Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem
Institut für Zellbiologie (Tumorforschung)

Einfluss des CC-Chemokin-Ligand 2 (Ccl2) auf die vaskuläre Funktion bei strahlungsinduzierter Normalgewebsschädigung

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Alina Wiesemann

aus Wuppertal

2020

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Offen im Denken

ub universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/73697
URN: urn:nbn:de:hbz:464-20210318-114840-5

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter:	Frau Prof. Dr. rer. nat. D. Klein
2. Gutachter:	Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Hansen
3. Gutachter:	Herr Univ.-Prof. Dr. phil. nat. G. Iliakis

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 2020

Teile dieser Arbeit sind in den folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

- **Wiesemann A**, Ketteler J, Slama A, Wirsdörfer F, Hager T, Röck K, Engel D, Fischer J, Clemens Aigner C, Jendrossek V, Klein D.
  Inhibition of radiation-induced Ccl2 signaling protects lungs from vascular dysfunction and endothelial cell loss.
  Antioxid Redox Signal. 2019 Jan 10;30(2):213-231.

  Auszeichnung*:* Paper-of-the-Year 2018 (Bereich Biologie) der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e. V.

- Klein D, Steens J, **Wiesemann A**, Schulz FC, Kaschani F, Roeck K, Yamaguchi M, Wirsdörfer F, Kaiser M, Fischer J, Stuschke M, Jendrossek V.
  Mesenchymal stem cell therapy protects lungs from radiation-induced endothelial cell loss by restoring superoxide dismutase 1 expression.
  Antioxid Redox Signal. 2017;26(11):563-582.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 9

1.1 KREBSINZIDENZ UND -MORTALITÄT 9

1.2 DIE STRAHLENTHERAPIE BEI KREBSERKRANKUNGEN 10

1.2.1 Biologische Wirkung der Strahlentherapie 10

1.2.2 Strahlentherapie bei thorakalen Tumoren 11

1.3 STRAHLENINDUZIERTE SCHÄDEN DES NORMALGEWEBES 12

1.3.1 Strahlenfolgen des Lungengewebes 12

1.3.2 Therapeutische Strategien zum Schutz strahleninduzierter Normalgewebsschäden 13

1.3.3 Die Pathogenese der Strahlenschäden 14

1.3.3.1 Strahleninduzierte Schäden des Gefäßsystems: Die Bedeutung der Endothelzellen 14

1.3.3.2 Strahleninduzierte Veränderungen des Mikromilieus: Die Bedeutung zytokingesteuerter Signalwege 15

1.4 GRUNDLAGEN DIESER DOKTORARBEIT 16

1.4.1 Strahleninduzierte Gefäßschäden der Lunge 16

1.4.2 Das Chemokin C-C Motivligand 2 (Ccl2) 17

2 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN 19

3 MATERIAL UND METHODEN 21

3.1 MATERIAL 21

3.1.1 Zelllinien und Mausstämme 21

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien 21
3.1.3 Medien, Puffer und Lösungen 22
3.1.4 Wirkstoffe, Kits und Antikörper 23
3.1.5 Arbeitsgeräte und Software 23
3.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN 24
3.2.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen 24
3.2.2 Konservierung und Reaktivierung von Zellen 24
3.2.3 Zellzahlbestimmung 25
3.2.4 Behandlung von Zellen 26
3.2.4.1 Bestrahlung mit Röntgenstrahlen 26
3.2.4.2 Behandlung mit Ccl2 und VEGF 26
3.2.5 Koloniebildungsassay 27
3.2.6 Durchflusszytometrie 29
3.2.6.1 Nicoletti-Färbung 30
3.3 TIEREXPERIMENTELLE METHODEN 31
3.3.1 Tierhaltung 31
3.3.2 Aufbau des kombinierten Mausmodells 31
3.3.2.1 Durchführung der Thoraxbestrahlung 31
3.3.2.2 Inhibition des Ccl2-Signalwegs 32
3.3.2.2.1 Pharmakologische Inhibition des Ccl2-Signalwegs 32
3.3.2.2.2 Genetische Inhibition des Ccl2-Signalwegs 33
3.3.3 Tiertötung 33
3.3.4 Histologische Untersuchungen 34
3.3.4.1 Paraffineinbettung und Schnittpräparation 34
3.3.4.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung 34
3.3.4.3 Elektronenmikroskopie 34

3.3.4.4 Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase-Aktivität 35

3.3.5 Extravasation der Tumorzellen 35

3.3.6 Evans-Blue-Dye-Assay 36

3.3.7 Durchflusszytometrie 37

3.3.7.1 Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen und Endothelzellen im Lungengewebe 37

3.3.8 Molekularbiologische Methoden 38

3.3.8.1 RNA-Isolation 38

3.3.8.2 Reverse Transkription (Synthese der cDNA) 39

3.3.8.3 Primer-Design 39

3.3.8.4 Quantitative Real Time PCR 39

3.3.9 Protein-Isolation 41

3.3.10 Statistische Auswertung 41

4 ERGEBNISSE 42

4.1 PHARMAKOLOGISCHE INHIBITION DES CCL2-SIGNALWEGS IM *IN VIVO* MAUSMODELL 42

4.1.1 Überprüfung der Wirksamkeit von Bindarit als Ccl2-Inhibitor 43

4.1.2 Effekte der pharmakologischen Ccl2-Inhibition auf strahleninduzierte Schäden des Lungengewebes 44

4.1.2.1 Auswirkungen der Ccl2-Inhibition auf die mikrovaskuläre Funktion 44

4.1.2.1.1 Einfluss auf die vaskuläre Permeabilität 44

4.1.2.1.2 Einfluss auf die Extravasation und Ansiedlung zirkulierender Tumorzellen 46

4.1.2.1.3 Einfluss auf verschiedene pulmonale Zellen 48

4.1.2.1.4 Einfluss auf die mikrovaskuläre Struktur und Morphologie 49

4.1.2.2 Das Potenzial der pharmakologischen Ccl2-Inhibition 49

4.1.3 Auswirkungen der Ccl2-Inhibition auf Seneszenz-assoziierte Merkmale 50

4.2 GENETISCHE INHIBITION DES CCL2-CCR2 SIGNALWEGS DURCH CCR2-KNOCKOUT (CCR2- DEFIZIENTE MÄUSE) 52

4.2.1 Einfluss auf die vaskuläre Funktion und die strukturellen Charakteristika des Gefäßsystems im Lungengewebe 52

4.2.2 Einfluss auf die Ansiedlung zirkulierender Tumorzellen und Immunzellen ins Lungengewebe 54

4.3 DAS POTENZIAL DER CCL2-CCR2-SIGNALWEGBLOCKIERUNG ALS SCHÜTZENDE MASSNAHME VOR STRAHLENINDUZIERTER GEFÄßFEHLFUNKTION 55

4.4 AUSWIRKUNGEN EXOGENER CCL2- STIMULATION AUF DIE ENDOTHELZELLEN 55

4.4.1 Der Einfluss von Ccl2 auf das Zellüberleben und die proliferative Aktivität 56

4.4.2 Der Einfluss von Ccl2 auf den Apoptosegrad endothelialer Zellen 58

4.4.3 Der Einfluss von Ccl2 auf das Langzeitüberleben klonogener Endothelzellen 59

4.4.4 Der Einfluss von Ccl2 auf den Phänotyp endothelialer Zellen 60

4.4.5 Das Potenzial exogener Ccl2-Stimulation 60

5 DISKUSSION 61

5.1 Der Einfluss von Bindarit auf die Ccl2-Expression und die Seneszenz-Aktivität im bestrahlten Lungengewebe 61

5.2 Der Ccl2-CCR2-Signalweg und die vaskuläre Dysfunktion des bestrahlten Lungengewebes 63

5.3 Der Ccl2-CCR2-Signalweg und akute Strahlenfolgen des bestrahlten Lungengewebes – Extravasation zirkulierender Tumor- und Immunzellen 64

5.4 Der Einfluss des Ccl2-CCR2-Signalwegs auf das Endothelzellkompartiment des bestrahlten Lungengewebes 65

5.5 Modellschema zur Darstellung des therapeutischen Potenzials der Ccl2-CCR2-Signalhemmung. 66

6 ZUSAMMENFASSUNG 68

7 LITERATURVERZEICHNIS 69

8 ANHANG 85

8.1 Supplementäre Daten 85

8.2 Abkürzungsverzeichnis 87

8.3 Abbildungsverzeichnis 88

8.4 Tabellenverzeichnis 89

9 DANKSAGUNG 90

10 LEBENSLAUF 91

1 EINLEITUNG

1.1 KREBSINZIDENZ UND -MORTALITÄT

Die Krebsinzidenz erreichte im Jahr 2015 weltweit 17,5 Millionen Fälle, wovon rund die Hälfte der Erkrankten (8,7 Millionen) verstarb (Fitzmaurice et al., 2017). In Deutschland erkranken jährlich etwa 476.000 Menschen neu an Krebs. Zwischen 2004 und 2014 hat die absolute Zahl der Krebsneuerkrankungen bei Männern um 9 % und bei Frauen um 6 % zugenommen (Robert Koch-Institut, 2017). Nach den Herzkreislauferkrankungen stellen Krebserkrankungen die zweithäufigste (37 % / 24,4 %) Todesursache in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt, 2019). Mit einem Anteil von 23,5 % sterben männliche Krebserkrankte am häufigsten an einem Lungenkarzinom. Bei den an Krebs erkrankten Frauen führt das Mammakarzinom am häufigsten und der Lungenkrebs am zweithäufigsten zum Tod [(Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2019)].

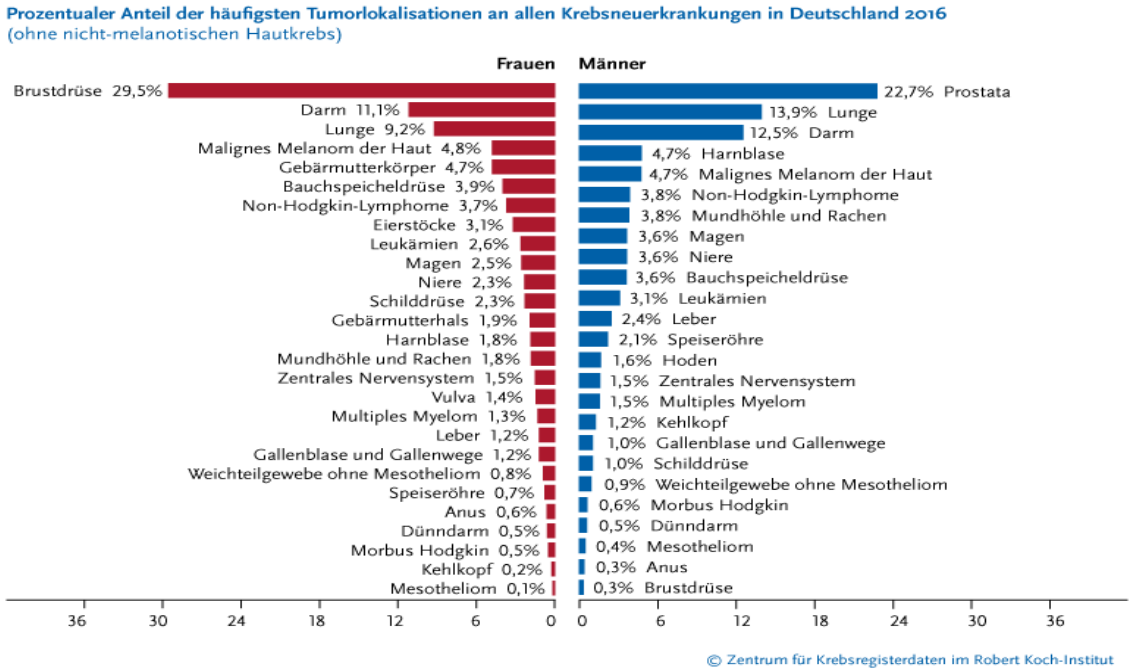

Abb. 1 Die häufigsten Tumorlokalisationen aller Krebserkrankungen in Deutschland im Jahr 2016. Dargestellt sind die häufigsten Tumorlokalisationen (ohne melanotischen Hautkrebs) aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2016. Männer erkrankten im Jahr 2016 am häufigsten an Prostata-, Lungen- und Darmkrebs. Bei den Frauen stellte die Brustdrüse, gefolgt von dem Darm und der Lunge die häufigste Tumorlokalisation dar. Angaben in Prozent. Entnommen aus (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2019)].

1.2 DIE STRAHLENTHERAPIE BEI KREBSERKRANKUNGEN

Die Strahlentherapie nimmt eine zentrale Stellung zwischen der operativ-chirurgischen und systemisch-medikamentösen Behandlung von Krebspatienten ein (Wannenmacher et al., 2006). Nachdem Wilhelm Conrad Röntgen 1895 die Röntgenstrahlung entdeckte, galt der Österreicher Leopold Freund im Jahr 1897 als Begründer der therapeutischen Anwendung von Röntgenstrahlen (Sedlmayer, 2012). In der heutigen Krebsbehandlung werden durch eine alleinige oder kombinierte Strahlentherapie (Radiotherapie [RT]) etwa die Hälfte der kurativ behandelten Patienten geheilt. Zusätzlich wird mittels der RT eine Symptomlinderung und eine Verbesserung der Lebensqualität bei zwei Drittel der palliativen Patienten erreicht. Dabei ist hervorzuheben, dass die Strahlentherapie insbesondere bei den häufig vorkommenden Tumorlokalisationen Anwendung findet (Bentzen, 2006; Wannenmacher et al., 2006).

1.2.1 BIOLOGISCHE WIRKUNG DER STRAHLENTHERAPIE

Die RT beschreibt die Applikation ionisierender Strahlung auf menschliches Gewebe. Ihre hohe Effektivität gegen Tumorzellen basiert auf DNA-schädigende Reaktionen mit konsekutivem Zelluntergang. Insbesondere DNA-Doppelstrangbrüche als Form der direkten Strahlenreaktion wurden als Hauptmechanismus der Tumorzellzerstörung identifiziert (Mladenov et al., 2013). Die Bildung hochreaktiver, freier Radikale führt darüber hinaus zu indirekten DNA-Schäden (Dizdaroglu and Jaruga, 2012). Ferner werden Proteinmodifikationen und Veränderungen der Membranen und Enzyme ausgelöst, die weitere Zellschäden anrichten und zum Absterben der Zelle führen können (Citrin and Mitchell, 2017).

Allgemein ist die Toleranz gegen Strahlenschäden bei gesunden Zellen höher als bei Tumorzellen, da sie einen niedrigeren Proliferationsindex und eine größere Reparatur- und Regenerationskapazität besitzen (Wannenmacher et al., 2006). Jedoch können Tumore durch Mutationen, Hypoxie und veränderte Apoptose-Signalwege eine gesteigerte intrinsische Strahlenresistenz entwickeln, die hohe Strahlendosen erfordern und somit die therapeutische Breite verringern (Liauw et al., 2013). Sobald die Strahlendosis die Strahlenschwelle überschreitet, kann die Strahlenschädigung über die intrinsische Reparaturkapazität des menschlichen Körpers hinausgehen und Schäden am gesunden Normalgewebe verursachen (Xu et al., 2018).

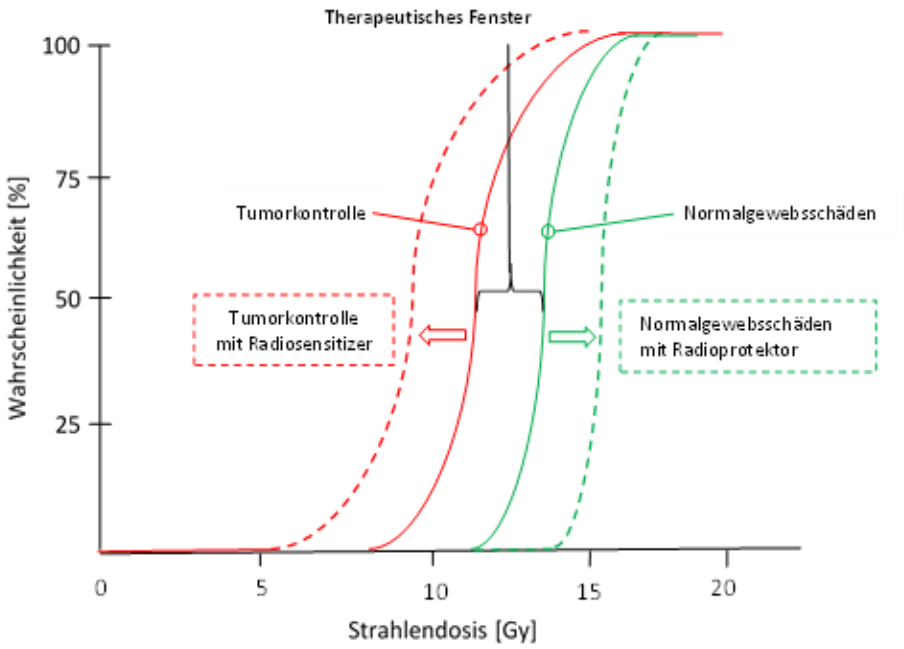

Abb. 2 Das therapeutische Fenster der Strahlentherapie.
Das therapeutische Fenster der Strahlentherapie wird durch die Differenz zwischen der Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Strahlendosis, die bestrahlten Tumorzellen abzutöten, und der Wahrscheinlichkeit, das Normalgewebe innerhalb des Bestrahlungsfeldes zu schädigen, definiert. Je breiter das therapeutische Fenster ist, desto effektiver kann die RT zur Tumorkontrolle führen, ohne Normalgewebsschäden hervorzurufen. Die Sensibilisierung von Tumorzellen durch Radiosensitizer und der Schutz des Normalgewebes durch Radioprotektoren kann helfen, das Therapiefenster zu erweitern. In Anlehnung an (Liauw et al., 2013).

1.2.2 STRAHLENTHERAPIE BEI THORAKALEN TUMOREN

Die Strahlentherapie hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer der wichtigsten Behandlungsmethoden thorakaler Tumore entwickelt (Zhang et al., 2012). Thoraxbestrahlungen werden bei Lungen- und Brustkrebs aber auch bei Vorliegen von Mediastinaltumoren standardmäßig durchgeführt. Durch ihre ausgedehnte Lage im Thorax ist die Lunge daher nicht nur bei Lungenkrebs, sondern auch bei der Behandlung extrapulmonaler Tumore strahlenexponiert (Benveniste et al., 2013). Die Lunge stellt jedoch ein sehr strahlenempfindliches Gewebe dar. Obwohl die einzelnen hier vorhandenen Zelltypen als relativ strahlungsresistent eingestuft werden können, hat das Organ als Ganzes eher wenig regenerative Kapazität, sodass es gegenüber höheren Strahlendosen intolerant ist (Coggle et al., 1986; Ghafoori et al., 2008). Auch wenn fortschrittlichere Bestrahlungstechniken lokalere Dosisabgaben ermöglichen, ist das Auftreten von strahleninduzierten Lungenschäden nach wie vor unvermeidlich und limitiert die Dosiseskalation und die Tumorkontrolle der thorakalen RT (Han et al., 2015; Huang et al., 2017).

1.3 STRAHLENINDUZIERTE SCHÄDEN DES NORMALGEWEBES

Allgemein werden Strahlenschäden in eine akute und in eine chronische Form eingeteilt. Akute Strahlenschäden manifestieren sich bereits während oder kurz nach der Bestrahlung, wohingegen chronische Strahlenschäden erst Monate oder Jahre nach der Behandlung in Erscheinung treten. Sie entstehen durch unzureichende Reparaturmechanismen und/oder durch ungenügenden und fehlerhaften Zellersatz des beschädigten oder zerstörten (vorwiegend strahlenempfindlichen) Gewebes (Stöver, 2018).

1.3.1 STRAHLENFOLGEN DES LUNGENGEWEBES

Strahlenschäden des Lungenparenchyms werden als radiogene Pneumopathie oder radiation induced lung injury (RILI) bezeichnet. Die radiogene Pneumopathie wird in die akute Strahlenpneumonie (radiation pneumonitis [RP]) und die chronische Lungenfibrose (radiation-induced lung fibrosis [RILF]) unterteilt. Das Ausmaß des Lungenschadens hängt zum einen von der Dosis und dem Volumen des Bestrahlungsfeldes und zum anderen von patientenbezogenen Faktoren wie Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand ab (Robnett et al., 2000).

Die Strahlenpneumonie entwickelt sich mit einer Latenzzeit von 4-12 Wochen nach einer Thoraxbestrahlung und tritt bei 5-20 % der Patienten mit Lungen- oder Brustkrebs im bestrahlten und nicht bestrahlten Lungenbereich auf (Provatopoulou et al., 2008; Graves et al., 2010). Sie ist durch frühzeitige Schäden der Epithel- und Endothelzellen des pulmonalen Systems charakterisiert, sodass die Alveolarmembran beeinträchtigt und die Kapillardurchlässigkeit erhöht wird. Es resultiert ein interstitielles Ödem und eine gestörte Exsudation, die den Gasaustausch beeinträchtigen. (Zhang et al., 2012). Klinisch können sich unspezifische Symptome wie Fieber, Brustschmerzen, trockener Husten, Dyspnoe und allgemeine Schwäche zeigen. In schweren Fällen kann ein akutes respiratorisches Syndrom (ARDS) und eine Beteiligung des Herzens (Cor pulmonale) auftreten (Tsoutsou and Koukourakis, 2006; Giridhar et al., 2015).

Die Strahlenfibrose tritt normalerweise frühestens 6 Monate nach der Bestrahlung auf und ist durch einen progressiven, irreversiblen Verlauf gekennzeichnet. Sie lässt sich als Umwandlung des gesunden Gewebes in bindegewebiges Narbengewebe beschreiben, was zu einem zunehmenden Volumenverlust und zu pulmonalen Funktionseinschränkungen führt. Sie ist durch die Ansammlung von Kollagen und Fibronektin charakterisiert, deren Ausschüttung unter anderem mit Wechselwirkungen zwischen dem Zytokin TGFβ1 und

Fibroblasten in Verbindung gebracht wird (Kong et al., 2005; Tsoutsou and Koukourakis, 2006). Die Infiltration von Immunzellen und die Aufrechterhaltung einer chronisch, inflammatorischen Gewebereaktion durch pro-inflammatorische Zytokine scheint ein weiterer Einflussfaktor der Fibrose zu sein (Wynn and Ramalingam, 2012; Xu et al., 2018). Bei geringer Ausdehnung können die Patienten asymptomatisch sein. Mit fortschreitendem Ausmaß zeigt sich jedoch eine vermehrte Atemnot und eine Abnahme der körperlichen Belastbarkeit (Tsoutsou and Koukourakis, 2006).

