

Aus dem
Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Prof. Dr. Jens W. Fischer

**Die Wirkung von Strahlung auf das Fibroblasten-Sekretom und dessen
Effekt auf die Radiosensitivität des ösophagealen Plattenepithelkarzinoms**

Dissertation

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

vorgelegt von
David Julian Rösgen

2021

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Günter Niegisch

Gewidmet meiner Familie und meinen Freunden

Zusammenfassung

Krebserkrankungen sind ein weltweit wachsendes Gesundheitsrisiko. Unter diesen ist das Ösophaguskarzinom die siebthäufigste Krebsart. Die Strahlentherapie ist als zentraler Bestandteil bei bis zu 80 % der Patienten indiziert. Die Prognose des Ösophaguskarzinoms im Vergleich zu anderen Karzinomen ist aufgrund häufig später Diagnose und hoher Invasivität schlecht. Daher sind Therapieverbesserungen dringend notwendig. Eine Verringerung der Radioresistenz bzw. eine Radiosensitivierung des Ösophaguskarzinoms könnte dies ermöglichen.

In der Krebsforschung werden die Einflüsse zwischen Tumor und umgebenden gesunden Zellen intensiv erforscht. In dieser sogenannten Tumormikroumgebung wirken schädliche und förderliche Effekte durch unterschiedliche Formen der Zellkommunikation.

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Radiosensitivierung von Ösophaguskarzinomzellen durch lösliche Faktoren von Fibroblasten. Darauf aufbauend wurde der Einfluss von Strahlung auf die löslichen Faktoren selbst analysiert.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die strahleninduzierte Apoptose von Ösophaguskarzinomzellen durch Kultivierung im konditionierten Medium nativer Fibroblasten signifikant ansteigt. Das konditionierte Medium zuvor bestrahlter Fibroblasten zeigte diesen Effekt nicht. Diese Ergebnisse konnten mit kryokonserviertem konditionierten Medium reproduziert werden. Die Ergebnisse deuteten auf eine Protein-vermittelte Radiosensitivierung in den Ösophaguskarzinomzellen hin. Dieser Effekt wurde durch Bestrahlung der Fibroblasten ausgeschaltet.

Eine quantitative Massenspektrometrie der sezernierten Proteine von nativen und bestrahlten Fibroblasten resultierte in der Entdeckung von 41 strahlungsabhängig regulierten Proteinen. Diese Gruppe wurde eingehend mit Werkzeugen der Bioinformatik analysiert und durch manuelle Literaturrecherche weiter eingegrenzt. Drei Proteine wurden abschließend als sehr wahrscheinliche Kandidaten für einen radiosensitivierenden Effekt identifiziert. Aus diesen ist das Protein LTBP1 der wahrscheinlichste Kandidat.

Summary

Cancer is a growing risk to health worldwide. Among the many types of cancer esophageal carcinoma is the seventh most common kind. A central pillar in its treatment is radiotherapy, which is indicated in up to 80 % of cases. By comparison, the esophageal carcinoma shows a high lethality, mainly due to a typically late diagnosis and advanced cancer invasion. Therefore, improvements of therapy are urgently needed. A decrease of radioresistance or an increase of radiosensitivity, respectively, could be an effective approach.

In cancer research the relationship between the tumor and stroma cells has been recently discovered and is investigated intensively. The so-called tumor microenvironment causes both detrimental and beneficial effects through multiple forms of cell communication.

The aim of this work was to investigate the influence of soluble factors from fibroblasts on the radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma and in addition the effect of radiation on the soluble factors themselves.

This work shows that radiation-induced apoptosis in esophageal cancer cells was significantly increased using conditioned medium of native fibroblasts. This effect disappeared, when the conditioned medium of previously irradiated fibroblasts was used. All the results were reproducible with cryoconserved conditioned media. This observation pointed towards a protein-mediated effect of increased radiosensitivity in esophageal cancer cells. The effect was neutralized by irradiation of the fibroblasts.

A quantitative mass spectrometry of the secreted proteins in the conditioned media of native and irradiated fibroblasts resulted in the discovery of 41 radiation-dependently regulated proteins. This group was investigated in detail with methods of bioinformatics and further explored by manual literature research. Three proteins were identified as likely candidates for an effect of increased radiosensitivity. Out of those LTBP1 is the most likely candidate.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
ATM	Serin-Proteinkinase ATM (<i>ataxia telangiectasia mutated</i>)
BASPs	Bestrahlungsabhängig sezernierte Proteine
BST1	ADP-Ribosyl Zyklase 2 (<i>bone marrow stromal cell antigen 1</i>)
CAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten (<i>cancer-associated fibroblasts</i>)
cEGF	C1r-ähnliche Domäne
CLEC11A	C-Lektin Superfamilie 11 Protein A
CLEC3B	Tetranectin
CLU	Clusterin
cm²	Quadratcentimeter
COL4A2	Alpha-2-Typ-IV-Kollagen
COL6A2	Alpha-2-Typ-VI-Kollagen
CSPG4	Chondroitinsulfat Proteoglykan 4
CTSB	Cathepsin-B
d	Tag
DAVID	<i>Database for annotation, visualization and integrated discovery</i>
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ESCC	Ösophageales Plattenepithelkarzinom
ESI-MS	Elektrosprayionisations-MS (<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>)
FAC	Funktionales Analysediagramm (<i>functional analysis chart</i>)
FAT	Funktionale Annotationsanwendung (<i>functional annotation tool</i>)
FBLN2	Fibulin-2
FBLN5	Fibulin-5
FBS	Fetales bovines Serum
FLNA	Filamin-A

FLNC	Filamin-C
g	g-Kraft
GELS	Gelsolin
GFCT	Funktionale Gen-Klassifizierungsanwendung (<i>gene functional classification tool</i>)
Gy	Gray
h	Stunde
hEGF	Humane EGF-ähnliche Domäne
HK1	Hexokinase-1
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HR	Homologe Rekombination
K-	Kyse 410 - unbestrahlt
K+	Kyse 410 - bestrahlt
kV	Kilovolt
LAMP1	Lysosome-assoziiertes Membranprotein 1
LC/MS	Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (<i>liquid chromatography/mass spectrometry</i>)
LDHB	L-Laktatdehydrogenase B
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LHRI	<i>Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics</i>
LTBP1	Latentes TGF-beta bindendes Protein 1
mA	Milliampere
mGy	Milligray
min	Minute
Mio.	Millionen
mm	Millimeter
MMDH2	Mitochondriale Malatdehydrogenase
MMP1	Matrix-Metalloprotease 1
mRNA	Mikro-RNA
MS	Massenspektrometrie
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten

NHEJ	Nicht-homologe Endverbindung (<i>non-homologous end joining</i>)
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>non-small cell lung cancer</i>)
OLFML3	Olfactomedin-ähnliches Protein 3
p53	Tumorprotein p53
PAM	Peptidylglycine alpha-amidierende Monooxygenase
PAPPA	Pappalysin-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCOLCE	Prokollagen C-Endopeptidase Verstärkerprotein 1
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PFN1	Profilin-1
PI	Propidium-Iodid
POSTN	Periostin
PRDX1	Peroxiredoxin-1
PRKCSH	Glucosidase-2-alpha
PROF1	Profilin 1
PSMA6	Proteasome Untereinheit-alpha Typ-6
RARRES2	Chemerin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> -Medium
s	Sekunde
SBAPs	Stark bestrahlungsabhängig sezernierte Proteine
SDCBP	Syndecan bindendes Protein 1
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERPINB6	Serpin B6
SERPINH1	Serpin H1
siRNA	Interferenz-RNA
SMAD	Signalproteinfamilie SMAD
SN-	Überstand (<i>supernatant</i>) - unbestrahlt
SN+	Überstand (<i>supernatant</i>) - bestrahlt
SPARC	Osteonectin (<i>secreted protein acidic and rich in cystein</i>)

STC2	Stanniocalcin-2
TE	Trypsin/EDTA
TENA	Tenascin
TGF-beta	Transformierender Wachstumsfaktor beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
TGF-beta 1	Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 (<i>transforming growth factor beta 1</i>)
TKT	Transketolase
TME	Tumormikroumgebung
TNC	Tenascin
TRIB3	Tribbles Pseudokinase 3
Tsd.	Tausend
VCAN	Versican
VCL	Vinculin
VCP	Transitionale endoplasmatische Retikulums ATPase
YWHAZ	Kodierendes Gen des 14-3-3 Protein zeta
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Maligne Neoplasien	1
1.2 Ösophaguskarzinom	1
1.2.1 Definition und Epidemiologie	1
1.2.2 Strahlentherapie des Ösophaguskarzinoms	2
1.3 Strahlenbiologie	3
1.3.1 Zellschaden durch Strahlung	3
1.3.2 Zelltod durch Strahlung.....	4
1.4 Radioresistenz	5
1.4.1 Radioresistenz von Karzinomzellen.....	5
1.4.2 Radioresistenz von ESCC	5
1.5 Fibroblasten	5
1.5.1 Fibroblasten allgemein.....	5
1.5.2 Fibroblasten und die Tumormikroumgebung	6
1.5.3 Fibroblasten unter Bestrahlung.....	7
1.6 Proteomik.....	7
1.6.1 Proteomik und Bioinformatik allgemein.....	7
1.6.2 Proteomik und Fibroblasten-Sekretom	8
1.7 Die Verbindung von Strahlung, ESCC, Fibroblasten und Proteomik ...	8
1.8 Ziele dieser Arbeit.....	10
2 Materialien und Methoden	11
2.1 Arbeitsmittel	11
2.1.1 Hersteller	11
2.1.2 Zelllinien	11
2.1.3 Zellkultur-Materialien	12
2.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	12
2.1.5 Geräte.....	12
2.1.6 Software	13
2.2 Zellkultur	13
2.2.1 Kultivierung.....	13
2.2.2 Zellzahlbestimmung.....	14
2.2.3 Versuchsaufbau.....	14
2.2.4 Versuchsaufbau mit kryokonserviertem Fibroblasten-Überstand	15
2.3 Durchflusszytometrie mit Sub-G1-Methode	15
2.4 Bestrahlung.....	17
2.5 Massenspektrometrie.....	17
2.6 Proteomdaten-Analyse	18
2.6.1 Ablauf der Datenanalyse	18

2.6.2	DAVID-Bioinformatik-Analyse	18
2.6.3	Manuelle Datenanalyse	23
2.7	Statistik	23
3	Ergebnisse.....	24
3.1	Radiosensitivität von Kyse 410 in Fibroblasten-Medium.....	24
3.2	Radiosensitivität von Kyse 410 in kryokonserviertem Medium	25
3.3	Einfluss von Strahlung auf das Sekretom von Fibroblasten.....	26
3.4	Funktions- und Klassifikationsanalyse der Proteomik-Daten	31
3.4.1	Proteom-Analyse mit dem DAVID FAT	31
3.4.2	Proteom-Analyse mit dem DAVID GFCT	32
3.4.3	Eingrenzung der Suchparameter	35
3.4.4	Manuelle Überprüfung der SBASP-Proteingruppe.....	36
3.4.5	Zusammenfassung der Sekretom-Analyse	37
4	Diskussion.....	41
4.1	Radiosensitivität von Kyse 410 in Fibroblasten-Medium.....	41
4.2	Radiosensitivität von Kyse 410 in kryokonserviertem Medium	43
4.3	Einfluss von Strahlung auf das Sekretom von Fibroblasten.....	45
4.4	Funktions- und Klassifizierungsanalyse der Proteomik-Daten	46
4.4.1	Proteom-Analyse mit DAVID FAT	46
4.4.2	Proteom-Analyse mit DAVID GFCT	48
4.4.3	Eingrenzung der Suchparameter	50
4.4.4	Manuelle Überprüfung der SBASP-Proteingruppe.....	50
4.4.5	Zusammenfassung der Sekretom-Analyse	51
5	Schlussfolgerungen.....	55
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	56

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Versuchsdesign der Sub-G1-Experimente.....	15
Abb. 2 Beispielhistogramm - Qualitatives Nicoletti-Assay-Histogramm.....	17
Abb. 3 Bildschirmaufnahme Phase 1 - Hochladen der Daten	20
Abb. 4 Bildschirmaufnahme Phase 2 – Auswahl der Analysewerkzeuge.....	21
Abb. 5 Bildschirmaufnahme Phase 3 - GFCT-Analyse mit <i>heatmap</i> -Option	22
Abb. 6 Bildschirmaufnahme Phase 4 - FAT-Analyse in <i>Chart</i> -Darstellung.....	23
Abb. 7 Steigerung der strahleninduzierten Apoptose von Kyse 410 durch Kultivierung in frischem Medium unbestrahlter Fibroblasten.....	25
Abb. 8 Steigerung der strahleninduzierten Apoptose von Kyse 410 durch Kultivierung in kryokonserviertem Medium unbestrahlter Fibroblasten	26
Abb. 9 Bestrahlung moduliert das Sekretom von Fibroblasten.....	28
Abb. 10 Die häufigsten funktionellen Eigenschaften der strahlungsabhängig sezernierten Proteine.....	32
Abb. 11 Die Proteine VCAN, LTBP1, FBLN2 und FBLN5 bilden eine Gruppe mit ähnlichem Eigenschaften-Profil.....	34
Abb. 12 Eingrenzung der Recherche auf Proteine mit zweifachem Signifikanzniveau	36
Abb. 13 Manuelle Analyse der SBASPs.....	37
Abb. 14 Zusammenfassung der Proteom-Analyse.....	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Hersteller	11
Tabelle 2 Zelllinien	11
Tabelle 3 Zellkulturmaterialien	12
Tabelle 4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	12
Tabelle 5 Geräte	12
Tabelle 6 Software	13
Tabelle 7 Bestrahlungsabhängig sezernierte Proteine	28

1 Einleitung

1.1 Maligne Neoplasien

Maligne Neoplasien sind eine Krankheit, die durch unkontrollierte Zellproliferation aus normalem Gewebe eines Organismus entsteht. Auf molekularer Ebene haben sich die Krebszellen den Schutzmechanismen zur Wachstumsregulation entzogen und bedrohen das Überleben des Organismus.

Weltweit wurde im Jahr 2020 bei 19,29 Mio. Menschen eine maligne Neoplasie diagnostiziert. In demselben Jahr verstarben 9,59 Mio. Menschen an einer Krebserkrankung. Maligne Neoplasien sind insgesamt die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen [1]. In Deutschland werden 51 % aller Männer und 43 % aller Frauen im Lauf ihres Lebens eine Krebsdiagnose erhalten. Jeder 4. Mann und jede 5. Frau in Deutschland wird an einer malignen Neoplasie sterben [2]. Aufgrund der global steigenden Lebenserwartung und verbesserter medizinischer Früherkennung ist weltweit mit weiterhin ansteigenden Erkrankungszahlen zu rechnen. Dies verdeutlicht die enorme Bedeutung maligner Neoplasien für die Gesundheit der Bevölkerung in Deutschland und weltweit.

1.2 Ösophaguskarzinom

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Das Ösophaguskarzinom ist weltweit die siebthäufigste und sechsttödlichste Krebserkrankung [1,3]. Es ist jährlich für 5,5 % aller durch Krebs verursachten Tode verantwortlich, was einer approximierten Anzahl von 544 Tsd. Krebstoten entspricht [1]. In Deutschland bestand der WHO zufolge 2020 eine Inzidenz von 7.682 Neuerkrankungen [1].

Der weltweit häufigste Subtyp des Ösophaguskarzinoms ist das ösophageale Plattenepithelkarzinom (ESCC), wozu auch die in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie Kyse 410 zählt. Das ESCC entsteht aus Epithelzellen im oberen und mittleren Drittel des Ösophagus. Die allgemeinen Hauptrisikofaktoren für das ESCC sind geordnet nach ansteigendem Risikofaktor: Armut, regelmäßiger Konsum sehr heißer Speisen, starker Alkohol- und Tabakkonsum [4]. 79 % aller

Patienten mit ESCC leben in Südost- und Zentral-Asien [5]. Neben dem ESCC existiert noch der Subtyp des ösophagealen Adenokarzinoms, der in dieser Arbeit aber nicht weiter behandelt wird.

Klinisch werden Ösophaguskarzinome meist durch Dysphagie (Schluckbeschwerden) auffällig, wobei die Odynophagie (Schmerzen im Schluckvorgang) und die als B-Symptomatik bekannte Trias aus Abgeschlagenheit, Nachtschweiß und Gewichtsverlust seltener Symptome sind [4]. Die Symptome treten typischerweise erst spät im Krankheitsverlauf auf. Daher gilt das Ösophaguskarzinom insgesamt als „stummer“ Tumor, der in 69 % aller Fälle zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits stark fortgeschritten ist [6].

Von den potentiell operablen Patienten unterziehen sich nur 40 % der risikoreichen Operation, die aus der Resektion des befallenen Abschnitts und dem Hochzug des Magens besteht [7]. Ein Vergleich von Chirurgie inklusive neoadjuvanter Radiochemotherapie mit definitiver Radiochemotherapie zeigte in mehreren Studien keine Unterschiede der Überlebensrate [8,9].

Inoperable Tumoren ohne Fernmetastasen werden mit definitiver Radiochemotherapie behandelt [10].

Ösophaguskarzinom-Patienten haben eine durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von 20%. Diese schlechte Prognose entsteht durch die oft späte Diagnose und die folglich limitierten Therapieoptionen [10]. Dies unterstreicht die dringende Notwendigkeit zur Verbesserung und Fortentwicklung der Therapiemöglichkeiten.

1.2.2 Strahlentherapie des Ösophaguskarzinoms

Die Strahlentherapie bildet neben Chirurgie und Chemotherapie die dritte Säule der onkologischen Therapie. Die Strahlendosis wird in Gray (Gy) als Joule pro Kilogramm angegeben.

Es wird angenommen, dass bei circa 80 % aller Patienten mit Ösophaguskarzinom eine Strahlentherapie indiziert ist [11]. Dazu wird nach aktueller S3-Leitlinie eine Standarddosis von 1,8-2 Gy pro Sitzung appliziert. Insgesamt wird eine kumulierte Dosis von 50 Gy angestrebt. Die zusätzliche Gabe der Chemotherapeutika 5-Fluoruracil oder Mitomycin-C als Strahlensensitizer kann die Ergebnisse verbessern [10]. Auch in einer palliativen

Situation wird Radiotherapie eingesetzt, um Symptome wie stenosebedingte Dysphagie oder Kompressionsschmerzen zu lindern [10].

Eine klinische Phase-III-Studie mit 236 Patienten verglich die Wirksamkeit der Standarddosis gegenüber einer hochdosierten Strahlentherapie (50,4 Gy vs. 64,8 Gy). Die intensiv bestrahlte Kohorte zeigte kein verlängertes Überleben und gleichzeitig eine erhöhte Sterberate, sodass die Studie abgebrochen wurde [12]. Dies zeigt, dass eine Verbesserung der Strahlentherapie nicht durch eine Dosissteigerung erfolgen kann, sondern besser durch eine effektivere Strahlenwirkung erzielt werden sollte. Der Erfolg der Strahlentherapie bewegt sich letztlich zwischen der Radiosensitivität der Tumorzellen und der Radioresistenz des gesunden Gewebes.

1.3 Strahlenbiologie

1.3.1 Zellschaden durch Strahlung

Die physikalische Grundlage der Zellschädigung durch Strahlung ist die Ionisation. Diese verursacht unmittelbar Schaden an der DNA und anderen Zellmolekülen sowie sekundäre Schäden durch Radiolyse und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) [13]. Insgesamt bewirken nicht die direkten Strahlenschäden, sondern die ROS den Großteil der Strahlenantwort. So konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von ROS-unterdrückenden Substanzen die Radiosensitivität deutlich verringert werden kann [14].

Aufgrund der zentralen Steuerungsfunktion der DNA ist das Ausmaß der DNA-Schädigung von wesentlicher Bedeutung für den Strahleneffekt. Es existieren zahlreiche Arten von DNA-Schäden, wie DNA-Einzelstrangbrüche, DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) und DNA-DNA-/DNA-Protein-Komplexbildungen [15]. DNA-Einzelstrangbrüche können unter Vorlage des komplementären DNA-Stranges repariert werden. Die Reparatur von DSB und DNA-Komplexen erfolgt durch homologe Rekombination (HR) oder nicht-homologe Endverbindung (NHEJ).

DNA-Schäden aktivieren eine Reihe von Signalkaskaden, unter anderem wird durch DNA-Doppelstrangbrüche die Serin/Threonin-Kinase ATM induziert, welche eine DNA-Reparatur oder einen Zellzyklusarrest und Apoptose bewirken

kann [16,17]. Es hat sich gezeigt, dass neben der DNA-Schädigung weitere Mechanismen der Strahlenschädigung existieren. Eine Beeinträchtigung der Mitochondrien und die Aktivierung saurer Sphingomyelinasen spielen ebenfalls eine Rolle im strahleninduzierten Zellschaden [18,19].

Darüber hinaus können Strahlungseffekte auch in unbestrahlten Zellen durch bestrahlte Zellen des gleichen Zelltyps hervorgerufen werden. Dies wird als sogenannter *bystander*-Effekt bezeichnet. Es ist ein Effekt vorbeschrieben, bei dem bestrahlte Fibroblasten durch Interleukin-33 und die Serin/Threonin-Kinase AKT eine DNA-Reparatur und anti-apoptotische Effekte in unbestrahlten Fibroblasten induzierten [20]. Bisher ist eine exakte Differenzierung zwischen direktem Strahleneffekt und *bystander*-Effekt bei gleichzeitigem Auftreten nicht möglich [21].

