

Einfluss bestrahlter Endothelzellen auf das Metastasierungsverhalten von Brustkrebszellen *in vitro*

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr.med.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Carolin Norra

geboren am 22.09.1987 in Neuruppin

aus Wittstock/ Dosse

Rostock, 2025

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Bernd J. Krause

Gutachter:

Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie

Prof. Dr. rer. nat. Franz Rödel, Universitätsmedizin Frankfurt, Klinik für Strahlentherapie und Onkologie

PD Dr. med.habil. Steffi Hartmann, Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt Rostock

Jahr der Einreichung: 2025

Jahr der Verteidigung: 2025

Die vorliegende Arbeit wurde im strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Frau PD Dr. rer. nat. habil. Katrin Manda angefertigt (Klinikdirektor: Prof. Dr. med. habil. Guido Hildebrandt).

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
1. Einleitung.....	4
1.1.Krebs	4
1.2.Brustkrebs.....	5
1.3.Metastasierung.....	8
1.4.Strahlentherapie.....	10
1.5.Bystander-Effekt.....	10
1.6.Zielstellung.....	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1.Verwendete Zellen.....	13
2.1.1.Brustkrebszellen - MCF7	13
2.1.2.Endothelzellen - EA.hy926	14
2.2.Ausfrieren von Zellen.....	14
2.3.Kultivierung der Zellen	15
2.4.Bestrahlung.....	15
2.5.Wachstum der Tumorzellen.....	16
2.5.1.Bestimmung der optimalen Einsaatdichte.....	16
2.5.2.Wachstumskurven der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt.....	17
2.6.Koloniebildung der Tumorzellen.....	17
2.6.1.Koloniebildung der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt.....	18
2.7.Migrationsvermögen der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt.....	18
2.8.Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der Tumorzellen.....	19
2.8.1.Probenvorbereitung	19
2.8.2.Lysatherstellung	20
2.8.3.Proteinbestimmung	20
2.8.4.Weiterverarbeitung des Lysats	21
2.8.5.Gele gießen	21
2.8.6.Gelelektrophorese	22
2.8.7.Blotten.....	23
2.8.8.Antikörperbehandlung	23
2.8.9.Entwicklung der Nitrocellulose-Membran.....	24
2.9.Statistik.....	24

Inhaltsverzeichnis

2.10. Geräte und Materialien.....	26
3. Ergebnisse.....	30
3.1. Wachstum der Tumorzellen.....	30
3.1.1. Wachstum der Tumorzellen – nativ.....	31
3.1.2. Wachstum der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt.....	31
3.2. Koloniebildung der Tumorzellen.....	33
3.2.1. Koloniebildung der Tumorzellen – nativ.....	34
3.2.2. Koloniebildung der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt.....	34
3.3. Migrationsvermögen der Tumorzellen.....	36
3.3.1. Bestimmung der Einsaatdichte.....	36
3.3.2. Migrationsvermögen der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt.....	37
3.4. Epithelial-mesenchymale Transition der Tumorzellen.....	38
3.4.1. Proteinbestimmung.....	38
3.4.2. Western Blot Analyse.....	39
4. Diskussion.....	43
4.1. Wachstum der Tumorzellen.....	43
4.2. Koloniebildung der Tumorzellen.....	44
4.3. Migration der Tumorzellen.....	45
4.4. Epithelial-mesenchymale Transition der Tumorzellen.....	47
5. Zusammenfassung.....	51
6. Ausblick.....	53
Literaturverzeichnis.....	54
Thesen.....	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität verschiedener Krebserkrankungen der Frau (Bray et al., 2018)	5
Abbildung 2: Inzidenz und Mortalität von Brustkrebs bei Frauen bezogen auf verschiedene Regionen weltweit (Bray et al., 2018)	6
Abbildung 3: Schematischer Ablauf des Metastasierungsprozesses (Chaffer et al., 2011)	8
Abbildung 4: Mikroskopische Darstellung von MCF7-Zellen in 400-facher Vergrößerung	13
Abbildung 5: Mikroskopische Darstellung von EA.hy926-Zellen in 400-facher Vergrößerung ..	14
Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Bestrahlung an einem Linearbeschleuniger	16
Abbildung 7: Platzierung der Zellkulturflaschen auf dem Bestrahlungstisch	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Migrationsvermögens	19
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Wachstumskurve	30
Abbildung 10: Wachstum der MCF7-Zellen bei unterschiedlicher Einsaatdichte	31
Abbildung 11: Wachstum unbestrahlter MCF7-Zellen in verschiedenen Medien	32
Abbildung 12: Überleben der MCF7-Zellen (Einsaatdichte 3×10^3 Zellen/ml)	34
Abbildung 13: Überleben der MCF7-Zellen (Einsaatdichte 3×10^3 Zellen/ml) in verschiedenen Medien	35
Abbildung 14: Migrationsvermögen unbestrahlter MCF7-Zellen in verschiedenen Medien	37
Abbildung 15: Bradford-Proteinstandardkurve (BSA) als Referenz zur Proteinbestimmung der Proben nach 24 Stunden	38
Abbildung 16: Bradford-Proteinstandardkurve (BSA) als Referenz zur Proteinbestimmung der Proben nach 48 Stunden	39
Abbildung 17: Beispiel einer Proteinexpression von β -Catenin, Smooth Muscle Actin (SM-Actin) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der MCF7-Zellen.....	39
Abbildung 18: Intensität der Proteinexpression von β -Catenin in MCF7-Zellen.....	40
Abbildung 19: Intensität der Proteinexpression von Smooth Muscle Actin (SM-Actin) in MCF7-Zellen	41

Abkürzungsverzeichnis

ALK-7	Activin Receptor-like Kinase 7
APS	Ammoniumperoxodisulfate
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
CNA	Copy Number Alteration
CTC	zirkulierende Tumorzellen (engl. circulating tumor cells)
dest.	destilliert
DPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EA.hy926	transformierte Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene
EC-Medium	Endothelzellmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunsorbent Assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
G3	Grading 3
HER2	human epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HPV	humane Papillomviren
MCF7	Michigan Cancer Foundation-7 (Brustkrebszelllinie)
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
PALB1	Partner und Lokalisierer von BRCA2
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RAD51C	codiertes Protein von BRCA3
RKI	Robert Koch Institut
rpm	revolutions per minute
SD	Standardabweichung
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β 1	transformierter Wachstumsfaktor β 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
TP53	Tumorsuppressor 53

TTBS	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
Tween20	Polysorbat 20
UICC	Internationale Union gegen Krebs
VEGF	vaskulär endotheliale Wachstumsfaktoren
WST-1	wasserlösliches Tetrazolium-1

1. Einleitung

1.1. Krebs

Als Krebs werden Zellen bzw. Gewebe bezeichnet, die unkontrolliert wachsen und sich vermehren. In diesem Zusammenhang spielen drei Gruppen von Genen eine Rolle: Onkogene, Tumorsuppressor-Gene und Reparaturgene. Onkogene fördern das Zellwachstum, Tumorsuppressor-Gene hemmen es. Kommt es zu Mutationen in diesen Genen, greift das Reparatursystem des Körpers ein und behebt diese Veränderungen. Dieser Vorgang ist erforderlich, um ein Ungleichgewicht der Onkogene und Tumorsuppressor-Gene und somit ein unkontrolliertes Zellwachstum zu verhindern.

Die Mutationen in Onkogenen, Tumorsuppressor-Genen oder Reparaturgenen entstehen meist spontan, sind jedoch mit Risikofaktoren wie Zigarettenrauchen, starkem Alkoholkonsum, übermäßige Einwirkung von Sonnenstrahlung und Infektionen (z.B. HPV) assoziiert. Darüber hinaus gibt es viele Gründe für ein nicht funktionierendes Reparatursystem des Körpers. Krebszellen haben u.a. die Fähigkeit sich zu tarnen und sich so dem Einfluss der Immunzellen zu entziehen. Außerdem kann es zum Ausfall bestimmter Programme des Alterungsprozesses in den Zellen kommen, wodurch diese als Krebszellen dauerhaft überleben können. Es gibt schnell und langsam, teilweise über Jahrzehnte, wachsende Krebsarten. Die Wachstumsgeschwindigkeit gibt einen Hinweis darauf, ob von einem benignen oder malignen Tumor die Rede ist. Benigne Tumore wachsen i.d.R. langsam, sind scharf begrenzt und dringen nicht in Blutgefäße ein. Sie metastasieren nicht und es findet eine Zellreifung statt. Im Gegensatz dazu zeichnen sich maligne Tumore durch schnelles Wachstum, unscharfe Begrenzung und Metastasierung aus, da sie in Blutgefäße eindringen können. Bei malignen Tumoren findet keine regelrechte Zellreifung statt, sodass unter dem Mikroskop undifferenzierte Zellen zu erkennen sind.

Die Therapie im Kampf gegen Krebs entwickelt sich stetig weiter. Dennoch steigt die Inzidenz und Mortalität weltweit rasant (BRAY et al., 2018). 2016 wurden in Deutschland rund 492.000 Krebserkrankungen diagnostiziert (RKI, 2020). Krebserkrankungen sind nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (SCHAFF, 2019) und gehören weltweit zu den Haupttodesursachen (RKI, 2020). Am häufigsten sind Menschen im Alter zwischen 70 und 74 Jahren von einer Krebsdiagnose betroffen (SCHAFF, 2019). Aufgrund dieser Tatsache und der zunehmenden Alterung der Bevölkerung lässt sich erklären, dass die Zahl der Krebserkrankungen insgesamt weiter steigen wird, obwohl für viele Krebsarten eine rückläufige

Tendenz zu erkennen ist (RKI, 2020). Eine der weltweit am häufigsten vorkommenden Krebsarten ist Brustkrebs (HARBECK et al., 2017).

1.2. Brustkrebs

Brustkrebs gehört mit jährlich mehr als 1.000.000 Fällen weltweit (MAKKI, 2015) zu den drei häufigsten Krebsarten (HARBECK et al., 2017) und ist bei Frauen die dominierende Krebsart in Inzidenz (COMŞA et al., 2015) und Mortalität (BRAY et al., 2018). Brustkrebs macht etwa 25% der Krebserkrankungen von Frauen (MAKKI, 2015; BRAY et al., 2018; Abb.1) und etwa 14% aller Krebstoten aus (COMŞA et al., 2015).

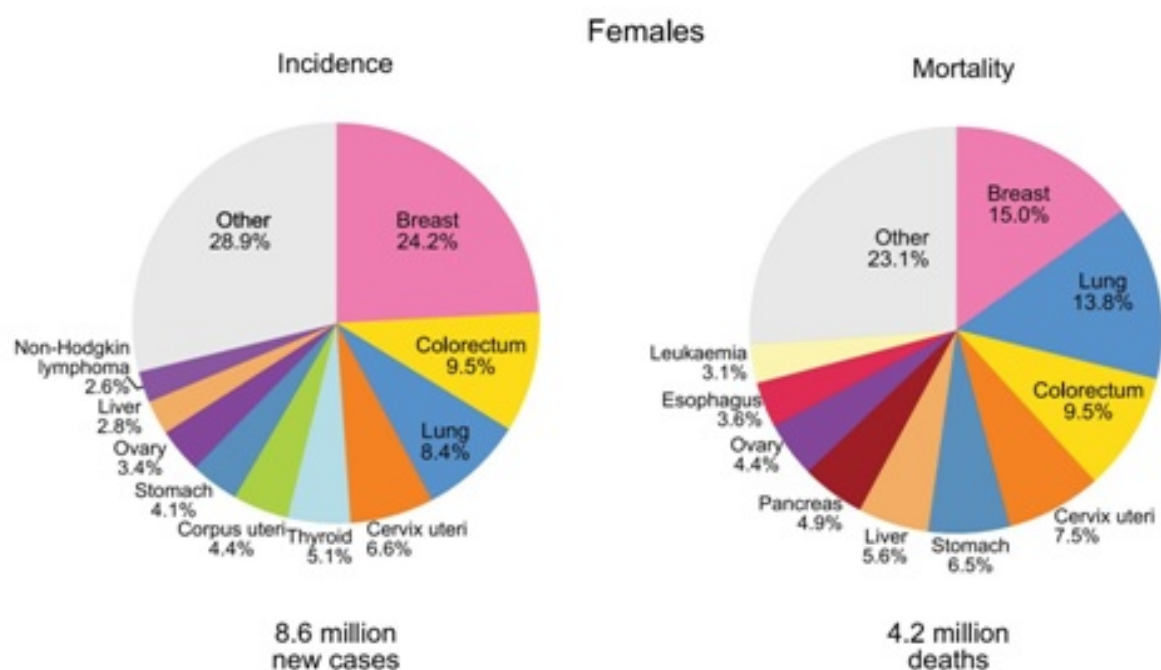


Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität verschiedener Krebserkrankungen der Frau (Bray et al., 2018)

Brustkrebs ist in der überwiegenden Mehrheit der Länder die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung (154 von 185 Länder) und in über 100 Ländern die häufigste Todesursache bei Krebserkrankungen (BRAY et al., 2018).

Die höchsten Inzidenzraten für Brustkrebs sind in Australien/Neuseeland, Nordeuropa (z.B. Großbritannien, Schweden, Finnland und Dänemark), Westeuropa (Belgien - mit der höchsten globalen Rate, den Niederlanden und Frankreich), Südeuropa sowie Nordamerika zu verzeichnen (BRAY et al., 2018; Abb.2). Im Vergleich ist zusätzlich in Abbildung 2 gezeigt, dass die Brustkrebsraten in Bezug auf die Mortalität eine geringere Variabilität aufweisen, wobei die höchste geschätzte Mortalität in Melanesien liegt (BRAY et al., 2018).

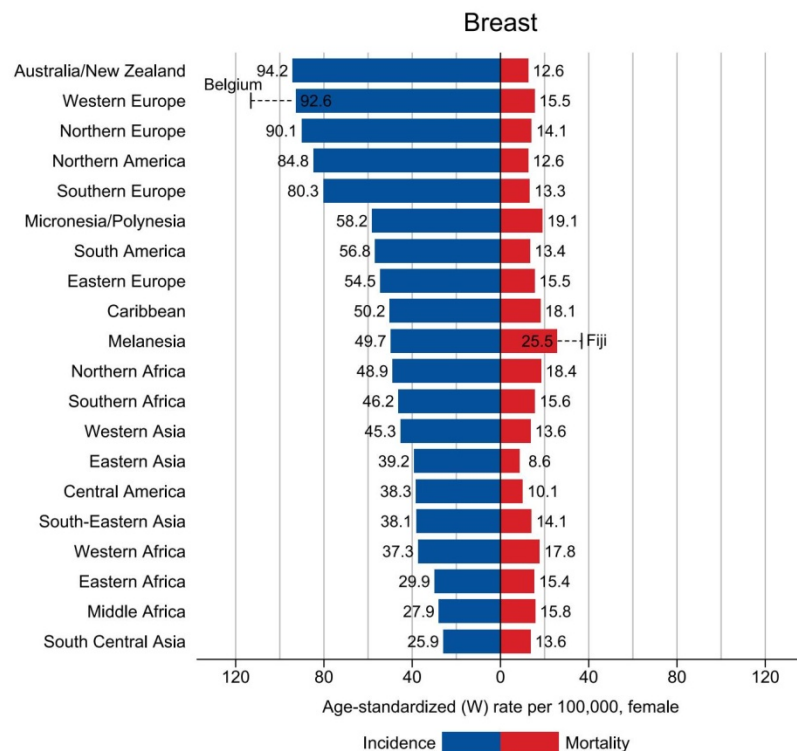


Abbildung 2: Inzidenz und Mortalität von Brustkrebs bei Frauen bezogen auf verschiedene Regionen weltweit (Bray et al., 2018)

Die tumorspezifische Mortalität wird durch Fortschritte in der Diagnostik (Mammographie, welche zu einem großen Teil in Anspruch genommen wird (STARKER et al., 2018)) und der Therapie kontinuierlich gesenkt, sodass die 5-Jahres-Überlebensrate bei 87% liegt.

Die medizinische Forschung ergab, dass durch genetische, hormonelle und/oder toxische Faktoren ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken besteht. So ergibt sich ein erhöhtes Risiko bei Keimbahnmutationen in den Genen BCRA-1, BCRA-2 (RHIEM et al., 2012), PALB2 (DEUTSCHES ÄRZTEBLATT, 2014; COUCH et al., 2017) oder RAD51C (MEINDL et al., 2010; COUCH et al., 2017). Ebenso besteht ein erhöhtes Risiko durch einen kontralateralen Brustkrebs (Erstkarzinom). Zusätzlich zu den genannten Risikofaktoren finden bei Brustkrebs die sogenannten erworbenen Risikofaktoren wie Übergewicht, Rauchen und/oder exzessiver Alkoholkonsum Beachtung. Der Fettleibigkeit wird sogar eine Verbindung zum Fortschreiten der Erkrankung zugeschrieben (VILLANUEVA-DUQUE et al., 2017).

Die Klassifikation nach der Größe des Primärtumors und das Ausmaß der Metastasierung erfolgt mittels TNM-Kriterien. Diese werden mit Hilfe der Einteilung der UICC in verschiedene Stadien zusammengefasst. Bei einem metastasierten Stadium steht der Erhalt der Lebensqualität im Vordergrund (HARBECK et al., 2017). Die Metastasierung findet hauptsächlich in die Knochen,

die Lunge, die Leber und das Gehirn statt (LU et al., 2011; HARA et al., 2017). Diese Fernmetastasen führen zu einer schlechten Prognose (ZHENG et al., 2018) und bilden mit fast 90% der Todesfälle bei Brustkrebs den größten Anteil (HARA et al., 2017).

Im Frühstadium ist Brustkrebs heilbar und wird bei dreifach negativen und human epidermalen Wachstumsfaktor 2 (HER2) - positiven Brustkrebs neoadjuvant therapiert (HARBECK et al., 2017). Zudem wurden in den letzten Jahren in der Prävention und Behandlung im frühen Brustkrebsstadium bedeutende Fortschritte erzielt (HARTKOPF et al., 2019).

Generell ist festzustellen, dass die Behandlung von Brustkrebspatienten sich immer mehr von einem einheitlichen Schema auf eine individuelle Behandlung verschiebt (MCDONALD et al., 2016). Das lässt sich u.a. auf die Tumoreigenschaften zurückführen. Dabei sind die Oberflächenproteine des Tumors entscheidend. HER2-positive Tumore haben im Allgemeinen eine schlechtere Prognose, aber mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper, Trastuzumab, einen Arzneistoff, der gezielt an den HER2-Rezeptor bindet und das Tumorstadium hemmt. Studien belegen, dass Trastuzumab und eine Chemotherapie in Kombination mit Pertuzumab die Überlebensraten ohne invasive Erkrankungen bei Patienten mit HER2-positivem, operablem Brustkrebs signifikant verbessert (MINCKWITZ et al., 2017). Es zeigt sich zudem eine Erhöhung des klinischen Nutzens einer First-Line-Chemotherapie bei metastasiertem und HER2-überexprimiertem Brustkrebs durch Zugabe von Trastuzumab (SLAMON et al., 2001). Neben diesen neuen Erkenntnissen und Fortschritten ist vor allem die Metastasierung für das Überleben entscheidend, sodass diese Thematik im Weiteren näher erklärt wird.

1.3. Metastasierung

Die Absiedlung von Tumorzellen eines Primärtumors in andere Gewebe wird als Metastasierung bezeichnet (Abb.3).

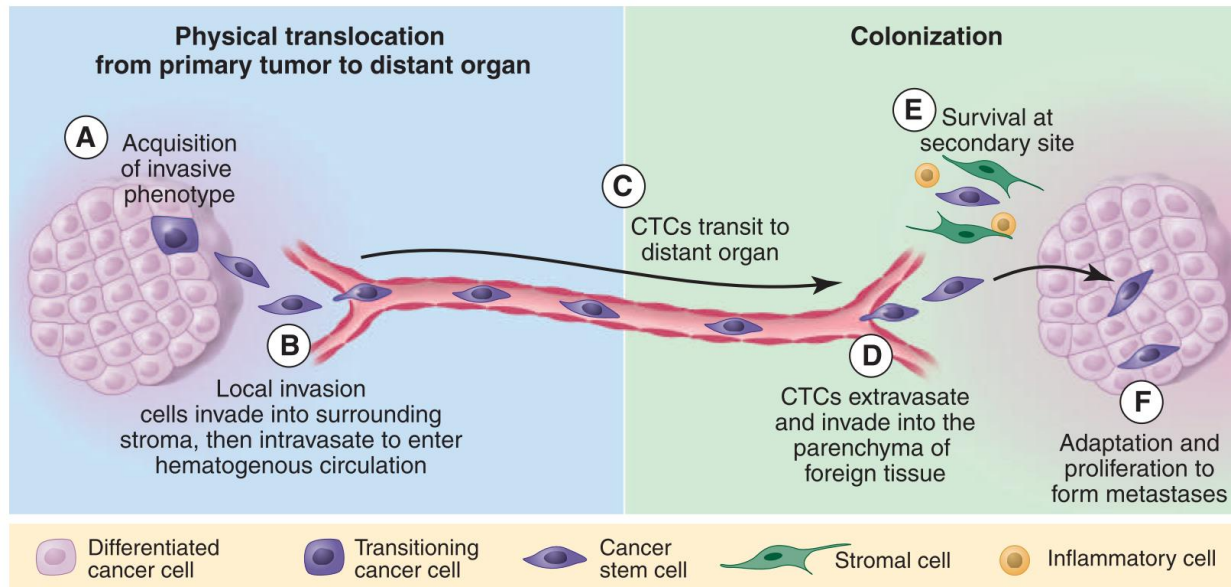


Abbildung 3: Schematischer Ablauf des Metastasierungsprozesses (Chaffer et al., 2011)

(A) Zum Beginn der metastatischen Kaskade erhalten Krebszellen innerhalb des Primärtumors einen invasiven Phänotyp. (B) Sie können in die umgebende Matrix und in Richtung Blutgefäße eindringen, wo sie intravasieren, um in den Kreislauf einzutreten. (C) Krebszellen, die sich durch den Kreislauf bewegen, werden als Circulating tumor cells (CTCs) benannt. Sie zeigen Eigenschaften des verankerungsunabhängigen Überlebens. (D) Am entfernten Organ verlassen CTCs den Kreislauf und dringen in die Umgebung des Fremdgewebes ein. (E) An dieser Stelle müssen Krebszellen in der Lage sein sich der angeborenen Immunantwort zu entziehen und als einzelne Zelle (oder als kleine Zellgruppe) zu überleben. (F) Zur aktiven makrometastatischen Ablagerung muss sich die Krebszelle an die Umgebung anpassen und die Proliferation initiieren können.

