

Aus dem Institut für Pharmakologie und
Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. J.W. Fischer

Stromale Beeinflussung der Strahlensensitivität des Ösophaguskarzinoms

Dissertation

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

vorgelegt von
Janna Sophia Morawitz

2020

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Zusammenfassung

Mit über 6500 Neuerkrankungen pro Jahr ist das Ösophaguskarzinom die achthäufigste Krebserkrankung in Deutschland. Die 5-Jahres-Überlebensrate von knapp 25 % zeigt die ungünstige Prognose dieser Erkrankung. In vielen Fällen bildet die Bestrahlung eine wesentliche Säule der Therapie.

Aus Forschungsarbeiten der letzten Jahre ergeben sich Hinweise darauf, dass das Tumorstroma eine entscheidende Rolle bei der Reaktion eines Tumors auf ionisierende Strahlung spielt. Vorausgegangene Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass bestrahlte Fibroblasten zellkontaktabhängig die Tumorapoptoserate bei Ösophaguskarzinomzellen signifikant erhöhen (1). Die Hypothese, dass von bestrahlten Fibroblasten transferierte Proteine verantwortlich für diesen Effekt sind, konnte in dieser Arbeit durch einen neuartigen Trans-SILAC- Versuchsansatz belegt werden. Nach der Markierung der Fibroblasten mit Isotopen-haltigen Aminosäuren wurden die Fibroblasten mit Ösophaguskarzinomzellen kokultiviert, um den Transfer der Proteine zu ermöglichen. Nach einer durchflusszytometrischen Trennung der beiden Zelllinien konnte das Proteom der Ösophaguskarzinomzellen massenspektrometrisch auf enthaltene Isotopen-haltige (und somit aus Fibroblasten stammende) Proteine untersucht werden.

Die Analysen ergaben drei Proteine, die signifikant von bestrahlten Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen geschleust werden. Durch *Knockdown*-Versuche, Echtzeit-Mikroskopie sowie SubG1-Zellzyklusanalysen konnte gezeigt werden, dass eines dieser Proteine - SHANK1 – grundlegend an der Vermittlung des erhöhten Tumorzelltodes beteiligt ist. In weiteren Kokulturversuchen konnte belegt werden, dass auch die Apoptoserate weiterer Tumorzelllinien durch bestrahlte Fibroblasten signifikant erhöht werden kann.

Mechanismen, die darauf abzielen die Tumorzellen für ionisierende Strahlung zu sensitivieren, stellen somit einen potentiellen Ansatzpunkt für zukünftige Therapiestrategien des Ösophaguskarzinoms dar.

Summary

With more than 6500 new cases each year esophageal carcinoma is the eighth common cancer in Germany. The 5-year-survival-rate is about 25 % and shows this disease' unfavorable prognosis. In many cases, radiation is one of the essential parts of therapy.

Research studies in recent years showed, that especially the tumor microenvironment is an important determinant of radiation response. Previous results from this working group have shown that in case of esophageal carcinoma fibroblasts enhance tumor cell-apoptosis in a cell-contact dependent manner (1). The hypothesis that the shuttling of proteins from irradiated fibroblasts to esophageal cancer cells is responsible for this effect could be confirmed in this study by a novel Trans-SILAC approach. In cell culture, the fibroblasts proteome was labelled with amino acids containing heavy isotopes. Afterwards, labelled fibroblasts were cocultured with esophageal carcinoma cells, followed by cell-sorting via flow cytometric analysis. The esophageal carcinoma proteome was analyzed by mass spectrometry, to evaluate isotope-containing (and thus from fibroblasts originating) proteins.

The results of this analysis show that three proteins were significantly shuttled from irradiated fibroblasts to esophageal carcinoma cells. By the use of knock-down experiments, time-lapse microscopy as well as SubG1-cell cycle analysis, it could be proven that one of these three shuttled proteins - SHANK1 - is essentially involved in the process of increased tumor apoptosis. Further co-culture experiments show that also other tumor cell lines show an increased rate of apoptosis when cocultured with irradiated fibroblasts.

Mechanisms aiming at sensitizing tumor cells towards ionizing radiation could be a potential approach for future therapy strategies of esophageal carcinoma.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IVIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Ösophaguskarzinom	1
1.2 Ionisierende Strahlung und ihre Effekte	2
1.2.1 Ionisierende Strahlung in der Krebstherapie	2
1.2.2 Effekte auf zellulärer Ebene	3
1.3 Apoptose.....	4
1.3.1 Extrinsischer Apoptoseweg	4
1.3.2 Intrinsischer Apoptoseweg	5
1.3.3 Strahlenresistenz.....	5
1.4 Tumorstroma	7
1.4.1 Definition	7
1.4.2 Fibroblasten im Tumorstroma	8
1.5 Zelluläre Interaktion.....	9
1.5.1 <i>Tunneling Nanotubes</i>	10
1.6 Zielsetzung	11
2 MATERIAL & METHODEN	12
2.1 Materialien	12
2.1.1. Zellkultur	12
2.1.2. Chemische Substanzen und Kits	13
2.1.3. Puffer und Lösungen	13
2.1.4 Primer.....	13
2.2. Geräte	14
2.3. Zellkultur	14
2.3.1. Kultivierung	14

2.3.2. Transfektion der Fibroblasten.....	15
2.3.3. Kokultur-Versuche	15
2.4. Bestrahlung	16
2.5. Identifizierung der transferierten Proteine	16
2.5.1. Markierung mit „schweren“ Aminosäuren	16
2.5.2. Kokultur.....	17
2.5.3. FACS-Sorting.....	17
2.5.4. Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	18
2.5.5. Massenspektrometrische Analyse	19
2.6. Bestimmung der mRNA Expression	20
2.6.1. RNA-Isolation.....	20
2.6.2. RNA-Quantifizierung	21
2.6.3. cDNA-Synthese	21
2.6.4. Quantitative Real-Time PCR.....	22
2.7. Apoptose-Bestimmung.....	22
2.7.1. Zeitraffer-Mikroskopie.....	22
2.7.2. SubG1-Zellzyklus-Analyse	23
2.8. Statistische Auswertung.....	23
3 ERGEBNISSE.....	24
3.1. Trans-SILAC	24
3.2 <i>Knockdown</i>	32
3.2.1. <i>Knockdown</i> der 3 geschleusten Proteine in Fibroblasten	32
3.2.2. SubG1-Messung bei Kokulturen mit <i>Knockdown</i> -Fibroblasten	34
3.2.3. Zeitraffer Videos der Kokulturen mit <i>Knockdown</i> -Fibroblasten.....	36
3.4. SHANK1-Expression in Fibroblasten.....	37
3.3. Weitere Tumorzelllinien in Kokultur mit Fibroblasten	38
4 DISKUSSION	40
4.1 SHANK1 und seine potentielle Rolle bei der Apoptose-Induktion in Tumorzellen	40
4.2 NEFM und FAM115C als geschleuste Proteine	42
4.3 Möglicher Mechanismus des Protein-Transfers	44
4.4. Der Effekt bestrahlter Fibroblasten auf weitere Tumorzelllinien	45
4.5 Schlussfolgerungen.....	48
5 LITERATURVERZEICHNIS.....	49
6 DANKSAGUNG	59

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
APAF1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
BAIAP2	<i>Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2</i>
BAX	BCL2-assoziiertes X-Protein
BRAF	Rat fibrosarcoma Isoform B
CAF	Tumor-assoziiertes Fibroblast (<i>Cancer-associated fibroblast</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DLGAP1	<i>Disks large-associated protein 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ESCC	Ösophagusplattenepithelkarzinomzellen
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FAM115C	<i>Family With Sequence Similarity 115, Member C</i>
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GKAP	<i>guanylate kinase-associated protein</i>
Gy	Gray
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
HOMER1	<i>Homer Scaffolding Protein 1</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)

IGSF9	<i>Immunoglobulin Superfamily Member 9</i>
IL-8	Interleukin 8
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KRAS	Oncogen in Kirsten Rat Sarcoma Virus
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
miRNA	microRNA
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA
NEFM	<i>Neurofilament medium polypeptide</i>
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS</i>
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie
p53	Tumorprotein p53
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PSD	Postsynaptische Dichte (<i>postsynaptic density</i>)
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
rcf	Zentrifugalbeschleunigung (<i>relative centrifugal force</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut-Medium</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SHANK1	<i>SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 1</i>
SHARPIN	<i>SHANK-associated RH domain interacting protein</i>
SILAC	<i>Stable isotope labeling with aminoacids in cell culture</i>
siRNA	Interferenz-RNA (<i>small interfering RNA</i>)
SPTAN1	Spectrin alpha
SSTR2	Somatostatin Rezeptor Typ 2

TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNT	<i>Tunneling Nanotube</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAIL-R1	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptor 1</i>
TRAIL-R2	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptor 2</i>
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Tumorstromas
Abbildung 2	Tunneling Nanotube verbindet Fibroblast mit einer EpCAM-angefärbten Ösophagus-Karzinomzelle
Abbildung 3	Markierung der unterschiedlichen Populationen von Ösophaguskarzinomzellen und Fibroblasten beim FACS-Sorting
Abbildung 4	Exemplarische Darstellung des Absterbens einer Ösophagus-Karzinomzelle in der Zeitraffermikroskopie
Abbildung 5	Versuchsaufbau Trans-SILAC
Abbildung 6	<i>Knockdown</i> -Effizienzen der geschleusten Proteine
Abbildung 7	<i>Knockdown</i> von SHANK1 in Fibroblasten führt in Kokulturen von Ösophaguskarzinomzellen mit bestrahlten Fibroblasten zur Reduktion des Tumorzelltodes
Abbildung 8	Doppel- <i>Knockdown</i> von NEFM und FAM115C im Vergleich zum SHANK1- <i>Knockdown</i> in Fibroblasten
Abbildung 9	Exemplarische Darstellung der mikroskopischen Aufnahmen zum Startzeitpunkt und zum Endzeitpunkt der Zeitraffer-Mikroskopie
Abbildung 10	Steigerung der SHANK1-Expression in Fibroblasten nach Bestrahlung
Abbildung 11	Tumorzelltod verschiedener Zelllinien in Kokultur mit bestrahlten und unbestrahlten Fibroblasten

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Substanzen
Tabelle 2	Übersicht über die verwendeten Substanzen und Kits
Tabelle 3	Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen
Tabelle 4	Übersicht über die verwendeten Primer
Tabelle 5	Übersicht über die verwendeten Geräte
Tabelle 6	Von unbestrahlten Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen geschleuste Proteine
Tabelle 7	Von bestrahlten Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen geschleuste Proteine

1 EINLEITUNG

1.1 Ösophaguskarzinom

Beim Ösophaguskarzinom handelt es sich um eine maligne Neoplasie der Speiseröhre. Im Jahr 2012 wies es deutschlandweit eine Inzidenz von mehr als 6500 Erkrankungen auf, während die 5-Jahres Überlebensrate bei nur 15-25% liegt (2). Die Prognose der Inzidenz für 2016 lag bei mehr als 7200 Neuerkrankungen pro Jahr, was zeigt, dass die Häufigkeit dieser Erkrankung stetig zunimmt (3).

Histologisch unterscheidet man das Plattenepithelkarzinom, welches vor allem in den oberen zwei Dritteln des Ösophagus auftritt, vom Adenokarzinom, was sich fast ausschließlich im unteren Drittel der Speiseröhre entwickelt. Für beide histologischen Tumorentitäten sind Risikofaktoren bekannt, die das Auftreten der Erkrankung um ein Vielfaches erhöhen können. Während Rauchen das Risiko für beide Tumorarten erhöht, führt der Genuss von hochprozentigem Alkohol vor allem zur Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms (4, 5). Das Risiko für ein Adenokarzinom wird vor allem durch Adipositas, gastro-ösophagealen Reflux und einen Barrett-Ösophagus erhöht (6-8).

Insgesamt ist die Prognose für Patienten mit einem Ösophaguskarzinom schlecht, was vor allem darauf beruht, dass es schnell über das lymphatische System oder vaskulär metastasiert (9). Des Weiteren korreliert die Prognose in der Regel stark mit der Infiltrationstiefe des Primärtumors und der Anzahl an Lymphknotenmetastasen (10). Die Tatsache, dass viele Patienten im Stadium T2-T3 prätherapeutisch bereits Lymphknoten-Metastasen aufweisen, spiegelt somit die schlechten Überlebenschancen wieder (11). Zur Primärdiagnostik eignet sich am besten ein endoskopischer Ultraschall im Rahmen einer ÖGD (Ösophago-Gastro-Duodenoskopie) mit Biopsie-Entnahme (12).

Neben der endoskopischen Entfernung des Tumors als Therapiemöglichkeit bei Frühkarzinomen, sind vor allem die Chirurgie, die Chemotherapie und die Strahlentherapie die drei Säulen der Therapie des Ösophaguskarzinoms (10). In den meisten Fällen werden die Patienten dabei interdisziplinär und multimodal behandelt.

Ist der Tumor funktionell operabel, entscheidet vor allem das Stadium der Krebserkrankung über das weitere Vorgehen. In frühen Stadien (T1-T2) ist die chirurgische Resektion die Therapie der Wahl, während in fortgeschrittenen Stadien (T3-T4) entweder eine neoadjuvante oder definitive Radiochemotherapie Mittel der Wahl ist (10). In Studien konnte gezeigt werden, dass die Therapie im Sinne einer präoperativen Radiochemotherapie einen signifikanten Vorteil gegenüber einer alleinigen OP aufwies (13). Darüber hinaus kann bei einem Plattenepithelkarzinom die alleinige neoadjuvante Chemotherapie ohne simultane Bestrahlung nicht empfohlen werden (14). All dies weist auf die enorme Relevanz der Strahlentherapie beim Ösophaguskarzinom hin. Einer der Gründe, wieso die neoadjuvante Radiochemotherapie zu einem verbesserten Langzeitüberleben führt, ist, dass sie eine erhöhte R0-Resektionsrate ermöglicht und eine geringere lokoregionäre Rezidivneigung nach sich zieht (10).

1.2 Ionisierende Strahlung und ihre Effekte

1.2.1 Ionisierende Strahlung in der Krebstherapie

In der Medizin wird ionisierende Strahlung nicht nur als diagnostische Methode angewendet, sondern stellt auch eine wichtige Therapieform zur Behandlung von Tumorerkrankungen dar. Neben der chirurgischen Entfernung des Tumors und der Chemo-, Hormon- oder Immuntherapie ist die Radiotherapie eine der wesentlichen Säulen in der onkologischen Therapie. Rund 52 % aller Patienten mit einer malignen Tumorerkrankung erhalten eine Strahlentherapie (15). Aber nur in Fällen eines hinreichend strahlensensiblen Tumors wird eine Strahlentherapie allein angewendet (16).

Die Strahlentherapie kann in unterschiedlichen Formen und Kombinationen erfolgen. In Kombination mit Zytostatika wird sie häufig als (neo-)adjuvante Radiochemotherapie eingesetzt. Die präoperative Radiotherapie gilt hauptsächlich der Verkleinerung der Tumormasse, um bessere operative Bedingungen zu schaffen und um die Lokalrezidivrate zu senken. Die intraoperative Radiotherapie kann dann von Vorteil sein, wenn der Tumor nicht vollständig reseziert werden konnte und intraoperativ das Resttumorgewebe unter Schonung der angrenzenden Organe bestrahlt werden kann. Bei der

interstitiellen Radiotherapie werden Radionuklide direkt in das Tumorgewebe eingebracht. So können hohe Dosen im Zielvolumen mit einem steilen Dosisabfall zum Normalgewebe erreicht werden. Die interstitielle Radiotherapie wird häufig adjuvant und selten alleinig angewendet (16).

1.2.2 Effekte auf zellulärer Ebene

Ionisierende Strahlung hat zum einen direkte, zum anderen indirekte Wirkungen auf lebende Zellen. Bei der direkten Strahlenwirkung handelt es sich um die Energieabsorption der Strahlung, die darauf folgenden (chemischen) Reaktionen und die daraus resultierenden Schäden, die alle am gleichen Molekül ablaufen. Bei der indirekten Strahlenwirkung erfolgt die Energieabsorption und die darauf folgende Auslösung der biologischen Wirkung in verschiedenen Molekülen. Innerhalb weniger Millisekunden nach Strahlenexposition bilden sich freie Radikale in der Zelle. Darauf folgen enzymatische Reaktionen und Reparaturprozesse.

Durch direkte und indirekte Strahlenwirkung sowie durch fehlerhafte Reparaturmechanismen nach Bestrahlung entstehen DNA-Schäden, die zu einer so ausgeprägten Zellschädigung führen können, dass es zum Untergang der Zelle kommt. Neben der Basenmodifikation und den Einzel- oder Doppelstrangbrüchen, zählen auch DNA-Crosslinks zu den häufigsten DNA-Schäden, die nach Bestrahlung entstehen (17).

Da lebende Zellen zum Großteil aus Wasser bestehen, führt die Strahlenabsorption zur Bildung von Wasserradikalen, die dann wiederum mit biologischen Molekülen reagieren und so beispielweise Proteine oder die DNA schädigen. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die als Produkt der Wasser-Radiolyse entstehen, haben eine sehr kurze Halbwertszeit (18), während die Sauerstoffspezies, die infolge der Permeabilitätserhöhung der Mitochondrien freigesetzt werden, länger bestehen (19). Die schwerwiegendsten Folgen, die Strahlung für eine Zelle haben kann, sind somit die Proliferationshemmung und der Zelltod. Diese Effekte werden bei der Bestrahlung von Tumoren ausgenutzt.

1.3 Apoptose

Unter Apoptose versteht man einen physiologischen Vorgang des selbstinduzierten Zelluntergangs. Dieser Vorgang ist erforderlich, um beispielsweise einen normalen Zellumsatz, eine regelrechte Entwicklung eines Embryos oder ein funktionierendes Immunsystem zu gewährleisten. Während der Entwicklung und Reifung eines Organismus werden Zellteilung und Apoptose durch einen homöostatischen Mechanismus reguliert, um eine regelrechte Gewebsentstehung sicherzustellen. Bei vielen Erkrankungen, besonders bei Krebserkrankungen, gerät die Regulation der Apoptose außer Kontrolle.

