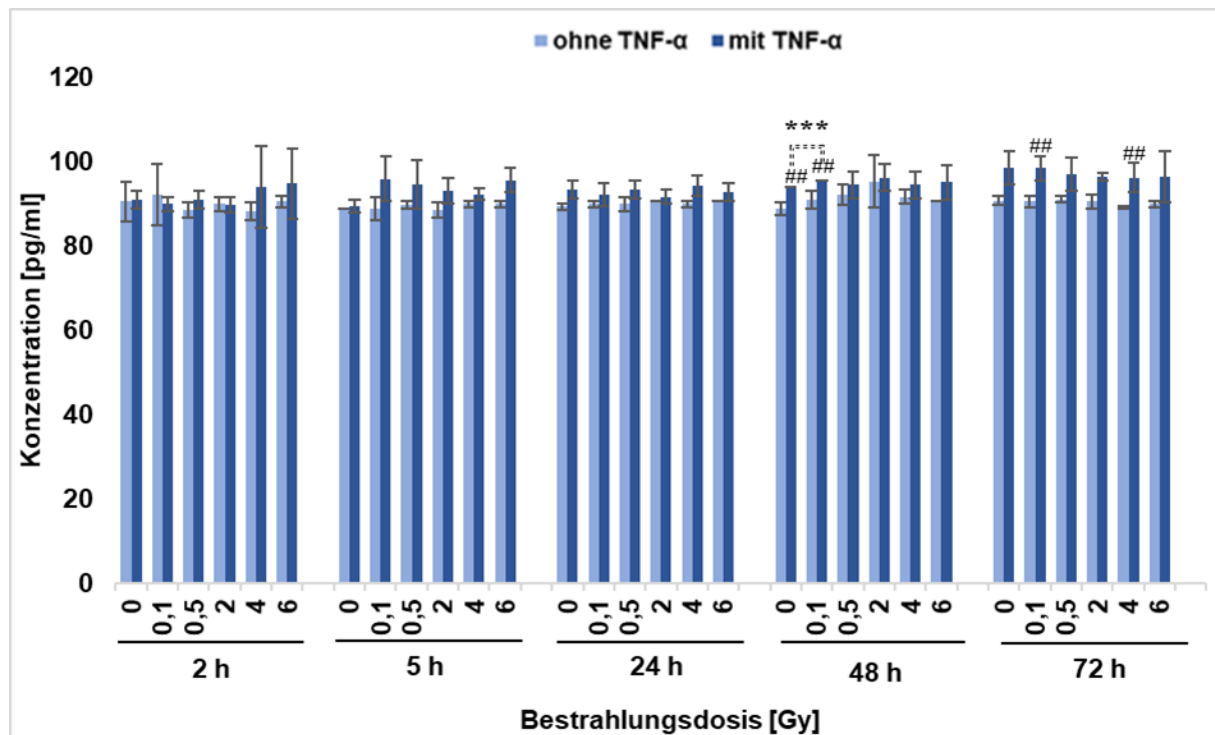


**Abb. 12:** Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von P-Selektin im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung. Dargestellt sind MW $\pm$ SD, n=3. Zu dem Zeitpunkt 72 h bei 2 Gy wurden nur zwei Werte gemessen.

In den Kulturüberständen ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  stieg die Konzentration von P-Selektin über die Zeit leicht an, so dass die Konzentration von P-Selektin 48 h und 72 h nach Bestrahlung in den Proben ohne TNF- $\alpha$  nur marginal (maximal 10 pg/ml) über jenen mit TNF- $\alpha$  lag. Diese Differenzen waren nicht signifikant. Alle gemessenen Konzentrationen lagen im Bereich zwischen 67 pg/ml und 85 pg/ml. Ein eindeutiger Einfluss der Bestrahlung ließ sich nicht erkennen.

### 3.3.4 E-SELEKTIN

Von Endothelzellen synthetisiertes E-Selektin bewirkt ein verlangsamtes Entlangrollen der Leukozyten an der Gefäßwand (Su *et al.*, 2012). In Abb. 13 wurden die gemessenen Konzentrationen nach der Bestrahlung dargestellt.



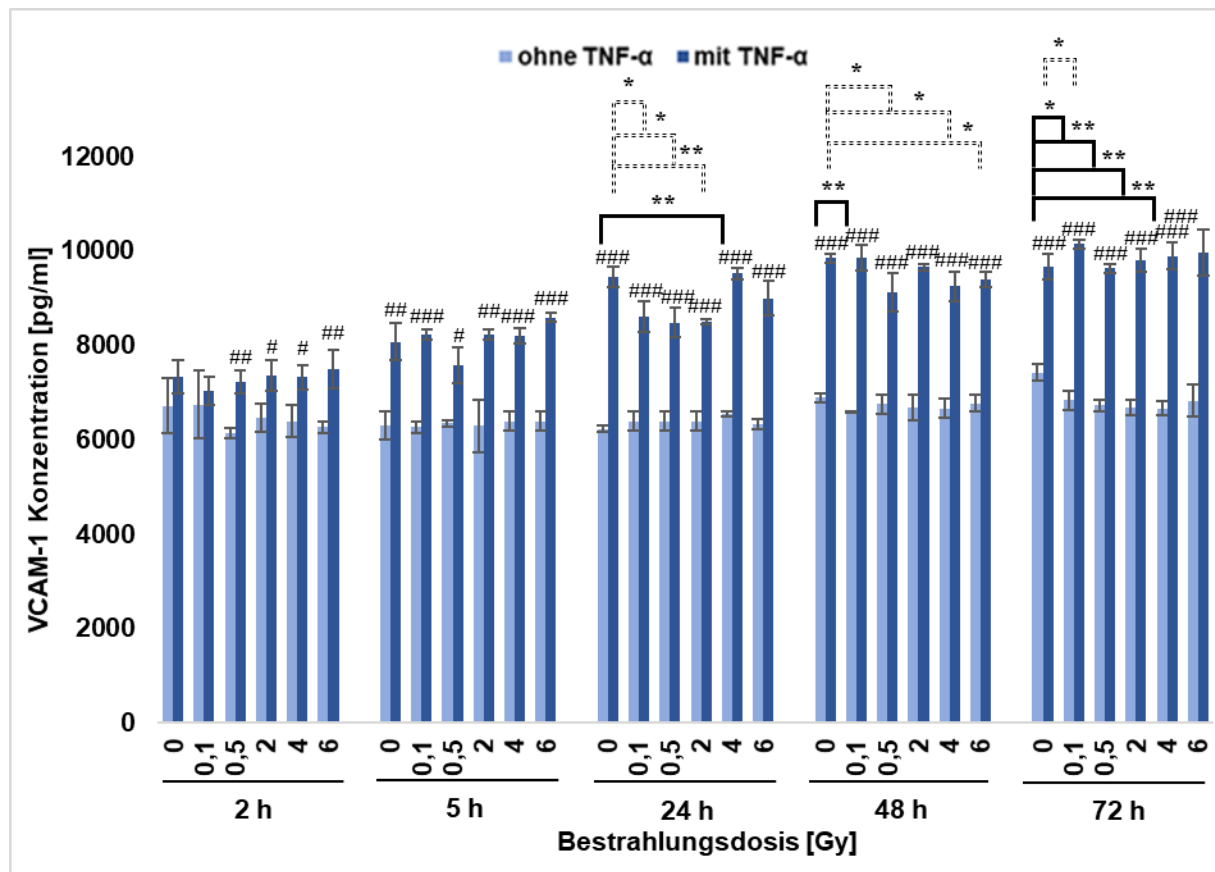
**Abb. 13:** Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von E-Selektin im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung. Dargestellt sind MW $\pm$ SD, n=3; \*\*\*p<0,001 bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und ebenfalls mit/ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  bei 0 Gy; ##p<0,01 bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und mit gleicher Bestrahlungsdosis ohne TNF- $\alpha$ . Zu dem Zeitpunkt 72 h bei 2 Gy wurden nur zwei Werte gemessen.

Die Konzentrationen von E-Selektin lagen im Bereich zwischen 88,34 pg/ml und 98,56 pg/ml (Abb. 14). Über die Zeit kam es nur bei den Proben mit TNF- $\alpha$ -Zugabe zu einem leichten Anstieg der Konzentrationen. Es wurde 48 h nach einer Bestrahlung mit 0,1 Gy, sowie TNF- $\alpha$ -Zugabe eine signifikant erhöhte Konzentration im Vergleich zur Konzentration in der scheinbestrahlten Probe gemessen. Durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  kam es nach 24 h zu einer leicht vermehrten Sekretion, welche teilweise signifikant war (48 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und 0,1 Gy sowie 72 h nach Bestrahlung mit 0,1 Gy und 4 Gy).

### 3.3.5 VCAM-1

In der Abb. 14 wird die Konzentration von VCAM-1 aus dem Kulturüberstand der EA.hy926-Zellen im zeitlichen Verlauf dargestellt. VCAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, welches hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert wird und die Adhäsion von Zellen an die Gefäßwand vermittelt (HARJUNPÄÄ *et al.*, 2019).





**Abb. 14: Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von VCAM-1 im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.** Dargestellt sind MW $\pm$ SD, n=3; \*p<0,05; \*\*p<0,01; bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und ebenfalls mit/ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  bei 0 Gy; ; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001; bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und gleichen Bestrahlungsdosis mit Zugabe von TNF- $\alpha$ .