Diese erfolgt über die Blut- oder Lymphbahnen, wozu mehrere Barrieren überwunden werden müssen. Zunächst müssen die Zellen ihren ursprünglichen Gewebeverband (Primärtumor) verlassen. Um diesen Vorgang zu ermöglichen schalten die Tumorzellen bestimmte Programme der Embryonalentwicklung ein, welche die Zellwanderung ermöglichen. Eines dieser Programme ist die epithelial-mesenchymale Transition. Der Begriff epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezieht sich auf ein komplexes molekulares und zelluläres Programm, mit dem Epithelzellen ihre differenzierten Eigenschaften wie Zell-Zell-Adhäsion, planare und apikal-basale Polarität sowie mangelnde Motilität ablegen und stattdessen mesenchymale Merkmale wie Motilität, Invasivität und eine erhöhte Apoptose-Resistenz erwerben (POLYAK et al., 2009). Diese zwei Zelltypen wurden bereits um das 19. Jahrhundert erkannt (THIERY, 2002). Die EMT spielt eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung (POLYAK et al., 2009) und unterteilt sich in drei Subtypen (KALLURI et al., 2009). Durch die verschiedenen Subtypen wird die EMT während der Implantation, der Embryogenese und der Organentwicklung (Typ 1), der

Gewebereparatur und der Organfibrose (Typ 2) sowie der Entstehung von Krebserkrankungen und Metastasierung (Typ 3) beschrieben (KALLURI et al., 2009), sodass die EMT im Laufe des Lebens eine Rolle bei der Neoplasie und einem zentralen Prozess der Metastasierung zugeschrieben wird (KALLURI et al., 2009; XU et al., 2012). Nach der epithelial-mesenchymalen Transition folgt die Einwanderung in die benachbarten Blut- oder Lymphbahnen. Um in die normalerweise eher undurchlässigen Blutgefäße einzudringen, können Tumorzellen Immunzellen anlocken, die sie transportieren. Bei Lymphgefäßen ist das nicht nötig, da diese durchlässiger sind. Im Blutgefäß tarnen sich die Tumorzellen durch Interaktion mit Thrombozyten. Nach dem Eintritt folgt der Austritt aus den jeweiligen Blut- oder Lymphbahnen in ein anderes Gewebe, in dem die Tumorzellen sich vermehren und die Neubildung von Blutgefäßen zum Erhalt ihrer Nährstoffversorgung anregen. Für die Vermehrung verlieren die Tumorzellen die Eigenschaft zu wandern. Die entstandene Tochtergeschwulst (Metastase) verschlechtert die Prognose.

Es gibt eine Vielzahl an Genen/Proteinen, die einen Einfluss auf den Prozess der Metastasierung haben. Eines dieser Proteine ist das Protein p53, welches eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung spielt. So führt der Verlust des Proteins p53 zur Störung von Stoffwechselwegen, welche die Metastasierung hemmen (POWELL et al., 2014). Durch zusätzliche Funktionen fördern Transkriptionsdefekte TP53-Mutanten die Metastasierung (POWELL et al., 2014). Die TP53-Genexpressionssignatur ist signifikant prädiktiv für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben, was darauf hindeutet, dass eine Störung des p53-Signalwegs bei Brustkrebs mit einer Metastasierung korreliert (POWELL et al., 2014). Zudem beeinträchtigt ALK7 das Überleben verschiedener Krebsarten, darunter auch Brustkrebs (MICHAEL et al., 2019) und bildet einen möglichen Ansatzpunkt für die Weiterentwicklung der Krebstherapie u.a. der Brustkrebstherapie.

YANG et al. fanden 2004 heraus, dass der Transkriptionsfaktor Twist, ein Hauptregulator der embryonalen Morphogenese, eine wesentliche Rolle bei der Metastasierung spielt. So führt die Unterdrückung der Twist-Expression in hochmetastatischen Brustkrebszellen zur spezifischen Hemmung der Fähigkeit von der Brustdrüse in die Lunge zu metastasieren (YANG et al., 2004). Metastasen gehen häufig mit Funktionseinschränkungen und Schmerzen einher, sodass zur Verbesserung der Lebensqualität die Patienten mit einer Chemo- und/oder Strahlentherapie behandelt werden.

1.4. Strahlentherapie

Die Strahlentherapie gewinnt in den letzten Jahren in der Therapie von Tumor- und Schmerzpatienten immer mehr an Bedeutung. So erhält etwa jeder zweite Krebspatient im Zuge seiner Behandlung eine Strahlentherapie (KREBSFORSCHUNGSZENTRUM, 2018). Durch diverse Studien werden die Behandlungen der Strahlentherapie weiter optimiert und erweitert. Die Strahlentherapie kann kurativ oder palliativ angewandt werden. Die kurative Behandlung zielt darauf ab eine Heilung der Erkrankung herbeizuführen. Dahingegen steht bei der palliativen Behandlung beispielsweise bei einer ossären Metastasierung bei Brustkrebs eine Schmerzlinderung oder protektiv eine Verhinderung pathologischer Frakturen zur Verbesserung der Lebensqualität im Vordergrund. In der Regel wird in beiden Fällen ionisierende Strahlung eingesetzt. Unabhängig vom Tumor-/Schmerzleiden erfolgt die Strahlentherapie nach einem definierten Ablauf. Eine etablierte Therapie in der Brustkrebsbehandlung ist die adjuvante Bestrahlung nach brusterhaltender Therapie. Diese wird bei primären und metastasiertem Brustkrebs angewandt (HARA et al., 2017).

1.5. Bystander-Effekt

In der Radiobiologie wurde lange davon ausgegangen, dass die Strahlung ausschließlich in den bestrahlten Zellen einen Effekt erzielt. Diese Theorie wurde 1992 durch ein Experiment in Frage gestellt, in welchem sich zeigte, dass die Bestrahlung von 1 % der Zellen mit Alpha-Partikeln in mehr als 30 % der Zellen zum Chromatidaustausch führte (NAGASAWA et al., 1992). Dieses Experiment beschrieb den sogenannten Bystander-Effekt. Heute ist bekannt, dass der Bystander-Effekt ein wichtiger Bestandteil der Wirkung ionisierender Strahlung ist (WIDEL, 2012). Es handelt sich dabei um nicht zielgerichtete Effekte, die in unbestrahlten Zellen beobachtet wurden, welche in Kontakt mit bestrahlten Zellen standen (AZZAM et al., 2003; LORIMORE et al., 2003; OSTERREICHER et al., 2003; FACOETTI et al., 2006; HUANG et al., 2007; CHAPMAN et al., 2008) oder lösliche Signale von diesen erhielten (LORIMORE et al., 2003; FACOETTI et al., 2006; HUANG et al., 2007). Der Bystander-Effekt kann demnach mutmaßlich durch Kommunikation über GAP-Junctions (AZZAM et al., 2003; WIDEL et al., 2009) bzw. durch einen Mediumtransfer *in vitro* (CHAPMAN et al., 2008; WIDEL et al., 2009) ausgelöst werden. Es zeigte sich jedoch, dass der Bystander-Effekt bei Zellen im engeren Kontakt und einer GAP-Junction-Kommunikation im Vergleich zu Mediumtransferexperimenten stärker ausgeprägt ist (HALL, 2003).

Es wird angenommen, dass auf molekularer Ebene Stickstoffmonoxid (SHAO et al., 2006; SHAO et al., 2008) und TGF- β 1 am Bystander-Effekt beteiligt sind (SHAO et al., 2008) und nach

Freisetzung von bestrahlten Zellen, in unbestrahlten Nachbarzellen unterschiedliche Signalwege induzieren (WIDEL et al., 2009). FACOETTI et al. untersuchten 2006 die Wirkung von Interleukin-8 und dessen Rezeptor (CXCR1) mit Hilfe der Mediumtransfertechnik beim Bystander-Effekt der Glioblastom-Zelllinie TG98G *in vitro* nach einer Gammabestrahlung. Ihre Ergebnisse legen nahe, dass die Zellspezifität bei der Induktion des Bystander-Effektes und beim Empfang der sezernierten Signale nicht nur eine Zytokinfreisetzung, sondern ebenso die Rezeptorprofile von Zellen die Zellantwort modulieren. Interzelluläre Signale, die Produktion von Zytokinen und freien Radikalen sind Merkmale von Entzündungsreaktionen, welche das Potenzial haben, sowohl durch den Bystander-Effekt vermittelte als auch anhaltende Schäden zu verursachen (LORIMORE et al., 2003). Durch die Hochregulation von Genen in bestrahlten Zellen, die Sekretion parakriner Faktoren und die Induktion der Genexpression in umgebenden unbestrahlten Zellen kommt es zum Überleben der unbestrahlten Zellen, wodurch die sekundäre Tumorentstehung begünstigt wird (JABBARI et al., 2019).

Der strahleninduzierte Bystander-Effekt hat mehrere Facetten, sodass auch die Autophagie (HUANG et al., 2014) und der Zelltyp (HALL, 2003) eine Rolle spielen. Beobachtete Bystander-Effekte zeigten sich in der Zunahme oder Abnahme von schädigungsinduzierbaren und stressbedingten Proteinen, der Zunahme oder der Abnahme der reaktiven Sauerstoffspezies, dem Zelltod oder der Zellproliferation sowie der Induktion von Mutationen und Chromosomenaberrationen (LORIMORE et al., 2003). Dies führt insgesamt zu einer genomischen Instabilität (LORIMORE et al., 2001; LORIMORE et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2007).

In Experimenten zeigten sich die Beobachtungen vermehrt bei niedrigen Strahlendosen (MATSUMOTO et al., 2007) unter Nutzung von α -Partikeln (WIDEL et al., 2009), welche u. a. für Mutationen mitverantwortlich sein können (NAGASAWA et al., 2003). So fanden LORIMORE et al. beispielsweise 2001 heraus, dass der Bystander-Effekt zur Leukämogenese beitragen kann. Es zeigte sich, dass die durch den strahleninduzierten Bystander-Effekt (RIBE) erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Zellreaktion wichtige Auswirkungen auf die Beurteilung des Krebsrisikos nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen und auf die Wahrscheinlichkeit von Sekundärkrebs nach einer Strahlentherapie hat (SHAO et al., 2008). Ein Fortschreiten eines Tumors im Rahmen des Bystander-Effektes wird durch die Freisetzung seneszenzassoziierter sekretorischer Phänotypen (SASPs) gefördert (HUANG et al., 2014).

1.6. Zielstellung

Die Strahlentherapie, deren Wirkung in vielen Studien nachgewiesen wurde, ist neben der Chirurgie und der Chemotherapie die dritte große Säule in der Krebstherapie. Der sogenannte strahleninduzierte Bystander-Effekt ist bisher noch wenig untersucht. Bei dieser „Fernwirkung“ ionisierender Strahlung können durch bestrahlte Zellen Veränderungen in unbestrahlten Nachbarzellen verursacht werden. Ziel dieser Arbeit war es, den strahleninduzierten Bystander-Effekt anhand des Einflusses bestrahlter Endothelzellen auf Brustkrebszellen und deren Metastasierungsverhalten *in vitro* zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen standen dabei im Fokus:

- Können bestrahlte Endothelzellen das Wachstum der Tumorzellen verändern?
- Ist das Überleben der Brustkrebszellen durch bestrahlte Endothelzellen beeinflussbar?
- Wird die Migration der Tumorzellen durch bestrahlte Endothelzellen moduliert?
- Können bestrahlte Endothelzellen den Phänotyp (epithelial/mesenchymal) von Tumorzellen verändern und somit deren Metastasierungsverhalten beeinflussen?

Die Untersuchungen sollten anhand von humanen MCF7-Zellen als Vertreter der Brustkrebszellen durchgeführt werden. Als Endothelzellen sollte die Zelllinie EA.hy926 verwendet werden. Nach dem Transfer des Mediums der bestrahlten Endothelzellen auf die unbestrahlten Tumorzellen waren verschiedene Analysen der Tumorzellen geplant. So sollte das Wachstum mittels Wachstumskurven, das klonogene Überleben anhand des Koloniebildungstests, die Mobilität der Zellen via Migrationsassay und die epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) mittels Western Blot-Analyse untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Zellen

2.1.1. Brustkrebszellen - MCF7

Die verwendeten MCF7-Zellen mit der ATCC Nummer: HTB-22™ stammen aus der American Type Culture Collection. MCF7 ist eine humane Brustkrebszelllinie, deren Zellen 1970 aus einem Adenokarzinom-Brustgewebe isoliert wurden (D'ANSELMi et al., 2013). Diese Brustkrebszelllinie war die erste, die durch SOULE et al. 1973 kultiviert werden konnte. MCF7-Zellen (Abb.4) haben eine Größe zwischen 20 μm und 25 μm und eine Zellpopulationsverdopplungszeit von 30-40 Stunden.

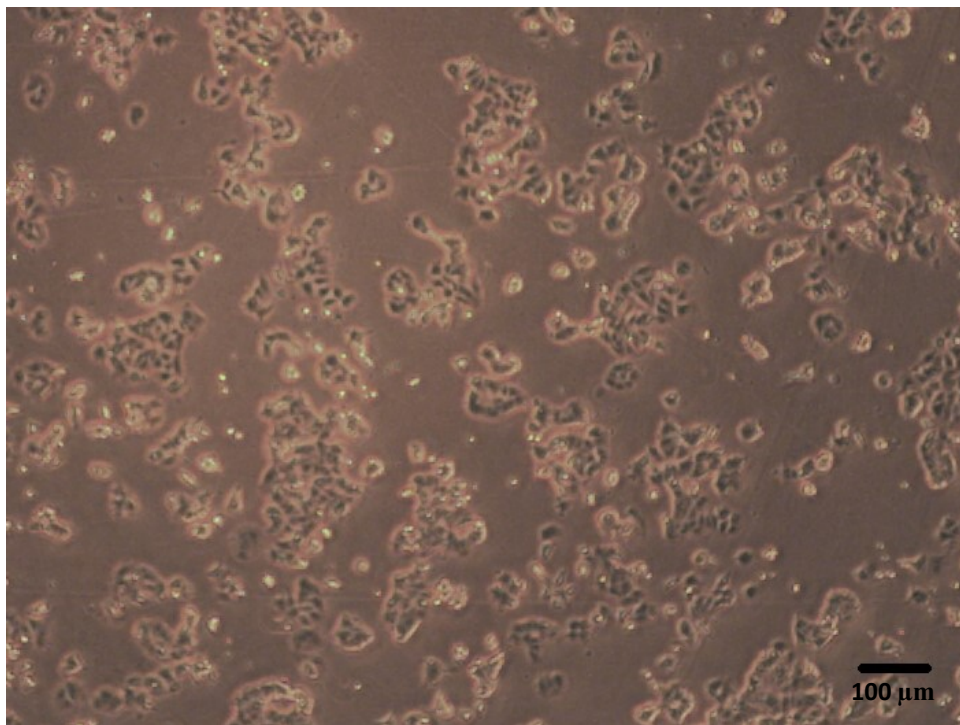


Abbildung 4: Mikroskopische Darstellung von MCF7-Zellen in 400-facher Vergrößerung

Das Wachstum der Brustkrebszellen wird neben Progesteron und Östrogen durch Plasmamembran-assoziierte Wachstumsfaktoren gesteuert (COMŞA et al., 2015). Gehemmt werden kann das Wachstum der MCF7-Zellen durch den Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α). Brustkrebszellen lassen sich u.a. durch die spezifische Rezeptorausstattung unterscheiden.

Die in dieser Arbeit verwendete Brustkrebszelllinie MCF7 ist Östrogen- und Progesteron-Rezeptor positiv sowie HER2 negativ. Diese Charakteristik bietet Angriffspunkte für Therapien. Außerdem weist sie Merkmale des differenzierten Brustepithels auf (D'ANSELMi et al., 2013). So sind die MCF7-Zellen positiv für Epithelmarker wie E-Cadherin und Cytokeratin 18 und negativ

für mesenchymale Marker wie Vimentin und α -Aktin der glatten Muskulatur (D'ANSELMi et al., 2013). Die Verwendung der MCF7 Zelllinie hat zudem zur Entdeckung der Anfälligkeit Östrogen-positiven Brustkrebs auf eine Antihormontherapie beigetragen (SWEENEY et al., 2012).

2.1.2. Endothelzellen - EA.hy926

Die verwendete Zelllinie EA.hy926 (Abb.5) mit der ATCC Nummer: CRL-2292™ stammt aus der American Type Culture Collection. Die EA.hy926 Zellen stellen transformierte Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene dar (AHN et al., 1995), welche durch Hybridisierung humaner Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) und der Epithelzelllinie A549 entstanden ist (THORNHILL et al., 1993). Sie ist demzufolge eine kontinuierlich replizierende Zelllinie, die aus humanem Endothel stammt (EDGELL et al., 1990).

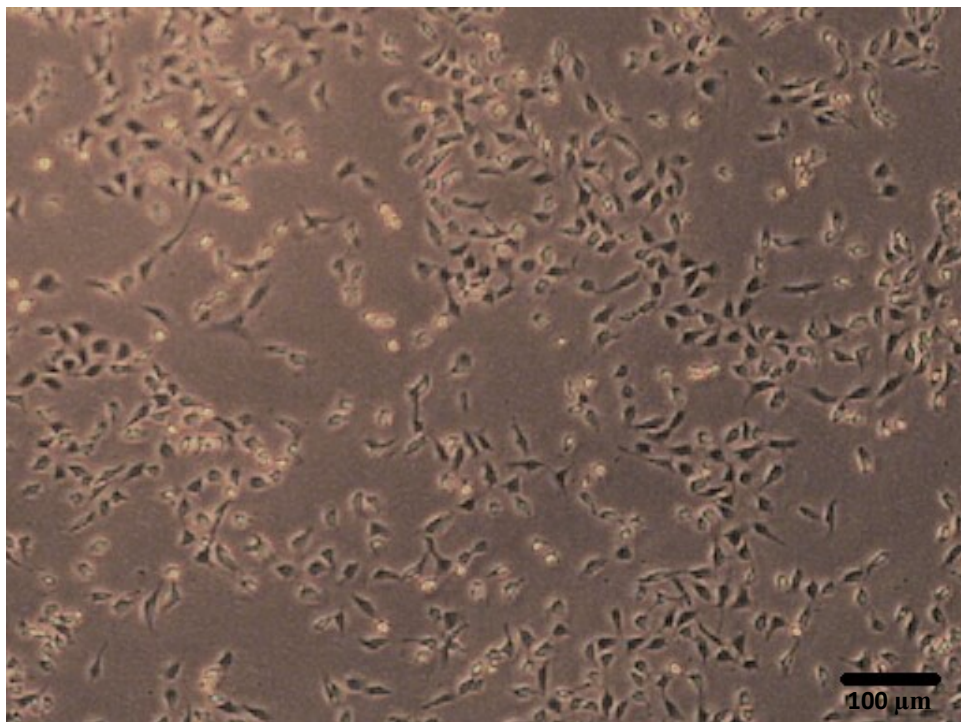


Abbildung 5: Mikroskopische Darstellung von EA.hy926-Zellen in 400-facher Vergrößerung

2.2. Ausfrieren von Zellen

Die kryokonservierten Zellen lagen in Kryomedium vor und wurden zunächst zum Auftauen ins 37°C warme Wasserbad gestellt. Im Anschluss wurde Kulturmedium in eine T₇₅-Zellkulturflasche vorgelegt und die aufgewärmten Zellen dazugegeben. Mit 1 ml Medium wurden die restlichen Zellen aus dem Gefäß gespült und in die T₇₅-Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3. Kultivierung der Zellen

Die MCF7-Zellen lagen in einer Nährlösung aus DMEM mit 10%igen FBS und 1%igen Penicillin/Streptomycin (P/S) vor. Zur optimalen Kultivierung wurde dieses Kulturmedium für die EA.hy926-Zellen um Natriumpyruvat (100 mM) erweitert. Die Inkubation erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5% CO₂ angereicherter Luft. Zur Verhinderung der Konfluenz wurden die Zellen im Abstand von drei bis vier Tagen gesplittet. Vor den Versuchen wurden die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt, um u.a. Verunreinigungen zu erkennen. Alle notwendigen Reagenzien wurden im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Zunächst wurden die Zellen mit 5 ml DPBS gewaschen und anschließend mit 0,05%igen Trypsin/EDTA versetzt. Nach der Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Ablösungsvorgang der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde der Vorgang gestoppt.

Nach Überführung in ein 50 ml Falcon Tube erfolgte eine Zentrifugation bei 20°C und 250 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte am Z2 Zellcounter der Firma Beckman Coulter GmbH. Dazu wurden 9.800 µl Isoton Lösung II und 200 µl der Zellsuspension in ein Coulter Gefäß pipettiert. Vom Gerät wurde eine Zellzahl pro Milliliter ermittelt. Nach einer Hochrechnung erfolgte die Aussaat der Zellen in T₇₅-Zellkulturflaschen.

2.4. Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte an einem Linearbeschleuniger des Typs Siemens ONCOR (Siemens AG, Erlangen, DE) mit einer Photonenenergie von 6 MeV und einer Dosisleistung von 3,7 Gy/min (Abb.6). Die applizierten Strahlendosen betrugen 0, 2, 4, 6 und 8 Gy.

Die Zellkulturflaschen wurden auf der Bestrahlungsplatte platziert (Abb.7) und mit der entsprechenden Dosis bestrahlt. Zum Beschleuniger wurden ebenfalls die Zellkulturflaschen der unbestrahlten Kontrollen mitgenommen.



Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Bestrahlung an einem Linearbeschleuniger

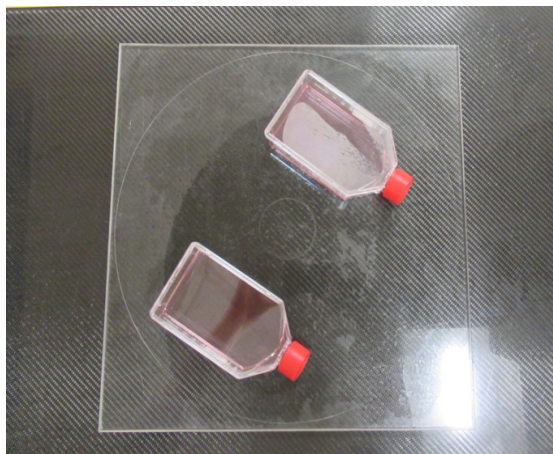


Abbildung 7: Platzierung der Zellkulturflaschen auf dem Bestrahlungstisch

2.5. Wachstum der Tumorzellen

2.5.1. Bestimmung der optimalen Einsaatdichte

Die Zellen wurden wie unter Kap. 2.3 beschrieben gesplittet. Danach wurden 5×10^3 Zellen/ml sowie 10×10^3 Zellen/ml pro Well in jeweils eine 24-Well-Platte eingesät. Es folgte die Inkubation bei 37°C und einem CO_2 Gehalt von 5%. An acht aufeinanderfolgenden Tagen wurden jeweils 3 Wells ausgezählt. Aus jedem Well wurde das Medium verworfen und anschließend 300 μl erwärmtes 0,25%iges Trypsin/EDTA pipettiert. Nach einer Inkubation wurden die Zellen durch mehrmaliges auf und ab pipettieren gelöst und 200 μl in ein Coulter Gefäß mit 9.800 μl Isoton Lösung II gegeben. Die Zellzählung erfolgte am Zellcounter. Es wurden Zellen zwischen 8 μm und 30 μm erfasst und die Zellzahl/ml vom Gerät ermittelt. Vor der Aussaat der Zellen wurde die Zellzahl pro ml auf 300 μl berechnet. Für die Untersuchung des Bystander-Effektes wurde mit einer Einsaatdichte 5×10^3 Zellen/ml gearbeitet.