Bei der Einleitung der Apoptose unterscheidet man zwischen einem intrinsischen und einem extrinsischen Weg. Beide Wege führen zu einer Kaskade, die durch die Aktivierung von Caspase-3 begonnen, und durch die Fragmentation der DNA, nukleärer Proteine und des Zytoskeletts beendet wird. Es werden apoptotische Körper geformt und Liganden für phagozytierende Zellen exprimiert. Ein weiterer, Caspase-unabhängiger Signalweg ist der Granzyme-Signalweg (20).

Strahlung führt meist zur Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges, allerdings kann abhängig von Dosis und Zelltyp auch der extrinsische Apoptoseweg aktiviert werden (17, 21).

1.3.1 Extrinsischer Apoptoseweg

Der extrinsische Signalweg wird über sog. „Todesrezeptoren“ auf der Zelloberfläche initiiert. Liganden dieser Rezeptoren sind die Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktoren(TNF)-Familie (22). Zu diesen Rezeptoren zählen *Fas* (CD95), *tumor necrosis factor α receptor 1* (TNFR1), *tumor necrosis factor α ligand-receptor 1*(TRAIL-R1, DR4), *tumor necrosis factor α ligand-receptor 2* (TRAIL-R2, DR5), DR3 und DR6. Werden die „Todesrezeptoren“ durch ihre Liganden aktiviert, z.B. durch *FasL/CD95 ligand* (CD95L), *TNF- α* oder *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), so aktivieren sie wiederum das intrazelluläre Adapterprotein *Fas-associated death domain protein* (FADD)(23). Dadurch werden verschiedene Caspasen zu einem Komplex (*death inducing signalling complex, DISC*) rekrutiert. Caspase 8 und Caspase 10 stellen dabei die Initiator-Caspasen dar.

1.3.2 Intrinsischer Apoptoseweg

Der intrinsische Apoptoseweg wird eingeleitet, wenn es zu komplexeren DNA-Schäden kommt, die durch die zelleigenen Reparaturmechanismen nicht mehr behoben werden können (24). Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der u.a. als Antwort auf ionisierende Strahlung exprimiert wird, ist p53. Durch diesen werden Zellen mit DNA-Läsionen daran gehindert, sich zu teilen; somit wird das Tumorwachstum gehemmt (25). Die Induktion von p53 durch ionisierende Strahlung führt beispielweise über die Aktivierung von p21 zum Zellzyklusarrest oder zur Seneszenz, durch *p53-upregulated modulator of apoptosis (PUMA)* oder *BCL2-associated X protein (BAX)* zur Apoptose oder durch PTEN zur Autophagie (26). BAX führt daraufhin zur Permeabilisation der äußeren mitochondrialen Membran, was dazu führt, dass Cytochrom C ins Zytoplasma freigesetzt wird (27). Die Freisetzung von Cytochrom C führt zur Bildung des Cytochrom C/APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*)/Caspase 9 Komplex. Caspase 9 wiederum aktiviert Caspase 7 und Caspase 3 (28).

1.3.3 Strahlenresistenz

Verschiedene Zellen bzw. Gewebe reagieren unterschiedlich sensibel auf ionisierende Strahlung. Besonders strahlensensibel sind sich schnell teilende Zellen, wie z.B hämatopoetische Stamm- oder Progenitorzellen, Keimzellen oder das Epithel des Magen-Darm-Traktes. Daher zählt die Immundepression zu den akuten Reaktionen nach Bestrahlung, die schon in Folge von 0,5-4 Gy bei einer Ganzkörperexposition auftreten kann (29). Knochen- oder peripheres Nervengewebe hingegen ist weniger strahlensensibel. Dort können Dosen von über 50 Gy toleriert werden, bevor es zu Strahlenfolgen wie der aseptischen Knochennekrose oder Lähmungserscheinungen kommt (16). Außerdem haben sich viele Tumorarten als strahlenresistent erwiesen. Die Strahlentherapie ist besonders bei malignen Melanomen, Osteo- oder Fibrosarkomen oder Nierenzellkarzinomen bisher keine kurative Therapieoption (30-33). Die Entwicklung einer Strahlenresistenz stellt besonders bei nicht operablen oder schnell rezidivierenden Tumoren ein großes Problem dar, da sie die Möglichkeiten der Tumorkontrolle und die Prognose der Patienten dramatisch verschlechtert.

Der meist untersuchteste Mechanismus der Strahlenresistenz ist die Hypoxie. Vermindert oxygenierte Tumoren sprechen schlechter oder nur verzögert auf eine Strahlentherapie an. Zudem wird eine vermehrte Expression des EGFR mit einer erhöhten Entwicklung von Strahlenresistenzen assoziiert (34). Auch der dem EGFR nachgeschaltete PI3K/AKT Signalweg wird mit der Entwicklung von Strahlenresistenzen in Verbindung gebracht (35).

Auch beim Ösophaguskarzinom stellt die Strahlenresistenz ein therapeutisches Problem dar, wenn der Tumor nicht resektabel ist und die Chemo- oder Strahlentherapie die einzig verbleibende Therapieoption ist. Qin *et al.* konnten zeigen, dass der Survivin-Inhibitor YM155 Ösophagus-Plattenepithel-Karzinomzellen für Strahlung sensitivieren kann, indem er den strahlungsinduzierten G2/M Zellzyklus-Arrest verhindert (36). Von Che *et al.* konnte gezeigt werden, dass der Cyclooxygenase-2-Hemmer NS398 zu einer verminderten Expression des Stammzellmarkers β -Catenin und zu einer erhöhten Radiosensitivität führte (37). Auch Mechanismen von ösophagealen Krebs-Stammzellen sind zur Entstehung von Strahlenresistenzen beschrieben: Zum einen konnte belegt werden, dass in Krebs-Stammzellen vermehrt DNA-Reparaturmechanismen stattfinden (38), zum anderen ist beschrieben, dass diese Stammzellen ein höheres Level an Enzymen exprimieren, die reaktive Sauerstoffspezies abbauen (39). Bisher hat keiner dieser Ansätze Anwendung im klinischen Alltag gefunden. Zusätzliche Möglichkeiten, die Tumorzellen für ionisierende Strahlung zu sensibilisieren, werden daher dringend benötigt.

Bisher ist nur wenig darüber bekannt, wie die Interaktion von ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen mit umgebenden Zellen des Tumorstromas – wie Fibroblasten – die Strahlensensitivität der Tumorzellen beeinflussen kann. Lediglich Zhang *et al.* beschreiben, dass CAFs durch die Expression von CXCL1 zu einer erhöhten Strahlenresistenz in ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen führen. Weitere Studien thematisieren die erhöhte Rate der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition unter Bestrahlung bei der Interaktion von CAFs mit ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen (40). Jedoch sind bisher keine Mechanismen bekannt, die bestrahlungsinduziert die zellkontaktabhängige Interaktion von Fibroblasten und Ösophaguskarzinomzellen beeinflussen.

1.4 Tumorstroma

1.4.1 Definition

Das Tumorstroma ist ein essentieller Bestandteil aller soliden malignen Tumoren. Es enthält vor allem Zellen wie Fibroblasten, Myofibroblasten, Immunzellen, Endothelzellen, neuroendokrine Zellen, Adipozyten sowie die extrazelluläre Matrix (EZM)(41). Die Interaktion dieser verschiedenen Bestandteile steuert unter dem Einfluss von umgebenden Faktoren, wie z.B. dem pH-Wert, der Sauerstoffversorgung oder löslichen Faktoren, unter anderem das Tumorwachstum, die Chemo- oder Strahlenresistenz oder die Metastasierung von Krebszellen (42, 43).

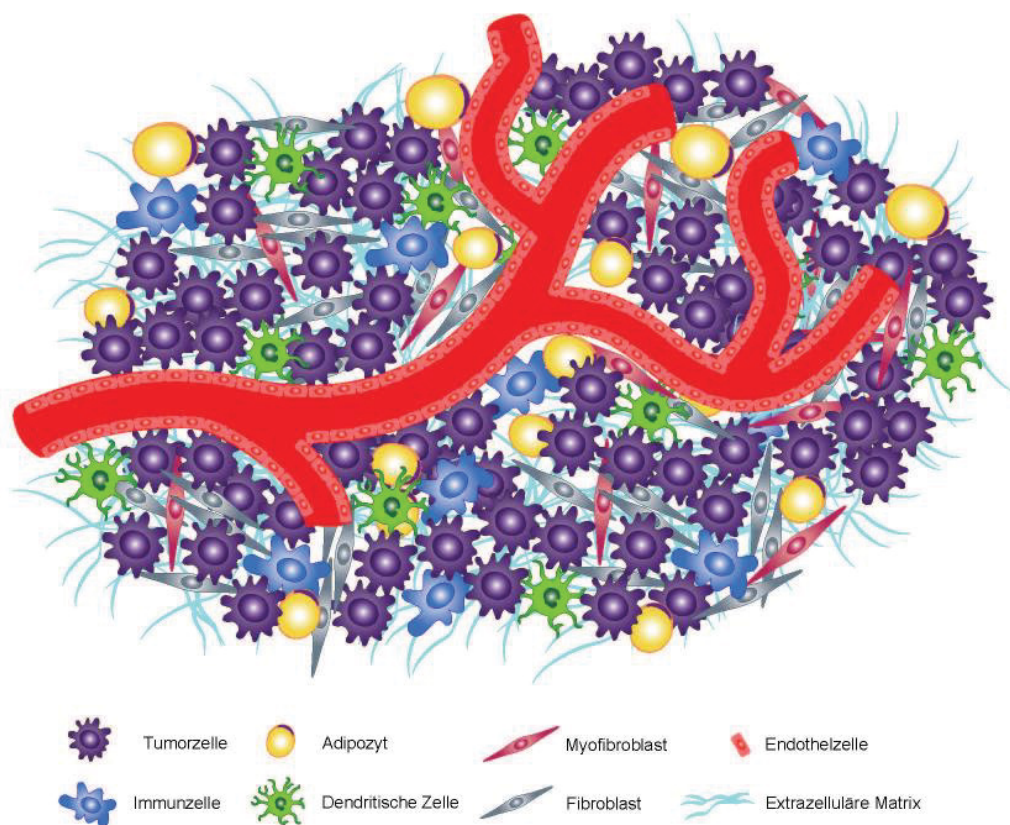


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Tumorstromas. Das Tumorstroma besteht u.a. aus verschiedenen Zellarten, wie Fibroblasten, Myofibroblasten, Immunzellen oder Fettzellen und der extrazellulären Matrix.

1.4.2 Fibroblasten im Tumorstroma

Während in den vergangenen Jahrzehnten vor allem die genomischen und physiologischen Veränderungen der entarteten Zellen im Fokus der Forschung standen, wurde in den letzten Jahren zunehmend die Bedeutung der Interaktion von Tumorzellen mit den umgebenden Stromazellen erkannt (44).

Als wichtiger Zelltyp des Tumorstromas ist vor allem der (Myo-) Fibroblast verantwortlich für die Synthese der Hauptbestandteile der EZM, wie verschiedenen Kollagenen, Hyaluronsäure, proteolytischen Enzymen oder Proteoglykanen (45). Fibroblasten sind u.a. durch die mesenchymal-epitheliale Interaktion mit angrenzenden Epithelzellen sowie durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren beteiligt an der Regulation der epithelialen Differenzierung, inflammatorischer Prozesse und der Wundheilung (46). Das Stroma eines Tumors kann mit dem einer heilenden Wunde verglichen werden und wird diesbezüglich als „reaktives Stroma“ bezeichnet (47). Fibroblasten, die aus einer Wunde isoliert werden, sezernieren höhere Level an EZM Molekülen, verglichen mit Fibroblasten aus gesunden Organen (48). Sowohl in Wunden als auch in Neoplasien können Fibroblasten ihren Phänotyp zu Myofibroblasten verändern (49). Diese „aktivierten“ Fibroblasten bzw. die als „cancer-associated fibroblasts (CAF)“ bezeichneten Fibroblasten können aus verschiedenen umgebenden Zellen entstehen, so zum Beispiel aus Endothelzellen, mesenchymalen Stammzellen, hämatopoetischen Vorläuferzellen oder ruhenden Gewebsfibroblasten (50). In Folge ihrer Aktivierung exprimieren CAFs im Gegensatz zu ruhenden Gewebsfibroblasten vermehrt Proteine wie *fibroblast-specific-protein* (FSP-1), *fibroblast-activating-protein* (FAP), *alpha-smooth-muscle-actin* (α -SMA), sie produzieren zudem vermehrt Zytokine und Chemokine wie IL-6, CXCL-8 und Wachstumsfaktoren wie TGF- β . All diese löslichen Faktoren sind zudem daran beteiligt, die CAFs dauerhaft in einen „aktivierten“ Zustand zu versetzen (51).

Die Aktivierung kann durch verschiedene Impulse während einer Gewebeläsion eingeleitet werden, beispielsweise durch Wachstumsfaktoren, Zell-Zell-Kontakte, Adhäsionsmoleküle, die mit Immunzellen interagieren, oder aber durch reaktive Sauerstoffspezies oder microRNA (52-54). Diese aktivierten Fibroblasten und CAFs sind dann in der Lage, die EZM umzugestalten, die Angiogenese zu

beeinflussen, inflammatorische Zellen zu rekrutieren und die Tumorzellproliferation zu fördern (52).

Allerdings wurden nicht nur tumorfördernde, sondern auch tumorsuppressive Effekte von Fibroblasten beschrieben. So können Fibroblasten TGF- β produzieren, was unterschiedliche Auswirkungen auf maligne Zellen haben kann (55). Während der Tumorentstehung kann TGF- β als ein Tumorsuppressor agieren, indem es das Tumorwachstum durch Beeinflussung des SMAD-, JNK- und p38-Signalweges hemmt (56-60). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bestrahlte Fibroblasten in Mäusen eine anti-tumorale Immunantwort bei Kolonkarzinomen hervorrufen. So kann das Tumorwachstum durch bestrahlte Fibroblasten hinausgezögert werden (61).

Auch die Tumorzellen selbst haben Einfluss auf die EZM. Twarock *et al.* beschrieben 2011, dass Ösophaguskarzinomzellen ein erhöhtes Level der Hyaluronsäure-Synthase 3 exprimieren. Da die Zellen die Hyaluronsäure der EZM für ihren proliferativen Phänotyp benötigen, konnte ein verminderter Tumorprogress unter Inhibition der Hyaluronsäure-Synthase 3 beobachtet werden (62).

1.5 Zelluläre Interaktion

Ein wichtiger Aspekt, wie die Strahlenantwort innerhalb des Tumors moduliert werden kann, ist die Zell-Zell-Kommunikation zwischen Tumorzellen und dem Tumorstroma, insbesondere die interzelluläre Kommunikation zwischen Fibroblasten und den Tumorzellen.

Zell-Zell-Kommunikation ist ein überlebenswichtiger Mechanismus und essentiell für die Weitergabe von Informationen in einem multizellulären System. Besonders im Tumor bzw. Tumorstroma trägt die zelluläre Interaktion entscheidend zur Progression des Tumors bei. Die bisher am intensivsten untersuchten Mechanismen der Kommunikation im Tumor sind lösliche Faktoren wie Chemokine (63), extrazelluläre Vesikel (64) und Verschlusskontakte (sog. *tight*-, *adherence*- und *gap-junctions*) (65).

Seit einiger Zeit ist zudem ein weiterer Mechanismus bekannt, durch den Zellen kommunizieren können: *Tunneling Nanotubes* (TNTs).

1.5.1 Tunneling Nanotubes

Erstmals beschrieben wurden *Tunneling Nanotubes* (TNTs) 2004 von Rustom *et al.* als dünne Membranbrücken zwischen P12 Phäochromozytomzellen, die einen interzellulären Austausch von Zellorganellen ermöglichen (66). Seitdem wurden TNT-Formationen in einem breiten Spektrum an nicht entarteten Zellen beschrieben (67-71). Aber auch in verschiedensten Tumorzelllinien konnten sie nachgewiesen werden (72-74). TNTs dienen als interzelluläre Brücken, über die Zellorganellen wie der Golgi-Apparat oder Mitochondrien transportiert werden können; aber auch weitere Biomoleküle, Proteine oder Pathogene, wie Viren, können so von einer Zelle in die nächste gelangen (69), (75-77). TNTs können eine Länge von mehreren Zelldurchmessern erreichen und haben einen Durchmesser von 50-200 nm (66). Die Zusammensetzung der TNTs variiert je nach ihrer Größe: Kleinere TNTs mit einem Durchmesser von bis zu 100 µm bestehen hauptsächlich aus F-Aktin, während größere TNTs (>100 µm) sowohl F-Aktin als auch Mikrotubuli enthalten (66), (77), (78). Die TNT-Bildung kann durch Substanzen wie Cytochalasin B/D oder Latrunculin B verhindert werden (79-81).

Die TNT-Formation wurde zuerst nur zwischen Zellen gleicher Zelllinien vermutet (75), später stellte man fest, dass auch unterschiedliche Zellarten durch TNTs in Verbindung stehen können (82). Während die ersten Untersuchungen zu TNTs hauptsächlich *in vitro* stattfanden, konnte Chinnery *et al.* 2008 erstmals TNTs *in vivo* darstellen (83). 2012 konnten dann TNTs in Tumoren von Patienten, die an einem Mesotheliom erkrankt waren, nachgewiesen werden (75).

TNTs stellen somit eine neuartige Zellverbindung dar, über die auch räumlich entfernte Zellen miteinander kommunizieren können.

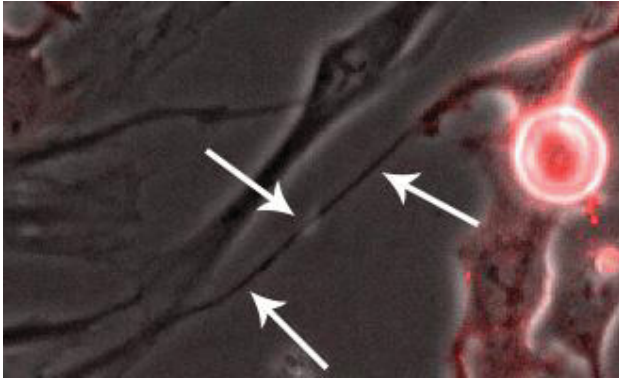


Abb. 2: Tunneling Nanotube verbindet Fibroblasten mit einer EpCam-angefärbten Ösophagus-Karzinomzelle.