Diese Folgeschäden beeinträchtigen nicht nur die Lebensqualität der Patienten, sondern können auch zu einem lebensbedrohlichen Zustand führen. Bis heute fehlen jedoch kausale Behandlungsmethoden, sodass die Prognose der Strahlenerkrankungen weiterhin schlecht ist (Zhang et al., 2012; Han et al., 2015; Xu et al., 2018). Folglich ist die Entwicklung physikalischer und biologischer Strategien, welche die Strahlensensibilität des Tumors erhöhen und/oder die Toxizität des Normalgewebes reduzieren können, um strahleninduzierte Schäden des Normalgewebes zu vermeiden und gleichzeitig eine ausreichende Tumorkontrolle zu erzielen, unabdingbar (siehe Abb.2).

1.3.2 THERAPEUTISCHE STRATEGIEN ZUM SCHUTZ STRAHLENINDUZIERTER NORMALGEWEBSSCHÄDEN

Bis heute existieren keine kausalen Therapien, die Strahlenschäden im Lungengewebe effektiv behandeln oder vielmehr noch rückgängig machen können. Im Rahmen der Behandlung von RILI gehört trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet pharmakologischer Behandlungsstrategien weiterhin lediglich die symptomatische Therapie mit Glukokortikoiden und wenigen anderen Immunsuppressiva zum Standardschema der Behandlung. Kausale Therapieansätze, welche versuchten, die Strahlenschäden am Normalgewebe zu beheben, beziehungsweise rückgängig zu machen, haben bisher noch keine ausreichend beabsichtigte Wirkung erzielen können (Gross et al., 1988; Ghafoori et al., 2008). Daher liegt der Forschungsschwerpunkt zunehmend in der Suche nach protektiven Behandlungsansätzen (Kim et al., 2014). Physikalisch-technische Veränderungen haben bereits zu geringeren Strahlendosen und zu einer präziseren Strahlenapplikation führen können, sodass die Strahlenexposition und somit das Risiko für strahleninduzierte Normalgewebsschäden reduziert werden konnte. Dennoch wird die Bestrahlung gesunden Gewebes mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in Zukunft nicht in Gänze vermeidbar sein, sodass ein zunehmendes Interesse an der Entwicklung

prophylaktischer Behandlungsmöglichkeiten besteht. Hierzu müssen die initialen molekularen Mechanismen, welche der Entwicklung der radiogenen Pneumopathie zugrunde liegen, verstanden und Strategien entwickelt werden, welche diese Prozesse unterbinden können.

1.3.3 DIE PATHOGENESE DER STRAHLENSCHÄDEN

Nach aktuellem Wissensstand gehen Forscher im Allgemeinen davon aus, dass die RT das homöostatische Netzwerk stört und so komplexe Strahlenreaktionen des Normalgewebes auslöst, welche zahlreiche Wechselwirkungen zwischen residenten Stammzellen, wie Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen, infiltrierenden Immunzellen, sowie extrazellulären Matrixmolekülen und regulatorischen Proteinen innerhalb der Gewebe bewirkt (Rübe et al., 2005; Brush et al., 2007; Almeida et al., 2013).

1.3.3.1 STRAHLENINDUZIERTE SCHÄDEN DES GEFÄßSYSTEMS: DIE BEDEUTUNG DER ENDOTHELZELLEN

In Studien an Tiermodellen und Patientenproben hat sich hierunter insbesondere das mikrovaskuläre Endothelkompartiment als kritische Determinante der Strahlentoxizität in gesunden Geweben herausgestellt (Baker and Krochak, 1989; Rannou et al., 2015). So ist schon länger bekannt, dass Gefäßverletzungen die häufigste Folge von Bestrahlungen des Normalgewebes darstellen (Rodemann and Blaese, 2007). Dabei unterscheidet sich die Strahlensensitivität kleiner und großer Gefäße. Während größere Blutgefäße weniger betroffen zu sein scheinen, bildet das mikrovaskuläre Netzwerk den empfindlichsten Bestandteil des Gefäßsystems ab (Fajardo, 2005).

In der frühen Phase nach der Bestrahlung wiesen Forscher bereits 1999 defekte Zellkontakte und eine gestörte Endothelbarriere nach (Onoda et al., 1999). Darüber hinaus sind apoptotische Zellvorgänge und das Auftreten eines dysfunktionalen vaskulären Phänotyps, welcher durch eine übermäßige Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, eine gesteigerte Rekrutierung von Blutzellen und Thrombozyten, sowie eine Aktivierung des Gerinnungssystems und eine erhöhte vaskuläre Permeabilität gekennzeichnet ist, aus der Literatur zu entnehmen (Paris et al., 2001; Milliat et al., 2008; Korpela and Liu, 2014).

Als späte Strahlenreaktionen wurden unter anderem eine Verdickung der Basalmembran, die Persistenz eines aktivierten, gerinnungsfördernden Endothelphänotyps mit seneszenten Eigenschaften und letztlich der Zerfall des mikrovaskulären Systems beschrieben, welche

eine hypoxische und pro-inflammatorische Umgebung begünstigen (Corre et al., 2013; Korpela and Liu, 2014; Jaillet et al., 2017). Insgesamt treten diese Veränderungen besonders in Geweben mit hoher intrinsischer Empfindlichkeit, insbesondere in der Lunge, auf und sind an der Entwicklung von strahleninduzierten Schäden beteiligt (Korpela and Liu, 2014).

1.3.3.2 STRAHLENINDUZIERTE VERÄNDERUNGEN DES MIKROMILIEUS: DIE BEDEUTUNG ZYTOKINGESTEUERTER SIGNALWEGE

In präklinischen Modellen konnten zytokingesteuerte Signalwege als weiterer bedeutsamer Faktor in der Entstehung strahleninduzierter Normalgewebsschäden herausgestellt werden. Auch klinische Untersuchungen geben immer mehr Hinweise auf ihre Relevanz für strahleninduzierte Krankheiten beim Menschen (Brush et al., 2007; Kim et al., 2014). Demnach führt die Strahlenexposition zur Sezernierung von Zytokinen in bestrahlten Geweben, sodass Zytokinkaskaden ausgelöst, interzelluläre Signale übermittelt und weitere Mediatoren freigesetzt werden. Diesbezüglich wird angenommen, dass die Exposition ionisierender Strahlung Zytokin-Signalwege auslöst, die zelluläre Strahlenschäden unterstützen, Regenerationsvorgänge beeinträchtigen und Entzündungsreaktionen über lange Zeiträume aufrechterhalten und verstärken (Kim et al., 2014; Citrin and Mitchell, 2017). In der Folge können Entzündungsreaktionen und im Weiteren auch gewebezerstörender Prozesse potenziell gefördert werden.

Untersuchungen zu Strahlenreaktionen des normalen Lungengewebes haben hier bereits gezeigt, dass die Zytokine Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor (TNF)-α und Transforming Growth Factor (TGF)-β entscheidende Mediatoren der Strahlenantwort darstellen, die bei der Regulation der Gewebehomöostase, der adaptiven Immun- und Entzündungsreaktionen sowie an Regenerationsvorgängen beteiligt sind (Kim et al., 2009; Lierova et al., 2018).

1.4 GRUNDLAGEN DIESER DOKTORARBEIT

1.4.1 STRAHLENINDUZIERTE GEFÄßSCHÄDEN DER LUNGE

Zusammenhänge zwischen mikrovaskulären Veränderungen und der Entstehung strahleninduzierter Lungenschäden wurden bereits von uns und anderen Forschungsgruppen beschrieben (Cappuccini et al., 2011; Korpela and Liu, 2014; Klein et al., 2016; Huang et al., 2017).

Anhand eines Mausmodells der strahleninduzierten Pneumopathie demonstrierten bereits publizierte Arbeiten, dass Endothelzellschäden (Schäden der Basalmembran, des Zytoplasma, der Zellverbindungen) und vaskuläre Dysfunktionen des normalen Lungengewebes in der frühen Phase nach Bestrahlung auftreten und die Extravasation von prämetastatischen Immunzellen und von zirkulierenden Tumorzellen in zuvor bestrahlte Lungen begünstigen (Klein et al., 2016). Neben diesen pro-invasiven zellulären Aktivitäten deckten weitere Versuche eine strahleninduzierte Seneszenz der bronchioalveolären Epithelzellen auf, welche mit einer Hochregulation von verschiedenen Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp- (SASP) Faktoren einherging (Klein et al., 2016). Langzeitversuche zeigten zum Teil einen erhöhten Verlust endothelialer Zellen und verifizierten die Ausprägung einer Fibrose als Spätfolge der Lungenbestrahlung (Wirsdörfer et al., 2016; Wirsdörfer and Jendrossek, 2016; Klein et al., 2017).

Nachdem durch einige wissenschaftliche Arbeiten gezeigt wurde, dass eine Therapie mit mesenchymalen Stammzellen als vielversprechende Option zur Vorbeugung oder Behandlung strahleninduzierter Normalgewebsschäden gilt, da sie das Überleben und die Reparatur beschädigter Zellen fördern kann, wurde sie zunehmend bei der Etablierung möglicher Behandlungsstrategien für strahleninduzierte Lungenerkrankungen berücksichtigt (Mouiseddine et al., 2007; Goradel et al., 2018; Xu et al., 2018).

Demnach befassten sich Folgeversuche der AG Jendrossek und NG Klein mit der Frage, ob eine therapeutische Anwendung bestimmter mesenchymaler Stammzellen auch geeignet sein könnte, um die Reparatur strahleninduzierter Schäden residenter Lungenzellen, insbesondere mit Hinblick auf die zuvor gezeigten mikrovaskulären Lungenschäden, zu fördern beziehungsweise die Schäden zu verhindern. Folglich wurde gezeigt, dass der adoptive Transfer von mesenchymalen Stammzellen, die zu den adulten und multipotenten Zellen zählen (Zanoni et al., 2019), während der frühen Phase nach der Bestrahlung sowohl dem Auftreten einer vaskulären Dysfunktion als auch der Entwicklung

endothelmorphologischer Veränderungen effektiv entgegenwirkte (Klein et al., 2016). Ferner hatte der adoptive Transfer von MSCs in der frühen Phase nach der Bestrahlung das Potenzial, einen langfristigen Schutz der pulmonalen EC vor strahleninduzierte Schäden zu bieten und einen Verlust der EC als Langzeitkomplikation zu verhindern (Klein et al., 2017). Bei einem Vergleich des therapeutischen Potenzials von MSCs, die klassischerweise aus dem Knochenmark oder auch aus adulten Blutgefäßen isoliert wurden, ging ein besonders großes Potenzial von den Gefäß-residenten MSCs für die Radioprotektion von vaskulären Strukturen aus, was darauf zurückgeführt wird, dass gewebespezifische Stammzellen überwiegend den Gewebetyp unterstützen, von dem sie stammen (Ergün et al., 2011; Klein, 2016).

Interessanterweise konnte zusätzlich gezeigt werden, dass diese protektiven Effekte nicht nur mit einer reduzierten Seneszenzaktivität des Lungenepithels einhergingen, sondern innerhalb der hochregulierten SASP-Faktoren, insbesondere die Expression des SASP-Faktors Ccl2 normalisiert wurde, welcher bemerkenswerterweise unter anderem für seine angiogene Wirkung bekannt ist (Klein et al., 2016).

1.4.2 DAS CHEMOKIN C-C MOTIVLIGAND 2 (CCL2)

Ccl2 gehört in die Gruppe der chemotaktischen Zytokine (Chemokine). Es ist eines der am frühesten entdeckten und am umfassendsten untersuchten Chemokine (Deshmane et al., 2009). Im Jahr 1989 wurde es zunächst unter dem Eigennamen Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1) in konditionierten Medien humaner myelomonozytärer Tumorzelllinien identifiziert (Matsushima et al., 1989). Im gleichen Jahr gelang es Yoshimura et al. mithilfe von Gliomzellen und stimulierten mononuklearen Leukozyten, dieses Protein zu sequenzieren und zu klonieren (Yoshimura et al., 1989b; Yoshimura et al., 1989a). Es besteht aus 76 Aminosäuren und vier Cysteinresten, von denen sich jeweils zwei am Anfang und zwei am Ende des Peptids befinden. Die Bezeichnung C-C Motivligand 2 basiert auf der neuen Nomenklatur für Chemokine, bei der die Abkürzung C-C die Unterfamilie kennzeichnet, bei welcher die N-terminalen Cystein-Aminosäuren aufeinander folgen. Die Nummerierung basiert auf dem Nummerierungssystem der codierenden Gene (Murphy et al., 2000; Zlotnik and Yoshie, 2000). Das kodierende Gen für humanes Ccl2 befindet sich auf Chromosom 17 (chr.17, q11.2) (Naruse et al., 1996).

Manche Chemokine, so auch das Ccl2, spielen eine funktionelle Komponente in der Angiogenese und Angiostase, da sie angiogen wirksam sind, das heißt die Gefäßneubildung

stimulieren und Endothelzellen aktivieren können (Weber et al., 1999; Mehrad et al., 2007; Nattermann, 2008). Weiterhin wurde Ccl2 bereits als bekannter SASP-Faktor beschrieben (Coppé et al., 2010), der eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten/Makrophagen ausübt (Rollins, 1996; Ajuebor et al., 1998). Ccl2 reguliert auch die Chemotaxis von T-Lymphozyten (Carr et al., 1994) und natürlichen Killerzellen (Allavena et al., 1994) und induziert bei einigen Leukozyten die Ausschüttung potenter Mediatoren (Alam et al., 1992). Damit besitzt dieses Chemokin neben der bekannten angiogenen Wirkungen auf die Gefäße bereits eine bedeutende Rolle im Rahmen der Immunantwort.

Ccl2 kann von vielen verschiedenen Zelltypen produziert werden und erzielt seine Wirkung hauptsächlich über die Bindung an den C-C Chemokin Rezeptor Typ 2 (CCR2) (Deshmane et al., 2009). Neben Monozyten/Makrophagen als Hauptquelle konnten unter anderem Epithel- und Endothelzellen, aber auch gewebespezifische Zellen wie Astrozyten, Mikroglia oder Mesangiumzellen als Ccl2-bildende Zellen nachgewiesen werden (Cushing et al., 1990; Sica et al., 1990; Standiford et al., 1991; Barna et al., 1994). Trotz der grundlegenden Bedeutung für das Abwehrsystem des Körpers ist Ccl2 mit einer außergewöhnlichen Anzahl an ätiologisch unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert. Hierzu zählen unter anderem Autoimmunerkrankungen (Rantapää-Dahlqvist et al., 2007), Krebserkrankungen (Fridlender et al., 2011; Lim et al., 2016), Lungenerkrankungen (Ip et al., 2006) und Gefäßerkrankungen (Boring et al., 1998; Namiki et al., 2002) sowie infektiologische Erkrankungen wie zum Beispiel HIV (Weiss et al., 1997).

2 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN

Ein ungelöstes Problem in der modernen Radiotherapie stellt immer noch die strahleninduzierte Normalgewebstoxizität dar, welche nicht nur die Lebensqualität der Patienten während der Behandlung beeinträchtigt und im Verlauf zu akuten und chronischen Strahlenfolgen führen kann, sondern auch die Applikation kurativer Strahlendosen limitiert und somit die Therapie und Heilung erschwert.

Es ist demnach von großer Bedeutung, zugrundeliegende Pathomechanismen der strahleninduzierten Normalgewebsschäden aufzudecken, um die Voraussetzung zu schaffen, potenzielle *Targets* zu identifizieren, mit denen neue therapeutische Strategien entwickelt werden können, die das Normalgewebe während der Bestrahlung schützen, ohne eine tumor-fördernde –aber im Idealfall eine gleichzeitig radiosensitivierende Wirkung- besitzen.

Ein zentraler Forschungsaspekt der Arbeitsgruppe (AG Jendrossek und NG Klein) ist es, die molekularen Mechanismen der strahleninduzierten Schäden im Bereich des gesunden Lungengewebes zu erforschen, um die Entwicklung potenziell schützender Strategien gegen die Entstehung der radiogenen Pneumopathie zu fördern bzw. das Ausmaß zu limitieren. Der Fokus der NG Klein liegt hierbei vor allem auf den strahleninduzierten Schäden des vaskulär-endothelialen Systems, dessen Funktion beziehungsweise Dysfunktion (infolge der Bestrahlung) entscheidend für die Entwicklung und Progression der RILI ist. Hierbei konnte gezeigt werden, dass

→ der adoptive Transfer von MSCs in der akuten Phase nach der Bestrahlung das Lungengewebe vor strahleninduzierten Schäden, insbesondere am Gefäßsystem (vaskuläre Dysfunktion) schützt, wodurch die Gefäßmorphologie und -funktion normalisiert werden. Dadurch wurde die Gefäßpermeabilität reduziert und folglich auch die Immunzellinfiltration, sowie die Extravasation und die Ansiedlung zirkulierender Tumorzellen in das zuvor bestrahlte Lungengewebe limitiert.

→ die genannten protektiven Effekte der MSC-Therapie mit einer Reduzierung der Seneszenz im Bronchialepithel assoziiert sind und zu einer Normalisierung der SASP-Level, insbesondere zu reduzierten Ccl2-Expressionlevel im Lungengewebe, führen.

→ Der adoptive Transfer von MSCs unmittelbar nach erfolgter Thorax-Bestrahlung auch mit einer Reduzierung der Langzeitkomplikationen in den Lungen einhergeht, namentlich einer Reduzierung der Fibrose sowie dem limitierten Verlust der Endothelzellen

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation spekuliert, dass Ccl2 eine zentrale Rolle in der Entstehung strahlentoxischer Normalgewebsschäden, insbesondere am vaskulären System und ihrer Spätfolgen im Lungengewebe, einnimmt.
Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war hierbei, ob eine Hemmung des Ccl2-Signalwegs die schützende Wirkung der MSC-Therapie vor strahleninduzierten Schäden des Normalgewebes und ihrer Spätfolgen nachahmen kann. Das therapeutische Potenzial einer Ccl2-Inhibition auf vaskulär-endotheliale Schäden in der Frühphase nach Bestrahlung mit Hinblick auf akute Strahlenfolgen bildeten hierbei den Schwerpunkt der Arbeit.
Folgende spezifische Fragestellungen galt es hierbei gezielt zu adressieren:

A. Schützt eine Inhibition des Ccl2-Signalwegs vor strahleninduzierter vaskulärer Dysfunktion?
B. Limitiert die normalisierte Gefäßfunktion infolge der Ccl2-Inhibition die Immunzellinfiltration sowie die Extravasation von zirkulierenden Tumorzellen?
C. Welchen Einfluss hat eine Inhibition des Ccl2-Signalwegs auf die Ccl2-Expression als SASP-Faktor und somit auf die strahlungsinduzierte Seneszenz des Bronchialepithels?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 ZELLLINIEN UND MAUSSTÄMME

Tab. 1 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Spezies und Gewebeart	Herkunft
B16F10	Murine Melanomzellen	American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA
AS-M5	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen	Abgeleitete Zelllinie eines kutanen Angiosarkoms (Krump-Konvalinkova et al., 2003)

Tab. 2 Verwendete Mausstämme

Mausstämme	Herkunft
C57BL/6	The Jacksons Laboratory Hauseigene Tierzüchtung
CCR2 defiziente Mäuse ($CCR2^{-/-}$) Hintergrund: C57BL/6) (B6.129S4-Ccr2tm1Ifc/J)	The Jacksons Laboratory Hauseigene Tierzüchtung

3.1.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Tab. 3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie, Reagenz	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Calbiochem
Collagenase D aus Clostridium histolyticum	Roche
Coomassie Brilliant Blue	Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Eosin G (1% in A. dest)	Roth
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Ethanol 99,8%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Evans Blue Dye	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Roth
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth
Hämatoxylinlösung A , B nach Weigert	Roth
Kaliumhexacyanoferrat (II)/ Kaliumhexacyanoferrat (III)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (Nacl)	Merck
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
Roti®-Histokitt II Einschlussmittel	Roth
SYBR®Green Fluoreszenzfarbstoff	Applied Biosystems
SYBR®Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich

X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, B4252)	Sigma-Aldrich
Xylol	Applichem
Zitronensäure-Monohydrat	Merck

3.1.3 MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

Tab. 4 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Medium, Puffer, Lösung	Hersteller
BD FACS Flow™	BD Biosciences
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco® (Thermo Fisher Scientific)
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell®
FACS Reinigungs- und Dekontaminationslösungen	BD Biosciences
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin 100x	Biochrom
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Gibco® (Thermo Fisher Scientific)
Trypsin/0,05% EDTA	Gibco® (Thermo Fisher Scientific)

Tab. 5 Hergestellte Lösungen und Puffer

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Ammoniumchlorid-Kalium- Lysepuffer pH 7,2 - 7,4 bei 4°C	4,15 g NH4Cl 0,5 g KHCO3 100 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 Auf 500 mL A. dest.
Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung (0,05%)	0,05 % Coomassie Blue 20 % Methanol 7,5 % Essigsäure
5xLämmlipuffer (Tris-Glycin-Puffer)	125mM TRIS-HCl, pH 6,7 20% Glycerin 6% SDS 0,1% Bromphenolblau A.dest
Nicoletti-PI-Lösung	250 µl Triton X100 (10x) 500 µl PI-Stammlösung (5 mg / ml) 50 mg Natriumcitrat 49,25 ml PBS
RIPA-Puffer	10mM Tris-HCl, pH 8,0 2mM EDTA 1% Triton X-100 0,1% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS 140mM NaCl 1mM Na3VO4 1mM NaF 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail(EDTA-frei)
Triton X100 (10X)	100 µl Triton X100 900 µl PBS (1x)

3.1.4 WIRKSTOFFE, KITS UND ANTIKÖRPER

Tab. 6 Verwendete Wirkstoffe und Kits

Wirkstoff/Kit	Hersteller
Bindarit	Selleckchem
Vascular-endothelial growth factor (VEGF)	PeproTech
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen
QuantiTectTMSYBR®Green PCR Kit	Eurogentec
RNeasy Mini Kit	Qiagen

Tab. 7 Verwendete Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Wirt/Isotyp	Firma
CD11b	PerCP-Cy5.5	M1/70	Rat / IgG2b, κ	eBioscience
CD31	FITC	390	Rat IgG2a, κ	eBioscience
CD45	PacificBlue	30-F11	Rat IgG2b, κ	eBioscience
CD309	PE	Avas12a1	Rat IgG2a, κ	eBioscience
Ly6C	FITC	HK1.4	Rat IgG2c, κ	Biolegend Inc.
Ly6G	PE	1A8	Rat IgG2a, κ	Biolegend Inc.

3.1.5 ARBEITSGERÄTE UND SOFTWARE

Tab. 8 Verwendete Arbeitsgeräte

Arbeitsgeräte	Hersteller
AxioCam HRc Mikroskop Kamera	Zeiss
BD Accuri™ C6 Cytometer	BD Biosciences
BD™ LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences
Einbettautomat Shandon Excelsior ES	Thermo Fisher Scientific
Einbettstation Shandon HistoCentre 2	Thermo Fisher Scientific
Inverses Mikroskop DM IRB	Leica
Kobalt-60 Quelle	Philips
Kryostat Leica CM1850 UV	Leica
MegaViewII Slow-Scan-CCD-Kamera	Zeiss
Nanodrop™ ND-1000 Spektralphotometer	peQLab Biotechnologie
Paraffinstrecktisch HI 1220	Leica
Paraffinwasserbad HI 1210	Leica
Rotationsmikrotom RM2235	Leica
Sterilbank BDK HF6.12	Faust
Synergy HT ELISA Reader	Bio-Tek Instruments
X-Ray Bestrahlungsgerät X-RAD 320	Precision X-Ray Inc.