Strahlung führt im klinischen Kontext zu einer Entzündungsreaktion des Gewebes. Bei Bestrahlung des Thorax äußert sich dies häufig in einer nicht-infektiösen Lungenentzündung (Pneumonitis) [10]. In diesem Kontext wurde der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF-beta) als zentraler Mediator identifiziert. So zeigten Haiping *et al.* (2006), dass eine *in vivo* TGF-beta-Suppression im Maus-Modell eine strahlungsinduzierte Pneumonitis verringert [22].

1.3.2 Zelltod durch Strahlung

Effektive Bestrahlung führt auf zellulärer Ebene zum Zelltod. Allgemein wird der Zelltod in vier Formen unterteilt. Man unterscheidet die Nekrose (physische Zerstörung), die Apoptose (Selbstzerstörung), den klonogenen Zelltod (Verlust der Teilungsfähigkeit) und die Seneszenz (alterungsbedingter Verlust der Teilungsfähigkeit). Strahlung in therapeutischer Dosierung bewirkt in Zellen die Apoptose oder den klonogenen Zelltod [23].

Die Apoptose führt zur Selbstaflösung der Zelle durch Lyse der DNA und Verlust der Membranintegrität. Ein klonogener Zelltod entspricht einem p53- und ATM-abhängigen Zellzyklus-Arrest, der sekundär ebenfalls zur Apoptose führt, falls keine Reparatur der Strahlenschäden erfolgt [24]. Dunne *et al.* (2016) konnten zeigen, dass die Rate der Apoptose eine akkurate Prädiktion des Strahleneffekts auf eine Zellpopulation erlaubt [25].

1.4 Radioresistenz

1.4.1 Radioresistenz von Karzinomzellen

Grundsätzlich unterliegen Karzinomzellen denselben Strahlungseffekten wie alle unveränderten Zellen. Allerdings besteht in Karzinomzellen eine verstärkte Resistenz gegenüber therapeutischer Schädigung durch Strahlung, die im Fall von gastrointestinalen Tumoren, zu denen auch ESCC gehören, in 70-96 % aller Fälle auftritt [26]. Da die Strahlentherapie in der Behandlung von ESCC eine herausragende Rolle spielt, sind Resistenzmechanismen von großem Interesse und werden bereits intensiv erforscht. Das Verständnis der molekularen Zusammenhänge ist aber unvollkommen.

1.4.2 Radioresistenz von ESCC

Für das ESCC sind multiple Mechanismen der Radioresistenz beschrieben. Dazu zählen radio-protective Mechanismen, wie die erhöhte Expression von Radikal- und ROS-Fängern und ein hypoxisches Milieu, aber auch regenerative Effekte, wie eine verstärkte DNA-Reparatur-Induktion via ATM oder die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT), die einen Zelltod verhindern kann [27].

Die Inhibition von Radioresistenzmechanismen, wie die DNA-Reparatur in Krebszellen, ist ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Strahlentherapie [28]. Außerdem gibt es bereits erfolgreiche Versuche zur Erhöhung der Radiosensitivität von ESCC durch Störung des bekannten Apoptose-Inhibitors Survivin mit mRNA [29]. Allerdings wurde bislang kein pharmakologischer Wirkstoff zur gezielten Radiosensitivierung von gastrointestinalen Tumoren klinisch zugelassen [26].

1.5 Fibroblasten

1.5.1 Fibroblasten allgemein

Fibroblasten sind die Bindegewebszellen des Körpers. Im Fall einer Krebsentstehung liegen sie dem Tumor in vielen Fällen direkt an. Sie beeinflussen daher auch den Tumor und werden bei einer Strahlentherapie mitbestrahlt.

1.5.2 Fibroblasten und die Tumormikroumgebung

Maligne Neoplasien entstehen nicht allein durch DNA-Mutationen, sondern benötigen zusätzlich eine begünstigende molekulare Umgebung. Die Gesamtheit der molekularen Umgebung eines Tumors wird als Tumormikroumgebung (TME) bezeichnet. Die TME umfasst ein heterogenes System, das zu einem wesentlichen Teil aus Fibroblasten besteht. Weitere Elemente der TME sind Endothel- und Immunzellen, Strukturkomponenten und lösliche Faktoren [30].

Die Phänotypen der Zellen der TME stehen unter zahlreichen externen Einflüssen wie parakrinen Signalen benachbarter Zellen, Hormonkonzentrationen, pH-Werten, Pathogenen oder DNA-Schäden. Als Modulator der Krebsentstehung ist die TME von großer Relevanz für die Radiosensitivität des Tumors. Da die TME eine niedrigere stochastische Mutationsrate als Krebszellen besitzt, ist die zu erwartende Resistenzbildungsrate geringer als bei Therapien, deren Zielstruktur dem Genom von Krebszellen entstammt, was sie als therapeutisches Ziel interessant macht [31].

Die Fibroblasten der TME liegen teilweise in ihrer nativen Form vor und sind teilweise durch den Einfluss von Tumorzellen zu Tumor-assoziierten Fibroblasten (*cancer-associated fibroblasts*, CAFs) verändert [32]. Charakteristisch für CAFs ist die Beobachtung, dass Fibroblasten aus der TME ihren Phänotyp dauerhaft verändern. Die CAFs sind Gegenstand aktueller Forschung. CAFs wurden bereits als Leit-Strukturen für die Invasion von Plattenepithelkarzinomen identifiziert und eine Immunevasion von Kolonkarzinom-Zellen durch Sekretion von TGF-beta aus CAFs ist beschrieben [33,34]. Aber eine klare Unterscheidung zwischen CAFs und nativen Fibroblasten in der TME ist bisher nicht möglich, da unklar ist, wie sich CAFs und native Fibroblasten unterscheiden [32].

Es gibt bereits Untersuchungen zur direkten Zellkontakt-vermittelten Kommunikation in der TME. So bewirkten native Fibroblasten im direkten Zellkontakt eine Wachstumsinhibition in zahlreichen Krebsarten [35]. Allerdings ist der Einfluss von indirekter Kommunikation zwischen Fibroblasten und Krebszellen mittels löslicher Faktoren bisher unzureichend erforscht. Die gezielte Untersuchung von indirekter Kommunikation könnte durch die Verwendung von konditioniertem Medium von Fibroblasten ermöglicht werden.

1.5.3 Fibroblasten unter Bestrahlung

Da Fibroblasten bei einer Strahlentherapie trotz größtmöglicher Schonung zwangsläufig Strahlung absorbieren, ist der Strahleneffekt auf die löslichen Faktoren aus Fibroblasten in diesem Kontext ebenfalls sehr interessant. Fibroblasten zeigen unter Bestrahlung deutliche phänotypische Veränderungen. So ist bekannt, dass Bestrahlung in Fibroblasten nach kurzer Zeit zu Inflammation führt [36]. In diesem Zusammenhang wird TGF-beta als zentraler Regulator der Strahlenantwort beschrieben [22,37]. Darüber hinaus entwickeln bestrahlte Fibroblasten eine Fibrose, eine Verhärtung des Gewebes, die zahlreiche Nebenwirkungen der Strahlentherapie verursacht [38]. Diese manifestiert sich mit einer zeitlichen Verzögerung von 4-12 Monaten und ist daher ein langfristiger Effekt [39].

Frühere Ergebnisse aus dem Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie konnten bereits zeigen, dass es durch direkten Zellkontakt von Fibroblasten und ESCC zu einer Zunahme strahlungsabhängiger Apoptose in ESCC kommt, wobei die Bestrahlung der Fibroblasten einen verstärkenden Effekt hatte [40]. Da die TME einen großen Einfluss auf das Karzinomzellverhalten hat und ein großer Anteil der TME aus Fibroblasten besteht, ist ein erheblicher Einfluss von Fibroblasten auf die Strahlenantwort anzunehmen.

Bisher wurden keine Untersuchungen zur Radiosensitivierung durch lösliche Faktoren aus Fibroblasten publiziert. Aber moderne Methoden zur systematischen Untersuchung interzellulärer Kommunikation könnten dies ermöglichen.

1.6 Proteomik

1.6.1 Proteomik und Bioinformatik allgemein

Die Proteomik ist ein eigenständiger Forschungsbereich der Biochemie, der versucht die Proteine eines Organismus umfassend zu katalogisieren. Als Methode kommt primär die Massenspektrometrie zum Einsatz [41]. In der onkologischen Forschung wird die Proteomik primär zur Analyse der Proteinexpression von Krebszellen eingesetzt. Hierbei steht bisher die Suche nach prädiktiven Biomarkern im Vordergrund. So wurden bereits Protein-

Biomarker zur Vorhersage der Wirksamkeit einer neoadjuvanten Radiochemotherapie des Ösophaguskarzinoms identifiziert [42]. Die Erforschung zellulärer Signal-Mechanismen gewinnt dabei in der Proteomik zunehmend an Bedeutung [43]. Insbesondere die Analyse der sezernierten Proteine, auch Sekretom genannt, ist zum Verständnis interzellulärer Signalwege von wachsendem Interesse [44].

Die wachsende Anzahl der Veröffentlichungen zur Proteomik hat zur Ansammlung sehr großer Datenmengen geführt. Zur effizienten Analyse dieser Daten hat sich parallel zur Proteomik das Feld der Proteom-Bioinformatik entwickelt. In der Bioinformatik werden mathematische Algorithmen zur Analyse biochemischer Daten eingesetzt. So können einzelne Datensätze mit der Gesamtheit aller veröffentlichten Daten abgeglichen werden. Bekannte Funktionen und Zusammenhänge aus dem Datensatz werden computergestützt offengelegt [45].

1.6.2 Proteomik und Fibroblasten-Sekretom

Das Fibroblasten-Sekretom ist die Grundlage für parakrine sekretorische Effekte zwischen Fibroblasten und Tumorzellen. Bisher wurde wenig zum Sekretom von Fibroblasten unter dem Einfluss von therapeutischer Strahlung geforscht. Es gibt Ergebnisse zum Einfluss von Strahlung auf das Fibroblasten-Proteom, dabei wurden aber nur sehr niedrige Dosierungen (40-140 mGy) getestet, um die Auswirkung von Hintergrundstrahlung zu erforschen [46].

1.7 Die Verbindung von Strahlung, ESCC, Fibroblasten und Proteomik

Da Strahlung eine der wichtigsten Therapieoptionen zur Behandlung des ESCC ist, sind die Strahleneffekte im ESCC intensiv untersucht. *In vivo* liegen die ESCCs jedoch in einer Tumormikroumgebung vor, die einen erheblichen Einfluss auf das Verhalten des Tumors hat. ESCCs und Therapieansätze sollten daher in Zusammenschau mit der TME erforscht werden. Da Fibroblasten einen erheblichen Anteil der TME bilden, könnten sie einen modulierenden Einfluss auf die Radiosensitivität von ESCC haben.

In der Beziehung zwischen Fibroblasten und verschiedenen Krebsarten sind zahlreiche pro- und anti-tumorigene Effekte beschrieben [47]. Allerdings wurde

diese Kommunikation bisher kaum in Hinblick auf eine Modulation der Radioresistenz untersucht. Außerdem sind nicht alle Fibroblasten der TME zu CAFs verändert. Es erscheint daher plausibel, dass native Fibroblasten ohne direkten Zellkontakt zum Tumor entscheidende Effekte für den Therapieerfolg durch parakrine Sekretion vermitteln könnten. Der Einfluss des Fibroblasten-Sekretoms auf die Radiosensitivität von ESCC ist daher von großem Interesse. Da Fibroblasten aufgrund ihrer Nähe zum Tumor durch eine Strahlentherapie mitbestrahlt werden, ist auch die Veränderung des Fibroblasten-Sekretoms durch Strahlung interessant. Der Effekt therapeutischer Strahlungsdosen auf das Fibroblasten-Sekretom wurde bisher nicht untersucht.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser experimentellen Arbeit ist es, den Einfluss von Strahlung auf die Sekretion löslicher Faktoren durch Fibroblasten zu untersuchen und den Effekt dieser Faktoren auf die Radiosensitivität von ESCC zu messen. Dazu wurden die sezernierten Proteine von bestrahlten und unbehandelten Fibroblasten analysiert und ihre Wirkung auf die Apoptoserate von bestrahlten ESCC untersucht. Zunächst sollte der Effekt von konditioniertem Medium nativer und bestrahlter Fibroblasten auf die strahleninduzierte Apoptose von Ösophaguskarzinomzellen bestimmt werden. Dann wurde massenspektrometrisch die Proteinexpression im konditionierten Medium nativer und bestrahlter Fibroblasten analysiert. Abschließend wurden die massenspektrometrischen Daten mit bioinformatischen Techniken und einer Literaturrecherche ausgewertet.

2 Materialien und Methoden

2.1 Arbeitsmittel

2.1.1 Hersteller

Tabelle 1 Hersteller

Hersteller	Hauptsitz
DSMZ	Braunschweig, Deutschland
Gbo Cellstar (Greiner Bio-One)	Kremsmünster, Österreich
Gibco (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA, USA
GraphPad Software Inc.	La Jolla, CA, USA
Gulmay	Camberley, SRY, UK
<i>Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics (LHRI) des amerikanischen National Cancer Institute (NCI)</i>	Frederick, MD, USA
Merck-Millipore	Burlington, MA, USA
PromoCell	Heidelberg, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Sartorius Stedim	Göttingen, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

2.1.2 Zelllinien

Tabelle 2 Zelllinien

Zelltyp	Bezeichnung	Hersteller
Normale humane dermale Fibroblasten - NHDF	NHDF 9060901.2 (C-12300)	PromoCell
Ösophageales Plattenepithelkarzinom - ESCC	Kyse 410 (ACC381)	DSMZ

2.1.3 Zellkultur-Materialien

Tabelle 3 Zellkulturmaterialien

Material	Bezeichnung	Hersteller
DMEM 4,5 g/l	<i>Dulbeccos Modified Eagle-Medium, high-glucose</i>	Gibco
FBS 10 %	Fetales bovines Serum	Gibco
PBS pH 7,4	Phosphate-gepufferte Salzlösung	Gibco
Pen/Strep 1 %	Penicillin (10.000 units/ml) Streptomycin (10.000 µg/ml)	Gibco
RPMI 4,5 g/l	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1640 Medium GlutaMAX™	Gibco
TE 0,5 %	Trypsin/EDTA	Gibco

2.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Natrium-Citrat	Sigma Chemical Co.
Propidium-Iodid Guava Cell Cyle Reagent	Merck-Millipore
Sterilfilter MiniSart 0,2 µm	Sartorius Stedim
Triton X-100	Sigma Chemical Co.

2.1.5 Geräte

Tabelle 5 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bestrahlungsgerät	XStrahl RS225	Gulmay
Durchflusszytometer	Guava easyCyte 5HT 0500-5005	Merck-Millipore
Hochleistungs-Flüssigchromatograph	UltiMate3000 RSLCnano	Thermo Fisher Scientific
Massenspektrometer	LTQ Orbitrap Elite	Thermo Fisher Scientific

2.1.6 Software

Tabelle 6 Software

Software	Bezeichnung	Entwickler
Bioinformatikprogramm, web-basiert	<i>Database for annotation, visualization and integrated discovery</i> (DAVID) v6.8, FCT, FAT, FAC	LHRI, <i>National Cancer Institute</i>
Statistikprogramm	GraphPad PRISM v6.0	GraphPad Software Inc.
Steuerungs- und Analyseprogramm des Durchflusszytometers	InCyte v2.2.2	Merck-Millipore

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung

Die ESCC-Zelllinie Kyse 410 (DMSZ, Braunschweig) wurde in *Roswell Park Memorial Institute* 1640-Medium GlutaMAX™ (RPMI, Gibco, Carlsbad, USA) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS, Gibco) und 1 % Penicillin-Streptomycin (PenStrep, Gibco) kultiviert.

Die humane Vorhaut-Fibroblasten-Zelllinie (NHDF, PromoCell, Heidelberg) wurde in *Dulbeccos Modified Eagle*-Medium 4,5 g/l Glukose (DMEM, Gibco), versetzt mit 10 % FBS und 1 % PenStrep, kultiviert. Alle Zelllinien wurden unter den Standardbedingungen von 37° C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die Erhaltungskulturen wurden in regelmäßigen Abständen passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit Phosphate-gepufferter Salzlösung (PBS, Gibco) gewaschen und im Anschluss mit 1 % Trypsin/EDTA-Lösung (TE, Gibco) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an Vollmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das zellfreie, überstehende Medium wurde verworfen, das Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und die Zellen wurden in normalisierter Zellzahl wieder ausgesät.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen trypsinisiert, abzentrifugiert und anschließend resuspendiert. Hiernach wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt. 10 µl dieser Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellen wurden gezählt und in 12.500 Zellen/cm² für Fibroblasten oder 5.000 Zellen/cm² für Kyse 410 neu ausgesät, wobei der Überschuss verworfen wurde.

2.2.3 Versuchsaufbau

Zu Beginn des siebentägigen Versuchsdesigns (Abb. 1) wurden die Fibroblasten in einer Dichte von 12.500 Zellen/cm² auf 12 Lochplatten ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurden sie entweder mit 2 Gy bestrahlt oder scheinbehandelt.

24 h nach Bestrahlung wurden die Fibroblasten mit PBS gewaschen und frisches FBS-freies Medium auf die Zellen aufgegeben. 72 h nach Bestrahlung wurde der konditionierte Überstand steril filtriert (MiniSart 0,2 µm, Sartorius Stedim) und dann frisch auf die Kyse 410 aufgebracht.

Parallel zum Mediumswechsel der Fibroblasten wurde Kyse 410 in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² ausgesät und nach 24 h mit 2 Gy bestrahlt oder scheinbehandelt. 24 h nach Bestrahlung wurde frischer oder kryokonservierter Fibroblastenüberstand auf die Kyse 410 aufgebracht. Der Überstand wurde dabei vorsichtig durch einen Sterilfilter von nicht-adhären Zellen gereinigt, um einer ungewollten Übertragung und direkten Ko-Kultur von Fibroblasten und Kyse 410 vorzubeugen. Der auf den Kyse 410 eingesetzte Überstand bildet das Sekretom der Fibroblasten zum Zeitpunkt 72 h nach Bestrahlung ab. Die stimulierten Kyse 410 wurden weitere 48 h inkubiert und am siebten Versuchstag, 72 h nach ihrer eigenen Bestrahlung, mittels Sub-G1-Assay (2.3.1) untersucht.

Um die Versuchsbedingungen zu standardisieren, wurden sowohl die Fibroblasten als auch die Kyse 410 24 h nach Bestrahlung auf FBS-freies Medium umgestellt. Für den maximalen Strahleneffekt wurden beide Zelllinien nach Bestrahlung für 72 h kultiviert.

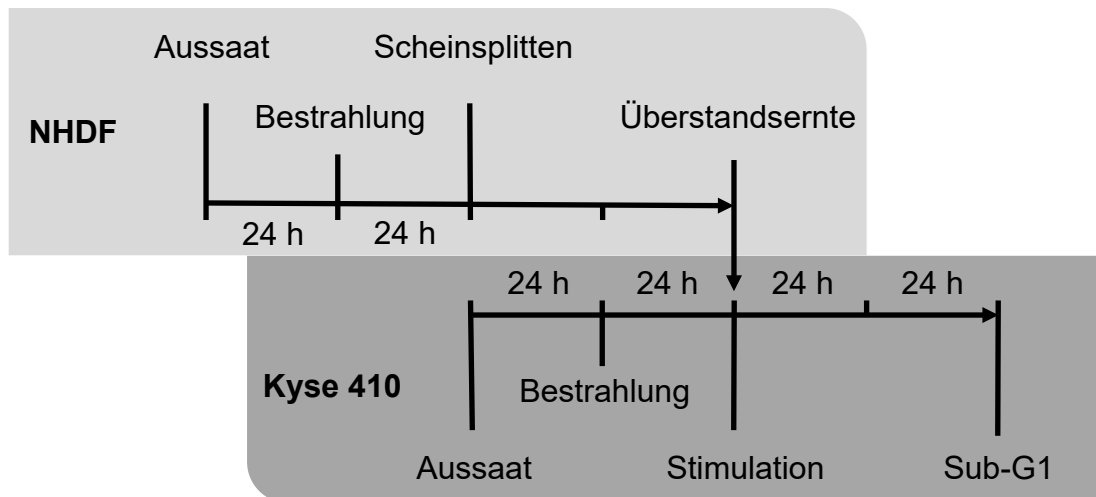


Abb. 1 Versuchsdesign der Sub-G1-Experimente

Flussdiagramm zur Erläuterung der Experimente zum Einfluss des konditionierten Mediums von Fibroblasten auf die Apoptoserate von Kyse 410.

2.2.4 Versuchsaufbau mit kryokonserviertem Fibroblasten-Überstand

Der Versuchsaufbau erfolgte analog zum Vorgehen mit frischem Fibroblasten-Überstand. Anstatt das Medium nach 48 h abzunehmen und durch einen Sterilfilter direkt auf Kyse 410 aufzubringen, wurde hier der Überstand der Fibroblasten ebenfalls nach 48 h von den Fibroblasten abgenommen und steril gefiltert. Der Überstand wurde anschließend ohne Zuhilfenahme von Lösungsmitteln wie DMSO eingefroren und für 7 d bei -20° Celsius gelagert, bevor er zur Kultivierung von Kyse 410 verwendet wurde.