1.6 Zielsetzung

Daten aus der Arbeit von Dr. Alexandra Schütze haben gezeigt, dass bestrahlte Fibroblasten in Kokultur mit Ösophaguskarzinomzellen zellkontaktabhängig die Apoptoserate der Tumorzellen signifikant erhöhen (1).

Ziel dieser Arbeit war es, einen neuartigen Trans-Silac Ansatz zu etablieren, um Proteine zu identifizieren, die von bestrahlten Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen geschleust werden. Es sollten Proteine identifiziert werden, die aus bestrahlten Fibroblasten stammen und Apoptose in Ösophaguskarzinomzellen vermitteln. In weiteren Zelllinien sollte der Tumorapoptose-fördernde Effekt von bestrahlten Fibroblasten Anwendung finden.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1. Zellkultur

	Hersteller
DMEM	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornien, USA
RPMI	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornien, USA
PBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornien, USA
Trypsin-EDTA (10x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornien, USA
Trypanblau	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
FCS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornien, USA
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornien, USA
L-Arginin schwer	Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, Massachusetts, USA
L-Lysin schwer	Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, Massachusetts, USA
Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glutamin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornien, USA
DMEM	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland

Tabelle 1: Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Substanzen.

2.1.2. Chemische Substanzen und Kits

	Hersteller
Propidiumiodid	Milipore Guava Cell Cycle Reagent, Merck Milipore, Burlington, Massachusetts, USA
siRNA	Qiagen FlexiTube siRNA, Venlo, Niederlande
Lipofectamin	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Ethanol	VWR Chemicals AnalaR Normapur, Radnor, Pennsylvania, USA
Isopropanol	Carlo Erba, Val-de-Reuil, Frankreich
Chloroform	VWR Chemicals AnalaR Normapur, Radnor, Pennsylvania, USA
Trizol	peqLab peqGOLD TriFast, VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA
Kit cDNA	Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit, Venlo, Niederladen

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Substanzen und Kits.

2.1.3. Puffer und Lösungen

Lysepuffer SubG1	0,1% NatriumCitrat 0,1% Triton X100
------------------	--

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen.

2.1.4 Primer

Primer	Forward-Primer (5' -> 3')	Reversed Primer (5' -> 3')
GAPDH	GTGAAGGTCGGAGTCAAGC	TGAGGTCAATGAAGGGGTC
SHANK1	AGACCATCAGTGCAAGCGAA	CAGGAAAGAAGGACGCTCGT
NEFM	CAGGACCTCCTCAACGTCAA	ATTGTGATTGGGGGTCGGTG
FAM115C	CTGTGCCTGCCCCATACTAC	GGTTGGCACTGTCAGGATGA

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer.

2.2. Geräte

Zentrifuge	Heraus sepatech Megafuge 1.0
	Eppendorf Centrifuge 5424
Zellzählgerät	Countess automated cell counter, Invitrogen
Zellkultur-Werkbank	Thermo Scientific SAFE2020
Mikroskop	Zeiss AxioObserver.Z1 mit ApoTome.2
FACS	Milipore guava easyCyte
cDNA Cyler	Eppendorf Master Cyler gradient
qRT-PCR Gerät	Applied Biosystems StepOnePlus
Brutschrank	Heracell 150i
Photometer	peqLab Nanodrop 1000 Spectrophotometer
Wasserfilter	Milipore Biocel 0,22 µM
Wasserbad	Julabo SW-20C

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Geräte.

2.3. Zellkultur

2.3.1. Kultivierung

Humane dermale Fibroblasten (NHDF, PromoCell, Heidelberg) wurden in *high glucose* (4,5 g/L Glukose) *Dulbeccos Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco, Carlsbad) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (Gibco, Carlsbad) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, Carlsbad) bei 37 °C und 5 % CO₂ als Monolayer bis zur Konfluenz kultiviert.

Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (Gibco, Carlsbad) gewaschen, bevor sie mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (TE) (Gibco, Carlsbad) für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die doppelte Menge an DMEM mit 10 % FCS hinzugegeben und die Zellsuspension in ein steriles Falcon überführt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium gelöst. Mit Hilfe von 0,4 %-iger Trypanblau-Lösung wurden 10 µL der Zellsuspension zum Färben der Zellen genutzt und die Lebendzellzahl

durch elektronische Zellzählung (Countess, Invitrogen, Carlsbad) bestimmt. Zwischen den Passagen 2 bis 15 wurden die Zellen für Versuche verwendet und dazu in 12-Loch-Platten mit einer Zellzahl von 12.500/cm² ausgesät.

Die humane Ösophaguskarzinomzelllinie KYSE410 (DMSZ, Braunschweig) wurde in RPMI-1640-Medium (Gibco, Carlsbad) unter Zusatz von 10 % FCS (Gibco, Carlsbad) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, Carlsbad) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Erreichen einer 90 %igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert und für Versuche in einer Dichte von 5.000/cm² ausgesät.

2.3.2. Transfektion der Fibroblasten

Die Transfektion der humanen Fibroblasten mit kurzer interferierender RNA (siRNA) (FlexiTube Qiagen, Hilden) wurde in 12-Loch-Platten durchgeführt. Dazu wurde Lipofectamin RNAiMAX (Life Technologies, Carlsbad) in einer Konzentration von 2 µL pro mL Medium eingesetzt.

Zunächst wurden Lipofectamin RNAiMAX und die siRNA in einer Endkonzentration von 10 nM in einer Lochung einer 12-Loch-Platte für 20 Minuten inkubiert, bevor die Fibroblasten in einer Zellzahl von 12.500/cm² in diese Lochung ausgesät wurden. Für die Transfektion wurde antibiotika- und serumfreies DMEM benutzt. Nach der Aussaat der Zellen in die Lipofectamin/siRNA-Lösung, wurde 10 % FCS in die Lochung hinzugegeben.

Die Fibroblasten wurden für 48 Stunden in diesem Medium gehalten, bevor sie entweder für die Testung der Transfektions-Effizienz geerntet oder für Kokulturversuche aus der Lochung gelöst wurden.

Mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurde die Transfektionseffizienz getestet. Eine Reduktion der Expression um mind. 50 % wurde als ausreichend erachtet.

2.3.3. Kokultur-Versuche

NHDF wurden mit einer Zellzahl von 12.500/cm² in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin auf einer 12-Loch-Platte ausgesät. Separat davon wurden KYSE410 mit einer Zellzahl von 5.000/cm² in RPMI-1640-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ebenfalls auf einer 12-Loch-Platte ausgesät.

Nach 24 Stunden erfolgte die Bestrahlung mit 2 Gy (siehe 2.4.).

48 Stunden nach der Aussaat wurden die Fibroblasten nach Waschen mit PBS durch Trypsin/EDTA aus den Lochungen gelöst, für 5 Minuten bei 300 rcf zentrifugiert, in serumfreiem RPMI-1640-Medium gelöst und zu den Ösophaguskarzinomzellen pipettiert. Für die Kokultur wurde das serumhaltige RPMI, welches für die Aussaat der KYSE410-Zellen benutzt wurde, gegen serumfreies RPMI ersetzt.

Die Zelllinien wurden für 48 Stunden in Kokultur gehalten, bevor sie für weitere Analysen geerntet wurden.

2.4. Bestrahlung

24 Stunden nach Aussaat wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt. Hierzu wurde das Bestrahlungsgerät *Xray RS225* (Gulmay, Camberley) mit 150 kV, 15 mA und einem 0,2 mm Kupferfilter benutzt.

Die 12-Loch Platten wurden einzeln in den auf 33 °C vorgeheizten Inkubationsraum gestellt und für eine Dosis von 2 Gy für 2 Minuten und 47 Sekunden bestrahlt.

Die Bestrahlung fand im Labor für Molekulare Radioonkologie (Leitung Prof. R. Jänicke) der Universitätsklinik Düsseldorf statt.

2.5. Identifizierung der transferierten Proteine

2.5.1. Markierung mit „schweren“ Aminosäuren

Zur Identifizierung der geschleusten Proteine, die von Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen transferiert werden, wurde das Proteom der Fibroblasten mit schweren Aminosäuren gekennzeichnet. Für diese Kennzeichnung wurde „schweres“ Arginin und Lysin verwendet, welches mit den Isotopen ^{13}C , ^{15}N und ^2H markiert war.

Für die Herstellung des „schweren“ Mediums wurde DMEM (PAN-Biotech, Aidenbach) ohne Arginin, Lysin, Glutamin und Pyruvat verwendet und mit 0,3981 mM „schwerem“ Arginin (L-Arginine, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) und 0,79781 mM „schwerem“ Lysin (L-Lysine, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) versetzt. Diese Konzentrationen entsprechen den Konzentrationen des DMEMs, welches für die normale Kultivierung der

Fibroblasten in der Zellkultur verwendet wurde (s. 2.3.1.). Da auch Glutamin (Gibco, Carlsbad) bzw. Pyruvat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) Bestandteil dieses DMEMs waren, wurden diese in einer Konzentration von 4 mM bzw. 1 mM zugesetzt. Anschließend wurde dem Medium 10 % dialysiertes fötales Kälberserum (FCS) (Gibco, Carlsbad) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, Carlsbad) zugesetzt.

Zur Kennzeichnung wurden die Fibroblasten für 9 Passagen in „schwerem“ Medium kultiviert. Für das Passagieren wurde der Zellrasen für 3 Minuten mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor der Vorgang mit der doppelten Menge an FCS-haltigem Medium abgestoppt wurde. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 300 rcf zentrifugiert und in einem Verhältnis von 1:2 in einer neuen Erhaltungsflasche ausgesät. Alle 3 - 4 Tage wurden die Zellen passagiert.

Die Effizienz der Kennzeichnung mit schweren Aminosäuren wurde von Dr. Waldera-Lupa (Molecular Proteomics Laboratory, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) überprüft. Als Kontrolle wurden parallel auch Fibroblasten in normalem Medium kultiviert.

2.5.2. Kokultur

Gemäß dem Kokultur-Protokoll (s. 2.3.3.) wurden die Fibroblasten mit einer Zellzahl von 12.500/cm² und die Ösophaguskarzinomzellen KYSE410 mit einer Zellzahl von 5.000/cm² ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt (s. 2.4.) und nach weiteren 24 Stunden kokultiviert. Für die Kokultur wurde FCS-freies RPMI-1640-Medium verwendet.

2.5.3. FACS-Sorting

Um die Zelllinien nach der Kokultur wieder voneinander zu trennen, wurden die Zellen, wie unter 2.5.1, beschrieben mit einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und zusammen mit dem vorab abgenommenem Zellüberstand zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, bevor sie für 5 Minuten in einer 0,5 %-igen FCS/PBS Lösung mit dem epithelialen Zelladhäsionsmolekül EpCAM (Miltenyi, Bergisch Gladbach) in einer Konzentration von 1:25 für mindestens 10 Minuten inkubiert wurden.

Anschließend erfolgte das Sortieren in die einzelnen Zelllinien durch einen MoFlo XDP (Beckmann Coulter, Krefeld) in der Core Facility der Universitätsklinik Düsseldorf unter der Anleitung von Katharina Raba. Die Zellen wurden in EpCAM-positive Ösophaguskarzinomzellen (KYSE410) und EpCAM-negative Fibroblasten sortiert (s. Abb. 3). Die sortierten Zellen wurden zentrifugiert und das Zellpellet bis zur Proteom-Analyse bei -80 °C gelagert.

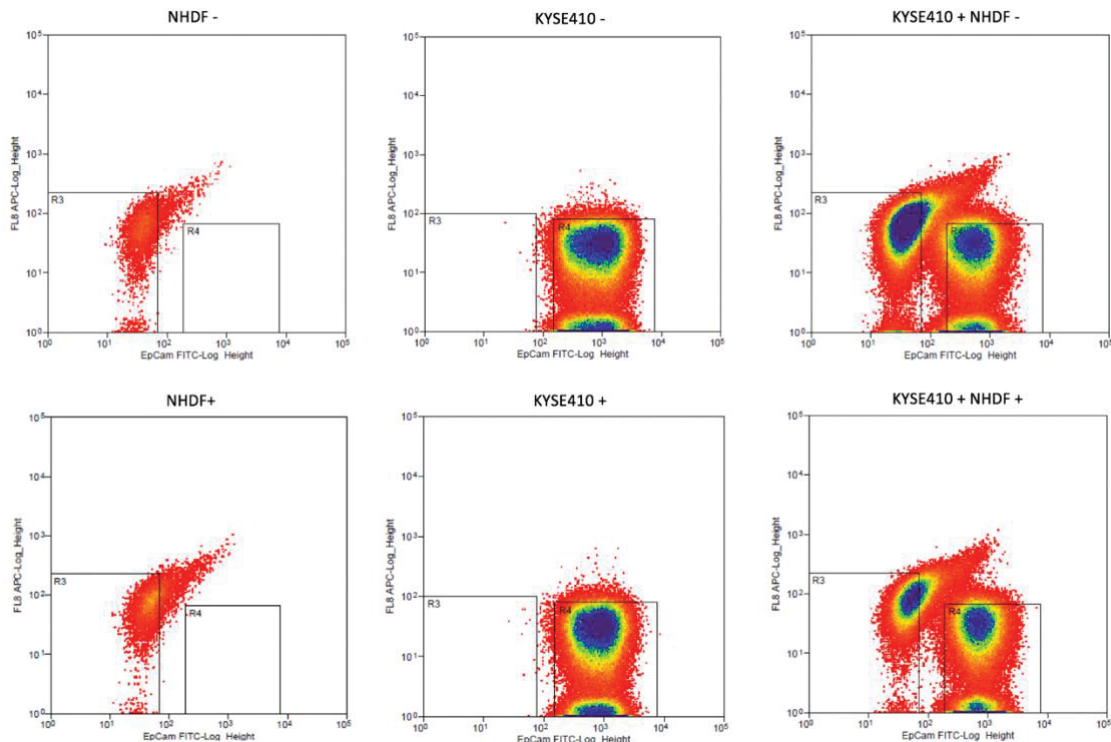


Abb. 3: Markierung der unterschiedlichen Populationen von Ösophaguskarzinomzellen und Fibroblasten beim FACS-Sorting. NHDF, Fibroblasten. KYSE410, Ösophaguskarzinomzellen. +, 2 Gy. -, unbestrahlt (0 Gy).

2.5.4. Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

Sowohl die Aufbereitung der Zellen, als auch die Durchführung der Massenspektrometrie wurden freundlicherweise von Dr. Waldera-Lupa und Prof. Stühler des *Molecular Proteomics Laboratory* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die nach dem FACS-Sorting erhaltenen Ösophaguskarzinomzellen wurden in Urea-Puffer homogenisiert und lysiert (2 M Thiourea, 7 M Urea, 30 mM Tris-HCL, pH 8,0). Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels *BCA Protein-Assay* (Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA) ermittelt und 10 µg jeder Probe

wurden mit Trypsin proteolytisch verdaut. Die Proteine wurden dazu mit 10 mM Dithiothreitol bei 56 °C für 45 Minuten in Amicon Ultra Filtern (3 kDa *cut-off*; Millipore, Billerica, USA) inkubiert. Im Folgenden wurde 0,55 M Iodacetamid dem Gemisch hinzugefügt und für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde dann für 30 Minuten bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Als nächstes wurden 50 mM Ammonium-hydrogencarbonat hinzugefügt und für weitere 60 Minuten bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Für den Verdau der Proteine wurde Trypsin im Verhältnis von 1:50 hinzugefügt. Der Proteinverdau wurde bei 37 °C für 12 Stunden durchgeführt. Der Verdau wurde mittels 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gestoppt.

2.5.5. Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse des Proteoms wurde mittels eines LC-MS/MS Systems durchgeführt. Die Proben wurden mit Hilfe eines Nano-HPLC/ESI-MS Systems, bestehend aus einer RSLCnano U3000 HPLC und einem LTQ Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Bremen) Massenspektrometer analysiert. Jede Probe wurde auf eine C₁₈ Vorsäule geladen (2 cm × 100 µm × 5 µm, 100 µm, Thermo Fisher Scientific) und für 10 Minuten mit 0,1 % TFA entsalzt. Im Weiteren wurden die Peptide von der Vorsäule eluiert und mit Hilfe einer analytischen Säule getrennt (120 Minuten Gradient mit einer Flussrate von 300 nL/min) (Acclaim PepMap RSLC C₁₈; 25 cm × 75 µm × 2 µm, 100 µm, Thermo Fisher Scientific) und anschließend mittels Elektrosprayionisation (ESI) in das Massenspektrometer gesprüht. Die Parameter des Massenspektrometers waren wie folgt gewählt: ESI-Spannung, 1,4 kV; Transferkapillar-Temperatur, 275 °C; Kollisionsgas, Helium; Kollisionsgas-Druck, 1,4 mTorr; normalisierte Kollisions-Energie für das MS/MS, 35 %. Die MS-Spektren wurden in einem Massenbereich von 300-1500 *m/z* und mit einer Auflösung von 60.000 akquiriert. Für die Generierung der MS/MS-Spektren wurde eine TOP4 datenabhängige Akquisition gewählt, um automatisch zwischen MS und MS/MS zu wechseln. Für die MS/MS-Analyse wurden die Mutterionen mit einer Isolationsbreite von 2 *m/z* isoliert und durch Kollisions-induzierte Dissoziation fragmentiert. Der Schwellenwert für die Auswahl der Mutterionen lag bei einer Intensität von 500 auf MS-Ebene. Mutterionen, die für

MS/MS ausgewählt wurden, wurden für 45 Sekunden dynamisch exkludiert. Die Masse von Polysiloxan wurde für die Rekalibrierung der Spektren verwendet.