Tab. 9 Verwendete Software

Software	Hersteller
Axio Vision LE64	Zeiss
BD Accuri C6	BD Biosciences
Cytometrische Analysesoftware FlowJo	FloJo Enterprise
ImageJ	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
GraphPad Prism 6.0	GraphPad Software

3.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 KULTIVIEREN UND PASSAGIEREN VON ZELLEN

Die Kultivierung und Aussaat der verschiedenen Zelllinien erfolgte stets unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank. Unter Gebrauch von zuvor autoklavierten, desinfizierten Lösungen und Materialien oder unter der Verwendung von steriler Einwegware wurden die Zellkulturarbeiten durchgeführt.

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (AS-M5) wurden in Endothelial Cell Growth Medium (ECG) und murine Melanomzellen (B16F10) in Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) mit 10 % fetalen Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin in 75 cm² großen Zellkulturflaschen unter Standardkulturbedingungen (37 °C, 21 % Sauerstoff (O_2), 5 % Kohlenstoffdioxid (CO_2) und 99 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Es erfolgten regelmäßige Medienwechsel und ein Passagieren der Zellen bei 80 - 90 % Konfluenz. Für das Passagieren wurde zunächst das alte Medium abgenommen und die Zellen 1x mit Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) gewaschen. Die Zellen wurden mit 2 mL 5x Trypsin/ 0,05 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) vom Flaschenboden abgelöst und die Reaktion dann durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in eine *Tube* überführt und bei 1200 rpm (engl. rounds per minute, Umdrehungen pro Minute) für 5 min zentrifugiert, um das alte Medium und das Trypsin vollständig von den Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen dann mit frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde abschließend je nach Bedarf im Verhältnis von 1:5 bis 1:20 verdünnt und neu ausgesät.

3.2.2 KONSERVIERUNG UND REAKTIVIERUNG VON ZELLEN

Eine dauerhafte Lagerung der Zelllinien erfolgte in Kryo-Gefäßen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Durch die Haltung der Zellen in einem Einfriermedium mit Dimethylsulfoxid (DMSO), welches eine Eiskristallbildung verhindert, kann ein Großteil der Zellen mehrere Jahre tiefgefroren überleben und nach der Reaktivierung erneut kultiviert werden.
Für die Konservierung wurden die Zellen in der exponentiellen Phase geerntet und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand entfernt, das Pellet in dem jeweiligen Kulturmedium + 20 % FCS + 10 % DMSO so resuspendiert, dass 1mL

Suspension ca. 1 x 10^6 Zellen enthält und dann in ein Kryogefäß überführt. Ein schonendes Einfrieren mit einer Rate von ca. 1 °C pro min erfolgte durch eine Lagerung in einem Mr.Frosty™ Gefrierbehälter mit Isopropanol über Nacht bei -80 °C. Für die dauerhafte Kryokonservierung wurden die Kryogefäße in einem Stickstofftank eingelagert.
Zur Reaktivierung der Zellen wurden die Kryogefäße aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit frischem Medium in ein 15 mL Falcon-Röhrchen überführt, 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, das Pellet im entsprechenden Kultivierungsmedium resuspendiert und in 75 cm^2 Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Entfernen toter Zellen erfolgte am darauffolgenden Tag ein Mediumwechsel.

3.2.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Zellzahlbestimmung der Zelllinien erfolgte durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblaufärbung. Hierzu wurden die Zellen zunächst, wie unter 3.2.1 beschrieben, behandelt. Auf die Zentrifugation folgend wurde eine 1:2 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau angefertigt und in eine Neubauer-Zählkammer transferiert. Trypanblau wird nur von abgestorbenen oder perforierten Zellen aufgenommen, sodass diese Zellen dunkelblau angefärbt werden und so von den lebenden Zellen unterschieden werden können. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl pro mL wurde die Anzahl lebender Zellen in vier Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt. Aus den vier ausgezählten Großquadraten wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor von 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro mL anzugeben.
Durch die Seitenlängen der Großquadrate von 1 mm sowie durch die festgelegte Kammertiefe von 0,1 mm, ergibt sich ein Volumen in einem Großquadrat von 0,1 mm^3= 0,1 µL. Aufgrund der Multiplikation mit 10^4 (=10.000) ergibt sich dann die Zellzahl pro mL, da 0,1 µL x 10^4 = 1 mL.

3.2.4 BEHANDLUNG VON ZELLEN

3.2.4.1 BESTRAHLUNG MIT RÖNTGENSTRAHLEN

Je nach experimentellem Aufbau wurden die Zellen in einer bestimmten Zellzahl und in verschiedenen Zellkulturtestplatten ausgesät und zur Anheftung an den Zellkulturträger über Nacht inkubiert. Die Bestrahlung der Zellen wurde am Bestrahlungsgerät X-RAD 320 X-Ray Biological Irradiator mit einer MIR-324 Röntgenröhre im Institut für medizinische Strahlenbiologie, Universitätsklinikum Essen (Prof. Dr. George Iliakis, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt. Die Behandlung mit ionisierender Strahlung erfolgte bei 320 keV, 10 mA mit einem 1,65 mm Aluminiumfilter bei Raumtemperatur. Die verwendeten Bestrahlungsdosen betrugen 0 Gy bis 10 Gy bei einer effektiven Photonenenergie von 90 keV und einer Dosisrate von ca. 2,67 Gy / min. Die Zellkulturtestplatten wurden für eine gleichmäßige Dosisverteilung auf einer rotierenden Bestrahlungsplatte mit einem gleichbleibenden Abstand von 75 cm für die Bestrahlung positioniert. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen umgehend zurück in den Inkubator gestellt und über die jeweilige Inkubationszeit kultiviert.

3.2.4.2 BEHANDLUNG MIT CCL2 UND VEGF

Um den Einfluss von Ccl2 auf die Proliferation, den Zelltod und die Apoptose der humanen mikrovaskulären Endothelzellen AS-M5 nach der Bestrahlung zu untersuchen, wurden die Zellen der Versuchsreihe nach der Bestrahlung in einem Ccl2-supplementiertem Medium kultiviert, während die Zellen der Kontrollreihe in dem Standardmedium ECG (normal growth medium, NGM) oder in VEGF-supplementiertem Medium als Kontrolle für endotheliale Zellaktivierung kultiviert wurden. Hierfür wurden die Zellen bis zur Bestrahlung zunächst alle in ECG inkubiert. Erst im Anschluss erfolgte der Wechsel auf das supplementierte Medium. Hierzu wurden die Zytokine mit einer bekannt wirksamen Konzentration von 20 ng/ ml Ccl2 bzw. 10 ng/ ml VEGF eingesetzt.

3.2.5 KOLONIEBILDUNGSASSAY

Der Koloniebildungsassay stellt das proliferative Potenzial von Zellen nach Bestrahlung, Chemotherapie oder der Behandlung mit pharmakologischen Wirkstoffen dar. Diese Methode bietet die Möglichkeit, den jeweiligen Effekt der Bestrahlung und des eingesetzten Wirkstoffs, aber auch die Auswirkungen der Kombination aus beidem auf die Proliferation der Zellen und deren Überleben zu untersuchen, sodass quantitative und langfristige Folgen dargestellt werden können.

Nach der Durchführung eines Test-Sets zur Bestimmung der nötigen Zellzahl wurde die Zellzahl so gewählt, dass sich nach der Inkubationszeit Kolonien, jedoch keine Kolonierasen bilden. Für einen Versuch wurden pro Zelllinie und Behandlung zwei unterschiedliche Zellverdünnungen ausgesucht und in jeweils drei *Wells* eines 6-*Wells* ausgesät. Diese sechs Werte wurden auf ihre jeweilige ausgesäte Zellzahl normiert und dann gemittelt.

Demnach wurden 200-1600 AS-M5 Zellen pro Well ausgesät und bis zum Folgetag kultiviert. Es folgte dann je nach Set die Bestrahlung mit 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy oder 8 Gy und eine Inkubationszeit von 10 Tagen unter Standardkulturbedingungen. Nach dieser Inkubationszeit wurde zur Bestimmung der Koloniebildungszahl der Überstand verworfen und die Zellen für 10 min in 3,7 % Formaldehyd fixiert. Nach Entfernen der Lösung erfolgte eine 10-minütige Inkubation in 70 %-Ethanol zur Permeabilisierung der Zellmembran. Die Lösung wurde ebenfalls verworfen und die Zellen mit Coomassie Brilliant Blue für ca. 2 h gefärbt. Die Färbelösung wurde durch Waschen mit destilliertem Wasser entfernt und die Platten bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss erfolgte eine manuelle Zählung unter mikroskopischer Kontrolle der Koloniegröße. Dabei wurde eine Zellansammlung als Zellkolonie definiert, wenn diese aus mehr als 50 Zellen bestand.

Für die Auswertung der ausgezählten Kolonien war zunächst die Ermittlung der Effizienz der Plattierung (PE, plating efficiency) anhand der Kontrollen notwendig, da in der Regel auch unter physiologischen Bedingungen keine Koloniebildungsrate von 100 % zu erwarten ist. Diese wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$PE = \frac{Anzahl\ gebildeter\ Kolonien}{Anzahl\ plattierter\ Zellen}\ x\ 100\ \%$$

Anschließend wurde die Überlebensrate (SF, surviving fraction), die der Anzahl gebildeter Kolonien nach der Behandlung entspricht, nach der folgenden Formel berechnet:

$$SF = \frac{Anzahl\ gebildeter\ Kolonien\ nach\ Behandlung}{Anzahl\ plattierter\ Zellen\ x\ PE}$$

Anhand der SF und der Strahlendosen lassen sich Überlebenskurven graphisch darstellen. In der Regel werden die Strahlendosen auf der x-Achse linear und die SF auf der y-Achse logarithmisch aufgetragen. Hier erfolgte die Darstellung der Ergebnisse als Kurvendiagramm (lineare Auftragung auf der x-Achse und logarithmische Auftragung auf der y-Achse: Strahlendosen gegen die SF) mit farblicher Unterscheidung des jeweils dargestellten Wirkstoffs.

Mit diesem Versuch sollte der Langzeiteffekt des Zytokins Ccl2 auf das proliferative Potenzial und das Überleben der Endothelzellen nach Bestrahlung untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen in einem Versuchsset in einem mit Ccl2-versetztem Medium mit einer Konzentration von 20 ng Ccl2/ ml Medium kultiviert. In einem weiteren Versuchsset erfolgte die Kultivierung unter Zugabe des bekannten angiogenen Stimulus VEGF (engl. vascular endothelial growth factor, kurz VEGF) mit einer Konzentration von 10 ng VEGF/ ml Medium. Als Referenz wurde ein Ansatz in normalem Standardmedium durchgeführt. Es wurde unmittelbar im Anschluss an die Bestrahlung das alte Medium abgenommen, die Zellen mit DPBS 1x gewaschen und frisches Medium bzw. Medium mit dem jeweiligen Wirkstoff hinzugegeben.

3.2.6 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie ist ein laserbasiertes Verfahren zur Analyse einzelner Zellen nach den Kriterien Größe, Granularität und Oberflächenbeschaffenheit. Zur Untersuchung wird eine Zellsuspension mit hoher Geschwindigkeit durch eine sehr dünne Messkapillare gezogen, sodass sich die Zellen einzeln hintereinander aufreihen. Sie werden dann an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, woraufhin dieser abgelenkt und gebrochen wird. Es entsteht eine Lichtstreuung, die je nach Zellgröße und -granularität variieren kann. Das Vorwärtsstreulicht (FSC= engl. Forward-Scatter) wird durch die Lichtbeugung bestimmt, das Seitwärtsstreulicht (SSC= engl. Sideward-Scatter) durch die Lichtbrechung und die Reflexion. Das FSC ist proportional zur Größe einer Zelle, während das SSC mit der Granularität und der Oberflächenbeschaffenheit einer Zelle korreliert. Bedient man sich eines Geräts, das mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen analysieren und sortieren kann, bezeichnet man das Verfahren als fluoreszenzbasierte Zellsortierung (engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting, kurz FACS). Die Detektion der spezifischen Fluoreszenzfärbung der Zellen erfolgt durch Absorption der Energie des Laserlichts durch das Fluorochrom, welches die Energie durch Emission eines Photons höherer Wellenlänge wieder abgibt. Dabei verhält sich das emittierte Fluoreszenzlicht proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrom-Moleküle. Die spezifischen Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzlichts werden über optische Spiegel und Filter zu einem Detektor weitergeleitet. Das elektronische System des Durchflusszytometers quantifiziert dann die detektierten Lichtsignale, indem es sie in digitale Daten umwandelt und mittels einer Software in Mess- bzw. Auswertefenstern grafisch darstellt. Die Darstellung der Proben erfolgt in zweidimensionalen Streudiagrammen (*Dot Plots*) und Histogrammen. Jedes detektierte Signal wird im *Dot Plot* als Punkt dargestellt. Im Histogramm wird die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzen angezeigt.

Für die im Folgenden beschriebenen Analysen wurde das Durchflusszytometer BD Accuri™ C6 verwendet. Dieses besitzt zwei Laser mit vier verschiedenen Fluoreszenzkanälen (FL1 bis FL-4). Somit können neben dem FSC und SSC vier weitere Fluoreszenzfarbstoffe mit verschiedenen Emissionsmaxima parallel über die vier Laserkanäle gemessen werden.

3.2.6.1 NICOLETTI-FÄRBUNG

Tritt während des Zellzyklus eine irreversible Schädigung auf, wird der programmierte Zelltod, die sogenannte Apoptose, eingeleitet. Apoptotische Zellen weisen eine verringerte Membranintegrität auf und setzen enzymatisch verdaute fragmentierte DNA von etwa 185 bp aus ihrem Zellkern frei, die in der Zelle akkumuliert.

Die Nicoletti-Färbung stellt eine modifizierte Form der Zellzyklusanalyse dar, welche die fragmentierte DNA detektieren und so den Anteil apoptotischer Zellen ermitteln kann (Riccardi and Nicoletti, 2006). Die Verwendung von Triton X-100 und hypotonem Puffer fördert dabei die Durchlässigkeit der Membran von apoptotischen Zellen mit bereits verringerter Membranintegrität und permeabilisiert zudem die Membran gesunder Zellen, sodass der Farbstoff Propidium Iodide (PI) auch in die DNA gesunder Zellen interkalieren kann und so die jeweiligen Zellzyklus-Phasen aller Zellen sichtbar werden. Demnach besitzen gesunde Zellen in der G0/G1-Phase einen diploiden und kurz vor der Teilung (M-Phase) in der G2-Phase einen tetraploiden Chromosomensatz im Zellkern. Zwischen diesen Phasen findet in der S-Phase die DNA-Verdopplung im Zellkern statt. Während dieser Phasen weisen die Zellen somit unterschiedliche DNA-Mengen auf, die dann anhand der jeweiligen Fluoreszenz-Intensität als G0/G1-Peak, G2/M-Peak oder als sub-G1-Peak den unterschiedlichen Zellzyklusphasen mittels FACS-Analyse zugeordnet werden können. Dabei können die apoptotischen Zellkerne mit der fragmentierten DNA im Histogramm als langgestreckter, flacher hypodiploider Peak vor dem hohen und engen G1-Peak (diploide Zellen) im Durchflusszytometer im FL-2 Kanal dargestellt werden.

Für die Nicoletti-Färbung erfolgte eine Zellernte nach 48 h bzw. 96 h mit anschließender Pelletierung wie zuvor beschrieben. Anschließend wurde das Zellpellet in Nicoletti-Lösung (0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % TritonX100, 50 µg / ml PI) resuspendiert und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde im FL-2 Kanal des BD Accuri™ C6 Durchflusszytometers die Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben gemessen und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen mithilfe der BD Accuri™ C6 Software ermittelt.

3.3 TIEREXPERIMENTELLE METHODEN

3.3.1 TIERHALTUNG

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (Regierungspräsidium Düsseldorf die Az 84-02.04.2014.A411 und die Az.-84-02.04.2015.A446) genehmigt. Die Mäuse wurden in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Essen gezüchtet. Für die Versuche wurden männliche und weibliche Wildtypen C57BL/6, sowie CCR2-defiziente Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund verwendet. Die Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen, in separat belüfteten Käfigen (IVC) mit einer maximalen Anzahl von sechs Tieren pro Käfig, unter einer Raumtemperatur von 20-22 °C und mit einem 12 h Licht/Dunkel-Zyklus gehalten. Nahrung und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung.

3.3.2 AUFBAU DES KOMBINIERTEN MAUSMODELLS

In einem murinen Modell der strahleninduzierten Pneumopathie wurde das Potenzial der Inhibition des Ccl2-Signalwegs als schützende Maßnahme vor strahleninduzierten Schäden insbesondere am Gefäßsystem mithilfe eines kombinierten Behandlungsverfahrens untersucht. Um zunächst strahlenassoziierte Schäden zu induzieren, wurden die Tiere an Tag 0 (t0) einer kompletten Thoraxbestrahlung mit 15 Gy (WTI) zugeführt. Um die Bedeutung der Ccl2-Signalgebung zu analysieren, wurden Versuche sowohl unter pharmakologischer Hemmung der Ccl2-Expression (Bindarit, siehe 3.3.2.2.1) als auch nach genetischer Unterbindung der Ccl2-Rezeption (CCR2-Knockout, siehe 3.3.2.2.2) durchgeführt. Da die frühen Effekte der Akutphase erfasst werden sollten, wurde der 21.Tag post radiationem als Untersuchungszeitpunkt gewählt.

3.3.2.1 DURCHFÜHRUNG DER THORAXBESTRAHLUNG

Bei der Thoraxbestrahlung wurden immer vier Mäuse parallel behandelt. Diese wurden zunächst mit 2 % Isofluran, narkotisiert und in eine spezielle Halterung gelegt. Anschließend wurde die WTI mit einer Einzeldosis von 15 Gy (Versuchsgruppe) durchgeführt. Die Bestrahlung wurde mit der Gammastrahlenquelle Cobalt-60 (Phillips, Hamburg, Deutschland) auf einem Bestrahlungsfeld von 23,3 cm x 2 cm und mit einem Abstand von 58 cm durchgeführt. Das Bestrahlungsfeld wurde zusätzlich durch zwei Lipowitz Metallabsorberblöcken von 5,3 cm Dicke und einem Zielabstand von 44 cm auf eine

Bestrahlungsfeldgröße von 23,3 cm x 1,5 cm minimiert. Ein Strahlenkollimator sorgte für die jeweilige Strahlenausrichtung mit einer axialen Schichtdicke von 1,5 cm auf die vier parallel positionierten Mäuse. Zur Dosismessung wurden der PinPoint 3D Ionization Chamber Typ 31013 (0,016 cm^3), als Referenzdosimeter der Semiflex Chamber Typ 31003 (0,3 cm^3) und das Elektrometer, Typ UNIDOS (PTW, Freiburg, Deutschland) verwendet. Die Dosisabweichung lag bei 3 % (+3 % für die beiden Mäuse mit einem Abstand von 3 cm zur zentralen Strahlenachse, -3 % für die beiden Mäuse mit einem Abstand von 9 cm zur zentralen Strahlenachse). Die Körperdosis außerhalb des Bestrahlungsfelds lag bei 1,3 % der festgesetzten Dosis. Die Cobalt-60-Quelle bestrahlte mit einer Dosisrate von 0,5 Gy /min.
In der Kontrollgruppe wurden die Mäuse narkotisiert und blieben unbestrahlt (0 Gy).

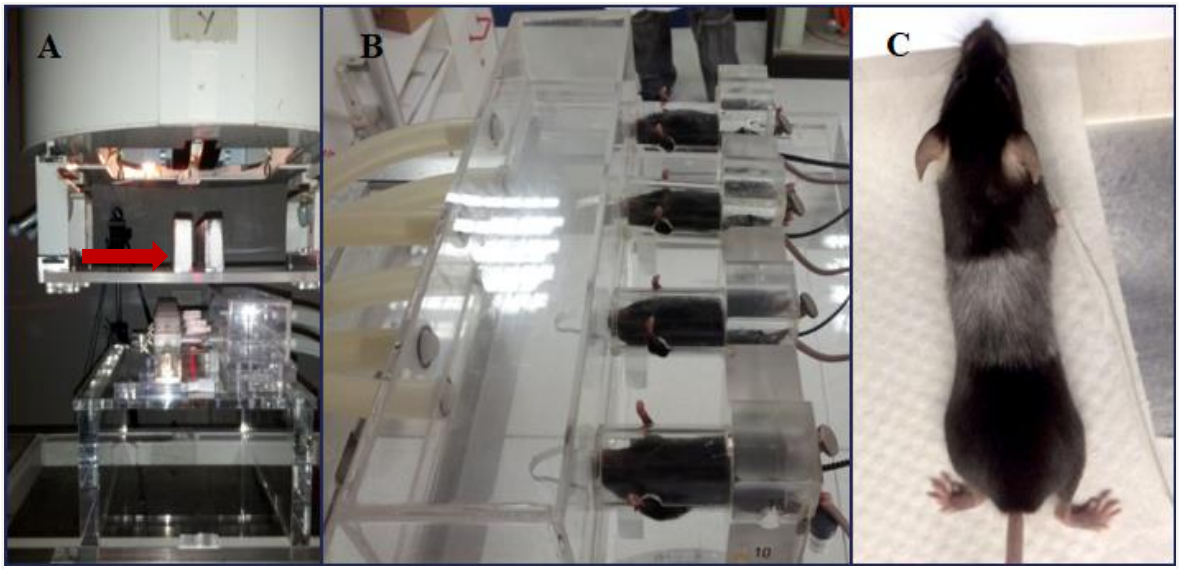

Abb. 3 Darstellung der Thoraxbestrahlungseinheit.
Die photographischen Aufnahmen zeigen die Bestrahlungs- und Halterungsvorrichtung zur Durchführung der Thoraxbestrahlung. A) Mittels Bleiblöcken (siehe Pfeil) wurde das Bestrahlungsfeld auf einen Durchmesser von 1,5 cm ausgerichtet. B) In einer speziellen Halterungsvorrichtung wurden die narkotisierten Mäuse positioniert und mit 15 Gy bestrahlt. Die Einheit bot Platz für eine simultane Bestrahlung von bis zu vier Mäusen. C) Die Bestrahlung entfärbte das Fell, sodass sich der bestrahlte Thoraxbereich anschließend grau darstellte.