2.5.2. Wachstumskurven der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt

Um den Bystander-Effekt der Endothelzellen auf das Wachstumsverhalten der MCF7-Zellen zu untersuchen wurde mit einer Einsaatdichte von 5×10^3 MCF7-Zellen/ml gearbeitet. Die Einsaat erfolgte 18 Stunden vor der Bestrahlung in einer 24-Wellplatte. Parallel dazu wurden 250×10^3 EA.hy926-Zellen im Endothelzell-Medium (EC-Medium) vorliegend in T₇₅-Zellkulturflaschen ausgesät. Dazu kamen weitere T₇₅-Zellkulturflaschen, in denen sich ausschließlich EC-Medium ohne Zellen befand. Am Folgetag wurden die EA.hy926-Zellen sowie das EC-Medium in den T₇₅-Zellkulturflaschen mit 0 Gy bzw. 8 Gy am Linearbeschleuniger, wie unter Kap. 2.4 beschrieben, bestrahlt. Sechs Stunden nach der Bestrahlung erfolgte bei den MCF7-Zellen ein vollständiger Wechsel des Mediums. Dazu wurde das MCF7-Medium komplett entfernt und durch 1 ml des jeweiligen EC-Mediums, EC-Medium aus der Inkubation von Endothelzellen (folgend „*konditioniertes EC-Medium*“ genannt) bzw. zellfreies EC-Medium (folgend „*EC-Medium*“ genannt) ersetzt. Die Zellzahlauszählungen wurden im Abstand von 24 Stunden, wie unter Kap. 2.5.1 beschrieben, durchgeführt.

2.6. Koloniebildung der Tumorzellen

Um das klonogene Überleben der Tumorzellen zu untersuchen wurde ein Koloniebildungstest mit den MCF7-Zellen durchgeführt. Die Einsaatdichte betrug 3×10^3 MCF7-Zellen/ml. Die Zellen wurden in T₂₅-Zellkulturflaschen pipettiert und mit MCF7-Medium auf 5 ml aufgefüllt. Die T₂₅-Zellkulturflaschen wurden in den Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gelegt. Nach 24 Stunden (Tag 1) wurden die MCF7-Zellen mit 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy, wie unter 2.4 beschrieben, als Duplikate bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die T₂₅-Zellkulturflaschen zurück in den Inkubator gelegt. An Tag 4 fand ein vollständiger Wechsel des Mediums statt. Hierfür wurde das MCF7-Medium durch neues MCF7-Medium ersetzt. An Tag 8 folgte die Färbung. Dazu wurde zunächst das MCF7-Medium aus allen T₂₅-Zellkulturflaschen verworfen und in jede T₂₅-Zellkulturflaschen zur Fixierung der MCF7-Zellen 3 ml 70%iges Ethanol gegeben. 20 min später wurde das Ethanol verworfen. Im Anschluss wurden 3 ml Kristallviolett zur Färbung der MCF7-Zellen in jede T₂₅-Zellkulturflasche gegeben. Nachdem der Färbeprozess beendet war, wurde das Kristallviolett verworfen und jede T₂₅-Zellkulturflasche dreimal mit kaltem Wasser gespült. Zur Trocknung bei Raumtemperatur wurden die T₂₅-Zellkulturflaschen mit der zellbenetzten Seite nach oben auf ein Tablett gelegt. Die Auszählung der Kolonien (≥ 50 Zellen im Verbund) erfolgte unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung.

2.6.1. Koloniebildung der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt

Um zu prüfen, ob bestrahlte Endothelzellen einen Einfluss auf das Überleben der MCF7-Zellen haben, wurde zusätzlich zu den T₂₅-Zellkulturflaschen mit dem 3×10^3 MCF7-Zellen/ml zur Durchführung des Koloniebildungstest 250×10^3 EA.hy926-Zellen in EC-Medium und zellfreies EC-Medium in T₇₅-Zellkulturflaschen angesetzt. Im Anschluss wurden alle Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Bestrahlung der EA.hy926-Zellen im EC-Medium sowie des zellfreien EC-Mediums erfolgte, wie unter Kap. 2.4 beschrieben, jeweils mit Bestrahlungsdosen von 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy am darauffolgenden Tag. Die MCF7-Zellen wurden nicht bestrahlt. Sechs Stunden nach Bestrahlung wurde das MCF7-Medium der MCF7-Zellen verworfen und durch 5 ml des jeweiligen Mediums (konditioniertes EC-Medium/EC-Medium) ersetzt. Daraufhin folgte die weitere Durchführung des Koloniebildungstests wie unter Kap. 2.6 beschrieben.

2.7. Migrationsvermögen der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt

Mit diesem Test wurde das Migrationsvermögen der MCF7-Zellen untersucht. Dazu wurden 250×10^3 EA.hy926-Zellen vorliegend im EC-Medium in T₇₅-Zellkulturflaschen ausgesät sowie zellfreies EC-Medium in weitere T₇₅-Zellkulturflaschen pipettiert. Diese Zellkulturflaschen wurden im Anschluss bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach zwei Tagen wurde die Bestrahlung, wie unter 2.4 beschrieben, mit 0 Gy bzw. 8 Gy durchgeführt. Fünf Stunden nach der Bestrahlung wurden jeweils 500 µl einer Zellsuspension mit 100×10^3 MCF7-Zellen/ml in serumfreies MCF7-Medium ins Innere eines Inserts, welche in mehrere 24-Wellplatten gehängt wurden, ausgesät (Abb. 8). Anschließend wurden die Wellplatten bei 37°C und 5% CO₂ für eine Stunde in den Inkubator gelegt. Danach wurden jeweils 750 µl des konditionierten EC-Mediums, des EC-Mediums bzw. des serumhaltigen MCF7-Mediums in die jeweiligen Wells der Mikrotiterplatten pipettiert. Im Anschluss wurden diese zurück in den Inkubator gestellt. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde das Medium aus den Wells und den Inserts vollständig abgesaugt. Danach wurde der Zellrasen aus dem Inneren jedes Inserts mit Hilfe von 400 µl vorgewärmtem serumfreien MCF7-Medium durch Auf- und Abziehen des Mediums und leichtes Schaben auf der Membran gelöst und in ein Becherglas verworfen. Zusätzlich wurde das Innere jedes Inserts mit einem Wattestäbchen ausgewischt. Die Inserts wurden zurück in die Wells gehängt. In jedem Well wurden 400 µl vorgewärmtes serumfreies MCF7-Medium pipettiert und bei Dunkelheit mit

jeweils 50 μ l wasserlöslichem Tetrazolium-1 (WST-1) versetzt. Anschließend wurde die Wellplatte zurück in den Inkubator gestellt. Nach zwei Stunden Inkubation wurde die Messung bei Dunkelheit am ELISA-reader durchgeführt. Es wurde eine Wellenlänge von 420-480 nm und eine Referenzwellenlänge von 600 nm eingestellt. Zur Messung am ELISA-reader wurden alle Inserts entfernt.

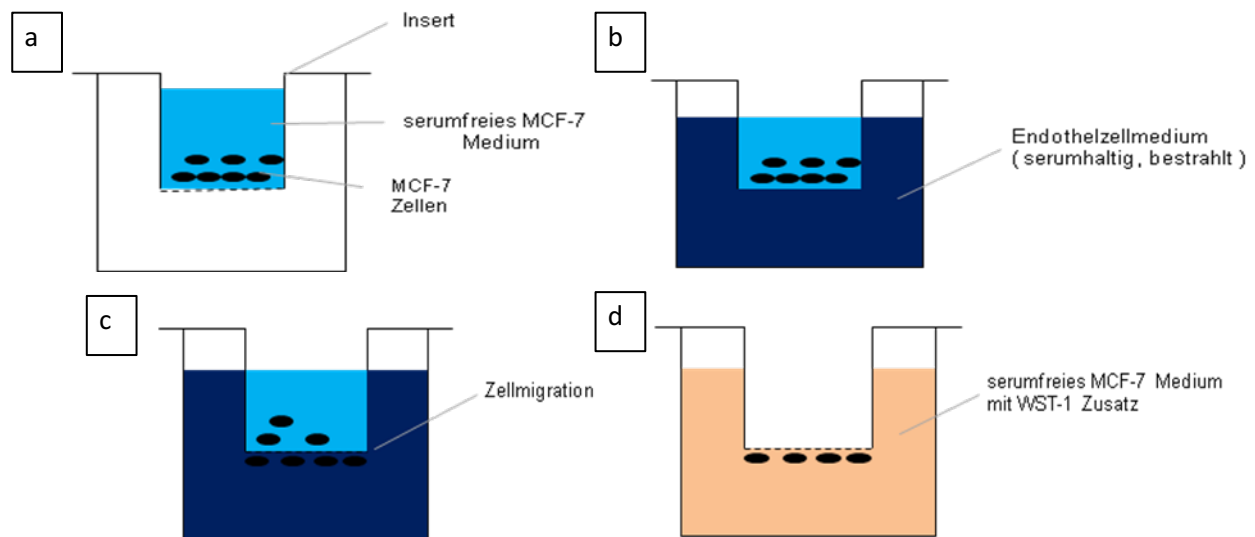


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Migrationsvermögens
a) MCF7-Zellen in serumfreiem MCF7-Medium im Insert hängend in ein Well der Wellplatte b) Zugabe von Medium zuvor bestrahlter Endothelzellen (konditioniertem EC-Medium) bzw. EC-Medium bzw. serumhaltigem MCF7-Medium in das Well c) Prozess der Zellwanderung d) Entfernung der Inserttinneren und Ersatz des Mediums im Well durch serumfreies MCF7-Medium mit WST-1-Zusatz

2.8. Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der Tumorzellen

Die Testung der epithelial-mesenchymalen Transition, kurz EMT, der Tumorzellen wurde mittels eines Western Blots durchgeführt. Zur Überprüfung des epithelial-mesenchymalen Übergangs wurde die Expression der Proteine Vimentin, β -Catenin und Smooth Muscle Actin (SM-Actin) untersucht.

2.8.1. Probenvorbereitung

Es wurde jeweils 1×10^6 EA.hy926-Zellen/ml im EC-Medium vorliegend in acht T₇₅-Zellkulturflaschen ausgesät und in acht weitere T₇₅-Zellkulturflaschen jeweils 15 ml EC-Medium pipettiert. Die T₇₅-Zellkulturflaschen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in den Inkubator gelegt. Am darauffolgenden Tag wurden 20 T₇₅-Zellkulturflaschen mit jeweils 1×10^6 MCF7-Zellen/ml pro Flasche angesetzt. Vor der Inkubation wurden die MCF7-Zellen je Zellkulturflasche mit 5 ng/ml TGF- β versetzt, da bekannt ist, dass TGF- β den Übergang vom epithelialem zum mesenchymalem Typ anregen kann. Einen Tag später erfolgte die Bestrahlung der EA.hy926-

Zellen im EC-Medium und des zellfreien EC-Mediums mit 0 Gy bzw. 8 Gy am Linearbeschleuniger. Danach wurden die T₇₅-Zellkulturflaschen zurück in den Inkubator gelegt. Sechs Stunden nach der Bestrahlung erfolgte ein vollständiger Wechsel des Mediums. Dazu wurde das MCF7-Medium aus allen T₇₅-Zellkulturflaschen, in denen die MCF7-Zellen ausgesät wurden, verworfen und durch konditioniertes EC-Medium, EC-Medium bzw. MCF7-Medium ersetzt. Anschließend wurden die MCF7-Zellen weiter inkubiert. Nach 24 und 48 Stunden erfolgte die Herstellung des Lysats.

2.8.2. Lysatherstellung

Das Medium wurde aus zwei zusammengehörigen T₇₅-Zellkulturflaschen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die MCF7-Zellen wurden mit 5 ml 4°C kaltem PBS gespült und ebenfalls in das Falcon-Röhrchen überführt. Danach wurden erneut 5 ml 4°C kaltes PBS zugefügt und die MCF7-Zellen abgeschabt. Die abgeschabten MCF7-Zellen wurden auch in das Falcon-Röhrchen gegeben. Dieser Vorgang wurde ein Mal wiederholt. Im Anschluss wurde erneut mit 5 ml 4°C kaltem PBS gespült und die restlichen MCF7-Zellen in das Falcon-Röhrchen überführt. Nun wurde die Suspension bei 4°C für 10 min bei 206 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 200 µl Lysispuffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss fand eine Homogenisierung statt. Dazu wurden die Proteine mit Hilfe eines Dispergiergerätes für drei Minuten bei mittlerer Stufe im 2 ml Reaktionsgefäß zerkleinert. Das Dispergierwerkzeug wurde anschließend mit 70%igem Ethanol und Aqua dest. gespült und das entstandene Homogenisat bei 1°C für 10 min bei 18.626 x g zentrifugiert. Der Überstand, das sogenannte Lysat, wurde nach der Zentrifugation in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Von diesem wurden 20 µl in ein separates 1,5 ml Reaktionsgefäß zur Proteinbestimmung pipettiert. Die beiden Reaktionsgefäße wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Dieser Vorgang wurde für alle zusammengehörigen T₇₅-Zellkulturflaschen sowie für den weiteren Analysezeitpunkt nach 48 Stunden wiederholt.

2.8.3. Proteinbestimmung

Eine Stunde vor Beginn der Proteinbestimmung wurde die Bradford-Lösung zur Erwärmung auf Raumtemperatur aus dem Kühlschrank genommen. Der 2 mg/ml BSA-Proteinstandard wurde zur Erstellung einer Eichkurve mit destilliertem Wasser so verdünnt, dass Endkonzentrationen von 0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1.000 µg/ml, 1.500 µg/ml sowie 2.000 µg/ml BSA vorlagen. Vor der Entnahme des Volumens zum weiteren Verdünnungen erfolgte die Homogenisierung mit einem Laborrüttler.

Nach der Vorbereitung der Proben für die Eichkurve wurden die Proben zur Proteinbestimmung aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen. Nun wurden jeweils 5 µl von der BSA-Verdünnung bzw. Probelösung in einem Well, einer 96-Well-Mikrotiterplatte, vorgelegt. Dieses erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Die Reaktionsgefäße wurden zuvor gevortext. Anschließend wurde mit einer Multipipette 250 µl Bradford-Lösung (2 mg/ml) je Well dazugegeben. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte in den ELISA-Reader gestellt und geschüttelt. Als Wellenlänge wurde 620 nm (ohne Referenzwellenlänge) eingestellt. Im Anschluss wurde jeweils eine Standardkurve für die Proben nach 24 und 48 Stunden in Abhängigkeit zur Konzentration in µg/ml erstellt. Anhand dieser Standardkurve wurden die Konzentrationen der Proben bestimmt.

2.8.4. Weiterverarbeitung des Lysats

Das hergestellte Lysat wurde aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen. Zusätzlich wurde das Mercaptoethanol unter dem Abzug, wo alle weiteren Arbeitsschritte durchgeführt wurden, auf Raumtemperatur erwärmt. Nach der Herstellung eines Laemmli Puffer-Mercaptoethanol-Gemisches, aus 950 µl Laemmli Puffer und 50 µl Mercaptoethanol, wurden 50 µl jeder Probe mit 50 µl des Laemmli Puffer-Mercaptoethanol-Gemisches versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden in den Thermomixer Comfort platziert und für fünf Minuten bei 98°C zur Proteindenaturierung erwärmt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße zur Druckreduktion kurz geöffnet und danach bei -20°C gelagert.

2.8.5. Gele gießen

Im ersten Schritt wurde pro Gel je eine ebene Glasplatte und eine Glasplatte mit Abstandshalter mit Ethanol gereinigt und getrocknet. Die Glasplatten wurden daraufhin in einer Befestigungsklammer fixiert. Dabei wurde beachtet, dass sich der Abstandshalter zwischen den Glasplatten befindet und die Glasplatten am unteren Rand gerade abschließen. Nun wurden die Glasplatten in den Gelgießstand, auf dessen Boden sich Dichtungsschwämme befanden, geklemmt. Dabei wurde beachtet, dass die kurze ebene Glasplatte nach vorne zeigt.

Zur Herstellung des Trenngels wurde zunächst Ammoniumperoxodisulfat (APS) für die Herstellung von 12%igen APS abgewogen und entsprechend der abgewogenen Menge in Aqua dest. gelöst. Für die Herstellung des Trenngels unter dem Abzug wurden 3 ml Resolver A, 3 ml Resolver B, 30 µl 12%iges APS und 4 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) je Gel in ein 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert, vermischt und zügig mit einer 1000 µl Pipette zwischen die

Glasplatten bis zur maximalen Füllhöhe, die zuvor mit Hilfe des Gelkamms ermittelt wurde, pipettiert. Zur Beschwerung und Entgasung wurde das Trenngel mit 70%igem Isopropanol überschichtet. Im Anschluss erfolgte eine 20-minütige Auspolymerisierung. Diese wurde mit Hilfe eines Restes des Trenngels im Falcon-Röhrchen überprüft. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das 70%ige Isopropanol vollständig abgegossen.

Zur Herstellung des Sammelgels unter dem Abzug wurden 1 ml Stacker A, 1 ml Stacker B, 10 µl 12%iges APS und 3 µl TEMED je Gel in ein 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert, vermischt und zügig mit einer 1000 µl Pipette auf das Trenngel pipettiert. Der Gelkamm wurde hineingesteckt. Es folgte eine Auspolymerisierung für 30 Minuten. Nachdem diese ebenfalls mit einem Rest des Sammelgels im Falcon-Röhrchen geprüft wurde, wurde das Gel aus dem Gelgießstand entfernt. Das Gel, welches sich zwischen den Glasplatten und im Befestigungshalter befand, wurde in feuchte Tücher gewickelt, in einem Ziplock-Beutel verpackt und im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung am nächsten Tag gelagert.

2.8.6. Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Puffers wurden 70 ml 10 x Tris/Glycine/SDS Puffer mit 630 ml Aqua dest. gemischt. Im Anschluss wurden die Gele aus dem Kühlschrank entnommen und aus den feuchten Tüchern gewickelt. Die Gele wurden vorsichtig in die Halterung der Apparatur eingespannt. Dabei war zu beachten, dass die kürzere Glasplatte nach innen zeigte und die Gele plan mit den Glasplatten abschlossen. Der hergestellte Puffer wurde bis zum oberen Rand der Gele in die innere Kammer, zwischen die Gele, gegossen. Mit dem restlichen Puffer wurde die Gelelektrophoresekammer bis zum 2-Gele-Strich gefüllt. Der Gelkamm wurde vorsichtig nach oben aus dem Gel gezogen. Es wurde überprüft, ob die Gele gut eingespannt und die Geltaschen intakt sind. Die vorbereiteten Proben wurden auf Raumtemperatur erwärmt und gemischt. Nach einem zuvor überlegten Schema wurde in jeweils eine Tasche eine definierte Menge einer Probe mit speziellen Pipettenspitzen pipettiert. Diese Menge ergab sich aus der Proteinbestimmung, sodass je Probe 5 µg Protein enthalten waren. In jeweils eine Geltasche pro Gel wurde der Marker, von dem 8 µl pipettiert wurden, platziert. Neben dem Marker wurde auf jedem Gel eine interne Kontrolle mitgeführt. Daraufhin wurde die Gelelektrophoresekammer mit einem Deckel verschlossen und die Kabel entsprechend angeschlossen. Eine Stromzufuhr von 200 V bei 40 mA wurde eingestellt. Nach 40 Minuten wurde kontrolliert, wie weit die Proben gewandert sind. Bei vollständiger Wanderung wurde die Stromzufuhr abgeschaltet und die Gele aus der Elektrophorese-Apparatur entnommen.

2.8.7. Blotten

Für die Herstellung des Blotpuffers wurden 200 ml 5 x Trans Puffer, 600 ml Aqua bidest. und 200 ml absoluter Alkohol miteinander vermischt. Dieser Blotpuffer wurde in kleine Plastikwannen gegossen und darin eine Nitrocellulose-Membran und das Filterpapier (2 Stapel pro Gel) für 2-3 Minuten äquilibriert. Für den Blotvorgang wurde das Trans-Blot® Turbo Transfer System verwendet und vor Gebrauch mit Aqua dest. gereinigt. Daraufhin wurde je Kassette zunächst ein Stapel Filterpapier gelegt. Auf das Filterpapier wurde vorsichtig und plan die Nitrocellulose-Membran gelegt. Auf die Nitrocellulose-Membran folgte das Gel, welches zuvor vorsichtig aus der Befestigungsklammer und von den Glasplatten entfernt wurde. Der Blotaufbau wurde mit einem weiteren Stapel Filterpapier abgeschlossen. Zur Vermeidung von Luftblasen wurde mit einem Roller vorsichtig über den Blotaufbau gerollt. Die Kassette wurde verschlossen und in das Trans-Blot® Turbo Transfer System geschoben. Der Blotvorgang wurde mit Hilfe des Programms Mixed MW für 7 Minuten durchgeführt. Danach wurde die Kassette entnommen, geöffnet und die Nitrocellulose-Membran aus dem Blotaufbau genommen. Diese wurde für 5 Minuten in eine Glasschale mit Ponceau-S zur Überprüfung des Blotvorgangs gelegt. Die Glasschale befand sich währenddessen auf einem Schüttler.