2.5.6. Proteinidentifizierung

Für die Protein-Identifizierung wurden der *Proteome Discoverer* (Version 1.4, Thermo Fisher Scientific) und der Suchalgorithmus *MASCOT* (Version 2.4.1, Matrix Science, London, UK) verwendet. Die MS/MS-Spektren wurden gegen die *UniProtKB* Datenbank abgeglichen. Folgende Suchparameter wurden verwendet: Enzyme, Trypsin; überlesene Schnittstellen, 2; Taxonomie, *homo sapiens*; Mutterionen-Toleranz, 10 ppm; Fragmentionen-Toleranz, 0,4 Da; Oxidation von Methionin, schweres Arginin (*Label*: $^{13}\text{C}(6)^{15}\text{N}(4)$) und schweres Lysin (*Label*: $^2\text{H}(4)$) als dynamische Modifikation; Carbamidomethylierung von Cystein als fixierte Modifikation. Für die Analyse von schweren Peptiden/Proteinen wurde die *false-discovery-rate* auf Peptid-Ebene auf 5 % gesetzt. Nur Peptide mit einem *MASCOT-Score* von >20 wurden für weitere Analysen verwendet. Des Weiteren wurden nur Peptide zur weiteren Analyse verwendet, die in mindestens 3 von 5 Replikaten pro Bedingung gefunden wurden.

Die Quantifizierung wurde mittels *Progenesis Q1 for proteomics* (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) durchgeführt. Mindestens 2 einzigartige Peptide pro Protein wurden für die Quantifizierung benötigt. Für die Quantifizierung wurde die *false-discovery-rate* auf Peptid-Ebene auf 1 % gesetzt. Nur Proteine mit einem *MASCOT-Score* von >50 wurden zur weiteren Analyse herangezogen. Für die statistische Analyse der Proteome wurde die ANOVA angewendet. Dazu wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant angesehen.

2.6. Bestimmung der mRNA Expression

2.6.1. RNA-Isolation

Das Medium wurde aus den 12-Loch-Platten abgesaugt und der Zellrasen mit 1 mL PBS gewaschen, bevor die Zellen in 1 mL peqGOLD TriFast (PeqLab, Erlangen) für 15 Minuten lysiert wurden. Anschließend wurde das Lysat in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 200 μL Chloroform hinzugegeben. Nach 5-

maligem kurzen Vortexen wurde für 15 Minuten bei 21.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch entstanden aus dem Gemisch drei unterschiedliche Phasen, wobei sich die RNA nur in der obersten, wässrigen Phase löste. Diese wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zugabe einer gleichen Menge Isopropanol wurde die RNA über Nacht bei -20 °C ausgefällt.

Danach wurde die ausgefällte RNA 45 Minuten bei 21.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 1 ml 75 %-igem Ethanol. Nach weiteren 15 Minuten Zentrifugation bei 21.000 x g wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet 20 Minuten an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde danach in 20 µL RNase-freiem Wasser gelöst.

2.6.2. RNA-Quantifizierung

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch mittels des NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Waltham) bestimmt. Hierzu wurde 1 µL der in Wasser gelösten RNA vermessen und sowohl das 260/280 nm Absorptionsverhältnis, als auch das 260/230 nm Absorptionsverhältnis bestimmt. Ersteres gibt Auskunft über die Reinheit der RNA und sollte 1,8-2,0 betragen. Letzteres gibt das Maß der Proteinverunreinigung an und sollte ebenfalls ca. 2,0 betragen.

2.6.3. cDNA-Synthese

Nach Herstellervorgaben wurde 1 µg der isolierten RNA mittels des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) in cDNA (kodierende DNA) umgeschrieben. Dafür wurde zuerst mit Hilfe eines *WipeOut Buffers* genomische DNA entfernt, bevor ein Mix aus Reverse Transkriptase, einem Primer-Mix und einem Puffer hinzugefügt und im Cycloer 30 Minuten auf 42 °C und anschließend 5 Minuten auf 95 °C erhitzt wurde. Abschließend wurde die cDNA in insgesamt 120 µL Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

2.6.4. Quantitative Real-Time PCR

Nach Herstellerangaben wurde mit Hilfe des StepOnePlus RealTime PCR-Systems (ThermoFisher Scientific, Waltham) das Expressionslevel der jeweiligen Zielgene analysiert. Die Proben wurden als Duplikate aufgetragen und nach der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurden durch die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode die relativen Expressionslevel ermittelt (84). Die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als endogene Kontrolle der Expressionslevel benutzt.

2.7. Apoptose-Bestimmung

2.7.1. Zeitraffer-Mikroskopie

Für die Analyse der Apoptoserate per Zeitraffer-Mikroskopie wurde der Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen) mit 10x Objektiv verwendet.

24 Stunden nach Beginn der Kokultur wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in der Inkubationskammer des Mikroskops bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Von jeder Bedingung wurden 3 repräsentative Bereiche innerhalb der Lochung ausgewählt und für 24 Stunden alle 10 Minuten eine Aufnahme gemacht, sodass je Probe 3 Zeitraffer-Videos entstanden.

Zur Erfassung der Apoptoserate der Tumorzellen wurden diejenigen Tumorzellen als apoptotisch gewertet, die sich abrundeten, die Bildung von Membranvesikeln (sogenanntes „*blebbing*“) aufwiesen und danach abschwammen (siehe Abb. 4). Anschließend wurde die Zahl der apoptotischen Tumorzellen in Relation zur Gesamtanzahl von Tumorzellen pro Video gesetzt. Zum Schluss wurde das arithmetische Mittel aus den 3 Videos pro Bedingung gebildet und so die relative Apoptoserate der Tumorzellen in Prozent bestimmt.

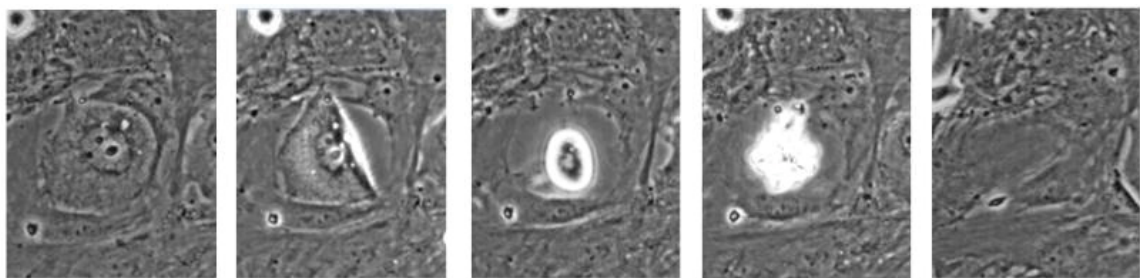


Abb. 4: Exemplarische Darstellung des Absterbens einer Ösophaguskarzinomzelle in der Zeitraffermikroskopie.

2.7.2. SubG1-Zellzyklus-Analyse

Die Zellzyklusphase, in der sich eine Zelle befindet, kann durchflusszytometrisch bestimmt werden (85, 86). Mittels des fluoreszierenden Farbstoffes Propidiumiodid, welches in die DNA interkaliert, kann der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmt werden. Die Fluoreszenz steigt somit proportional zum DNA-Gehalt einer Zelle (87). Während in der G1-Phase ein vollständiger Chromosomensatz vorliegt und in der S-Phase ein doppelter Chromosomensatz, wird in der Sub-G1-Phase die DNA fragmentiert und degradiert, was charakteristisch für apoptotische Zellen ist (88).

Um den Anteil an apoptotischen Zellen in den Kokulturen zu bestimmen, wurde der Überstand gesammelt, der Zellrasen durch Inkubation mit TE gelöst, zusammen mit dem Überstand abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend in 75 µL eines 0,1 %igen Natrium-Citrat und 0,1 %igem Triton X-100 Lysepuffers gelöst (89), (86). Nach Zugabe von 25 µL Guava Cell Cycle Reagent (Millipore, Billerica) erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung des SubG1-Anteils mit Hilfe des EasyCyte 5 (Millipore, Billerica). Durch Verwendung der InCyte Software (Millipore, Billerica) wurden 10.000 Events der Population *forward scatter/side scatter* bestimmt und das resultierende Histogramm auf den prozentualen Anteil der Zellen untersucht, die sich in der Sub-G1 Phase befinden.

2.8. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse aus n unabhängigen Experimenten sind angegeben als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Abhängig vom Versuchsaufbau erfolgte die Auswertung zweier Gruppen mittels ungepaartem *student's-t-test* und die Auswertung von drei oder mehr Gruppen mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und nachfolgendem *Dunnett's-multiple-comparison-test*. Als signifikant angesehen wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software *GraphPad Prism* (La Jolla, USA) Version 6.0.

3 ERGEBNISSE

3.1. Trans-SILAC

Vorangegangene Versuche von Dr. Alexandra Schütze konnten zeigen, dass es zellkontaktabhängig zu einem signifikanten Anstieg des Tumorzelltodes in Kokultur bestrahlter Fibroblasten mit bestrahlten Ösophaguskarzinomzellen kam (1). Um zu prüfen, ob Proteine von Fibroblasten in Ösophagus-Karzinomzellen geschleust wurden, wurde ein Trans-SILAC Versuchsansatz verwendet (90). Hierzu wurden Fibroblasten in einem Medium kultiviert, welches Isotope in den Aminosäuren Arginin und Lysin enthielt. Somit wurde das Proteom dieser Fibroblasten als „schwer“ markiert, während die Ösophaguskarzinomzellen in Medium ohne isopenhaltige Aminosäuren kultiviert wurden. Die Fibroblasten wurden bestrahlt und nach 24 Stunden in eine Kokultur mit den Ösophaguskarzinomzellen gegeben. Die Zellen wurden geerntet, die Zelllinien durch FACS-Sorting voneinander separiert und die Tumorzellen für die weitere Proteomanalyse aufbereitet.

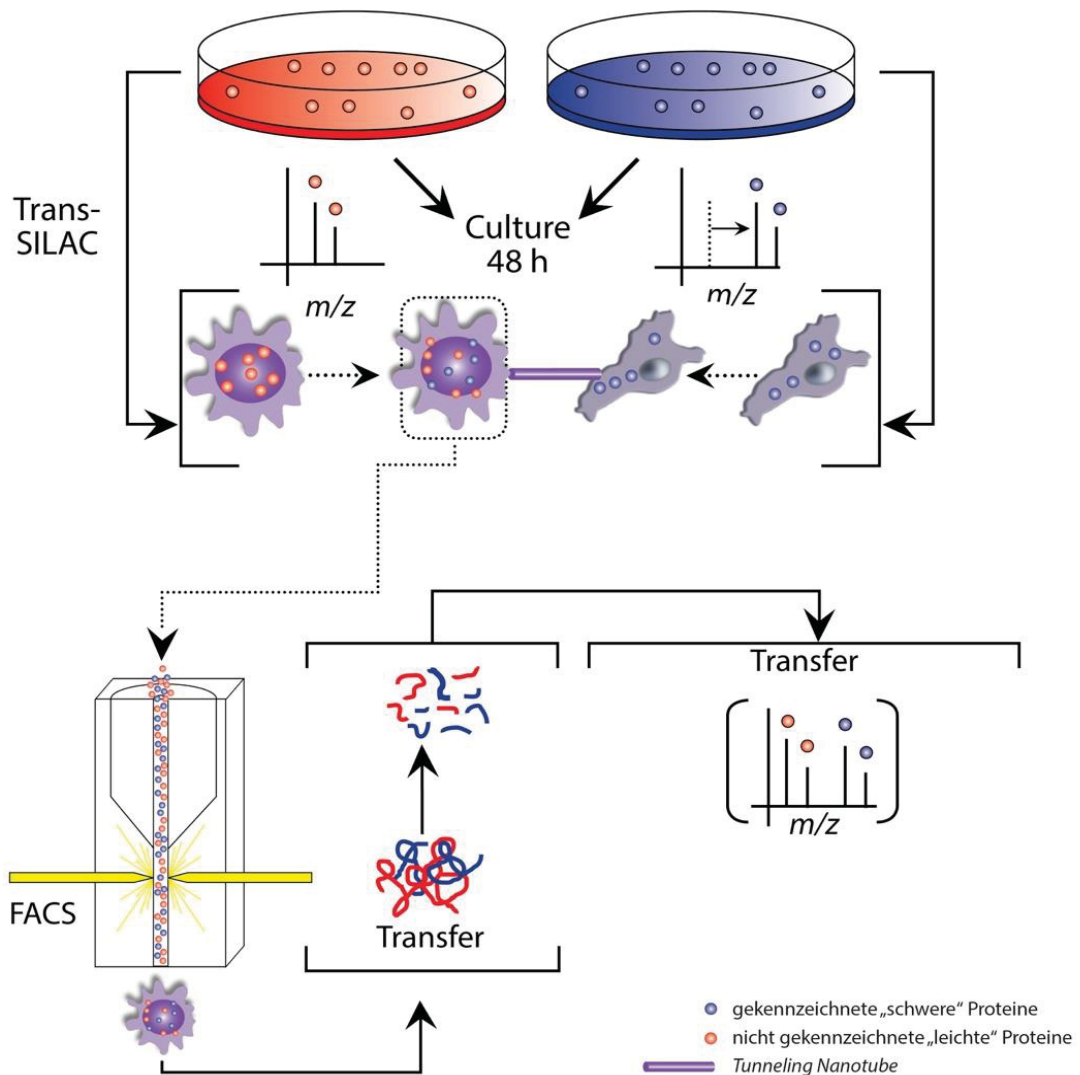


Abb. 5: Versuchsaufbau Trans-SILAC. Nach Kennzeichnung der Fibroblasten mit „schweren“ Aminosäuren wurden die Zellen mit Ösophaguskarzinomzellen in Kokultur gehalten, bevor sie durchflusszytometrisch voneinander getrennt wurden. Danach erfolgte die massenspektrometrische Aufarbeitung bzw. Identifizierung der geschleusten Proteine. Modifiziert nach Rechavi *et al.*, 2010

Nach massenspektrometrischer Analyse des Ösophaguskarzinomzellen-Proteoms konnten 78 Proteine mit isotopenhaltigen Aminosäuren in Ösophaguskarzinomzelllen identifiziert werden, die sich mit unbestrahlten Fibroblasten in Kokultur befanden (s. Tab. 6).

Accession	Proteinname
Q15126	Phosphomevalonate kinase
Q7Z4V5	Hepatoma-derived growth factor-related protein 2
P0C7V7	Putative signal peptidase complex catalytic subunit SEC11B
Q8IXJ9	Putative Polycomb group protein ASXL1
P07197	Neurofilament medium polypeptide
Q15111	Inactive phospholipase C-like protein 1
Q16352	Alpha-internexin
Q6XZF7	Dynamin-binding protein
Q96SN8	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2
A6NCK2	Tripartite motif-containing protein 43B
A6NFBQ2	Protein FAM115C
A6NMB9	Putative fidgetin-like protein 2
P04070	Vitamin K-dependent protein C
P16050	Arachidonate 15-lipoxygenase
P46013	Antigen KI-67
P59923	Zinc finger protein 445
Q12789	General transcription factor 3C polypeptide 1
Q15678	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 14
Q5FYA8	Arylsulfatase H
Q6P047	Uncharacterized protein C8orf74
Q86UL3	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4
Q8IWZ8	SURP and G-patch domain-containing protein 1
Q8N122	Regulatory-associated protein of mTOR
Q8N945	PRELI domain-containing protein 2
Q96M32	Adenylate kinase 7
Q9UPX6	UPF0258 protein KIAA1024
P12036	Neurofilament heavy polypeptide
P07196	Neurofilament light polypeptide
Q9Y566	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1
Q8IX03	Protein KIBRA
Q5T7N8	Protein FAM27D1

Q96L93	Kinesin-like protein KIF16B
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain
Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain
Q9BYX7	Putative beta-actin-like protein 3
Q9UHR4	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1
Q9UJS0	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F
O14976	Cyclin-G-associated kinase
O15020	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain
P04350	Tubulin beta-4A chain
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
P06733	Alpha-enolase
P07355	Annexin A2
P07437	Tubulin beta chain
P08670	Vimentin
P08758	Annexin A5
P09104	Gamma-enolase
P0CG38	POTE ankyrin domain family member I
P0CG39	POTE ankyrin domain family member J
P13929	Beta-enolase
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
P17661	Desmin
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial
P35579	Myosin-9
P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15
P60709	Actin, cytoplasmic 1
P62244	40S ribosomal protein S15a
P62736	Actin, aortic smooth muscle
P63261	Actin, cytoplasmic 2
P63267	Actin, gamma-enteric smooth muscle

P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1
P68104	Elongation factor 1-alpha 1
P68133	Actin, alpha skeletal muscle
P68363	Tubulin alpha-1B chain
P68371	Tubulin beta-4B chain
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2
Q07157	Tight junction protein ZO-1
Q13885	Tubulin beta-2A chain
Q14568	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2
Q15436	Protein transport protein Sec23A
Q562R1	Beta-actin-like protein 2
Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain
Q92878	DNA repair protein RAD50
Q9H6R4	Nucleolar protein 6

Tabelle 6: Von unbestrahlten Fibroblasten geschleuste Proteine. Die massenspektrometrische Analyse ergab vor der Überprüfung der Replikate 78 Proteine, die von unbestrahlten Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen geschleust wurden. *Accession*, Abkürzung, unter der das Protein in gängigen Datenbanken zu finden ist.

In den Ösophaguskarzinomzellen, die sich mit bestrahlten Fibroblasten in Kokultur befanden, konnten 66 Proteine identifiziert werden, die isotopenhaltige Aminosäuren trugen (s. Tab. 7).