3.3.2.2 INHIBITION DES CCL2-SIGNALWEGS

3.3.2.2.1 Pharmakologische Inhibition des Ccl2-Signalwegs

Zur pharmakologischen Inhibition der Ccl2-Expression wurde der kommerziell erhältliche Wirkstoff Bindarit eingesetzt (Selleckchem, Houston, TX). Bindarit (BIN) ist ein kleines, synthetisch hergestelltes Indazol-Derivat (2-((1-Benzyl-indazol-3-yl) Methoxy-) 2-Methylpropionsäure), welches die Transkription des monozytenchemotaktischen Proteins MCP-1/ Ccl2 hemmt und als selektiver Ccl2-Inhibitor gilt (Zoja et al., 1998; Sironi et al.,

1999; Mirolo et al., 2008; Mora et al., 2012). Durch Versuche von Steiner et al. ist bereits bekannt, dass die Gabe von Bindarit im Mausmodell die Wirkung von Ccl2 aufheben und somit das Tumorwachstum reduzieren kann (Steiner et al., 2014). Darüber hinaus wurde Bindarit bereits erfolgreich in vielen weiteren Experimenten als Ccl2-Inhibitor eingesetzt (Wolf et al., 2017; Wu et al., 2017; Zhang et al., 2018).

Nach der Bestrahlung erfolgte die Behandlung mit Bindarit über einen Zeitraum von 3 Wochen während der inflammatorischen Phase (0 – 42 d). Hierbei wurde das bereits bekannte und in der Literatur verifizierte Behandlungsschema mit einer Dosierung von 100 mg / kg Körpergewicht in 0,5-prozentiger Aqua Methylcellulose in einem maximalen Injektionsvolumen von 100 µl bei intraperitonealer Injektion und eine Behandlungsfrequenz von drei Injektionen pro Woche eingehalten (Gazzaniga et al., 2007; Zollo et al., 2012). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine Scheinbehandlung mit Aqua Methylcellulose allein. Die erste Applikation wurde unmittelbar nach der Bestrahlung, also am selben Tag, durchgeführt.

3.3.2.2.2 Genetische Inhibition des Ccl2-Signalwegs

Die Unterbindung der Ccl2-Rezeption erfolgte durch die Verwendung von CCR2-Knockout-Mäusen (CCR2-KO). Bei Knockout-Mäusen wird durch genetische Manipulation ein bestimmtes Gen deaktiviert (außer Gefecht setzen, engl. knock out). Für unsere Versuche wurde bei C57BL/6 Mäusen das Gen für den Ccl2-Hauptrezeptor CC-Chemokin Rezeptor Typ 2 (CCR2) deaktiviert, sodass die Ccl2-Signalgebung kontinuierlich aufgehoben wurde.

3.3.3 TIERTÖTUNG

An den entsprechenden Versuchsendpunkten wurden die Mäuse zunächst durch eine Inhalation mit Isofluran (Überdosis) narkotisiert und durch eine transkardiale Perfusion mit PBS schmerzfrei getötet. Im Anschluss wurde das Lungengewebe unmittelbar isoliert herauspräpariert und Proben des Lungengewebes zur Protein- bzw. RNA-Gewinnung bei - 80 °C bzw. - 20 °C eingefroren, zur histopathologischen Aufarbeitung direkt in Paraformaldehyd (PFA) fixiert oder zur FACS bzw. EBD- Analyse weiterverarbeitet. Die Haltung und Tötung der Mäuse erfolgte nach den Richtlinien der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde-Society for Laboratory Animal Science), die in den oben genannten und genehmigten Tierversuchsanträgen genau beschrieben sind.

3.3.4 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.3.4.1 PARAFFINEINBETTUNG UND SCHNITTPRÄPARATION

Zur Einbettung in Paraffin wurden die Gewebeproben in Histologie-Kassetten eingelegt, im Einbettautomat Shandon Excelsior ES im Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen entwässert und in flüssiges Paraffin aufgenommen. Die feste Einbettung der Proben in einen Paraffinblock wurde an der Einbettstation Shandon HistoCentre 2 durchgeführt. Von den Probenblöcken wurden am Rotationsmikrotom RM2235 5 µm dünne Schnitte angefertigt, die mithilfe des Paraffinwasserbads und des Paraffinstrecktischs auf Objektträger (Super Frost Plus 75 mm x 25 mm) aufgebracht und über Nacht bei 60 °C getrocknet wurden.

3.3.4.2 HÄMATOXYLIN-EOSIN (HE)-FÄRBUNG

Für die HE-Färbung wurde eine Entparaffinierung mit Xylol (2x 5 min), sowie eine Bewässerung der Proben durch eine Alkoholreihe (jeweils 5 min in 100 %, 96 % und 70 % Ethanol) und durch eine Inkubation in Aqua bidest. (5 min) durchgeführt. Zur Blaufärbung der Zellkerne wurden die Proben in *Hämalaun sauer nach Meyer* für 5 min getaucht. Es folgte das sogenannte *Bläuen* unter fließendem Leitungswasser für ca. 10 min und eine Färbung in *Eosin G*-Lösung (*Eosin G* mit 3 Tropfen 1 % Essigsäure) für 3 min bis 5 min. *Eosin G* bewirkt eine Rotfärbung von Muskelfasern, Zytoplasma und Erythrozyten. Der Farbüberschuss wurde mit Aqua bidest abgespült.

3.3.4.3 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Das Gewebe wurde mit phosphatgepuffertem Glutaraldehyd (4,5 %) fixiert, mit 1 % Osmiumtetraoxid und 1 % Uranlacetat konstrastiert und in EPON® eingebettet. Dünne Abschnitte (8 nm) wurden geschnitten und auf 200 Mesh hexagonale Kupfergitter montiert. Zur Kontrastverstärkung wurden Uranylacetat und Bleicitrat eingesetzt. Für die Untersuchung bei 80 KV wurde ein Zeiss Transmissionselektronenmikroskop (EM 902A) verwendet. Die digitale Bilderfassung wurde mit Hilfe von Herrn PD Dr. Jastrow (Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt und erfolgte mit einer MegaViewII Slow-Scan-CCD-Kamera, die an einen PC mit ITEM® 5.0-Software angeschlossen war.

3.3.4.4 SENESZENZ-ASSOZIIERTE BETA-GALAKTOSIDASE-AKTIVITÄT

Die lysosomale β-D-Galaktosidase erreicht ihre maximale Aktivität in nicht-seneszenten Zellen bei einem pH-Wert von 4,0. In seneszenten Zellen kommt es zur Überexpression der β-D-Galaktosidase, die auch noch bei einem suboptimalen pH von 6,0 nachgewiesen werden kann und so nicht-seneszente von seneszenten Zellen unterscheidet. Sie wird daher auch Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase (SA-β-Gal) genannt und ist ein weit verbreiteter Biomarker in Studien zur zellulären Seneszenz *in vitro* und *in vivo*. SA-β-Gal hydrolisiert das chromogene Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoyl β-D-Galactopyranosid (X-gal) in Galaktose und in einen blauen, wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff, sodass in Form eines X-gal-Stainings zelluläre Seneszenz farblich dargestellt werden kann (Dimri et al., 1995; Debacq-Chainiaux et al., 2009).

Für den Nachweis der SA-β-Gal-Aktivität im Lungengewebe wurden Kryostatschnitte angefertigt. Hierfür wurden die präparierten Lungen in Kryoformen gelegt, mit Kryostat-Lösung (Tissue-Tek® O.C.T) eingebettet, auf Trockeneis getrocknet und in Aluminiumfolie eingewickelt bei -80 °C eingefroren. Im Anschluss wurden 4 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt. Es folgte der histochemische Nachweis der SA-βgal-Aktivität mit dem chromogenen β-Gal Substrat X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, B4252 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in einem Puffer bei pH 6,0 (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Die Objektträger wurden in 4 % PFA für 30 min bei 4 °C fixiert, mit Waschpuffer 4x für je 5 min gespült und anschließend mit X-gal Färbelösung (0,1 % X-Gal, 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (II), 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III), 150 mM Natriumchlorid und 2 mM Magnesiumchlorid in 40 mM Zitronensäure/Natriumphosphatlösung, pH 6,0) für mehr als 12 h bei 37 °C im feuchten Inkubator entwickelt. Der Färbebehälter war für normales Licht undurchlässig. Nach der Färbung wurden die Objektträger 3x mit PBS für je 5 min gewaschen und die SA-βgal-Aktivität unter dem Lichtmikroskop anhand der Intensität der Blaufärbung dargestellt. Alle Arbeitslösungen wurden frisch zubereitet.

3.3.5 EXTRAVASATION DER TUMORZELLEN

Um die Extravasation zirkulierender Tumorzellen und ihre Ansiedlung in das umliegende Gewebe zu untersuchen, wurden am 21.Tag (t21) post radiationem je 0,5 x 10^6 Tumorzellen (B16F10 Melanomzellen) in die Schwanzvene der Mäuse transplantiert. Nach weiteren 14 Tagen wurden die Mäuse nach dem bekannten Ablauf getötet und die Lungen isoliert. Zur histopathologischen Aufbereitung wurde das Gewebe direkt im Anschluss an die Präparation

in 4 % Formalin fixiert und im Folgenden in Paraffin eingebettet. Es folgte die Anfertigung von jeweils drei bis vier 5 µm dicken Longitudinalschnitten aus dem Paraffinblock in jeweils drei Gewebetiefen und eine Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin. Die Schnitte wurden anschließend mit einem 20-fachen Objektiv mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden die Tumorzellformationen in der Lunge in mindestens drei Schnitten pro Gewebetiefe quantifiziert und anschließend der Mittelwert gebildet.

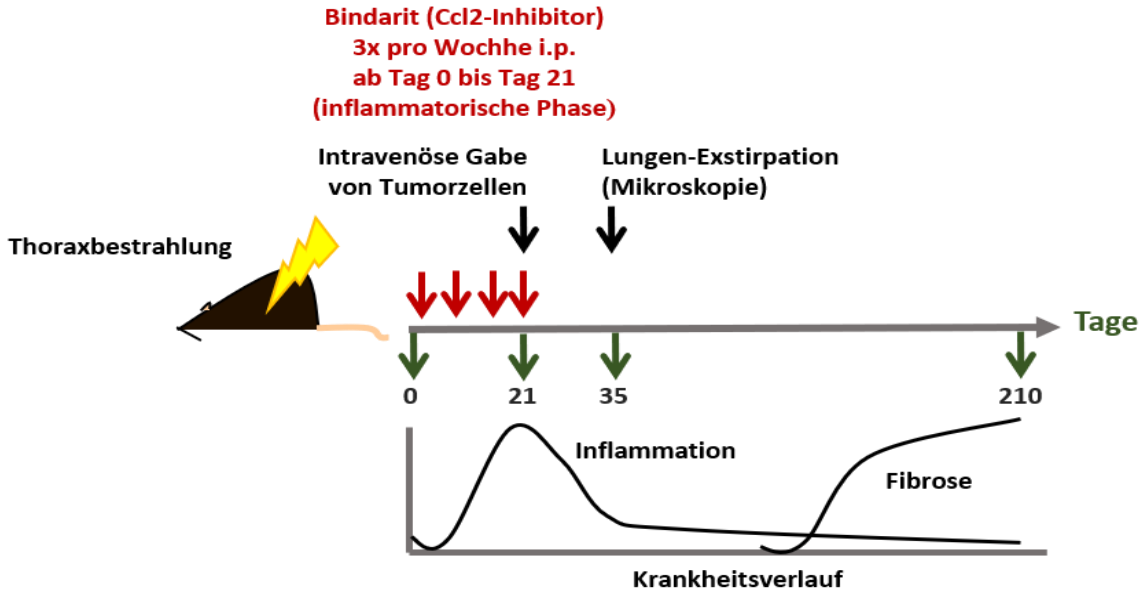

Abb. 4 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Extravasation zirkulierender Tumorzellen. Die Durchführung ist unter 3.3.5 beschrieben.

3.3.6 EVANS-BLUE-DYE-ASSAY

Zur Beurteilung der vaskulären Funktion wurde am 21. Tag post radiationem die vaskuläre Permeabilität des Lungengewebes mithilfe des Evans Blue Dye Assays bestimmt. Evans Blue Dye (EBD) ist ein Farbstoff, der eine hohe Affinität zu Plasmaalbumin aufweist. Die Prinzipien hinter dem Einsatz von EBD zur Bestimmung der Gefäßpermeabilität in diesem Assay liegen darin, dass Albumin in normalen Geweben mit normaler Gefäßintegrität nicht in der Lage ist, durch die Gefäßwand-Endothelschicht in das Interstitium zu wandern. Ist die Gefäßwandintegrität jedoch beeinträchtigt, bilden sich Lücken, durch die das Albumin bzw. dann der EBD-Albumin-Komplex hindurchwandern kann. Der EBD-Albumin-Komplex kann dann als Blaufärbung im interstitiellen Gewebe betrachtet und gemessen werden und auf eine erhöhte Gefäßpermeabilität hinweisen. Für die Durchführung wurde der Farbstoff Evans Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in einer Konzentration von 100 µg EBD/100 µl PBS intravenös in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Eine Stunde nach der Injektion

wurden die Mäuse, wie oben beschrieben, getötet. Die Lungen wurden herauspräpariert und zu jeweils einer Hälfte in Tubes überführt, gewogen (Nassgewicht) und dann über Nacht bei 60 °C getrocknet und nochmals gewogen (Trockengewicht). Im Weiteren wurde das Gewebe in 200 µl Formamid für 24 h bei 65 °C inkubiert, um das in das Lungeninterstitium abgesonderte EBD zu gewinnen. Schließlich wurde die Farbstoffkonzentration bei einer Absorption von 620 nm mittels ELISA-*Reader* gemessen und in Relation zum Nass- bzw. Trockengewicht der Lunge gesetzt (µg EBD pro mg Nass-/Trockengewicht der Lunge). Je höher dabei die gemessene Farbstoffkonzentration ist, umso größer ist das Ausmaß der Gefäßpermeabilität.

3.3.7 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

3.3.7.1 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER IMMUNZELLEN UND ENDOTHELZELLEN IM LUNGENGEWEBE

Die Immunzell- und Endothelzellisolierung aus dem Lungengewebe wurde in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Florian Wirsdörfer (AG Molekulare Zellbiologie, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt.

Die Lungen wurden nach der Entnahme auf einem Objektträger in Stücke geschnitten und in 1 mg / mL Collagenase D in PBS für 40 min bei 37 °C aufgeschlossen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 5 mM EDTA gestoppt. Die Zellsuspension wurde zunächst durch ein 70 µm Zellensieb und dann durch ein 30 µm Zellensieb gedrückt und in ein Falcon mit PBS transferiert. Die Zellsuspension wurde dann bei 1500 rpm für 6 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Es folgte eine Erythrozyten-Lyse durch Resuspension des Zellpellets in 1 mL eiskaltem Ammoniumchlorid-Kalium-Lysepuffer. Die Reaktion wurde nach 1 min durch Zugabe von 9 mL DMEM gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 6 min, woraufhin das entstandene Pellet je nach geplanter FACS-Färbung in einem bestimmten Volumen mit Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt wurde.

Um die isolierten Immunzellen und Endothelzellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle zu charakterisieren, wurden fluoreszenzfarbstoffmarkierte Antikörper verwendet. Durch den Einsatz von fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern können entsprechend emittierte Fluoreszenzen durch die Laser und Detektoren im Durchflusszytometer erfasst und quantifiziert werden. Die emittierte Fluoreszenz der gefärbten Zellen ist dabei proportional zur Menge der gebundenen fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörper und korreliert

demnach mit der Menge an Oberflächenmolekülen. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Wellenlängenbereichen und Emissionsmaxima ermöglicht eine Detektion über verschiedene Fluoreszenzkanäle parallel. Für die durchgeführten Messungen wurden folgende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP-Cy5.5), Fluorescein Isocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE)-Cyanin7 (PE-Cy7) oder, Allophycocyanin (APC) und für die Immunzellen aus der Lunge Pacific Blue (PacBlu).

Für die verschiedenen Zellfärbungen wurden pro Probe 0,3 – 1 x 10^6 Zellen pro Well einer 96-Well U-Bodenplatte aufgetragen. Die 96-Well Platten wurden bei 1500 rpm für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch 1x Dekantieren verworfen. Die Zellpellets wurden in jeweils 100 µL FACS-Puffer mit entsprechender Antikörper-Zusammensetzung resuspendiert und für 10 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Zugabe von 100 µL FACS-Puffer für reine Oberflächenfärbungen. Die oberflächengefärbten Zellen wurden zur Konservierung in 100 µL PFA-Lösung (1 %) resuspendiert, in FACS-Röhrchen transferiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Durchflusszytometrie wurde, wie unter 3.2.6 beschrieben, verwendet. Die Analyse der isolierten Zellen aus der Lunge wurde am BD™ LSR II im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

3.3.8 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.3.8.1 RNA-ISOLATION

Für die Isolation der Ribonukleinsäure (RNA engl. Ribonucleinacid) wurden Gewebeproben der Lungen bei der Präparation gewonnen. Die RNA-Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dazu wurde die Gewebeprobe zunächst in RLT-Puffer (Lysepuffer) und 1% β-Mercaptoethanol mit einem Mixer resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen wurde die Suspension mit einer 1ml Spritze + 0,9 mm Kanüle 6 bis 8 Mal aufgezogen. Es folgte die Isolierung der RNA über eine Silicagel-Membran enthaltene Säule nach Angaben des Herstellers mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des Spektralphotometers NanoDrop™ bestimmt und die Proben ggf. bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3.8.2 REVERSE TRANSKRIPTION (SYNTHESE DER CDNA)

RNA kann mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für die Umschreibung in cDNA wurde das QuantiTect®Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dazu wurde 1 µg der isolierten RNA verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Die Umschreibezeit wurde auf 30 min bei 42 °C angepasst. Im Anschluss wurden die Proben ggf. bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C aufbewahrt.

3.3.8.3 PRIMER-DESIGN

Die Oligonukleotide (Primer) wurden mit dem Programm Primer3Web (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) designt und dann von der Firma *metabion international AG (Planegg)* hergestellt. Die in unserer Studie verwendeten Primer waren intronübergreifend. Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 200 - 300 bp. Es wurden folgende Sequenzen verwendet:

bActin fw	CCAGAGCAAGAGAGGTATCC
bActin bw	CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG
Ccl2 fw	GGGCCTGCTGTTCACAGT
Ccl2 bw	CCTACTCATTGGGATCATCTTGCT
CCR2 fw	GATGATGGTGAGCCTTGTCATA
CCR2 bw	TCCACCAAAATAACCAATGTGA
Cdkn1a fw	GAGAACGGTGGAACTTTGACTT
Cdkn1a bw	CTCAGACACCAGAGTGCAAGAC

3.3.8.4 QUANTITATIVE REAL TIME PCR

Die Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von PCR-Produkten, bei der die DNA-Menge nach jedem Zyklus detektiert wird. Die Detektion erfolgt über Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzmarkierte Sonden, die in die DNA interkalieren können. Nach jedem abgeschlossenen Zyklus erfolgt eine Messung des Fluoreszenzsignals, sodass der Fluoreszenzwert die Menge des PCR-Produkts repräsentiert, das bis zu diesem Punkt der Reaktion amplifiziert wurde. Um jedoch die relative cDNA Menge einer Probe bestimmen zu können, muss eine Normalisierung des *Gene of interest* über einen Abgleich mit den Expressionswerten eines *housekeeping gene* erfolgen. Dazu werden nicht-regulierte, konstitutiv exprimierte Gene herangezogen, die

grundlegende Zellfunktionen besitzen und so in allen Zellen konstant exprimiert sind. Eine Berechnung in Relation zum *housekeeping gene* erlaubt es, Unregelmäßigkeiten der Qualität und Quantität der cDNA-Proben innerhalb eines Ansatzes zu kompensieren. Die Stringenz der Produkte lässt sich anhand einer Schmelzkurve nachweisen. Sie wird nach dem Ende der PCR-Zyklen aufgenommen. Dabei wird die Fluoreszenz der Proben über ein breites Temperaturintervall (60 °C bis 95 °C) gemessen. Die Fluoreszenzintensität nimmt mit steigender Temperatur ab, da die doppelsträngige DNA denaturiert und der Fluoreszenzstoff dadurch freigesetzt wird. In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR mit den gewonnenen cDNA-Proben in Zusammenarbeit mit meiner Betreuerin PD Dr. Diana Klein wie folgt durchgeführt: Für die Durchführung wurde der SYBR®Green Fluoreszenzfarbstoff (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und der SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Analyse erfolgte mit den oben aufgeführten Oligonukleotidprimern.
Dazu wurde pro Reaktion folgender Ansatz pipettiert:

25 µl	Reaktionspuffer	2x
0,5µl	*forward* Primer	200nM
0,5 µl	*reverse* Primer	200nM
0,125 µl	SYBR Green I	
Ad 50 µl	ddH2O	
Vges.	50 µl	

Die Primer wurden in qPCR Platten vorgelegt und mit jeweils 24µl Master mix containg cDNA (insg. 25 µl je Ansatz) der gewünschten *template* cDNA versetzt. Anschließend wurden die Platten mit einer optischen Klebefolie versiegelt, kurz zentrifugiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Für die Durchführung der qPCR wurde der ABI PRISMH7000 qPCR Cycler (Applied Biosystems) mit folgendem Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	10 sec	x 25-30 Zyklen
Annealing	59 °C	30 sec	x 25-30 Zyklen
Elongation	72 °C	30 sec	x 25-30 Zyklen
Halten	4 °C		

Die Spezifität aller PCR-Reaktionen wurde durch parallele Reaktionen mit Wasser anstelle von cDNA getestet. Die Expressionsstufen der analysierten Gene wurden auf die Expression des *housekeeping gene* β-Aktin normalisiert.

3.3.9 PROTEIN-ISOLATION

Von einem Anteil des präparierten Lungengewebes wurden Protein-Lysate hergestellt, welche später zur Durchführung von Western Blot Analysen durch meine Betreuerin PD Dr. Diana Klein verwendet wurden.
Für die Protein-Isolation wurde das Gewebe unter Zugabe von RIPA-Puffer mit einem kleinen Hammer homogenisiert und lysiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde der proteinhaltige Überstand in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Darauf konnte die Konzentration der Proteinlösung gemessen und mit Lysepuffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden. Die Probe wurde mit Lämmlipuffer/β-Mercaptoethanol (900 µL/ 100 µL) bei 96 °C für 5 - 10 min aufgekocht und dann bei – 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.10 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *Graph Pad Prism 6.0*. Gezeigt sind in den Graphen meist die Mittelwerte +/- SEM (standard error of the mean) oder SD (standard deviation). Die einzelnen biologischen Replikate (n, unabhängige Messungen), sowie die Anzahl der technischen Wiederholungen sind in der jeweiligen Abbildungslegende angegeben. Für den Vergleich von mehreren Versuchsgruppen wurde ein „One-way ANOVA Test“ oder ein „Two-way ANOVA Test“ gefolgt von einem *post-hoc* Tukey’s Test bzw. einem *post hoc* Bonferroni‘s Test verwendet. Es wurde ein Konfidenzintervall von 95 % festgelegt und ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0{,}05$, somit wurden P- Werte $\leq 0{,}05$ als signifikant angesehen. Der Grad der Signifikanz wurde in den Abbildungen mit Sternen (*) gekennzeichnet: *$p \leq 0{,}05$ (signifikant), **$p \leq 0{,}01$ (hoch signifikant), ***$p \leq 0{,}001$ (sehr hoch signifikant), ****$p \leq 0.001$ (höchst signifikant).