2.8.8. Antikörperbehandlung

Die folgenden Angaben beziehen sich auf eine Nitrocellulose-Membran. Nach Überprüfung des Blotvorgangs wurden die weiteren Schritte in der Glasschale durchgeführt und diese während der Inkubationszeiten auf den Schüttler gestellt. Zunächst wurde das Ponceau-S verworfen und die Nitrocellulose-Membran zweimal für je 5 Minuten mit Aqua dest. entfärbt. Daraufhin folgten mehrere Waschvorgänge. Dazu wurde das Aqua dest. abgegossen und die Nitrocellulose-Membran dreimal für je 5 Minuten mit Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) übergossen. Das TBS wurde zuvor aus 50 ml 10 x TBS und 450 ml Aqua dest. hergestellt. Zwischen den Waschschritten wurde das TBS immer wieder erneuert. Im Anschluss wurde die Nitrocellulose-Membran nach Entfernung der TBS Lösung für eine Stunde in handwarmer Blockierlösung getränkt. Für die Herstellung der 3%igen Blockierlösung wurden 1,5 g Magermilchpulver abgewogen und in 50 ml TBS mittels Magnetührstab gelöst und kurzzeitig erhitzt. Nun wurde die Nitrocellulose-Membran, nachdem die Blockierlösung verworfen wurde, dreimal für jeweils 15 Minuten mit Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 (TTBS) gewaschen. Das TTBS wurde durch Mischen von 50 ml 10 x TBS, 450 ml Aqua dest. und 500 µl Polysorbat 20 (Tween-20) hergestellt. Die Lösung wurde für einige Minuten mit Hilfe eines Magnetührers gemischt. Im

Anschluss wurde eine 1%ige Antikörperlösung hergestellt. Dafür wurden 0,1 g Magermilchpulver in 10 ml TTBS mittels Magnetrührer gelöst und kurz erwärmt. Zu 4 ml dieser Antikörperlösung wurden 16 µl vom Western-Blot-Cocktail des epithelial-mesenchymalen Übergangs in einem 50 ml Falcon-Röhrchen zur Herstellung der primären Antikörperlösung pipettiert. Bevor die Nitrocellulose-Membran mit dieser primären Antikörperlösung benetzt für eine Stunde auf dem Schüttler gestellt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert wurde, wurde das TTBS verworfen. Am nächsten Tag wurde die primäre Antikörperlösung verworfen und die Nitrocellulose-Membran erneut dreimal für je 15 Minuten in TTBS gewaschen. Im Anschluss wurde das TTBS abgekippt und die Nitrocellulose-Membran für eine Stunde mit der sekundären Antikörperlösung benetzt. Zur Herstellung der sekundären Antikörperlösung wurden 4 ml der am Vortag hergestellten 1%igen Antikörperlösung mit 1,6 µl des Sekundärantikörpers in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gemischt. Nach einstündiger Inkubation wurde die sekundäre Antikörperlösung abgegossen und die Nitrocellulose-Membran erneut dreimal für je 15 Minuten mit TTBS gewaschen.

2.8.9. Entwicklung der Nitrocellulose-Membran

Für die Entwicklung der Nitrocellulose-Membran wurde der Li-cor Scanner vorbereitet. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran aus der Glasschale genommen, vorsichtig abgeschüttelt und in eine Wanne gelegt. Nachdem 800 µl stabile Peroxidlösung und 800 µl Luminol Verstärkerlösung in Dunkelheit gemischt und auf die Nitrocellulose-Membran pipettiert wurde, wurde die Wanne mit einem Deckel für eine fünfminütige Inkubation abgedeckt. In dieser Zeit wurden die Glasfläche des Li-cor Scanners und eine Folie, welche im weiteren Verlauf zur Beschwerung auf die Nitrocellulose-Membran gelegt wurde, mit Ethanol gereinigt. Nach Ablauf der fünfminütigen Inkubation wurde die Nitrocellulose-Membran in einem definierten Bereich auf die gereinigte Glasfläche des Li-cor Scanners, mit dem Bild nach unten zeigend, gelegt und mit der Folie beschwert. Der Deckel des Li-cor Scanners wurde geschlossen und die Nitrocellulose-Membran mit hoher Sensitivität gescannt. Die Auswertung wurde mit der Image Studio Software realisiert.

2.9. Statistik

Für die statistische Berechnung wurde nach Prüfung der Normalverteilung der Student's *t*-Test herangezogen. Die Abweichung vom Kontrollwert wurde mit Hilfe des zweiseitigen Zweistichproben *t*-Tests für die Auswertung des Wachstumsverhaltens, der Koloniebildung, der Migration und der epithelial-mesenchymalen Transition errechnet. Zum Vergleich der anderen Zahlenreihen der genannten Versuche wurde der Zweistichproben *t*-Test bei abhängigen Stichproben unter der

Annahme einer gleichen Varianz angewandt. Die Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ gewertet. Unterstützt wurde das Verfahren durch das Computerprogramm Microsoft Excel 2007.

2.10. Geräte und Materialien

Geräte	Hersteller, Ort
Phasenkontrast Mikroskop Eclipse TE300	Nikon GmbH, Düsseldorf
4er Objektiv (Plan Fluor 4x0.13 Ph1DL)	Nikon GmbH, Düsseldorf
10er Objektiv (Plan Fluor 10x0.3 Ph1DL)	Nikon GmbH, Düsseldorf
Sicherheitswerkbank HERASafeKSP	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Laborzentrifuge Hettich Rotina 420 R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Coulter Counter Z2	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen
Kühlschrank Cup 3011	Liebherr GmbH, Biberach an der Riß
Eppendorf Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipette Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
Wasserbad	LAUDA-GFL GmbH, Burgwedel
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
ELISA-Reader anthos zenyth 340r	anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld
Linearbeschleuniger VersaHD	Elekta GmbH, Hamburg
Laborzentrifuge Hettich Mikro 200R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Dispergiergerät T10 basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Dispergierwerkzeug	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Biomedical Freezer	SANYO Electric Co. Ltd., Osaka (Japan)
Casy Cell Counter	Omnilife Science GmbH & Co. KG, Bremen
Wecker	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Taschenrechner MS-100	CASIO Europe GmbH, Norderstedt
ZIEGRA Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen
VARIOMAG Electronicrührer Monotherm	H+P Labortechnik GmbH, München
Waage Sartorius BL 600/Mini	Sartorius AG, Göttingen
Feinwaage Sartorius Entris	Sartorius AG, Göttingen
C-DiGit Western Blot Scanner	Li-cor Biosciences, Lincoln (U.S.)
Multichannel Eppendorf xplorer 15 – 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Genie 2 T	Scientific Industries, Inc., Bohemia (U.S.)
pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt

Mini Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)
Power Pac 300 Elepho	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)
Trans-Blot® Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)

Zellkulturmedium

Dulbecco's Modified Eagle Medium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Fetal Bovine Serum	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Natriumpyruvat	Life Technologies, Carlsbad (U.S.)

Kultivierung/Zellzahlbestimmung

Handschuhe PEHA-Soft-nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Phospat buffered Saline	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA (0,05%;0,25%)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Isoton I Lösung	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Reinstwasser System Clear	SG-Wasseraufbereitung & Regenerierstation GmbH, Hamburg
Becherglas	SIMAX Bohemia Cristal Handelsgesellschaft mbH, Selb
Kryoröhrchen	VWR International GmbH, Darmstadt
Serologische Pipette (10 ml bzw. 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Falcon-Röhrchen (15 ml bzw. 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Coulter Gefäße	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zellkulturflaschen (T ₂₅ bzw. T ₇₅)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
24-Wellplatten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen

Zellfärbung

Ethanol (70%), vergällt	Zentralapotheke, Universitätsklinikum Rostock
Kristallviolett-Lösung (1%)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Migrationsvermögen

Insert	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Wattestäbchen	Groupe Lemoine, Boulogne-Billancourt (FR)

EMT-Bestimmung

Multichannel Eppendorf xplorer 15 – 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Messzylinder	BRAND GmbH & CO. KG, Wertheim
Laborgewindeflasche	Schott AG, Mainz
Cell Scraper	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
RIPA Lysis Buffer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte/ Waltham
Eppendorf Reaktionsgefäße 2 ml/ 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Mini Protean System Glass Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)
Fast Cast Acrylamid Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)
TGX Fast Cast Acrylamid Kit 10 %	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)
2-Propanol 70 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)
Sodium Crystal Chlorid	Avantor Inc., Allentown (U.S.)
TRIS (hydroxymethyl)-aminomethane	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
APS (Ammonium Persulfate)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
5 x Transfer Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)
Pipetten for loading Gels 1 - 200 µl	VWR International LLC, Radnor (U.S.)
10 x Tris/Glycine/SDS Buffer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules (U.S.)
Ethanol 96 %	Zentralapotheke, Universitätsklinikum Rostock
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Tween®20 (Polysorbat 20)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Western-Blot-Cocktail des epithelial-mesenchymal Übergangs	Abcam plc., Cambridge (U.K.)
Ponceau-S solution	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
WesternSure® Pre-stained	Li-cor Biosciences, Lincoln (U.S.)
Chemilumineszenz Protein Ladder	

WesternSure® Premium Chemilumineszenzsubstrat	Li-cor Biosciences, Lincoln (U.S.)
Mini Protean Short Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Trans-Blot® Turbo Mini-size Transfer Stacks	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)
Trans-Blot® Turbo Mini-size nitrocellulose	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (U.S.)

3. Ergebnisse

3.1. Wachstum der Tumorzellen

Wachstumskurven werden in der Regel in vier Phasen eingeteilt (Abb. 9). Die Zellen gewöhnen sich zunächst in der Latenzphase (Lag-Phase) an die Umgebung. Daraufhin vermehren sie sich exponentiell in der exponentiellen Phase (Log-Phase). In der stationären Phase nimmt die Vermehrung stark ab, ist aber noch größer als die Absterberate. Diese überwiegt in der letzten Phase einer Wachstumskurve, der sogenannten Absterbephase.

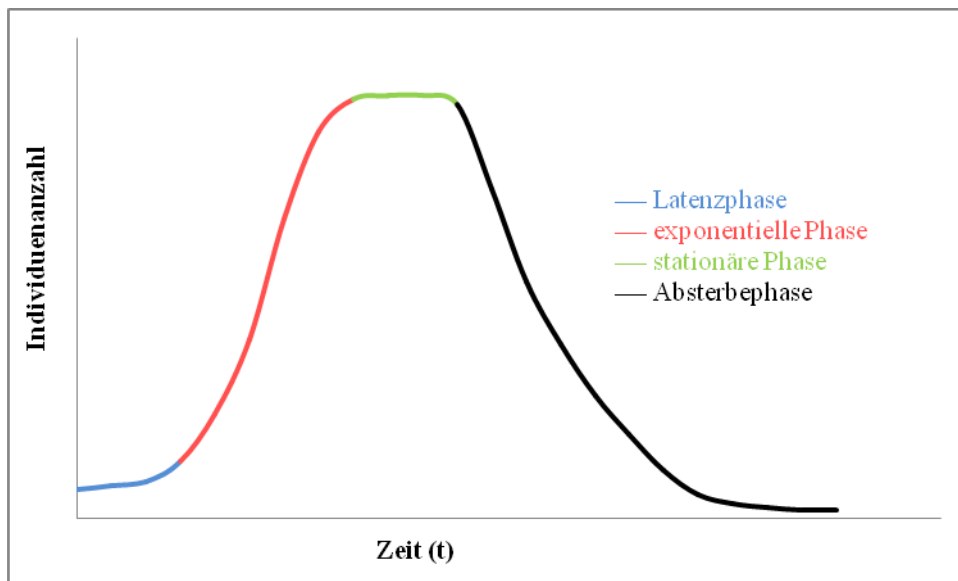


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Wachstumskurve

Zur Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit der MCF7-Zellen wurden native Wachstumskurven über einen Zeitraum von acht Tagen erstellt (Kap.3.1.1.). Zunächst wurde eine optimale Einsaatdichte von 5×10^3 MCF7-Zellen/ml ermittelt und im Anschluss mit dieser der Einfluss des Bystander-Effektes durch Zugabe verschiedener Medien untersucht (Kap.3.1.2.).

3.1.1. Wachstum der Tumorzellen – nativ

Es wurde das Wachstum der Tumorzellen für die Einsaatdichten von 5×10^3 Zellen/ml und 10×10^3 Zellen/ml über einen Zeitraum von acht Tagen verglichen (Abb.10).

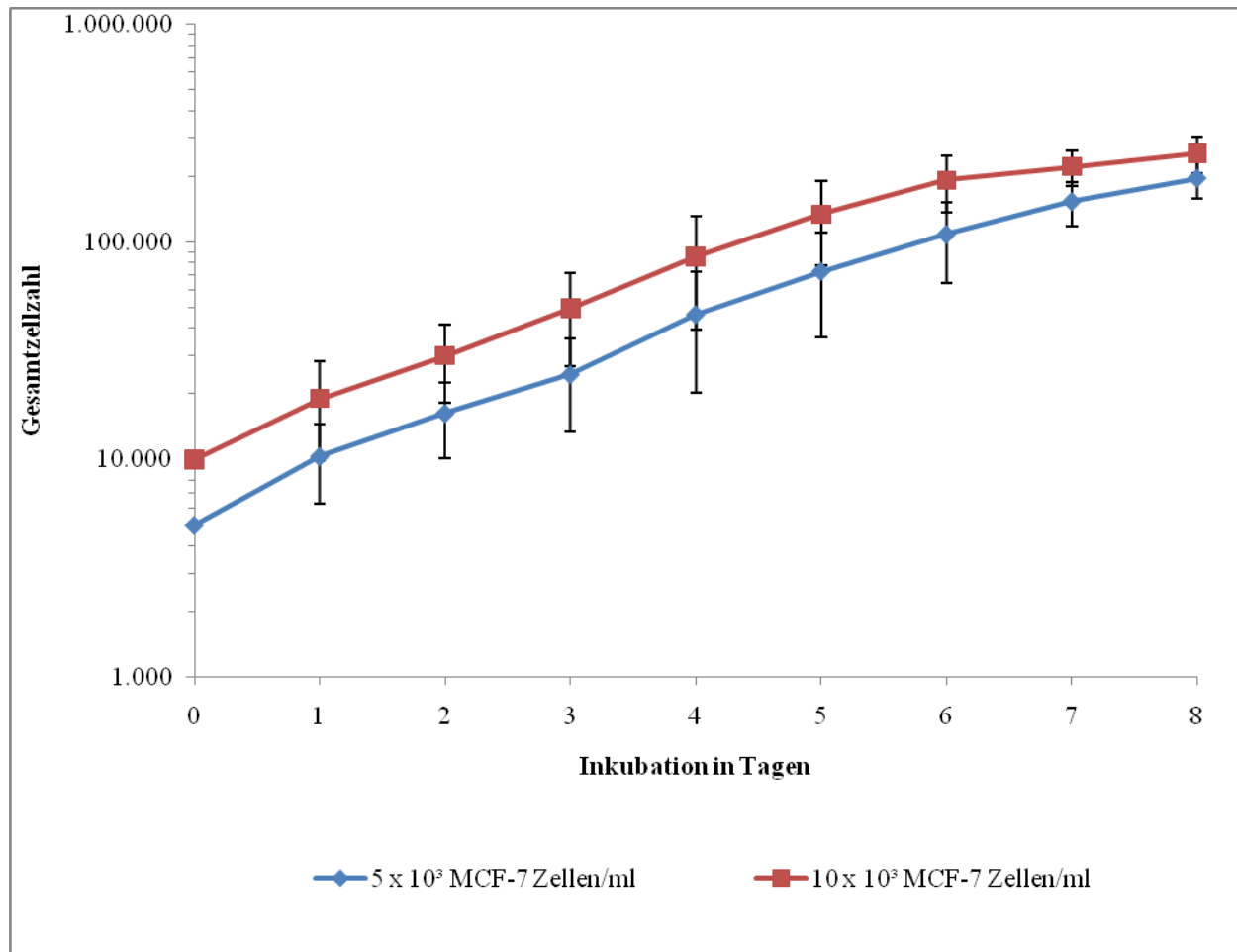


Abbildung 10: Wachstum der MCF7-Zellen bei unterschiedlicher Einsaatdichte
Darstellung beinhaltet MW $\pm$ SD aus n=5

Es war zu erkennen, dass die Wachstumskurven sich bis zum sechsten Tag annähernd parallel verhielten. Am siebten Tag begann bei der Einsaatdichte von 10×10^3 Zellen/ml die stationäre Phase, wohingegen die Wachstumskurve der Einsaatdichte 5×10^3 Zellen/ml sich noch in der exponentiellen Phase befand. Für beide Einsaatdichten ergab sich eine Zellpopulationsverdopplungszeit von 32 Stunden. Für die Überprüfung des Bystander-Effektes wurde die Einsaatdichte von 5×10^3 Zellen/ml gewählt.

3.1.2. Wachstum der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt

Es wurde das Wachstumsverhalten von MCF7-Zellen in einer Einsaatdichte von 5×10^3 Zellen/ml in unterschiedlichen Medien verglichen (Abb.11). Die MCF7-Zellen im MCF7-Medium wurden nicht bestrahlt. Die EA.hy926-Zellen, welche im EC-Medium kultiviert wurden, sowie zellfreies EC-Medium wurden mit 0 Gy bzw. 8 Gy bestrahlt. Sechs Stunden nach der

Bestrahlung wurde am ersten Tag der Wachstumskurve der Tumorzellen das MCF7-Medium vollständig durch konditioniertes EC-Medium bzw. EC-Medium ersetzt.

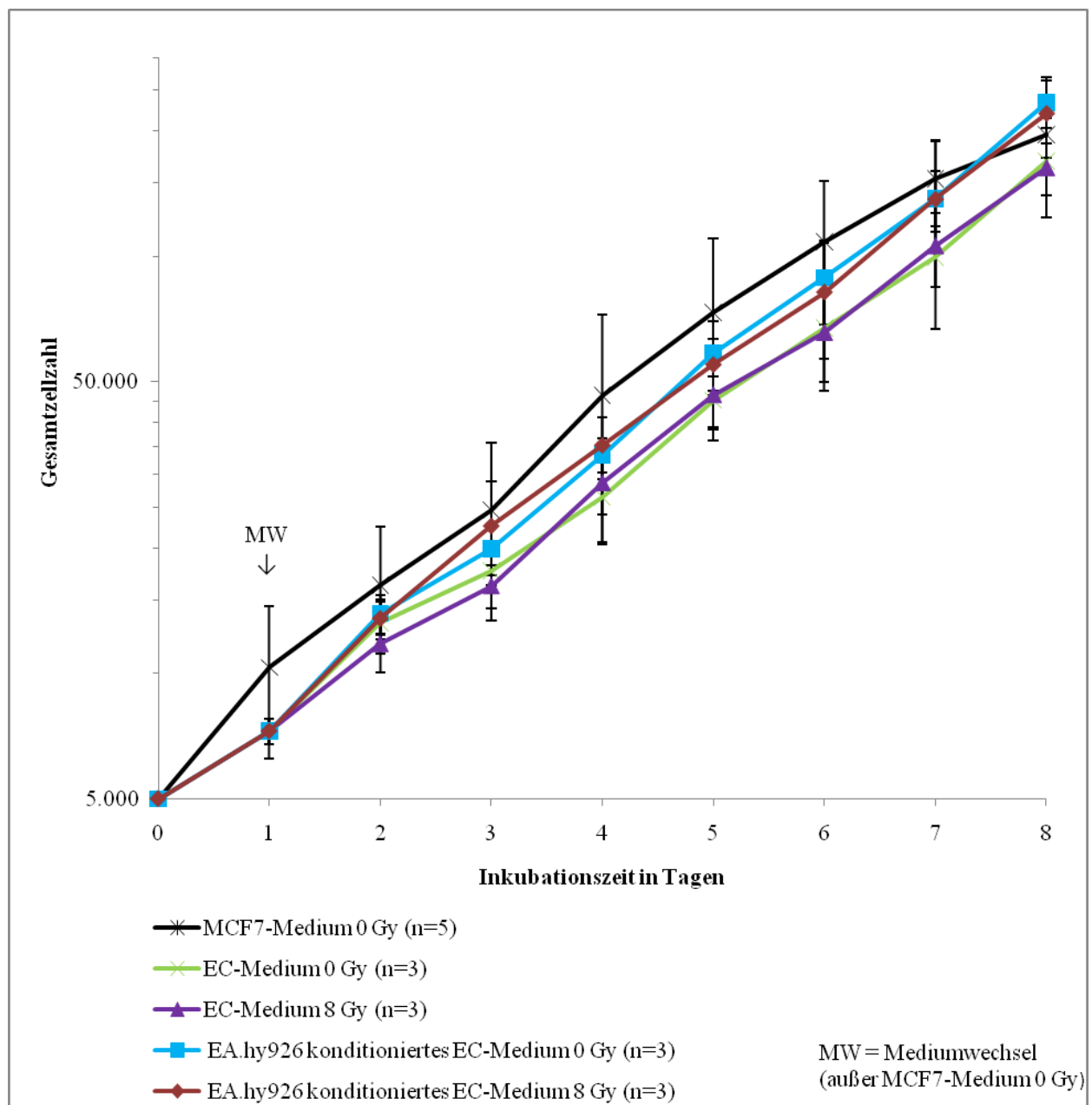


Abbildung 11: Wachstum unbestrahlter MCF7-Zellen in verschiedenen Medien (MCF7-Medium 0 Gy; bestrahltes/unbestrahltes konditioniertes EC-Medium sowie bestrahltes/unbestrahltes EC-Medium); Darstellung beinhaltet MW $\pm$ SD aus mind. n=3

In der Abbildung 11 zeigte sich, dass das Wachstum der Tumorzellen im MCF7-Medium bis zum siebten Tag oberhalb der Vergleichs-Wachstumskurven lag. Bei den Wachstumskurven der Tumorzellen im konditioniertem EC-Medium ließ sich zwischen 0 Gy und 8 Gy kein wesentlicher Unterschied erkennen. Das war ebenso für das Wachstum der Tumorzellen im EC-Medium (0 Gy/8 Gy) zu beobachten. Allerdings lagen die Wachstumskurven mit dem konditionierten EC-Medium konstant oberhalb der Wachstumskurven mit dem EC-Medium und ab dem achten Tag ebenfalls oberhalb der Referenzwachstumskurve. Damit wurde deutlich, dass

die Tumorzellen im konditionierten EC-Medium besser wuchsen als im EC-Medium. Die Endothelzellen hatten somit scheinbar einen indirekt positiven Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen. Die ermittelten Zellpopulationsverdopplungszeiten für die Tumorzellen im konditionierten EC-Medium betrug etwa 35 Stunden und für die Tumorzellen im EC-Medium betrug sie etwa 37,5 Stunden. Demzufolge ergab sich im Vergleich zur Kontrolle mit einer Zellpopulationsverdopplungszeit von etwa 32 Stunden für alle Wachstumskurven eine Verlängerung der Zellpopulationsverdopplungszeit. Bei Betrachtung der einzelnen Tage ergaben sich im Vergleich zur Kontrolle sowie im Vergleich zwischen den MCF7-Zellen im EC-Medium und den MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium keine statistischen Signifikanzen.

3.2. Koloniebildung der Tumorzellen

Der Koloniebildungstest ist ein Maß für die intrinsische Strahlenwirkung. Mit dieser Methode wurde das Zellüberleben nach der Bestrahlung gemessen und somit indirekt der klonogene Zelltod bestimmt. Nach der Bestrahlung und einer entsprechenden Inkubationszeit wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen ausgezählt, die Plattiereffizienz (PE) und die Überlebensfraktion (SF) ermittelt und eine entsprechende Überlebenskurve in Abhängigkeit zur Bestrahlungsdosis erstellt. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellt.

3.2.1. Koloniebildung der Tumorzellen – nativ

Es wurde die Überlebensrate der MCF7-Zellen in Abhängigkeit zur Bestrahlungsdosis mit Hilfe des Koloniebildungstests ermittelt (Abb.12).