Accession	Proteinname
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F
A6NMY6	Putative annexin A2-like protein
O95372	Acyl-protein thioesterase 2
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
P06733	Alpha-enolase
P07355	Annexin A2
P07437	Tubulin beta chain
P08670	Vimentin
P08758	Annexin A5
P09104	Gamma-enolase
P0CG38	POTE ankyrin domain family member I
P0CG39	POTE ankyrin domain family member J
P13929	Beta-enolase
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
P14625	Endoplasmin
P17661	Desmin
P23634	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4
P27348	14-3-3 protein theta
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial
P35579	Myosin-9
P41219	Peripherin
P60709	Actin, cytoplasmic 1
P62736	Actin, aortic smooth muscle
P63261	Actin, cytoplasmic 2
P63267	Actin, gamma-enteric smooth muscle
P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1
P68104	Elongation factor 1-alpha 1
P68133	Actin, alpha skeletal muscle
P68363	Tubulin alpha-1B chain
P68371	Tubulin beta-4B chain

Q04917	14-3-3 protein eta
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2
Q13509	Tubulin beta-3 chain
Q13885	Tubulin beta-2A chain
Q16880	2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase
Q562R1	Beta-actin-like protein 2
Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E
Q6ZVC0	Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adapter 1
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain
Q9BSC4	Nucleolar protein 10
Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain
Q9BYX7	Putative beta-actin-like protein 3
Q14005	Pro-interleukin-16
Q9NYC9	Dynein heavy chain 9, axonemal
O94832	Unconventional myosin-IId
P07197	Neurofilament medium polypeptide
Q15111	Inactive phospholipase C-like protein 1
Q16352	Alpha-internexin
O95567	Uncharacterized protein C22orf31
Q9NZ42	Gamma-secretase subunit PEN-2
P37287	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit A
Q86SK9	Stearoyl-CoA desaturase 5
Q6IE37	Ovostatin homolog 1
Q96L03	Spermatogenesis-associated protein
Q9C091	GREB1-like protein
A6NFQ2	Protein FAM115C
P07196	Neurofilament light polypeptide
O00308	NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP2
Q86VR8	Four-jointed box protein 1

P23378	Glycine dehydrogenase [decarboxylating], mitochondrial
Q96MV1	Transmembrane protein 56
P12036	Neurofilament heavy polypeptide
O60343	TBC1 domain family member 4
Q9Y566	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1

Tabelle 7: Von bestrahlten Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen geschleuste Proteine. Die massenspektrometrische Analyse ergab vor der Überprüfung der Replikate 66 Proteine, die von unbestrahlten Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen geschleust wurden. *Accession*, Abkürzung, unter der das Protein in gängigen Datenbanken zu finden ist.

Aufgrund des signifikanten Zuwachses an Apoptose in Kokultur mit bestrahlten Fibroblasten, wurden im Weiteren ausschließlich die Proteine untersucht, die aus bestrahlten Fibroblasten stammen und in mindesten 3 von 5 Replikaten geschleust wurden. Die Quantifizierung wurde mittels *Progenesis Q1 for proteomics* (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) durchgeführt. Es konnten schließlich 3 Proteine identifiziert werden, die ausschließlich von bestrahlten Fibroblasten signifikant in Ösophaguskarzinomzellen geschleust werden:

- **Neurofilament Medium Polypeptide**
- **SH3 and Multiple Ankyrin Repeat Domains Protein 1**
- **Family with Sequence Similarity Member 115 C**

Neurofilament Medium Polypeptide (NEFM)

NEFM ist 102 kDa groß und besteht aus 916 Aminosäuren. Als Typ IV Intermediär-Filament wird es in Neuronen als Neurofilament bezeichnet und ist vor allem struktureller Bestandteil des Zytoskeletts in Neuronen (91).

Neurofilamente spielen eine Rolle beim intrazellulären Transport zu Axonen und Dendriten. NEFM wird als Biomarker für neuronalen Schaden benutzt. Durch alternatives Splicing sind verschiedene Isoformen bekannt. Die Phosphorylierung des Amino-Endes von Neurofilamenten spielt eine wichtige Rolle bei der Quervernetzung und beim Abbau von Neurofilamenten. Die Phosphorylierung des Carboxyl-Endes ist vermutlich daran beteiligt, Verbindungen zwischen

Neurofilamenten und Mikrotubuli aufzubauen, führt zur Integration ins zytoskelettale Netzwerk und stabilisiert so beispielsweise das Axon eines Neurons (92).

SH3 and Multiple Ankyrin Repeat Domains Protein 1 (SHANK1)

SHANK1 ist 225 kDa groß und besteht aus 2161 Aminosäuren. Die Familie der SHANK-Proteine agiert als Gerüst für die Entwicklung und Funktion von neuronalen Synapsen. Es wird als Adapterprotein in der Postsynaptischen Dichte (PSD) exzitatorischer Synapsen beschrieben. Dort verbindet es Rezeptoren der postsynaptischen Membran durch Komplexe mit GKAP/PSD-95 und dem Aktin-basierten Zytoskelett (93, 94). Weitere Interaktionspartner sind SSTR2, IGSF9, SHARPIN, SPTAN1, HOMER1, DLGAP1/GKAP und BAIAP2.

Family with Sequence Similarity Member 115C

FAM115C ist 101 kDa groß und besteht aus 919 Aminosäuren. Isoform 2 dieses Proteins ist ein negativer Regulator des Plasmamembran-Kationenkanals TRPM8. Es ist an der Rekrutierung von TRPM8 zur Zelloberfläche beteiligt. FAM115C fördert die Prostatakrebszell-Migration in TRPM8-abhängiger Weise.

3.2 Knockdown

3.2.1. Knockdown der 3 geschleusten Proteine in Fibroblasten

Um den Effekt der geschleusten Proteine auf den Tumorzelltod zu untersuchen, wurden Kokultur-Versuche mit Fibroblasten durchgeführt, die eine verminderte Expression der zu untersuchenden Proteine aufwiesen. Mittels siRNA wurde eine Verminderung der Expression erzielt. Zur Untersuchung der Expressionslevel der dargestellten Gene wurden die Zellen 48 Stunden nach Transfektion geerntet und die relative Expression der Zielgene durch eine Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) bestimmt. Als Kontrolle (si Con) diente eine siRNA, welche keine Homologie zu einem Gen aufweist.

Für das Protein *Neurofilament Medium Polypeptid* (NEFM) konnte mit der Variante si NEFM_7 eine Reduktion der Expression auf 0,7 % (SD +- 0,7%) erreicht werden. Für das Protein *Family with Sequence Similarity 115 Member C*

(FAM115C) konnte eine Reduktion der Expression auf 24,17% (SD +- 1,63 %) erzielt werden und für das Protein *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1* (SHANK1) konnte eine Reduktion der Expression auf 40,95 % (SD +- 13,93 %) erzielt werden.

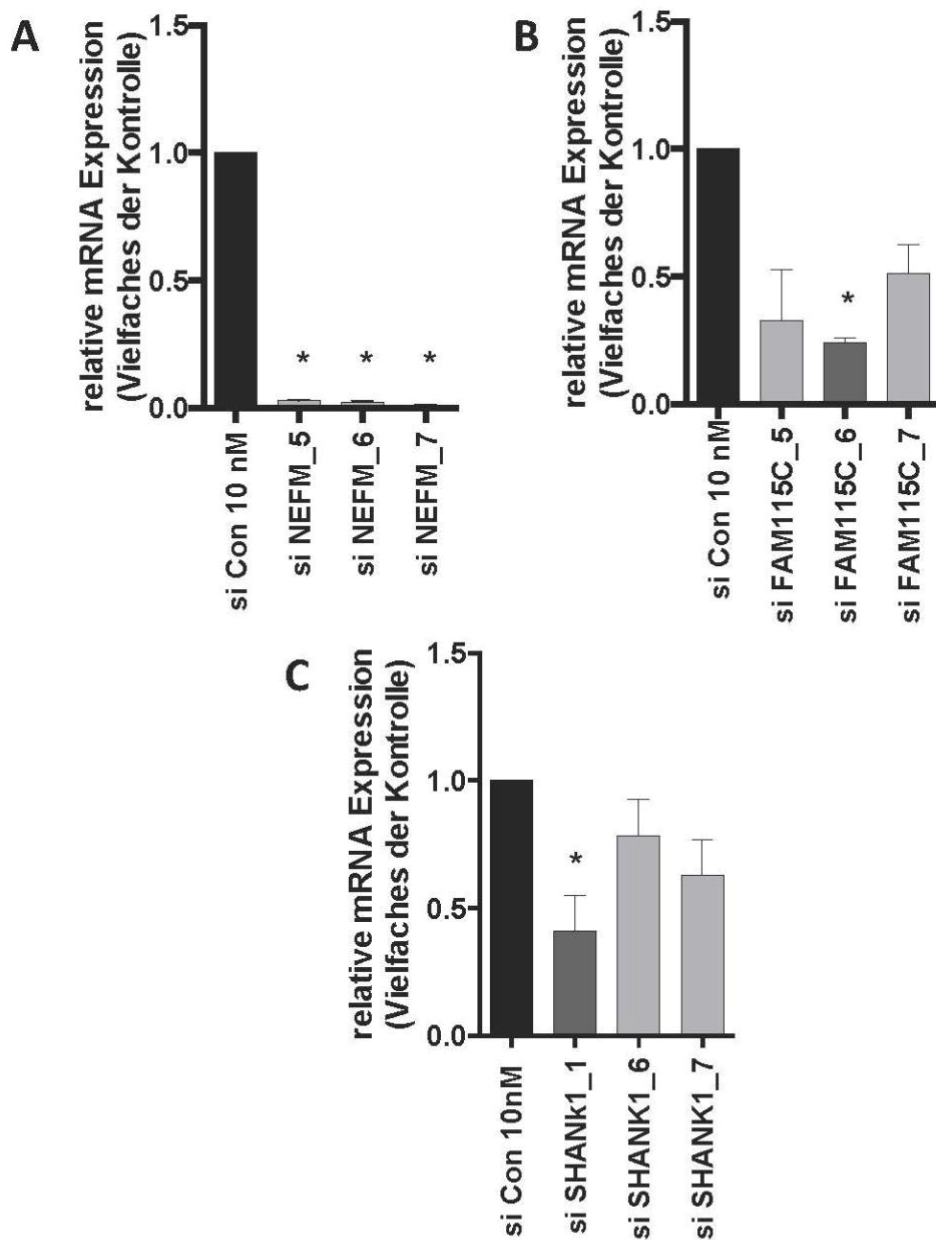


Abb. 6: Knockdown-Effizienzen der geschleusten Proteine. Durch qRT-PCR ermittelte Expression der zu untersuchenden Proteine in Fibroblasten 48 Stunden nach Transfektion mit siRNA, die gegen (A) NEFM, (B) FAM115C, (C) SHANK1 gerichtet ist. *, $p < 0,05$. $n=3$

3.2.2. SubG1-Messung bei Kokulturen mit *Knockdown*-Fibroblasten

Die Fibroblasten, welche mittels siRNA-*Knockdown* eine verminderte Expression der zu untersuchenden Proteine aufwiesen, wurden mit Ösophaguskarzinomzellen kokultiviert, um zu prüfen, ob dadurch eine verminderte Apoptoserate bei den Tumorzellen in Kokultur nach Bestrahlung der Fibroblasten erzielt werden kann. Mittels Nicoletti-Assay (89) wurde die Apoptoserate der Ösophaguskarzinomzellen 48 Stunden nach Beginn der Kokultur ermittelt.

Es zeigte sich, dass durch den *Knockdown* von NEFM und FAM115C in Fibroblasten keine Änderung der Apoptoserate der Ösophaguskarzinomzellen erzielt werden konnte, während aber der *Knockdown* von SHANK1 in Fibroblasten zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose in den Ösophaguskarzinomzellen in Kokultur mit bestrahlten Fibroblasten führte (K+F+ siCon: 8,628 Vielfaches von K-, SD +/- 1,14. K+F- siSHANK: 4,343 Vielfaches von K-, SD 0,6526. K+F+ siSHANK: 5,440 Vielfaches von K-, SD 1,140).

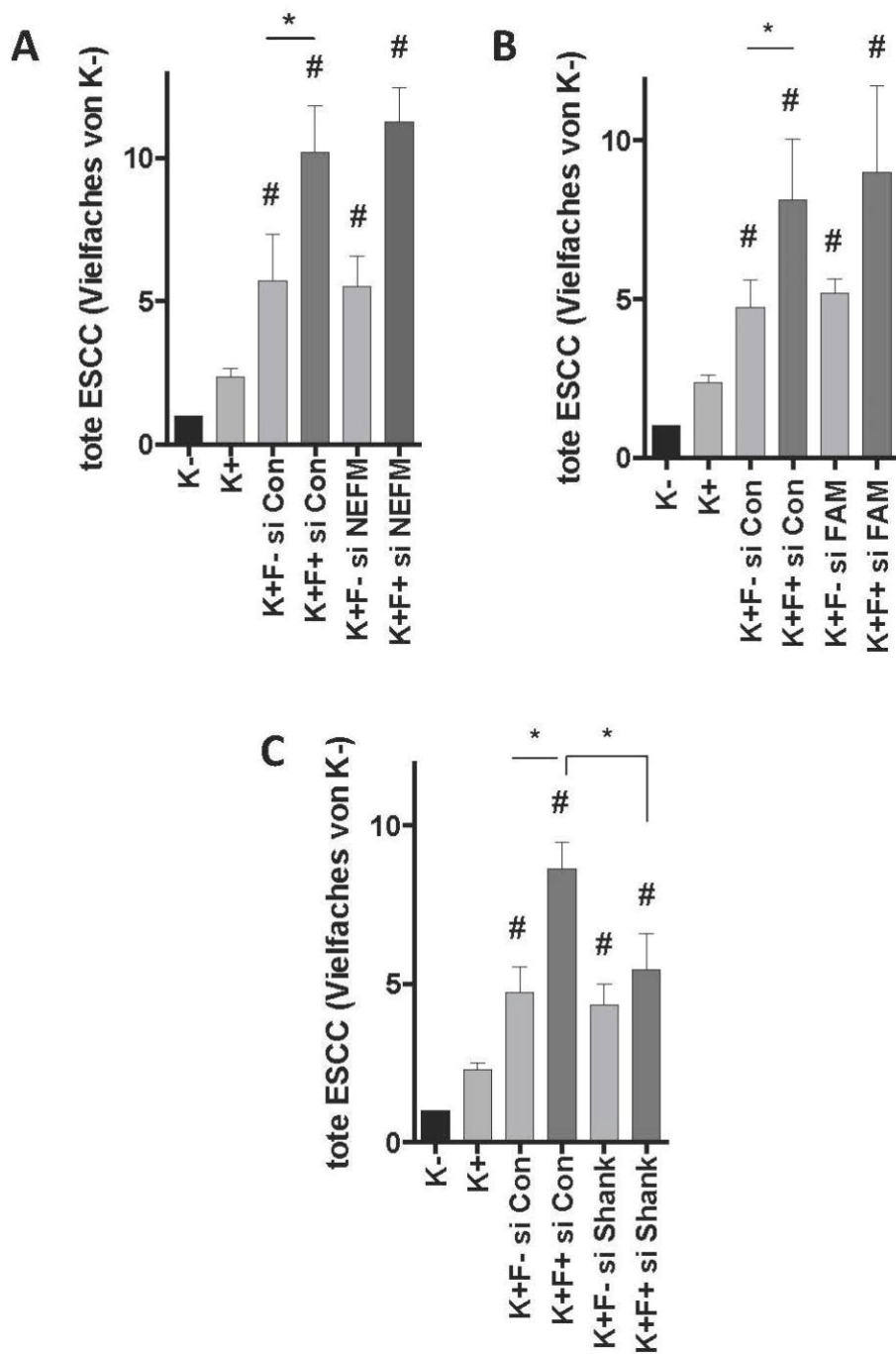


Abb. 7: Knockdown von SHANK1 in Fibroblasten führt in Kokulturen von Ösophaguskarzinomzellen mit bestrahlten Fibroblasten zur Reduktion des Tumorzelltodes. SubG1 Zellzyklus Analyse mittels Nicoletti Assay. (A) Kokultur von KYSE410 mit NEFM-Knockdown Fibroblasten, (B) Kokultur von KYSE410 mit FAM115C-Knockdown Fibroblasten, (C) Kokultur von KYSE410 mit SHANK1-Knockdown Fibroblasten. K, KYSE410; F, NHDF; -, unbestrahlt; +, 2Gy; #, $p < 0,05$ im Vergleich zu K-; *, $p < 0,05$ im Vergleich zu K+F-siCon; n=3

3.2.3. Zeitraffer Videos der Kokulturen mit *Knockdown*-Fibroblasten

Auch mittels Zeitraffer-Videos konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von SHANK1 in Fibroblasten zu einer signifikanten Reduktion des Krebszelltodes in Kokulturen mit bestrahlten Fibroblasten führte. Dazu wurde im Zeitraum von 24 bis 48 Stunden nach Beginn der Kokultur alle 10 Minuten mikroskopische Aufnahmen der Kokulturen gemacht und die Apoptoserate der Ösophagus-Karzinomzellen visuell ausgezählt. Nachdem in der SubG1-Analyse der *Knockdown* von NEFM und FAM115C getrennt voneinander beurteilt wurde (siehe 3.2.2.), zeigte sich auch durch einen Doppel-*Knockdown* dieser beiden Proteine keine Änderung der Apoptoserate der Ösophaguskarzinomzellen.