4 ERGEBNISSE

4.1 PHARMAKOLOGISCHE INHIBITION DES CCL2-SIGNALWEGS IM *IN VIVO* MAUSMODELL

Mithilfe des *in vivo* Mausmodells der strahleninduzierten Pneumopathie wurde die Rolle des Ccl2-Signalwegs für strahleninduzierte vaskulär-endotheliale Schäden im Lungengewebe untersucht. Nach der Strahlenbehandlung (einer Einzeit-Thoraxbestrahlung mit 15 Gy) wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen die Ccl2-Signalgebung durch die therapeutische Applikation von Bindarit (Ccl2-Inhibitor) zunächst pharmakologisch inhibiert. Die Untersuchung der Auswirkung auf die vaskulär-endothelialen Schäden in der Frühphase der akuten Strahlenfolgen erfolgte am 21. Tag post radiationem.

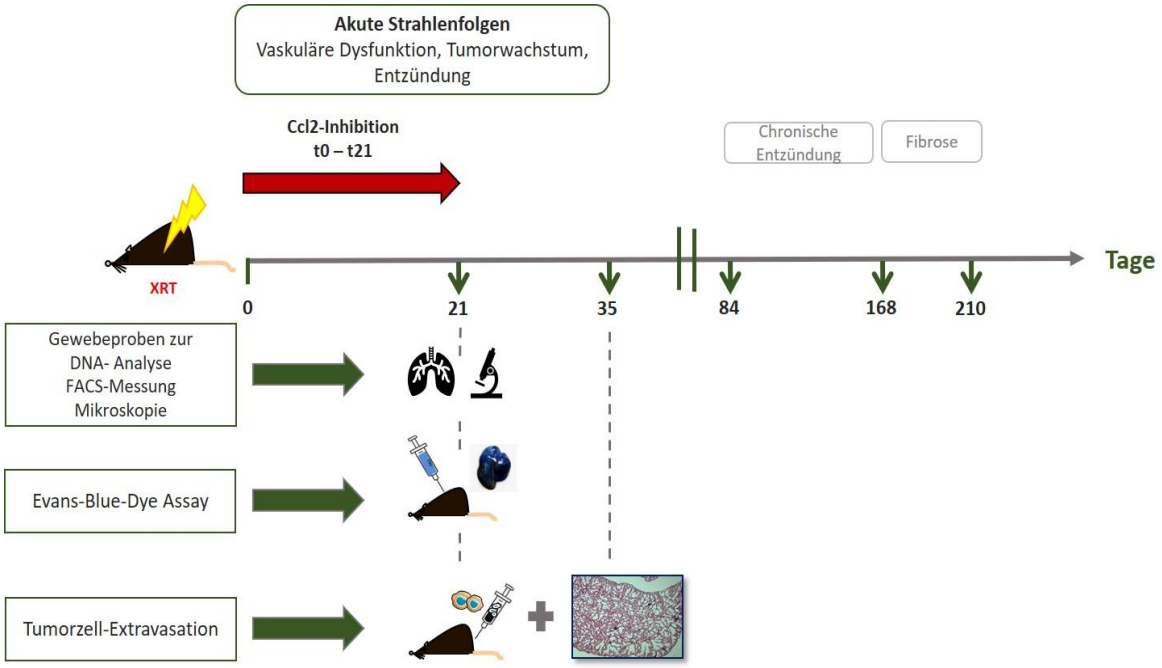

Abb. 5 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der pharmakologischen Ccl2-Inhibition im *in vivo* Mausmodell.
C57BL/6 (Wildtyp-) Mäuse wurden (unter leichter Isoflurannarkose) einer Thoraxbestrahlung mit 15 Gy oder 0 Gy (Kontrolle) unterzogen. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit dem Ccl2-Inhibitor Bindarit über einen Zeitraum von 3 Wochen. Hierzu erhielt ein Teil der bestrahlten (15 Gy) und ein Teil der unbestrahlten (0 Gy) Tiere 3x wöchentlich (erstmalig unmittelbar nach der Bestrahlung, also am selben Tag) eine intraperitoneale Injektion mit Bindarit (100mg / kg Körpergewicht) in 0,5-prozentiger Aqua Methylcellulose, während die entsprechenden Kontrollgruppen (0 Gy und 15 Gy) eine Scheinbehandlung mit 0,5-prozentiger Aqua Methylcellulose (Lösemittelkontrollen) erhielten. Am 21. Tag nach Bestrahlung wurden die Mäuse schmerzfrei und in tiefer Narkose getötet, das Lungengewebe entnommen und Proben je nach Fragestellung zur DNA-Gewinnung, FACS-Analyse oder mikroskopischen Aufbereitung weiterverarbeitet. In weiteren Versuchsansätzen wurde die Analyse der vaskulären Permeabilität anhand des Evans Blue Dye Assays bzw. Untersuchungen zur Extravasation und Ansiedlung zirkulierender Tumorzellen vorgenommen.

4.1.1 ÜBERPRÜFUNG DER WIRKSAMKEIT VON BINDARIT ALS CCL2-INHIBITOR

Um zunächst die Wirksamkeit der Bindarit-Behandlung zur Reduzierung der Ccl2-Expression in den bestrahlten Mäuselungen zu verifizieren, wurden die Expressionslevel der Ccl2-mRNA in RNA-Isolaten der kompletten bestrahlten und unbestrahlten Lungen mit und ohne Bindarit-Behandlung mittels qRT- PCR-Analyse bestimmt.

Die Messungen zeigten einen Anstieg der Ccl2-Expression im Lungengewebe am 21. Tag nach Bestrahlung, der durch die Behandlung mit Bindarit signifikant limitiert wurde. In unbestrahlten Mäuselungen waren hingegen keine Unterschiede in den Ccl2-Expressionsleveln festzustellen. Zusätzlich wurde die Expression des hauptsächlichen Ccl2-Rezeptors CCR2 im Lungengewebe untersucht. Hier ließ sich ein tendenzieller Anstieg der Rezeptorexpression im bestrahlten Gewebe erkennen, welcher im Zuge der Behandlung mit Bindarit nicht beeinflusst wurde (Abb. 6).

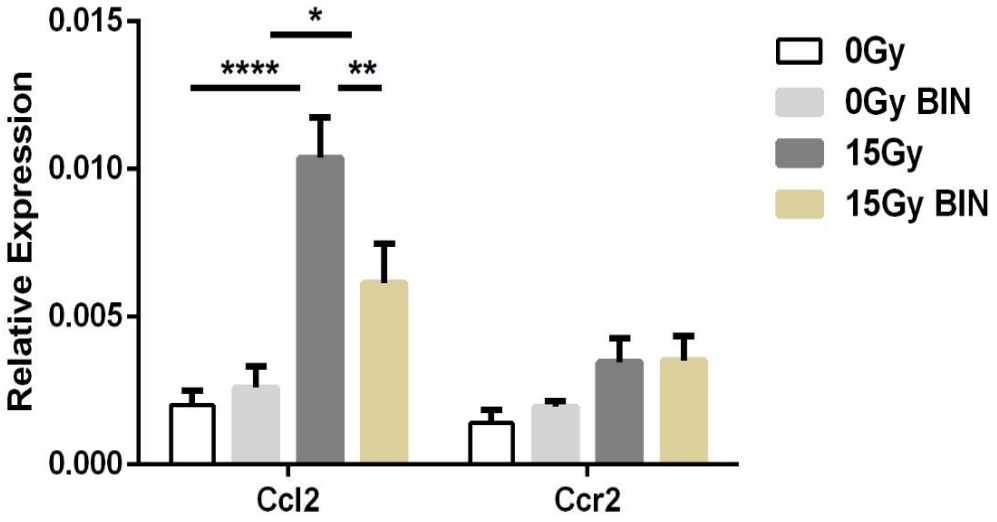

Abb. 6 Der Einfluss der Bindarit-Behandlung auf die Ccl2- und CCR2- Expression des Lungengewebes. Die Expression von Ccl2- und CCR2- mRNA wurde in RNA- Isolaten kompletter Lungen mittels qRT- PCR bestimmt. C57BL/6 Mäuse links: unbestrahlt und unbehandelt (0 Gy Ctrl); mittig links: unbestrahlt und behandelt (0 Gy BIN); mittig rechts: bestrahlt und unbehandelt (15 Gy Ctrl); rechts: bestrahlt und behandelt (15 Gy BIN). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (±SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 2-4 Individuen pro Gruppe (0 Gy Ctrl: n=6; 0 Gy BIN: n=7; 15 Gy Ctrl und 15 Gy BIN: n=6 pro Gruppe). Statistische Signifikanz: Two-way ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test. *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ****$p \leq 0.001$. Diese Abbildung wurde farblich modifiziert und entspricht der Abbildung 1D (Figure 1D) in der Publikation (Wiesemann et al., 2019).

4.1.2 EFFEKTE DER PHARMAKOLOGISCHEN CCL2-INHIBITION AUF STRAHLENINDUZIERTE SCHÄDEN DES LUNGENGEWEBES

Nachdem gezeigt wurde, dass Bindarit den Anstieg der Ccl2-Expression nach Bestrahlung effektiv limitiert, folgte die Untersuchung des therapeutischen Potenzials der pharmakologischen Ccl2-Inhibition zum Schutz vor strahleninduzierten Schäden am Gefäßsystem.

4.1.2.1 AUSWIRKUNGEN DER CCL2-INHIBITION AUF DIE MIKROVASKULÄRE FUNKTION

4.1.2.1.1 Einfluss auf die vaskuläre Permeabilität

Zur Beurteilung der vaskulären Funktion wurde am 21. Tag post radiationem die vaskuläre Permeabilität des Lungengewebes mithilfe des Evans Blue Dye Assays bestimmt. Hierzu wurde den Tieren unmittelbar vor Versuchsende der Farbstoff EBD intravenös injiziert. Die Isolierung der Lunge erfolgte dann im Anschluss nach transkardialer Perfusion der Individuen, das heißt nach Entfernung des Blutes aus dem Gefäßsystem. Der noch im Lungengewebe zurückbleibende Farbstoff ist somit als Maß für die Funktionalität (‚*leakage*‘) des Gefäßsystems anzusehen. Nach RT zeigte sich eine signifikante Zunahme der EBD-Konzentration im Lungengewebe der bestrahlten, aber unbehandelten Tiere (15 Gy Ctrl) in Relation zur unbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy Ctrl). Erfuhren die Mäuse hingegen nach der Bestrahlung eine Ccl2-Inhibitionsbehandlung (15 Gy BIN), blieb der Anstieg der EBD-Extravasation ins Lungeninterstitium aus und es wurden EBD-Konzentrationen auf dem Niveau der unbestrahlten Kontrollgruppen (0 Gy Ctrl; 0 Gy BIN) ermittelt. Die Ccl2-Inhibition beeinflusste die EBD-Extravasation bei unbestrahlten Tieren (0 Gy BIN) hingegen nicht (Abb. 7A). Auch optisch konnten diese Resultate anhand der intensiven Blaufärbung des unbehandelten Lungengewebes nach Bestrahlung im Vergleich zu einem blau nuancierten Gewebe nach Ccl2-Inhibition verdeutlicht werden (Abb. 7B).

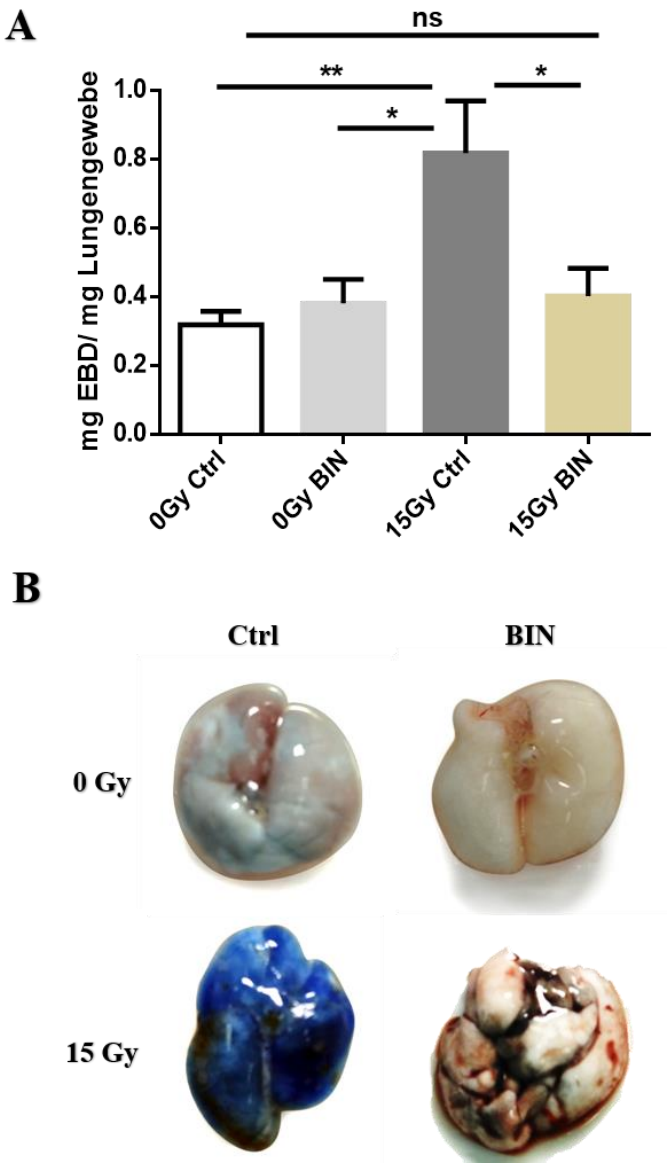

Abb. 7 Der Einfluss der Bindarit-Behandlung auf die vaskuläre Permeabilität des Lungengewebes.
3 Wochen nach Bestrahlung wurde das Ausmaß der vaskulären Permeabilität unbehandelter und behandelter Versuchsgruppen durch Nachweis der Extravasation des Evans Blue Farbstoffs (EBD) aus dem Gefäßlumen in das Lungeninterstitium analysiert. A) Quantitative Analyse mittels spektralphotometrischer Messungen der EBD-Konzentration in Relation zum Gewicht des Lungengewebes. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (±SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten (0 Gy Ctrl: n=17; 0 Gy BIN: n=10; 15 Gy Ctrl: n=15; 15 Gy BIN: n=10). Statistische Signifikanz: One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-hoc Test. *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ns= nicht signifikant. Diese von mir angefertigte Abbildung entspricht in farblich modifizierter Form der Abbildung 1I (Figure 1I) in der Publikation (Wiesemann et al., 2019). B) Repräsentative photographische Aufnahmen jeweils einer kompletten Lunge der einzelnen Versuchsgruppen. Je höher die Extravasation des EBD, umso intensiver war das Ausmaß der Blaufärbung des Lungengewebes und desto größer ist die vaskuläre Permeabilität in der jeweiligen Lunge.

4.1.2.1.2 Einfluss auf die Extravasation und Ansiedlung zirkulierender Tumorzellen

Die Extravasation von Tumorzellen stellt einen bedeutenden Schritt in der hämatogenen Metastasierungskaskade dar, der durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität und beschädigte Gefäßstrukturen begünstigt wird. Nachdem zuvor gezeigt wurde, dass die Ccl2-Inhibition mittels Bindarit die strahleninduzierte Steigerung der Gefäßpermeabilität verhindern kann, wurde nun untersucht, ob die durch Bindarit limitierte Dysfunktion der Gefäße auch vor verstärkter Extravasation zirkulierender Tumorzellen und anschließender Metastasenbildung ins Lungengewebe als akute Folge der Bestrahlung schützt.

Hierzu wurden den Tieren am 21. Tag nach Bestrahlung bzw. Scheinbestrahlung und Behandlung syngene Tumorzellen (B16F10 Melanomzellen) in die Schwanz-Vene injiziert. 14 Tage nach der Injektion wurde das Lungengewebe isoliert, histologische Schnitte der vollständigen Lunge angefertigt und die Anzahl formierter Tumorzellverbände pro Lunge unter dem Mikroskop quantifiziert, um das Ausmaß der Extravasation und der Ansiedlung zirkulierender Tumorzellen zu bestimmen (Abb. 8B).

Das Lungengewebe bestrahlter Tiere ohne Ccl2-Inhibitor-Behandlung (15 Gy Ctrl) zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl extravasierter Tumorzellen und einer anschließenden Mikrometastasenbildung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy Ctrl). Im Gegensatz hierzu wies das Lungengewebe der bestrahlten Tiere mit BIN-Behandlung (15 Gy BIN) keine erhöhte Anzahl formierter Tumorzellen auf. Vielmehr zeigte sich unter den BIN-behandelten Tieren kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der bestrahlten Gruppe (15 Gy BIN) und den unbestrahlten Kontrollgruppen (0 Gy Ctrl/ 0 Gy BIN) (Abb. 8A).

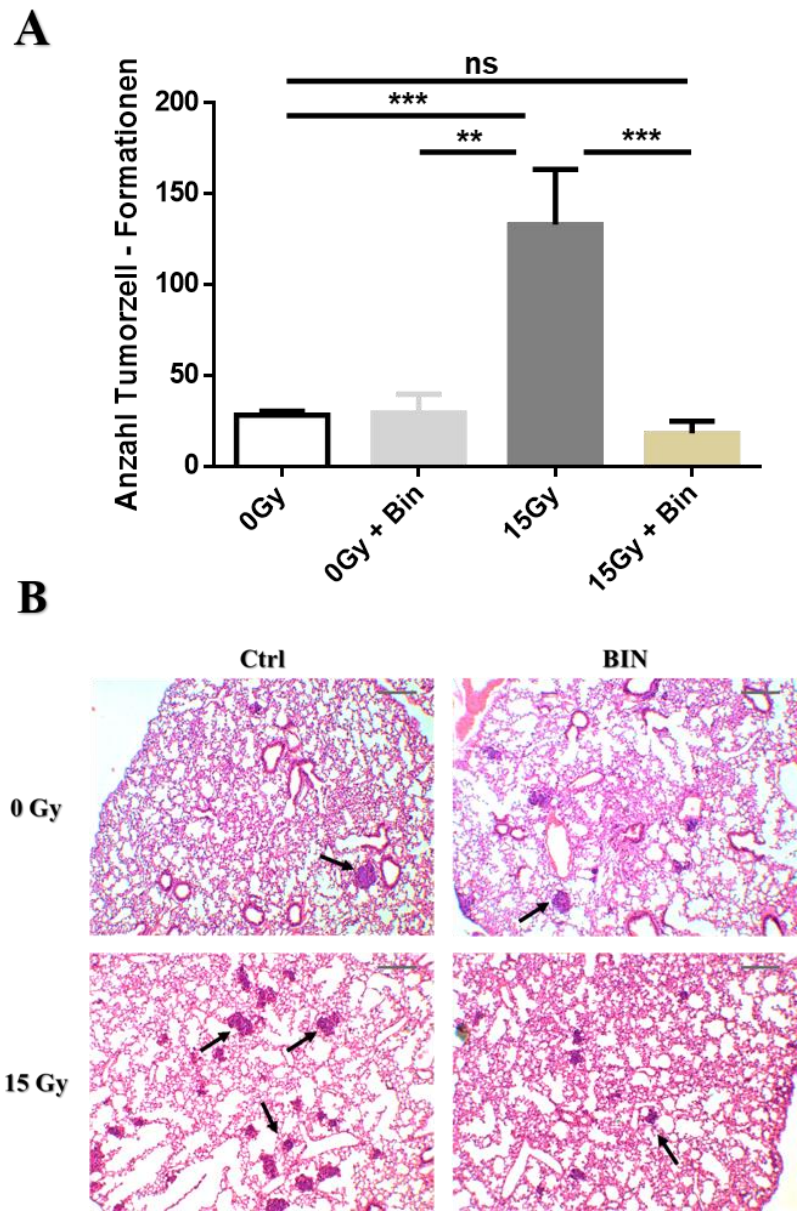

Abb. 8 Der Einfluss der Bindarit-Behandlung auf die Extravasation zirkulierender Tumorzellen ins Lungengewebe.
Analyse der Tumorzellansiedlung im Lungengewebe am 14. Tag nach Zellinjektion. Darstellung der Bindarit-behandelten Gruppen mit und ohne Bestrahlung (0 Gy BIN; 15 Gy BIN) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen (0 Gy Ctrl; 15 Gy Ctrl). A) Die Anzahl der Tumorzell- Formationen wurde aus Gewebeschnitten vollständig isolierter Lungen unter dem Mikroskop quantifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (±SEM) aus einem von drei unabhängigen Experimenten (0 Gy Ctrl: n=6; 0 Gy BIN: n=5; 15 Gy Ctrl: n=5; 15 Gy BIN: n=6). Statistische Signifikanz: One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-hoc-Test. $^{**}p \leq 0.01$, $^{***}p \leq 0.001$, ns= nicht signifikant. B) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Versuchsgruppen zur optischen Darstellung der Tumorzellformationen in den Lungengewebeschnitten. Pfeile zeigen exemplarisch auf Tumorzellformationen. Maßstab = 100 µm. Diese von mir angefertigten Abbildungen entsprechen der Abbildung 1J (Figure 1J) in der Publikation (Wiesemann et al., 2019).

4.1.2.1.3 Einfluss auf verschiedene pulmonale Zellen

Um die Funktionalität des vaskulären Lungensystems weiter zu charakterisieren, wurden zum Dreiwochenzeitpunkt nach Bestrahlung Zellsuspensionen aus frisch isoliertem Lungengewebe mittels Durchflusszytometrie (in Zusammenarbeit mit Dr. Wirsdörfer, Institut für Zellbiologie, Universität Duisburg-Essen) analysiert. Innerhalb der Zellsuspension wurden die Zellen zunächst in $CD45^+$ - und $CD45^-$ - Zellen differenziert.