2.3 Durchflusszytometrie mit Sub-G1-Methode

Der Effekt der Strahlung und der konditionierten Medien auf die nukleäre DNA-Dichte der Kyse 410 wurde zytometrisch mittels Sub-G1-Assay nach Nicoletti bestimmt [48].

Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen zunächst geerntet. Dazu wurden das Medium und jegliches PBS, welches zum Waschen der Zellen verwendet wurde, abgenommen und gebündelt zentrifugiert, um die nicht-adhären Zellen zu gewinnen. Die adhären Zellen wurden mit $400\ \mu\text{l}$ TE für 5 min abgelöst und anschließend gebündelt mit den nicht-adhären Zellen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für einen weiteren Waschschrift in PBS resuspendiert, zentrifugiert und das PBS abgesaugt.

Anschließend wurde die DNA-Dichte der Kyse 410 mittels Sub-G1-Assay bestimmt. Hierzu wurde die Zellmembran mit einem hypotonischen Puffer lysiert. Dafür wurden die Proben in 75 µl Lysepuffer (0,1 % Natrium-Citrat, 0,1 % Triton X-100) resuspendiert und für 5 min inkubiert. Danach wurde der fluoreszierende, irreversible DNA-Interkalator Propidium-Iodid (PI, Guava Cell Cycle Reagent, Merck-Millipore) hinzugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Proben zytometrisch vermessen.

Das PI markiert die DNA-Dichte einzelner Zellkerne für die Messung im Durchflusszytometer. Dafür saugt das Gerät die Zellsuspension in die feine Kapillare und leitet diese durch einen Laserstrahl. Mithilfe der Streuung des Lasers kann das Volumen einzelner Zellen und die Struktur des Zellkerns bestimmt werden. Zusätzlich ändern sich die fluoreszierenden Eigenschaften des PI dauerhaft durch die DNA-Interkalation, sodass die spezifischen Fluoreszenzeigenschaften eine Bestimmung der DNA-Dichte erlauben. Für alle Versuche kam das Guava EasyCyte 5HT (Merck-Millipore) zum Einsatz.

Auf diese Weise wurden je Probe 10.000 Zellkerne gemessen und auf einem Histogramm aufgetragen. Zelldebris oder Zelldubletten, zwei Zellkerne, die aufgrund zu geringen Abstandes gemeinsam gemessen wurden, wurden mittels einer Ausschluss-Strategie bereinigt.

Im Histogramm bilden sich Zellkerne mit geringerer DNA-Dichte als in der G1-Phase linksseitig vom G1-Gipfel ab (Abb. 2). Diese Teilfraktion ergibt den prozentualen Anteil der Zellen in Apoptose und wird als Sub-G1-Anteil bezeichnet.

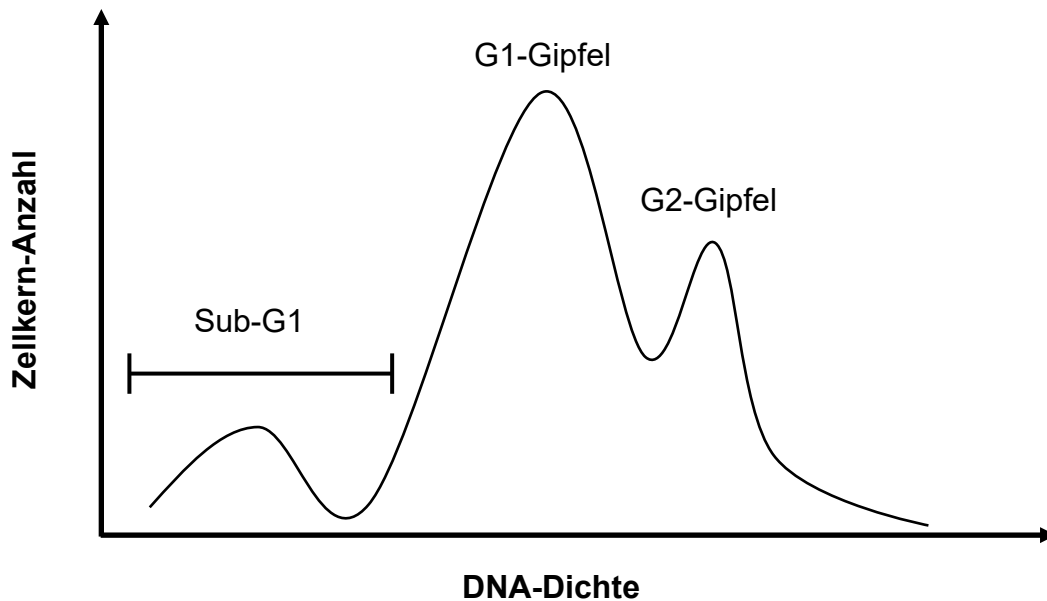


Abb. 2 Beispielhistogramm - Qualitatives Nicoletti-Assay-Histogramm

Schematisches Beispielhistogramm zur Erläuterung der Sub-G1-Methode nach Nicoletti. Die Zellkerne, die eine geringere DNA-Dichte als in der G1-Phase aufweisen, befinden sich auf der x-Achse links des G1-Gipfels. Diese werden als Sub-G1-Anteil gemessen und werden als apoptotischer Anteil angesehen.

2.4 Bestrahlung

Zur Bestrahlung der Zellen wurde mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Reiner Jänicke (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Radioonkologie) das XStrahl RS225 (Gulmay, Camberley) verwendet. Zu bestrahlende Lochplatten wurden in der temperierten Strahlenkammer mittig unter der Strahlenröhre platziert. Alle bestrahlten Zellen wurden mit einer Strahlendosis von 2 Gy behandelt. Dafür wurden sie mit 150 kV und 15 mA für 2 min 47 s bestrahlt.

2.5 Massenspektrometrie

Das Sekretom wurde in einer massenspektrometrischen Analyse der Überstände bestrahlter und unbestrahlter Fibroblasten untersucht. Die Massenspektrometrie wurde durchgeführt von Dr. rer. nat. Daniel Waldera-Lupa am Molecular Proteomics Laboratory (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) unter der Leitung von Prof. Dr. Kai Stühler.

Die Messung erfolgte mit je 5 technischen Replikaten von frischem Medium bestrahlter und unbestrahlter Fibroblasten. Die Fibroblasten wurden analog zu

den Vorversuchen 24 h nach Aussaat bestrahlt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Umstellung auf FBS-freies Medium. Dieses Medium wurde nach einer Inkubation von 48 h geerntet und zur Analyse verwendet.

Es wurde eine markierungsfreie Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) verwendet, um die strahlungsabhängige Veränderung der Proteine im konditionierten Medium von Fibroblasten exakt zu quantifizieren. Der markierungsfreie Ansatz ermöglichte eine Quantifizierung der Bestandteile des Sekretoms ohne die zusätzliche Einbringung von Marker-Substanzen an die Fibroblasten. Dadurch konnte das Versuchsdesign zur Gewinnung des Fibroblastenüberstandes exakt beibehalten werden.

Die markierungsfreie Quantifizierung folgte dem in Sitek *et al.* beschriebenen Protokoll [49]. Das Sekretom wurde mit einer kombinierten Nano-Hochleistungsflüssigchromatographie mit nachgeschalteter Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (nano-HPLC/ESI-MS) analysiert. Dieses bestand aus einem UltiMate3000 RSLCnano Hochleistungsflüssigchromatographen (Thermo Fisher Scientific) und einem LTQ Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific) Massenspektrometer mit einer Nano-Elektrosprüh-Ionenquelle.

2.6 Proteomdaten-Analyse

2.6.1 Ablauf der Datenanalyse

Die in der Massenspektrometrie detektierten Proteine wurden in mehreren Teilschritten analysiert. Dabei wurde zunächst eine Bioinformatik-Analyse mithilfe strukturierter Daten durchgeführt. Anschließend erfolgten eine Datenselektion und eine Datenanalyse mittels manueller Literaturrecherche. Schließlich wurde eine Zusammenfassung der Ergebnisse erstellt. Ein Venn-Diagramm wurde als geeignetes Modell zur Darstellung der Ergebnisse ausgewählt.

2.6.2 DAVID-Bioinformatik-Analyse

Für die Bioinformatik-Analyse wurde das internetbasierte Programm *Database for annotation, visualization and integrated discovery* (DAVID) in Version 6.8

eingesetzt. Das Programm wurde vom *Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics* (LHRI) des US-amerikanischen *National Cancer Institute* entwickelt und zur Verfügung gestellt [50,51].

Es handelt sich um eine Datenbank zur Zusammenführung aller bekannten Gene und Proteine und der mit ihnen assoziierten funktionellen Annotationen aus allen weltweiten, wissenschaftlich anerkannten Datenbanken[52]. Die beiden verwendeten Werkzeuge, das *Gene Functional Classification Tool* (GFCT) und das *Functional Annotation Tool* (FAT) sind komplexe mathematische Algorithmen. Sie greifen für eine flexible Kreuzreferenz-Analyse auf DAVID zu. So können Zusammenhänge und Bezüge innerhalb großer Proteingruppen aufgedeckt werden.

In dieser Arbeit wurden die Proteomdaten nach Hinweisen auf Apoptose-Prozesse sowie eventuelle Bindungspartner untersucht. Die detektierten Proteine wurden dafür mit der Codierung *UniProt Accession* verschlüsselt und hochgeladen.

Das GFCT fasst Proteine auf der Basis ihrer kodierenden Gene von höchstmöglich übereinstimmenden Eigenschaften zusammen. Beispielsweise, indem innerhalb einer Gruppe von 41 Proteinen eine Gruppe von 4 Proteinen identifiziert wird, welche in 18 Eigenschaften übereinstimmt.

Das FAT analysiert dagegen die funktionellen Eigenschaften der gesamten Datenmenge. Zur differenzierten Analyse stehen die drei unterschiedlichen Subkategorien *Cluster*, *Chart* und *Table zur Verfügung*. Die *Chart*-Funktion identifiziert die insgesamt häufigsten Eigenschaften aus der Datenmenge. Zum Beispiel, indem sie die Eigenschaft „Signalpeptid“ als häufigste vorhandene Eigenschaft erkennt. Die *Table*-Funktion ordnet die einzelnen Eigenschaften jeweils dem entsprechenden Protein zu, sodass ein Überblick über das funktionelle Profil einzelner Proteine entsteht. Die *Cluster*-Funktion fasst die funktionellen Eigenschaften in Gruppen zusammen. Aufgrund der detaillierteren Analyse mit der *Chart*-Funktion, ergab sie für diese Arbeit keinen Wissensgewinn und wurde daher nicht verwendet.

Im Folgenden wird ein Beispielablauf in vier Phasen erläutert. Zu Beginn wird die DAVID-Webseite aufgerufen [52]. und über den Reiter *Start Analysis* wird eine Analyse begonnen. Dann werden zunächst die Daten als einzelne Proteine in einer Kodierung in das Eingabefeld im linken Bildschirmbereich der DAVID-

Oberfläche eingefügt. Alternativ kann eine Datenliste hochgeladen werden. Dann wird die verwendete Kodierung (z.B. *UniProt Accession*) im Aufklapp-Menü ausgewählt und die Listenart Gen-Liste bestätigt. Schließlich wird die Datenliste hochgeladen (Abb. 3).

Analysis Wizard
DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH

Home **Start Analysis** Shortcut to DAVID Tools Technical Center Downloads & APIs Term of Service About DAVID About LHRI

Analysis Wizard

Upload **List** Background

Upload Gene List

Demolist 1 Demolist 2
Upload Help

Step 1: Enter Gene List

A: Paste a list

Q10588
Q9Y240
P05452
P10909

Clear

Or

B: Choose From a File

Datei auswählen Keine Datei ausgewählt

Multi-List File ?

Step 2: Select Identifier

UNIPROT_ACCESSION

Step 3: List Type

Gene List
Background

Step 4: Submit List

Submit List

← Step 1. Submit your gene list through left panel.

An example:

Copy/paste IDs to "box A" -> Select Identifier as "Affy_ID" -> List Type as "Gene List" -> Click "Submit" button

1007_s_at
1053_at
117_at
121_at
1255_g_at
1294_at
1316_at
1320_at
1405_i_at
1431_at
1438_at
1487_at
1494_f_at
1598_g_at

Tell us how you like the tool
Contact us for questions

Abb. 3 Bildschirmaufnahme Phase 1 - Hochladen der Daten

In der ersten Phase der bioinformatischen Analyse wird die Datenliste hochgeladen. Dazu wird von der Hauptseite über den Reiter *Start Analysis* (rotes Rechteck) die Analyse gestartet. Entsprechend der vorgegebenen Schritte 1 bis 4 im linken, hellblauen Eingabefeld werden dann die Protein-Codes in das linke Eingabefeld kopiert (*Step 1*). Anschließend wird die verwendete Kodierung (z.B. *Uniprot Accession*) ausgewählt (*Step 2*) und die Daten werden als Gen-Liste definiert (*Step 3*) und hochgeladen (*Step 4*).

Nach der Eingabebestätigung stehen die Daten bereit. Die zutreffende Spezies (z.B. *Homo sapiens*) wird im linken Eingabefeld eingestellt. In der Mitte der Benutzeroberfläche stehen die Auswertungsoptionen zur Verfügung (Abb. 4).

The screenshot shows the DAVID Analysis Wizard interface. At the top, there is a navigation bar with links: Home, Start Analysis, Shortcut to DAVID Tools, Technical Center, Downloads & APIs, Term of Service, About DAVID, and About LHRI. The main header reads "Analysis Wizard" and "DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH".

On the left side, there are three tabs: Upload, List, and Background. The "List" tab is active, showing the "Gene List Manager". A red rectangle highlights the "Select to limit annotations by one or more species" section, which includes a dropdown menu currently set to "Homo sapiens(41)" and a "Select Species" button. Below this is the "List Manager" section, which shows a list with "List_1" and buttons for "Use", "Rename", "Remove", "Combine", and "Show Gene List".

The main content area displays "Step 1. Successfully submitted gene list" with "Current Gene List: List_1" and "Current Background: Homo sapiens". Below this is "Step 2. Analyze above gene list with one of DAVID tools", with a blue arrow pointing to a list of tools. A green circle highlights the "Functional Annotation Tool" option, which includes sub-options: "Functional Annotation Clustering", "Functional Annotation Chart", and "Functional Annotation Table". Other tools listed are "Gene Functional Classification Tool", "Gene ID Conversion Tool", and "Gene Name Batch Viewer".

On the right side, there are links: "Tell us how you like the tool" and "Contact us for questions", and a question "Which DAVID tools to use?".

Abb. 4 Bildschirmaufnahme Phase 2 – Auswahl der Analysewerkzeuge

In der zweiten Phase kann das gewünschte Analysewerkzeug aus den verfügbaren Optionen gewählt werden. Die für die Probe zutreffende Spezies wird im linken Eingabefeld bestätigt (rotes Rechteck). Es ist auch die parallele Bearbeitung mehrerer Datensätze über den *List-Manager* möglich. Im zentralen Bildschirmbereich können dann die Analysewerkzeuge angeklickt werden (grüner Kreis).

Daran anschließend wird die GFCT-Analyse durch Anwählen des *Gene Functional Classification Tool* in Phase 2 durchgeführt, um ähnliche funktionelle Profile zu detektieren. Dabei erfolgt die Darstellung zunächst als Tabelle (Abb. 5). Über das grün-schwarze Symbol oben-rechts kann auf ein *heatmap*-Darstellung gewechselt werden.

Gene Functional Classification Tool
DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH

Home Start Analysis Shortcut to DAVID Tools Technical Center Downloads & APIs Term of Service About DAVID About LHRI

Upload List Background

Gene List Manager

Select to limit annotations by one or more species [Help](#)

- Use All Species -
Homo sapiens(41)

Select Species

List Manager [Help](#)

List_1

Select List to:

Use Rename

Remove Combine

Show Gene List

Gene Functional Classification Result [Help and Tool Manual](#)

Current Gene List: List_1
Current Background: Homo sapiens
41 DAVID IDs

Options Classification Stringency Medium

Rerun using options Create Sublist

1 Cluster(s) [Download File](#)

Gene Group 1	Enrichment Score: 4.69	RG	
1 P98095	fibulin 2(FBLN2)		
2 P13611	versican(VCAN)		
3 Q14766	latent transforming growth factor beta binding protein 1(LTBP1)		
4 Q9UBX5	fibulin 5(FBLN5)		

37 gene(s) from your list are not in the output.

Abb. 5 Bildschirmaufnahme Phase 3 - GFCT-Analyse mit *heatmap*-Option

Die dritte Phase ist die Anwendung des Algorithmus GFCT auf die Daten. Die Ergebnisse werden als Tabelle dargestellt. Durch Anklicken des grün-schwarzen Symbols (rotes Rechteck) kann das Ergebnis als *heatmap*-Diagramm gesichert werden. Sollte ein eingegebenes Protein keinerlei funktionelle Ähnlichkeiten mit den anderen Proteinen aufweisen, ist es auch möglich, dass es nicht in der Auswertung erscheint (grüner Kreis).

Im Anschluss an die GFCT-Analyse kann der Benutzer über den Reiter *Start Analysis* zur Analyse-Startseite (Abb. 4) zurückkehren und die FAT-Analyse selektieren. Die Auswahl des FAT führt zur Annotations-Ergebnis-Seite (Abb. 6). Hier kann aus den drei Optionen *Cluster*, *Chart* oder *Table* ausgewählt werden. Die Ergebnisse des FAT werden dann in einem neuen Fenster geöffnet. In dieser Arbeit wurde das *Functional Annotation Chart* zur Auswertung der häufigsten Eigenschaften und die Funktion *Functional Annotation Table* zur detaillierten Untersuchung einzelner Proteine in der manuellen Recherche verwendet.

The screenshot shows the Functional Annotation Tool (FAT) interface. On the left, the 'Gene List Manager' allows selecting species (currently Homo sapiens, 41 IDs) and lists 'List_1'. The 'Annotation Summary Results' section shows 41 DAVID IDs and various annotation categories: Disease (1 selected), Functional_Categories (3 selected), Gene_Ontology (3 selected), General_Annotations (0 selected), Literature (0 selected), Main_Accessions (0 selected), Pathways (3 selected), Protein_Domains (3 selected), Protein_Interactions (0 selected), and Tissue_Expression (0 selected). A green circle highlights the 'Functional Annotation Chart' button in the 'Combined view for Selected Annotation' section. On the right, the 'Functional Annotation Chart' section displays a table of 184 chart records with columns for Sublist, Category, Term, and RT. A red rectangle highlights this section.

Abb. 6 Bildschirmaufnahme Phase 4 - FAT-Analyse in *Chart*-Darstellung

Der vierte Schritt ist die FAT-Auswertung. Hier stehen die Optionen *Clustering*, *Chart* oder *Table* zur Auswahl (grüner Kreis). Die Ergebnisse werden automatisch in einem neuen *Browser*-Fenster angezeigt (rotes Rechteck).

2.6.3 Manuelle Datenanalyse

Die manuelle Untersuchung der Proteine erfolgte mit webbasierten Quellen, der Datenbank *Genecards* [53] und unter Zuhilfenahme der Suchfunktion der DAVID-Anwendung, *Functional Annotation Table*, die eine Übersicht aller bekannten funktionellen Eigenschaften eines einzelnen Proteins bietet [50].

2.7 Statistik

Die Statistik erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad PRISM Version 6.0 (GraphPad Software Inc.). Zur Anwendung kam die Varianzanalyse (ANOVA) mit nachgeschaltetem Tukey-Test, als Post-hoc-Test. In den Sub-G1-Versuchen erfolgte die Berechnung des Vielfachen gegen den Mittelwert der Kontrolle. In der quantitativen Massenspektrometrie wurde das Vielfache (*fold change*) aus den Mittelwerten des Stichprobenumfangs berechnet. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Statistische Signifikanz wurde grundsätzlich ab einem p-Wert $< 0,05$ angenommen und ein p-Wert $p < 0,01$ wurde als stark signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Radiosensitivität von Kyse 410 in Fibroblasten-Medium

Das Ziel des Versuchs war, den Einfluss löslicher Faktoren im Fibroblasten-Medium auf die Strahlenantwort von Kyse 410 zu untersuchen. Dafür wurde Kyse 410 bestrahlt und danach in konditioniertem Medium von Fibroblasten kultiviert. Das konditionierte Medium wurde aus dem Überstand von Fibroblasten generiert, die 72 h zuvor bestrahlt oder scheinbehandelt wurden. Anschließend wurde die Apoptoserate von Kyse 410 mit der Sub-G1-Methode gemessen.

Die Apoptose von Kyse 410 wurde unter vier Bedingungen gemessen. Verglichen wurde eine unbestrahlte Negativkontrolle von Kyse 410 (K-), eine bestrahlte Positivkontrolle von Kyse 410 (K+), bestrahlte Kyse 410 im konditionierten Medium unbestrahlter Fibroblasten (K+ SN-) und bestrahlte Kyse 410 im konditionierten Medium bestrahlter Fibroblasten (K+ SN+).

Alle bestrahlten Kyse 410 zeigten eine gesteigerte Apoptose gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Es zeigte sich, dass die Kultivierung bestrahlter Kyse 410 im Medium bestrahlter Fibroblasten zu keinem zusätzlichen Anstieg der Apoptose führte.

Dagegen zeigten bestrahlte Kyse 410, welche im Überstand unbestrahlter Fibroblasten kultiviert wurden, eine zusätzliche Steigerung der Apoptose gegenüber der bestrahlten Kontrolle. Darüber hinaus zeigte diese Gruppe auch gegenüber bestrahlten Kyse 410 im Medium bestrahlter Fibroblasten signifikant mehr Apoptose (Abb. 7).