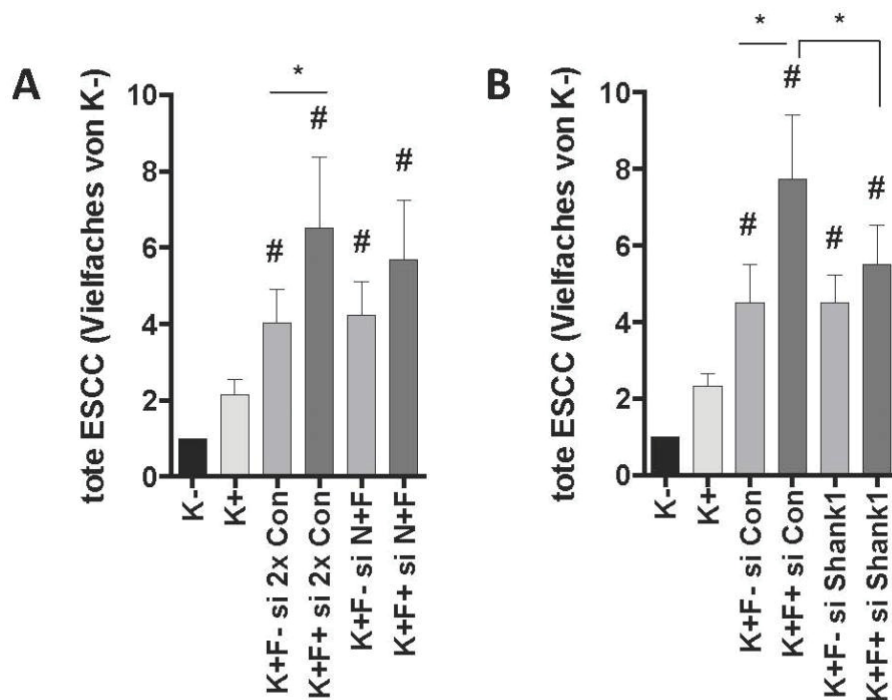


Abb. 8: Doppel-*Knockdown* von NEFM und FAM115C im Vergleich zum SHANK1-*Knockdown* in Fibroblasten. Mikroskopische Evaluation des Krebszelltodes in Kokulturen mittels Zeitraffer-Mikroskopie. (A) Kokulturen von KYSE410 mit NEFM- und FAM115- Doppel-*Knockdown* Fibroblasten, (B) Kokulturen von KYSE410 mit SHANK1-*Knockdown* Fibroblasten. K, KYSE410; F, NHDF; -, unbestrahlt; +, 2Gy; #, $p < 0,05$ im Vergleich zu K-; *, $p < 0,05$ im Vergleich zu K+F+siCon; n=3

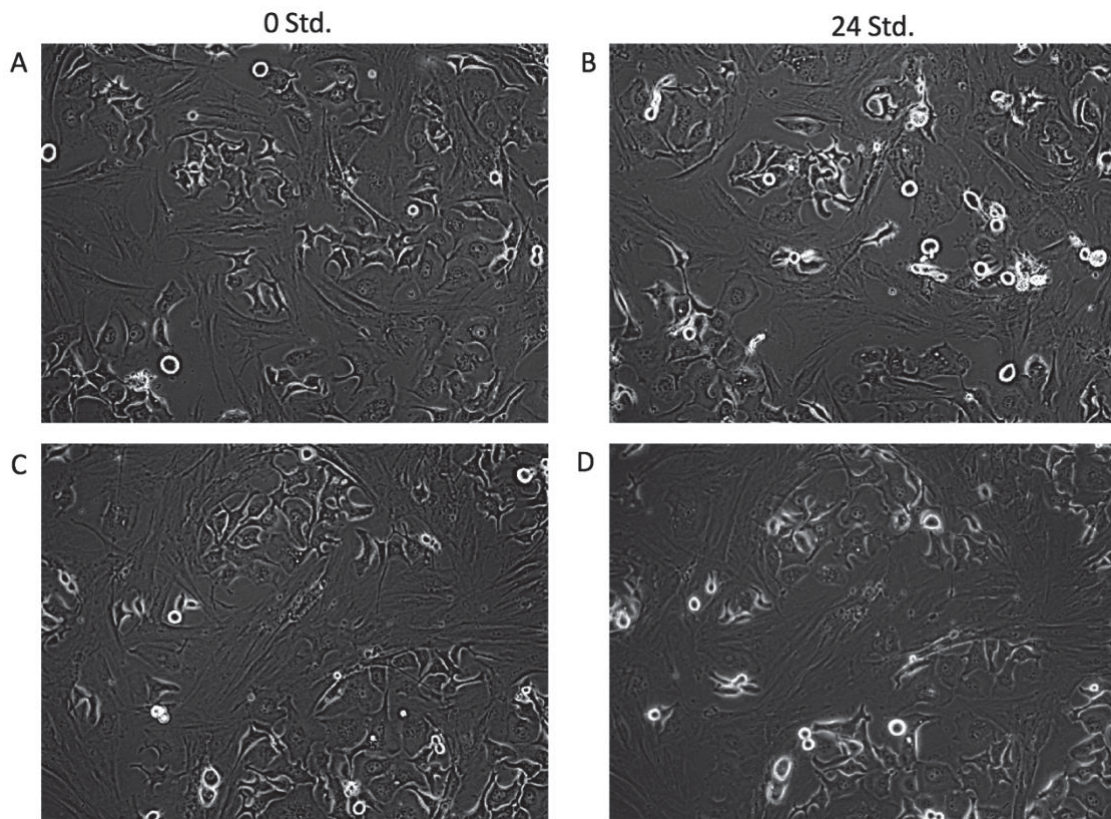


Abb. 9: Exemplarische Darstellung der mikroskopischen Aufnahmen zum Startzeitpunkt und zum Endzeitpunkt der Zeitraffer-Mikroskopie. (A) und (B), Kontroll-Kokultur (K+F+siCon). (C) und (D), Kokultur mit Shank1-Knockdown Fibroblasten (K+F+siShank1).

3.4. SHANK1-Expression in Fibroblasten

Die SHANK1 Expression in Fibroblasten nach Bestrahlung mit 2 Gy wurde mit der basalen SHANK1 Expression von unbehandelten Fibroblasten verglichen, um zu überprüfen, ob eine Bestrahlung die Expression hochreguliert. Es konnte eine nicht signifikante Steigerung der Expression auf mRNA Level von 14 % ermittelt werden (Abb. 10).

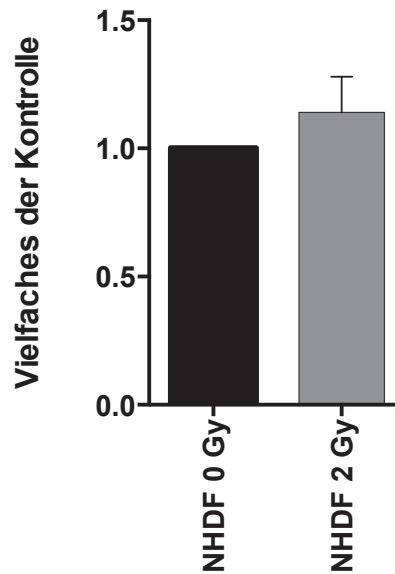


Abb. 10: Steigerung der SHANK1-Expression in Fibroblasten nach Bestrahlung. Eine Bestrahlung führt zu einer Zunahme der SHANK1-Expression von 14 %. Durch qRT-PCR ermitteltes mRNA Expressionslevel von SHANK1 in Fibroblasten 24h nach Bestrahlung. NHDF, Fibroblasten; n=3

3.3. Weitere Tumorzelllinien in Kokultur mit Fibroblasten

Um zu beurteilen, ob auch die Apoptoserate weiterer Tumorzelllinien durch Fibroblasten in ähnlicher Weise beeinflusst wird, wurden die Kokultur-Experimente mit weiteren Tumorzelllinien durchgeführt und die Apoptoserate durch SubG1-Zellzyklusanalyse bestimmt. Analysiert wurden humane Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MDA-MB231), humane Plattenepithel-Karzinomzellen der Haut (A431), humane Urothelkarzinomzellen (RT4 und J82), murine Lungenkarzinomzellen (LLC) und murine Melanomzellen (B16F10). In MDA-MB231, RT-4, J82 und B16F10 Zellen konnte eine gesteigerte Tumorapoptoserate in Kokultur mit unbestrahlten Fibroblasten beobachtet werden. Weiter gesteigert wurde dieser Effekt, wenn die Tumorzellen mit bestrahlten Fibroblasten kokultiviert wurden. In eingeschränkter Weise konnte der Effekt auch bei A431 und LLC Zellen beobachtet werden. Das Ausmaß des Tumorapoptose-steigernden Effektes von Fibroblasten unterscheidet sich jedoch in den unterschiedlichen Kokulturen, sodass dies einen möglichen weiteren Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen darstellen kann.

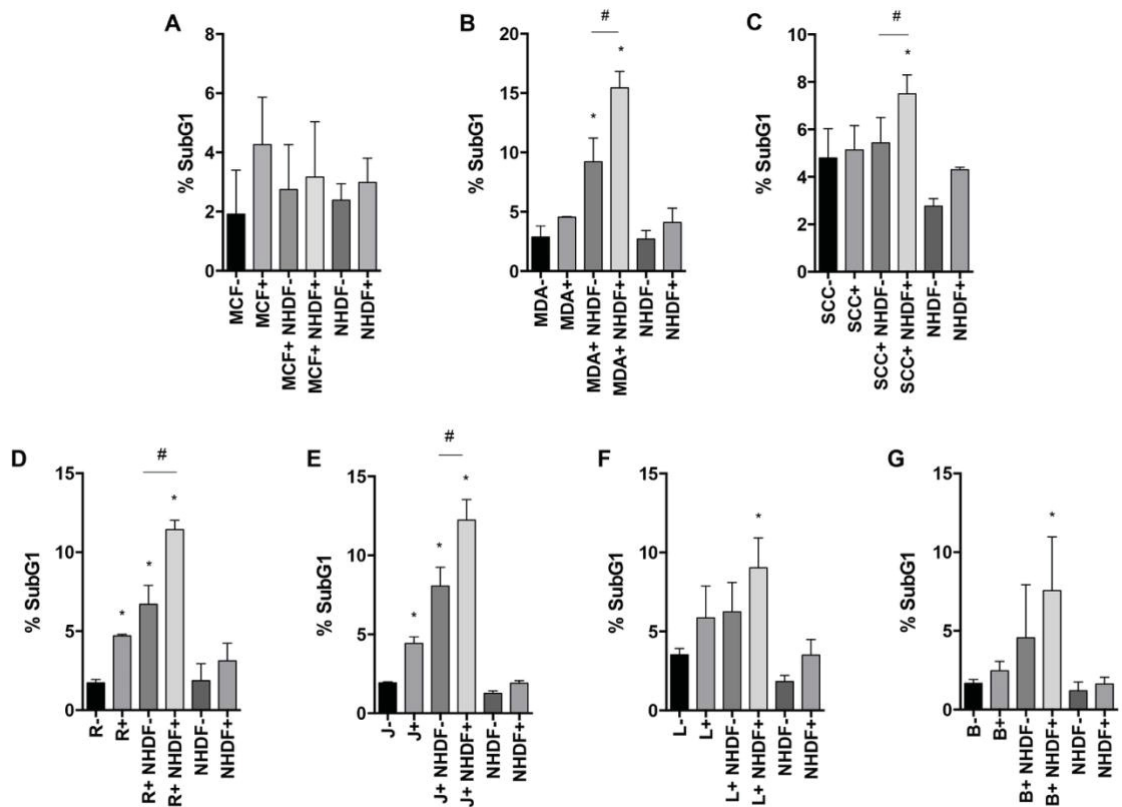


Abb. 11: Tumorzelltod verschiedener Zelllinien in Kokultur mit bestrahlten und unbestrahlten Fibroblasten. SubG1-Zellzyklusanalyse mittels Nicoletti-Assay. Kokultur von NHDF mit (A) MCF-7 Mammakarzinomzellen, (B) MDA-MB231 Mammakarzinomzellen, (C) A431 Plattenepithelkarzinomzellen der Haut, (D) RT-4 Urothelkarzinomzellen, (E) J82 Urothelkarzinomzellen, (F) LLC Lungenkarzinomzellen, (G) B16F10 Melanomzellen. MCF, MCF-7 Zellen; MDA, MDA-MB231 Zellen; SCC, A431 Zellen; R, RT4 Zellen; J, J82 Zellen, L, LLC Zellen; B, B16F10 Zellen; -, 0 Gy; +, 2 Gy; *, $p < 0,05$ im Vergleich zur jeweiligen unbestrahlten Monokultur der Tumorzelllinie; #, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kokultur von bestrahlter Tumorzelllinie mit unbestrahlten NHDF; $n=3$

4 DISKUSSION

Vorausgegangene Arbeiten von Dr. Alexandra Schütze haben gezeigt, dass bestrahlte Fibroblasten die Apoptoserate von Ösophaguskarzinomzellen zellkontaktabhängig signifikant erhöhen (1).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass drei Proteine von bestrahlten Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen geschleust werden und dass mindestens eines dieser drei Proteine, SHANK1, (mit-)verantwortlich für den Tumorzelltod ist. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der steigernde Effekt von bestrahlten Fibroblasten auf die Apoptoserate von Tumorzellen auch in Kokultur mit weiteren Tumorzelllinien beobachtet werden kann.

Die interzelluläre Kommunikation ist einer der entscheidenden Faktoren bei der Tumorzellproliferation. Neben löslichen Faktoren spielt der direkte Zellkontakt bei der interzellulären Kommunikation eine große Rolle. So können nicht nur Ionen oder Zellorganellen, sondern auch Proteine ausgetauscht werden. Bereits bei neurologischen Erkrankungen wie Alzheimer, Huntington oder Parkinson spielt die interzelluläre Verbreitung von Proteinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Krankheiten (95). Welche Rolle der Austausch und Transfer von Proteinen zwischen stromalen und entarteten Zellen eines Tumors spielt, wie dies zur Progression des Tumors beiträgt und welche Rolle ionisierende Strahlung in diesem Zusammenhang spielt, ist bislang nur unzureichend erforscht.

4.1 SHANK1 und seine potentielle Rolle bei der Apoptose-induktion in Tumorzellen

Die SHANK-Proteine wurden ursprünglich in den späten 1990er Jahren im Rattengehirn entdeckt und bestehen aus drei Mitgliedern: SHANK1, SHANK2 und SHANK3 (93). Die SHANK-Gene kodieren für große Gerüst-Proteine mit vielen Protein-Protein Interaktionsdomänen, welche besonders in der Postsynaptischen Dichte angereichert sind (96). Seit ihrer Entdeckung konnten SHANK-Mutationen mit vielen neuropsychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, darunter zum Beispiel Autismus, geistige Behinderung, Schizophrenie, bipolare Störungen oder das Aufmerksamkeits-

defizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) (97). Auch in peripheren Organen werden die SHANK-Proteine exprimiert, allerdings mit bisher weitestgehend unbekannter Funktion.

Die Rolle der SHANK-Proteine, insbesondere die von SHANK1 ist im Zusammenhang mit Krebserkrankungen bislang nur unzureichend erforscht. Lilja *et al.* beschrieben 2017 erstmals die Rolle der SHANK Proteine, in erster Linie von SHANK1 und SHANK3, in Zusammenhang mit deren Funktion in der embryonalen Nierenzelllinie HEK293 und Mamma-Karzinom-Zelllinie MDA-MB231. Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von SHANK1 und SHANK3 in diesen Zellen Rap1a- und Ras-abhängig zu einer erhöhten Integrin-Aktivierung führt (98). Integrine sind als Transmembranproteine bedeutend an der Signalübermittlung zwischen Zellen bzw. zwischen Zellen und der umgebenden extrazellulären Matrix beteiligt. Talin, als wichtiger Teil des Integrin-Adhäsions-Komplexes, verbindet Integrine mit Aktin (99). Somit ist es denkbar, dass SHANK1 durch die Regulierung der Integrin-Aktivität auch Einfluss auf die Regulierung von Aktin, als wichtigsten Baustein der TNTs, nehmen kann. Dafür spricht auch, dass SHANK1 vor allem in der Zell-Peripherie und Aktin-reichen Membranausstülpungen lokalisiert ist (98). Des Weiteren scheinen SHANK1 und SHANK3 die Zelladhäsion und -bewegung Rap1-abhängig negativ zu regulieren (98). Rap1 ist Teil des „*Shelterin*-Komplexes“, welcher am Ende der Chromosomen die Telomere vor DNA-Schäden schützt (100). Wird Rap1 als Teil dieses *Shelterin*-Komplexes beispielsweise durch SHANK1 inhibiert, ist es vorstellbar, dass der *Shelterin*-Komplex in seiner Funktion behindert wird und DNA-Schäden in der betroffenen Zelle daraus resultieren.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von SHANK1 zu einer Zunahme der Zellmigration und -invasion führt (98). Dies untermauert die Beobachtung, dass eine Verminderung des SHANK1-Transfers zu Tumorzellen durch *Knockdown* in Fibroblasten zu einem verminderten Tumorzelltod führt. Der Mechanismus dieser Effekte ist bisher unbekannt.

Weitere Zusammenhänge zwischen SHANK und Aktin konnten auch Duffney *et al.* belegen: SHANK3-defiziente Mäuse wiesen einen Verlust von kortikalem Aktin auf (101). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von SHANK1 und SHANK3 ist es denkbar, dass auch SHANK1 solch einen Effekt auf die Expression von Aktin haben könnte.

Ein weiterer Interaktionspartner von SHANK1 ist der Somatostatinrezeptor 2 (102). Dieser ist in einigen Tumorentitäten, wie z.B dem Mammakarzinom, häufig überexprimiert. Bharti *et al.* konnten 2017 zeigen, dass eine Behandlung der Mammakarzinomzellen mit dem IL-1-Inhibitor Diacerein allein weniger antitumorale Effekte aufwies als Diacerein, welches an ein Somatostatinanalogon gekoppelt war (103). Daraus lässt sich schließen, dass Somatostatin potentiell antitumorale Effekte besitzen könnte. 1984 wurden erstmals die antiproliferativen Effekte von Somatostatin auf Thymozyten beschrieben (104). Aber auch für viele Tumorzellen sind antiproliferative Effekte von Somatostatin bzw. Somatostatinanaloga beschrieben (105-108). Es ist vorstellbar, dass die Interaktion von SHANK1 mit dem Somatostatinrezeptor 2 auf ähnlichen Wegen die Apoptose von Tumorzellen beeinflusst.

Ein direkter Zusammenhang zwischen ionisierender Strahlung und SHANK ist bisher nicht bekannt. Wie in Abb. 10 gezeigt, führt Bestrahlung nicht zu einer signifikanten Steigerung der SHANK-Expression in Fibroblasten, sodass dort ein komplexerer Zusammenhang bestehen muss, der erklärt, wieso insbesondere bestrahlte Fibroblasten SHANK1 in Ösophaguskarzinomzellen schleusen. Somit wird belegt, dass nicht das Expressionslevel von SHANK1 in Fibroblasten, sondern der Mechanismus des Proteintransfers durch die Bestrahlung reguliert werden.

4.2 NEFM und FAM115C als geschleuste Proteine

Wie die Trans-SILAC Experimente gezeigt haben, wird auch das Protein *Neurofilament Medium Polypeptide* (NEFM) von bestrahlten Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen geschleust. In den *Knockdown*-Versuchen veränderte sich die Apoptoserate der Tumorzellen aber nur unwesentlich, sodass der alleinige *Knockdown* von *Neurofilament Medium Polypeptide* keinen Einfluss auf die Apoptose der Tumorzellen nimmt. Allerdings ist es denkbar, dass dieses Protein in Zusammenspiel mit weiteren Faktoren Einfluss auf den Tumorzelltod nehmen könnte.