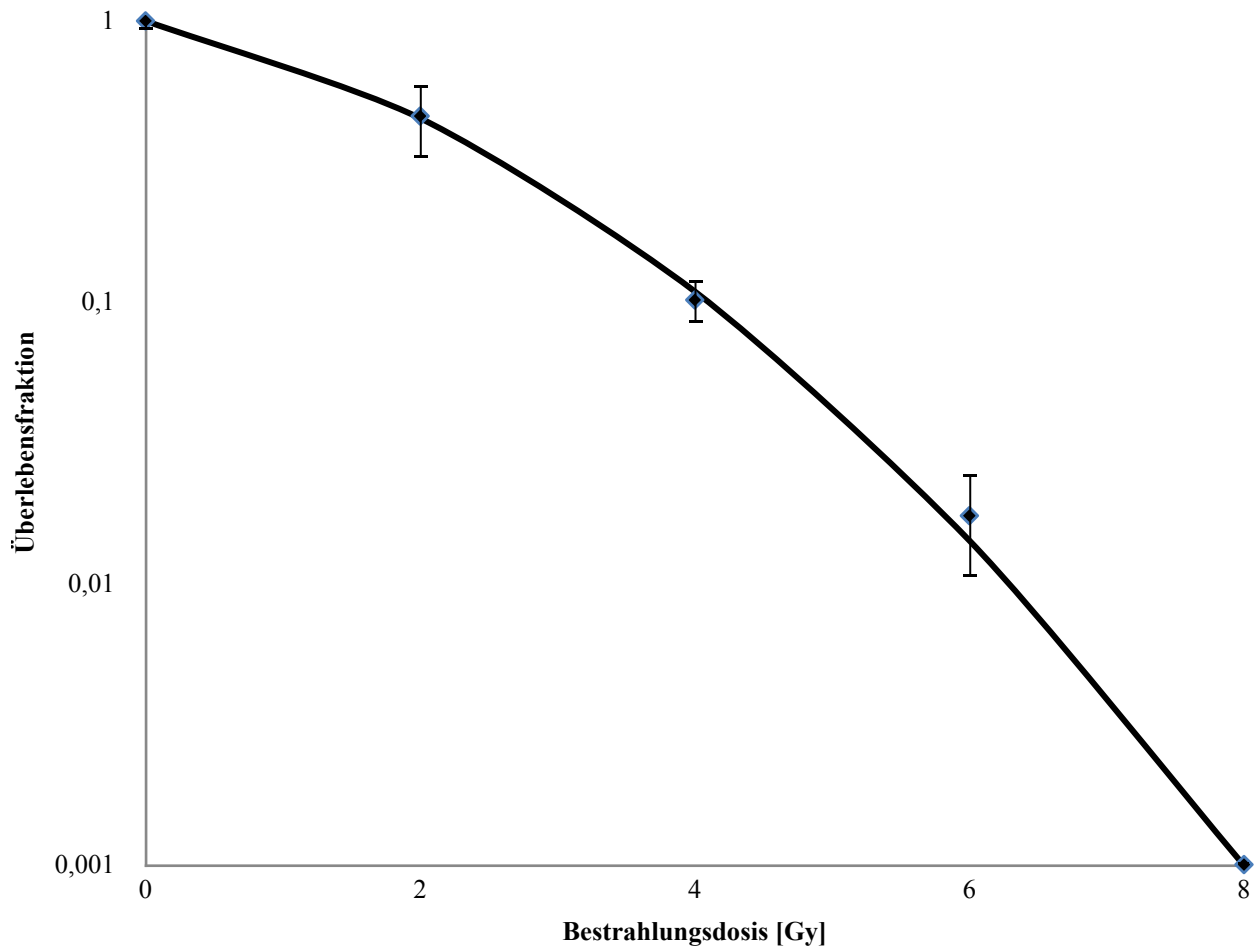


Abbildung 12: Überleben der MCF7-Zellen (Einsaatdichte 3×10^3 Zellen/ml)
Darstellung beinhaltet MW $\pm$ SD aus n=3

Es zeigte sich, dass die Überlebensrate der MCF7-Zellen mit steigenden Bestrahlungsdosen kontinuierlich und ab einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy exponentiell abnahm. So betrug das klonogene Überleben bei 2 Gy 0,458%, bei 4 Gy 0,108% und bei 6 Gy 0,017%. Für eine Bestrahlungsdosis von 8 Gy ergab sich eine Überlebensrate von 0,001%.

3.2.2. Koloniebildung der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt

Es wurde die intrinsische Strahlenwirkung auf unbestrahlte MCF7-Zellen in unterschiedlichen Medien untersucht (Abb.13). Dabei wurde Medium aus unbestrahlten bzw. bestrahlten konditioniertem EC-Medium sowie unbestrahltes bzw. bestrahltes EC-Medium genutzt.

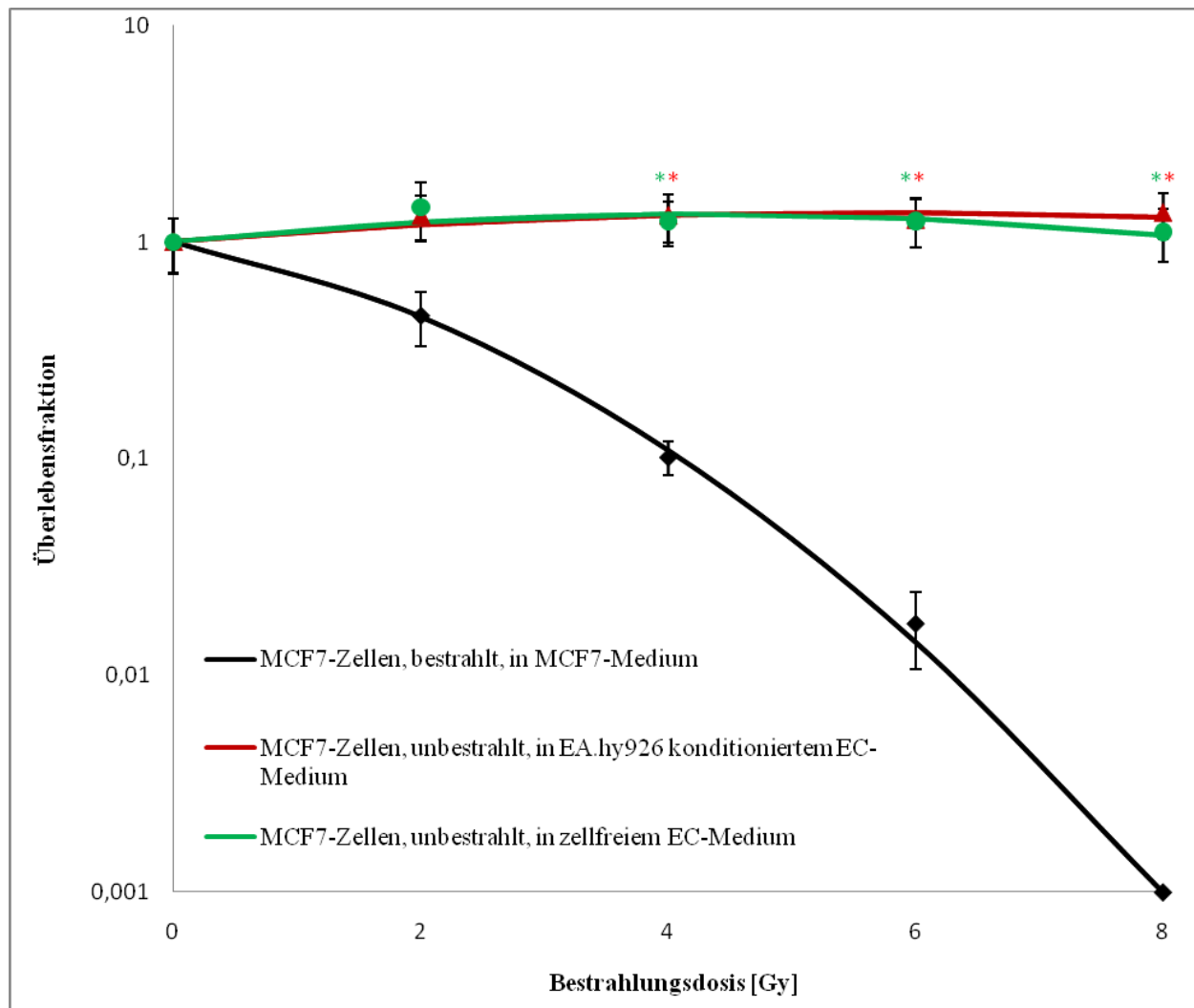


Abbildung 13: Überleben der MCF7-Zellen (Einsaatdichte 3×10^3 Zellen/ml) in verschiedenen Medien (MCF7-Medium, unbestrahltes/bestrahltes konditioniertes EC-Medium sowie unbestrahltes/bestrahltes EC-Medium); Darstellung beinhaltet MW $\pm$ SD aus $n=3$, $*=p<0,05$ bezogen auf die MCF7-Zellen, bestrahlt, im MCF7-Medium

Als Referenz wurde die Überlebenskurve der bestrahlten MCF7-Zellen gewählt. Es zeigte sich für die unbestrahlten MCF7-Zellen sowohl im konditionierten EC-Medium als auch im EC-Medium keine Verringerung des Überlebens bei steigender Bestrahlungsdosis. Ab einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy war der Unterschied zu den bestrahlten MCF7-Zellen für beide Kurven signifikant. Die Überlebensraten der MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium sowie im EC-Medium verhielten sich bis zu einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy nahezu identisch. Bei dieser Bestrahlungsdosis zeigte sich eine leichte Abnahme der Überlebensrate für die MCF7-Zellen im EC-Medium, die jedoch nicht signifikant war. Die Plattiereffizienz beider Überlebenskurven war bis zur Bestrahlungsdosis von 6 Gy ebenso mit einem Unterschiedsmaximum von 0,011 bei 4 Gy nahezu identisch. Für das klonogene Überleben der MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium im Vergleich der MCF7-Zellen im EC-Medium zeigten sich entsprechend keine signifikanten Unterschiede.

3.3. Migrationsvermögen der Tumorzellen

Mit diesem Test wurde der Einfluss der Endothelzellen auf die Mobilität der MCF7-Zellen untersucht.

3.3.1. Bestimmung der Einsaatdichte

Um das Migrationsvermögen der Tumorzellen zu analysieren, wurde zunächst die optimale Einsaatdichte bestimmt. Es wurden die Einsaatdichten 75×10^3 MCF7-Zellen/ml und 100×10^3 MCF7-Zellen/ml je Insert nach 24 und 48 Stunden miteinander verglichen. Bezogen auf die Zeit von 24 und 48 Stunden ergab sich eine größere Konstanz des Migrationsverhaltens der MCF7-Zellen bei höherer Einsaatdichte. Die weiteren Versuche wurden deshalb mit der Einsaatdichte 100×10^3 MCF7-Zellen/ml je Insert durchgeführt.

3.3.2. Migrationsvermögen der Tumorzellen unter Einfluss von Endothelzellen – Bystander-Effekt

Es wurde das Migrationsvermögen von MCF7-Zellen in unterschiedlichen Medien mit der Einsaatdichte 100×10^3 MCF7-Zellen/ml nach 24 und 48 Stunden untersucht (Abb.14). Die MCF7-Zellen wurden nicht bestrahlt.

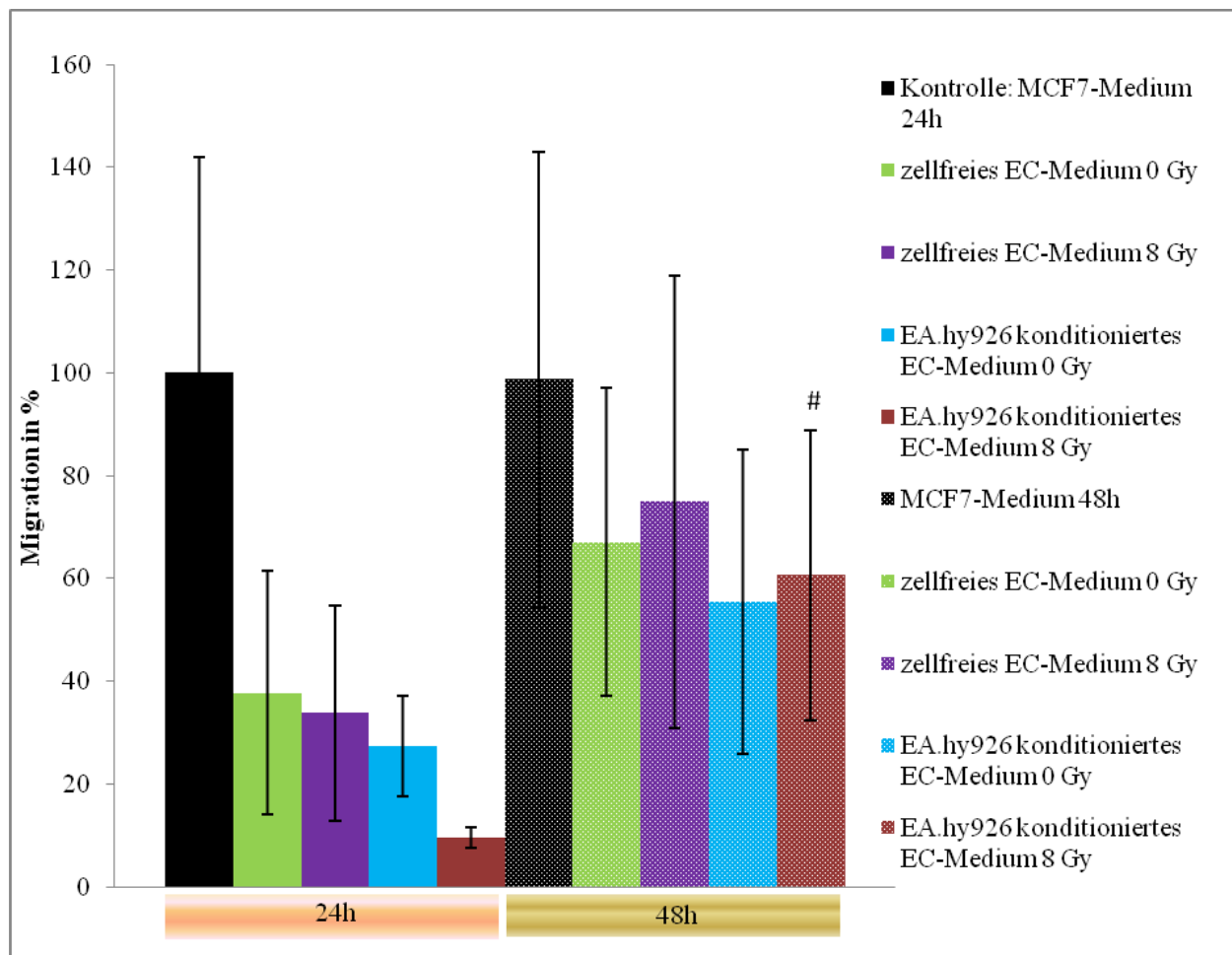


Abbildung 14: Migrationsvermögen unbestrahlter MCF7-Zellen in verschiedenen Medien normiert auf die Kontrolle (MCF7-Medium 24 h bzw. 48 h = 100 %); Darstellung beinhaltet MW $\pm$ SD aus n=3; #= $p < 0,05$ bezogen auf den Ansatz im selben Medium zum 24 h-Zeitpunkt

Im Vergleich zu den Tumorzellen im MCF7-Medium war die Migration der Tumorzellen in allen anderen Medien geringer. Nach 48 Stunden waren mehr Zellen als nach 24 Stunden migriert. Für die MCF7-Zellen im bestrahlten konditionierten EC-Medium ergaben sich signifikante Unterschiede über die Zeit. Außerdem zeigte sich, dass das Migrationsvermögen der Tumorzellen im konditionierten EC-Medium stets geringer als im EC-Medium war. Somit wurde die Migration der Tumorzellen durch den Einfluss der Endothelzellen gehemmt. Dieser Unterschied war aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht signifikant. Insgesamt zeigte sich eine verringerte Migration der MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium im Vergleich zur

Migration der MCF7-Zellen im EC-Medium von durchschnittlich 33,9 %, einem Maximum von 71,8 % (24 Stunden nach Bestrahlung) und einem Minimum von 17,4 % (48 Stunden ohne Bestrahlung). Zudem konnte beobachtet werden, dass im Bezug zur Bestrahlungsdosis von 24 Stunden nach 48 Stunden ein Wechsel im Migrationsvermögen der MCF7-Zellen unabhängig vom Medium stattfand. Nach 24 Stunden war das Migrationsvermögen der MCF7-Zellen bei Einfluss von unbestrahltem Bystander-Medium größer als das des bestrahlten. Nach 48 Stunden zeigte sich, dass das Migrationsvermögen der MCF7-Zellen nach Bestrahlung der Endothelzellen oberhalb des Migrationsvermögens der Zellen ohne Einfluss von Bestrahlung lag. So lagen die Migrationen der Tumorzellen beispielsweise im konditionierten EC-Medium nach 24 Stunden bei 27 % (0 Gy) und 10 % (8 Gy), hingegen nach 48 Stunden bei 56 % (0 Gy) und 61 % (8 Gy).

3.4. Epithelial-mesenchymale Transition der Tumorzellen

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der Tumorzellen wurde mit einem Western Blot überprüft. Es wurde eine Proteinleiter zur Detektion von Proteinen der Größe 8 – 260 kDa eingesetzt. Diese diente zur Abbildung der verschiedenen Proteine des epithelialen und mesenchymalen Phänotyps. Mit diesem Versuch wurde untersucht, ob die Zellen ihre Oberflächenproteine ändern und durch den Einfluss von Endothelzellen sowie Bestrahlung von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp übergehen. Diese Veränderung benötigen die Zellen für eine Metastasierung.

3.4.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung war notwendig, um in der Western Blot Analyse eine definierte Proteinkonzentration für die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die erhaltenen Bradford-Standardkurven zur Proteinbestimmung der Proben nach 24 bzw. 48 Stunden sind in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt.

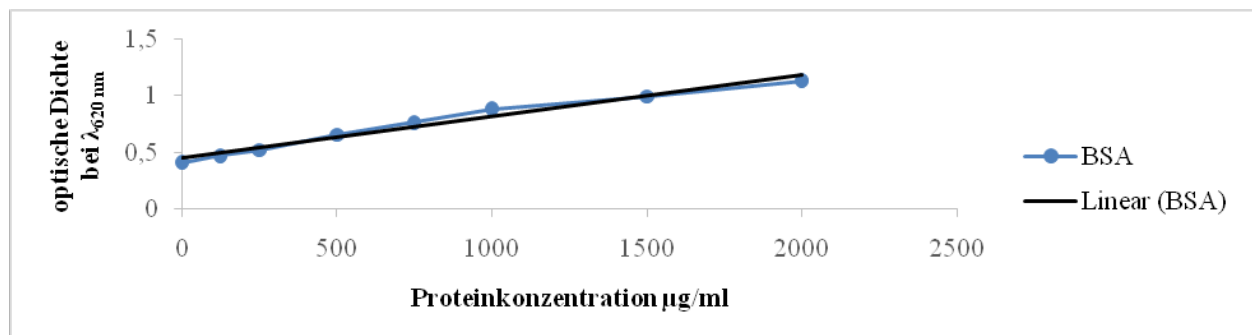


Abbildung 15: Bradford-Proteinstandardkurve (BSA) als Referenz zur Proteinbestimmung der Proben nach 24 Stunden

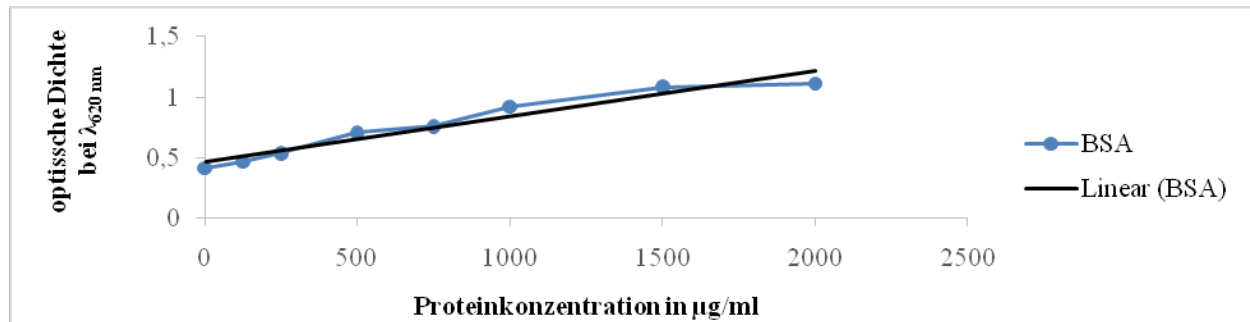


Abbildung 16: Bradford-Proteinstandardkurve (BSA) als Referenz zur Proteinbestimmung der Proben nach 48 Stunden

Die ermittelten Bradford-Proteinstandardkurven (BSA) verliefen nahezu linear und wurden daher zur Berechnung der jeweiligen Probenmenge zum Erhalt einer definierten Proteinkonzentration der Proben herangezogen.

3.4.2. Western Blot Analyse

Nach der Entwicklung der Nitrocellulose-Membran zeigte sich für die MCF7-Zellen ein bestimmtes Bandenmuster, welches beispielhaft in Abbildung 17 dargestellt ist. Die unbestrahlten MCF7-Zellen wurden mit bestrahlten/unbestrahlten konditionierten EC-Medium und bestrahlten/unbestrahlten EC-Medium versetzt.

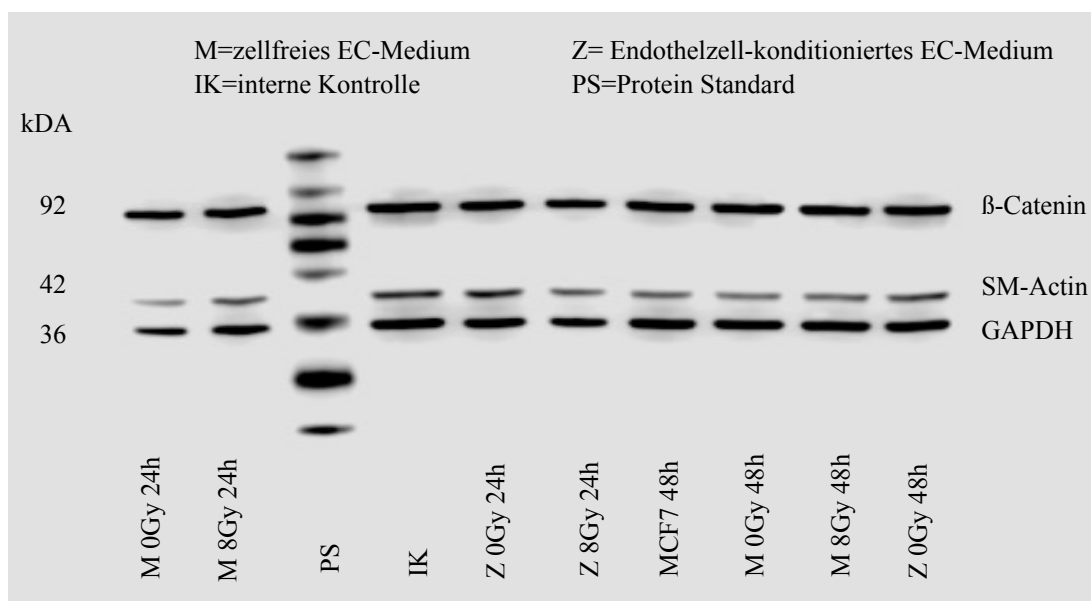


Abbildung 17: Beispiel einer Proteinexpression von β -Catenin, Smooth Muscle Actin (SM-Actin) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der MCF7-Zellen unter Einfluss von bestrahlten/unbestrahlten EC-Medium bzw. konditionierten EC-Medium. Der Protein Standard Western Sure® Pre-stained Chemiluminescent Protein Ladder befindet sich auf Position 3.