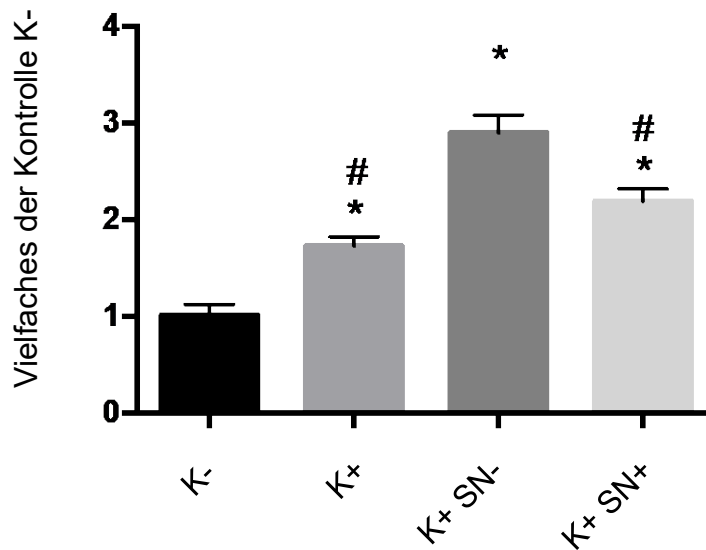


Abb. 7 Steigerung der strahleninduzierten Apoptose von Kyse 410 durch Kultivierung in frischem Medium unbestrahlter Fibroblasten

Ergebnisse des Sub-G1-Assay nach Nicoletti von unbestrahlten (K-) oder bestrahlten Kyse 410 (K+), welche mit Überstand von bestrahlten (SN+) oder unbestrahlten Fibroblasten (SN-) behandelt wurden. Kyse 410 wurden 72 h vor der Messung bestrahlt [2 Gy] und ab 24 h nach Bestrahlung in Fibroblasten-Medium inkubiert. Das Medium wurde vor dem Transfer steril filtriert (Porengröße: 2 µm). Eine Negativkontrolle mit unbestrahlten Kyse 410 (K-) und eine Positivkontrolle mit bestrahlten Kyse 410 (K+) wurden ebenfalls gemessen. Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$ verglichen mit Kontrolle; #, $p < 0,05$ verglichen mit K+ SN-; ANOVA mit nachgeschaltetem Tukey-Test (n=8).

3.2 Radiosensitivität von Kyse 410 in kryokonserviertem Medium

Anschließend wurde der Versuch mit Fibroblasten-Medium wiederholt, welches nach der Gewinnung für 7 d kryokonserviert wurde. So konnten kryosensitive Einflussfaktoren, wie z.B. ROS, untersucht werden. Ausgehend von der unbestrahlten Negativkontrolle zeigten alle bestrahlten Kyse 410 einen signifikanten Anstieg der Apoptose. Wurden die Kyse 410 im kryokonservierten Medium unbehandelter Fibroblasten kultiviert, bewirkte dies einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Fraktion, sowohl gegenüber der bestrahlten Kontrolle als auch den Zellen, die im Medium bestrahlter Fibroblasten kultiviert wurden. Die Kultivierung im kryokonservierten Medium bestrahlter Fibroblasten zeigte keinen gesteigerten Effekt gegenüber der Kontrolle (Abb. 8). Der Effekt von kryokonservierten konditionierten Medien entspricht somit den Ergebnissen der frischen konditionierten Medien.

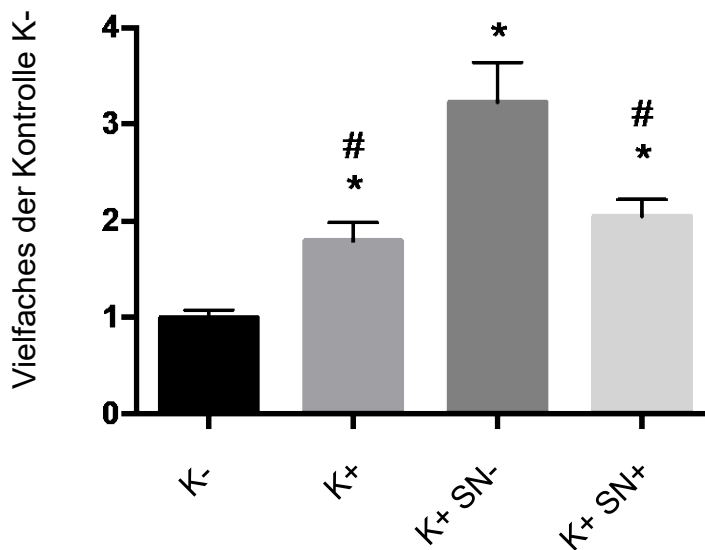


Abb. 8 Steigerung der strahleninduzierten Apoptose von Kyse 410 durch Kultivierung in kryokonserviertem Medium unbestrahlter Fibroblasten

Sub-G1-Assay nach Nicoletti von unbestrahlten (K-) und bestrahlten Kyse 410 (K+), die mit kryokonserviertem Überstand von bestrahlten (SN+) oder unbestrahlten Fibroblasten (SN-) behandelt wurden. Kyse 410 wurde 72 h vor der Messung bestrahlt [2 Gy], und ab 24 h nach Bestrahlung in Fibroblasten-Medium inkubiert, welches zuvor 7 d bei -20 °C gelagert wurde. Das Medium wurde vor dem Transfer steril filtriert (Porengröße: 2 µm). Eine unbestrahlte Negativkontrolle (K-) und eine Positivkontrolle (K+) wurden ebenfalls gemessen. Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$ verglichen mit Kontrolle; #, $p < 0,05$ verglichen mit K+ SN-; ANOVA mit nachgeschaltetem Tukey-Test (n=7).

3.3 Einfluss von Strahlung auf das Sekretom von Fibroblasten

Das konditionierte Medium von Fibroblasten zeigte abhängig von der Vorbehandlung der Fibroblasten unterschiedlichen Einfluss auf die Radiosensitivität von Kyse 410. Während das Medium von bestrahlten Fibroblasten keinen Einfluss auf die Radiosensitivität zeigte, konnte durch das Medium unbestrahlter Fibroblasten eine Zunahme der Apoptose nachgewiesen werden. Daher wurde das konditionierte Medium von bestrahlten und unbestrahlten Fibroblasten eingehend auf lösliche Faktoren untersucht, um mögliche radiosensitivierende Faktoren zu identifizieren.

Um die strahlungsabhängigen Veränderungen des Sekretoms von Fibroblasten exakt zu quantifizieren, wurde eine markierungsfreie Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung verwendet. Die markierungsfreie Methode

erlaubte eine quantitative Analyse des Sekretoms ohne Vorbehandlung der Fibroblasten mit Marker-Substanzen. Aufgrund dieser Flexibilität konnte das Versuchsdesign zur Gewinnung des Fibroblasten-Überstandes exakt beibehalten werden.

Die Massenspektrometrie des Fibroblasten-Mediums detektierte insgesamt 688 Proteine. Von diesen lagen 247 Proteine unter beiden Bedingungen vor, sodass eine Quantifizierung möglich war. Die quantifizierbaren Proteine wurden in drei Gruppen unterteilt, wobei alle Messwerte mit einem p-Wert $p > 0,05$ exkludiert wurden. P-Werte $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen und p-Werte $p < 0,01$ wurden als stark signifikant gewertet.

Insgesamt zeigten 41 Proteine einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen bestrahlter und unbestrahlter Bedingung. Von diesen zeigten 36 Proteine verminderte Expression durch Bestrahlung. Die übrigen fünf Proteine lagen unter Bestrahlung erhöht vor. Alle bestrahlungsabhängigen Proteine werden im Folgenden als „bestrahlungsabhängig-sezernierte Proteine“ (BASPs) bezeichnet.

Aus den BASPs wiesen 13 Proteine einen p-Wert $p < 0,01$ auf. In dieser Untergruppe waren zwölf Proteine durch Bestrahlung vermindert und ein Protein vermehrt. Diese Untergruppe wird nachfolgend als „stark bestrahlungsabhängig sezernierte Proteine“ (SBASPs) bezeichnet (Abb. 9).

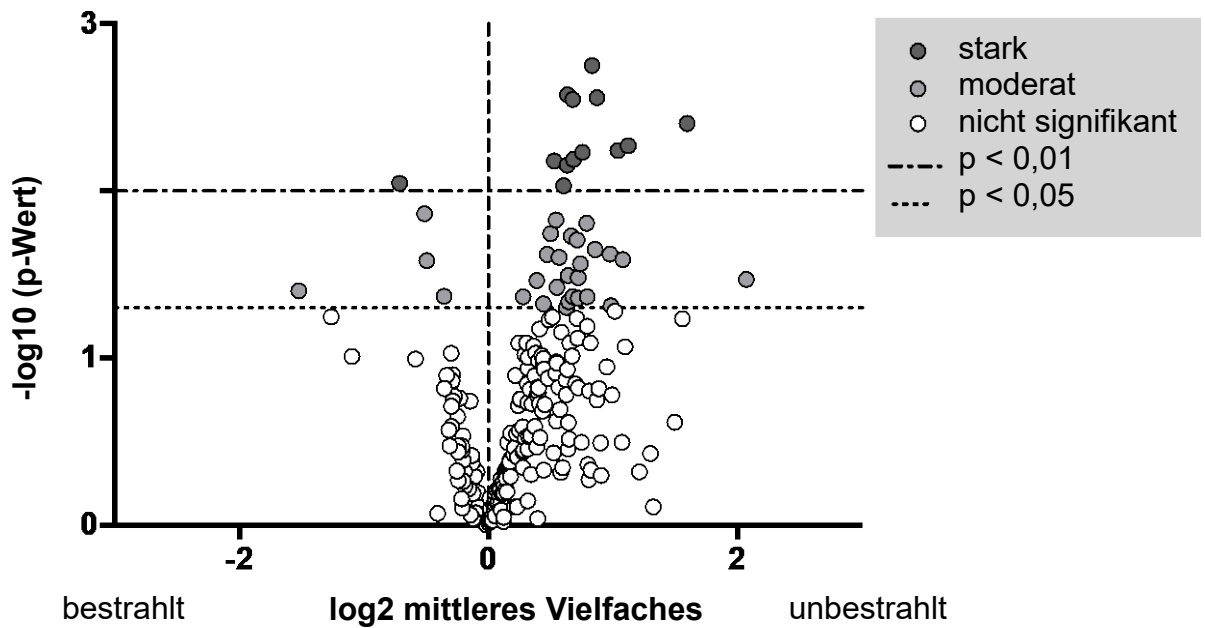


Abb. 9 Bestrahlung moduliert das Sekretom von Fibroblasten

Markierungsfreie Massenspektrometrische Quantifizierung des Sekretoms von Fibroblasten in Abhängigkeit von Bestrahlung. Darstellung der quantifizierbaren Proteine in einem Vulkan-Diagramm (volcano plot). Die Darstellung zeigt detektierte Proteine als Punkte. Signifikanzen: signifikant = $p < 0,05$ und sehr signifikant = $p < 0,01$; ANOVA (n=5 technische Replikate).

Alle 41 signifikant unterschiedlich regulierten Proteine sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die Proteine sind alphabetisch nach dem Namen des kodierenden Gens geordnet. Zusätzlich sind die Beschreibung des Proteins, der p-Wert, das mittlere Vielfache (*mean fold change*) der massenspektrometrischen Quantifizierung und die Regulation nach Bestrahlung aufgeführt (Tabelle 7).

Tabelle 7 Bestrahlungsabhängig sezernierte Proteine

Genname	Protein Beschreibung	p-Wert	Mittleres Vielfaches	Regulation nach Bestrahlung
BST1	ADP-Ribosyl Zyklase 2	4,31E-02	1,21	∨
CLEC11A	C-Lektin Superfamilie 11 Protein A	2,66E-03	1,55	∨
CLEC3B	Tetranectin	2,57E-02	2,11	∨
CLU	Clusterin	4,98E-02	1,54	∨
COL4A2	Alpha-2-Typ-IV-Kollagen	3,95E-02	2,87	^

Gename	Protein Beschreibung	p-Wert	Mittleres Vielfaches	Regulation nach Bestrahlung
COL6A2	Alpha-2-Typ-VI-Kollagen	4,74E-02	1,36	∨
CSPG4	Chondroitinsulfat Proteoglykan 4	1,80E-02	1,41	∨
CTSB	Cathepsin-B	4,26E-02	1,28	^
FBLN2	Fibulin-2	1,86E-02	1,58	∨
FBLN5	Fibulin-5	4,31E-02	1,73	∨
FLNA	Filamin-A	1,49E-02	1,46	∨
FLNC	Filamin-C	2,77E-03	1,83	∨
GELS	Gelsolin	2,84E-03	1,60	∨
HK1	Hexokinase-1	4,39E-02	1,65	∨
LAMP1	Lysosome-assoziiertes Membranprotein 1	4,29E-02	1,60	∨
LDHB	L-Laktatdehydrogenase B	5,87E-03	1,69	∨
LTBP1	Latentes-TGF-beta- bindendes Protein 1	5,35E-03	2,18	∨
MMDH2	Mitochondriale Malatdehydrogenase	3,22E-02	1,56	∨
MMP1	Matrix-Metalloprotease 1	9,32E-03	1,52	∨
OLFML3	Olfactomedin-ähnliches Protein 3	2,24E-02	1,81	∨
PAM	Peptidylglycine alpha-amidierende Monooxygenase	6,63E-03	1,44	∨
PAPPA	Pappalysin-1	8,98E-03	1,64	^

Gename	Protein Beschreibung	p-Wert	Mittleres Vielfaches	Regulation nach Bestrahlung
	Prokollagen			
PCOLCE	C-Endopeptidase	2,40E-02	1,38	∨
	Verstärkerprotein 1			
PCSK9	Proprotein Konvertase Subtilisin/ Kexin Typ 9	3,94E-03	3,02	∨
PFN1	Profilin-1	7,03E-03	1,55	∨
POSTN	Periostin	5,72E-03	2,06	∨
PRDX1	Peroxiredoxin-1	2,72E-02	1,67	∨
PRKCSH	Glucosidase-2-alpha	4,86E-02	1,98	∨
PSMA6	Proteasome Untereinheit-alpha Typ-6	2,49E-02	1,48	∨
RARRES2	Chemerin	2,38E-02	1,97	∨
SDCBP	Syndecan bindendes Protein 1	3,43E-02	1,31	∨
SERPINB6	Serpin B6	1,56E-02	1,73	∨
SERPINH1	Serpin H1	6,48E-03	1,60	∨
SPARC	Osteonectin	2,60E-02	1,41	^
STC2	Stanniocalcin-2	1,37E-02	1,43	^
TKT	Transketolase	3,77E-02	1,46	∨
TNC	Tenascin	1,78E-03	1,78	∨
VCAN	Versican	4,60E-02	1,56	∨
VCL	Vinculin	1,97E-02	1,64	∨

Genname	Protein Beschreibung	p-Wert	Mittleres Vielfaches	Regulation nach Bestrahlung
VCP	Transitionale endoplasmatische Retikulums ATPase	3,30E-02	1,65	∨
YWHAZ	14-3-3 Protein zeta	3,38E-02	4,19	∨

3.4 Funktions- und Klassifikationsanalyse der Proteomik-Daten

Im Anschluss wurden die biologischen Prozesse untersucht, welche möglicherweise die Radiosensitivität von Kyse 410 durch die BASPs modulieren. Zu diesem Zweck wurden die Sekretom-Daten in einer detaillierten Funktions- und Netzwerkanalyse mithilfe des webbasierten Bioinformatik-Werkzeugs DAVID untersucht. Die Sekretom-Daten wurden mit großen Datenbanken verglichen, welche alle wissenschaftlich anerkannten Proteinfunktionen und bekannten Kreuzreferenzen enthalten. So ermöglicht DAVID eine Einteilung von Proteomdaten in überschaubare Gruppierungen zur effizienten Interpretation im Kontext eines Netzwerks. Auf diese Art konnte der Datensatz auf funktionell verwandte Gene und Stichwörter untersucht werden. Dieser Untersuchungsschritt wird in der Bioinformatik als *Knowledge discovery in database* bezeichnet.

Die Analyse mit DAVID ergab funktionelle Tendenzen und Gruppierungen im Fibroblasten-Sekretom. Anschließend wurden mittels selektiver Literaturrecherche spezifische Proteine auf potentielle Rollen in der Modulation der Radiosensitivität untersucht.

3.4.1 Proteom-Analyse mit dem DAVID FAT

In der Analyse mit DAVID wurden zwei spezifische Anwendungen eingesetzt: Es handelt sich dabei um zwei verschiedene Algorithmen FAT und GFCT, die auf Basis einer zentralisierten Gen-Protein-Datenbank Kreuzreferenzen detektieren (vgl. 2.6.2).

Mit dem FAT konnten die insgesamt häufigsten Eigenschaften der BASPs ermittelt werden. So konnten innerhalb der Gruppe funktionelle Schwerpunkte

erkannt werden, die auf einen möglichen funktionellen Trend des gesamten analysierten Sekretoms hinweisen.

Die Analyse ergab nach Eingabe von 41 BASPs die häufigsten bekannten Eigenschaften. In absteigender Reihenfolge waren dies die sechs Eigenschaften „Signalpeptid“, „Extrazelluläres Exosom“, „Proteinbindend“, „Disulfid-Bindung“, „Sezerniert“ und „Extrazellularraum“. Dabei wurden nur nicht-triviale Eigenschaften berücksichtigt, die bei über 50 % also mindestens 21 von 41 Proteinen vorhanden waren. Triviale Eigenschaften, wie „Phosphoprotein“ und „Polymorphismus“ wurden nicht aufgenommen (Abb. 10).

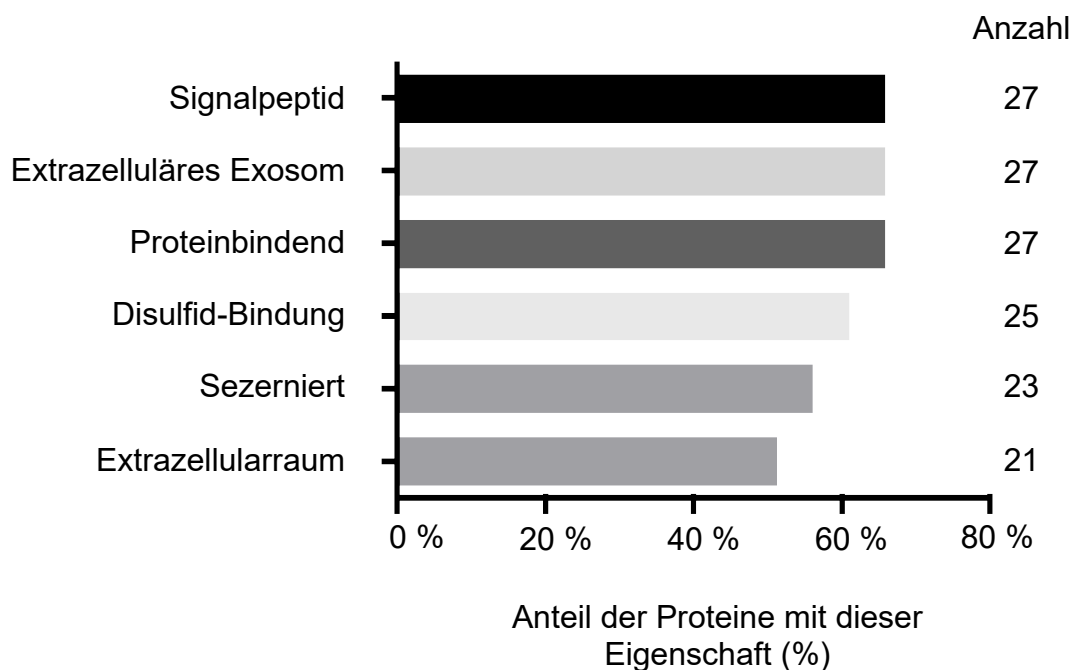


Abb. 10 Die häufigsten funktionellen Eigenschaften der strahlungsabhängig sezernierten Proteine

Auswertung der Sekretom-Daten im *Functional Annotation Tool*. Die häufigsten bekannten Eigenschaften sind in absteigender Häufigkeit gezeigt. Berücksichtigt wurden nur nicht-triviale Eigenschaften, die bei mindestens 50 % der detektierten Proteine registriert wurden. Attribute wie „Phosphoprotein“ oder „Polymorphismus“ wurden als trivial betrachtet.

3.4.2 Proteom-Analyse mit dem DAVID GFCT

Das GFCT ist ein Algorithmus zur Erkennung von Ähnlichkeitsstrukturen in Proteomdaten. Die Analyseanwendung wurde verwendet, um Proteine mit ähnlichem Eigenschaften-Profil aus dem Datensatz der 41 strahlungsabhängigen Proteine zu identifizieren. Die gefundenen Gruppen von ähnlichen Proteinen werden als *Cluster* oder funktionelle Klassen bezeichnet.

Die Analyse des GFCT ergab eine funktionelle Klasse aus den vier Proteinen: Versican (VCAN), Latentes-TGF-beta-bindendes Protein 1 (LTBP1), Fibulin-2 (FBLN2) und Fibulin-5 (FBLN5). Für diese vier Proteine wurden 42 gemeinsame Eigenschaften in der Rohanalyse ermittelt. Die gemeinsamen Eigenschaften reduzierten sich aufgrund von Redundanzen auf die 27 gezeigten Eigenschaften (Abb. 11).