Bisher wurden die Neurofilamente fast ausschließlich mit neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Unlängst wurde aber auch bekannt, dass

sie in der Pathogenese von malignen Tumorerkrankungen eine Rolle spielen können (109-111). So wurde das *Neurofilament Heavy Polypeptide* (NEFH) beispielsweise von Kim *et al.* als ein Tumorsuppressor beschrieben, dessen Inaktivierung β -Cathenin vermittelt zu einer gesteigerten Tumorgenese in Ösophaguskarzinomen führen kann (112).

Des Weiteren ist bekannt, dass Intermediärfilamente, zu denen auch die Neurofilamente zählen, entlang von Mikrotubuli durch die Zelle transportiert werden (113). So ist es denkbar, dass das Protein *Neurofilament Medium Polypeptide* entlang von Mikrotubuli, die Bestandteile von Tunneling Nanotubes sein können, von Fibroblasten in die Tumorzellen gelangt sind.

Von Calmon *et al.* wurde beschrieben, dass die DNA-Methylierungs-assoziierte Gen-Inaktivierung von NEFH, NEFM und NEFL häufig in Brustkrebszellen und weiteren Tumorzellarten nachgewiesen werden kann und zur Progression des Tumors beitragen kann (114). Somit ist es vorstellbar, dass bestrahlte Fibroblasten durch den Transport von NEFM in Tumorzellen zum pro-apoptotischen Effekten in Tumorzellen beitragen könnten. Die alleinige Inaktivierung von NEFM in Fibroblasten und der konsekutiv verminderte Transport von NEFM in Ösophaguskarzinomzellen scheint jedoch nicht ausreichend zu sein, um die Apoptoserate der Tumorzellen zu reduzieren. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass weitere Interaktionspartner von NEFM involviert sein müssen.

Über das Protein *Family With Sequence Similarity Member 115C* (FAM115C) (auch *TRPM8-Channel associated factor 2* (TCAF2) genannt) ist bislang nur wenig bekannt. Es ist ein Protein, das zusammen mit *TRPM8-Channel associated factor 1* (TCAF1) die Aktivität und Oberflächenexpression des TRPM8 Kanals reguliert. Während die Interaktion von TCAF1 mit TRPM8 zu einer Reduktion der Migration bei Prostatakarzinomzellen führt, führt TCAF2 zu einer verstärkten Migration dieser Zellen (115). Auch die Überexpression von TRPM8 in bestimmten Karzinomzelllinien spricht dafür, dass TCAF2 möglicherweise auch beim Überleben der Ösophaguskarzinomzellen eine Rolle spielen könnte (116).

4.3 Möglicher Mechanismus des Protein-Transfers

Die Arbeiten von Dr. Alexandra Schütze konnten zeigen, dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt bestehen muss, um den proapoptotischen Effekt zu vermitteln, den bestrahlte Fibroblasten auf Ösophaguskarzinomzellen ausüben. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Cytochalasin B, ein Inhibitor der Aktin-Polymerisierung und somit auch ein Inhibitor der TNT-Ausbildung, diesen proapoptotischen Effekt der Fibroblasten auf Ösophaguskarzinomzellen vermindert (1). Dies unterstützt die Hypothese, dass TNTs essentiell sind, um den proapoptotischen Effekt der Fibroblasten auf die Tumorzellen zu vermitteln.

Wie von Biran *et al.* gezeigt, sind seneszente Fibroblasten in der Lage, Proteine durch zytoplasmatische Brücken in benachbarte natürliche Killerzellen zu schleusen und dort zu einer erhöhten Toxizität zu führen (117). Da die Bestrahlung in höheren Dosen bei Fibroblasten zu einem seneszenten Phänotyp führen kann (118), belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in ähnlicher Weise, dass bestrahlte Fibroblasten Proteine in benachbarte Ösophaguskarzinomzellen schleusen und dort zu einer erhöhten Apoptoserate führen.

Neben TNTs stellen *Gap Junctions*, Immunsynapsen, Nervenzellsynapsen oder Zelladhäsionsmoleküle weitere zellkontakt-abhängige Mechanismen der interzellulären Kommunikation dar. Aus unterschiedlichen Gründen können diese Zellkontakte jedoch nicht an der Vermittlung des in dieser Arbeit untersuchten Effektes beteiligt sein:

Gap Junctions bestehen aus 12 Proteinen, von denen jeweils sechs zusammen einen Hemikanal, das sogenannte Connexon, bilden. Durch den direkten Kontakt von zwei Connexonen entsteht ein funktioneller Kanal. Dass *Gap Junctions* als „Transportkanal“ der Trans-SILAC Proteine dienen, erscheint allerdings unwahrscheinlich, da der Kanal, den *Gap Junctions* bilden, nur Moleküle mit einer maximalen Größe von 1 kDa passieren lässt (119). Die untersuchten Proteine der vorliegenden Arbeit sind jedoch bis zu 225 kDa groß.

Immunsynapsen stellen neben TNTs einen weiteren zellkontaktabhängigen Mechanismus der interzellulären Kommunikation dar, der einen Austausch von größeren Molekülen ermöglicht. Unter der Immunsynapse versteht man einen spezialisierten Kontakt zwischen T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden

Zellen, die zur Aktivierung der T-Lymphozyten beiträgt. Als Mechanismus des Transfers von SHANK1, NEFM oder FAM115C kommt die Immunsynapse ebenfalls nicht in Frage, da sie Antigen-präsentierende Zellen erfordert, die nicht Teil des Versuchsaufbaus waren.

Auch Nervenzellsynapsen oder Zelladhäsionsmoleküle, die weitere Formen der zellkontaktabhängigen interzellulären Kommunikation darstellen, können den Mechanismus der transferierten Proteine nicht erklären, da sie keinen Transfer von größeren Molekülen vermitteln, sondern lediglich Transmitter freisetzen bzw. durch Rezeptoren intrazelluläre Signalwege aktivieren.

Es ist bekannt, dass durch zellulären Stress, wie er beispielweise durch ionisierende Strahlung ausgelöst wird, die Zusammensetzung und die Menge an sezernierten Exosomen beeinflusst werden kann. Diese Exosomen enthalten zelluläre Bestandteile wie RNA, die in benachbarten Zellen chromosomale Schäden verursachen können (120, 121).

Jelonek *et al.* konnten 2015 durch massenspektrometrische Analysen zeigen, dass die enthaltenen Proteine in den von Tumorzellen sezernierten Exosomen deutlich different von denen unbestrahlter Tumorzellen sind (122).

Dies unterstützt die Beobachtungen dieser Arbeit, dass durch Bestrahlung Einfluss auf die Art der geschleusten Proteine von benachbarten Zellen in Kokultur genommen wird.

Weiter gestützt werden die Ergebnisse dieser Arbeit durch Beobachtungen von Biran *et al.* 2015, dass senescente Zellen Proteine in Immunzellen präneoplastischer Läsionen im Pankreas schleusen. Dieser Prozess ist abhängig von direktem Zellkontakt und der Polymerisierung von Aktin und somit zumindest teilweise durch zytoplasmatische Brücken vermittelt (117).

4.4. Der Effekt bestrahlter Fibroblasten auf weitere Tumorzelllinien

Die Kokulturversuche verschiedener Tumorzelllinien mit Fibroblasten konnten zeigen, dass Fibroblasten auf MDA-MB231 Mammakarzinomzellen, RT4 und J82 Urothelkarzinomzellen und eingeschränkt auch auf LLC und B16F10 Zellen ebenfalls Apoptose-steigernde Effekte haben. Die Kokultur der Karzinomzellen mit unbestrahlten Fibroblasten führte bei MDA-MB231, RT4 und J82 Zellen zu

einer Zunahme des Tumorzelltodes, während die Kokultur dieser Zellen mit bestrahlten Fibroblasten eine weitere Steigerung der Apoptose bewirkte. Bei den murinen LLC Lungenkarzinomzellen und den murinen Melanomzellen B16F10 war eine Tendenz dieses Effektes ebenfalls nachweisbar.

Ionisierende Strahlung hat Auswirkungen auf jede einzelne bestrahlte Zelle, sie wird aber zu einem nicht unerheblichen Teil durch den Zellverband modifiziert. Als *intercellular induction of apoptosis* (IIA) wird in der Literatur der Effekt beschrieben, dass interzelluläre Signalkaskaden von benachbarten Zellen zur Apoptose-Induktion in Tumorzellen führen können (123).

Durch die IIA können selektiv entartete Zellen eliminiert werden. Durch Bestrahlung kann dieser Effekt gesteigert werden (124). So führt die Bestrahlung von Fibroblasten zu einer erhöhten Freisetzung von diversen Signalmolekülen, u.a. ROS, die wiederum in Kokultur mit entarteten/ präkanzerösen Zellen zur Apoptose dieser Zellen führt (123).

Zudem ist seit Längerem der *Bystander*-Effekt bekannt, welcher besagt, dass Bestrahlungseffekte auch in unbestrahlten Zellen, die sich in Nachbarschaft von bestrahlten Zellen befinden, beobachtet werden können (125). Nicht nur Zytokine wie IL-8 oder TNF- α scheinen eine Rolle in diesem Prozess zu spielen (126, 127), sondern auch NO, TGF- β (128) oder Plasmamembran-gebundene *lipid rafts* (129).

Da der in dieser Arbeit untersuchte Effekt von Fibroblasten ausgeht und Auswirkungen in Tumorzellen ausübt, ist dieser in erster Linie mit der IIA zu vergleichen.

In der Literatur werden Fibroblasten oft als Faktoren beschrieben, die sowohl die Tumorprogression, als auch die Metastasierung und die Entwicklung von Therapieresistenzen fördern (130, 131). Andererseits gibt es auch Studien, die belegen, dass Fibroblasten im Tumorstroma proapoptotische Effekte auf Tumorzellen haben können. Ein hoher Gehalt an *alpha-smooth muscle actin* (alpha-SMA), welches ein Marker für tumorassoziierte Fibroblasten ist, wird mit einem verbesserten Überleben bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom und Pankreaskarzinom assoziiert (132). Insbesondere aber normale, nicht aktivierte Fibroblasten werden als proapoptotisch beschrieben (133, 134).

Es ist also bekannt, dass Fibroblasten sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte auf Tumorzellen haben können. Ein wichtiger Aspekt ist, dass durch den reziproken Austausch von Informationen Fibroblasten von einem tumorhemmenden in einen tumorfördernden Zustand übergehen können (135). Im Kontext dieser Arbeit ist zu diskutieren, dass normale dermale Fibroblasten in den Versuchen verwendet wurden und diese sich durch den Kontakt mit Tumorzellen erst zu CAFs entwickeln. Es ist also anzunehmen, dass der Versuchsaufbau der Experimente ein Tumorfrühstadium widerspiegelt, in dem sich durch den reziproken Informationsaustausch Fibroblasten und Tumorzellen gegenseitig beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Beobachtungen, dass Fibroblasten in einem frühen Stadium der Tumorgenese die Tumorprogression hemmen.

4.5 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass u.a. das Protein SHANK1 von bestrahlten Fibroblasten in Ösophaguskarzinomzellen geschleust wird. Die Herabregulation von SHANK1 in bestrahlten Fibroblasten führte in Kokultur mit Ösophaguskarzinomzellen zu einer Verminderung der Tumorapoptoserate.

Durch den Nachweis von SHANK1 als möglichen proapoptotischen Faktor in Ösophaguskarzinomzellen kann es in Zukunft einen neuartigen Therapieansatz beim Ösophaguskarzinom darstellen. Denkbar wäre es, die SHANK1-Expression durch epigenetische Methoden zu regulieren. Zudem könnte versucht werden, Signalkaskaden zu aktivieren, die zu einer gesteigerten Expression von SHANK1 in den Tumorzellen führen. Vorstellbar wäre es auch, Fibroblasten, welche vermehrt SHANK1 exprimieren, in den Tumor zu injizieren, um den Transfer von SHANK1 in die Tumorzellen zu erhöhen. Da der Transfer von SHANK1 nur für Ösophaguskarzinomzellen nachgewiesen wurde, der Effekt bestrahlter Fibroblasten auf die Tumorapoptose allerdings auch in weiteren Tumorzelllinien nachweisbar ist, wäre die Injektion von bestrahlten Fibroblasten auch dort denkbar.

Die Therapie maligner Tumoren wird heutzutage immer individueller an den Patienten angepasst. Am Beispiel des kolorektalen Karzinoms lässt sich verdeutlichen, dass abhängig vom Fehlen oder Vorhandensein bestimmter Mutationen, die Therapie moduliert wird bzw. das Ansprechen vorausgesagt werden kann. KRAS, NRAS und BRAF sind beispielsweise Gene, die das Ansprechen auf Anti-EGFR-Antikörper negativ beeinflussen. So wird empfohlen, bei Vorhandensein dieser Gene die Therapie mit Anti-EGFR-Antikörpern zu unterlassen (136).

Weitere bekannte prognostische und/oder prädiktive Biomarker in der Krebsdiagnostik und -therapie sind beispielweise HER-2/neu (137) oder p16. Das zeigt, dass heutzutage die Therapie zunehmend individueller auf den Patienten angepasst und auch das Therapieansprechen vorausgesagt werden kann. So ist es vorstellbar, dass möglicherweise auch die SHANK1-Expression in Tumorbiopsien bestimmt werden könnte, und so das Bestrahlungsansprechen vorausgesagt werden kann.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Schütze A. Der Einfluss des Hyaluronsäure-Systems auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen: Universität Duisburg-Essen; 2016.
2. Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA, Luketich JD. Oesophageal carcinoma. *Lancet*. 2013;381(9864):400-12.
3. (Hrsg.) R-K-IHudgdeKiDeV. Krebs in Deutschland 2009/2010. 2013.
4. Tramacere I, La Vecchia C, Negri E. Tobacco smoking and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma: a meta-analysis. *Epidemiology*. 2011;22(3):344-9.
5. Lee CH, Wu DC, Lee JM, Wu IC, Goan YG, Kao EL, et al. Anatomical subsite discrepancy in relation to the impact of the consumption of alcohol, tobacco and betel quid on esophageal cancer. *Int J Cancer*. 2007;120(8):1755-62.
6. O'Doherty MG, Freedman ND, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. A prospective cohort study of obesity and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Gut*. 2012;61(9):1261-8.
7. Pandeya N, Webb PM, Sadeghi S, Green AC, Whiteman DC, Australian Cancer S. Gastro-oesophageal reflux symptoms and the risks of oesophageal cancer: are the effects modified by smoking, NSAIDs or acid suppressants? *Gut*. 2010;59(1):31-8.
8. Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sorensen HT, Funch-Jensen P. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1375-83.
9. Takizawa K, Matsuda T, Kozu T, Eguchi T, Kato H, Nakanishi Y, et al. Lymph node staging in esophageal squamous cell carcinoma: a comparative study of endoscopic ultrasonography versus computed tomography. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(10):1687-91.
10. Porschen R, Buck A, Fischbach W, Gockel I, Gorling U, Grenacher L, et al. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus (Langversion 1.0 - September 2015). *Z Gastroenterol*. 2015;53(11):1288-347.
11. Stiles BM, Mirza F, Coppolino A, Port JL, Lee PC, Paul S, et al. Clinical T2-T3N0M0 esophageal cancer: the risk of node positive disease. *Ann Thorac Surg*. 2011;92(2):491-6; discussion 6-8.
12. Puli SR, Reddy JB, Bechtold ML, Antillon D, Ibdah JA, Antillon MR. Staging accuracy of esophageal cancer by endoscopic ultrasound: a meta-analysis and systematic review. *World J Gastroenterol*. 2008;14(10):1479-90.
13. Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, et al. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol*. 2008;26(7):1086-92.

14. Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalcberg JR, Simes RJ, Barbour A, et al. Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2011;12(7):681-92.
15. Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer.* 2005;104(6):1129-37.
16. Reiser MK FDJ. *Duale Reihe Radiologie.* Verlag GT, editor2011.
17. Maier P, Hartmann L, Wenz F, Herskind C. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1).
18. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:657-67.
19. Tulard A, Hoffschir F, de Boisferon FH, Luccioni C, Bravard A. Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(1):68-77.
20. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity.* 2005;22(3):355-70.
21. Takasawa R, Nakamura H, Mori T, Tanuma S. Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC. *Apoptosis.* 2005;10(5):1121-30.
22. Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32(11-12):1123-36.
23. Wu H, Medeiros LJ, Young KH. Apoptosis signaling and BCL-2 pathways provide opportunities for novel targeted therapeutic strategies in hematologic malignances. *Blood Rev.* 2018;32(1):8-28.
24. Gudkov AV, Komarova EA. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(2):117-29.
25. Zhang T, Brazhnik P, Tyson JJ. Exploring mechanisms of the DNA-damage response: p53 pulses and their possible relevance to apoptosis. *Cell Cycle.* 2007;6(1):85-94.
26. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene.* 2013;32(33):3789-97.
27. Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(2):191-201.
28. Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22686-92.
29. Diegeler S, Hellweg CE. Intercellular Communication of Tumor Cells and Immune Cells after Exposure to Different Ionizing Radiation Qualities. *Front Immunol.* 2017;8:664.