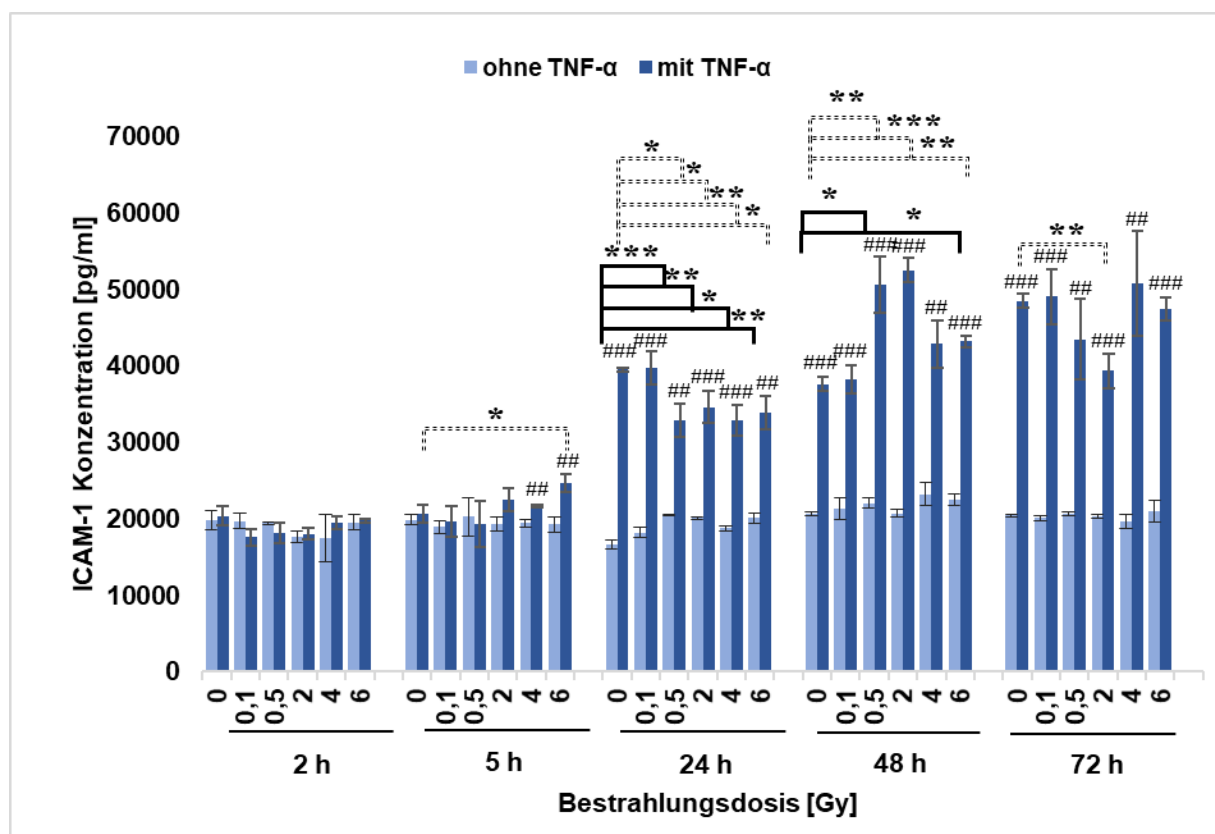
In Abb. 14 ist der zeitliche Verlauf der VCAM-1-Konzentration zu sehen. In den Proben mit TNF- $\alpha$  zeigte sich ein Anstieg, sodass die Konzentrationen 72 h nach Bestrahlung in diesen Proben mindestens 2.300 pg/ml höher waren als in den Proben ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe.

In den Proben ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe kam es durch die Bestrahlung zum Teil zu signifikanten Veränderungen. Nach 72 h waren die Konzentrationen in den bestrahlten Proben im Vergleich zu den unbestrahlten Proben mit einer Konzentration von 7.423 pg/ml geringer; bei einer Bestrahlungsdosis mit 0,1 Gy (6.835 pg/ml), 0,5 Gy (6.721 pg/ml), 2 Gy (6.684 pg/ml) und 4 Gy (6.656 pg/ml) war der Unterschied signifikant. Ebenso kam es 48 h nach einer Bestrahlung mit 0,1 Gy zu signifikant geringeren Werten (6.588 pg/ml bei 0,1 Gy im Vergleich zu 6.885 pg/ml bei 0 Gy). Eine Ausnahme bildeten die gemessenen Konzentrationen von VCAM-1 24 h nach Bestrahlung. Zu diesem Zeitpunkt zeigten alle bestrahlten Proben höhere Werte als die unbestrahlte Probe, bei 4 Gy ist dieser Wert mit 6.555 pg/ml signifikant höher als der Wert der scheinbestrahlten Probe mit 6.232 pg/ml.

In den Proben mit TNF- $\alpha$ -Zugabe zeigte sich bei 24 h nach Bestrahlung bei 0,1 Gy (8.606 pg/ml), 0,5 Gy (8.479 pg/ml) und 2 Gy (8.507 pg/ml) ein signifikanter Abfall der VCAM-1 Konzentration im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (9.449 pg/ml). 48 h nach der Bestrahlung führte die Exposition bei einer Dosis von 0,5 Gy (9.127 pg/ml), 4 Gy (9.247 pg/ml) und 6 Gy (9.395 pg/ml) ebenfalls zu einer signifikant niedrigeren Konzentration. 24 h später jedoch lag die Konzentration in den bestrahlten Proben mindestens 219 pg/ml höher als in den unbestrahlten Ansätzen (mit Ausnahme von 0,5 Gy). Bei 0,1 Gy war der Unterschied signifikant.

### 3.3.6 ICAM-1

Die folgende Abb. 15 zeigt die Konzentrationen des Adhäsionsmoleküls ICAM-1. ICAM wird von verschiedenen Zellen synthetisiert unter anderem Endothelzellen und Tumorzellen (HARJUNPÄÄ *et al.*, 2019).



**Abb. 15: Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von ICAM-1 im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.** Die Ergebnisse ergeben sich aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und ebenfalls mit/ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  bei 0 Gy; # $p < 0,5$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und mit gleicher Bestrahlungsdosis ohne TNF- $\alpha$ .

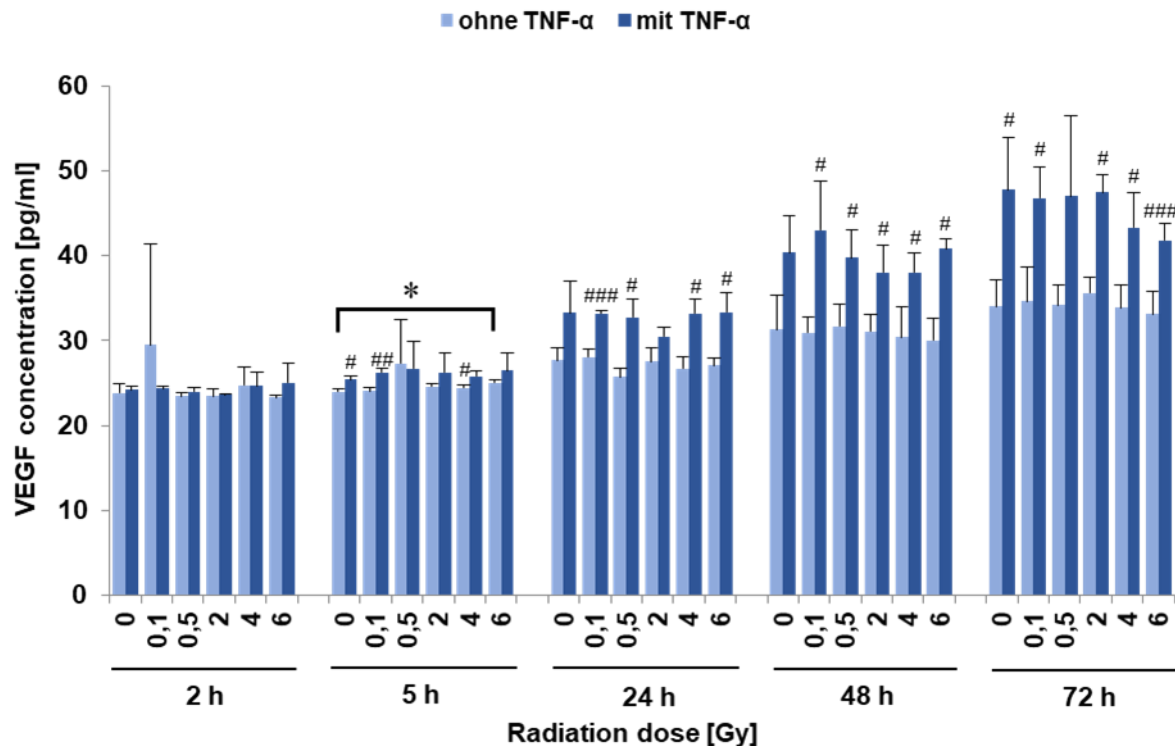
In den Zellkulturüberständen der mit TNF- $\alpha$  vorbehandelten Zellen kam es über die Zeit zu einem starken Anstieg der Konzentration von ICAM-1, während die Konzentration von ICAM-1 in den Überständen der unbehandelten Zellen nur sehr leicht anstieg. 72 h Stunden nach Bestrahlung zeigte sich bei allen gemessenen Proben eine signifikante Erhöhung der ICAM-1 Konzentration um über 90 % durch die Zugabe von TNF- $\alpha$ .

In den Proben, welche nicht mit TNF- $\alpha$  behandelt wurden, zeigten sich 2 h und 5 h nach Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bestrahlungsdosen. Die Werte lagen zu diesen Zeitpunkten zwischen 17.518 pg/ml und 20.271 pg/ml. Nach 24 h führte die Bestrahlung, bis auf die Bestrahlung mit 0,1 Gy, in den unbehandelten Proben zu einem signifikanten Anstieg von ICAM-1 um mindestens 2.000 pg/ml. Dieser Trend setzte sich auch in der Messung 24 h später fort: Auch hier zeigten die bestrahlten Proben höhere Werte. Es konnte eine signifikante Erhöhung von 20.628 pg/ml in der scheinbestrahlten Probe auf 22.053 pg/ml nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy und 22.536 pg/ml nach der Bestrahlung mit 6 Gy gemessen werden. 72 h nach Bestrahlung zeigte sich wiederum keine so deutlichen Unterschiede zwischen den Bestrahlungsdosen.

In den Proben mit TNF- $\alpha$ -Zugabe zeigte sich 2 h nach Bestrahlung ebenfalls kein starker Einfluss der Bestrahlung. Nach 5 h und einer Bestrahlung mit 6 Gy kam es zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration um 4.047 pg/ml. Bei dem Messpunkt 24 h wirkte sich die Bestrahlung in den Proben mit TNF- $\alpha$ -Zugabe hingegen mindernd auf die ICAM-1-Konzentration aus. Bei 0,5 Gy (32.909 pg/ml), 2 Gy (34.653 pg/ml), 4 Gy (32.944 pg/ml) und 6 Gy (33.960 pg/ml) kam es zu einem signifikanten Abfall der ICAM-1-Konzentration im Vergleich zur scheinbestrahlten Probe (39.535 pg/ml). Bei 48 h kam es wiederum in den bestrahlten Proben zu einer Erhöhung der Konzentration im Vergleich zur scheinbestrahlten Probe mit einer Konzentration von 37.634 pg/ml (signifikant bei 0,5 Gy (50.696 pg/ml), 2 Gy (52.571 pg/ml) und 6 Gy (43.279 pg/ml)). Bei dem Messzeitpunkt 72 h nach der Bestrahlung zeigten sich diskontinuierliche Dosiseffekte der Bestrahlung. Nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy, 2 Gy und 6 Gy kam es zu einem Abfall der Konzentration um 5.016 pg/ml (0,5 Gy) 9.157 pg/ml (2 Gy) und 1.001 pg/ml (6 Gy), wohingegen die Bestrahlung mit 0,1 Gy und 4 Gy zu einem Anstieg um 571 pg/ml (0,1 Gy) und 2.249 pg/ml (4 Gy) führte.

### 3.3.7 VEGF

In der Abb. 16 wird die Konzentration von VEGF im Zellkulturüberstand dargestellt. Dieser Wachstumsfaktor verbessert durch Angiogenese die Versorgung eines Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen (DOME *et al.*, 2007).