Die Banden wurden mit Hilfe des Standards Western Sure® Pre-stained Chemiluminescent Protein Ladder, welcher Proteingrößen von 8 - 260 kDa abbildet, identifiziert. Die Intensitäten von β -Catenin und SM-Actin wurden durch die Intensität des Housekeeping Gens GAPDH

normalisiert. Mit diesen Werten erfolgte die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung in Bezug auf die interne Kontrolle, die auf jeder Nitrocellulose-Membran mitgeführt wurde. Die Ergebnisse für β -Catenin (Abb.18) und SM-Actin (Abb.19) wurden jeweils für die Zeit nach 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung dargestellt.

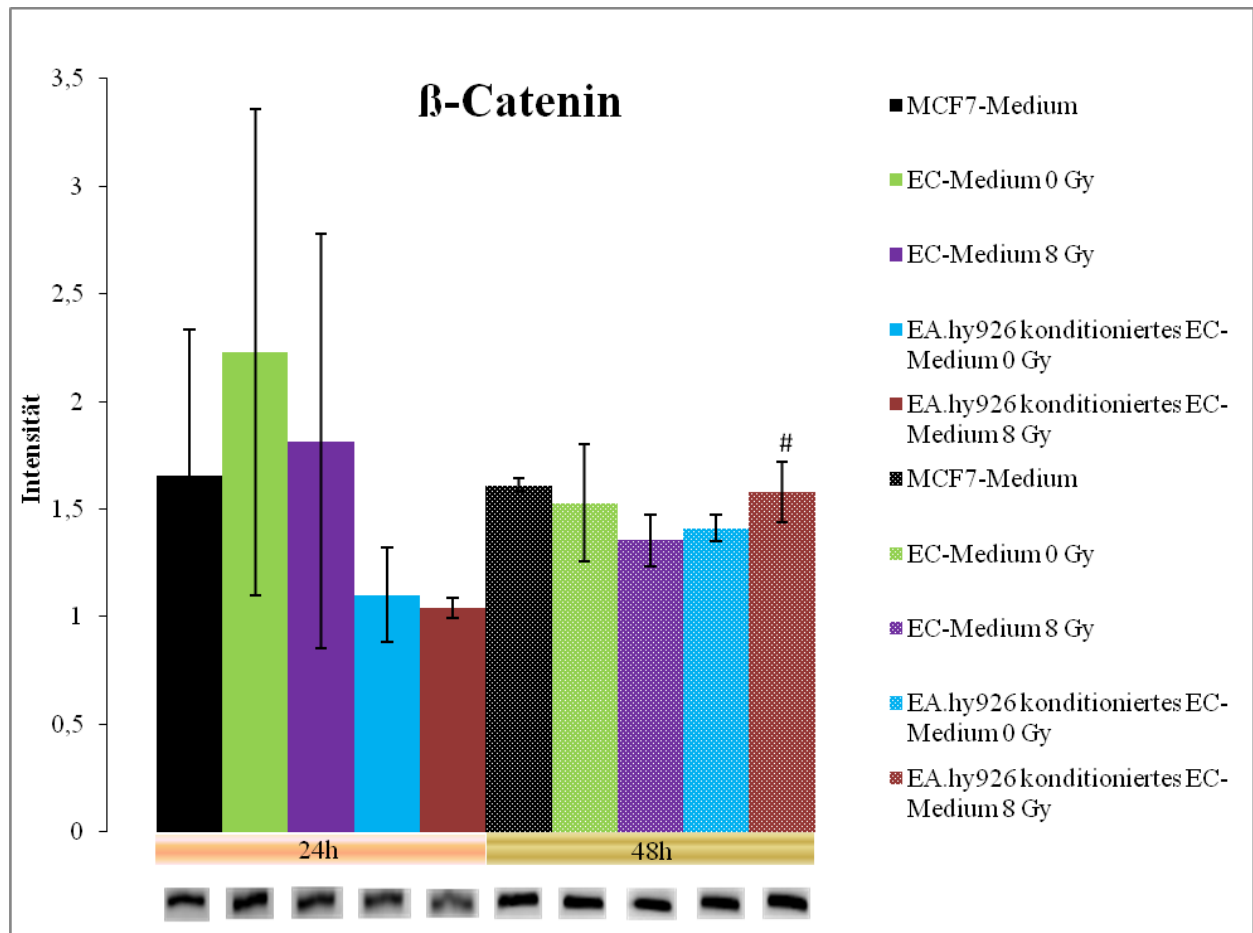


Abbildung 18: Intensität der Proteinexpression von β -Catenin in MCF7-Zellen inkubiert in unterschiedlichen Medien; Darstellung beinhaltet MW + SD aus n=3, #= $p < 0,05$ bezogen auf den Ansatz im selben Medium zum 24 h-Zeitpunkt

Abbildung 18 zeigt die Intensität der Proteinexpression von β -Catenin in MCF7-Zellen 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung. Es zeigte sich eine nahezu identische Expression des β -Catenins bei Vorliegen der MCF7-Zellen im MCF7-Medium für die untersuchten Zeitpunkte. Für die MCF7-Zellen stellte sich sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden eine stärkere Expression im unbestrahlten EC-Medium im Vergleich zum bestrahlten EC-Medium dar. Diese Konstanz konnte für die MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium nicht festgestellt werden. Hier zeigte sich nach 24 Stunden eine höhere Expression von β -Catenin im unbestrahlten konditionierten EC-Medium im Vergleich zum bestrahlten konditionierten EC-Medium. Nach 48 Stunden konnte eine höhere Expression der MCF7-Zellen im bestrahlten konditionierten EC-Medium im Vergleich zum unbestrahlten verzeichnet werden. Zusammenfassend zeigte sich,

dass Endothelzellen die Proteinexpression von β -Catenin in den Tumorzellen beeinflussen. So lag zum 24h-Zeitpunkt die Intensität beispielsweise bei 1,10 (konditioniertes EC-Medium, 0 Gy) im Vergleich zu 2,22 (EC-Medium, 0 Gy). Damit wurde durch den Einfluss der Endothelzellen zum untersuchten Zeitpunkt die Expression des β -Catenins um etwa 50 % gesenkt. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch eine Abnahme der Expression für die bestrahlten Medien beobachtet werden. Nach 48 Stunden zeigten sich für Tumorzellen in den unbestrahlten Medien nahezu gleiche Intensitäten (konditioniertes EC-Medium, 0 Gy: 1,41; EC-Medium, 0 Gy: 1,52). Für die Tumorzellen in den bestrahlten Medien zeigte sich eine Steigerung der Expression des β -Catenins um etwa 17 % (konditioniertes EC-Medium, 8 Gy: 1,58; EC-Medium, 8 Gy: 1,35). Bei Vergleich der beiden beobachteten Zeitpunkte ergab sich eine maximale und signifikante Steigerung der Proteinexpression um etwa 58 % für die Tumorzellen im konditionierten EC-Medium nach Bestrahlung (24 h: 1,0; 48 h: 1,58).

Neben der Expression des β -Catenin wurde die Expression des SM-Actin (Abb.19) untersucht.

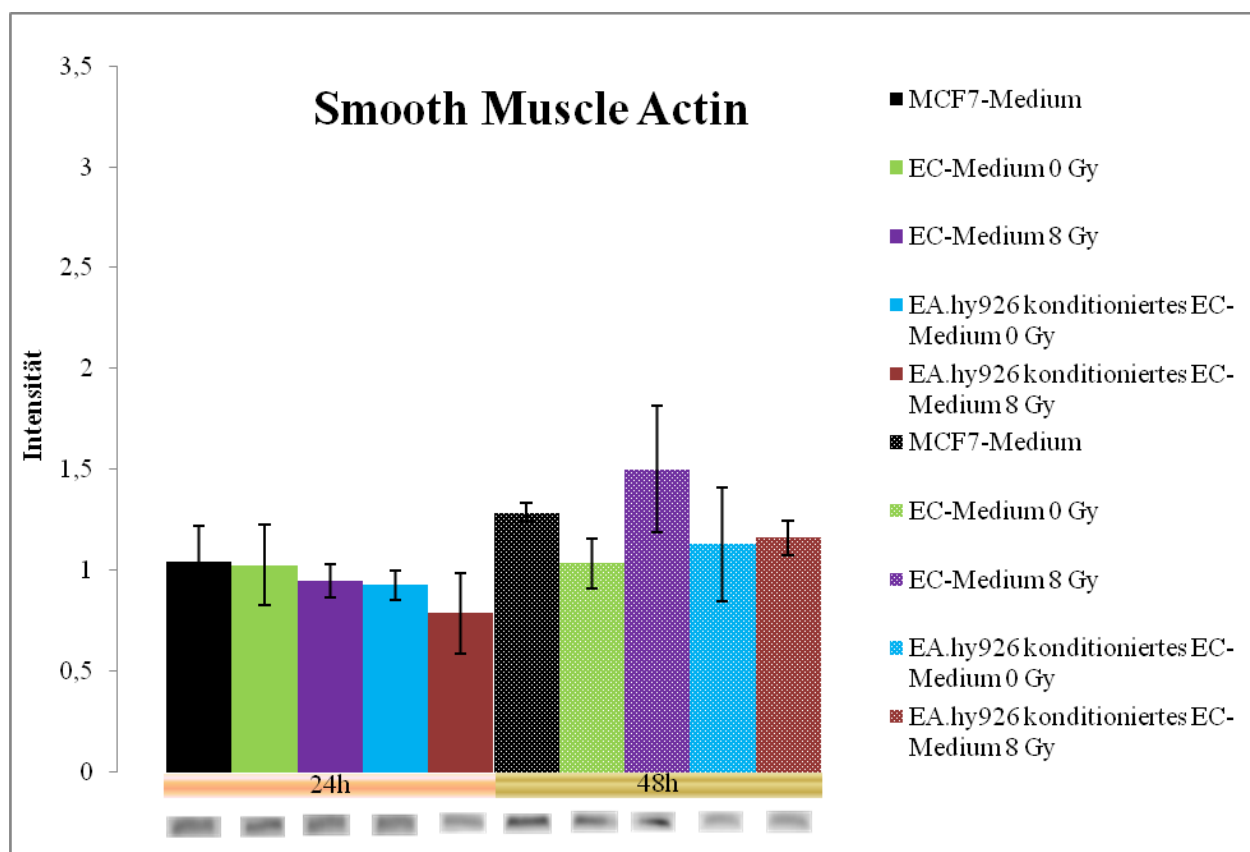


Abbildung 19: Intensität der Proteinexpression von Smooth Muscle Actin (SM-Actin) in MCF7-Zellen inkubiert in unterschiedlichen Medien; Darstellung beinhaltet MW + SD aus n=3

In Abbildung 19 ist die Proteinexpression von Smooth Muscle Actin (SM-Actin) der MCF7-Zellen für die Zeitpunkte 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung dargestellt. Es zeigte sich, dass die Proteinexpression im Laufe der Zeit anstieg. Dieser Anstieg ergab sich aus den ermittelten

Werten der Expression von SM-Actin für die Tumorzellen im EC-Medium sowie für die Tumorzellen im konditionierten EC-Medium. Zusammenfassend zeigte sich, dass Endothelzellen die Proteinexpression von SM-Actin in den Tumorzellen beeinflussen. So lag zum 24h-Zeitpunkt die Intensität bei 0,93 (konditioniertes EC-Medium, 0 Gy) im Vergleich zu 1,03 (EC-Medium, 0 Gy). Damit wurde durch den Einfluss der Endothelzellen die Expression des SM-Actins um etwa 11 % gesenkt. Für die Tumorzellen in den bestrahlten Medien konnte eine Senkung der Expression um etwa 18 % (konditioniertes EC-Medium, 8 Gy: 0,78; EC-Medium, 8 Gy: 0,95) beobachtet werden. Nach 48 Stunden zeigte sich für die Expression des SM-Actins der Tumorzellen in den unbestrahlten Medien eine Steigerung um etwa 10 % durch die Endothelzellen (konditioniertes EC-Medium, 0 Gy: 1,13; EC-Medium, 0 Gy: 1,03). Für die Tumorzellen in den bestrahlten Medien ergab sich durch die Konditionierung eine Senkung der Expression des SM-Actins um etwa 23 % (konditioniertes EC-Medium, 8 Gy: 1,16; EC-Medium, 8 Gy: 1,50) und stieg demnach gegenüber der Expressionssenkung nach 24 Stunden um 5 % an. Zu berücksichtigen ist die teils hohe Standardabweichung.

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte der Bystander-Effekt bestrahlter Endothelzellen auf das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen untersucht werden. Dazu wurden EA.hy926-Endothelzellen in Endothelzellmedium inkubiert und teilweise bestrahlt. Das bestrahlte/unbestrahlte konditionierte EC-Medium wurde auf die MCF7-Brustkrebszellen gegeben und deren Wachstum, Überleben, Migration und die epithelial-mesenchymale Transition analysiert und mit den Ergebnissen der Tumorzellen im bestrahlten/unbestrahlten EC-Medium verglichen.

4.1. Wachstum der Tumorzellen

Bei der Bestimmung der optimalen Einsaatdichte der MCF7-Zellen wurde für beide Zelldichten (5×10^3 Zellen/ml und 10×10^3 Zellen/ml) eine Zellpopulationsverdopplungszeit von 32 Stunden ermittelt. In wissenschaftlichen Arbeiten finden sich für diese Tumorzellen Zellpopulationsverdopplungszeiten von $34 \pm 1,5$ Stunden (BAABE et al., 2018) bis 39 Stunden (YOHAN et al., 2015), welche über der in dieser Arbeit ermittelten Zellpopulationsverdopplungszeit liegen. Diese Unterschiede lassen sich hauptsächlich durch verschiedene Medienzusammensetzungen und andere Seren bzw. deren Chargen erklären.

Verglichen mit den ermittelten Zellpopulationsverdopplungszeiten der Untersuchung des Wachstums der Tumorzellen unter Einfluss von bestrahlten Endothelzellen - Bystander-Effekt - war zu erkennen, dass diese inklusive der Kontroll-Wachstumskurven größer waren als die zuvor ermittelten 32 Stunden. Das bedeutete, dass die Tumorzellen im EC-Medium generell langsamer wuchsen als im MCF7-Medium. Dies war vermutlich auf das Pyruvat, welches im Gegensatz zum MCF7-Medium im EC-Medium enthalten war, zurückzuführen. Das Natriumpyruvat dient als Intermediat bei der ATP-Produktion in der Zelle der Bereitstellung zusätzlicher Energie. So kann zusätzliches Pyruvat den Zellen helfen, die einen Mangel eines der Glucose-metabolisierenden Enzyme aufweisen. Zudem kann es das Wachstum von Zellen niedriger Dichte durch verstärkte Stimulation zum Zitratzyklus fördern. Dieser Erkenntnis nach wäre eine kürzere Zellpopulationsverdopplungszeit für die MCF7-Zellen im EC-Medium zu erwarten. Da sich jedoch ein verlangsamtes Wachstum zeigte, stützten diese Erkenntnisse die Beobachtung nicht. Es kann daher nicht von einem Warburg-Effekt ausgegangen werden.

Beim Vergleich des Tumorzellwachstums im konditionierten EC-Medium und EC-Medium konnte beobachtet werden, dass die Tumorzellen im konditionierten EC-Medium besser wuchsen als im EC-Medium. Damit konnte ein fördernder Einfluss der Endothelzellen auf das Wachstum

der Tumorzellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt war unabhängig von der Bestrahlung und wurde durch diese nicht beeinflusst. In der Literatur wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. So beschrieben INGTHORSSON et al. 2010, dass Brustendothelzellen proliferative Signale nicht nur an das normale, sondern auch an das maligne Brustepithel liefern und das Wachstum in selbigen Zellen stimulieren. Durch Bildung von Gefäßen und Rekrutierung aus dem Knochenmark stammender endothelialer Vorläuferzellen spielen tumorassoziierte Endothelzellen eine Schlüsselrolle im Tumorwachstum durch Unterstützung dessen mit Nährstoffen (CHOUAIB et al., 2010).

4.2. Koloniebildung der Tumorzellen

Die Untersuchung der Koloniebildung ist die Methode der Wahl zur Überprüfung der Wirkung ionisierender Strahlung (FRANKEN et al., 2006; RAFEHI et al., 2011). Zunächst wurde das klonogene Überleben der MCF7-Zellen in ihrem eigenen Medium nach Bestrahlungsdosen von 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy ermittelt. Die ermittelte Überlebenskurve diente als Referenzkurve für den Vergleich des Bystander-Effektes. Bei dieser Kontrolle zeigte sich eine deutliche Abnahme der Überlebensrate der MCF7-Zellen bei steigender Bestrahlungsdosis, welche bereits in anderen Studien gezeigt wurde (SARKARIA et al., 1994; PAN et al., 2019). Bei Pan et al. betrug die Überlebensfraktion 1 bei 0 Gy und sank konstant mit steigender Bestrahlungsdosis auf 0,001 ab 6 Gy. Ähnlich verhielt es sich bei SARKARIA et al.. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenso eine Abnahme der Überlebensfraktion mit steigender Bestrahlungsdosis von 1,0 bei 0 Gy auf 0,001 bei 8 Gy. Die SF2 (Überleben nach 2 Gy) der Tumorzellen in der vorliegenden Arbeit betrug 0,46 und ist somit vergleichbar mit der von LACOSTE-COLLIN et al. 2015 ermittelten SF2 von 0,47. 2006 ermittelten AKABANI et al. für die Brustkrebszellen BT-474- sowie SKBr-3- und MCF7/HER2-18-Zellen SF2-Werte von 0,78, 0,53 bzw. 0,64. Die aufgeführten Brustkrebszellen scheinen demzufolge weder besonders strahlensensibel bzw. -resistent zu sein, wobei sich zeigt, dass die MCF7-Zellen im Vergleich strahlensensibler sind.

Es gibt verschiedene Einflussfaktoren auf das Zellüberleben nach einer Bestrahlung. Dazu zählen die intrinsische Strahlenempfindlichkeit, die Strahlenempfindlichkeit in verschiedenen Zellzyklusphasen, die Fraktionierung der Dosis, die Protrahierung der Bestrahlung, der Sauerstoffeffekt und der Einfluss des linearen Energietransfers. Im Endeffekt verlieren die Tumorzellen durch die Bestrahlung die Fähigkeit der unbegrenzten Teilung und damit verbundenen Bildung von Kolonien. Der daraus resultierende sogenannte klonogene Zelltod

beruht auf Chromosomenaberrationen oder einen Mangel an genetischem Material (DocCheck Medical Services GmbH, 2022).

Zur Überprüfung des Bystander-Effektes wurden unbestrahlte MCF7-Zellen mit EC-Medium von zuvor mit den oben genannten Dosen bestrahlten Endothelzellen inkubiert. Hier zeigte sich mit steigender Bestrahlungsdosis eine nahezu konstante Überlebensfraktion bei 1,0. Damit konnte kein Einfluss der bestrahlten Endothelzellen auf das Überleben der Tumorzellen und somit kein strahleninduzierter Bystander-Effekt beobachtet werden. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich bei ZAINUDIN et al. 2020. Sie ermittelten nach Mediumtransfer von 0 Gy bis 8 Gy bestrahlten MCF7-Zellen auf unbestrahlte MCF7-Zellen eine Überlebensfraktion zwischen 1,0 und 0,8. Hier zeigte sich kein Einfluss von bestrahlten Tumorzellen auf unbestrahlte Tumorzellen. MOTHER-SILL & SEYMOUR fanden 1997 heraus, dass Medium von bestrahlten Endothelzellen einen toxischen Effekt auf nicht bestrahlte Fibroblasten hat. KIANI et al. ermittelten ebenfalls 1997, dass die adhäsive Wechselwirkung mit Tumorzellen (A549) bei Bestrahlung von Endothelzellen (HUVEC) mit zunehmender Bestrahlungsdosis abnahm. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die adhäsive Wechselwirkung signifikant durch Bestrahlung der Tumorzellen (KIANI et al., 1997). Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass Endothel- und Tumorzellen sich wechselseitig beeinflussen. So konnte eine Zunahme der Strahlenempfindlichkeit von Endothelzellen durch eine Blockade der p53-Funktion, welche die Kommunikation zwischen Tumorzellen und Endothelzellen verändert, herbeigeführt werden (KHODAREV et al., 2004). Zudem sind Endothelzellen an vielen Prozessen im Körper beteiligt (STURTZEL, 2017; BOCHENEK et al., 2019). Endothel ist z.B. ein wichtiger Regulator der Tumorantwort auf die Strahlentherapie (EL KAFFAS et al., 2014). Studien von GARCIA-BARROS et al. wiesen 2003 daraufhin, dass mikrovaskuläre Schäden die Tumorantwort bei Bestrahlung regulieren. Nach GORSKI et al. (1999) werden durch Induktion von VEGF durch ionisierende Strahlung die Tumorblutgefäße vor strahlenvermittelter Zytotoxizität geschützt und dadurch die Tumorstrahlenresistenz gestärkt. Durch Kombination einer antiangiogenen Therapie mit einer Bestrahlung kann die Tumorreaktion verstärkt werden (LEE et al., 2000).

4.3. Migration der Tumorzellen

Die Zellmigration ist für die normale Entwicklung, die Immunantwort und die Krankheitsprozesse wie Metastasierung und Entzündungen lebender Zellen entscheidend (JUSTUS et al., 2014). Sie kann auf verschiedene Weise untersucht werden. In dieser Arbeit wurde die Methode des Transwell-Migrationsassays angewandt. Diese Methode ermöglicht die Wanderungsfähigkeit

durch eine physikalische Barriere nach Erkennen eines bestimmten Chemolockstoffes zu analysieren (JUSTUS et al., 2014). Es wurde untersucht, inwiefern die Mobilität der Tumorzellen durch den Einfluss bestrahlter bzw. unbestrahlter Endothelzellen beeinflusst werden kann. Dabei lagen die MCF7-Zellen jeweils im serumfreien zellspezifischen Medium vor und das serumhaltige konditionierte EC-Medium wurde als Lockstoff eingesetzt.