Zur Begutachtung des mikrovaskulären Systems wurden die EC mithilfe des EC-Markers CD31 (PECAM1) innerhalb der $CD45^-$ - Population identifiziert und ihr Anteil im Lungengewebe bestimmt. Die Auswertung der EC-Anzahl zeigte zu diesem Zeitpunkt keinen Unterschied zwischen dem bestrahlten und dem unbestrahlten Lungengewebe. Auch die Behandlung mit BIN beeinflusste den Endothelzellanteil im Lungengewebe nicht. Zusätzlich wurde die Expression von VEGFR 2 auf den $CD31^+$ Zellen analysiert, um Rückschlüsse auf das Proliferationspotenzial der Endothelzellen zu ziehen. Bekanntermaßen steuert der endotheliale Wachstumsfaktorrezeptor 2 (VEGFR 2) als primärer Signalempfänger der vaskulär endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) die endotheliale Migration und Proliferation und somit die Angio- und Vaskulogenese (Shibuya, 2011; Miettinen et al., 2012). Interessanterweise zeigte sich hier, dass die EC des unbehandelten Gewebes den VEGFR 2 nach RT tendenziell hochregulierten, wohingegen die Bindarit-Behandlung die Expression wieder zu normalisieren schien. Demnach zeigen die Messungen zwar eine unveränderte Anzahl der endothelialen Zellen, sie sprechen jedoch für eine Beeinflussung des EC-Zustands in einen aktivierten, „angiogenen“ EC-Typ (VEGFR 2-Expression). Die entsprechende Abbildung, angefertigt durch meine Betreuerin PD Dr. Klein, wird in Abb. 16 des Anhangs auf Seite 85 gezeigt und ist in der entsprechenden Publikation (Wiesemann et al., 2019) als Abbildung 1H (Figure 1H) gezeigt.

Durch die Messung der CD45-exprimierenden Zellen ($CD45^+$) wurden auch die in das Lungengewebe extravasierten, d.h. infiltrierten, Immunzellen infolge der Bestrahlung ermittelt und anhand der CD11b-, Ly6C- und Ly6G- Ausprägung als Makrophagen (CD11b+), Monozyten (Ly6C+) und Granulozyten (Ly6G+) weiter differenziert.
Das Lungengewebe bestrahlter Tiere (15 Gy Ctrl) zeigte im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy Ctrl) eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils der CD11b(+)- und insbesondere der Ly6C(+)- Zellen und einen tendenziellen Anstieg der

Ly6G(+)-Zellen, wohingegen das Lungengewebe von BIN-behandelten Tieren nach der Bestrahlung einen niedrigeren Immunzellanteil aufwies.
Folglich verdeutlichen die Ergebnisse eine verstärkte strahleninduzierte vaskuläre Permeabilität. Die entsprechende Abbildung, angefertigt durch meine Betreuerin PD Dr. Klein, wird in Abb. 17 des Anhangs auf Seite 85 gezeigt und findet sich in der entsprechenden Publikation (Wiesemann et al., 2019) als Abbildung 1E (Figure 1E) wieder.

4.1.2.1.4 Einfluss auf die mikrovaskuläre Struktur und Morphologie

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen isolierter Lungenproben, welche in Zusammenarbeit mit PD Dr. Jastrow (Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen) und meiner Betreuerin PD Dr. Klein (Institut für Zellbiologie, Universität Duisburg-Essen) angefertigt wurden, wurden auch die morphologischen Veränderungen der Blutgefäße erfasst. Im Einklang mit den funktionellen Veränderungen zeigten die Aufnahmen eine unregelmäßige Gefäßstruktur sowie eine morphologische Beeinträchtigung der Endothelzellen (EC) nach RT, die durch zahlreiche Vakuolen und teilweise abgebaute Mitochondrien charakterisiert war. Die Bilder der BIN-behandelten Mäuselungen zeigten hingegen eine regelrechte Gefäßstruktur und eine unversehrte EC-Morphologie des Lungengewebes nach RT. Die entsprechende Abbildung, angefertigt durch meine Betreuerin PD Dr. Klein, wird in Abb. des Anhangs auf Seite 86 gezeigt und findet sich in der entsprechenden Publikation (Wiesemann et al., 2019) als Abbildung 1F (Figure 1F) wieder.

4.1.2.2 DAS POTENZIAL DER PHARMAKOLOGISCHEN CCL2-INHIBITION

Die Ergebnisse zeigen eine deutlich strahleninduzierte Steigerung der vaskulären Permeabilität (Dysfunktion) des Lungengewebes, die mit strukturellen und morphologischen Defekten des Gefäßsystems einhergeht. Zudem bleibt festzuhalten, dass eine pharmakologische Blockierung der Ccl2-Signalgebung mittels Bindarit post radiationem die MSC-bekannten Effekte „imitiert“, indem sowohl die Gefäßpermeabilität als auch die Extravasation von Blutbestandteilen wie Albumin (EBD), Immunzellen (limitierte Inflammation) und Tumorzellen (limitierte Metastasierung) als auch die Endothelzell- und Gefäßmorphologie günstig beeinflusst wird. Insgesamt betont dies die Hypothese eines Ccl2-vermittelten Pathomechanismus und unterstreicht das Potenzial der Ccl2-Signalhemmung als schützenden Faktor vor strahleninduzierten Lungenschäden in der akuten Phase nach Bestrahlung.

4.1.3 AUSWIRKUNGEN DER CCL2-INHIBITION AUF SENESZENZ-ASSOZIIERTE MERKMALE

In den Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die protektiven Effekte der MSC-Therapie mit einer reduzierten Seneszenz-Aktivität im Bronchialepithel einhergehen (Klein et al., 2016). Zudem ist bekannt, dass Ccl2 zur Gruppe der SASP-assoziierten Faktoren gehört. Nachdem die Ergebnisse aus 4.1.1 bereits aufzeigen konnten, dass die Bindarit-Behandlung die Expression dieses SASP-Faktors reduziert, wurde nun untersucht, ob diese Behandlung auch die Seneszenz-Aktivität im Bronchialepithel beeinflusst.

Zum mikroskopischen Nachweis seneszenter Zellen wurde die Aktivität des gängigen Seneszenzmarkers bzw. des Enzyms „Seneszenz-assoziierte-beta-Galaktosidase“ (SA- betagal) in gefrorenen Lungengewebeschnitten 21 Tage nach Bestrahlung mittels Färbung visualisiert. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe wurde im bestrahlten Gewebe eine verstärkte Galaktosidase-Aktivität überwiegend in Zellen des Bronchialepithels beobachtet, die durch eine Behandlung mit Bindarit, visuell betrachtet, nicht beeinflusst wurde **(**Abb. 9A). Zur Quantifizierung der gesamten Seneszenz-Aktivität im Lungengewebe wurde die Expression des zellulären Seneszenzmarkers Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (Cdkn1a/p21) auf mRNA-Ebene erfasst. Die Messungen zeigten einen Anstieg der Cdkn1a-Level im Lungengewebe nach Bestrahlung, aber keine signifikante Veränderung des Seneszenzmarkers nach der Behandlung mit Bindarit (Abb. 9B).

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Inhibition des Ccl2-Signalwegs das Auftreten strahleninduzierter Seneszenz im Lungengewebe nicht beeinflusst, aber (wie oben gezeigt) die strahleninduzierte Hochregulation des SASP-Faktors Ccl2 limitiert und somit ein Seneszenz-assoziierter Effekt günstig beeinflusst wird.

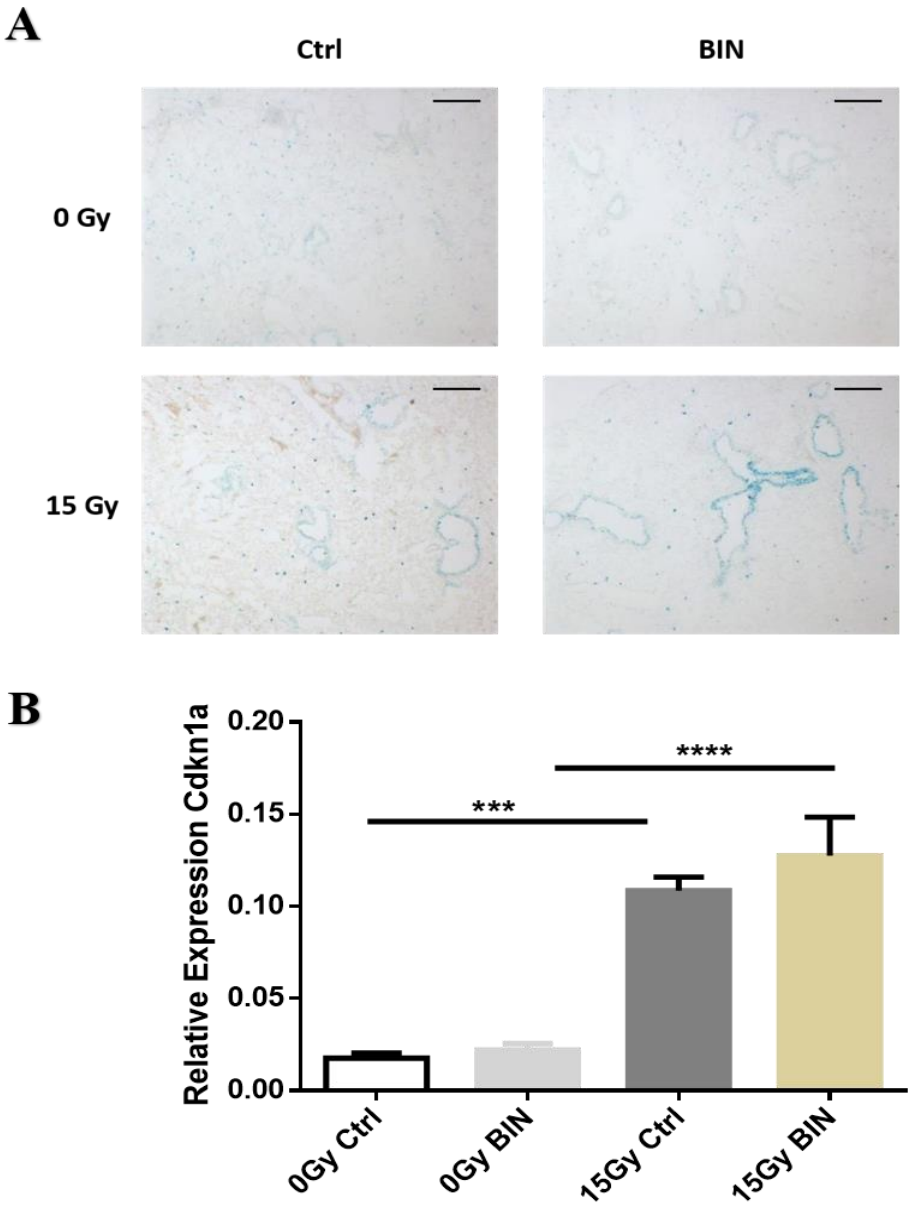

Abb. 9 Der Einfluss der Bindarit-Behandlung auf die zelluläre Seneszenz des Lungengewebes. Untersuchung zellulärer Seneszenz am 21.Tag nach Bestrahlung und Inhibition der Ccl2- Produktion durch die Behandlung mit Bindarit. (A) Repräsentative Bilder mikroskopischer Aufnahmen der Seneszenz- assoziierten-beta-Galaktosidase- Aktivität (SA- betagal) in gefrorenen Lungengewebeschnitten aus drei unabhängigen Experimenten. Die Intensität der Blaufärbung stellt das Ausmaß der Seneszenz- Aktivität im Gewebe dar. Maßstabsbalken 100 µm. Diese Abbildung entspricht der Abbildung 2A (Figure 2A) in der Publikation (Wiesemann et al., 2019). (B) Messung der Cdkn1a mRNA- Level (Seneszenzmarker) aus RNA- Isolaten kompletter Lungen mittels qRT- PCR. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (±SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten (0 Gy Ctrl: n=5; 0 Gy BIN: n=7;15 Gy Ctrl und 15 Gy BIN: n=6 je Gruppe; 0 Gy BIN: n =7). Statistische Signifikanz: One-way ANOVA gefolgt von einem post-hoc Tukey Test. ***$p \leq 0.005$, ****$p \leq 0.001$. Diese Abbildung entspricht der Abbildung 2C (Figure 2C) in der Publikation (Wiesemann et al., 2019).

4.2 GENETISCHE INHIBITION DES CCL2-CCR2 SIGNALWEGS DURCH CCR2-KNOCKOUT (CCR2- DEFIZIENTE MÄUSE)

Anhand der Versuche mit Bindarit konnte das therapeutische Potenzial einer gehemmten Ccl2-Signalgebung als protektive Maßnahme vor strahleninduzierten Schäden des Lungengewebes herausgearbeitet werden. Um jedoch die Bedeutung des Ccl2-Signalwegs für strahleninduzierte Schäden des Lungengewebes zu untermauern sowie weiter zu charakterisieren, wurden zusätzlich die Auswirkungen einer kontinuierlichen Aufhebung der Ccl2-Signalrezeption mittels genetischer Deaktivierung des Ccl2-Hauptrezeptors untersucht. Hierfür wurden die Versuche mit C-C Chemokin- Rezeptor- 2 defizienten Mäusen (CCR2-KO), d.h. Mäuse, die defizient für den Haupt-Ccl2-Rezeptor sind, im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp- Mäusen (WT), die CCR2 weiterhin besitzen, durchgeführt.

4.2.1 EINFLUSS AUF DIE VASKULÄRE FUNKTION UND DIE STRUKTURELLEN CHARAKTERISTIKA DES GEFÄßSYSTEMS IM LUNGENGEWEBE

Zunächst wurde das Ausmaß der vaskulären Permeabilität als Maß der vaskulären Funktion am 21. Tag post radiationem mithilfe des Evans Blue Dye Assays (wie oben beschrieben) verifiziert. Im Lungengewebe der WT-Mäuse bestätigte sich der signifikante Anstieg der EBD-Konzentration nach Bestrahlung. Demgegenüber wiesen die Lungen der CCR2-defizienten Tiere nach Bestrahlung (15 Gy KO) eine signifikant niedrigere Farbstoff-Konzentration im Vergleich zu den Lungen bestrahlter WT-Mäuse (15 Gy WT) auf. Darüber hinaus lag die EBD-Konzentration im Lungengewebe CCR2-defizienter Tiere (CCR2-KO) nach XRT (15 Gy KO) auf dem gleichen Niveau wie bei der unbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy KO) (Abb. 10A).

Die durchflusszytometrischen Messungen des Lungengewebes der WT- und KO-Mäuse ergaben auch hier eine reguläre Anzahl endothelialer Zellen im Lungengewebe trotz CCR2-Defizienz. Ebenso zeigte sich ein Anstieg der VEGFR2-Expression auf den CD31-exprimierenden Zellen des Lungengewebes bestrahlter WT-Mäuse. Interessanterweise blieb die Erhöhung der VEGFR2-Expression auf den Zellen der bestrahlten CCR2-KO Mäusen jedoch aus (Abb. 10B)

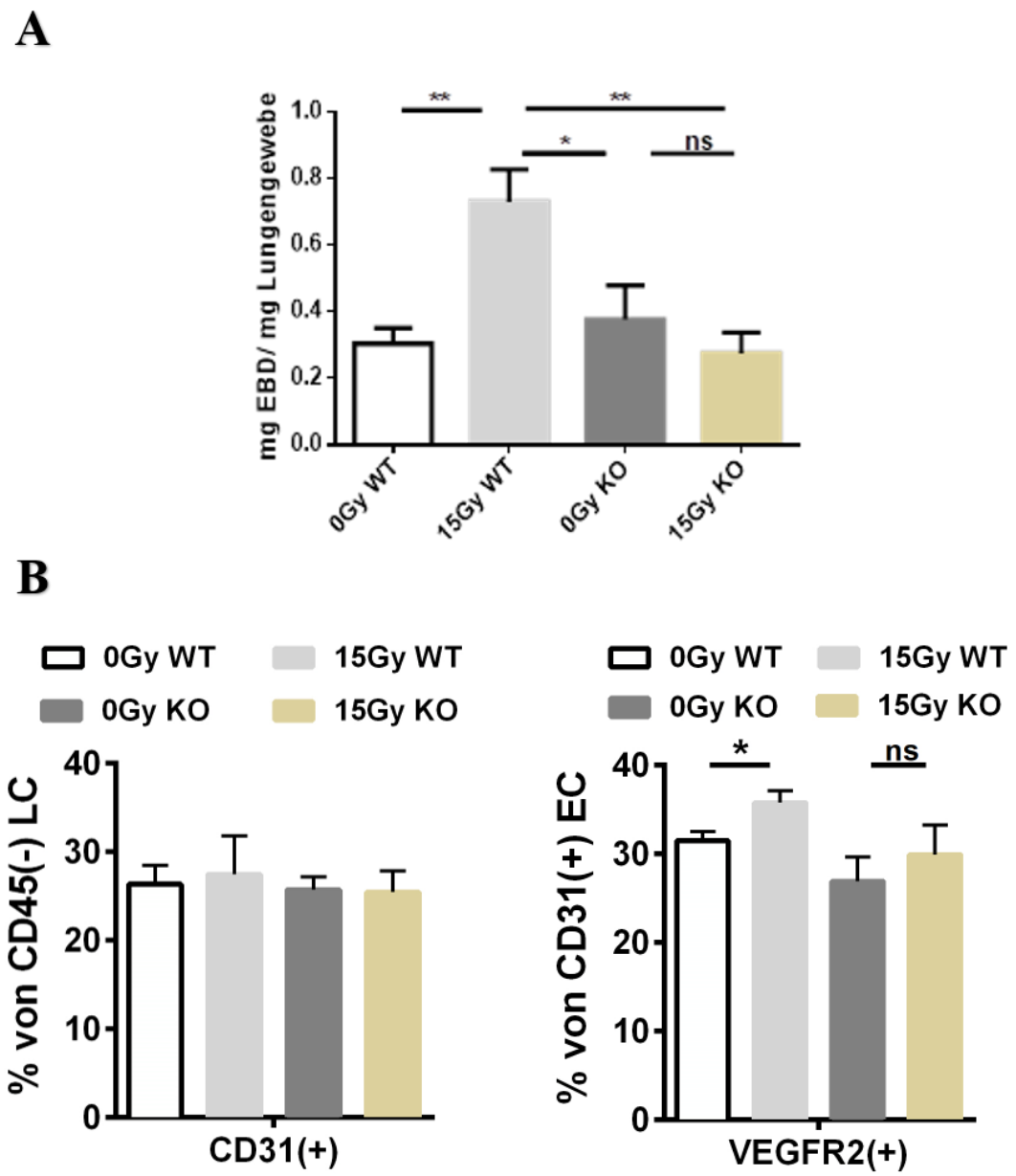

Abb. 10 Der Einfluss der CCR2-Defizienz auf die vaskuläre Funktion und auf strukturelle Charakteristika des Gefäßsystems im Lungengewebe.
A) Bestimmung der vaskulären Permeabilität durch Nachweis der Extravasation des Evans Blue Farbstoffs (EBD) aus dem Gefäßlumen in das Lungeninterstitium 3 Wochen nach Bestrahlung. Quantitative Analyse mittels spektralphotometrischer Messungen der EBD-Konzentration in Relation zum Gewicht des Lungengewebes. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (±SEM) aus einem von zwei unabhängigen Experimenten, (0 Gy WT: n=11; 15 Gy WT: n=9; 0 Gy KO: n=6; 15 Gy KO: n=7). Statistische Signifikanz: One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-hoc Test. *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ns = nicht signifikant. Diese von mir angefertigte Abbildung entspricht der Abbildung 3A (Figure 3A) in der Publikation (Wiesemann et al., 2019). B) Messung der Endothelzellanzahl (links) und der VEGFR2-Expression (rechts) in CCR2-KO-Mäusen 3 Wochen nach Bestrahlung. Die Endothelzellen wurden mit CD31/PECAM 1- und die VEGFR 2-Expression mit VEGFR 2-Antikörpern identifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ±SEM (n=6-7 pro Gruppe). Statistische Signifikanz: t-Test, *$p \leq 0.05$, ns=nicht signifikant. Diese von mir angefertigte Abbildung entspricht einem Teil der Abbildung 3C (Figure 3C) in der Publikation (Wiesemann et al., 2019).

4.2.2 EINFLUSS AUF DIE ANSIEDLUNG ZIRKULIERENDER TUMORZELLEN UND IMMUNZELLEN INS LUNGENGEWEBE

Ebenso wurden die Auswirkungen der CCR2-Defizienz auf die Extravasation zirkulierender Tumorzellen und die Infiltration immunologischer Zellen ins Lungengewebe analysiert. Auch hier ließ sich nach Bestrahlung eine signifikant erhöhte Anzahl formierter Tumorzellverbände im Lungengewebe der WT-Mäuse (15 Gy WT) nachweisen, wohingegen die CCR2-Defizienz die Ansiedlung zirkulierender Tumorzellen nach XRT auf das Niveau der unbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy KO) begrenzte (Abb. 11A). Die durchflusszytometrische Analyse konnte in beiden Gruppen (WT und KO) einen signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils CD11b (+) myeloischer Zellen der CD45 (+) Leukozyten nach Bestrahlung nachweisen. Jedoch war der Anteil im Lungengewebe bestrahlter WT-Mäuse höher als im Lungengewebe bestrahlter CCR2-KO-Mäuse (Abb. 11B links). Zudem zeigte sich ein prozentual höherer Anteil von Ly6C (+)-Zellen im bestrahlten Lungengewebe der WT-Mäuse im Vergleich zu dem pulmonalen Gewebe der CCR2-KO Mäuse (Abb. 11B rechts).

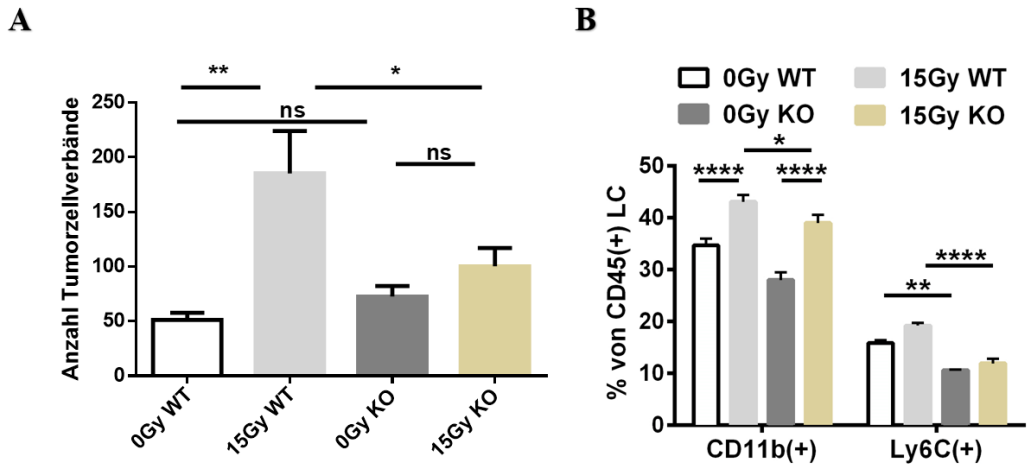

Abb. 11 Der Einfluss der CCR2-Defizienz auf die Ansiedlung zirkulierender Tumorzellen und auf die Immunzellinfiltration ins Lungengewebe.
A) Die Injektion von zirkulierenden Tumorzellen in die Lunge wurde 21 Tage nach der Bestrahlung vorgenommen. Nach weiteren 14 Tagen wurden die Lungen einer Lungenhistologie unterzogen und die Metastasierung in ganzen Lungenabschnitten quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte aus einem von drei unabhängigen Experimenten (0 Gy WT: n=5, 15 Gy WT: n=5, 0 Gy KO: n=8, 15 Gy KO: n=6). Statistische Signifikanz: One-way ANOVA gefolgt von einem Bonferroni- post-hoc Test *p ≤ 0.05, **p≤ 0.01,ns= nicht signifikant. Die finale Variante (wie in der Publikation gezeigt) wurde durch noch weitere biologische Replikate komplettiert und entspricht der Abbildung 3B (Figure 3B) in der Publikation (Wiesemann et al., 2019). B) Aus der Zellsuspension von frisch isoliertem Lungengewebe wurden die Myeloidzellen durch die $CD45^+$- Expression zusammen mit der $CD11b^+$- und $Ly6C^+$- Expression mittels FACS-Analyse identifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM (n= 6-7 für jede Gruppe). Statistische Signifikanz: Two-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-hoc Test. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ****p ≤ 0.001. Die von mir angefertigte Abbildung entspricht einem Teil der Abbildung 3C (Figure 3C) in der Publikation (Wiesemann et al., 2019).