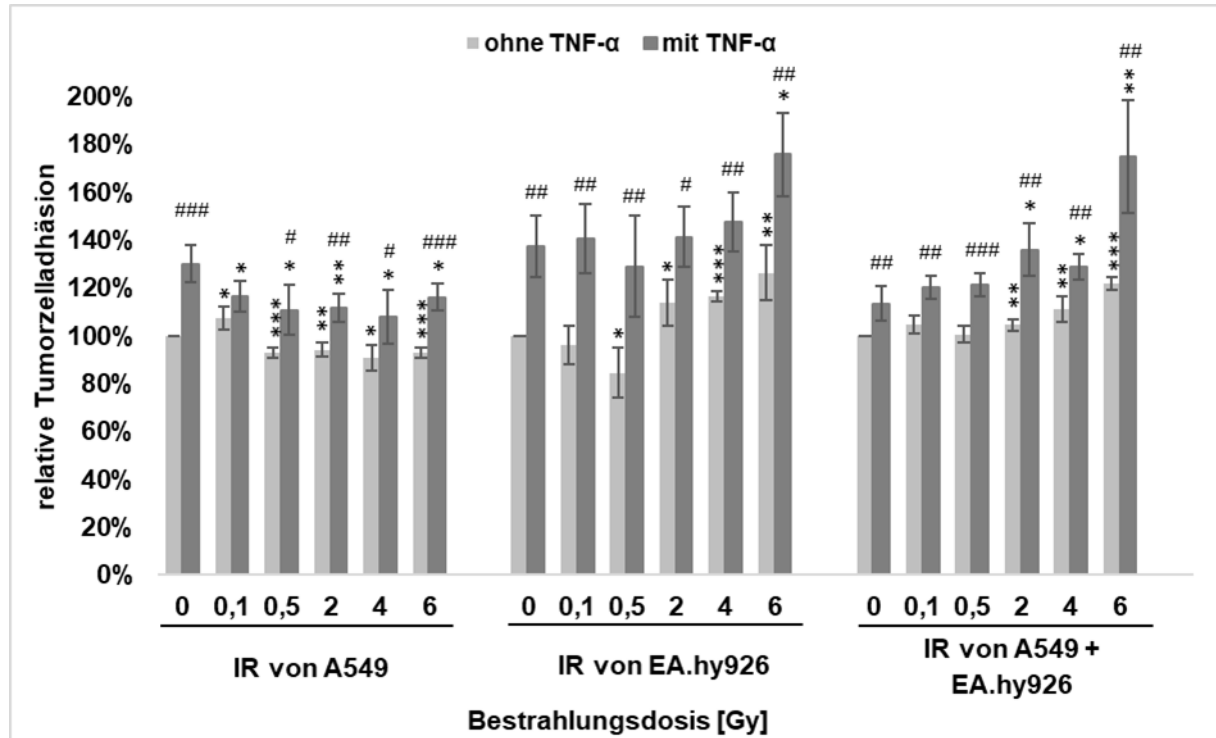


**Abb. 16: Einfluss ionisierender Strahlung auf die Konzentration von VEGF im Zellkulturüberstand der EA.hy926-Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.** Die Ergebnisse ergeben sich aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD. Zu dem Zeitpunkt 72 h bei 2 Gy wurden nur zwei Werte gemessen; \* $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und ebenfalls mit/ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  bei 0 Gy; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und mit gleicher Bestrahlungsdosis ohne TNF- $\alpha$ .

Über die Zeit stiegen die Konzentrationen von VEGF sowohl bei den Proben mit Zugabe von TNF- $\alpha$  als auch bei denen ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  an (Abb. 16). In der scheinbestrahlten Probe ohne TNF- $\alpha$  kam es zu einem Anstieg von 24 pg/ml nach 2 h, auf 34 pg/ml nach 72 h. Durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  kam es 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung der Zellen zu einer Erhöhung der VEGF-Konzentration im Vergleich zu den Proben aus den Überständen der Zellen, zu denen kein TNF- $\alpha$  zugegeben wurde. So lagen die VEGF-Konzentrationen in den Proben ohne TNF- $\alpha$  72 h nach Bestrahlung zwischen 33 pg/ml und 36 pg/ml und in den Proben mit TNF- $\alpha$  zwischen 42 pg/ml und 48 pg/ml. Der Unterschied war bei 0 Gy; 0,1 Gy; 2 Gy; 4 Gy und 6 Gy signifikant. Bei dem Zeitpunkt 5 h nach Bestrahlung ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  führte eine Bestrahlung von 6 Gy zu einer signifikanten Erhöhung (25,0 pg/ml,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den scheinbestrahlten Zellen (24,0 pg/ml).

### 3.4 ADHÄSION DER A549-TUMORZELLEN AN DIE EA.HY926-ENDOTHELZELLEN

Mit Hilfe des Adhäsionsassays sollte der direkte Einfluss der Bestrahlung auf die Tumor-Endothelzell-Interaktion untersucht werden (Abb. 17). Dieser Test wurde ebenfalls mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe durchgeführt, so dass zusätzlich zur Wirkung der Bestrahlung der Einfluss eines entzündlichen Mikromilieus untersucht werden konnte.



**Abb. 17: Einfluss ionisierender Strahlung (IR) auf die Adhäsion der Tumorzellen A549 an die EA.hy926-Zellen mit/ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe 24 h nach Bestrahlung.** links: Bestrahlung der Tumorzellen; mittig: Bestrahlung der Endothelzellen; rechts: Bestrahlung beider Zelllinien. Normierung auf die jeweilige scheinbestrahlte Probe ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe. Dargestellt sind MW $\pm$ SD, n=4; \*p<0,05; \*\*p<0,05; \*\*\*p<0,01 bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und ebenfalls mit/ohne Zugabe von TNF- $\alpha$  bei 0 Gy; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 bezogen auf die jeweilige Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt und mit gleicher Bestrahlungsdosis ohne TNF- $\alpha$ .

Durch die Behandlung mit TNF- $\alpha$  kam es zu einer vermehrten Adhäsion der Tumorzellen. Dies zeigte sich sowohl bei alleiniger Bestrahlung der Tumor- oder Endothelzellen, aber auch bei der Bestrahlung beider Zelllinien. Der Unterschied zeigte sich am deutlichsten bei der Bestrahlung sowohl der A549-Zellen als auch der EA.hy926-Zellen mit 6 Gy (122 % im Vergleich zu 175 %, des Ausgangswert bei 0 Gy ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe.)

In den Proben ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe und alleiniger Bestrahlung der Tumorzellen kam es nach einer Bestrahlung der A549-Zellen mit 0,1 Gy zu einem signifikanten Anstieg der adhären A549-Zellen auf 108 % des Ausgangswertes. Bei allen höheren Bestrahlungsdosen zeigte sich

eine signifikante Verminderung der Anzahl der adhärenierten Zellen. Diese war maximal bei 4 Gy mit einem Abfall auf 91 %.

Durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  adhärenierten bei den Proben mit alleiniger Strahlenexposition der A549-Zellen mehr Tumorzellen. In den scheinbestrahlten Proben kam es zu einem Anstieg auf 130 %. Im Gegensatz zu den Proben ohne TNF- $\alpha$  zeigte sich hier bei allen Bestrahlungsdosen ein signifikant hemmender Einfluss der Bestrahlung der Tumorzellen auf die Adhäsion. Am stärksten ausgeprägt war die Hemmung bei 4 Gy (130 % im Vergleich zu 108 %).

Wurden nur die Endothelzellen bestrahlt, kam es bei den höheren Bestrahlungsdosen (2 Gy, 4 Gy und 6 Gy) zu einer vermehrten Adhäsion im Vergleich zur scheinbestrahlten Probe, sowohl mit als auch ohne Zugabe von TNF- $\alpha$ . Die Anzahl der adhärenierten Tumorzellen nahm mit Erhöhung der Dosis zu. In den Proben ohne TNF- $\alpha$  kam es zu einem Anstieg auf 114 % bei 2 Gy, 116 % bei 4 Gy und 126 % bei 6 Gy (jeweils genormt auf den Wert bei 0 Gy und ohne TNF- $\alpha$ ). Wurde TNF- $\alpha$  hinzugegeben kam es, bezogen auf den Wert der scheinbestrahlten Probe ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe, durch die Bestrahlung zu einem Anstieg auf 141 % (2 Gy) 148 % (4 Gy) und 176 % (6 Gy). Nach den Bestrahlungsdosen von 0,1 Gy und 0,5 Gy kam es in den Proben ohne TNF- $\alpha$  zu einer Abnahme der Adhäsion auf 96 % bei 0,1 Gy bzw. 84 % bei 0,5 Gy des Ausgangswertes. Bei TNF- $\alpha$ -Zugabe zeigte sich bei 0,1 Gy (141 %) eine Zunahme der Adhäsion im Vergleich zur scheinbestrahlten Probe (137 %); bei 0,5 Gy (129 %) wurde ebenfalls eine Abnahme beobachtet.

Nach Bestrahlung beider Zelllinien zeigte sich bei allen Dosen (mit und ohne TNF- $\alpha$ ) eine Zunahme der adhärenierten Tumorzellen. Bei 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy zeigte sich ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den scheinbestrahlten Zellen. In den Proben ohne TNF- $\alpha$  kam es zu Anstiegen um 4 % (2 Gy) 11 % (4 Gy) und 22 % (6 Gy). Im Vergleich dazu zeigten die Proben mit TNF- $\alpha$ -Zugabe eine noch stärkere Erhöhung der Adhäsion. Es kam zu einem Anstieg um 20 % (2 Gy) 14 % (4 Gy) und 54 % (6 Gy) der Adhäsion im Vergleich zu der scheinbestrahlten Probe mit TNF- $\alpha$ -Zugabe.

#### **IV. DISKUSSION**

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung der Auswirkung ionisierender Strahlung mit Dosen von 0,1 Gy - 6 Gy auf die Tumor-Endothelzell-Interaktion.

##### **4.1 ZELLVIABILITÄT UNTER BESTRAHLUNG**

Durch Nutzung des WST-1-Tests konnte eine mögliche Abhängigkeit der Viabilität der analysierten Zellen von der Strahlungs-dosis sowie der TNF- $\alpha$ -Behandlung zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden. Damit sollte nachgewiesen werden, dass mögliche Änderungen in der Proteinsekretion, Migration und Adhäsion aus den nachfolgenden Analysen nicht aus einer Änderung der Viabilität resultieren.

Die Bestrahlung und die Zugabe von TNF- $\alpha$  hatten keinen bedeutsamen Einfluss auf die Viabilität der EA.hy926-Zellen oder der A549-Zellen. Bei den bestrahlten als auch den unbestrahlten Endothel- und Tumorzellen zeigte sich nach Zugabe von Wachstumsfaktoren (0,5 % FBS) ein Anstieg der Viabilität sowohl zwischen 2 h und 24 h als auch zwischen 24 h und 48 h nach der Bestrahlung. Im Vergleich dazu setzte sich der Viabilitätsanstieg sowohl der Tumor-, als auch der Endothelzellen unabhängig von der Bestrahlungsdosis im serumfreien Medium 24 h nach Bestrahlung nicht weiter fort.