Ein Charakteristikum der Gruppe waren verschiedene epidermaler-Wachstumsfaktor-ähnliche Domänen (EGF-ähnliche Domäne), die als Merkmal von Proteinen der extrazellulären Matrix bekannt sind und eine Beteiligung an apoptotischen Prozessen implizieren, wie in der Diskussion im Detail ausgeführt wird. Daneben waren bei diesen vier Proteinen die drei Eigenschaften: „Sezerniert“, „Extrazellulär“ und „Signal“ gemeinsam vorhanden.

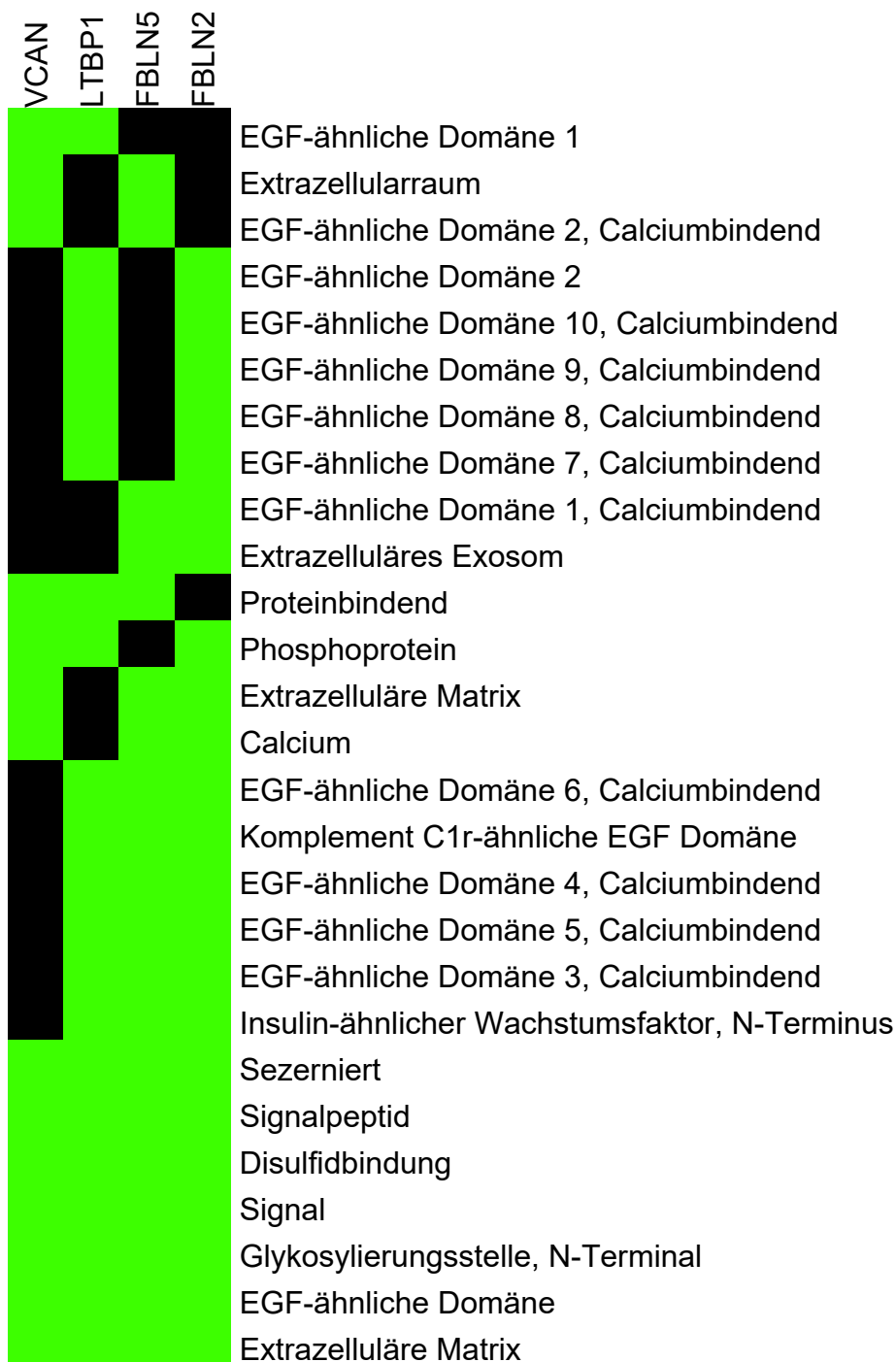


Abb. 11 Die Proteine VCAN, LTBP1, FBLN2 und FBLN5 bilden eine Gruppe mit ähnlichem Eigenschaften-Profil.

Cluster-Analyse durch das *Gene Functional Classification Tool*. Die vier Proteine wurden als eine funktionelle Klasse mit hoher Übereinstimmung von funktionellen Eigenschaften erkannt. Darstellung als *heatmap*-Diagramm. Klassifikations-Stringenz: medium. Erläuterung: grün = Funktion bekannt; schwarz = Funktion unbekannt.

3.4.3 Eingrenzung der Suchparameter

Mithilfe der Bioinformatik-Analyse von DAVID wurde in der Gruppe der BASPs ein allgemeiner Trend zur Sekretion, extrazellulärer Matrix und Signal-Funktion identifiziert. Außerdem wurde eine funktionelle Klasse von vier Proteinen mit ähnlichem Funktions-Profil erkannt. Vielversprechende Proteine für einen radiosensitivierenden Effekt wurden aber zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert.

Zur Annäherung an einen möglichen Kandidaten musste die Suche intensiviert werden. Um die Chancen auf ein Ergebnis zu erhöhen, wurde die Suche auf die 13 Proteine mit starkem Signifikanzniveau ($p < 0,01$) beschränkt, hier als SBASPs bezeichnet (Abb. 12). Diese Gruppe wurde manuell auf potentielle Rollen in der Radiosensitivierung untersucht.

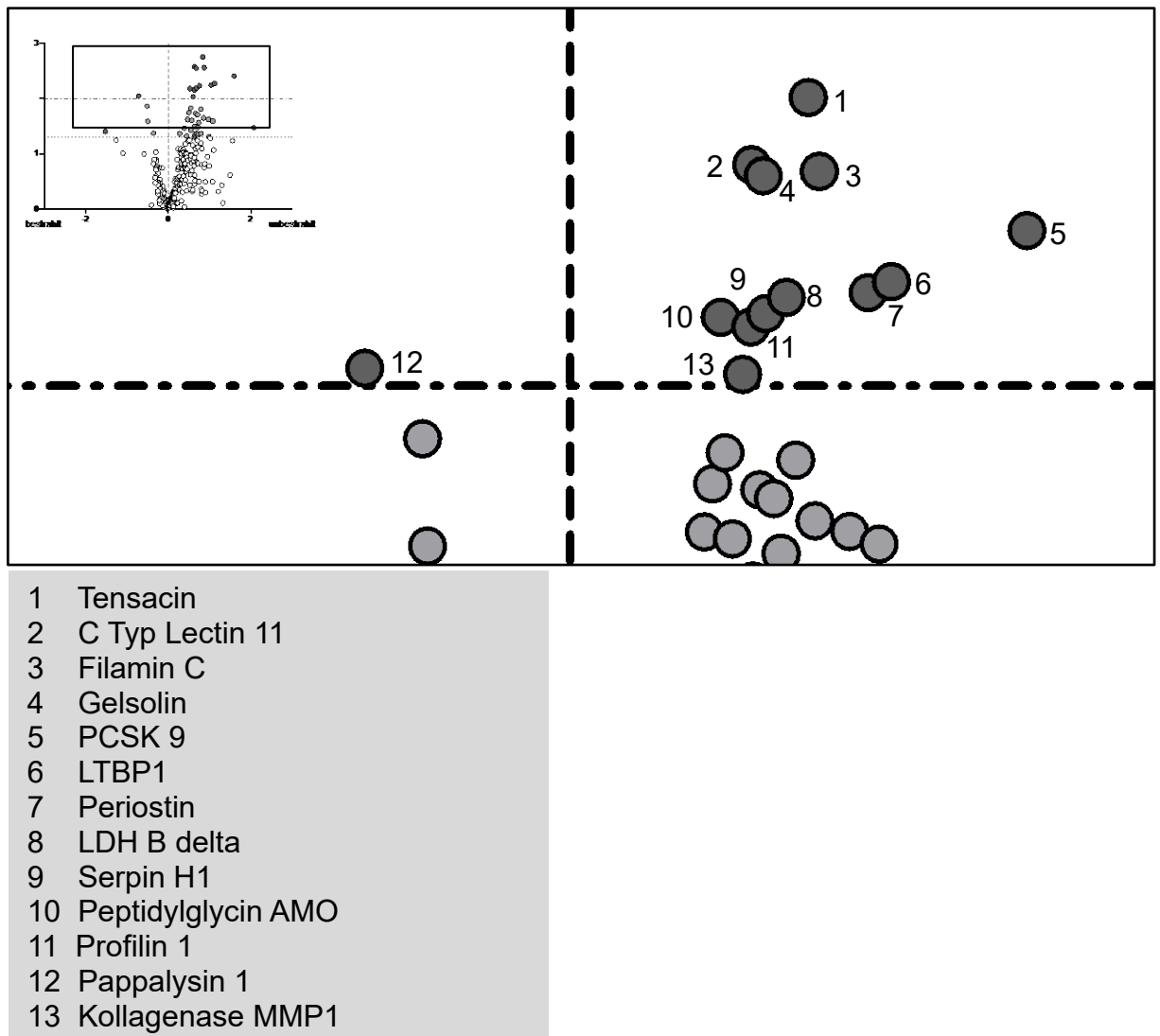


Abb. 12 Eingrenzung der Recherche auf Proteine mit zweifachem Signifikanzniveau

Vergrößerter Ausschnitt aus dem Vulkan-Diagramm (vgl. Abb. 9) mit Fokus auf die „stark bestrahlungsabhängig sezernierten Proteine“ (SBASPs).

3.4.4 Manuelle Überprüfung der SBASP-Proteingruppe

Es wurde eine selektive Literaturrecherche durchgeführt, mit dem Ziel, spezifische Eigenschaften in der Gruppe der SBASPs zu untersuchen. Dabei wurde die Gruppe gezielt auf bekannte Eigenschaften untersucht, die für einen radiosensitivierenden Effekt relevant sein könnten. Es wurde dazu ohne Ausnahme auf wissenschaftlich anerkannte text- und webbasierte Quellen, wie die Datenbank *Genecards*, zurückgegriffen (vgl. 2.6.3).

Es wurden sieben funktionelle Eigenschaften für die Recherche ausgewählt, die für eine interzelluläre Radiosensitivierung wichtig sein könnten. Die Eigenschaften waren „Signal“, „Sezerniert“, „Extrazellulär“, wobei hier zwischen

„frei gelöst“ und „membranständig“ unterschieden wurde, „Extrazelluläres Exosom“, „Extrazelluläre Matrix“ und „Apoptotisch“.

Zehn Proteine hatten eine erwiesene Signalfunktion und neun Proteine zeigten eine bekannte Sekretion. Bei der extrazellulären Funktion waren acht Proteine membranständig und sechs frei gelöst. Fünf Proteine wurden mit exosomaler Ausschleusung in Verbindung gebracht. Bestandteil der extrazellulären Matrix waren die drei Proteine: Tenascin, interstitielle Kollagenase und Periostin. Die drei Proteine GELS, PCSK9 und LTBP1 hatten apoptotische Effekte (Abb. 13).

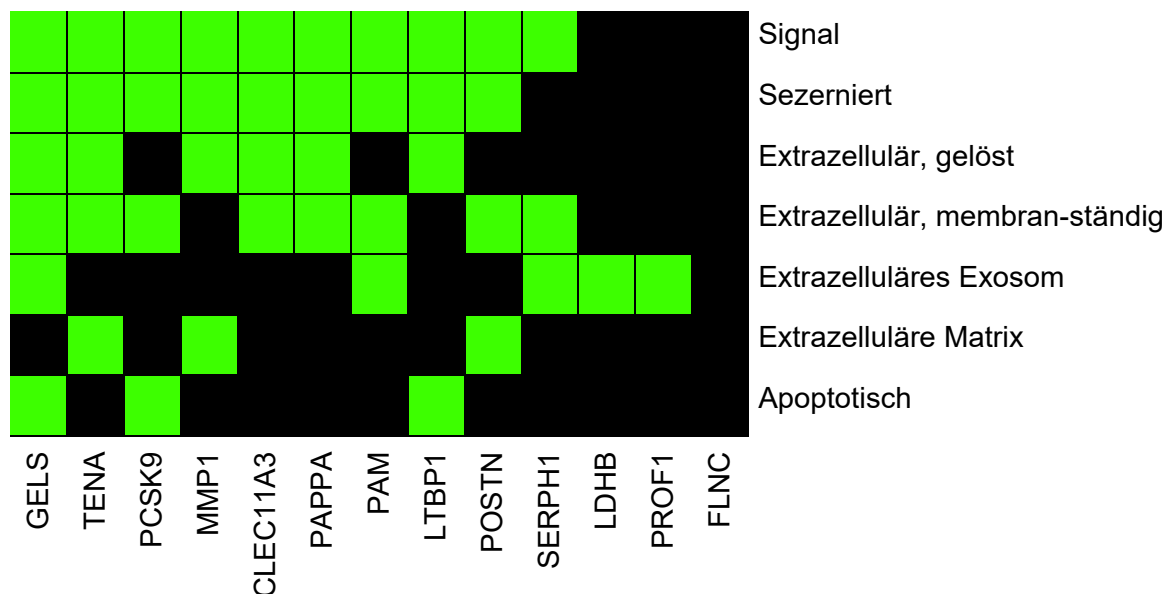


Abb. 13 Manuelle Analyse der SBASPs

Manuelle Analyse der 13 am stärksten durch Bestrahlung beeinflussten Proteine als *heatmap*-Diagramm. Erläuterung: grün = Funktion bekannt; schwarz = Funktion unbekannt; verwendete Abkürzungen: GELS, Gelsolin; TENA, Tensacin; PCSK9, Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9; MMP1, Matrix-Metalloprotease 1; CLEC11A3, C Typ Lektin 11; PAPP, Pappalysin 1; PAM, Peptidylglycine alpha-amidierende Monooxygenase; LTBP1, Latentes TGF-beta bindendes Protein 1; POSTN, Periostin; SERPH1, Serpin H1; LDHB, Laktatdehydrogenase B; PROF1, Profilin 1; FLNC, Filamin C.

3.4.5 Zusammenfassung der Sekretom-Analyse

Die Datenanalyse des DAVID Tool sowie die anschließende Literaturrecherche ergaben ein klar strukturiertes Bild (Abb. 14). Die Proteine wurden in mehreren Teilschritten auf die SBASPs eingegrenzt und nach den drei wichtigsten Eigenschaften „Sezerniert“, „Signalfunktion“ und „Apoptose“ gruppiert. Die Ergebnisse wurden in einem Venn-Diagramm zusammengefasst. Die Wegfindung zu den wahrscheinlichsten Kandidaten ist in einer konkludierenden Übersichtsgrafik dargestellt.

Es zeigte sich, dass diese drei Eigenschaften innerhalb der SBASPs von drei Proteinen erfüllt werden. Die drei Proteine Latentes TGF-beta bindendes Protein 1 (LTBP1), Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9) und Gelsolin sind daher die wahrscheinlichsten Kandidaten für die Steigerung der Radiosensitivität.

Insbesondere LTBP1 steht aufgrund seiner Funktion für den TGF-beta-Signalweg in enger Verbindung zu bestrahlungsassoziierter Apoptose.

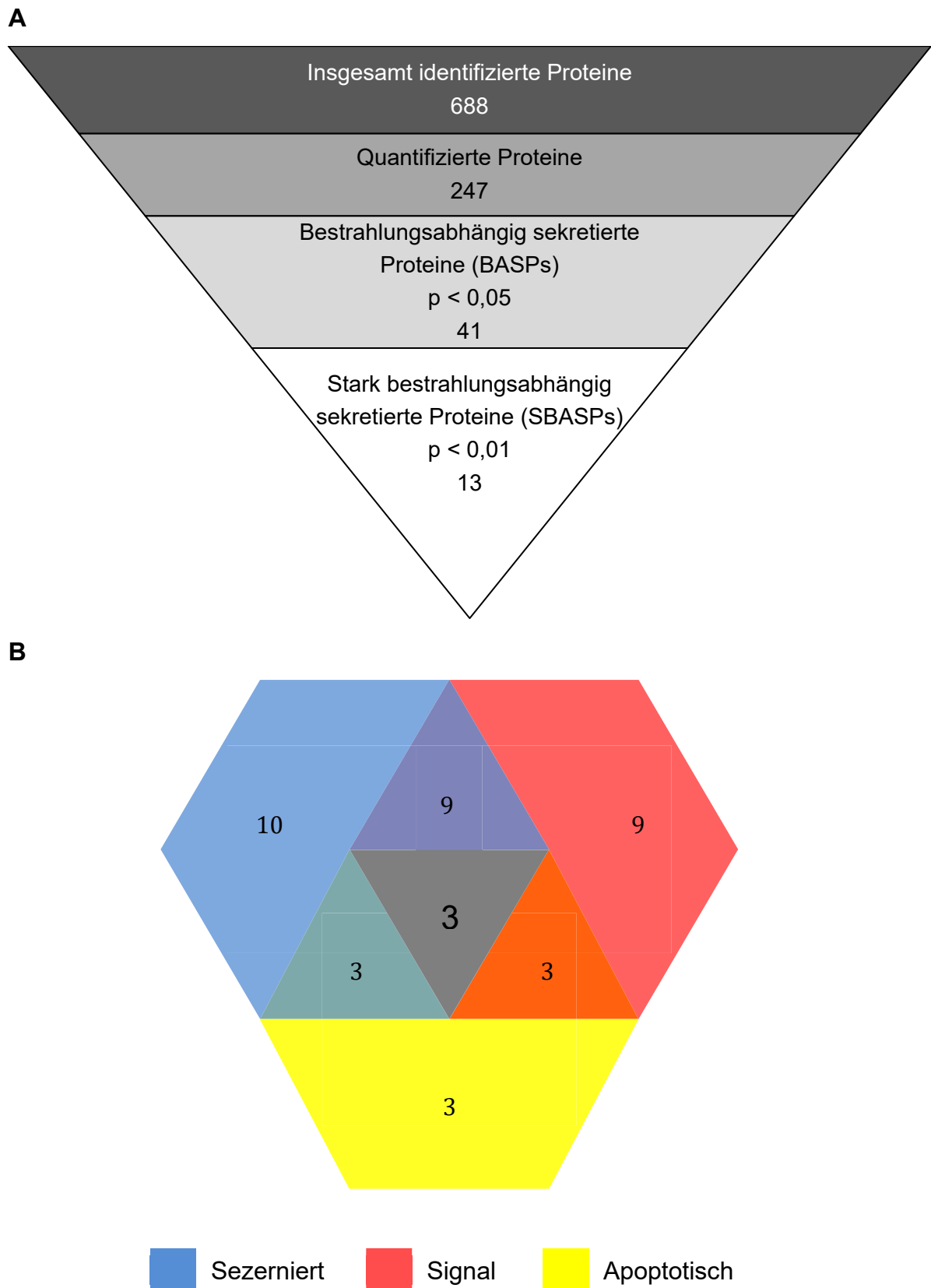


Abb. 14 Zusammenfassung der Proteom-Analyse

(A) Zusammenfassung der quantitativen Sekretom-Analyse in einem Trichter-Diagramm. (B) Ergebnis der manuellen Untersuchung der SBASPs in einem Venn-Diagramm. Gezeigt sind die

Anzahl der Proteine und die Überschneidungen der drei Eigenschaften: „Sezerniert“, „Signalfunktion“ und „Apoptotisch“. Diese wurden manuell in selektiver Literaturrecherche untersucht. Drei Proteine wurden als Schnittmenge aller drei Eigenschaften identifiziert. Diese drei Proteine waren Gelsolin, PCSK9 und LTBP1.

4 Diskussion

4.1 Radiosensitivität von Kyse 410 in Fibroblasten-Medium

Die Experimente in Kapitel 3.1 untersuchten den Einfluss des konditionierten Mediums von Fibroblasten auf die Apoptoserate von bestrahlten Kyse 410.

Die entscheidende Beobachtung besteht darin, dass die Verwendung des Mediums unbestrahlter Fibroblasten zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose führte (Abb. 7). Da die Apoptose in Kyse 410 grundsätzlich strahleninduziert war, erscheint es plausibel, dass die gesteigerte Apoptose durch eine Radiosensitivierung von Kyse 410 verursacht wird. In der Literatur gibt es zahlreiche Versuche zur Modulation der Radiosensitivität von ESCCs mit einzelnen Faktoren. So konnten bereits spezifische miRNA und das Protein TRIB3 als Modulatoren der Radiosensitivität in ESCC identifiziert werden [54,55]. Allerdings wurde bisher keine Untersuchung unternommen, die sich auf den Einfluss löslicher Faktoren aus humanen Fibroblasten konzentriert. Da konditioniertes Medium durch die sezernierten Proteine der darin kultivierten Zellen charakterisiert wird, könnte der beobachtete Effekt durch das Sekretom der Fibroblasten vermittelt sein [56].