4.3 DAS POTENZIAL DER CCL2-CCR2-SIGNALWEGBLOCKIERUNG ALS SCHÜTZENDE MASSNAHME VOR STRAHLENINDUZIERTER GEFÄßFEHLFUNKTION

Zusammenfassend stützen diese Ergebnisse die Annahme, dass eine therapeutische Hemmung der Ccl2-CCR2-Signalisierung ein hohes Potenzial hat, strahleninduzierten Gefäßfehlfunktionen entgegenzuwirken und damit assoziierte Folgeschäden abzuschwächen. Neu zeigte sich die Beobachtung, dass ein Anstieg der VEGFR2-Expression der Endothelzellen durch die Unterbindung der Ccl2-CCR2-Signalisierung ausbleibt. Interessanterweise steht sowohl die Expression von VEGFR2 als auch die Expression von Ccl2 im Zusammenhang mit angiogenen Prozessen, sodass im Folgenden die Auswirkungen einer Stimulation mit Ccl2 auf die Proliferation und Migration der Endothelzellen genauer untersucht wurden.

4.4 AUSWIRKUNGEN EXOGENER CCL2- STIMULATION AUF DIE ENDOTHELZELLEN

Die beschriebenen *in vivo* Untersuchungen wurden durch entsprechende *in vitro* Untersuchungen komplettiert. Um den Einfluss der Ccl2-Stimulation auf die Zellproliferation, den Zelltod und das Zellüberleben endothelialer Zellen in Abhängigkeit von der Bestrahlung zu spezifizieren, wurden *in vitro* Versuche mit kultivierten Endothelzellen unter exogener Zugabe von rekombinantem Ccl2 durchgeführt. Für die Versuche wurden als Endothelzell-Modell kultivierte AS-M5 Zellen verwendet. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde je ein Set in dem Standardmedium (NGM), ein Set in Ccl2-supplementiertem Medium (20 ng Ccl2 / ml) und ein Set in VEGF-supplementiertem Medium (10 ng VEGF / ml), als Positivkontrolle endothelialer Zellaktivierung, für weitere 48h – 96h kultiviert. Als Referenz wurden unbestrahlte Zellen unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

4.4.1 DER EINFLUSS VON CCL2 AUF DAS ZELLÜBERLEBEN UND DIE PROLIFERATIVE AKTIVITÄT

Zur Quantifizierung vitaler Zellen wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt, welche abgestorbene und perforierte Zellen dunkelblau färbt, sodass die lebenden und die toten Zellen voneinander unterschieden werden können. Abbildung 12 zeigt die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl toter und lebender Zellen der verschiedenen Versuchsgruppen mit und ohne Bestrahlung. Erwartungsgemäß ließ sich eine höhere Gesamtzellzahl in den unbestrahlten Zellgruppen im Vergleich zu den bestrahlten Zellgruppen sowohl nach 48h als auch nach 96h nachweisen. Bei Betrachtung der Ccl2-betonten Kultivierungsgruppen lag die Gesamtzellzahl unter bestrahlungsfreien Bedingungen (0 Gy) nach 48h auf dem Niveau des normalen Standardmediums, während sich in der VEGF-stimulierten Zellgruppe erwartungsgemäß eine stärkere Zunahme insbesondere der Lebendzellzahl zeigte. Nach 96h belief sich die Gesamtzellzahl der in Standardmedium kultivierten Zellen und der VEGF-stimulierten Zellen auf einem etwa gleich hohen Niveau, während die Gesamtzellzahl der Ccl2-stimulierten Zellen tendenziell niedriger ausfiel. Wurden die Zellen jedoch zuvor mit 10 Gy bestrahlt, so schien es, dass die Lebendzellzahl unter Ccl2-Stimulation zunächst (48h) stärker zunahm als in den anderen beiden Gruppen, während die Zahl toter Zellen in allen drei Gruppen in etwa gleich hoch war. 96h nach Bestrahlung (10 Gy) lag die Gesamtzellzahl in der Ccl2-stimulierten Gruppe dann jedoch wieder unter der Zellzahl sowohl der NGM- als auch der VEGF-kultivierten Zellgruppen. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Proliferation bestrahlter Endothelzellen durch die Stimulation mit Ccl2 zunächst angeregt wird und so zu einer Zunahme der Zellzahl führt. Anhand dieser Untersuchungen wird jedoch nicht deutlich, ob die niedrigere Gesamtzellzahl 96h nach Bestrahlung und Ccl2-betonter Kultivierung auf einer Abnahme der Zellproliferation oder dem Einsetzen eines endothelialen Ruhezustands bzw. Zelltods im Verlauf beruht. Demnach sollte im Folgenden das Proliferationsverhalten und Zellüberleben weiter untersucht werden.

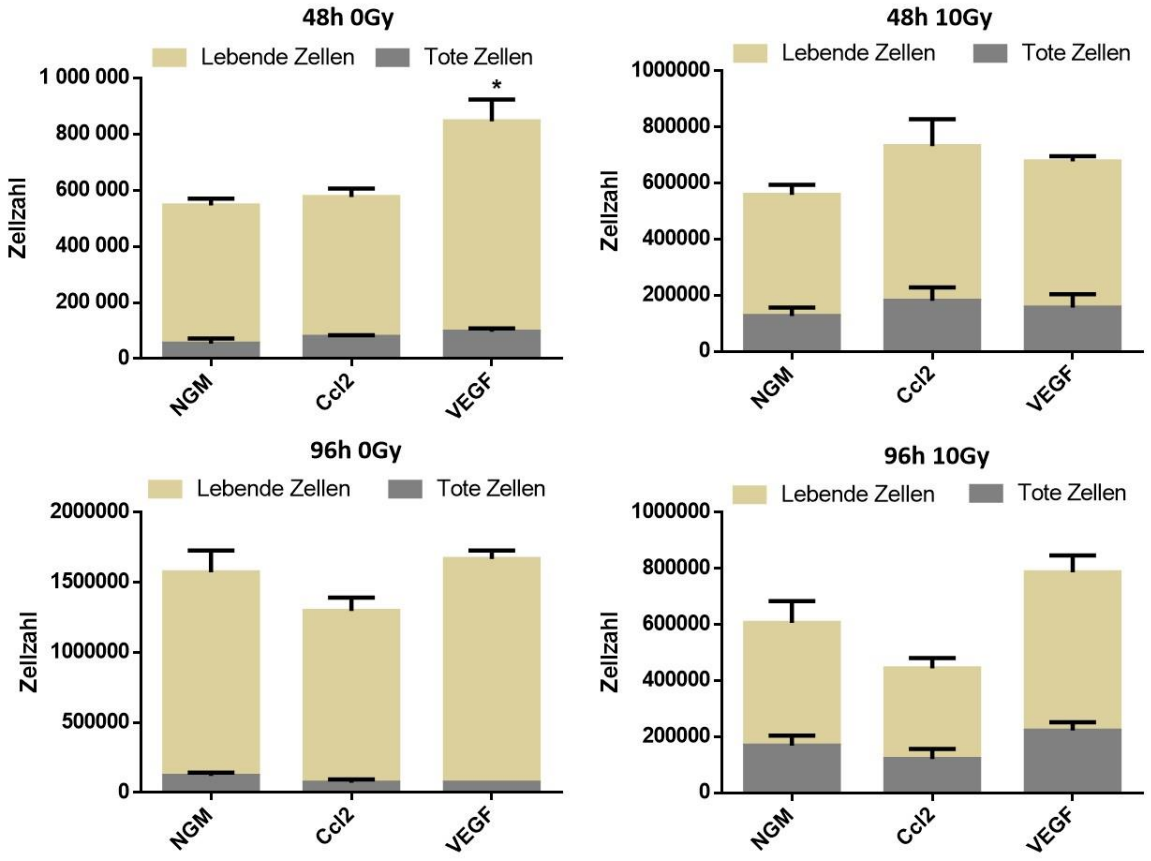

Abb. 12 Einfluss von Ccl2 auf die Zellviabilität endothelialer Zellen.
Dargestellt ist die absolute Anzahl lebender und toter Zellen der unterschiedlichen Behandlungs- und Bestrahlungsregimes. Es wurde eine Ccl2-Konzentration von 20 ng/ ml und eine VEGF-Konzentration von 10ng/ml eingehalten. Links oben: 48h nach Behandlung ohne Bestrahlung. Oben rechts: 48h nach Bestrahlung und Behandlung. Unten links: 96h nach Behandlung ohne Bestrahlung. Unten rechts: 96h nach Behandlung und Bestrahlung. Gemessen in Duplikaten. Statistische Signifikanz: Two-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-hoc Test. *$p \leq 0.05$.

4.4.2 DER EINFLUSS VON CCL2 AUF DEN APOPTOSEGRAD ENDOTHELIALER ZELLEN

Mittels Durchflusszytometrie wurde zunächst der Anteil apoptotischer Zellen durch Messung des SubG1-Anteils im Kurzzeitversuch (96h) nach der Bestrahlung mit anschließender Supplement-Behandlung (Ccl2, VEGF) bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass die SubG1-Fraktion in allen Versuchsgruppen nach der Bestrahlung signifikant anstieg. Im Vergleich zur Kontrollgruppe deutete sich zudem in den Versuchsgruppen, die über 96h mit Ccl2 bzw. VEGF stimuliert wurden, eine tendenziell höhere Fraktion an apoptotischen Zellen an.

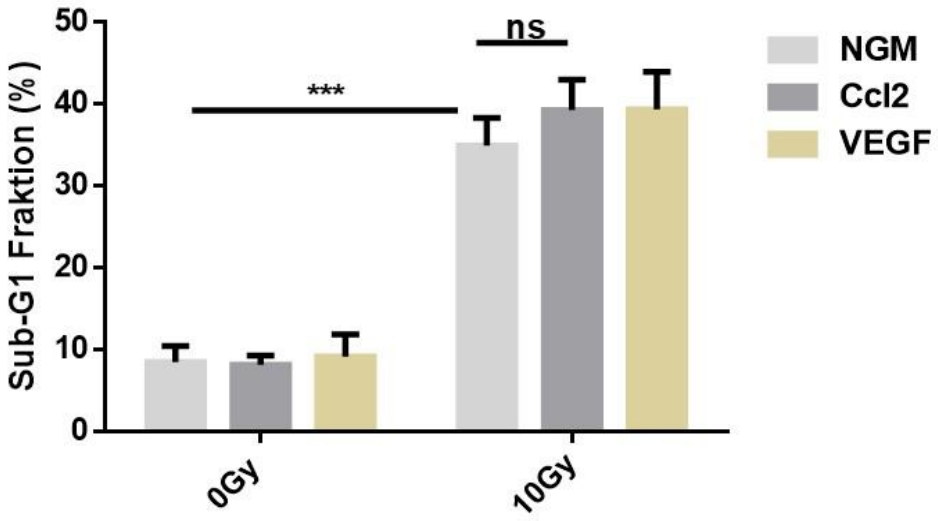

Abb. 13 Der Einfluss von Ccl2 auf den Apoptosegrad pulmonaler Endothelzellen.
Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch Messung des SubG1-Anteils im Kurzzeitversuch 96h nach Bestrahlung in den einzelnen Versuchsgruppen quantifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aus einem von drei unabhängigen Experimenten (n=3 für jede Gruppe). Statistische Signifikanz: Two-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-hoc Test. ***$p \leq 0.005$. Diese von mir angefertigte Abbildung entspricht der Abbildung S4B (supplementary Figure S4B) in der Publikation (Wiesemann et al., 2019).

4.4.3 DER EINFLUSS VON CCL2 AUF DAS LANGZEITÜBERLEBEN KLONOGENER ENDOTHELZELLEN

Mithilfe eines Kolonie-Bildungs-Assays wurde ferner das Proliferationsverhalten und das Überleben der Endothelzellen in Abhängigkeit von der Bestrahlung und der jeweiligen Behandlung im Langzeitverlauf analysiert. Hierzu wurde die Überlebensfraktion am 10. Tag nach Bestrahlung und durchgeführter Supplement-Gabe in den einzelnen Versuchsgruppen ermittelt. Erwartungsgemäß stellte sich in allen Gruppen bei zunehmender Strahlenbelastung ein Rückgang koloniebildender Zellen dar. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Anzahl der Endothelzellen, welche die Bestrahlung überleben und eine Kolonie bilden konnten, in den Ccl2- stimulierten Proben sowie auch in den VEGF-behandelten Endothelzellen, im Vergleich zu den Zellen unter NGM-Kultivierung, erheblich vermindert war.

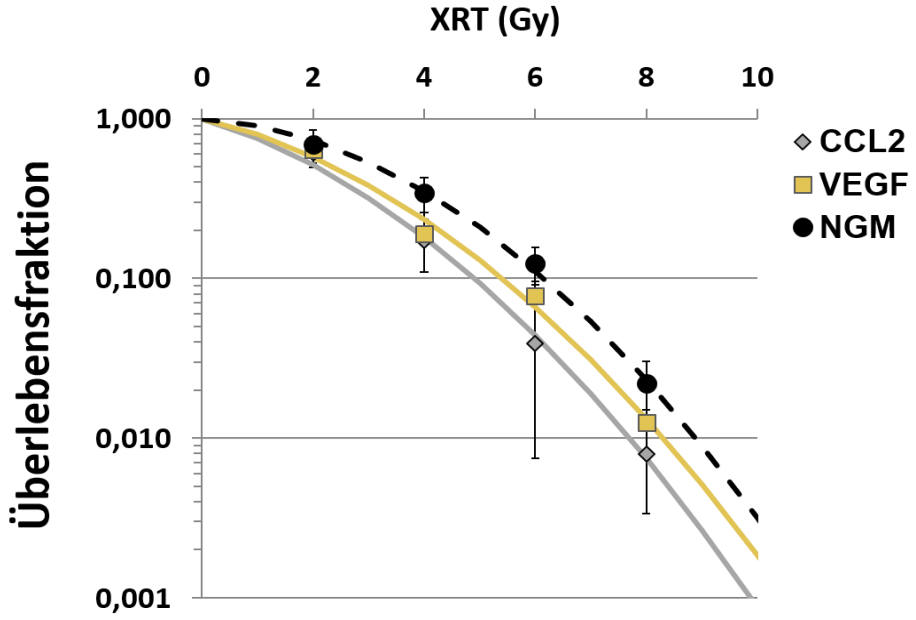

Abb. 14 Der Einfluss von Ccl2 auf das Langzeitüberleben pulmonaler Endothelzellen.
AS-M5-Zellen wurden für den Koloniebildungsassay plattiert, mit den angegebenen Strahlendosen bestrahlt und anschließend für weitere 10 Tage in NGM oder in Ccl2- bzw. VEGF-supplementiertem Medium kultiviert. Die Daten zeigen die Überlebensfraktionen aus drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM).

4.4.4 DER EINFLUSS VON CCL2 AUF DEN PHÄNOTYP ENDOTHELIALER ZELLEN

In Zusammenarbeit mit meiner Betreuerin PD Dr. Klein wurden Western-Blot Analysen zur Bestimmung der Proteinlevel von Zelladhäsionsstrukturen sowie von Angiogenese- und Proliferationsmarkern in den unterschiedlich kultivierten Endothelzellproben zum 96h Zeitpunkt durchgeführt.
Demnach zeigte sich, dass die Bestrahlung die Expressionslevel des Zelladhäsionsmoleküls VE-Cadherin sowie der assoziierten Zellkontaktproteine β-Catenin und Occludin in allen Versuchsgruppen gleichermaßen abschwächte, während der Angiogeneserezeptor KDR/VEGFR2 in den Endothelzellen mit dem Ccl2- und dem VEGF-betontem Kultivierungsmedium im Vergleich zur NGM-Gruppe hochreguliert wurde. Darüber hinaus wiesen die Ccl2- und VEGF-stimulierten Endothelzellen erhöhte Expressionslevel der Proliferationsmarker Proliferating- Cell- Nuclear-Antigen (PCNA) und Cyclin D1 (CCND1) auf. Die entsprechende Abbildung, angefertigt durch meine Betreuerin PD Dr. Klein, ist in Abb. des Anhangs auf Seite 86 gezeigt und ist als Abbildung 5A (Figure 5A) in der entsprechenden Publikation (Wiesemann et al., 2019) gezeigt.

4.4.5 DAS POTENZIAL EXOGENER CCL2-STIMULATION

Im Einklang mit den *in vivo* Daten deuten die Ergebnisse somit darauf hin, dass die Stimulation der Endothelzellen mittels des SASP-Faktors Ccl2 – ähnlich wie mit dem bekannten angiogenen Wachstumsfaktor VEGF- eine erhöhte Proliferationsaktivität und einen angiogenen Phänotyp der kultivierten, strahlenbeschädigten Endothelzellen bewirkt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte die Stimulation mit Ccl2 zudem die Sensitivität der Endothelzellen für strahleninduzierte Apoptose und reduzierte das langfristige Überleben der Zellen nach Bestrahlung.

5 DISKUSSION

Trotz der Weiterentwicklung verschiedenster Strahlungsmodalitäten und -schemata sowie präziserer Bestrahlungstechniken in der strahlentherapeutischen Bekämpfung maligner Erkrankungen, ist es immer noch nicht möglich, die Strahlentoxizität von Normalgeweben zu umgehen. Demnach spielen akute Nebenwirkungen weiterhin eine einschränkende Rolle in der Regeneration des gesunden Gewebes und gelten in der Folge als limitierender Faktor für Tumorkontrolle und definitive Heilung. Darüber hinaus können Spätkomplikationen der Strahlentherapie zu Einschränkungen von Organfunktionen beispielsweise des kardiovaskulären Systems und folglich zu einer reduzierten Lebensqualität führen (Aleman et al., 2007; Korpela and Liu, 2014). Demzufolge beschäftigt sich die Forschung immer mehr damit, pharmakologische Strategien zu entwickeln, die das Eintreten akuter und später strahleninduzierter Schädigungen des zuvor gesunden Gewebes verhindern (Bourgier et al., 2012).

Im Allgemeinen wird angenommen, dass Strahlenreaktionen des Lungengewebes durch parenchymale, inflammatorische und vaskuläre Prozesse geprägt sind, die durch Zytokinkaskaden ausgelöst, aufrechterhalten und vermittelt werden. Die Rolle von Chemokinen und ihren Rezeptoren als kontrollierende Komponente verschiedener physiologischer und pathologischer Prozesse im Rahmen dessen ist erst in den letzten Jahren deutlich geworden (Bentzen, 2006).

5.1 DER EINFLUSS VON BINDARIT AUF DIE CCL2-EXPRESSION UND DIE SENESZENZ-AKTIVITÄT IM BESTRAHLTEN LUNGENGEWEBE

Forschungsarbeiten liefern zunehmend Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von Ccl2 und der strahleninduzierten Toxizität des Normalgewebes. Bereits 1998 zeigten Johnston et al., dass Ccl2 in die Gruppe der Zytokine gehört, die bereits wenige Minuten bis Stunden nach Bestrahlung aktiviert werden (Johnston et al., 1998). Eine klinische Studie um Hawkins et al. identifizierte Ccl2 zudem als prädiktiven Parameter zur Abschätzung des RILI-Risikos von Patienten. Gleichzeitig wurde die Frage nach den zugrundeliegenden Mechanismen, über die Ccl2 mit der Strahlung interagiert und das RILI-Risiko beeinflusst, aufgeworfen (Hawkins et al., 2017). Von Bedeutung ist, dass bereits beschrieben wurde, dass Ccl2 insbesondere als Botenstoff von seneszenten Zellen im Rahmen des Seneszenz-assoziierten-sekretorischen Phänotyps ausgeschüttet wird (Coppé et

al., 2010). Aus der Literatur ist weiterhin zu entnehmen, dass dieser pro-inflammatorische Faktor sowohl von Zellen des Immunsystems als auch von seneszenten Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert wird (Sasaki et al., 2010; Contrepois et al., 2017). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass krebsassoziierte Fibroblasten, die das Potenzial haben, die Mikroumgebung zu modulieren, indem sie die epitheliale Homöostase und die proliferative Ruhe verändern, Ccl2 charakteristisch exprimieren (Trimboli et al., 2009; Heneberg, 2016). Im Hinblick auf fibrotische Lungenerkrankungen ist bekannt, dass Ccl2 eine wichtige Rolle bei der idiopathischen Lungenfibrose spielt, da das aktivierte Lungenepithel als wichtige Quelle von (Proteinase-aktiviertem Rezeptor-1-induzierbarem) Ccl2 identifiziert wurde (Mercer et al., 2009; Mercer et al., 2014).

In der vorliegenden Dissertation und den damit assoziierten aktuellen (und bereits veröffentlichten) Arbeiten wurde eine Hochregulation von Ccl2 nach Bestrahlung beschrieben, welche vorwiegend in bronchialen Epithelzellen induziert wurde und zudem zu Pneumonitis und Fibrose als unterschiedliche Merkmale der Reaktion des normalen Lungengewebes auf Strahlenschäden beiträgt (Klein et al., 2016; Wiesemann et al., 2019). Gleichzeitig konnte eine Steigerung der Seneszenz-Aktivität des Lungenepithels nach Bestrahlung beobachtet werden (Klein et al., 2016). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde kürzlich berichtet, dass Lungenepithelzellen die Hauptquelle von Ccl2 nach einer Infektion mit dem Influenza-A-Virus darstellen und dass eine Behandlung mit Bindarit die Ccl2-Expression in diesen Zellen wirksam reduziert hat (Wolf et al., 2017).