Im WST-1 Test wird die Umsetzung von Tetrazoliumsalz WST-1 in dunkelrotes Formazan durch die Zellen genutzt, um die Viabilität zu beurteilen. Die Konzentration des Formazans ist daher abhängig von der Anzahl der lebenden Zellen. Wird in Folgeexperimenten eine verringerte Konzentration gemessen, deutet dies auf eine geringere Anzahl lebender Zellen und dem entsprechend auf ein Absterben der Zellen hin. Wird in späteren WST-1 Test hingegen eine vermehrte Umwandlung gemessen, weist dies auf eine Erhöhung der Zellzahl und auf Zellteilung hin (PETROVIC *et al.*, 2006). Der Entzug von Wachstumsfaktoren führt zu einer Synchronisation der Zellen in der G0 Phase und verhindert somit weitere Zellteilungen (DAVIS 2001). In Vorversuchen wurden Zellzyklus-Analysen durchgeführt. In diesen waren nach 24 h in serumfreien Medium 73 % der EA.hy926-Zellen und 82 % der A549-Zellen in der G0/G1-Phase. Daher war eine Stagnation der Viabilität nach 24 h zu erwarten.

Bei 0,5 % FBS-haltigem Medium hingegen zeigte sich auch nach 24 h ein anhaltender Anstieg der Viabilität. Dies deutet darauf hin, dass bereits ein Anteil von 0,5 % FBS zu einer Zellteilung führt.

##### **4.2 MIGRATION**

Mit Hilfe des Scratch-Assays konnte die Abhängigkeit der Migration der Zellen von der Bestrahlung bestimmt werden (SCHRÖDER *et al.*, 2019). Gegenstand der Untersuchung war dabei ein Zellrasen mit Simulation eines entzündlichen Mikroklimas (TNF- $\alpha$ -Zugabe) und, um einen

Vergleich ziehen zu können, ein Zellrasen ohne Zugabe von externen Entzündungsmediatoren. Hierbei zeigte der Scratch-Assay (siehe Abb. 7), dass sich bei der Mehrzahl der Proben ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe eine Hemmung der Migration durch die Bestrahlung einstellte, welche bei einer Bestrahlung mit 2 Gy am höchsten war. Durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  wurde die Migration gefördert (außer bei 0 Gy/6 Gy, zum Zeitpunkt 48 h nach Bestrahlung).

Im Kontext der Arbeit von JUNG *et al.* (2007) wurden A549-Zellen in Medium mit 1 % FBS einer Photonenstrahlung (Caesium-Quelle, 2,32 Gy/min) ausgesetzt. Dabei zeigte sich, anders als in der vorliegenden Arbeit, eine Zunahme der Migration nach einer Bestrahlung mit 6 Gy. Zusätzlich konnten JUNG *et al.* eine veränderte Zellmorphologie nach der Bestrahlung bei allen Strahlungsdosen beobachten. So wurden nach der Bestrahlung eine länglichere Zellform und ein vermehrtes Auftreten von Pseudopodien beschrieben. In der Arbeit von JUNG *et al.* konnte eine Assoziation der vermehrten Migration mit EMT und einer damit verbundenen Änderung des Phänotyps nachgewiesen werden. Jedoch beschrieben JUNG *et al.* selbst, dass die gefundenen Ergebnisse für die Aufklärung der molekularen Mechanismen nicht ausreichen, welche wichtig sind, um die verschiedenen Zellantworten auf Strahlung richtig deuten zu können. In einem Übersichtsartikel (MONCHARMONT *et al.*, 2014) kommen die Autoren ebenfalls zu dem Schluss, dass die Bestrahlung sowohl die Migration als auch die EMT fördert. Jedoch wird in der Zusammenfassung betont, dass in manchen Studien die Bestrahlung zu einer Hemmung der Migration führte. Beispielsweise untersuchte die Arbeitsgruppe um AKINO *et al.* (2009) die Migration der A549-Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen oder  $\gamma$ -Strahlung (10 % FBS, 2 h Inkubationszeit). Hierbei kam es bei beiden Bestrahlungsarten nach Dosen von 0,5 Gy bis 5 Gy (Kohlenstoffionenbestrahlung) bzw. 10 Gy ( $\gamma$ -Strahlung) zu einer Hemmung der Migration. Eine mögliche Erklärung für die Differenzen in den verschiedenen Studien sind die unterschiedlichen Serumkonzentrationen, sowie die Verwendung einer anderen Strahlenquelle neben unterschiedlichen Dosisraten und Bestrahlungsdosen.

In den für diese Arbeit ausgewerteten Experimenten konnten keine Morphologieänderungen nach Bestrahlung beobachtet werden, jedoch zeigten sich bei den Zellen unter TNF- $\alpha$  Einfluss verstärkt längliche Zellen mit Pseudopodien, welche auf eine EMT hindeuten (siehe Abb. 8). YAMAUCHI *et al.* (2010) konnten nachweisen, dass TNF- $\alpha$  die durch TGF- $\beta$ 1 ausgelöste EMT von A549-Zellen deutlich verstärkt. Dies zeigte sich in einer Reduktion des epithelialen Phänotypmarkers E-Cadherin und einem Anstieg von Vimentin in der PCR und in immunhistologischen Färbungen, sowie in einer entsprechenden morphologischen Änderung der Zellen. Alleinige Stimulation mit TNF- $\alpha$  führte laut YAMAUCHI *et al.* lediglich zu einer leichten Reduktion des E-Cadherin, es zeigten sich keine Veränderungen des Phänotyps der Zellen.

Wie Abb. 7 verdeutlicht, kam es im Scratch-Assay bestrahlungsdosisunabhängig nach 24 h durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  zu einer verstärkten Migration in den freien Raum. Nach 48 h setzte sich dieser Trend fort. Lediglich bei den Proben, welche mit 0 Gy oder 6 Gy bestrahlt

---



wurden, zeigte sich kein eindeutiger Einfluss durch die TNF- $\alpha$  Behandlung. Auch SHIOZAKI *et al.* (2012) konnten zeigen, dass die Zugabe von TNF- $\alpha$  sowohl die EMT als auch die Migration fördert. Zur Beurteilung der Migrationsfähigkeit wurde von SHIOZAKI ein Scratch-Assay durchgeführt. In Phasen-mikroskopischen Aufnahmen mit F-Aktin-Färbung von SHIOZAKI lieferte die Zellmorphologie und das Verteilungsmuster des F-Aktin Hinweise für eine EMT. Zudem wurden nach Zugabe von TNF- $\alpha$  eine Abnahme der E-Cadherin und eine Zunahme des Claudin 1 mittels Western-Blot detektiert, was laut SHIOZAKI ebenfalls für eine EMT spricht. Die Zugabe von TNF- $\alpha$  führte zudem zu einer erhöhten Konzentration von IL-8 (siehe Abb. 10). Da bekannt ist, dass IL-8 zu einer vermehrten EMT führt (PALENA *et al.*, 2012), könnten die Auswirkungen von TNF- $\alpha$  auf die EMT durch IL-8 vermittelt worden sein.

Beim Vergleich von mit TNF- $\alpha$  behandelten Zellen und solchen ohne TNF- $\alpha$  Zusatz wurde deutlich, dass sich durch die Behandlung mit TNF- $\alpha$  der Einfluss der Bestrahlung ändert (siehe Abb 7). Während in den Proben ohne TNF- $\alpha$  eine Bestrahlung im Bereich vom 0,1 Gy bis 2 Gy in den ersten 24 h die Migration hemmte, führte sie in den Proben mit TNF- $\alpha$  zu einer Förderung der Migration im betrachteten Zeitraum. Nach 48 h konnte dieses Phänomen nach einer Bestrahlung mit 0,1 und 0,5 Gy beobachtet werden.

Mit Hilfe des Scratch Assays konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass TNF- $\alpha$  einen migrationsfördernden Effekt hat, während die Bestrahlung (besonders im Bereich von 0,5 Gy bis 4 Gy) die Migration hemmt. Bei gleichzeitiger Behandlung mit TNF- $\alpha$  und Bestrahlung verstärkt die Strahlung im niedrigen Bereich (bis 2 Gy 24 h nach Bestrahlung und bis 0,5 Gy 48 h nach Bestrahlung) den fördernden Effekt von TNF- $\alpha$ . Bei höheren Bestrahlungsdosen überkompensierte der Einfluss der Bestrahlung und es kam zu einer geringeren Migration als in der Kontrollprobe ohne TNF- $\alpha$  oder Bestrahlung.

PAL *et al.*, (2018) führte einen Scratch-Assay 24 h nach Bestrahlung mit 5 Gy durch. Hierbei kam es durch die alleinige Bestrahlung oder Zugabe von TNF- $\alpha$  zu keinen signifikanten Veränderungen. Jedoch konnte, wie in der vorliegenden Arbeit, nach der Zugabe von TNF- $\alpha$  eine Morphologieänderung beobachtet werden. Nach Kombination von TNF- $\alpha$  und Bestrahlung mit 5 Gy kam es (wie in der vorliegenden Arbeit nach Bestrahlung mit 4 Gy oder 6 Gy und Gabe von TNF- $\alpha$ ) zur deutlichen Hemmung der Migration. Zu beachten ist, dass anders als in der vorliegenden Arbeit PAL *et al.* 1 % FBS verwendete und nicht die verbliebene freie Fläche maß, sondern wie viele Zellen in die freie Fläche migrierten.

#### **4.3 KONZENTRATION DER INFLAMMATORISCHEN MARKER**

---

Durch die Auswertung der Daten des Multiplex-Assays von sieben verschiedenen inflammatorischen Markern konnte eine detailliertere Aufschlüsselung der zeitlichen Auswirkung von Bestrahlungen zwischen 0,1 Gy und 6 Gy auf die untersuchten Endothelzellen der Linie

---

EA.hy926 angefertigt werden. Des Weiteren wurde gezeigt, wie sich ein entzündliches Mikroklima (TNF- $\alpha$ -Zugabe) auf die untersuchten Parameter auswirkt.

Die Auswertung ergab bei den Proteinen VEGF, ICAM-1, VCAM-1, IL-8 und MCP-1 eine erhöhte Sekretion nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ . Dieser Anstieg kann über folgenden Signalweg erklärt werden: TNF- $\alpha$  ist einer der stärksten Aktivatoren des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors werden vermehrt Zytokine freigesetzt: unter anderem IL-8 und MCP 1 aber auch VEGF und die Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 (WANG UND LIN, 2008, AGGARWAL UND GEHLOT, 2009, HELLWEG, 2015,). Hervorzuheben ist der deutlich höhere Anstieg der Konzentrationswerte der Entzündungsmarker IL-8 und MCP-1.

Durch Bestrahlung kann es ebenfalls zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B in EA.hy926-Zellen kommen. Hierbei wurde eine diskontinuierliche Dosisabhängigkeit mit einem Maximum bei 0,5 Gy und 3 Gy nachgewiesen (RÖDEL *et al.*, 2004).