Fibroblasten sind *in vivo* ein maßgeblicher Bestandteil der TME, daher könnten sie durch extrazelluläre Signale einen erheblichen Einfluss auf die Radiosensitivität des Tumors haben [47]. Auch primär intrazelluläre Proteine könnten beispielsweise durch Zell-Lyse neben sezernierten Proteinen im konditionierten Medium vorliegen und den Effekt auf Kyse 410 beeinflussen. Dies macht eine genauere Analyse der Proteine des konditionierten Mediums nötig. Interessanterweise zeigte das konditionierte Medium nach vorhergehender Bestrahlung der Fibroblasten keinen Einfluss mehr auf die Apoptoserate von Kyse 410. Demzufolge beeinflussten die löslichen Faktoren aus Fibroblasten nach Bestrahlung nicht länger die Radiosensitivität des Tumors. Daraus lässt sich schließen, dass der Effekt durch Bestrahlung der Fibroblasten ausgeschaltet wird. Es ist bekannt, dass Bestrahlung in Fibroblasten kurzfristig zur Aktivierung inflammatorischer Signalwege führt und langfristig Fibrose verursacht [39]. Da das Medium 72 h nach Bestrahlung geerntet wurde, handelt es sich bei den beobachteten Effekten wahrscheinlich um kurzfristige Effekte. Bekannte

inflammatorische Effekte durch Bestrahlung sind die Aktivierung von Interleukin 4 und des TGF-beta Signalwegs inklusive der nachgeschalteten SMAD-Familie [57,58]. Da die Induktion von Inflammation und Apoptose in enger Beziehung stehen, könnte dies ein Ansatz zur Erklärung des radiosensitivierenden Effekts sein. So induziert TGF-beta über den TGF-beta-Rezeptor und die nachgeschaltete SMAD-Signalkaskade transnukleär einen Zellzyklus-Arrest und Apoptose [59,60]. Gleichzeitig sind inaktivierende Mutationen in Genen für TGF-beta und SMAD in zahlreichen Krebsarten nachgewiesen worden, sodass TGF-beta als Tumorsuppressor betrachtet wird [61].

Grundsätzlich zeigte Kyse 410 unabhängig vom Medium eine gesteigerte Apoptose im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Daraus kann auf eine grundsätzliche Wirksamkeit der gewählten Strahlungs-dosis in Kyse 410 geschlossen werden. Eine grundsätzliche Radiosensitivität von Kyse 410 ist vorbeschrieben und steht in Einklang mit den Vorergebnissen der Forschungsgruppe des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität. So konnte die Arbeit von Schütze (2015) zeigen, dass die Apoptose von Kyse 410 in direkter Ko-Kultur mit bestrahlten und unbestrahlten Fibroblasten ansteigt [40]. Die Arbeit untersuchte auch den Einfluss konditionierten Mediums auf die Apoptose und zeigte einen Anstieg der Apoptoserate von bestrahlten Kyse 410 mit unbestrahltem Fibroblasten-Medium in Zeitraffer-Mikroskopie (vgl. Abb. 24 der zitierten Arbeit). Jedoch zeigte sich im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen keine gesteigerte Apoptoserate durch die Bestrahlung allein. Die Arbeit zeigte außerdem noch keine Untersuchung mit konditioniertem Medium im Sub-G1-Assay und erforschte die Proteine des konditionierten Mediums nicht im Detail.

Die verwendete Strahlendosis von 2 Gy stellt die Standard-Dosis für eine Einzelsitzung in der Strahlentherapie dar. In der klinischen Anwendung werden jedoch deutlich höhere Dosen von bis zu 50 Gy appliziert [10]. Daher könnten *in vivo* stärkere Effekte sowohl auf die Fibroblasten als auch auf die ESCCs einwirken.

4.2 Radiosensitivität von Kyse 410 in kryokonserviertem Medium

Aufbauend auf den Versuch 3.1 wurde der Einfluss einer Kryokonservierung des konditionierten Mediums auf die Radiosensitivität von ESCC untersucht (3.2).

Die Ergebnisse konnten bestätigen, dass das Medium unbestrahlter Fibroblasten auch nach Kryokonservierung eine erhöhte Apoptoserate in Kyse 410 bewirkte. Ebenso zeigten sich insgesamt keine abweichenden Resultate durch die Verwendung von kryokonserviertem Medium (Abb. 4). Der Effekt blieb trotz mindestens siebentägiger Kryokonservierung bei -20 °C stabil.

Wie einleitend erwähnt, sind ROS als maßgeblicher Mediator von Strahlenschäden beschrieben [14]. Die ROS im Fibroblasten-Überstand wären somit als ein Auslöser der gesteigerten Apoptose von ESCC grundsätzlich plausibel. Allerdings konnte in mehreren Publikationen gezeigt werden, dass die ROS-Konzentration durch Gefrier-Auftau-Zyklen moduliert wird. So zeigten mehrere Studien zur Kryokonservierung von Spermatozoen eine stark erhöhte ROS-Konzentration nach Kryokonservierung [62,63]. Da die Radiosensitivierung von ESCC mit kryokonserviertem Medium vollständig reproduzierbar war, lässt sich folgern, dass die ROS-Konzentration für diesen Effekt vermutlich eine untergeordnete Rolle spielt.

Es ist bekannt, dass Proteine im hypothermen Bereich grundsätzlich eine gute Thermostabilität aufweisen und Kryokonservierung unbeschadet überstehen können. Zwar können wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen die Proteine denaturieren und Beeinträchtigungen durch pH-Absenkungen bei rapidem Einfrieren in Trockeneis sind beschrieben [64]; allerdings durchlief das verwendete Medium nur das Minimum eines einzigen Gefrier-Auftau-Zyklus und es wurden keine Schnellgefrier-Methoden wie Trockeneis angewendet. Stattdessen wurde das Medium nativ bei -20 °C eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut.

In diesen Kontext passen auch die Ergebnisse von Ozbey *et al.* (2014), die spezifische Zytokine in konditioniertem Medium auf ihre Stabilität nach Gefrier-Auftau-Zyklen testeten. Unter den sechs getesteten Proteinen wurde einzig der Tumornekrosefaktor-alpha eindeutig durch Kryokonservierung degradiert [65]. Die Kryosensitivität von Proteinen scheint demnach zu variieren. Für die in dieser

vorliegenden Arbeit detektierten Proteine war keine Kryosensitivität vorbeschrieben.

Es ist nicht auszuschließen, dass weitere Effekte abgesehen von löslichen Faktoren einen Einfluss auf die Apoptoserate von Kyse 410 hatten. Unterschiedliche Konzentrationen von Glukose in den konditionierten Medien aufgrund von Strahlungsstress in den Fibroblasten könnten zu einer Steigerung der Apoptose in Kyse 410 geführt haben. So zeigten Ampferl *et al.* (2018), dass eine verringerte Glukosekonzentration in hypopharyngealen Plattenepithelkarzinomzellen zur Beeinträchtigung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und zur Radiosensitivierung in konfluenten Tumorzellen führt. Allerdings zeigte sich in der Publikation von Ampferl *et al.* (2018) kein Effekt in normalen Fibroblasten und in proliferierenden Tumorzellen zeigte sich lediglich eine Wachstumsverlangsamung, aber keine Radiosensitivierung [66]. Ein Einfluss der Glukosekonzentration erscheint demzufolge eher unwahrscheinlich.

Ein Einfluss durch artifizielle Wachstumsstimulation kann ausgeschlossen werden, weil die verwendeten konditionierten Medien alle serumfrei waren.

Eine unbeabsichtigte direkte Ko-Kultur von Fibroblasten mit Kyse 410 wurde durch Sterilfiltration des Mediums vor dem Transfer auf Kyse 410 ausgeschlossen.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Bestrahlung der Fibroblasten die proapoptotische Wirkung auf Kyse 410 ausschaltet. Der beobachtete Effekt ähnelt dem sogenannten *bystander*-Effekt. Grundsätzlich beschreibt der *bystander*-Effekt eine indirekte Wirkung von Bestrahlung, indem bestrahlte Zellen in unbestrahlten Zellen Bestrahlungseffekte via interzellulärer Kommunikation hervorrufen [67]. Es wurde bereits gezeigt, dass bestrahlte Fibroblasten via *bystander*-Effekt die Invasivität von Plattenepithelkarzinomzellen erhöhen, allerdings wurde keine Apoptosesteigerung beobachtet [68]. Außerdem konnte durch die Bestrahlung von nativen Zellen indirekte Apoptose in präkanzerösen Zellen des gleichen Zelltyps ausgelöst werden [69]. Schon 1996 wurde gezeigt, dass diese „interzelluläre Induktion von Apoptose“ zumindest partiell auf einem ROS-abhängigen Signalweg basiert, der eine TGF-beta-abhängige Apoptose in der Zielzelle induziert [70].

Die Ergebnisse der Versuche in der vorliegenden Arbeit lassen mehrere Interpretationen zu. Die Beobachtung, dass das Medium bestrahlter Fibroblasten

keine Apoptose-Steigerung bewirkte, könnte entweder dadurch erklärt werden, dass die Bestrahlung einen apoptotischen Faktor deaktiviert oder dass sie einen anti-apoptotischen Effekt im Sinne eines Rettungsmechanismus aktiviert. Es wäre theoretisch denkbar, dass die Bestrahlung in den Fibroblasten ein Überlebensprogramm mit verstärkter DNA-Reparatur und konsekutiv gesteigerter Radioresistenz auslöst, welches indirekt auch Kyse 410 vor Apoptose schützt. Dies entspräche einem umgekehrten *bystander*-Effekt.

Lösliche Faktoren des Fibroblasten-Sekretoms könnten einen apoptotischen Effekt bewirken, der unabhängig von Strahlung besteht. Allerdings zeigten eigene Vorversuche mit unbestrahlten Kyse 410 im Medium unbestrahlter Fibroblasten keine gesteigerte Apoptose im Vergleich zur Kontrolle. Ein strahlungsunabhängiger Effekt erscheint demzufolge unwahrscheinlich und eine Steigerung der Radiosensitivität könnte die Ursache der gesteigerten Apoptose sein. Insgesamt führten die Ergebnisse zu der Hypothese, dass das Sekretom von unbestrahlten Fibroblasten die Radiosensitivität von Kyse 410 erhöht. Diese Hypothese ist gestützt auf die Annahmen, dass erstens die gesteigerte Apoptose durch Radiosensitivierung bedingt ist und dass zweitens der Effekt durch das Sekretom vermittelt wird.

4.3 Einfluss von Strahlung auf das Sekretom von Fibroblasten

Da die Bestrahlung der Fibroblasten den radiosensitivierenden Effekt des konditionierten Mediums beeinflusste, ergab sich hieraus eine neue Forschungsfrage. Es sollte untersucht werden, wie sich das Sekretom der Fibroblasten im konditionierten Medium durch die Bestrahlung verändert.

Die Untersuchung des konditionierten Mediums ergab 41 Proteine, die im Medium bestrahlter und unbehandelter Fibroblasten signifikant unterschiedlich vorlagen. Diese Gruppe spiegelt den Einfluss von 2 Gy Strahlung auf das Sekretom der Fibroblasten wider. Die 41 Proteine wurden zur Vereinfachung als BASPs zusammengefasst. Diese 41 BASPs bilden die Datenbasis als Ausgangspunkt zur Untersuchung der Radiosensitivierung von Kyse 410.

Grundsätzlich belegen die Ergebnisse, dass Strahlung modulierend auf das Sekretom der Fibroblasten wirkt und messbare Veränderungen bewirkt. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen, die in Fibroblasten nach Bestrahlung

einerseits verstärkte Sekretion inflammatorischer Faktoren [20] und andererseits verminderte tumorigene Effekte *in vivo* zeigen konnten [40].

Die Verteilung der Proteine im Vulkan-Diagramm zeigt, dass 87 % der bestrahlungsabhängigen Proteine (36 von 41 Proteinen) in der unbestrahlten Bedingung erhöht waren (Abb. 9). Nach der Bestrahlung wurde also die Mehrzahl der signifikant regulierten Proteine vermindert exprimiert. Diese Tendenz war auch unterhalb der Signifikanz-Grenze erkennbar. Daraus kann gefolgert werden, dass die Mehrzahl der sezernierten Proteine nach Bestrahlung weniger sezerniert werden. Obwohl für Fibroblasten eine zentrale Rolle bei Inflammation und Fibrose als Reaktion auf Strahlung beschrieben ist [71], scheint die Stress-Situation in den Fibroblasten dazu führen, dass die Mehrzahl der Proteine vermindert sezerniert wird und nur spezifische Proteine verstärkt sezerniert werden (Abb. 9).

Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Quantifizierung der Proteine in der markierungsfreien Massenspektrometrie eine Detektion in beiden Bedingungen voraussetzt. Da die Quantifizierung die Voraussetzung zur Berechnung der Signifikanz ist, wurden alle nicht-quantifizierbaren Proteine von der weiteren Analyse ausgeschlossen. So wurden 688 Proteine identifiziert, aber nur 247 Proteine waren quantifizierbar.

4.4 Funktions- und Klassifizierungsanalyse der Proteomik-Daten

Die 41 BASPs wurden mit DAVID untersucht, um funktionelle Eigenschaften und Trends sowie Überschneidungen der Funktionen offenzulegen. Das FAT untersuchte insgesamt häufige funktionelle Eigenschaften der Proteine. Mit dem GFCT wurden die funktionellen Eigenschaften der Proteine miteinander verglichen, um falls möglich funktionelle Unterklassen zusammenzufassen.

4.4.1 Proteom-Analyse mit DAVID FAT

Die FAT-Analyse ergab folgende Attribute als häufigste nicht-triviale Eigenschaften, die hier einzeln diskutiert werden (Abb. 10):

1. Signalpeptid – 66 %
2. Extrazelluläres Exosom – 66 %
3. Proteinbindend – 66 %

4. Disulfid-Bindung – 61 %
5. Sezerniert – 56 %
6. Extrazellularraum – 51 %

Ad 1. Ein Signalpeptid, das bei zwei Dritteln der Proteine vorhanden war, markiert Proteine meist für posttranslationale Modifikation im endoplasmatischen Retikulum und anschließende Sekretion oder Membran-Einbau [72]. Dies deutet auf einen hohen Anteil von extrazellulär wirksamen Proteinen im konditionierten Medium hin. Da der Versuch auf die Identifizierung eines extrazellulären apoptotischen Signalwegs zielte, war dies ein vielversprechendes Analyseergebnis.

Ad 2. Die Eigenschaft „Extrazelluläres Exosom“ zeigt, dass eine exosomale Ausschleusung für dieses Protein bekannt war. Diese Eigenschaft war ebenfalls bei zwei Dritteln der Proteine vorhanden und deutet weiterhin auf eine starke Fraktion extrazellulär aktiver Faktoren.

Ad 3. Die Eigenschaft „Proteinbindend“ impliziert einen modulierenden Effekt auf andere Proteine. Dies könnte komplexere multifaktorielle Mechanismen im konditionierten Medium implizieren.

Ad 4. Disulfid-Bindungen von Proteinen sind ein Merkmal von Molekülen, die extrazellulär vorliegen. Sie bilden sich nicht im Zytosol, sondern müssen aufwendiger unter oxidativen Bedingungen im endoplasmatischen Retikulum oder Mitochondrium gebildet werden und bieten den Proteinen anschließend extrazelluläre Faltungs-Stabilität [73]. Der hohe Anteil an Proteinen mit Disulfid-Bindung ist ein Indikator dafür, dass die meisten detektierten Proteine physiologisch extrazellulär vorliegen.

Darüber hinaus können sich intrazelluläre Disulfid-Bindungen in der Spätphase des Zelltods ausbilden [74]. Dies wäre durch strahleninduzierten Zellstress in den Fibroblasten denkbar, allerdings zeigt die Analyse mittels DAVID keine tatsächlich vorliegenden Disulfid-Brücken, sondern nur bekannte physiologische Eigenschaften der detektierten Proteine, sodass dieser Zusammenhang hier vermutlich keine Rolle spielt.

Ad 5. Die Sekretion ist eine Voraussetzung extrazellulärer Kommunikation und deutet auf einen Trend der BASPs zur extrazellulären Kommunikation hin. Dies spricht für eine relativ gute Nachbildung der physiologischen Verhältnisse und eine nur geringe Vermischung mit nicht physiologisch sezernierten Proteinen, die theoretisch aus lysierten Fibroblasten ins konditionierte Medium austreten könnten.

Ad 6. Die Eigenschaft „Extrazellularraum“ war bei der Hälfte der Proteine bekannt. Dies kann als weitere Bestätigung der extrazellulären Aktivität der BASPs gewertet werden.

Insgesamt deutet die funktionelle Charakterisierung des bestrahlungsabhängigen Fibroblasten-Sekretoms auf einen hohen Anteil an extrazellulär wirksamen Proteinen, die potentiell Kyse 410 beeinflussen und die Radiosensitivierung modulieren könnten.

Diese Charakterisierung des Fibroblastensekretoms steht in Einklang mit den Ergebnissen von Maarof *et al.* (2018), die das konditionierte Medium humaner dermaler Fibroblasten analysierten und verschiedene Charakteristika der Proteine des Sekretoms wie Signalfunktion, Sekretion und Einfluss auf die extrazelluläre Matrix beschrieben [56].

Es muss betont werden, dass die verwendeten Fibroblasten keiner Prägung durch Tumorzellen ausgesetzt waren, wie sie für CAFs typisch ist [75]. Dies könnte Rückschlüsse aus den Ergebnissen auf Vorgänge *in vivo* in der TME einschränken. Allerdings ist bisher keine klare Differenzierung zwischen CAFs und nativen Fibroblasten möglich, da exakte Kriterien zur Unterscheidung fehlen [32]. Es ist zudem wahrscheinlich, dass die TME nicht ausschließlich CAFs enthält, sondern auch native Fibroblasten beinhaltet.

4.4.2 Proteom-Analyse mit DAVID GFCT

Die Ähnlichkeits-Analyse mittels GFCT identifizierte eine Gruppe aus VCAN, LTBP1, FBLN2 und FBLN5 als Klasse von Proteinen mit ähnlichem Eigenschaften-Profil (Abb. 11). Nur insgesamt vier von 41 Proteinen wurden einer Klasse zugeordnet. Dies belegt, dass es sich bei den BASPs um eine

heterogene Gruppe handelte, in der insgesamt nur wenige Proteine funktionelle Ähnlichkeit miteinander aufweisen.

Die identifizierte Klasse zeigte eine Tendenz zu extrazellulärer Signal-Funktion und Sekretion, die auch das Sekretom insgesamt zeigte. Außerdem war die Klasse insbesondere durch (1) EGF-ähnliche Domänen und (2) Calcium-bindende Rezeptoren charakterisiert.

Ad 1. Die EGF-ähnliche Domäne ist ein extrazelluläres Protein-Modul, das sich aus drei Disulfid-Bindungen konstituiert und eine aktive Bindungsstelle zur Fixierung, Stabilisierung und potentiellen Modifikation von Bindungspartnern formt [76]. Innerhalb der EGF-ähnlichen Domänen sind die zwei Subtypen humane EGF-ähnliche Domäne (hEGF) und Komplement-Cr1-ähnliche Domäne (cEGF) beschrieben [77]. Beide Subtypen sind im Protein LTBP1 beschrieben, welches auch Teil der identifizierten Protein-Klasse ist. In LTBP1 bildet die hEGF-Domäne die Bindungs- und Fixierungsstelle des Proteins an die extrazelluläre Matrix und die cEGF-Domäne formt die Bindungsstelle von TGF-beta an LTBP1, sodass TGF-beta in seiner latenten, inaktiven Form im Extrazellularraum gebunden wird [77]. Außerdem bindet die EGF-ähnliche Domäne bei Inflammation vermehrt Phosphatidylserin und wurde daher als wichtiger Bestandteil der apoptotischen Phagozytose identifiziert [78]. Die Identifizierung der Eigenschaft „EGF-ähnliche Domäne“ als dominierende Eigenschaft der Protein-Klasse könnte ein Hinweis für modulierende Funktionen im Extrazellularraum sein. Allerdings werden für EGF-ähnliche Domänen zunehmende neue Subtypen mit heterogenen Funktionen entdeckt, die eine eindeutige Schlussfolgerung nicht zulassen [79].

Ad 2. Die Bindung von Calcium ist in Proteinen essentiell für strukturelle Integrität [80]. Im Zusammenspiel mit einer Mutation der EGF-ähnlichen Domäne besteht eine Assoziation mit dem Marfan-Syndrom, einer krankhaften Bindegewebsschwäche [81]. Dies deutet darauf hin, dass die identifizierte Protein-Klasse eine Rolle in der Stabilisierung des Extrazellularraums spielt.

Zusammenfassend kann die mittels GFCT identifizierte Protein-Klasse als stabilisierend im Extrazellularraum mit der Fähigkeit zur Modulation

extrazellulärer Faktoren charakterisiert werden. Alle vier Proteine der Klasse hatten nach Bestrahlung eine geringere Konzentration im konditionierten Medium. Daraus lässt sich ableiten, dass die Bestrahlung der Fibroblasten zu verminderter Stabilisierung des Extrazellulärraums führen könnte. Außerdem könnten durch verminderte Protein-Bindungen Folge-Effekte entstehen. So könnte eine verminderte LTBP1-Konzentration zu einem höheren Anteil von aktivem TGF-beta im Extrazellulärraum führen. Dies stände in Einklang mit der Funktion von TGF-beta als zentralem Faktor in der Reaktion auf Zellstress und Entzündung [82].