Die Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigte, dass das Migrationsvermögen der MCF7-Zellen im serumhaltigen zellspezifischen Medium am größten war. Die Untersuchungen zum Bystander-Effekt ergaben, dass die Endothelzellen die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen hemmten. Diese Beobachtung war nach 24 Stunden bei einer Bestrahlungsdosis von 8 Gy am stärksten. Ein Teil der inhibierenden Wirkung ließ sich dabei auf das EC-Medium zurückführen, in dem die Tumorzell-Migration ebenfalls geringer als im zellspezifischen Medium war. Jedoch war die Hemmung im konditionierten EC-Medium größer als im EC-Medium. Damit konnte gezeigt werden, dass die Endothelzellen die Tumorzellen in ihrer Migration hemmen. Es könnte sein, dass Signale, welche von den Endothelzellen ausgeschüttet werden, im Laufe der Zeit abnehmen und sich dadurch eine geringere Hemmung der Migration der Tumorzellen in Bezug zur Migration der Tumorzellen im zellspezifischen Medium zeigte oder dass, die Endothelzellen Signale ausschütten, welche mit der Zeit zunehmen und somit eine verzögerte Steigerung der Migration stattfand. Diese Theorie wird indirekt u.a. durch JUSTUS et al. (2014), welche mit Fibroblasten anstelle von Endothelzellen gearbeitet haben, gestärkt. Die Autoren fanden heraus, dass B16F10-Melanomzellen in ihrer Migration durch embryonale Mausfibroblasten (NIH3T3) konditioniertes Medium verstärkt werden. Dieses Ergebnis würde die zweite Theorie, der zeitlich zunehmenden Signalausschüttung und damit verzögerten Migrationssteigerung stützen.

In der Arbeit von FENG et al. (2017) zeigte sich ebenso passend zur aufgestellten Hypothese nach Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit eine Förderung der Proliferations-, Migrations- und Invasionsfähigkeit von HepG2-Zellen, einer humanen hepatozelluläre Tumorzelllinie, durch EA.hy926-Zellen konditioniertes Medium. Dieses zeigte einen Bystander-Effekt durch konditioniertes Medium. Ebenso fanden die Autoren im Gegenzug heraus, dass angiogene Faktoren von den Tumorzellen ausgeschüttet werden um vaskuläre Endothelzellen zur Organisation der Blutversorgung des Tumors anzulocken. In den Untersuchungen von Feng et al. beeinflussten sich die beiden Zelllinien einander, sodass ursächlich von einem Cross-Talk Mechanismus ausgegangen wurde. Diese Erkenntnis zeigt, dass die Migration durch Chemolockstoffe beeinflusst werden kann und demzufolge eine Beeinflussung der Migration

von Brustkrebszellen durch Ausschüttung eines Chemokinstoffes von bestrahlten Endothelzellen möglich ist.

Neben den oben genannten Faktoren können ebenfalls Exosome aus bestrahlten Zellen zu einer verstärkten Migration der Empfängerzellen führen und bei Aufnahme derer einen wandernden Phänotyp fördern (ARSCOTT et al., 2013). Tumorzellen und Endothelzellen beeinflussen sich demzufolge gegenseitig. Das zeigten wie bereits erwähnt KIANI et al. (1997). Sie fanden heraus, dass die Bestrahlung von A549-Tumorzellen ihre adhäsive Wechselwirkung mit Endothelzellen (HUVEC) signifikant erhöhte. Mit zunehmender Dosis nahm die adhäsive Wechselwirkung bei Bestrahlung von Endothelzellen anstelle von Tumorzellen ab. Eine signifikante Veränderung der adhäsiven Wechselwirkung durch gleichzeitige Bestrahlung der Tumor- als auch Endothelzellen fand nicht statt. Diese Kenntnisse beschreiben den sogenannten Bystander-Effekt, welcher als strahlungsähnlicher Effekt in Zellen oder Geweben gesehen wird, die mit bestrahlten Zellen kommuniziert haben, aber selbst nicht bestrahlt wurden (CHAPMAN et al., 2008).

4.4. Epithelial-mesenchymale Transition der Tumorzellen

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Endothelzellen auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) unbestrahlter MCF7-Zellen untersucht. Als Verfahren wurde der Western Blot angewandt, welcher eine etablierte Methode zum Nachweis von spezifischen Proteinen ist. Zur Analyse der EMT in den Tumorzellen wurde die Proteinexpression von β -Catenin und SM-Actin untersucht, welche einen mesenchymalen Phänotyp repräsentieren (KALLURI et al., 2009) und deren Zunahme ein Hinweis für die EMT darstellt.

In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich nach 24 Stunden unabhängig von der Bestrahlungsdosis eine geringere Expression von β -Catenin in den MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium im Vergleich zum EC-Medium. Nach 48 Stunden wurde nach Bestrahlung eine höhere β -Catenin Expression für die MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium im Vergleich zum EC-Medium beobachtet. Diese Beobachtungen zeigen, dass Endothelzellen die Proteinexpression von β -Catenin in den MCF7-Zellen nach einer Bestrahlung steigern können. Da diese Beobachtungen erst nach 48 Stunden gemacht werden konnten, deutet es zudem daraufhin, dass dieser Vorgang Zeit benötigt.

β -Catenin ist ein Protein, welches an den zytoplasmatischen Schweif von E-Cadherin gebunden ist (POLYAK et al., 2009) und die Epithelarchitektur fördert (KIM ET AL., 2000). Zudem wird β -Catenin eine Rolle in der Cadherin-Zelladhäsion attestiert (HUELSKEN et al., 2000). Die

Detektion der β -Catenin-Bande in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sprach für eine Freisetzung des Proteins, wodurch eine Wanderung der β -Catenin Moleküle zum Kern und eine damit verbundene Expression von EMT-induzierten Transkriptionsfaktoren ausgelöst werden kann (YANG et al., 2008; POLYAK et al., 2009). Gleichzeitig spricht es für einen Verlust von E-Cadherin, welcher zu den morphologischen Veränderungen in der Zelle zählt, die die EMT beeinflussen (DUMONT et al., 2008; YANG et al., 2008). Aufgrund dessen ist von einer Regulation der EMT durch einen β -Catenin vermittelten Transkriptionsweg auszugehen (YANG et al., 2008), welcher maßgeblich an der Steuerung des invasiven Verhaltens von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) beteiligt ist und bei der Metastasierung von Tumorzellen nachgewiesen werden konnte (KAROW, 2008).

Neben β -Catenin wurde die Proteinexpression von Smooth Muscle Actin (SM-Actin), einem Differenzierungsmarker für glatte Muskelzellen (SKALLI et al., 1989), analysiert. Bei diesem Protein konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass die Expression im Laufe der Zeit anstieg.

Der stärkste Expressionsanstieg von SM-Actin ließ sich für die MCF7-Zellen in den bestrahlten Medien über die Zeit ermitteln. Außerdem zeigte sich, dass die Proteinexpression der Tumorzellen zu den untersuchten Zeitpunkten im konditionierten EC-Medium geringer bzw. nach 48 Stunden ohne Bestrahlung annähernd identisch zum EC-Medium war. Diese Beobachtungen zeigen, dass durch die Endothelzellen die SM-Actin-Expression vermindert wird. Nach 48 Stunden konnte im Vergleich zum 24h-Zeitpunkt eine generelle Steigerung der SM-Actin Proteinexpression in den MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium als auch EC-Medium gezeigt werden und überstieg im bestrahlten EC-Medium die Proteinexpression der MCF7-Zellen im MCF7-Medium.

Die zeitverzögerte Steigerung der β -Catenin- und der SM-Actin-Expression der MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium nach 48 Stunden lässt vermuten, dass die MCF7-Zellen eine EMT durchlaufen haben. XU et al. stellten nach längerer Co-Kultivierung mit humanen adipose-derived mesenchymalen Stammzellen (ADMSCs) 2012 die Etablierung eines stabilen mesenchymalen Phänotyps in MCF7-Zellen fest. WU et al. beobachteten 2019 ebenso einen erhöhten epithelial-mesenchymalen Übergang von MCF7-Zellen durch humane adipose-derived Stammzellen (Hu-ADSCs). Diese Beobachtungen zeigen, dass die EMT von MCF7-Zellen durch Vorhandensein anderer Zellen beeinflusst werden kann. Zudem sind Endothelzellen starke

Induktoren der epithelial-mesenchymalen Transition (SIGURDSSON et al., 2011) und können demzufolge die EMT beschleunigen.

Im beobachteten Zeitraum von 48 Stunden zeigte sich eine Proteinexpressionsanstieg sowohl von β -Catenin als auch von SM-Actin in den Tumorzellen im konditionierten EC-Medium. Mit Ausnahme der β -Catenin Expression der MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium nach Bestrahlung zeigte sich die Expression der Tumorzellen im konditionierten EC-Medium dennoch niedriger bzw. annähernd identisch der β -Catenin und SM-Actin Expression im EC-Medium. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass durch die Bestrahlung eine Veränderung der Freisetzung unbekannter Faktoren in den Endothelzellen, welche mit der Zeit eine Wirkverstärkung bei den Tumorzellen erzielt, stattfindet. Auf welcher Ebene die vermutete Veränderung stattfindet und wie genau es dazu kommt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend berichtet werden. FACOETTI et al. beschrieben 2006 eine dosisunabhängige jedoch zeitabhängige Wirkung von Strahlung, welche sich durch eine Veränderung der Freisetzung von Interleukin-8 aus exponierten T98G-Zellen (Glioblastom-Zelllinie) zeigte. Interleukin-8 ist ein wichtiger Regulator der Tumormikroumgebung und fördert den epithelial-mesenchymalen Übergang sowie den Erwerb stammähnlicher Zelleigenschaften in Krebszellen (OSPINA-MUÑOZ et al., 2020). Aufgrund dessen könnte es sich bei der Veränderung um die Ausschüttung von Interleukin-8 durch die Endothelzellen handeln. Denn Interleukin-8 induziert die Bildung größerer Tumorsphären in MCF7-Zellen, was auf eine Anreicherung von Krebsstammzellen hindeutet (OSPINA-MUÑOZ et al., 2020). Die Sekretion von Interleukin-8 sollte somit in weiteren Studien untersucht werden.

Neben den genannten Proteinen wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Houskeeping-Protein detektiert. Eine Bande, welche Vimentin beschreibt, konnte nicht erfasst werden. 2015 beobachteten MAHDI et al. ebenfalls das Fehlen von Vimentin nach TGF- β -Zugabe, obwohl es ohne TGF- β von MCF7-Zellen exprimiert wird und neben N-Cadherin ein Marker für die epithelial-mesenchymale Transition ist (HUGO et al., 2007). TGF- β wurde ebenso in der vorliegenden Arbeit angewandt und vor der Untersuchung der EMT den Tumorzellen zugefügt. TGF- β kann mit seinem Signalweg den Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Typ beeinflussen (LI et al., 2015; HAO et al., 2019). Nach Erreichen eines späten Krebszellstadiums, in dem die Tumorzellen ihre Tumorsuppressorgene verlieren, kann der TGF- β -induzierte Wachstumsstopp nicht mehr ausgelöst werden (HAO et al., 2019). TGF- β wirkt stattdessen als Tumorpromotor, in dem er den epithelial-mesenchymalen Übergang der

Tumorzellen anregt (HAO et al., 2019). Das bedeutet, dass die Tumorzellen angeregt werden, einen mesenchymalen Phänotyp anzunehmen, welcher eine Metastasierung ermöglicht. Die Visualisierung dessen lieferten LI et al. (2015). Sie wiesen die Abnahme von E-Cadherin als epithelialem Vertreter sowie die Zunahme von N-Cadherin als mesenchymalem Vertreter als Auswirkung von TGF- β auf die EMT nach. Diese Erkenntnis konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden. Es wurde bei allen MCF7-Zellen eine Detektion von β -Catenin und SM-Actin, welche für einen mesenchymalen Phänotyp sprechen (KALLURI et al., 2009), beobachtet. MAHDI et al. (2015) sprachen TGF- β ebenfalls eine Bedeutung bei der zellulär morphologischen Veränderung zu. So zeigten sich nach einer Behandlung mit TGF- β an T47D-Zellen und MCF7-Zellen morphologische Veränderungen mit signifikanter Vergrößerung der Zelloberfläche im Vergleich zu den Kontrollzellen (MAHDI et al., 2015).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Endothelzellen sowie deren Bestrahlung einen Einfluss auf das Metastasierungsverhalten von Brustkrebszellen *in vitro* haben. Als Vertreter der Endothelzellen wurden EA.hy926-Zellen verwendet. Als Brustkrebszellen wurden MCF7-Zellen gewählt.

Im untersuchten Bystander-Effekt lagen die MCF7-Zellen jeweils unbestrahlt vor. Die Endothelzellen wurden im EC-Medium inkubiert (konditioniertes EC-Medium) und waren unbestrahlt (0 Gy) oder bestrahlt (8 Gy). Als Kontrolle, dass die Beobachtungen auf die Endothelzellen und nicht auf die Verwendung des EC-Mediums zurückzuführen waren, wurde zellfreies unbestrahltes bzw. bestrahltes EC-Medium (EC-Medium) mitgeführt. Das unbestrahlte/bestrahlte konditionierte EC-Medium sowie das unbestrahlte/bestrahlte EC-Medium wurde jeweils zur Messung des Bystander-Effektes auf die Tumorzellen transferiert. Die MCF7-Zellen im zellspezifischen Medium dienten als Referenzkontrolle.

Folgende Resultate konnten in dieser Arbeit gewonnen werden:

- Für das Wachstum der Tumorzellen ergab sich im zellspezifischen Medium eine Zellpopulationsverdopplungszeit von 32 Stunden. Im Endothelzell-(EC)-Medium war das Wachstum der Tumorzellen verringert (Zellpopulationsverdopplungszeit 37,5 Stunden).
- Unter Einfluss des konditionierten Endothelzellmediums war das Wachstum der Tumorzellen erhöht. Die Zellpopulationsverdopplungszeit der Tumorzellen im konditionierten EC-Medium sank dabei auf 35 Stunden, im Vergleich zum EC-Medium mit 37,5 Stunden.
- Eine vorherige Bestrahlung der Endothelzellen mit 8 Gy hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen.
- Im Koloniebildungstest zeigte sich für die bestrahlten MCF7-Zellen eine typische Überlebenskurve mit abnehmenden Überlebensraten bei steigenden Strahlendosen. Die SF2 betrug 0,46.
- Das durch Endothelzellen (bestrahlt bzw. unbestrahlt) konditionierte Medium zeigte keine Modulation der Überlebensrate der unbestrahlten MCF7-Zellen.

- Die Migration der Tumorzellen war im Tumorzellmedium zu allen Zeitpunkten höher als im EC-Medium, stieg in letzterem jedoch von 24 Stunden zu 48 Stunden deutlich an. Durch den Einfluss des konditionierten EC-Mediums wurde die Migration der Tumorzellen zu beiden beobachteten Zeitpunkten verringert.
- Im Western Blot wurde die Proteinexpression von β -Catenin und Smooth-Muscle-Actin als Vertreter eines mesenchymalen Phänotyps in den Tumorzellen nachgewiesen. Mit Ausnahme der β -Catenin-Expression 48 Stunden nach Bestrahlung zeigte sich unabhängig von der Bestrahlungsdosis im Beobachtungszeitraum von 48 Stunden eine verringerte bzw. annähernd identische Proteinexpression von β -Catenin als auch von SM-Actin durch den Einfluss der Endothelzellen.

6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen sowohl durch unbestrahlte als auch durch bestrahlte Endothelzellen beeinflussbar sind. Die Endothelzellen konnten sowohl das Wachstum, die Migration und die epithelial-mesenchymale Transition beeinflussen.

Das Wachstum der Tumorzellen zeigte sich unter Einfluss der bestrahlten Endothelzellen verlangsamt. Die Überlebensrate der MCF7-Zellen war unter Einfluss von Endothelzellen unverändert. Die Migration wurde unter Einfluss von Endothelzellen im Beobachtungszeitraum von 48 Stunden verringert. Mit Ausnahme der β -Catenin Expression 48 Stunden nach Bestrahlung zeigte sich eine Verringerung bzw. Stabilität der Expression sowohl von β -Catenin als auch Smooth-Muscle-Actin unter Einfluss von Endothelzellen.

Aufgrund des Einflusses der Endothelzellen auf die Tumorzellen besteht eine klinische Relevanz, weshalb es wünschenswert ist sich dieser Thematik weiter zu widmen. Durch diese Beeinflussung kann es sein, dass sowohl Tumorzellen als auch Endothelzellen ihre Eigenschaften verändern und es somit eventuell zu einer Verschlechterung der jeweiligen Tumorerkrankung kommen kann. Es wäre von großem Interesse den Mechanismus weiter aufzuklären und zu analysieren, ob es neben dem vermuteten Interleukin-8 weitere Signale gibt, welche die Endothelzellen an die Tumorzellen aussenden. Durch diese Erkenntnisse könnten neue Angriffspunkte für eine mögliche Therapie gefunden werden. Dazu wäre es überlegenswert die ausgeschütteten Signalproteine (Chemo-/Zytokine) der Endothelzellen quantitativ, z.B. mittels ELISA, zu detektieren. In verschiedenen Ansätzen könnten anschließend diese Signalproteine einzeln zu den Tumorzellen hinzugefügt werden, um herauszufinden, welche oder ob eventuell ein Gemisch von Signalproteinen für den Bystander-Effekt in den Tumorzellen verantwortlich ist. Nach diesen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob bereits ein Wirkstoff zum Einfluss des jeweiligen Proteins auf die Tumorzellen zur Verfügung steht oder eine entsprechende Substanz entwickelt werden kann, um dieses zukünftig *in vitro* zu überprüfen bevor es in eine Therapie integriert werden kann. Des Weiteren ist es eine Überlegung, den Koloniebildungstest mit bestrahlten MCF7-Zellen im konditionierten EC-Medium sowie unter inflammatorischen Bedingungen zu untersuchen, um eine Anpassung zur klinischen Praxis zu erzielen. Zudem sollte die Migration über einen längeren Zeitraum mit Erhöhung der Versuchsanzahl beobachtet werden, um zu klären, ob wie vermutet durch Einfluss von Endothelzellen eine verzögerte Migrationssteigerung stattfindet.

Literaturverzeichnis

Ahn, Kyunghye; Pan, Sharon; Beningo, Karen; Hupe, Donald (1995): A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells. In: *Life sciences* 56 (26), S. 2331–2341. DOI: 10.1016/0024-3205(95)00227-w.

Akabani, Gamal; Carlin, Sean; Welsh, Phil; Zalutsky, Michael R. (2006): In vitro cytotoxicity of 211At-labeled trastuzumab in human breast cancer cell lines: effect of specific activity and HER2 receptor heterogeneity on survival fraction. In: *Nuclear medicine and biology* 33 (3), S. 333–347. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2005.12.006.

Arscott, W. Tris; Tandle, Anita T.; Zhao, Shuping; Shabason, Jacob E.; Gordon, Ira K.; Schlaff, Cody D. et al. (2013): Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. In: *Translational Oncology* 6 (6), S. 638–648. DOI: 10.1593/tlo.13640.

Azzam, Edouard I.; Toledo, Sonia M. de; Little, John B. (2003): Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. In: *Oncogene* 22 (45), S. 7050–7057. DOI: 10.1038/sj.onc.1206961.

Baaße, Annemarie; Juerß, Dajana; Reape, Elaine; Manda, Katrin; Hildebrandt, Guido (2018): Promoting effects of adipose-derived stem cells on breast cancer cells are reversed by radiation therapy. In: *Cytotechnology* 70 (2), S. 701–711. DOI: 10.1007/s10616-017-0172-6.

Bochenek, Magdalena L.; Schäfer, Katrin (2019): Role of Endothelial Cells in Acute and Chronic Thrombosis. In: *Hamostaseologie* 39 (2), S. 128–139. DOI: 10.1055/s-0038-1675614.

Bray, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.

Chaffer CL and Weinberg RA: A perspective on cancer cell metastasis. - PubMed - NCBI. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21436443>, zuletzt geprüft am 29.05.2019.

Chapman, Kim L.; Kelly, James W.; Lee, Ryonfa; Goodwin, Edwin H.; Kadhim, Munira A. (2008): Tracking genomic instability within irradiated and bystander populations. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 60 (8), S. 959–968. DOI: 10.1211/jpp.60.8.0003.

Chouaib, Salem; Kieda, Claudine; Benlalam, Houssein; Noman, Muhammad Zaeem; Mami-Chouaib, Fathia; Rüegg, Curzio (2010): Endothelial cells as key determinants of the tumor microenvironment: interaction with tumor cells, extracellular matrix and immune killer cells. In: *Critical reviews in immunology* 30 (6), S. 529–545. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v30.i6.30.

Comşa, Şerban; Cîmpean, Anca Maria; Raica, Marius (2015): The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. In: *Anticancer research* 35 (6), S. 3147–3154.

Couch, Fergus J.; Shimelis, Hermela; Hu, Chunling; Hart, Steven N.; Polley, Eric C.; Na, Jie et al. (2017): Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. In: *JAMA oncology* 3 (9), S. 1190–1196. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.0424.

D'Anselmi, Fabrizio; Masiello, Maria Grazia; Cucina, Alessandra; Proietti, Sara; Dinicola, Simona; Pasqualato, Alessia et al. (2013): Microenvironment promotes tumor cell reprogramming in human breast cancer cell lines. In: *PLoS ONE* 8 (12), e83770. DOI: 10.1371/journal.pone.0083770.

Deutscher Ärzteverlag GmbH, Redaktion Deutsches Ärzteblatt (2014): PALB2: Brustkrebsgen mit hohem Lebenszeitrisiko. Online verfügbar unter <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/59673/PALB2->

Brustkrebsgen-mit-hohen-Lebenszeitrisko, zuletzt aktualisiert am 04.11.2020, zuletzt geprüft am 04.11.2020.

DocCheck Medical Services GmbH (2022): Klonogener Zelltod - DocCheck Flexikon. DocCheck Medical Services GmbH. Online verfügbar unter https://flexikon.doccheck.com/de/Klonogener_Zelltod, zuletzt aktualisiert am 14.11.2022, zuletzt geprüft am 14.11.2022.

Dumont, Nancy; Wilson, Matthew B.; Crawford, Yongping G.; Reynolds, Paul A.; Sigaroudinia, Mahvash; Tlsty, Thea D. (2008): Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (39), S. 14867–14872. DOI: 10.1073/pnas.0807146105.

Edgell, C. J.; Haizlip, J. E.; Bagnell, C. R.; Packenham, J. P.; Harrison, P.; Wilbourn, B.; Madden, V. J. (1990): Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. In: *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 26 (12), S. 1167–1172. DOI: 10.1007/BF02623694.