#### **4.3.1 ENTZÜNDUNGSMARKER IL-8 UND MCP-1**

Die hohe Konzentration dieser beiden wichtigen Entzündungsmediatoren zeigt eine erfolgreiche Simulation des entzündlichen Mikroklimas. Da nach der Bestrahlung kein Mediumwechsel vorgenommen wurde, deutet die zeitliche Zunahme auf eine Akkumulation bei andauernder Sekretion hin. Bei Betrachtung des Verlaufs der Entzündungsmarkerkonzentration mit zunehmender Bestrahlungsdosis zeigen sich deutliche Einflüsse der Dosis auf die Sekretion der einzelnen Markermoleküle unter TNF- $\alpha$ -Zugabe. Durch die Bestrahlung kam es nach TNF- $\alpha$ -Zugabe bei 48 h zu einem diskontinuierlichen Anstieg der IL-8 Konzentration mit relativen Maxima bei 0,1 Gy, 2 Gy und 6 Gy. Ohne TNF- $\alpha$  zeigte sich 48 h nach Bestrahlung mit 6 Gy ebenfalls ein Anstieg; dieser war jedoch nicht signifikant. 48 h nach Bestrahlung kam es in den bestrahlten Proben (ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe) ebenfalls zu einem markanten Anstieg der MCP-1-Konzentration.

Ein deutlicher Anstieg der IL-8 Konzentration konnte ebenfalls nach der Behandlung von EA.hy926-Zellen und HUVEC Zellen mit TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden (SCHRÖDER *et al.*, 2018). Es wurden Bestrahlungsdosen zwischen 0 Gy und 2 Gy untersucht. In diesem Bereich kam es zu diskontinuierlichen Dosisabhängigkeiten. Es kam zu einer signifikanten Steigerung der Sekretion 48 h nach Bestrahlung mit einer Bestrahlungsdosis von 0,05 Gy, 0,1 Gy und 2 Gy (ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe). Relativen Maxima bei 0,1 Gy und 2 Gy konnten ähnlich wie in Abb. 10 nach der Zugabe von TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. Die IL-8 Sekretion von HUVEC nach der Bestrahlung mit höheren Bestrahlungsdosen (2 Gy bis 10 Gy mittels 60 Kobalt-Quelle) wurde von VAN DER MEEREN *et al.*, (1997) untersucht; ebenfalls mit und ohne Zugabe von TNF- $\alpha$ . Hierbei konnte ein deutlicher Anstieg der IL-8-Konzentration mit einer linearen

Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein stärkerer Anstieg durch die Bestrahlung zu späteren Messzeitpunkten zwischen 2 Tagen und 6 Tagen. Die Behandlung mit TNF- $\alpha$  und die Bestrahlung bewirkten synergistische Effekte. VAN DER MEEREN *et al.* wies einen deutlicheren Einfluss der Bestrahlung als in der vorliegenden Arbeit nach. Dies mag, neben der Verwendung unterschiedlicher Bestrahlungsquellen und Dosisraten, daran liegen, dass bei gleichzeitiger Untersuchung der HUVEC-Zellen und der EA.hy926-Zellen die HUVEC-Zellen eine deutlich stärkere Sekretion aufweisen (SCHRÖDER *et al.*, 2018). Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit keine Konzentrationen zu späteren Zeitpunkten als 72 h nach Bestrahlung gemessen. Im Zeitraum zwischen 3 bis 6 Tagen nach Bestrahlung kam es in der Arbeit von VAN DER MEEREN *et al.* durch die Bestrahlung zu einem deutlichen Anstieg der IL-8 Konzentrationen.

In der Arbeit von CHANG *et al.* (2009) wurde ebenfalls die Auswirkung der Bestrahlung mit einem Linearbeschleuniger bei 5 Gy und 20 Gy auf Endothelzellen untersucht. Gemessen wurde die Ausschüttung verschiedener Moleküle mittels Immunoblot 72 h nach Bestrahlung mit 6 MV und 200 cGy/min. Bei der Messung von MCP-1 kam es zu einer Zunahme nach der Bestrahlung mit 20 Gy nicht jedoch nach der Bestrahlung mit 5 Gy. Die Konzentration von IL-8 stieg sowohl nach der Bestrahlung mit 5 Gy als auch mit 20 Gy an.

Obwohl immer wieder beschrieben wird, dass Strahlung im Niedrigdosis-Bereich einen antiinflammatorischen Effekt habe (ARENAS *et al.* 2012, RÖDEL *et al.* 2007, FREY *et al.* 2015), konnte, wie Abb. 9 und 10 zeigen, bei 0,5 Gy und 0,1 Gy keine signifikante Hemmung der Sekretion von IL-8 beobachtet werden. 48 h nach Bestrahlung im Bereich von 0,1 Gy bis 4 Gy und Zugabe von TNF- $\alpha$  kam es jedoch zur signifikanten Hemmung der MCP-1 Sekretion.

In der Literatur wurde beschrieben, dass erhöhte autokrine IL-8- und VEGF-Konzentrationen bei A549-Zellen zu vermehrter EMT, Migration und Adhäsion führten (DESAI *et al.*, 2013). Die erhöhten IL-8 und VEGF Konzentrationen wurden durch konditioniertes Medium (Zellkulturüberstand von A549-Zellen nach 48 h Inkubation) hervorgerufen. Nach Behandlung mit Antikörpern gegen IL-8 und VEGF kam es zu einer deutlichen Minderung der Motilität und Invasivität (DESAI *et al.*, 2013). Dieses legt den Schluss nahe, dass die in dieser Arbeit beobachtete vermehrte EMT und Motilität nach TNF- $\alpha$ -Zugabe in Zusammenhang mit den erhöhten Konzentrationen von IL-8 nach der Behandlung von TNF- $\alpha$  steht.

#### **4.3.2 ADHÄSIONSMOLEKÜLE VCAM-1, ICAM-1, E-SELEKTIN UND P-SELEKTIN**

Ebenso wie bei der Untersuchung der IL-8 und MCP-1 Konzentrationen, konnte nach Zugabe von TNF- $\alpha$  eine im zeitlichen Verlauf steigende Erhöhung der ICAM-1 und VCAM-1 Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Konzentration von VCAM-1 lag bereits beim ersten Messzeitpunkt über dem Vergleichswert ohne TNF- $\alpha$ . Hingegen stieg die ICAM-1 Konzentration erst 24 h nach Bestrahlung deutlich über die Konzentration in den Wells ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe und

---

es zeigten sich deutliche strahlungsdosisabhängige Konzentrationsänderungen. Ohne TNF- $\alpha$  Zugabe konnten leicht erhöhte Konzentrationen von ICAM-1 24 h und 48 h nach Bestrahlung bei allen Bestrahlungsdosen gemessen werden. Bei Analysen von E-Selektin und P-Selektin zeigte der Multiplex-Assay eine nahezu konstante Konzentration der Analyten über die Zeit bei leicht erhöhten Werten für E-Selektin (80 bis 100 pg/ml) gegenüber P-Selektin (60 bis 80 pg/ml). Dies änderte sich auch unter dem Einfluss der Bestrahlung nicht. Die Zugabe von TNF- $\alpha$  führte zu einem leichten Anstieg der E-Selektin Konzentration (Abb. 13).

In verschiedenen Studien wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen nach der Bestrahlung von Endothelzellen gemessen. Es wurden beispielsweise EA.hy926-Zellen mit einem Röntgentherapiegerät bestrahlt und mit TNF- $\alpha$  stimuliert (HILDEBRANDT *et al.*, 2002). Hierbei kam es mit und ohne TNF- $\alpha$  zu einer kurzzeitigen Stimulation der E-Selektin-Sekretion 6 h nach Bestrahlung. Die Messungen von ICAM-1 im Zellmedium zeigten keinen Einfluss der Bestrahlung (Untersucht wurde der Zeitraum bis 24 h nach Bestrahlung). 6 h nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  konnte ein kurzzeitiges Konzentrationsmaximum von E-Selektin nachgewiesen werden, während die Konzentration von ICAM-1 nach 6 h ein Plateau bildete. Der Einfluss von TNF- $\alpha$  konnte sowohl mittels ELISA als auch mittels Messung der gebundenen Adhäsionsmoleküle durchflusszytometrisch bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Adhäsionsmoleküle im Medium gemessen, daher wurden nur die von der Zelloberfläche gelösten Moleküle nachgewiesen. Der Messpunkt 6 h nach TNF- $\alpha$ -Stimulation entsprach dem Zeitpunkt 4 h nach Bestrahlung. In der vorliegenden Arbeit konnte beim Messzeitpunkt 5 h nach Bestrahlung weder ein Effekt der Bestrahlung noch der Stimulation durch TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. Möglicherweise tritt die von HILDEBRANDT *et al.* gemessene Konzentrationserhöhung nur kurzzeitig auf, sodass sie eine Stunde später nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Auch die Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Endothelzelllinie HDMEC wurde untersucht (HAUBNER *et al.*, 2013). Dabei zeigte sich ein Anstieg von VCAM-1 und ICAM-1 im Kulturüberstand durch die Bestrahlung (2 Gy - 6 Gy). In verschiedenen weiteren Studien wurden weitere Endothelzellen untersucht. So konnte VAN DER GAUGLER *et al.* (1997) eine Erhöhung der ICAM-1 Konzentration nach Bestrahlung mit 2 Gy - 10 Gy der Endothelzellen HUVEC feststellen. Die Konzentration von VCAM-1 oder E-Selektin änderte sich hingegen nicht. Es wurden die zellgebundenen Adhäsionsmoleküle mittels Durchflusszytometer gemessen (van der GAUGLER *et al.*, 1997). In der Arbeitsgruppe um HALLAHAN *et al.*, (1996) konnte ein Anstieg von ICAM-1 (ab einer Bestrahlungsdosis von 5 Gy) und E-Selektin (4 h nach Bestrahlung mit 2 Gy) bei HUVEC nachgewiesen werden. Wobei die E-Selektin-Konzentration im weiteren zeitlichen Verlauf erneut sank. Die Bestrahlung hatte jedoch keinen Einfluss auf die Konzentration von VCAM-1 und P-Selektin (HALLAHAN *et al.*, 1996). Der Einfluss der Bestrahlung auf ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin scheint von verschiedenen Faktoren, wie Messzeitpunkt und

Wahl der Zelllinie abzuhängen. Die P-Selektin-Konzentration stieg jedoch weder nach Bestrahlung von HUVEC (HALLAHAN *et al.*, 1996) noch von EA.hy926-Zellen (wie in dieser Arbeit gezeigt wurde) an.

### 4.3.3 WACHSTUMSFAKTOR VEGF

Zur Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF konnte nach ionisierender Strahlung keine belastbare Dosis-Wirkungsbeziehung im Bereich von 0,1 Gy bis 6 Gy beobachtet werden. Nach Zugabe von TNF- $\alpha$  kam es jedoch zu einem deutlichen Anstieg. Unter normoxischen Bedingungen wie in dieser Arbeit konnte SOFIA *et al.* (2010) nach einer Bestrahlung im niedrigen Dosisbereich von HMVEC-L Zellen ebenfalls keine Änderung der Konzentration beobachten. Wie bereits unter 4.3 beschrieben, ist bekannt, dass TNF- $\alpha$  zu einer erhöhten VEGF Sekretion führt. Erhöhte VEGF-Konzentrationen konnten mit einer vermehrten Metastasenbildung in Verbindung gebracht werden (LI *et al.*, 2008; AGGARWAL UND GEHLOT, 2009). Möglicherweise besteht dieser Zusammenhang, da VEGF die Gefäßbildung anregt und die Tumorzellen bei einem gut durchbluteten Gewebe leichter in die Blutbahn eindringen können. Dies spricht für einen Metastasen fördernden Effekt des entzündlichen Mikroklimas.