Als Hypothese ergibt sich daraus: Durch die Bestrahlung wird in den Fibroblasten entweder ein pro-apoptotischer Effekt neutralisiert oder es wird umgekehrt ein anti-apoptotischer Effekt aktiviert. Aus diesem Grund könnte einerseits ein pro-apoptotisches Protein im Medium unbehandelter Fibroblasten vorliegen. Andererseits wäre ein anti-apoptotisches Protein denkbar, das pro-apoptotische Effekte des unbehandelten Mediums nivelliert, nachdem es durch die Bestrahlung der Fibroblasten aktiviert wurde.

4.4.3 Eingrenzung der Suchparameter

Die algorithmische Untersuchung des Datensatzes ergab noch keine klaren Hinweise für die Apoptosesteigerung. Für eine schärfere Trennung wurde der Datensatz daher weiter eingegrenzt. Dazu wurde das alpha-Niveau von $p = 0,05$ auf $p = 0,01$ angehoben (Abb. 12). Dieser Ansatz ermöglichte eine stärkere Fokussierung auf die relevanten Proteine. Die 13 Proteine mit starker Signifikanz ($p < 0,01$) wurden als SBASPs zusammengefasst.

4.4.4 Manuelle Überprüfung der SBASP-Proteingruppe

Als nächster Analyseschritt wurden die 13 SBASPs im Detail recherchiert (Abb. 13). Da in DAVID nur Effekte berücksichtigt werden, die bereits wissenschaftlich belegt wurden, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass einige der untersuchten Proteine noch unentdeckte Eigenschaften besitzen, die nicht in die Analyse mit einbezogen werden konnten. Daher wurde eine Auswahl an Kriterien getroffen, die zur interzellulären Radiosensitivierung wichtig sein könnten. Diese wurden in manueller Arbeit nochmals einzeln recherchiert. Zur Identifizierung eines radiosensitivierenden Effekts wurde neben wichtigen Eigenschaften wie

„Signal“, „Sezerniert“ und „Apoptotisch“ vor allem nach Unterschieden der extrazellulären Funktion gesucht.

Die Unterscheidung der SBASPs in membranständige und frei gelöste Proteine, konnte die Suche weiter eingrenzen. Die gesteigerte Radiosensitivität aus den vorangegangenen Experimenten musste von einem frei gelösten Protein ausgehen. Proteine, die physiologisch membran-adhärenz waren, wurden daher von der Suche ausgeschlossen, da sie in diesem Fall unphysiologisch nicht-adhärenz vorlagen. Die Proteine Serpin H1, Periostin und PAM sind Beispiele hierfür.

4.4.5 Zusammenfassung der Sekretom-Analyse

Die Reduktion auf die drei zentralen Funktionen „Sezerniert“, „Signalfunktion“ und „Apoptose“ führte zur Selektion von (1) Gelsolin, (2) Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9) und (3) LTBP1 als Kandidaten (Abb. 14).

Ad 1. Gelsolin ist ein Aktin-modulierendes Protein, das die Struktur des Zytoskeletts beeinflusst [83]. Da die Apoptose mit einem Umbau des Zellskeletts einhergeht, ist Gelsolin auch mit Apoptose assoziiert. Allerdings beschreiben bisherige Ergebnisse eine erhöhte Expression von Gelsolin als anti-apoptotisch in Neuronen [84,85]. Weiterhin wurde in radioresistenten NSCLC-Zelllinien eine Überexpression von Gelsolin im Vergleich zu nicht-radioresistenten NSCLC-Zelllinien gemessen und eine Ausschaltung von Gelsolin in radioresistenten NSCLC-Zelllinien führte zur Radiosensitivierung [86]. Demzufolge wird Gelsolin als Radioresistenz-fördernd beschrieben. Da in den vorliegenden Ergebnissen Gelsolin mit einer erhöhten Apoptose korrelierte, passt dies nicht zu den vorliegenden Beobachtungen. Gelsolin war in den gezeigten Ergebnissen bei erhöhter Radiosensitivität vermehrt exprimiert. Daher handelt es sich bei Gelsolin vermutlich nicht um den gesuchten löslichen Faktor.

Ad 2. PCSK9, auch bekannt als NARC1, liegt primär in der Leber vor und wird klinisch als Zielstruktur für Antikörper in der Behandlung von Fettstoffwechselstörungen durch Blockade von LDL-Rezeptoren eingesetzt [87,88]. Das Protein ist primär membranständig, aber wird auch sezerniert [89]. Aktuelle Veröffentlichungen beschreiben eine Verbindung von PCSK9 und

Apoptose. Ding *et al.* (2016) zeigten eine bidirektionale Wechselwirkung zwischen PCSK9 und mitochondrialem DNA-Schaden in glatten Muskelzellen, die zumindest teilweise von mitochondrialem ROS abhängig war und zur Apoptose in den glatten Muskelzellen führte [90]. Interessanterweise induziert Bestrahlung die Bildung von ROS [13] und die besondere Rolle von mitochondrialem ROS im bestrahlungsabhängigen Zelltod ist, wie bereits einleitend erwähnt, vorbeschrieben [18]. Eine pro-apoptotische Zielwirkung von PCSK9 in Kyse 410 wäre somit plausibel. Allerdings wurde PCSK9 in den vorliegenden Ergebnissen nicht durch Bestrahlung überexprimiert, sondern war im Sekretom unbestrahlter Fibroblasten erhöht. Die Wechselwirkung zwischen PCSK9 und DNA-Schaden sowie Apoptose wäre den gezeigten Ergebnissen zufolge somit allenfalls einseitig und nicht, wie von Ding *et al.* (2016) beschrieben, bidirektional. Zusätzlich dazu konnten Pia *et al.* (2015) eine erhöhte Apoptose in Glioblastom-Zellen nach PCSK9-Ausschaltung und eine verminderte Apoptose durch PCSK9-Überexpression zeigen [91]. Während PCSK9 in glatten Muskelzellen pro-apoptotisch zu sein scheint, ist in Glioblastom-Zellen eine anti-apoptotische Wirkung beschrieben. Insgesamt deuten die unterschiedlichen Effekte von PCSK9 auf eine multimodale Wirkung in verschiedenen Zelltypen, die eine genauere Erforschung der Rolle von PCSK9 in der Apoptose nahelegen. Da PCSK9 trotz sekretorischer Fähigkeit primär membranständig ist und vor allem in Hepatozyten exprimiert wird, wurde es in der vorliegenden Arbeit nicht als wahrscheinlichster Kandidat gewertet.

Ad 3. LTBP1 ist Teil der LTBP-Proteinfamilie, die inaktives TGF-beta 1 im Extrazellularraum bindet und an der Aktivierung von TGF-beta 1 beteiligt ist [92]. Dabei bindet LTBP1 spezifisch an TGF-beta 1. Vorbeschriebene Effekte von TGF-beta 1 sind ein G1- und G2-Zellzyklus-Arrest und die Induktion von EMT (vgl. 1.4.2), wobei die Effektstärke je nach Zelltyp variierte [93]. EMT konnte wiederum in mehreren epithelialen Zelllinien anti-apoptotische Effekte vermitteln [94]. TGF-beta 1 kann demnach sowohl apoptotisch durch Zellzyklus-Arrest als auch anti-apoptotisch durch EMT-Induktion wirken. Die letztliche Wirkung von TGF-beta ist dabei vermutlich abhängig von Faktoren wie Gen-Mutationen, TGF-beta-Rezeptor-Deletion und weiteren Faktoren wie der Zellzyklus-Phase der betroffenen Zelle [95]. Die Arbeit von Flaumenhaft (1993) zu LTBP zeigte,

dass einerseits die Zugabe von rekombinantem LTBP eine interzelluläre TGF-beta-Aktivierung unterdrücken kann, während andererseits die Blockade spezifischer Bindungsstellen von LTBP mittels Antikörpern ebenfalls zu verminderter TGF-beta-Aktivierung führte [96]. Demzufolge reguliert die extrazelluläre LTBP-Menge den Anteil von aktiviertem TGF-beta, aber das Protein scheint auch direkt an der TGF-beta-Aktivierung beteiligt zu sein. TGF-beta selbst spielt eine zentrale Rolle in der Entzündungsregulation, die als Reaktion auf Bestrahlung eintritt [22]. Damit steht im Einklang, dass LTBP1 in den hier gezeigten Ergebnissen bestrahlungsabhängig sezerniert wurde. Trotz intensiver Forschung ist die Rolle von TGF-beta 1 aber nicht ausreichend geklärt und auch die Funktion von LTBP1 ist vermutlich multidimensional. In den vorliegenden Ergebnissen kann die LTBP1-Menge im unbestrahlten Medium als natürliche Konzentration gewertet werden, während LTBP1 im bestrahlten Medium 2,18-fach vermindert vorlag (Tabelle 7). Entsprechend den diskutierten Quellen würde eine durch Bestrahlung verminderte LTBP1-Sekretion am ehesten zu einer geringeren Menge von aktiviertem TGF-beta 1 führen. Die beobachtete Radiosensitivierung und der Verlust der Radiosensitivierung nach Bestrahlung der Fibroblasten wären dementsprechend durch einen Mangel von aktiviertem TGF-beta 1 vermittelt.

TGF-beta ist als inflammatorisches und immunmodulierendes Zytokin bekannt. Schon 1990 wurde die Induktion eines G1-Zellzyklus-Arrests durch TGF-beta beschrieben [97]. Dies könnte zu einem Anstieg des Sub-G1-Anteils der DNA von Kyse 410 geführt haben, der im Nicoletti-Assay als Apoptose-Marker gemessen wird.

Außerdem wurde im ESCC bereits eine Immunevasion durch TGF-beta in der TME entdeckt [98]. Dies könnte ein Hinweis auf die zentrale Rolle von TGF-beta in der interzellulären Kommunikation in der TME sein. Darüber hinaus ist eine strahleninduzierte und Redox-vermittelte Aktivierung von latentem TGF-beta in zellfreien Versuchen vorbeschrieben [82]. Dieser Effekt könnte ebenfalls durch die bestrahlten Kyse 410 im konditionierten Fibroblasten-Medium ausgelöst worden sein.

Die massenspektrometrische Analyse des konditionierten Mediums unbestrahlter Fibroblasten identifizierte neben zahlreichen anderen Proteinen

auch TGF-beta. Eine Regulation durch Bestrahlung konnte nicht detektiert werden.

Überlagernde Effekte könnten von zusätzlichem TGF-beta ausgehen, das als Bestandteil des FBS zur Wachstumsstimulation *in vitro* verwendet wird. Die zur Stimulation verwendeten konditionierten Medien waren allerdings alle FBS-frei, um eine künstliche Wachstumsstimulation zu vermeiden. Eine exogene, artifizielle TGF-beta Stimulation ist daher in diesem Versuchsaufbau vernachlässigbar.

Das Beispiel von LTBP1 demonstriert die Relevanz von manueller Recherche im Vergleich zur Bioinformatik-Analyse mit DAVID. Da die Implikation von LTBP1 in apoptotische Prozesse nur sekundär über TGF-beta begründet werden kann, wurde dies von DAVID nicht berücksichtigt. Es ist einleuchtend, dass die Bioinformatik als Werkzeug zur Bewältigung großer Datenmengen unabdingbar ist. Allerdings kann die automatisierte Auswertung zum Verlust wichtiger Details führen, da komplexere Signalwege nicht erfasst werden. Die Weiterentwicklung der Ergebnisse der Proteom-Analyse in manueller Recherche erwies sich als zielführend.

Zusammenfassend wurde LTBP1 durch Zellstress in Form von Bestrahlung vermindert sezerniert. Dies könnte zu verringerter TGF-beta-Bindung und folglich verringerter TGF-beta-Aktivität im Sekretom bestrahlter Fibroblasten geführt haben. Allerdings sind sowohl für die Radiosensitivierung von Krebszellen als auch für TGF-beta sehr unterschiedliche Effekte beschrieben, die auf Epigenetik und Polymorphismus zurückgeführt werden [60,99]. Eine eindeutige Schlussfolgerung ist also zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich.

Insgesamt ist eine strahleninduzierte TGF-beta-vermittelte Reaktion aber plausibel. Die Tatsache, dass mit LTBP1 ein direkter Regulator von TGF-beta im Sekretom identifiziert wurde, macht es zu einem wahrscheinlichen Auslöser der beobachteten Radiosensitivierung.

5 Schlussfolgerungen

Das zentrale Problem der onkologischen Strahlentherapie ist die Balance zwischen der Resistenz des Tumors und der Anfälligkeit des gesunden Umgebungsgewebes. Die Erforschung und Anwendung molekularer Mechanismen der Radiosensitivität sind daher entscheidend für den Therapieerfolg.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass konditioniertes Medium unbestrahlter Fibroblasten die strahleninduzierte Apoptose von Kyse 410 im Nicoletti-Assay erhöht. Dieser Effekt konnte mit kryokonserviertem Medium reproduziert werden, wodurch kryosensitive Einflussfaktoren, wie ROS oder kryosensitive Proteine, als Auslöser weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

Daran anknüpfend wurde erstmalig eine Untersuchung des Strahleneffekts in therapeutisch wirksamer Dosis auf das Sekretom von Fibroblasten durchgeführt. Dabei konnten in der Massenspektrometrie 41 Proteine identifiziert werden, die strahlungsabhängig im konditionierten Medium vorlagen. Die Proteine wurden eingehend analysiert und das LTBP1 wurde aus einer Auswahl von drei Proteinen als aussichtsreichster Kandidat für die Radiosensitivierung identifiziert. Allerdings bedarf es weiterer Forschung auf diesem Feld, um die Radiosensitivierung von ESCC durch konditioniertes Medium von Fibroblasten zu ergründen.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Sekretion von radiosensitivierenden Faktoren in Fibroblasten *in vitro* nach Bestrahlung unterdrückt wird. Es ist bekannt, dass die Bestrahlung von gesundem Gewebe die Ursache zahlreicher Nebenwirkungen der Strahlentherapie ist. Eine Mitbestrahlung von gesundem Umgebungsgewebe könnte für den Therapieerfolg nachteilig sein, da die natürliche Strahlenantwort des gesunden Gewebes aktiviert wird und im Sinn eines umgekehrten *bystander*-Effekts den Tumor indirekt schützt. Die Wichtigkeit der strengen Schonung von gesunden Fibroblasten wird damit unterstrichen. Auf die Ergebnisse aufbauend könnte ein tieferes Verständnis der Mechanismen der Strahlenantwort nicht nur eine Vermeidungsempfehlung geben, sondern auch zur Entwicklung aktiver Medikamente zur Steigerung der klinischen Radiosensitivität unter Ausnutzung natürlicher molekularer Mechanismen führen.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, **Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**, *CA. Cancer J. Clin.* (2021), doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] A.S. Quante, C. Ming, M. Rottmann, J. Engel, S. Boeck, V. Heinemann, C.B. Westphalen, K. Strauch, **Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030**, *Cancer Med.* 5 (2016) 2649–2656, doi: 10.1002/cam4.767.
- [3] A. Pennathur, M.K. Gibson, B.A. Jobe, J.D. Luketich, Oesophageal carcinoma, in: *Lancet*, Lancet Publishing Group, 2013: pp. 400–412doi: 10.1016/S0140-6736(12)60643-6.
- [4] P.C. Enzinger, R.J. Mayer, **Esophageal Cancer**, *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 2241–2252, doi: 10.1056/NEJMra035010.
- [5] M. Arnold, I. Soerjomataram, J. Ferlay, D. Forman, **Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012**, *Gut.* 64 (2015) 381–387, doi: 10.1136/gutjnl-2014-308124.
- [6] Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)., *Krebs in Deutschland für 2015/2016 - Speiseröhre* 12. Ausgabe., Berlin, 2015doi: 10.25646/5977.
- [7] M.F. Berry, **Esophageal cancer: staging system and guidelines for staging and treatment.**, *J. Thorac. Dis.* 6 Suppl 3 (2014) S289-97, doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.11.
- [8] C. Pöttgen, M. Stuschke, **Radiotherapy versus surgery within multimodality protocols for esophageal cancer - A meta-analysis of the randomized trials**, *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 599–604, doi: 10.1016/j.ctrv.2011.10.005.
- [9] M. Kranzfelder, T. Schuster, H. Geinitz, H. Friess, P. Büchler, **Meta-analysis of neoadjuvant treatment modalities and definitive non-surgical therapy for oesophageal squamous cell cancer**, *Br. J. Surg.* 98 (2011) 768–783, doi: 10.1002/bjs.7455.
- [10] AWMF. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus, **Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adeno-karzinome des Ösophagus, Langversion 2.01 (Konsultationsfassung), 2018, AWMF Registernummer: 0, AWMF-Registernummer: 021/023OL.** (2018). <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/o-esophaguskarzinom/>(abgerufen am: 04.06.2019).
- [11] G. Delaney, S. Jacob, C. Featherstone, M. Barton, **The role of radiotherapy in cancer treatment**, *Cancer.* 104 (2005) 1129–1137, doi: 10.1002/cncr.21324.
- [12] B.D. Minsky, T.F. Pajak, R.J. Ginsberg, T.M. Pisansky, J. Martenson, R.

- Komaki, G. Okawara, S.A. Rosenthal, D.P. Kelsen, **INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) Phase III Trial of Combined-Modality Therapy for Esophageal Cancer: High-Dose Versus Standard-Dose Radiation Therapy**, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 1167–1174, doi: 10.1200/jco.2002.20.5.1167.
- [13] H.B. Michaels, J.W. Hunt, **A Model for Radiation Damage in Cells by Direct Effect and by Indirect Effect: A Radiation Chemistry Approach**, *Radiat. Res.* 74 (1978) 23, doi: 10.2307/3574754.
- [14] V. Múčka, J. Červenák, D. Reimitz, V. Čuba, P. Bláha, B. Neužilová, **Effects of irradiation conditions on the radiation sensitivity of microorganisms in the presence of OH-radical scavengers**, *Int. J. Radiat. Biol.* 94 (2018) 1142–1150, doi: 10.1080/09553002.2018.1532610.
- [15] W.L. Santivasi, F. Xia, **Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair**, *Antioxid. Redox Signal.* 21 (2014) 251–259, doi: 10.1089/ars.2013.5668.
- [16] K. Suzuki, S. Kodama, M. Watanabe, **Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation**, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 25571–25575, doi: 10.1074/jbc.274.36.25571.
- [17] C.H. Westphal, S. Rowan, C. Schmaltz, A. Elson, D.E. Fisher, P. Leder, **atm and p53 cooperate in apoptosis and suppression of tumorigenesis, but not in resistance to acute radiation toxicity**, *Nat. Genet.* 16 (1997) 397–401, doi: 10.1038/ng0897-397.
- [18] S. Kobashigawa, G. Kashino, K. Suzuki, S. Yamashita, H. Mori, **Ionizing Radiation-Induced Cell Death Is Partly Caused by Increase of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Normal Human Fibroblast Cells**, *Radiat. Res.* 183 (2015) 455–464, doi: 10.1667/RR13772.1.
- [19] I. Corre, M. Guillonneau, F. Paris, **Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity.**, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 22678–96, doi: 10.3390/ijms141122678.
- [20] V.N. Ivanov, H. Zhou, S.A. Ghandhi, T.B. Karasic, B. Yaghoubian, S.A. Amundson, T.K. Hei, **Radiation-induced bystander signaling pathways in human fibroblasts: A role for interleukin-33 in the signal transmission**, *Cell. Signal.* 22 (2010) 1076–1087, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.02.010.
- [21] M. Widel, **Radionuclides in radiation-induced bystander effect; may it share in radionuclide therapy?**, *Neoplasma.* 64 (2017) 641–654, doi: 10.4149/neo_2017_501.
- [22] Z. Haiping, K. Takayama, J. Uchino, A. Harada, Y. Adachi, S. Kura, Z. Caicun, T. Tsuzuki, Y. Nakanishi, **Prevention of radiation-induced pneumonitis by recombinant adenovirus-mediated transferring of soluble TGF- β type II receptor gene**, *Cancer Gene Ther.* 13 (2006) 864–872, doi: 10.1038/sj.cgt.7700959.
- [23] J.B. Little, **Principal Cellular and Tissue Effects of Radiation**, in: P.R.W.R. et al. Kufe DW (Ed.), *Holland-Frei Cancer Med.*, 6th edition, BC

- Decker, 2003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12344/> (accessed April 14, 2021).
- [24] J.B. Little, H. Nagasawa, **Effect of Confluent Holding on Potentially Lethal Damage Repair, Cell Cycle Progression, and Chromosomal Aberrations in Human Normal and Ataxia-Telangiectasia Fibroblasts**, *Radiat. Res.* 101 (1985) 81, doi: 10.2307/3576305.
- [25] A.L. Dunne, M.E. Price, C. Mothersill, S.R. McKeown, T. Robson, D.G. Hirst, **Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells**, *Br. J. Cancer.* 89 (2003) 2277–2283, doi: 10.1038/sj.bjc.6601427.
- [26] A.M. Buckley, N. Lynam-Lennon, H. O’Neill, J. O’Sullivan, **Targeting hallmarks of cancer to enhance radiosensitivity in gastrointestinal cancers**, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17 (2020) 298–313, doi: 10.1038/s41575-019-0247-2.
- [27] G.Z. Chen, H.C. Zhu, W.S. Dai, X.N. Zeng, J.H. Luo, X.C. Sun, **The mechanisms of radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma and current strategies in radiosensitivity**, *J. Thorac. Dis.* 9 (2017) 849–859, doi: 10.21037/jtd.2017.03.23.
- [28] M.R. Kelley, D. Logsdon, M.L. Fishel, **Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: What’s new?**, *Futur. Oncol.* 10 (2014) 1215–1237, doi: 10.2217/fon.14.60.
- [29] M. Park, H.J. Yoon, M.C. Kang, J. Kwon, H.W. Lee, **MiR-338-5p enhances the radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma by inducing apoptosis through targeting survivin**, *Sci. Rep.* 7 (2017)doi: 10.1038/s41598-017-10977-9.
- [30] D. Hanahan, L.M. Coussens, **Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment**, *Cancer Cell.* 21 (2012) 309–322, doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
- [31] A. Palumbo, N. de Oliveira Meireles Da Costa, M.H. Bonamino, L.F. Ribeiro Pinto, L.E. Nasciutti, **Genetic instability in the tumor microenvironment: A new look at an old neighbor**, *Mol. Cancer.* 14 (2015)doi: 10.1186/s12943-015-0409-y.
- [32] E. Sahai, I. Astsaturon, E. Cukierman, D.G. DeNardo, M. Egeblad, R.M. Evans, D. Fearon, F.R. Greten, S.R. Hingorani, T. Hunter, R.O. Hynes, R.K. Jain, T. Janowitz, C. Jorgensen, A.C. Kimmelman, M.G. Kolonin, R.G. Maki, R.S. Powers, E. Puré, D.C. Ramirez, R. Scherz-Shouval, M.H. Sherman, S. Stewart, T.D. Tlsty, D.A. Tuveson, F.M. Watt, V. Weaver, A.T. Weeraratna, Z. Werb, **A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts**, *Nat. Rev. Cancer.* 20 (2020) 174–186, doi: 10.1038/s41568-019-0238-1.
- [33] C. Gaggioli, S. Hooper, C. Hidalgo-Carcedo, R. Grosse, J.F. Marshall, K. Harrington, E. Sahai, **Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells**, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 1392–1400, doi: 10.1038/ncb1658.
- [34] D.V.F. Tauriello, S. Palomo-Ponce, D. Stork, A. Berenguer-Llargo, J.