El Kaffas, Ahmed; Al-Mahrouki, Azza; Tran, William T.; Giles, Anoja; Czarnota, Gregory J. (2014): Sunitinib effects on the radiation response of endothelial and breast tumor cells. In: *Microvascular research* 92, S. 1–9. DOI: 10.1016/j.mvr.2013.10.008.

Facoetti, A.; Ballarini, F.; Cherubini, R.; Gerardi, S.; Nano, R.; Ottolenghi, A. et al. (2006): Gamma ray-induced bystander effect in tumour glioblastoma cells: a specific study on cell survival, cytokine release and cytokine receptors. In: *Radiation Protection Dosimetry* 122 (1-4), S. 271–274. DOI: 10.1093/rpd/ncl431.

Feng, Tang; Yu, Hongchi; Xia, Qing; Ma, Yunlong; Yin, Hongmei; Shen, Yang; Liu, Xiaoheng (2017): Cross-talk mechanism between endothelial cells and hepatocellular carcinoma cells via growth factors and integrin pathway promotes tumor angiogenesis and cell migration. In: *Oncotarget* 8 (41), S. 69577–69593. DOI: 10.18632/oncotarget.18632.

Franken, Nicolaas A. P.; Rodermond, Hans M.; Stap, Jan; Haveman, Jaap; van Bree, Chris (2006): Clonogenic assay of cells in vitro. In: *Nature protocols* 1 (5), S. 2315–2319. DOI: 10.1038/nprot.2006.339.

Garcia-Barros, Monica; Paris, Francois; Cordon-Cardo, Carlos; Lyden, David; Rafii, Shahin; Haimovitz-Friedman, Adriana et al. (2003): Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. In: *Science (New York, N.Y.)* 300 (5622), S. 1155–1159. DOI: 10.1126/science.1082504.

Gorski, D. H.; Beckett, M. A.; Jaskowiak, N. T.; Calvin, D. P.; Mauceri, H. J.; Salloum, R. M. et al. (1999): Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. In: *Cancer research* 59 (14), S. 3374–3378.

Hall, Eric J. (2003): The bystander effect. In: *Health Physics* 85 (1), S. 31–35. DOI: 10.1097/00004032-200307000-00008.

Hao, Yang; Baker, David; Dijke, Peter ten (2019): TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. In: *International journal of molecular sciences* 20 (11). DOI: 10.3390/ijms20112767.

Hara, Takamitsu; Iwadate, Manabu; Tachibana, Kazunoshin; Waguri, Satoshi; Takenoshita, Seiichi; Hamada, Nobuyuki (2017): Metastasierung von Brustkrebszellen in Knochen, Lunge und Lymphknoten steigert die Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung. In: *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 193 (10), S. 848–855. DOI: 10.1007/s00066-017-1165-2.

- Harbeck, Nadia; Gnant, Michael (2017): Breast cancer. In: *The Lancet* 389 (10074), S. 1134–1150. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8.
- Hartkopf, Andreas D.; Müller, Volkmar; Wöckel, Achim; Lux, Michael P.; Janni, Wolfgang; Nabieva, Naiba et al. (2019): Update Breast Cancer 2019 Part 1 - Implementation of Study Results of Novel Study Designs in Clinical Practice in Patients with Early Breast Cancer. In: *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 79 (3), S. 256–267. DOI: 10.1055/a-0842-6614.
- Huang, Lei; Kim, Perry M.; Nickoloff, Jac A.; Morgan, William F. (2007): Targeted and nontargeted effects of low-dose ionizing radiation on delayed genomic instability in human cells. In: *Cancer research* 67 (3), S. 1099–1104. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3697.
- Huang, Yao-Huei; Yang, Pei-Ming; Chuah, Qiu-Yu; Lee, Yi-Jang; Hsieh, Yi-Fen; Peng, Chih-Wen; Chiu, Shu-Jun (2014): Autophagy promotes radiation-induced senescence but inhibits bystander effects in human breast cancer cells. In: *Autophagy* 10 (7), S. 1212–1228. DOI: 10.4161/auto.28772.
- Huelsken, J.; Vogel, R.; Brinkmann, V.; Erdmann, B.; Birchmeier, C.; Birchmeier, W. (2000): Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. In: *The Journal of cell biology* 148 (3), S. 567–578. DOI: 10.1083/jcb.148.3.567.
- Hugo, Honor; Ackland, M. Leigh; Blick, Tony; Lawrence, Mitchell G.; Clements, Judith A.; Williams, Elizabeth D.; Thompson, Erik W. (2007): Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. In: *Journal of cellular physiology* 213 (2), S. 374–383. DOI: 10.1002/jcp.21223.
- Ingthorsson, Saevar; Sigurdsson, Valgardur; Fridriksdottir, Agla; Jonasson, Jon G.; Kjartansson, Jens; Magnusson, Magnus K.; Gudjonsson, Thorarinn (2010): Endothelial cells stimulate growth of normal and cancerous breast epithelial cells in 3D culture. In: *BMC Res Notes* 3 (1), S. 184. DOI: 10.1186/1756-0500-3-184.
- Jabbari, Nasrollah; Nawaz, Muhammad; Rezaie, Jafar (2019): Bystander effects of ionizing radiation: conditioned media from X-ray irradiated MCF-7 cells increases the angiogenic ability of endothelial cells. In: *Cell communication and signaling : CCS* 17 (1), S. 165. DOI: 10.1186/s12964-019-0474-8.
- Justus, Calvin R.; Leffler, Nancy; Ruiz-Echevarria, Maria; Yang, Li V. (2014): In vitro Cell Migration and Invasion Assays. In: *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (88). DOI: 10.3791/51046.
- Kalluri, Raghu; Weinberg, Robert A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (6), S. 1420–1428. DOI: 10.1172/JCI39104.
- Karow, Marisa (2008): Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen. Unter Mitarbeit von Thomas Cremer.
- Khodarev, Nikolai N.; Labay, Edwardine; Darga, Thomas; Yu, Jianqing; Mauceri, Helena; Gupta, Nalin et al. (2004): Endothelial cells co-cultured with wild-type and dominant/negative p53-transfected glioblastoma cells exhibit differential sensitivity to radiation-induced apoptosis. In: *International journal of cancer* 109 (2), S. 214–219. DOI: 10.1002/ijc.11728.
- 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. In: *Clin Exp Metastasis* 15 (1), S. 12–18. DOI: 10.1023/A:1018424021393.
- Kim, K.; Pang, K. M.; Evans, M.; Hay, E. D. (2000): Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. In: *Molecular biology of the cell* 11 (10), S. 3509–3523. DOI: 10.1091/mbc.11.10.3509.

- Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst, Deutsches (2018): Strahlentherapie: Anwendungsbeispiele und mögliche Nebenwirkungen. In: *Krebsinformationsdienst*, 21.03.2018. Online verfügbar unter <https://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/strahlentherapie-nuklearmedizin/strahlentherapie-nebenwirkungen.php>, zuletzt geprüft am 08.05.2020.
- Lacoste-Collin, Laetitia; Castiella, Marion; Franceries, Xavier; Cassol, Emmanuelle; Vieilleveigne, Laure; Pereda, Veronica et al. (2015): Nonlinearity in MCF7 Cell Survival Following Exposure to Modulated 6 MV Radiation Fields: Focus on the Dose Gradient Zone. In: *Dose-response : a publication of International Hormesis Society* 13 (4), 1559325815610759. DOI: 10.1177/1559325815610759.
- Lee, C. G.; Heijn, M.; Di Tomaso, E.; Griffon-Etienne, G.; Ancukiewicz, M.; Koike, C. et al. (2000): Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. In: *Cancer research* 60 (19), S. 5565–5570.
- Li, Lingmei; Qi, Lisha; Liang, Zhijie; Song, Wangzhao; Liu, Yanxue; Wang, Yalei et al. (2015): Transforming growth factor- β 1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells. In: *International Journal of Molecular Medicine* 36 (1), S. 113–122. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2222.
- Lorimore, S. A.; Coates, P. J.; Scobie, G. E.; Milne, G.; Wright, E. G. (2001): Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? In: *Oncogene* 20 (48), S. 7085–7095. DOI: 10.1038/sj.onc.1204903.
- Lorimore, S. A.; Wright, E. G. (2003): Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. In: *International journal of radiation biology* 79 (1), S. 15–25. DOI: 10.1080/0955300021000045664.
- Lorimore, Sally A.; Coates, Philip J.; Wright, Eric G. (2003): Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. In: *Oncogene* 22 (45), S. 7058–7069. DOI: 10.1038/sj.onc.1207044.
- Lu, Xin; Mu, Euphemia; Wei, Yong; Riethdorf, Sabine; Yang, Qifeng; Yuan, Min et al. (2011): VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging α 4 β 1-positive osteoclast progenitors. In: *Cancer cell* 20 (6), S. 701–714. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.11.002.
- Mahdi, Shah H. A.; Cheng, Huanyi; Li, Jinfeng; Feng, Renqing (2015): The effect of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition on the expression of intracellular calcium-handling proteins in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 583, S. 18–26. DOI: 10.1016/j.abb.2015.07.008.
- Makki, Jaafar (2015): Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. In: *Clinical Medicine Insights: Pathology* 8, S. 23–31. DOI: 10.4137/CPath.S31563.
- MATSUMOTO, Hideki; Hamada, Nobuyuki; TAKAHASHI, Akihisa; KOBAYASHI, Yasuhiko; OHNISHI, Takeo (2007): Vanguard of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. In: *Journal of Radiation Research* 48 (2), S. 97–106. DOI: 10.1269/jrr.06090.
- McDonald, Elizabeth S.; Clark, Amy S.; Tchou, Julia; Zhang, Paul; Freedman, Gary M. (2016): Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 57 Suppl 1, 9S-16S. DOI: 10.2967/jnumed.115.157834.
- Meindl, Alfons; Hellebrand, Heide; Wiek, Constanze; Erven, Verena; Wappenschmidt, Barbara; Niederacher, Dieter et al. (2010): Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. In: *Nature genetics* 42 (5), S. 410–414. DOI: 10.1038/ng.569.

Michael, Iacovos P.; Saghafeina, Sadegh; Tichet, Mélanie; Zangger, Nadine; Marinoni, Ilaria; Perren, Aurel; Hanahan, Douglas (2019): ALK7 Signaling Manifests a Homeostatic Tissue Barrier That Is Abrogated during Tumorigenesis and Metastasis. In: *Developmental Cell* 49 (3), 409-424.e6. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.04.015.

Minckwitz, Gunter von; Procter, Marion; Azambuja, Evandro de; Zardavas, Dimitrios; Benyunes, Mark; Viale, Giuseppe et al. (2017): Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. In: *The New England journal of medicine* 377 (2), S. 122–131. DOI: 10.1056/NEJMoa1703643.

Mothersill, C.; Seymour, C. (1997): Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. In: *International journal of radiation biology* 71 (4), S. 421–427. DOI: 10.1080/095530097144030.

Nagasawa, H.; Little, J. B. (1992): Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. In: *Cancer research* 52 (22), S. 6394–6396.

Ospina-Muñoz, Natalia; Vernot, Jean-Paul (2020): Partial acquisition of stemness properties in tumorspheres obtained from interleukin-8-treated MCF-7 cells. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 42 (12), 1010428320979438. DOI: 10.1177/1010428320979438.

Oesterreicher, Jan; Prise, Kevin M.; Michael, Barry D.; Vogt, Jürgen; Butz, Tilman; Tanner, Judith M. (2003): Radiation-induced bystander effects. Mechanisms, biological implications, and current investigations at the Leipzig LIPSION facility. In: *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 179 (2), S. 69–77. DOI: 10.1007/s00066-003-1000-9.

Pan, Lingxiao; Wan, Minghui; Zheng, Wenbo; Wu, Rui; Tang, Wei; Zhang, Xiaoshen et al. (2019): Intrabeam Radiation Inhibits Proliferation, Migration, and Invasiveness and Promotes Apoptosis of MCF-7 Breast Cancer Cells. In: *Technology in cancer research & treatment* 18, 1533033819840706. DOI: 10.1177/1533033819840706.

Polyak, Kornelia; Weinberg, Robert A. (2009): Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (4), S. 265–273. DOI: 10.1038/nrc2620.

Powell, Emily; Piwnica-Worms, David; Piwnica-Worms, Helen (2014): Contribution of p53 to metastasis. In: *Cancer discovery* 4 (4), S. 405–414. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0136.

Rafehi, Haloom; Orlowski, Christian; Georgiadis, George T.; Ververis, Katherine; El-Osta, Assam; Karagiannis, Tom C. (2011): Clonogenic Assay: Adherent Cells. In: *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (49). DOI: 10.3791/2573.

Rhiem, K.; Pfeifer, K.; Schmutzler, R. K.; Kiechle, M. (2012): Risk-reducing Surgery in Women at Risk for Familial Breast or Ovarian Cancer. In: *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 72 (9), S. 833–839. DOI: 10.1055/s-0032-1315362.

RKI - 2019 - Neue Zahlen zu Krebs in Deutschland (2020). Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2019/16_2019.html, zuletzt aktualisiert am 31.03.2020, zuletzt geprüft am 31.03.2020.

ROTI®Cell Pyruvat-Lösung | Zellkulturmedienzusätze | Reagenzien für die Zellkultur | Zellkultur | Applikationen | Carl Roth - Deutschland (2020). Online verfügbar unter <https://www.carlroth.com/de/de/zellkulturmedienzusaetze/roticell-pyruvat-loesung/p/9182.1>, zuletzt aktualisiert am 12.11.2020, zuletzt geprüft am 12.11.2020.

- Sarkaria, J. N.; Miller, E. M.; Parker, C. J.; Jordan, V. C.; Mulcahy, R. T. (1994): 4-Hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, does not alter the radiation sensitivity of MCF-7 breast carcinoma cells irradiated *in vitro*. In: *Breast cancer research and treatment* 30 (2), S. 159–165. DOI: 10.1007/BF00666060.
- Shao, C.; Folkard, M.; Prise, K. M. (2008): Role of TGF-beta1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells. In: *Oncogene* 27 (4), S. 434–440. DOI: 10.1038/sj.onc.1210653.
- Shao, Chunlin; Lyng, Fiona M.; Folkard, Melvyn; Prise, Kevin M. (2006): Calcium fluxes modulate the radiation-induced bystander responses in targeted glioma and fibroblast cells. In: *Radiation research* 166 (3), S. 479–487. DOI: 10.1667/RR3600.1.
- Sigurdsson, Valgardur; Hilmarisdottir, Bylgja; Sigmundsdottir, Hekla; Fridriksdottir, Agla J. R.; Ringnér, Markus; Villadsen, Rene et al. (2011): Endothelial induced EMT in breast epithelial cells with stem cell properties. In: *PLoS ONE* 6 (9), e23833. DOI: 10.1371/journal.pone.0023833.
- Skalli, O.; Pelte, M. F.; Peclet, M. C.; Gabbiani, G.; Gugliotta, P.; Bussolati, G. et al. (1989): Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 37 (3), S. 315–321. DOI: 10.1177/37.3.2918221.
- Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A. et al. (2001): Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. In: *The New England journal of medicine* 344 (11), S. 783–792. DOI: 10.1056/NEJM200103153441101.
- Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M. (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. In: *Journal of the National Cancer Institute* 51 (5), S. 1409–1416. DOI: 10.1093/jnci/51.5.1409.
- Starker, Anne; Buttmann-Schweiger, Nina; Krause, Laura; Barnes, Benjamin; Kraywinkel, Klaus; Holmberg, Christine (2018): Krebsfrüherkennungsuntersuchungen in Deutschland: Angebot und Inanspruchnahme. Krebsfrüherkennungsuntersuchungen in Deutschland: Angebot und Inanspruchnahme. Springer. Online verfügbar unter <https://link.springer.com/article/10.1007/s00103-018-2842-8>, zuletzt aktualisiert am 31.03.2020, zuletzt geprüft am 31.03.2020.
- Sturtzel, Caterina (2017): Endothelial Cells. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1003, S. 71–91. DOI: 10.1007/978-3-319-57613-8_4.
- Sweeney, Elizabeth E.; McDaniel, Russell E.; Maximov, Philipp Y.; Fan, Ping; Jordan, V. Craig (2012): Models and Mechanisms of Acquired Antihormone Resistance in Breast Cancer: Significant Clinical Progress Despite Limitations. In: *Hormone molecular biology and clinical investigation* 9 (2), S. 143–163. DOI: 10.1515/hmbci-2011-0004.
- Thiery, Jean Paul (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (6), S. 442–454. DOI: 10.1038/nrc822.
- Thornhill, M. H.; Li, J.; Haskard, D. O. (1993): Leucocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926. In: *Scandinavian journal of immunology* 38 (3), S. 279–286. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1993.tb01726.x.
- Thorsten Schaff (2020): So häufig kommt Krebs in Deutschland vor. Online verfügbar unter <https://www.aerztezeitung.de/Medizin/So-haeufig-kommt-Krebs-in-Deutschland-vor-313195.html>, zuletzt aktualisiert am 30.01.2019, zuletzt geprüft am 31.03.2020.

Villanueva-Duque, Alfredo; Zuniga-Eulogio, Miriam Daniela; Dena-Beltran, Jose; Castaneda-Saucedo, Eduardo; Calixto-Galvez, Mercedes; Mendoza-Catalán, Miguel Angel et al. (2017): Leptin induces partial epithelial-mesenchymal transition in a FAK-ERK dependent pathway in MCF10A mammary non-tumorigenic cells. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 10 (10), S. 10334–10342.

Widel, Maria (2012): Bystander effect induced by UV radiation; why should we be interested? In: *Postepy higieny i medycyny doswiadczałnej (Online)* 66, S. 828–837. DOI: 10.5604/17322693.1019532.

Widel, Maria; Przybyszewski, Waldemar; Rzeszowska-Wolny, Joanna (2009): Popromienny efekt sasiedztwa, wazny element odpowiedzi na promieniowanie jonizujace - potencjalne implikacje kliniczne. In: *Postepy higieny i medycyny doswiadczałnej (Online)* 63, S. 377–388.

Wu, Simeng; Wang, Yajun; Yuan, Zhe; Wang, Siliang; Du, Hongmei; Liu, Xue et al. (2019): Human adipose-derived mesenchymal stem cells promote breast cancer MCF7 cell epithelial-mesenchymal transition by cross interacting with the TGF- β /Smad and PI3K/AKT signaling pathways. In: *1791-3004* 19 (1), S. 177–186. DOI: 10.3892/mmr.2018.9664.

Xu, Qilin; Wang, Liang; Li, Hongling; Han, Qin; Li, Jing; Qu, Xuebin et al. (2012): Mesenchymal stem cells play a potential role in regulating the establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition in MCF7 human breast cancer cells by paracrine and induced autocrine TGF- β . In: *International journal of oncology* 41 (3), S. 959–968. DOI: 10.3892/ijo.2012.1541.

Yang, Jing; Mani, Sendurai A.; Donaher, Joana Liu; Ramaswamy, Sridhar; Itzykson, Raphael A.; Come, Christophe et al. (2004): Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. In: *Cell* 117 (7), S. 927–939. DOI: 10.1016/j.cell.2004.06.006.

Yang, Jing; Weinberg, Robert A. (2008): Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. In: *Developmental cell* 14 (6), S. 818–829. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.05.009.

Yohan, Darren; Cruje, Charmainne; Lu, Xiaofeng; Chithrani, Devika (2015): Elucidating the Uptake and Distribution of Nanoparticles in Solid Tumors via a Multilayered Cell Culture Model. In: *Nano-micro letters* 7 (2), S. 127–137. DOI: 10.1007/s40820-014-0025-1.

Zainudin Nh, Mohd; R, Abdullah; W N, Rahman (2020): Bystander Effect Induced in Breast Cancer (MCF-7) and Human Osteoblast Cell Lines (hFOB 1.19) with HDR-Brachytherapy. In: *Journal of Biomedical Physics & Engineering* 10 (3), S. 319–328. DOI: 10.31661/jbpe.v0i0.1135.

Zheng, Weilong; Li, Jingda; Wang, Xudong; Yuan, Yanping; Zhang, Jianing; Xiu, Zhilong (2018): Effects of Antarctic krill docosahexaenoic acid on MCF-7 cell migration and invasion induced by the interaction of CD95 with caveolin-1. In: *Life sciences* 192, S. 270–277. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.11.011.

Thesen

Durch den Bystander-Effekt als wichtigen Wirkmechanismus ionisierender Strahlung wird neben dem direkten Effekt auf zusätzliche Weise ein Einfluss auf unbestrahlte Zellen ausgeübt.

In verschiedenen *In-vitro*-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde der Bystander-Effekt von humanen Endothelzellen auf humane Tumorzellen der Brust (MCF7-Zellen) näher charakterisiert. Dazu wurden das Wachstum, das klonogene Überleben, das Migrationsvermögen sowie die epithelial-mesenchymale Transition der Tumorzellen nach Inkubation mit Medium bestrahlter sowie unbestrahlter Endothelzellen (konditioniertes EC-Medium) analysiert.

Für das Wachstum der Tumorzellen ergab sich im zellspezifischen Medium eine Zellpopulationsverdopplungszeit von 32 Stunden. Im Endothelzell-(EC)-Medium war das Wachstum der Tumorzellen verringert (Zellpopulationsverdopplungszeit 37,5 Stunden).

Unter Einfluss des konditionierten Endothelzellmediums war das Wachstum der Tumorzellen erhöht. Die Zellpopulationsverdopplungszeit der Tumorzellen im konditionierten EC-Medium sank dabei auf 35 Stunden, im Vergleich zum EC-Medium mit 37,5 Stunden.

Eine vorherige Bestrahlung der Endothelzellen mit 8 Gy hatte keinen zusätzlichen Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen.

Im Koloniebildungstest zeigte sich für die bestrahlten MCF7-Zellen eine typische Überlebenskurve mit abnehmenden Überlebensraten bei steigenden Strahlendosen. Die SF2 betrug 0,46.

Das durch Endothelzellen (bestrahlt bzw. unbestrahlt) konditionierte Medium zeigte keine Modulation der Überlebensrate der unbestrahlten MCF7-Zellen.

Die Migration der Tumorzellen war im Tumorzellmedium zu allen Zeitpunkten höher als im EC-Medium, stieg in letzterem jedoch von 24 Stunden zu 48 Stunden deutlich an. Durch den Einfluss des konditionierten EC-Mediums wurde die Migration der Tumorzellen zu beiden beobachteten Zeitpunkten verringert.

Im Western Blot wurde die Proteinexpression von β -Catenin und Smooth-Muscle-Actin (SM-Actin) als Vertreter eines mesenchymalen Phänotyps in den Tumorzellen nachgewiesen. Mit Ausnahme der β -Catenin-Expression 48 Stunden nach Bestrahlung im konditionierten EC-Medium zeigte sich unabhängig von der Bestrahlungsdosis eine verringerte bzw. annähernd

identische Proteinexpression von β -Catenin als auch von SM-Actin durch den Einfluss der Endothelzellen.

Ein Bystander-Effekt der Endothelzellen auf die humanen Tumorzellen der Brust konnte nachgewiesen werden.