### 4.4 ADHÄSION

Mittels eines Adhäsionsassays wurde der Einfluss von TNF- $\alpha$  und der Bestrahlung auf die Adhäsion von Tumorzellen an die Endothelzellen gemessen.

Beim Vergleich der Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe zeigte sich über alle Bestrahlungsdosen hinweg, unabhängig von der bestrahlten Zellart, eine erhöhte Adhäsion der Tumorzellen in den Proben mit TNF- $\alpha$ . Die Bestrahlung der Endothelzellen mit 2 Gy - 6 Gy führte zu einer vermehrten Adhäsion ebenso wie die Bestrahlung im Bereich von 2 Gy - 6 Gy von sowohl Endothelzellen als auch Tumorzellen. Die alleinige Bestrahlung der Tumorzellen hingegen führte im Bereich von 0,5 bis 6 Gy zu einer verminderten Adhäsion. Diese Effekte traten in den Proben ohne TNF- $\alpha$ -Zugabe ebenso wie in den Proben mit TNF- $\alpha$ -Zugabe auf.

Wurden nur die Endothelzellen bestrahlt, zeigte sich eine Hemmung der Adhäsion nach Bestrahlung mit niedriger Bestrahlungsdosis (0,1 Gy und 0,5 Gy).

Wie bereits erläutert, spielen die Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion: Eine erhöhte Konzentration dieser Moleküle führt zu einer vermehrten Zelladhäsion. Im Multiplex-Assay konnte nach Zugabe von TNF- $\alpha$  kein Anstieg von P-Selektin und nur ein leichter Anstieg von E-Selektin beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass diese Moleküle nicht ursächlich für die vermehrte Adhäsion der Tumorzellen nach TNF- $\alpha$ -Zugabe sind. Der vermehrte Anstieg der Konzentrationen von VCAM-1 und ICAM-1 durch die Stimulation

mit TNF- $\alpha$  lässt die Vermutung zu, dass die vermehrte Adhäsion nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  durch die erhöhte Konzentration von VCAM-1 und ICAM-1 vermittelt wird.

Die Bestrahlung hatte keinen so deutlichen Einfluss auf die Konzentration der untersuchten Adhäsionsmoleküle, sodass nicht genau bestimmt werden konnte, durch welche Adhäsionsmoleküle die erhöhte Adhäsion nach Bestrahlung der Endothelzellen vermittelt wird.

Auch ein Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die Adhäsion von Kolonkarzinom-Zellen an HUVEC Endothelzellen wurde bereits in der Literatur beschrieben (NÜBEL *et al.*, 2004). Dabei zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg der adhärenierten Zellen nach der Behandlung mit TNF- $\alpha$ . Jedoch führten NÜBEL *et al.* den Effekt auf eine erhöhte Sekretion von E-Selektin zurück, welcher zuvor in Vorexperimenten gemessen wurde. Es wurde erwähnt, dass die Zelllinie EA.hy926 in Vorexperimenten deutlich weniger sensibel auf die Stimulation von TNF- $\alpha$  reagierte als die HUVEC-Zellen. Die Sekretion von ICAM-1 war in der Arbeit von NÜBEL *et al.* nach Zugabe von TNF- $\alpha$  ebenfalls erhöht, dies wurde jedoch nicht näher untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem ein Zusammenhang zwischen der Bestrahlungsdosis, der Auswahl der bestrahlten Zelllinie und der Adhäsion der Tumorzellen gezeigt werden.

KIANI *et al.* (1996) untersuchten ebenfalls den Einfluss der Bestrahlung im Bereich von 1 Gy bis 20 Gy auf die Adhäsion der A549-Zellen an die HUVEC-Zellen. Sie beschrieben, dass eine Bestrahlung der Tumorzellen zu einer vermehrten Adhäsion und eine Bestrahlung der Endothelzellen zu einer verminderten Adhäsion führt. Die Ergebnisse der zitierten Arbeit stehen damit im Widerspruch zu den oben erläuterten Ergebnissen dieser Dissertation. Beim Vergleich der Methoden fiel auf, dass die Zellen bei KIANI *et al.* in dem Adhäsions-Assay nur eine halbe Stunde kokubiert wurden und nicht wie in der vorliegenden Arbeit zwei Stunden. Dass die Kokubationszeit eine wichtige Rolle spielt, bestätigen die Ergebnisse von HERZOG *et al.* (2013). In deren Arbeit wurde unter anderem der Einfluss ionisierender Strahlung auf die Adhäsion von verschiedenen Tumorzellen an HUVEC untersucht. Es wurde ebenfalls eine Kokubationszeit von 2 h gewählt. Dabei zeigte sich eine verstärkte Adhäsion der Tumorzellen nach Bestrahlung der Endothelzellen mit 5 Gy (HT-29) und 10 Gy (HT-29, CHO-K1 und MCF-7). Aber auch die Wahl der Tumorzelle scheint relevant zu sein, da es nach einer alleinigen Bestrahlung mit 10 Gy der MCF-7-Zellen zu einer verminderten Adhäsion und nach alleiniger Bestrahlung mit 10 Gy der CHO-K1-Zellen zu keiner Änderung der Adhäsion kam; im Gegensatz dazu die HT-29- und DLD1-Zellen (2 Gy bis 10 Gy) vermehrt adhärenierten.

Eine vorherige Behandlung der HUVEC mit TNF- $\alpha$  verstärkte die Adhäsion der Tumorzellen (HT-29 und DLD1; HERZOG *et al.*, 2013).

Wurden nur die Endothelzellen bestrahlt, zeigte sich nach einer Dosis von 0,5 Gy ein Minimum der Adhäsion (siehe Abb. 17). Ein ähnliches Phänomen mit einem Minimum der Adhäsion im Niedrigdosisbereich zeigte sich bei der Adhäsion von Immunzellen an Endothelzellen. So beschrieb RÖDEL *et al.* (2008) die Adhäsion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten

(PMN) an EA.hy926-Zellen 24 h nach der Bestrahlung und 4 h nach Zugabe von TNF- $\alpha$ . Es zeigte sich ähnlich wie in Abb. 17 eine verminderte Adhäsion nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy. Die Messung erfolgte jedoch mittels Koinkubation der Endothelzellen und der PMN-Zellen über 25 min bei 4°C unter Scherkräften.

Auch die Adhäsion von peripheren mononukleären Blutzellen zeigte ein relatives Minimum nach der Bestrahlung im Dosisbereich zwischen 0,3 Gy und 0,7 Gy ( RÖDEL *et al.*, 2009). Hierfür wurden murine Endothelzellen bestrahlt und anschließend für 20 h inkubiert. Nach der Zugabe von IL-1 $\beta$  wurden die Zellen für weitere 4 h inkubiert. Es wurde ebenfalls eine Koninkubation über 25 min bei 4°C unter Scherkräften durchgeführt. Im Multiplex-Assay konnte 24 h nach Bestrahlung mit 0,5 Gy (mit TNF- $\alpha$ -Zugabe) eine verminderte Konzentration von VCAM-1 und ICAM-1 gemessen werden (Abb. 14 und Abb. 15). Jedoch konnte der Effekt nicht in den Proben ohne TNF- $\alpha$  beobachtet werden. Konzentrationsunterschiede von ICAM-1 und VCAM-1 können also nicht alleinige Ursache für die verminderte Adhäsion nach Bestrahlung mit 0,5 Gy sein.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

---

Das entzündliche Mikroklima im Tumorgewebe und dem umgebenden Gewebe beeinflusst unter anderem die Entstehung, das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren. Dieses Mikroklima kann durch ionisierende Strahlung beeinflusst werden, welche sich je nach Bestrahlungsdosis anti- oder proinflammatorisch auswirkt. Zudem ist die Interaktion zwischen Tumor- und Endothelzellen in Hinblick auf Wachstum und Metastasierung des Tumors entscheidend. Ziel dieser Arbeit war es daher, in verschiedenen *in vitro*-Untersuchungen die Auswirkungen der ionisierenden Strahlung im Bereich von 0 Gy bis 6 Gy auf die Tumor-Endothelzell-Interaktion zu untersuchen. Im Folgenden werden die in diesem Rahmen erlangten Ergebnisse zusammengefasst:

- Mit Hilfe eines Scratch-Assays konnte ein migrationsfördernder Effekt von TNF- $\alpha$  auf die A549-Tumorzellen gezeigt werden. Die Bestrahlung verursachte in den Zellen ohne TNF- $\alpha$  eine Hemmung der Migration, im untersuchten Dosisbereich zeigte sich ein Maximum der Hemmung bei 2 Gy. Wurden die Zellen sowohl bestrahlt als auch mit TNF- $\alpha$  stimuliert, kam es nach Bestrahlung mit 0,1 Gy und 0,5 Gy zu einer vermehrten Migration, während hohe Dosen von 4 Gy und 6 Gy zu einer verminderten Migration führten.
- Nach Stimulation der Endothelzellen EA.hy926 mit TNF- $\alpha$  wurde im Multiplex-Assay ein deutlicher Anstieg von IL-8, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 und VEGF nachgewiesen.
- Die Bestrahlung modifizierte die Sekretion von IL-8, MCP-1, ICAM-1 und VCAM-1 der EA.hy926-Zellen. Die Ausschüttung von E-Selektin, P-Selektin und VEGF wurde hingegen kaum beeinflusst.
- Nach alleiniger Bestrahlung der A549-Zellen kam es im Adhäsionsassay zu einer verminderten Adhäsion an die EA.hy926-Zellen. Nach Bestrahlung sowohl der Tumor- als auch der Endothelzellen erfolgte mit steigender Dosis eine Zunahme der Adhäsion innerhalb des untersuchten Dosisbereiches. Eine alleinige Bestrahlung der EA.hy926-Zellen führte im Dosisbereich von 2 Gy bis 6 Gy ebenfalls zu einer mit steigender Bestrahlungsdosis zunehmenden Adhäsion; jedoch zeigte sich nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy ein relatives Minimum. Unter Einfluss von TNF- $\alpha$  kam es unabhängig von Bestrahlungsdosis und bestrahlter Zellart zu einer erhöhten Adhäsion.
- Bei Gesamtbetrachtung der Ergebnisse wurde deutlich, dass das entzündliche Mikroklima die Tumorzellmigration steigert, die Zytokinsekretion der Endothelzellen erhöht und die Adhäsion der Tumorzellen an die Endothelzellen fördert und somit möglicherweise auch das Tumorwachstum und die Metastasierung verstärkt.