- Badia-Ramentol, M. Iglesias, M. Sevillano, S. Ibiza, A. Cañellas, X. Hernando-Momblona, D. Byrom, J.A. Matarin, A. Calon, E.I. Rivas, A.R. Nebreda, A. Riera, C.S.O. Attolini, E. Batlle, **TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis**, *Nature*. 554 (2018) 538–543, doi: 10.1038/nature25492.
- [35] E. Flaberg, L. Markasz, G. Petransy, G. Stuber, F. Dicså, N. Alchihabi, É. Oláh, I. Csízy, T. Józsa, O. Andrén, J.E. Johansson, S.O. Andersson, G. Klein, L. Szekely, **High-throughput live-cell imaging reveals differential inhibition of tumor cell proliferation by human fibroblasts**, *Int. J. Cancer*. 128 (2011) 2793–2802, doi: 10.1002/ijc.25612.
- [36] R. Yahyapour, P. Amini, S. Rezapoor, A. Rezaeyan, B. Farhood, M. Cheki, H. Fallah, M. Najafi, **Targeting of Inflammation for Radiation Protection and Mitigation**, *Curr. Mol. Pharmacol.* 11 (2018) 203–210, doi: 10.2174/1874467210666171108165641.
- [37] J. Lee, M.R. Kim, H.J. Kim, Y.S. An, J.Y. Yi, **TGF- β 1 accelerates the DNA damage response in epithelial cells via Smad signaling**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476 (2016) 420–425, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.136.
- [38] J.M. Straub, J. New, C.D. Hamilton, C. Lominska, Y. Shnayder, S.M. Thomas, **Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy**, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141 (2015) 1985–1994, doi: 10.1007/s00432-015-1974-6.
- [39] A. Vallée, Y. Lecarpentier, R. Guillevin, J.N. Vallée, **Interactions between TGF- β 1, canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR γ in radiation-induced fibrosis**, *Oncotarget*. 8 (2017) 90579–90604, doi: 10.18632/oncotarget.21234.
- [40] A. Schütze, **Der Einfluss des Hyaluronsäure-Systems auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen**, Universität Duisburg-Essen, 2015. https://bibliographie.ub.uni-due.de/servlets/DozBibEntryServlet?id=ubo_mods_00067000 (accessed June 10, 2020).
- [41] A. Doerr, **Mass spectrometry-based targeted proteomics**, *Nat. Methods*. 10 (2013) 23, doi: 10.1038/nmeth.2286.
- [42] S.G. Maher, D.T. McDowell, B.C. Collins, C. Muldoon, W.M. Gallagher, J. V. Reynolds, **Serum proteomic profiling reveals that pretreatment complement protein levels are predictive of esophageal cancer patient response to neoadjuvant chemoradiation**, in: *Ann. Surg.*, Ann Surg, 2011: pp. 809–816, doi: 10.1097/SLA.0b013e31823699f2.
- [43] S.I. Anjo, B. Manadas, **A translational view of cells' secretome analysis - from untargeted proteomics to potential circulating biomarkers**, *Biochimie*. 155 (2018) 37–49, doi: 10.1016/j.biochi.2018.05.007.
- [44] J. Brandi, M. Manfredi, G. Speziali, F. Gosetti, E. Marengo, D. Cecconi, **Proteomic approaches to decipher cancer cell secretome**, *Semin. Cell Dev. Biol.* 78 (2018) 93–101, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.06.030.
- [45] S. Keerthikumar, **An Introduction to Proteome Bioinformatics**, in: *Methods Mol. Biol.*, 2017: pp. 1–3doi: 10.1007/978-1-4939-6740-7_1.

- [46] M. Hauptmann, S. Haghdoost, M. Gomolka, H. Sarioglu, M. Ueffing, A. Dietz, U. Kulka, K. Unger, G. Babini, M. Harms-Ringdahl, A. Ottolenghi, S. Hornhardt, **Differential Response and Priming Dose Effect on the Proteome of Human Fibroblast and Stem Cells Induced by Exposure to Low Doses of Ionizing Radiation**, *Radiat. Res.* 185 (2016) 299, doi: 10.1667/rr14226.1.
- [47] R. Kalluri, **The biology and function of fibroblasts in cancer**, *Nat. Rev. Cancer.* 16 (2016) 582–598, doi: 10.1038/nrc.2016.73.
- [48] I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, **A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry**, *J. Immunol. Methods.* 139 (1991) 271–279, doi: 10.1016/0022-1759(91)90198-O.
- [49] B. Sitek, D.M. Waldera-Lupa, G. Poschmann, H.E. Meyer, K. Stühler, **Application of label-free proteomics for differential analysis of lung carcinoma cell line A549**, *Methods Mol. Biol.* 893 (2012) 241–248, doi: 10.1007/978-1-61779-885-6_16.
- [50] D.W. Huang, B.T. Sherman, R.A. Lempicki, **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources**, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 44–57, doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- [51] D.W. Huang, B.T. Sherman, R.A. Lempicki, **Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.**, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 1–13, doi: 10.1093/nar/gkn923.
- [52] LHRI, **DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis**, (n.d.). <https://david.ncifcrf.gov/> (accessed April 14, 2021).
- [53] G. Stelzer, N. Rosen, I. Plaschkes, S. Zimmerman, M. Twik, S. Fishilevich, T. Iny Stein, R. Nudel, I. Lieder, Y. Mazor, S. Kaplan, D. Dahary, D. Warshawsky, Y. Guan-Golan, A. Kohn, N. Rappaport, M. Safran, D. Lancet, **The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses**, *Curr. Protoc. Bioinforma.* 2016 (2016) 1.30.1-1.30.33, doi: 10.1002/cpbi.5.
- [54] A. Luo, X. Zhou, X. Shi, Y. Zhao, Y. Men, X. Chang, H. Chen, F. Ding, Y. Li, D. Su, Z. Xiao, Z. Hui, Z. Liu, **Exosome-derived miR-339-5p mediates radiosensitivity by targeting Cdc25A in locally advanced esophageal squamous cell carcinoma**, *Oncogene.* 38 (2019) 4990–5006, doi: 10.1038/s41388-019-0771-0.
- [55] S. Zhou, S. Liu, C. Lin, Y. Li, L. Ye, X. Wu, Y. Jian, Y. Dai, Y. Ouyang, L. Zhao, M. Liu, L. Song, M. Xi, **TRIB3 confers radiotherapy resistance in esophageal squamous cell carcinoma by stabilizing TAZ**, *Oncogene.* (2020) 1–16, doi: 10.1038/s41388-020-1245-0.
- [56] M. Maarof, Y. Lokanathan, H.I. Ruszymah, A. Saim, S.R. Chowdhury, **Proteomic Analysis of Human Dermal Fibroblast Conditioned Medium (DFCM)**, *Protein J.* 37 (2018) 589–607, doi: 10.1007/s10930-018-9800-z.
- [57] C. Büttner, A. Skupin, T. Reimann, E.P. Rieber, G. Unteregger, P. Geyer, K.H. Frank, **Local Production of Interleukin-4 during Radiation-induced Pneumonitis and Pulmonary Fibrosis in Rats: Macrophages**

- as a Prominent Source of Interleukin-4**, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17 (1997) 315–325, doi: 10.1165/ajrcmb.17.3.2279.
- [58] K.C. Flanders, C.D. Sullivan, M. Fujii, A. Sowers, M.A. Anzano, A. Arabshahi, C. Major, C. Deng, A. Russo, J.B. Mitchell, A.B. Roberts, **Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation**, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 1057–1068, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64926-7.
- [59] Y. Shi, J. Massagué, **Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus**, *Cell.* 113 (2003) 685–700, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00432-X.
- [60] P.M. Siegel, J. Massagué, **Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer**, *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 807–820, doi: 10.1038/nrc1208.
- [61] D. Samanta, P.K. Datta, **Alterations in the Smad pathway in human cancers**, *Front. Biosci.* 17 (2012) 1281–1293, doi: 10.2741/3986.
- [62] S. Chatterjee, C. Gagnon, **Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing**, *Mol. Reprod. Dev.* 59 (2001) 451–458, doi: 10.1002/mrd.1052.
- [63] S. Evangelista-Vargas, A. Santiani, **Detection of intracellular reactive oxygen species (superoxide anion and hydrogen peroxide) and lipid peroxidation during cryopreservation of alpaca spermatozoa**, *Reprod. Domest. Anim.* 52 (2017) 819–824, doi: 10.1111/rda.12984.
- [64] B.M. Murphy, S. Swarts, B.M. Mueller, P. Van Der Geer, M.C. Manning, M.I. Fitchmun, **Protein instability following transport or storage on dry ice**, *Nat. Methods.* 10 (2013) 278–279, doi: 10.1038/nmeth.2409.
- [65] G. Ozbey, R. Gorczynski, N. Erin, **Stability of cytokines in supernatants of stimulated mouse immune cells**, *Eur. Cytokine Netw.* 25 (2014) 30–34, doi: 10.1684/ecn.2014.0353.
- [66] R. Ampferl, H.P. Rodemann, C. Mayer, T.T.A. Höfling, K. Dittmann, **Glucose starvation impairs DNA repair in tumour cells selectively by blocking histone acetylation**, *Radiother. Oncol.* 126 (2018) 465–470, doi: 10.1016/j.radonc.2017.10.020.
- [67] J. B. Little, E. I. Azzam, S. M. de Toledo, H. Nagasawa, **Bystander Effects: Intercellular Transmission of Radiation Damage Signals**, *Radiat. Prot. Dosimetry.* 99 (2002) 159–162, doi: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a006751.
- [68] N. Kamochi, M. Nakashima, S. Aoki, K. Uchihashi, H. Sugihara, S. Toda, S. Kudo, **Irradiated fibroblast-induced bystander effects on invasive growth of squamous cell carcinoma under cancer-stromal cell interaction**, *Cancer Sci.* 99 (2008) 2417–2427, doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00978.x.
- [69] D.I. Portess, G. Bauer, M.A. Hill, P. O'Neill, **Low-dose irradiation of nontransformed cells stimulates the selective removal of precancerous cells via intercellular induction of apoptosis**, *Cancer Res.* 67 (2007) 1246–1253, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2985.
- [70] C. Langer, J.M. Jürgensmeier, G. Bauer, **Reactive oxygen species act at**

- both TGF- β -dependent and -independent steps during induction of apoptosis of transformed cells by normal cells**, *Exp. Cell Res.* 222 (1996) 117–124, doi: 10.1006/excr.1996.0015.
- [71] S.G. Dakin, **Inflammation or damage: Fibroblasts decide**, *Sci. Transl. Med.* 11 (2019)doi: 10.1126/scitranslmed.aax9562.
- [72] K. Kapp, S. Schrempf, M.K. Lemberg, B. Dobberstein, **Post-Targeting Functions of Signal Peptides**, (2013).
- [73] C.S. Sevier, C.A. Kaiser, **Formation and transfer of disulphide bonds in living cells**, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 836–847, doi: 10.1038/nrm954.
- [74] A.L. Samson, A.S. Knaupp, M. Sashindranath, R.J. Borg, A.E.L. Au, E.J. Cops, H.M. Saunders, S.H. Cody, C.A. McLean, C.J. Nowell, V.A. Hughes, S.P. Bottomley, R.L. Medcalf, **Nucleocytoplasmic Coagulation: An Injury-Induced Aggregation Event that Disulfide Crosslinks Proteins and Facilitates Their Removal by Plasmin**, *Cell Rep.* 2 (2012) 889–901, doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.026.
- [75] X. Chen, E. Song, **Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts**, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2019) 99–115, doi: 10.1038/s41573-018-0004-1.
- [76] E. Appella, I.T. Weber, F. Blasi, **Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins**, *FEBS Lett.* 231 (1988) 1–4, doi: 10.1016/0014-5793(88)80690-2.
- [77] M.A. Wouters, I. Rigoutsos, C.K. Chu, L.L. Feng, D.B. Sparrow, S.L. Dunwoodie, **Evolution of distinct EGF domains with specific functions**, *Protein Sci.* 14 (2005) 1091–1103, doi: 10.1110/ps.041207005.
- [78] S.-Y. Park, S.-Y. Kim, M.-Y. Jung, D.-J. Bae, I.-S. Kim, **Epidermal growth factor-like domain repeat of stabilin-2 recognizes phosphatidylserine during cell corpse clearance.**, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 5288–98, doi: 10.1128/MCB.01993-07.
- [79] B.J. Tombling, C.K. Wang, D.J. Craik, **EGF-like and Other Disulfide-rich Microdomains as Therapeutic Scaffolds**, *Angew. Chemie - Int. Ed.* (2019)doi: 10.1002/anie.201913809.
- [80] C.M. Kielty, C.A. Shuttleworth, **The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils**, *FEBS Lett.* 336 (1993) 323–326, doi: 10.1016/0014-5793(93)80829-J.
- [81] A.K. Downing, V. Knott, J.M. Werner, C.M. Cardy, I.D. Campbell, P.A. Handford, **Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: Implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders**, *Cell.* 85 (1996) 597–605, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81259-3.
- [82] M.H. Barcellos-Hoff, T.A. Dix, **Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1.**, *Mol. Endocrinol.* 10 (1996) 1077–1083, doi: 10.1210/mend.10.9.8885242.
- [83] P. Silacci, L. Mazzolai, C. Gauci, N. Stergiopoulos, H.L. Yin, D. Hayoz, **Gelsolin superfamily proteins: Key regulators of cellular functions**,

- Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 2614–2623, doi: 10.1007/s00018-004-4225-6.
- [84] Q.H. Zhang, Q. Chen, J.R. Kang, C. Liu, N. Dong, X.M. Zhu, Z.Y. Sheng, Y.M. Yao, **Treatment with gelsolin reduces brain inflammation and apoptotic signaling in mice following thermal injury**, *J. Neuroinflammation*. 8 (2011), doi: 10.1186/1742-2094-8-118.
- [85] H. Liu, J. Liu, S. Liang, H. Xiong, **Plasma gelsolin protects HIV-1 gp120-induced neuronal injury via voltage-gated K⁺ channel Kv2.1**, *Mol. Cell. Neurosci.* 57 (2013) 73–82, doi: 10.1016/j.mcn.2013.10.008.
- [86] R. Sen Zhao, W. Wang, J.P. Li, C.M. Liu, L. He, **Gelsolin Promotes Radioresistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Through Activation of Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling**, *Technol. Cancer Res. Treat.* 16 (2017) 512–518, doi: 10.1177/1533034616643884.
- [87] E.A. Stein, S. Mellis, G.D. Yancopoulos, N. Stahl, D. Logan, W.B. Smith, E. Lisbon, M. Gutierrez, C. Webb, R. Wu, Y. Du, T. Kranz, E. Gasparino, G.D. Swergold, **Effect of a Monoclonal Antibody to PCSK9 on LDL Cholesterol**, *N. Engl. J. Med.* 366 (2012) 1108–1118, doi: 10.1056/nejmoa1105803.
- [88] G.D. Norata, G. Tibolla, A.L. Catapano, **Targeting PCSK9 for Hypercholesterolemia**, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54 (2014) 273–293, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-140025.
- [89] F. Du, Y. Hui, M. Zhang, M.F. Linton, S. Fazio, D. Fan, **Novel domain interaction regulates secretion of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) protein**, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 43054–43061, doi: 10.1074/jbc.M111.273474.
- [90] Z. Ding, S. Liu, X. Wang, P. Mathur, Y. Dai, S. Theus, X. Deng, Y. Fan, J.L. Mehta, **Cross-Talk between PCSK9 and Damaged mtDNA in Vascular Smooth Muscle Cells: Role in Apoptosis**, *Antioxidants Redox Signal.* 25 (2016) 997–1008, doi: 10.1089/ars.2016.6631.
- [91] M.X. Piao, J.W. Bai, P.F. Zhang, Y.Z. Zhang, **PCSK9 regulates apoptosis in human neuroglioma u251 cells via mitochondrial signaling pathways**, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 2787–2794, PMID: 26045785.
- [92] J. Saharinen, J. Keski-Oja, **Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF- β binding proteins, LTBP_s, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF- β** , *Mol. Biol. Cell.* 11 (2000) 2691–2704, doi: 10.1091/mbc.11.8.2691.
- [93] Y. Yang, X. Pan, W. Lei, J. Wang, J. Song, **Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism**, *Oncogene*. 25 (2006) 7235–7244, doi: 10.1038/sj.onc.1209712.
- [94] S. Vega, A. V. Morales, O.H. Ocaña, F. Valdés, I. Fabregat, M.A. Nieto, **Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death**, *Genes Dev.* 18 (2004) 1131–1143, doi: 10.1101/gad.294104.
- [95] J. Song, **EMT or apoptosis: A decision for TGF- β** , *Cell Res.* 17 (2007) 289–290, doi: 10.1038/cr.2007.25.

- [96] R. Flaumenhaft, M. Abe, Y. Sato, K. Miyazono, J. Harpel, C.H. Heldin, D.B. Rifkin, **Role of the latent TGF- β binding protein in the activation of latent TGF- β by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells**, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 995–1002, doi: 10.1083/jcb.120.4.995.
- [97] H.L. Moses, E.Y. Yang, J.A. Pietenpol, **TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: New mechanistic insights**, *Cell.* 63 (1990) 245–247, doi: 10.1016/0092-8674(90)90155-8.
- [98] C. Vanpouille-Box, J.M. Diamond, K.A. Pilonis, J. Zavadil, J.S. Babb, S.C. Formenti, M.H. Barcellos-Hoff, S. Demaria, **TGF β is a master regulator of radiation therapy-induced antitumor immunity**, *Cancer Res.* 75 (2015) 2232–2242, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3511.
- [99] A. Arshad, E. Deutsch, M.-C. Vozenin, **Simultaneous Irradiation of Fibroblasts and Carcinoma Cells Repress the Secretion of Soluble Factors Able to Stimulate Carcinoma Cell Migration**, *PLoS One.* 10 (2015) e0115447, doi: 10.1371/journal.pone.0115447.

Danksagung

Meinem Doktorvater Professor Dr. Jens Walter Fischer möchte ich danken für die Erfahrung, die ich am Institut machen durfte und für die Betreuung und Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Meiner Betreuerin Dr. Katharina Röck bin ich sehr dankbar, ohne ihre zielsicheren Anweisungen und ihren Ansporn wäre ich niemals zum Ende gekommen.

Dr. Dr. Sören Twarock bin ich in höchstem Maße dankbar für seine Unterstützung und großzügige Hilfe vor Ort ab dem zweiten Forschungssemester und weit darüber hinaus.

Ein zentraler Ansporn für mein wissenschaftliches Interesse war meine Tätigkeit beim GRK 1937. Dafür möchte ich allen Mitgliedern des GRK, aber insbesondere meiner Mentorin Frau Prof. Dr. Verena Jendrossek und Frau Ivonne Schulte herzlich danken.

Meiner Arbeitsgruppe, Alexandra Schütze, Christian Vogeley und vor allem Oliver Reiners möchte ich dafür danken, dass sie mir so manchen Anfängerfehler verziehen haben und viel Geduld mit mir hatten. Von ihnen habe ich den größten Teil meiner naturwissenschaftlichen Fähigkeiten lernen dürfen. Vielen Dank schulde ich auch Christina Reichert und Janna Morawitz dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und klinische Pharmakologie möchte ich danken für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit, die sicher zu einem großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Sabina Tschaikowski-Rösgen und Stephan Rösgen, meinen Brüdern Frederik und Lorenz und meinen guten Freunden Lukas Heimann, Justus Lohaus, Enrico Schönheit und Tengis Tschaidse, die mich durch Tiefpunkte und intensive Arbeitsphasen begleitet haben und immer für mich da waren.