30. Fort M, Guet S, Husheng S, Calitchi E, Belkacemi Y, Arome, et al. Role of radiation therapy in melanomas: Systematic review and best practice in 2016. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;99:362-75.
31. Bielack SS, Hecker-Nolting S, Blattmann C, Kager L. Advances in the management of osteosarcoma. *F1000Res*. 2016;5:2767.
32. Koswig S, Budach V. [The role of radiotherapy in the treatment of bone neoplasms]. *Chirurg*. 2002;73(12):1174-80.
33. Muller AC, van Oorschot B, Micke O, Guckenberger M. [German S3 guideline for renal cell carcinoma : Presentation and discussion of essential aspects for the radiation oncologist]. *Strahlenther Onkol*. 2018;194(1):1-8.
34. Hoogsteen IJ, Marres HA, van den Hoogen FJ, Rijken PF, Lok J, Bussink J, et al. Expression of EGFR under tumor hypoxia: identification of a subpopulation of tumor cells responsible for aggressiveness and treatment resistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;84(3):807-14.
35. Zhan M, Han ZC. Phosphatidylinositide 3-kinase/AKT in radiation responses. *Histol Histopathol*. 2004;19(3):915-23.
36. Qin Q, Cheng H, Lu J, Zhan L, Zheng J, Cai J, et al. Small-molecule survivin inhibitor YM155 enhances radiosensitization in esophageal squamous cell carcinoma by the abrogation of G2 checkpoint and suppression of homologous recombination repair. *J Hematol Oncol*. 2014;7:62.
37. Che SM, Zhang XZ, Liu XL, Chen X, Hou L. The radiosensitization effect of NS398 on esophageal cancer stem cell-like radioresistant cells. *Dis Esophagus*. 2011;24(4):265-73.
38. Chen Y, Li D, Wang D, Liu X, Yin N, Song Y, et al. Quiescence and attenuated DNA damage response promote survival of esophageal cancer stem cells. *J Cell Biochem*. 2012;113(12):3643-52.
39. Chen GZ, Zhu HC, Dai WS, Zeng XN, Luo JH, Sun XC. The mechanisms of radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma and current strategies in radiosensitivity. *J Thorac Dis*. 2017;9(3):849-59.
40. Bao CH, Wang XT, Ma W, Wang NN, Un Nesa E, Wang JB, et al. Irradiated fibroblasts promote epithelial-mesenchymal transition and HDGF expression of esophageal squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;458(2):441-7.
41. Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med*. 2015;13:45.
42. Cortini M, Avnet S, Baldini N. Mesenchymal stroma: Role in osteosarcoma progression. *Cancer Lett*. 2017;405:90-9.
43. Yokozaki H, Koma YI, Shigeoka M, Nishio M. Cancer as a tissue: The significance of cancer-stromal interactions in the development, morphogenesis and progression of human upper digestive tract cancer. *Pathol Int*. 2018;68(6):334-52.
44. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001;411(6835):375-9.

45. Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest.* 1990;63(2):144-61.
46. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-63.
47. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 2001;166(6):2472-83.
48. Castor CW, Wilson SM, Heiss PR, Seidman JC. Activation of lung connective tissue cells in vitro. *Am Rev Respir Dis.* 1979;120(1):101-6.
49. Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Thelmo WL. The myofibroblast: biologic, pathologic, and theoretical considerations. *Pathol Annu.* 1980;15(Pt 1):443-70.
50. Jiang H, Hegde S, DeNardo DG. Tumor-associated fibrosis as a regulator of tumor immunity and response to immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(8):1037-48.
51. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol.* 2014;4:62.
52. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(5):392-401.
53. Tanaka K, Miyata H, Sugimura K, Fukuda S, Kanemura T, Yamashita K, et al. miR-27 is associated with chemoresistance in esophageal cancer through transformation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts. *Carcinogenesis.* 2015;36(8):894-903.
54. Min A, Zhu C, Peng S, Shuai C, Sun L, Han Y, et al. Downregulation of Microrna-148a in Cancer-Associated Fibroblasts from Oral Cancer Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Targeting Wnt10b. *J Biochem Mol Toxicol.* 2016;30(4):186-91.
55. Huang M, Sharma S, Zhu LX, Keane MP, Luo J, Zhang L, et al. IL-7 inhibits fibroblast TGF-beta production and signaling in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2002;109(7):931-7.
56. Padua D, Massague J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res.* 2009;19(1):89-102.
57. Tang B, Vu M, Booker T, Santner SJ, Miller FR, Anver MR, et al. TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest.* 2003;112(7):1116-24.
58. Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol.* 2002;4(1):51-8.
59. Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol.* 2001;3(8):708-14.
60. Yoo J, Ghiassi M, Jirmanova L, Balliet AG, Hoffman B, Fornace AJ, Jr., et al. Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-

dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem*. 2003;278(44):43001-7.

61. Li XY, Xiao L, Zhang JH, Chen L. The irradiated-fibroblasts elicit immune response against tumor in a murine colon cancer model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(15):2812-7.

62. Twarock S, Freudenberger T, Poscher E, Dai G, Jannasch K, Dullin C, et al. Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by in vivo targeting of hyaluronan synthesis. *Mol Cancer*. 2011;10:30.

63. Chow MT, Luster AD. Chemokines in cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(12):1125-31.

64. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:41-51.

65. Brooke MA, Nitoiu D, Kelsell DP. Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. *J Pathol*. 2012;226(2):158-71.

66. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 2004;303(5660):1007-10.

67. Rainy N, Chetrit D, Rouger V, Vernitsky H, Rechavi O, Marguet D, et al. H-Ras transfers from B to T cells via tunneling nanotubes. *Cell Death Dis*. 2013;4:e726.

68. Costanzo M, Abounit S, Marzo L, Danckaert A, Chamoun Z, Roux P, et al. Transfer of polyglutamine aggregates in neuronal cells occurs in tunneling nanotubes. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 16):3678-85.

69. Guescini M, Leo G, Genedani S, Carone C, Pederzoli F, Ciruela F, et al. Microvesicle and tunneling nanotube mediated intercellular transfer of g-protein coupled receptors in cell cultures. *Exp Cell Res*. 2012;318(5):603-13.

70. Climent M, Quintavalle M, Miragoli M, Chen J, Condorelli G, Elia L. TGFbeta Triggers miR-143/145 Transfer From Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells, Thereby Modulating Vessel Stabilization. *Circ Res*. 2015;116(11):1753-64.

71. Naphade S, Sharma J, Gaide Chevrone HP, Shook MA, Yeagy BA, Rocca CJ, et al. Brief reports: Lysosomal cross-correction by hematopoietic stem cell-derived macrophages via tunneling nanotubes. *Stem Cells*. 2015;33(1):301-9.

72. Antanaviciute I, Rysevaite K, Liutkevicius V, Marandykina A, Rimkute L, Sveikatiene R, et al. Long-distance communication between laryngeal carcinoma cells. *PLoS One*. 2014;9(6):e99196.

73. Polak R, de Rooij B, Pieters R, den Boer ML. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells use tunneling nanotubes to orchestrate their microenvironment. *Blood*. 2015;126(21):2404-14.

74. Thayanythy V, Babatunde V, Dickson EL, Wong P, Oh S, Ke X, et al. Tumor exosomes induce tunneling nanotubes in lipid raft-enriched regions of human mesothelioma cells. *Exp Cell Res*. 2014;323(1):178-88.

75. Lou E, Fujisawa S, Morozov A, Barlas A, Romin Y, Dogan Y, et al. Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *PLoS One*. 2012;7(3):e33093.
76. Burtay A, Wagner M, Hodneland E, Skaftnesmo KO, Schoelermann J, Mondragon IR, et al. Intercellular transfer of transferrin receptor by a contact-, Rab8-dependent mechanism involving tunneling nanotubes. *FASEB J*. 2015;29(11):4695-712.
77. Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, Kohler K, et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol*. 2008;10(2):211-9.
78. Wang X, Veruki ML, Bukoreshtliev NV, Hartveit E, Gerdes HH. Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(40):17194-9.
79. Bukoreshtliev NV, Wang X, Hodneland E, Gurke S, Barroso JF, Gerdes HH. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett*. 2009;583(9):1481-8.
80. Wang Y, Cui J, Sun X, Zhang Y. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ*. 2011;18(4):732-42.
81. Wittig D, Wang X, Walter C, Gerdes HH, Funk RH, Roehlecke C. Multi-level communication of human retinal pigment epithelial cells via tunneling nanotubes. *PLoS One*. 2012;7(3):e33195.
82. Thayanithy V, Dickson EL, Steer C, Subramanian S, Lou E. Tumor-stromal cross talk: direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Transl Res*. 2014;164(5):359-65.
83. Chinnery HR, Pearlman E, McMenamin PG. Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *J Immunol*. 2008;180(9):5779-83.
84. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
85. G B. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie. DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie. Verlag. K, editor. Basel: Karger Verlag; 2007.
86. Lenz D MA, Bocsi J. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie. Probenvorbereitung für die Bildzytometrie. Karger, editor. Basel: Karger Verlag; 2007. 139-56 p.
87. Crowley LC, Marfell BJ, Waterhouse NJ. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(9).
88. Sack U TA, Rothe G. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie: Karger Verlag; 2006.
89. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991;139(2):271-9.

90. Rechavi O, Kalman M, Fang Y, Vernitsky H, Jacob-Hirsch J, Foster LJ, et al. Trans-SILAC: sorting out the non-cell-autonomous proteome. *Nat Methods*. 2010;7(11):923-7.
91. Myers MW, Lazzarini RA, Lee VM, Schlaepfer WW, Nelson DL. The human mid-size neurofilament subunit: a repeated protein sequence and the relationship of its gene to the intermediate filament gene family. *EMBO J*. 1987;6(6):1617-26.
92. Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res*. 2007;313(10):2098-109.
93. Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, et al. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*. 1999;23(3):569-82.
94. Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, et al. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*. 1999;23(3):583-92.
95. Victoria GS, Zurzolo C. The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: Implications for neurodegenerative diseases. *J Cell Biol*. 2017;216(9):2633-44.
96. Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED. ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem*. 2002;81(5):903-10.
97. Guilmatre A, Huguet G, Delorme R, Bourgeron T. The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. *Dev Neurobiol*. 2014;74(2):113-22.
98. Lilja J, Zacharchenko T, Georgiadou M, Jacquemet G, De Franceschi N, Peuhu E, et al. SHANK proteins limit integrin activation by directly interacting with Rap1 and R-Ras. *Nat Cell Biol*. 2017;19(4):292-305.
99. Klapholz B, Brown NH. Talin - the master of integrin adhesions. *J Cell Sci*. 2017;130(15):2435-46.
100. Xin H, Liu D, Songyang Z. The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome Biol*. 2008;9(9):232.
101. Duffney LJ, Zhong P, Wei J, Matas E, Cheng J, Qin L, et al. Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Rep*. 2015;11(9):1400-13.
102. Zitzer H, Honck HH, Bachner D, Richter D, Kreienkamp HJ. Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. *J Biol Chem*. 1999;274(46):32997-3001.
103. Bharti R, Dey G, Banerjee I, Dey KK, Parida S, Kumar BN, et al. Somatostatin receptor targeted liposomes with Diacerein inhibit IL-6 for breast cancer therapy. *Cancer Lett*. 2017;388:292-302.
104. Mascardo RN, Barton RW, Sherline P. Somatostatin has an antiproliferative effect on concanavalin A-activated rat thymocytes. *Clin Immunol Immunopathol*. 1984;33(1):131-8.

105. Weckbecker G, Raulf F, Tolcsvai L, Bruns C. Potentiation of the anti-proliferative effects of anti-cancer drugs by octreotide in vitro and in vivo. *Digestion*. 1996;57 Suppl 1:22-8.
106. Srikant CB. Cell cycle dependent induction of apoptosis by somatostatin analog SMS 201-995 in AtT-20 mouse pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;209(2):400-6.
107. Liu D, Martino G, Thangaraju M, Sharma M, Halwani F, Shen SH, et al. Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2000;275(13):9244-50.
108. Teijeiro R, Rios R, Costoya JA, Castro R, Bello JL, Devesa J, et al. Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53. *Cell Physiol Biochem*. 2002;12(1):31-8.
109. Alholle A, Brini AT, Gharanei S, Vaiyapuri S, Arrigoni E, Dallol A, et al. Functional epigenetic approach identifies frequently methylated genes in Ewing sarcoma. *Epigenetics*. 2013;8(11):1198-204.
110. Huang Z, Zhuo Y, Shen Z, Wang Y, Wang L, Li H, et al. The role of NEFL in cell growth and invasion in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(3):191-8.
111. Revill K, Wang T, Lachenmayer A, Kojima K, Harrington A, Li J, et al. Genome-wide methylation analysis and epigenetic unmasking identify tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2013;145(6):1424-35 e1-25.
112. Kim MS, Chang X, LeBron C, Nagpal JK, Lee J, Huang Y, et al. Neurofilament heavy polypeptide regulates the Akt-beta-catenin pathway in human esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2010;5(2):e9003.
113. Leduc C, Etienne-Manneville S. Regulation of microtubule-associated motors drives intermediate filament network polarization. *J Cell Biol*. 2017;216(6):1689-703.
114. Calmon MF, Jeschke J, Zhang W, Dhir M, Siebenkas C, Herrera A, et al. Epigenetic silencing of neurofilament genes promotes an aggressive phenotype in breast cancer. *Epigenetics*. 2015;10(7):622-32.
115. Gkika D, Lemonnier L, Shapovalov G, Gordienko D, Poux C, Bernardini M, et al. TRP channel-associated factors are a novel protein family that regulates TRPM8 trafficking and activity. *J Cell Biol*. 2015;208(1):89-107.
116. Zhang L, Barritt GJ. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(1):27-38.
117. Biran A, Perelmutter M, Gal H, Burton DG, Ovadya Y, Vadai E, et al. Senescent cells communicate via intercellular protein transfer. *Genes Dev*. 2015;29(8):791-802.
118. Papadopoulou A, Kletsas D. Human lung fibroblasts prematurely senescent after exposure to ionizing radiation enhance the growth of malignant lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 2011;39(4):989-99.

119. Donahue HJ, Qu RW, Genetos DC. Joint diseases: from connexins to gap junctions. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;14(1):42-51.
120. Al-Mayah A, Bright S, Chapman K, Irons S, Luo P, Carter D, et al. The non-targeted effects of radiation are perpetuated by exosomes. *Mutat Res.* 2015;772:38-45.
121. Al-Mayah AH, Irons SL, Pink RC, Carter DR, Kadhimi MA. Possible role of exosomes containing RNA in mediating nontargeted effect of ionizing radiation. *Radiat Res.* 2012;177(5):539-45.
122. Jelonek K, Wojakowska A, Marczak L, Muer A, Tinhofer-Keilholz I, Lysek-Gladysinska M, et al. Ionizing radiation affects protein composition of exosomes secreted in vitro from head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(2):265-72.
123. Kundrat P, Friedland W. Impact of intercellular induction of apoptosis on low-dose radiation carcinogenesis. *Radiat Prot Dosimetry.* 2015;166(1-4):170-3.
124. Bauer G. Low dose radiation and intercellular induction of apoptosis: potential implications for the control of oncogenesis. *Int J Radiat Biol.* 2007;83(11-12):873-88.
125. Blyth BJ, Sykes PJ. Radiation-induced bystander effects: what are they, and how relevant are they to human radiation exposures? *Radiat Res.* 2011;176(2):139-57.
126. Facchetti A, Ballarini F, Cherubini R, Gerardi S, Nano R, Ottolenghi A, et al. Gamma ray-induced bystander effect in tumour glioblastoma cells: a specific study on cell survival, cytokine release and cytokine receptors. *Radiat Prot Dosimetry.* 2006;122(1-4):271-4.
127. Burr KL, Robinson JL, Rastogi S, Boylan MT, Coates PJ, Lorimore SA, et al. Radiation-induced delayed bystander-type effects mediated by hemopoietic cells. *Radiat Res.* 2010;173(6):760-8.
128. Shao C, Prise KM, Folkard M. Signaling factors for irradiated glioma cells induced bystander responses in fibroblasts. *Mutat Res.* 2008;638(1-2):139-45.
129. Nagasawa H, Cremesti A, Kolesnick R, Fuks Z, Little JB. Involvement of membrane signaling in the bystander effect in irradiated cells. *Cancer Res.* 2002;62(9):2531-4.
130. Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(1-2):303-15.
131. Nakaoka HJ, Tanei Z, Hara T, Weng JS, Kanamori A, Hayashi T, et al. Mint3-mediated L1CAM expression in fibroblasts promotes cancer cell proliferation via integrin $\alpha 5 \beta 1$ and tumour growth. *Oncogenesis.* 2017;6(5):e334.
132. Wang WQ, Liu L, Xu HX, Luo GP, Chen T, Wu CT, et al. Intratumoral α -SMA enhances the prognostic potency of CD34 associated with maintenance of microvessel integrity in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancer. *PLoS One.* 2013;8(8):e71189.

133. Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR. Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell*. 1986;44(1):187-96.
134. Martin W, Zempel G, Hulser D, Willecke K. Growth inhibition of oncogene-transformed rat fibroblasts by cocultured normal cells: relevance of metabolic cooperation mediated by gap junctions. *Cancer Res*. 1991;51(19):5348-51.
135. Alkasalias T, Moyano-Galceran L, Arsenian-Henriksson M, Lehti K. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).
136. van Brummelen EMJ, de Boer A, Beijnen JH, Schellens JHM. BRAF Mutations as Predictive Biomarker for Response to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies. *Oncologist*. 2017;22(7):864-72.
137. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.

6 DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. J.W. Fischer für die Überlassung des interessanten Themas, die Unterstützung und die hilfreichen Anregungen bedanken. Insbesondere bedanke ich mich für die Möglichkeit der Mitgliedschaft im GRK1739.

Besonderer Dank gilt Katharina Röck, ohne deren Hilfe und Ratschläge diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Vielen Dank für die Erreichbarkeit trotz der Distanz und die Unterstützung jeglicher Art.

Ich bedanke mich beim GRK1739, insbesondere bei Frau Prof. Jendrossek und Frau Prof. Knauer, für die Betreuung innerhalb des Graduiertenkollegs, für ihren wissenschaftlichen Input und ihre konstruktiven Ratschläge.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Alexandra Schütze für die geduldige Einarbeitung im Labor, die immense Unterstützung und die gemeinsam zurückgelegten Kilometer – ob in der Bahn und im Auto nach Essen oder in Laufschuhen am Rhein entlang - bedanken. Du warst eine riesige Hilfe während der gesamten Zeit!

Gleichermaßen bedanke ich mich bei Oliver Reiners für die Unterstützung und die tolle gemeinsame Zeit im Labor. Vielen Dank für den seelischen und wissenschaftlichen Beistand, der vieles in den letzten Jahren einfacher gemacht hat.

Bei Jessica Wladarz, Christian Vogeley und David Rösger bedanke ich mich für die tolle Zusammenarbeit in der AG Röck.

Bei Sören Twarock möchte ich mich herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die Hilfe bei diversen technischen Problemen bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Oma Amma, die mir ein so sorgloses Studium in jeder Hinsicht ermöglicht haben!