- Die Bestrahlung hemmte die Migration der Tumorzellen, führte zu einer Modifikation der Zytokinsekretion und förderte die Adhäsion der Tumorzellen an die Endothelzellen.

**VI. AUSBLICK**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die bedeutsame Rolle der Endothelzellen als Bestandteil des Tumormikroklimas auf die Auswirkungen der Strahlentherapie im Rahmen der Tumorthherapie. Die ionisierende Strahlung beeinflusste sowohl die Zytokinausschüttung der Endothelzellen als auch die Adhäsion der Tumorzellen an die Endothelzellen. Zudem konnte eine Hemmung der Tumorzellmigration durch die Bestrahlung bestimmt werden. Zusätzlich zeigte sich ein deutlicher Einfluss durch das entzündliche Mikroklima, welches durch TNF- $\alpha$ -Gabe simuliert wurde. Dabei wurde eine Konzentration des TNF- $\alpha$  verwendet, unter welcher sich in anderen Studien eine effektive Stimulation der Zellen zeigte. Es erscheint sinnvoll, auch die Auswirkungen geringerer TNF- $\alpha$  Konzentrationen näher zu betrachten. In zukünftigen Studien sollte darüber hinaus untersucht werden, ob entzündungshemmende Medikamente wie bspw. Glykokortikoide den Effekt der TNF- $\alpha$ -Zugabe vermindern können.

Als Endothelzellen wurden in dieser Arbeit EA.hy926-Zellen verwendet. Diese immortalisierten Endothelzellen entstanden durch die Hybridisierung der primären Endothelzellen HUVEC mit der Tumorzelllinie A549. Weitere Untersuchungen mit humanen primären Endothelzellen wie HUVEC oder primären dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMVEC) könnten helfen, genauere Aussagen auf die Reaktionen im menschlichen Körper zu treffen.

Die Bestrahlung sollte in den Experimenten die Viabilität der Tumorzellen nicht zu stark mindern, um die Adhäsion und die Migration nicht aufgrund verringerter Viabilität zu beeinträchtigen. Daher wurde in dieser Arbeit eine Tumorzelllinie gewählt, welche wenig bestrahlungssensibel ist. In folgenden Experimenten könnten auch strahlungssensiblere Tumorzellen untersucht werden.

Während die Behandlung mit TNF- $\alpha$  großen Einfluss auf die Sekretion der Adhäsionsmoleküle hatte, kam es nur zu geringen Änderungen der Sekretion der Adhäsionsmoleküle nach Bestrahlung, obwohl die Bestrahlung mit 2 - 6 Gy der Endothelzellen im Adhäsionsassay zu einer deutlichen Zunahme der Adhäsion führte. Daher sollten in zukünftigen Untersuchungen weitere Adhäsionsmoleküle berücksichtigt werden.

Für eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen könnten zudem *in vivo* Studien an Tieren durchgeführt werden, in welchen das Ausmaß der Metastasierung nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen, mit und ohne TNF- $\alpha$ -Gabe bzw. mit und ohne Einfluss von entzündungshemmenden Medikamenten ermittelt werden könnte.

## VII. THESEN

---

1. Endothelzellen, als essenzieller Bestandteil des Tumormikroklimas, sind von großer Bedeutung für die inflammatorischen Prozesse der tumorassoziierten Entzündung. Die Endothelzellen beeinflussen die Tumorentstehung und das Tumorwachstum, indem sie verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschütten und als Teil der Blutgefäße mit verantwortlich für die Bereitstellung von Nährstoffen sind. Zudem müssen die Tumorzellen, um im Metastasierungsprozess die Blutgefäße zu verlassen, an die Endothelzellen adhären und durch die Endothelzellschicht migrieren.
2. Die Reaktion der Endothelzellen auf eine Bestrahlung im Rahmen der Tumorthherapie kann große Bedeutung für den Gesamterfolg der Therapie haben.
3. In den durchgeführten Studien konnte ein deutlicher Einfluss der Bestrahlung auf die Sekretion der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 sowie der inflammatorischen Zytokinen IL-8 und MCP-1 durch humanen Endothelzellen EA.hy926 detektiert werden.
4. Die Adhäsion der Tumorzellen A549 an die Endothelzellen EA.hy926 änderte sich unter der Wirkung der ionisierenden Strahlung. Eine Bestrahlung der Endothelzellen mit Dosen von 2 Gy bis 6 Gy führte zu einer vermehrten Adhäsion, während die alleinige Bestrahlung der Tumorzellen im selben Dosisbereich eine verminderte Adhäsion bedingte. Wurden sowohl die Tumor- als auch die Endothelzellen bestrahlt, kam es zu einer verstärkten Adhäsion. Die alleinige Bestrahlung der Endothelzellen mit 0,5 Gy bewirkte eine verminderte Adhäsion der Tumorzellen an die Endothelzellen.
5. Mittels Zugabe von TNF- $\alpha$  konnte ein entzündliches Mikroklima erfolgreich simuliert werden. Unter diesen Bedingungen kam es zu einem deutlichen Anstieg der Sekretion der Endothelzellen von IL-8, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 und VEGF.
6. Im Adhäsionsassay bewirkte das inflammatorische Mikroklima unabhängig von der Bestrahlungsdosis und unabhängig davon, ob Tumor und/oder Endothelzellen bestrahlt wurden, eine verstärkte Adhäsion der Tumor- an die Endothelzellen.
7. Im Migrationsassay zeigten die A549-Zellen eine deutlich verminderte Migration nach der Bestrahlung. Die Hemmung hatte ein relatives Maximum bei 2 Gy.

8. Das entzündliche Mikroklima (hervorgerufen durch TNF- $\alpha$ -Zugabe) führte zu einer deutlichen Zunahme der Migration der Tumorzellen. Wurden die Zellen zudem bestrahlt, kam es im Niedrigdosisbereich trotz Bestrahlung zu einer Zunahme der Migration.
9. Bei Gesamtbetrachtung der Ergebnisse wird deutlich, dass das entzündliche Mikroklima die Tumorzellmigration steigerte, die Zytokinsekretion der Endothelzellen erhöhte und die Adhäsion der Tumorzellen an die Endothelzellen förderte und somit möglicherweise auch das Tumorwachstum und die Metastasierung verstärkt.
10. Die Bestrahlung hemmte die Migration der Tumorzellen, führte zu einer Modifikation der Zytokinsekretion und förderte die Adhäsion der Tumorzellen an die Endothelzellen.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

---

AGGARWAL B. B. UND GEHLOT P. (2009) Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9(4): 351–369.

AKINO Y., TESHIMA T., KIHARA A., KODERA-SUZUMOTO Y., INAOKA M., HIGASHIYAMA S., FURUSAWA Y., MATSUURA N. (2009) Carbon-ion beam irradiation effectively suppresses migration and invasion of human non-small-cell lung cancer cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 75: 475–481.

ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN E.V, (2018) *Deutschen Krebshilfe. Leitlinienprogramm Onkologie: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms.*

ARENAS M., SABATER S., HERNÁNDEZ V., ROVIROSA, A., LARA P. C., BIETE A., PANÉS J. (2012) Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy. Indications, dose, and radiobiological mechanisms involved. *Strahlenther. Onkol.* 188(11): 975–981.

BALKWILL F. UND MANTOVANI A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357(9255): 539–545.

BENDAS G. UND BORSIG L. (2012) Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int. J. of Cell Biol.* 12: 676731-676741.

BORRELLO M. G., ALBERTI L., FISCHER A., DEGL'INNOCENTI D., FERRARIO C., GARIBOLDI M. (2005) Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the RET/PTC1 oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(41): 14825–14830.

BORSIG L., WOLF M. J., ROBLEK, M., LORENTZEN A., HEIKENWALDER M. (2014) Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory. *Oncogene* 33(25): 3217–3224.

BOYER B. UND THIERY J. P. (1993) Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity. *APMIS* 101(1-6): 257–268.

CHAMBERS A.F., GROOM A. C., MACDONALD I. C. (2002) Metastasis. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer.* 2(8): 563–572.

- CHANG C. C., LERMA, O. Z., THANIK V. D., SCHARF C. L., GREIVES M. R., SCHNEIDER R. J. (2009) Dose-dependent effect of radiation on angiogenic and angiostatic CXC chemokine expression in human endothelial cells. *Cytokine* 48(3): 295–302.
- CHIRIVI R. G. S., NICOLETTI M. I., REMUZZI A., GIAZZI R. (1994) Cytokines and Cell Adhesion Molecules in Tumor-Endothelial Cell Interaction and Metastasis. *Cell Commun. Adhes.* 2: 219–224.
- COLOTTA F., ALLAVENA P., SICA, A., GARLANDA C., MANTOVANI A. (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30(7): 1073–1081.
- DEGRO-AG „RADIOTHERAPIE GUTARTIGER ERKRANKUNGEN“ (2018) *Leitlinien in der Strahlentherapie, Strahlentherapie gutartiger Erkrankungen Fachgruppenspezifische evidenzbasierte S2e-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) Version 2.0 vom 02.11.2018*
- DAVIS P. K., HO A., DOWDY S. F. (2001) Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *Biotechniques* 30 1322-6.
- DELOCH, L., DERER, A., HUEBER, A. J., FIETKAU, R., FREY, B., GAIPL, U. S. (2016) The impact of low-dose radiation on inflammatory diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 75(1): A63.1-A63.
- DESAI S., LASKAR S., PANDEY B. N. (2013) Autocrine IL-8 and VEGF mediate epithelial-mesenchymal transition and invasiveness via p38/JNK-ATF-2 signalling in A549 lung cancer cells. *Cell Signal*; 25: 1780–1791.
- DESHMANE S. L., KREMLEV S., AMINI S., SAWAYA B. E. (2009) Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Jun; 29(6): 313–326.
- DOMÉ B., HENDRIX M. J. C., PAKU S., TOVARI J., TIMAR J. (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am. J. Pathol.* 170(1): 1–15.
- FOLKMAN J. (1992) The role of angiogenesis in tumor growth. *Seminars in cancer biology* 3 (2): 65–71.

FREY B., HEHLGANS S., RÖDEL F., GAUPL U. S. (2015) Modulation of inflammation by low and high doses of ionizing radiation: Implications for benign and malign diseases. *Cancer Lett.* 368: 230–237.

GOLDSTRAW P., CROWLEY J., CHANSKY K., GIROUX D. J., GROOME P. A., RAMI-PORTA R. (2007) The IASLC Lung Cancer Staging Project. Proposals for the Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. *J. Thorac. Oncol.* 2(8): 706–714.

HALLAHAN D., KUCHIBHOTLA J., WYBLE C. (1996) Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. *Cancer Res.* 56: 5150–5155.

HARJUNPÄÄ H., ASENS M. L., GUENTHER C., SUSANNA C. FAGERHOLM S. C. (2019) Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment *Front Immunol.* 10: 1078.

HAUBNER F., OHMANN E., POHL F., PRANTL L., STRUTZ J., GASSNER H. G. (2013) Effects of radiation on the expression of adhesion molecules and cytokines in a static model of human dermal microvascular endothelial cells. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 54(4): 371–379.

HELLWEG C. E. (2015) The Nuclear Factor  $\kappa$ B pathway: A link to the immune system in the radiation response. *Cancer Lett.* 368: 275–289.

HEROLD G. (Hg.) (2015) *Innere Medizin 2015. Eine vorlesungsorientierte Darstellung, unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung.* Köln: Selbstverl.

HERZOG M. (2013) *Pharmakologische Hemmung strahleninduzierter Tumorzell-Endothelzell-Interaktionen in vitro und Metastasierungsprozesse in vivo.* Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

HILDEBRANDT G., MAGGIORELLA L., RÖDEL F., RÖDEL V., WILLIS D., TROTT K.-R. (2002) Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 78: 315–325.

HORN L. UND SANDLER A. (2007) Lung Cancer Adjuvant Therapy. *Cancer J.* 13(3): 210–216.

ISMAIL A. H., LESSARD L., MES-MASSON A.-M., SAAD F. (2004) Expression of NF- $\kappa$ B in prostate cancer lymph node metastases. *Prostate* 58(3): 308–313.

ITZKOWITZ, S. H. (2004) Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. The role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287 (1): G7-G17.

JUNG J.-W., HWANG SO-YOUNG H., HWANG J.-S., OH E.-S., PARK S., HAN I.-O. (2007) Ionising radiation induces changes associated with epithelial-mesenchymal transdifferentiation and increased cell motility of A549 lung epithelial cells. *Eur. J. Cancer* 43(7): 1214–1224. DOI:

KANDA M., KODERA Y., SAKAMOTO J. (2015) Updated evidence on adjuvant treatments for gastric cancer. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9(12): 1549–1560. DOI:

KIANI M. F., FENTON B. M., SPORN L. A., SIEMANN D. W. (1997) Effects of ionizing radiation on the adhesive interaction of human tumor and endothelial cells in vitro. *Clin. Exp. Metastasis* 15(1): 12–18.

LI J., LI B.-L., ZHANG H.-Q., XU S.-F., LIU Z.-D., YUE W.-T, HAN Y. (2008) Relationship between vascular endothelial growth factor C expression level and lymph node metastasis in non small cell lung cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*; 88: 2982–2985.

LI N., KARIN M. (1998) Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF- B through two distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(22): 13012–13017.

MANTOVANI A., ALLAVENA P., SICA A., BALKWILL F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203): 436–444.

MEDEN H., OSMERS R., EMONS G. (1999) Hormontherapie des Endometriumkarzinoms und seiner Präkanzerosen. *Onkologe* 5: 417–421.

Moncharmont C., Levy A., Guy J.-B., Falk A. T., Guilbert M., Trone J.-C., Alphonse G., Gilormini M., Ardail D., Toillon R.-A., Rodriguez-Lafrasse C., Magné N. (2014) Radiation-enhanced cell migration/invasion process: a review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 92: 133–142.

MOORE K. L., PATEL K. D., BRUEHL R. E., LI F., JOHNSON D. A., LICHENSTEIN H. S., CUMMINGS R. D., BANTON D. F., MCEVER R. P. (1995) P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol.* 128(4): 661-71.



MULTHOFF G., MOLLS M., RADONS J. (2011) Chronic inflammation in cancer development. *Front. Immunol.* 2: 98.

MULTHOFF G. UND RADONS, J. (2012) Radiation, Inflammation, and Immune Responses in Cancer. *Front. Oncol.* 2: 58.

NÜBEL T., DIPPOLD W., KLEINERT H., KAINA B., FRITZ G. (2004) Lovastatin inhibits Rho-regulated expression of E-selectin by TNFalpha and attenuates tumor cell adhesion. *FASEB J.* 18(1): 140–142.

PAL S., YADAV P., SAINIS K. B., SHANKAR B.S. (2018) TNF- $\alpha$  and IGF-1 differentially modulate ionizing radiation responses of lung cancer cell lines. *Cytokine* 101: 89–98.

PALENA C., HAMILTON D. H. FERNANDO R. I. (2012) Influence of IL-8 on the epithelial–mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol.* 2012 June; 8(6): 713–722.

PARSONNET J., FRIEDMAN G. D., VANDERSTEEN D. P., CHANG Y., VOGELMAN J. H., ORENTREICH N., SIBLEY R. K. (1991) Helicobacter pylori Infection and the Risk of Gastric Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325(16): 1127–1131.

PETROVIC L., POHLE D., MÜNSTEDT H., RECHTENWALD T., SCHLEGEL K. A., RUPPRECHT S., (2006) Effect of  $\beta$ TCP filled polyetheretherketone on osteoblast cell proliferation *in vitro*. *J Biomed Sci* 13, 41–46.

ROBERT KOCH-INSTITUT (2019) *Krebs in Deutschland 2015/2016. Gesundheitsberichterstattung des Bundes.* 12. Ausg. 2019.

RÖDEL F., HANTSCH M., HILDEBRANDT G., SCHULTZE-MOSGAU S., RÖDEL C., HERRMANN M., SAUER R., VOLL R. E. (2004) Dose-dependent biphasic induction and transcriptional activity of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in EA.hy.926 endothelial cells after low-dose X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*; 80: 115–123.

RÖDEL F., KEILHOLZ L., HERRMANN M., SAUER R., HILDEBRANDT G. (2007) Radiobiological mechanisms in inflammatory diseases of low-dose radiation therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 83: 357–366.

RÖDEL F., HOFMANN D., AUER J., KEILHOLZ L., RÖLLINGHOFF M., SAUER R., BEUSCHER H. U. (2008) The anti-inflammatory effect of low-dose radiation therapy involves a diminished CCL20 chemokine expression and granulocyte/endothelial cell adhesion. *Strahlenther. Onkol.* 184(1): 41-47.

ROEDEL F., KLEY N., BEUSCHER H. U., HILDEBRANDT G., KEILHOLZ L., KERN P., VOLL R., HERRMANN M., SAUER R. (2009) Anti-inflammatory effect of low-dose X-irradiation and the involvement of a TGF-beta1-induced down-regulation of leukocyte/endothelial cell adhesion. *Int. J. Radiat. Biol.* 78(8): 711-719.

RÖDEL F., FREY B., MÜLTHOFF G., GAIPL U. (2015) Contribution of the immune system to bystander and non-targeted effects of ionizing radiation. *Cancer Lett.* 356:105–113.

SCHRÖDER S., JUERß D., KRIESEN S., MANDA K., HILDEBRANDT G. (2018) Immunomodulatory properties of low-dose ionizing radiation on human endothelial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 95(1): 1–10.

SCHRÖDER S., BROESE S., BAAKE J., JUERß D., KRIESEN S., HILDEBRANDT G., MANDA K. (2019) Effect of ionizing radiation on human EA.hy926 endothelial cells under inflammatory conditions and their interactions with A549 tumour cells. *J. Immunol. Res.* 9645481.

SHIOZAKI A., BAI X., SHEN-TU G., MOODLEY S., TAKESHITA H., FUNG S.-Y. (2012) Claudin 1 mediates TNF $\alpha$ -induced gene expression and cell migration in human lung carcinoma cells. *PLoS One* 7(5): e38049.

SMITH I., PROCTER M., GELBER R. D., GUILLAUME S., FEYEREISLOVA A., DOWSETT M., GOLDHIRSCH A., UNTCH M., MARIANI G., BASELGA J., KAUFMANN M., CAMERON D., BELL R., BERGH J., COLEMAN R., WARDLEY A., HARBECK N., LOPEZ R. I., MALLMANN P., GELMON K., WILCKEN N., WIST E., SÁNCHEZ ROVIRA P., PICCART-GEHBART M. J. (2007) 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomized controlled trial. *The Lancet* 369: 29–36.

SOFIA V. I., MARTINS L. R., IMAIZUMI N., NUNES R. J., RINO J., KUONEN F., CARVALHO L. M., RÜEGG C., GRILLO I. M., BARATA J. T., MAREEL M., SANTOS S. C. R. (2010) Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PLoS ONE* 5: e11222.

SU Y., LEI X., WU L., LIU L. (2012) The role of endothelial cell adhesion molecules P-selectin, E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in leucocyte recruitment induced by exogenous methylglyoxal. *Immunology* 137(1): 65-79

THIERY J. P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev. Cancer* 2(6): 442–454.

TOYOKUNI S. (2008) Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis. From epidemiology to oxygenomics. *IUBMB Life* 60(7): 441–447.

VALAVANIDIS A., VLACHOGIANNI T., FIOTAKIS K., LORIDAS S. (2013) Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer. Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10(9): 3886–3907.

VAN DER GAUGLER, C. SQUIBAN A. MEE M.-H. (2009) Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *Int. J. of Radi. Biol.* 72(2): 201–209.

VAN DER MEEREN A. V., BERTHO J. M., VANDAMME M., GAUGLER M. H. (1997) Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. *Mediator.s Inflamm.* 6: 185–193.

WANG X UND LIN Y. (2008) Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta. Pharmacol. Sin.* 29: 1275–1288.

WANNENMACHER M., WENZ F., DEBUS J. (2013) *Strahlentherapie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.*

YAMAUCHI Y., KOHYAMA T., TAKIZAWA H., KAMITANI S., DESAKI M., TAKAMI K. (2010) Tumor necrosis factor-alpha enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1. *Exp. Lung Res.* 36(1): 12–24.

YANG J. UND WEINBERG R. A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* 14(6): 818–829.

**DANKSAGUNG**

---

An dieser Stelle möchte ich mit herzlich bei allen bedanken, ohne deren fachliche und kollegiale Hilfe ich diese Arbeit nicht hätte erstellen können.

Für die Übernahme der Betreuung und die Möglichkeit die Dissertation in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie anzufertigen, möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hildebrandt bedanken.

Ein besonderer Dank gilt ebenso Frau Dr. Manda, für die unermüdliche Unterstützung während der Arbeit im Labor und insbesondere in der Korrekturphase. Vielen Dank für die fachlichen Ratschläge und die vielen Ermutigungen.

Für die Einarbeitung und auch die weitere Betreuung im Labor bedanke ich mich bei Frau Schröder, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich maßgeblich bei den verschiedenen Arbeitstechniken anleitete.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei dem gesamten Labor-Team bedanken, das mich immer unterstützt hat und an das ich mich jederzeit mit meinen Fragen wenden konnte.

Vielen Dank an das Team der medizinischen Physik für die Unterstützung bei der Bestrahlung der Zellen.

Frau Dr. Petra Müller möchte ich für die Hilfestellung bei der Durchführung des Multiplex-Assays danken.

Für die emotionale Unterstützung, das „Rückenfreihalten“, das Motivieren und für Vieles mehr gilt mein ganz besonderer Dank meinem Ehemann und meiner Familie.

**EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

---

Die Dissertation wurde bisher weder vorher noch gleichzeitig in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen nicht benutzt habe. Die in den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich noch kein Promotionsverfahren an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines erworbenen Dokortitels nicht vorliegt.

Simone Broese

Wismar, 06.08.2020