Bindarit ist ein kleines, synthetisch hergestelltes Indazol-Derivat, welches dafür bekannt ist, die Transkription von Monozyten-chemotaktischen-Proteinen selektiv zu hemmen (Sironi et al., 1999). Bereits 1998 zeigten Zoja et al., dass eine therapeutische Bindarit-Applikation die Ccl2-Expression in den Nieren polyzystisch nierenerkrankter Ratten signifikant reduzieren kann (Zoja et al., 1998). Diese Dissertation ergänzt nun, dass die kurzfristige Bindarit-Behandlung in der frühen Phase nach Bestrahlung der Hochregulation von Ccl2 entgegenwirkt und somit einen Seneszenz-assoziierten Faktor beeinflusst, ohne die strahleninduzierte Seneszenz-Aktivität des Lungengewebes zu vermindern. Bemerkenswerterweise wurde der Wirkstoff Bindarit zudem bereits in vielen präklinischen Studien als spezifischer Ccl2-Inhibitor verwendet und hält zunehmend auch Einzug in klinische Studien, sodass unsere Ergebnisse die Bindarit-Behandlung nicht nur als wirksame Strategie hervorheben, um den Einfluss des Ccl2-Signalwegs auf strahleninduzierte Schäden des Normalgewebes untersuchen zu können, sondern die durch diese Arbeit aufgedeckten

Mechanismen möglicherweise auf die klinische Praxis direkt übertragbar sind (Ble et al., 2011; Zollo et al., 2012; Wolf et al., 2017).

5.2 DER CCL2-CCR2-SIGNALWEG UND DIE VASKULÄRE DYSFUNKTION DES BESTRAHLTEN LUNGENGEWEBES

Laboreigene und fremde präklinische Studien haben bereits belegt, dass die strahleninduzierte Toxizität des Normalgewebes mit endothelialer Zellschädigung und der Dysfunktion der Blut-Luft-Schranke in Verbindung steht (Garcia-Barros et al., 2003; Cappuccini et al., 2011; Eldh et al., 2012; Klein et al., 2016; Klein, 2018; Wiesemann et al., 2019). Untersuchungen in Mausmodellen deuteten darauf hin, dass strahleninduzierte Endothelzellschäden die Transmigration von Tumorzellen sowie die Rekrutierung von Immunzellen durch das Endothel begünstigen und somit zu einer verstärkten Bildung von Mikrometastasen führen (Bernier et al., 2004; Barcellos-Hoff et al., 2005; Hamalukic et al., 2011; Korpela and Liu, 2014). Ergänzend hierzu wiesen die dieser Arbeit zugrundeliegenden Vorarbeiten eine erhöhte vaskuläre Permeabilität des Lungengewebes und eine Beeinträchtigung der Endothelzellmorphologie als akute Strahlenreaktionen nach (Klein et al., 2016).

Ferner zeigten Forschergruppen am Beispiel der Blut-Hirn-Schranke bereits eine Verbindung zwischen vaskulärer Dysfunktion und der Ccl2-CCR2-Signalgebung auf. Demnach beeinflusst der Ccl2-CCR2-Signalweg endotheliale Zellverbindungen und verstärkt die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Stamatovic et al., 2003; Yao and Tsirka, 2011). Am Beispiel des Kolonkarzinoms demonstrierten Wolfe et al. zudem, dass tumorfreigesetztes Ccl2 die vaskuläre Permeabilität erhöht, um so die Extravasation und Metastasierung der Tumorzellen *in vivo* zu fördern, während die CCR2-Defizienz diesen Effekt verhindert (Wolf et al., 2012). Es stellte sich zudem heraus, dass eine endotheliale CCR2-Reexpression die Paravasation und die Metastasierung wiederherstellte. Eine Reduktion der CCR2-Expression auf myeloischen Zellen konnte eine Metastasierung jedoch nur reduzieren, nicht aber verhindern (Wolf et al., 2012). Ferner weisen Mäuse mit einem Ccl2-Defizit bekanntermaßen ähnliche Phänotypen wie diese mit einem CCR2-Defizit auf. Daraus schlussfolgernd scheint die Ccl2-CCR2-Bindung die vorherrschende Interaktion *in vivo* zu sein (Boring et al., 1997; Lu et al., 1998).

Im Einklang damit zeigen unsere Ergebnisse, dass die Morphologie der Endothelzellen und die vaskuläre Barrierefunktion nach Bestrahlung sowohl durch eine kurzfristige Hemmung

der Ccl2-Expression (Bindarit) als auch durch die kontinuierliche Blockierung der Ccl2-Rezeption (CCR2-KO) in der frühen Phase nach Bestrahlung geschützt werden kann. Schlussfolgernd hieraus (und zusätzlich gestützt durch die hier dargelegten *in vitro* Ergebnisse) ergibt sich eine strahleninduzierte und primär Ccl2-vermittelte Gefäßpermeabilität, die begrenzt werden kann und folglich eine Reduzierung akuter Strahlenschäden ermöglichen könnte.

5.3 DER CCL2-CCR2-SIGNALWEG UND AKUTE STRAHLENFOLGEN DES BESTRAHLTEN LUNGENGEWEBES – EXTRAVASATION ZIRKULIERENDER TUMOR- UND IMMUNZELLEN

Laboreigene Arbeiten wiesen weiterhin im Hinblick auf eine erhöhte Gefäßpermeabilität eine gesteigerte Extravasation zirkulierender Tumorzellen und eine verstärkte Rekrutierung immunologischer Zellen in bestrahltes Lungengewebe als frühzeitige und unter anderem Metastasen-fördernde Folge der Bestrahlung nach (Klein et al., 2016). In einigen Studien wurde zudem die Möglichkeit aufgeworfen, dass die Thoraxbestrahlung nicht nur eine effiziente Bekämpfung bösartiger Zellen bezweckt, sondern auch die Verstreuung überlebender Tumorzellen in das bestrahlte Lungengewebe und damit das Wiederauftreten des Tumors unter bestimmten Bedingungen erleichtert (Chung et al., 2006; Hamalukic et al., 2011). Daneben ist die Rolle von Immunzellen, die in bestrahltes Gewebe eindringen, für das therapeutische Ergebnis der Bestrahlung noch umstritten. Es wird diskutiert, dass sie entweder die Anti-Tumorwirkung der RT verstärken oder parakrine Signale liefern können, die das Überleben und Wachstum von Tumorzellen, einschließlich der Bildung von Tumorblutgefäßen, erleichtern (Ahn et al., 2010; Liang et al., 2013; Wirsdörfer et al., 2014). Zugleich gibt es immer mehr Hinweise, dass Chemokine durch verschiedene Mechanismen signifikant zur Metastasierung beitragen (Borsig et al., 2014). Bezugnehmend auf die von uns zeitgleich beobachtete Hochregulation von Ccl2, wurde diesem Chemokin bereits eine kanzerogene Wirkung bei der Krebsentwicklung, sowie der anschließenden Metastasierung zugesprochen und es wurde bei mehreren Krebsarten mit einem schlechten klinischen Outcome in Verbindung gebracht (Craig and Loberg, 2006; Bonapace et al., 2014; Lim et al., 2016). Ferner wiesen van Deventer et al. nach, dass die pulmonale Metastasierung durch eine Ccl2-induzierte Rekrutierung von Ly6C(+)-Myeloiden Zellen gefördert wird (van Deventer et al., 2013), welche in der Literatur als wesentliche Zellen für die Etablierung

einer prämetastatischen Nische und für das Überleben metastasierender Zellen beschrieben werden (Gil-Bernabé et al., 2012).

Die hier gezeigten neuen Ergebnisse bestätigen, dass die strahleninduzierte Extravasation zirkulierender Tumorzellen sowie die Rekrutierung tumorfördernder myeloischer Zellen ins Lungengewebe sowohl durch eine Hemmung der Ccl2-Stimulation (Bindarit) als auch durch eine Blockierung der Ccl2-Rezeption (CCR2-KO) in der akuten Phase nach Bestrahlung begrenzt werden können und der Ccl2-CCR2-Signalweg somit Mechanismen akuter Strahlenfolgen beeinflusst.

Weiterführende (und bereits publizierte Daten), basierend auf den hier erhobenen Ergebnissen, zeigen ferner, dass eine kurzfristige Ccl2-Blockierung (Bindarit) in der frühen Phase nach Bestrahlung keinen langfristigen Schutz vor endothelialem Zellverlust und einer damit assoziierten Fibrose als Spätkomplikation der Bestrahlung bietet, während die kontinuierliche Inhibierung des Ccl2-CCR2-Signalwegs (CCR2-KO) späte Strahlenfolgen limitiert (Wiesemann et al., 2019).

5.4 DER EINFLUSS DES CCL2-CCR2-SIGNALWEGS AUF DAS ENDOTHELZELLKOMPARTIMENT DES BESTRAHLTEN LUNGENGEWEBES

Seit Längerem werden Endothelzellen als kritische Determinanten strahleninduzierter Gewebeschäden beschrieben (Baker and Krochak, 1989; Paris et al., 2001; Corre et al., 2013; Rannou et al., 2015; Klein, 2018; Ketteler et al., 2020). Darüber hinaus haben Untersuchungen zu Interaktionen zwischen endothelialen Zellen und dem Ccl2-CCR2-Signalweg einerseits eine Ccl2-vermittelte vaskuläre Dysfunktion und andererseits eine Ccl2-assoziierte Neovaskularisierung beschrieben. Aus der Literatur ist außerdem zu entnehmen, dass Ccl2 die Rekrutierung und Proliferation von ECs stimulieren kann (Hiratsuka et al., 2013; Lim et al., 2016).

Ergänzend hierzu demonstrieren wir jetzt, dass Ccl2 die Proliferationsaktivität endothelialer Zellen nach Bestrahlung erhöht und zur Aktivierung eines angiogenen Phänotyps führt. Konträr dazu zeigen wir, dass die Stimulation mit Ccl2 die Empfindlichkeit der ECs gegenüber strahleninduzierter Apoptose erhöht und das langfristige Überleben der Zellen nach Bestrahlung reduziert. Im Bezug darauf konnte Julia Ketteler aus unserer AG in bereits publizierten Versuchen nachweisen, dass ECs ein sehr langsames Reparaturvermögen besitzen, um strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche zu beheben (Wiesemann et al., 2019).

Basierend auf diesen Beobachtungen folgern wir die Hypothese, dass freigesetztes Ccl2 die normalerweise ruhenden ECs aktiviert, was dann durch die herbeigeführte DNA-Schädigung zur Induktion endothelialer Apoptose beiträgt und langfristig zum Verlust dieser Zellen führt. Im Einklang damit veranschaulichten auch Wolf et al. am Beispiel des Kolonkarzinoms, dass tumorfreigesetztes Ccl2 das CCR2-positive Endothel aktiviert und dadurch die vaskuläre Permeabilität erhöht wird (Wolf et al., 2012).

5.5 MODELLSCHEMA ZUR DARSTELLUNG DES THERAPEUTISCHEN POTENZIALS DER CCL2-CCR2-SIGNALHEMMUNG.

Die Abbildung 15 fasst die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Ergebnisse schematisch zusammen und liefert einen Überblick über die Rolle von Ccl2 auf die strahleninduzierten Schäden des mikrovaskulären Systems und das therapeutische Potential der Inhibition des Ccl2-CCR2-Signalwegs.

In der gesunden Situation befindet sich das Lungenendothel in einem Ruhezustand und bildet eine effiziente Barriere für zirkulierende Blutstromkomponenten (normale Lungen-Homöostase). Die Behandlung mit ionisierender Strahlung führt dann zu einer Seneszenz-Induktion in den Lungenepithelzellen, welche mit einer erhöhten Produktion und Sekretion von Ccl2 einhergeht (1). Dieser SASP-Faktor kann auf benachbarte Endothelzellen wirken und diese „aktivieren“ (2). Es resultiert ein angiogener Endothelzell-Phänotyp, welcher im Zusammenspiel mit der strahleninduzierten DNA-Schädigung eine erhöhte endotheliale Permeabilität bewirkt und die Extravasation von Flüssigkeiten, zirkulierenden Immun- und/oder Tumorzellen in das Lungeninterstitium begünstigt und so inflammatorische und metastasenfördernde Prozesse unterstützt (akuter Effekt) (3). Die (angeregte) Proliferation dieser geschädigten Zellen führt schließlich zum apoptotischen Zelltod. Weitergehende *in vivo* Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigten in diesem Zusammenhang den schwerwiegenden Verlust von Endothelzellen als Langzeitkomplikation nach erfolgter Thorax-Bestrahlung (Klein et al., 2017; Wiesemann et al., 2019) (4). Die therapeutische Hemmung der strahleninduzierten Ccl2-Signalübertragung wird hier nun als neuer, innovativer Ansatz zum Schutz vor vaskulärer Dysfunktion gezeigt (5).

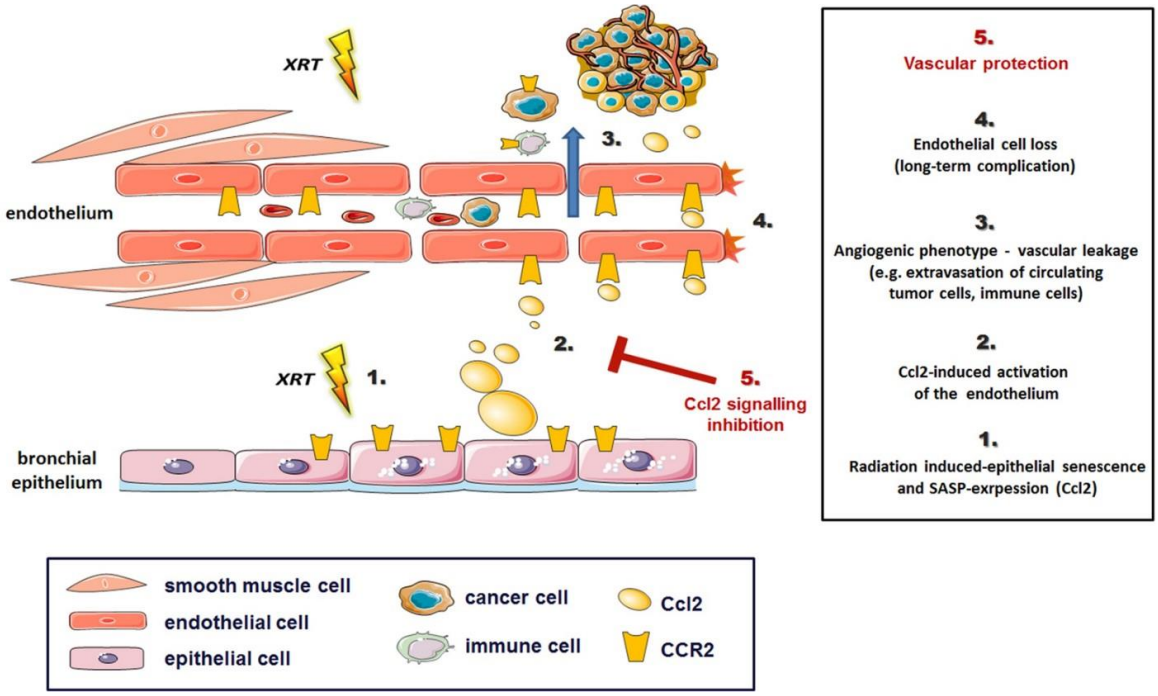

Abb. 15 Ein Modellschema zur Darstellung des Einfluss von Ccl2 auf strahleninduzierte Schäden des mikrovaskulären Systems und zur Darstellung des therapeutischen Potenzials der Ccl2-CCR2-Signalhemmung.
Einzelheiten hierzu sind im Text unter dem Punkt 5.5 beschrieben. Die Abbildung ist in der Publikation (Wiesemann et al., 2019) als Abbildung 7 (Figure 7) gezeigt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte der CC-Chemokin Ligand 2 (Ccl2) -Signalweg als ein zentraler Signalweg bestätigt und moduliert werden, der das Potential besitzt, radioprotektiv auf das Normalgewebe zu wirken, wenn er im Zuge der Radiotherapie blockiert wird. Die Inhibierung wurde auf zwei Wegen in *in vivo* Versuchen durchgeführt – durch die pharmakologische Ccl2-Inhibition (Blockierung der Signalgebung) mittels Bindarit und durch die genetische Deaktivierung des Ccl2-Hauptrezeptors CC-Chemokin Rezeptor Typ 2 (CCR2) (Blockierung der Signalrezeption) mittels CCR2-Knockout-Mäusen – und die Effekte durch komplementäre *in vitro* Studien bestätigt. Zudem konnte das mikrovaskuläre System als kritische Determinante strahleninduzierter Normalgewebsschädigung bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die radioprotektive Wirkung der Stammzelltherapie auf das Normalgewebe – als Ausgangspunkt dieser Dissertation – auf einer Normalisierung bestimmter Aspekte des Sekretoms der bestrahlten und folglich seneszent gewordenen (residenten) Lungenzellen, mit dem Fokus auf einer Signalinhibition des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp Faktors Ccl2 basiert und die gleichzeitig daraus resultierenden Effekte auf das pulmonale Gefäßbett entscheidend zum Schutz vor strahleninduzierten Lungenschäden beitragen.

Die Erkenntnisse dieser Doktorarbeit liefern somit neue Einblicke in die Mechanismen von strahleninduzierten Akuteffekten des Normalgewebes und unterstreichen die Hemmung der Ccl2-Signalübertragung als potenzielle radioprotektive Strategie. Im Hinblick auf den klinischen Nutzen hat die Strahlenprotektion des Normalgewebes ohne Beeinträchtigung der Radiosensibilisierung des Tumorgewebes wichtige Implikationen in der Onkologie, da höhere Strahlendosen sowohl die lokale Kontrolle als auch das Überleben verbessern könnten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahn, G.-O., Tseng, D., Liao, C.-H., Dorie, M.J., Czechowicz, A., and Brown, J.M. (2010). Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 8363-8368.

2. Ajuebor, M.N., Flower, R.J., Hannon, R., Christie, M., Bowers, K., Verity, A., and Perretti, M. (1998). Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. Journal of leukocyte biology *63*, 108-116.

3. Alam, R., Lett-Brown, M.A., Forsythe, P.A., Anderson-Walters, D.J., Kenamore, C., Kormos, C., and Grant, J.A. (1992). Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for basophils. The Journal of clinical investigation *89*, 723-728.

4. Aleman, B.M.P., van den Belt-Dusebout, A.W., Bruin, M.L. de, van 't Veer, M.B., Baaijens, M.H.A., Boer, J.P. de, Hart, A.A.M., Klokman, W.J., Kuenen, M.A., Ouwens, G.M., Bartelink, H., and van Leeuwen, F.E. (2007). Late cardiotoxicity after treatment for Hodgkin lymphoma. Blood *109*, 1878-1886.

5. Allavena, P., Bianchi, G., Zhou, D., van Damme, J., Jílek, P., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1994). Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. European journal of immunology *24*, 3233-3236.

6. Almeida, C., Nagarajan, D., Tian, J., Leal, S.W., Wheeler, K., Munley, M., Blackstock, W., and Zhao, W. (2013). The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury. PloS one *8*, e53628.

7. Baker, D.G., and Krochak, R.J. (1989). The response of the microvascular system to radiation: a review. Cancer investigation *7*, 287-294.

8. Barcellos-Hoff, M.H., Park, C., and Wright, E.G. (2005). Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. Nature reviews. Cancer *5*, 867-875.

9. Barna, B.P., Pettay, J., Barnett, G.H., Zhou, P., Iwasaki, K., and Estes, M.L. (1994). Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. Journal of neuroimmunology *50*, 101-107.

10. Bentzen, S.M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. Nature reviews. Cancer *6*, 702-713.

11. Benveniste, M.F.K., Welsh, J., Godoy, M.C.B., Betancourt, S.L., Mawlawi, O.R., and Munden, R.F. (2013). New era of radiotherapy: an update in radiation-induced lung disease. Clinical radiology *68*, e275-90.

12. Bernier, J., Hall, E.J., and Giaccia, A. (2004). Radiation oncology: a century of achievements. Nature reviews. Cancer *4*, 737-747.

13. Ble, A., Mosca, M., Di Loreto, G., Guglielmotti, A., Biondi, G., Bombardieri, S., Remuzzi, G., and Ruggenenti, P. (2011). Antiproteinuric effect of chemokine C-C motif ligand 2 inhibition in subjects with acute proliferative lupus nephritis. American journal of nephrology *34*, 367-372.

14. Bonapace, L., Coissieux, M.-M., Wyckoff, J., Mertz, K.D., Varga, Z., Junt, T., and Bentires-Alj, M. (2014). Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. Nature *515*, 130-133.

15. Boring, L., Gosling, J., Chensue, S.W., Kunkel, S.L., Farese, R.V., Broxmeyer, H.E., and Charo, I.F. (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. The Journal of clinical investigation *100*, 2552-2561.

16. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I.F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. Nature *394*, 894-897.

17. Borsig, L., Wolf, M.J., Roblek, M., Lorentzen, A., and Heikenwalder, M. (2014). Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory. Oncogene *33*, 3217-3224.

18. Bourgier, C., Levy, A., Vozenin, M.-C., and Deutsch, E. (2012). Pharmacological strategies to spare normal tissues from radiation damage: useless or overlooked therapeutics? Cancer metastasis reviews *31*, 699-712.

19. Brush, J., Lipnick, S.L., Phillips, T., Sitko, J., McDonald, J.T., and McBride, W.H. (2007). Molecular mechanisms of late normal tissue injury. Seminars in radiation oncology *17*, 121-130.

20. Cappuccini, F., Eldh, T., Bruder, D., Gereke, M., Jastrow, H., Schulze-Osthoff, K., Fischer, U., Köhler, D., Stuschke, M., and Jendrossek, V. (2011). New insights into the

molecular pathology of radiation-induced pneumopathy. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology *101*, 86-92.

21. Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S., and Springer, T.A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 3652-3656.

22. Chung, Y.-L., Jian, J.J.-M., Cheng, S.H., Tsai, S.Y.C., Chuang, V.P., Soong, T., Lin, Y.-M., and Horng, C.-F. (2006). Sublethal irradiation induces vascular endothelial growth factor and promotes growth of hepatoma cells: implications for radiotherapy of hepatocellular carcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *12*, 2706-2715.

23. Citrin, D.E., and Mitchell, J.B. (2017). Mechanisms of Normal Tissue Injury From Irradiation. Seminars in radiation oncology *27*, 316-324.

24. Coggle, J.E., Lambert, B.E., and Moores, S.R. (1986). Radiation effects in the lung. Environmental health perspectives *70*, 261-291.

25. Contrepois, K., Coudereau, C., Benayoun, B.A., Schuler, N., Roux, P.-F., Bischof, O., Courbeyrette, R., Carvalho, C., Thuret, J.-Y., Ma, Z., Derbois, C., Nevers, M.-C., Volland, H., Redon, C.E., Bonner, W.M., Deleuze, J.-F., Wiel, C., Bernard, D., Snyder, M.P., Rübe, C.E., Olaso, R., Fenaille, F., and Mann, C. (2017). Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. Nature communications *8*, 14995.

26. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. Annual review of pathology *5*, 99-118.

27. Corre, I., Guillonneau, M., and Paris, F. (2013). Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. International journal of molecular sciences *14*, 22678-22696.

28. Craig, M.J., and Loberg, R.D. (2006). CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) in cancer bone metastases. Cancer metastasis reviews *25*, 611-619.

29. Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., and Fogelman, A.M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth

muscle cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *87*, 5134-5138.

30. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betagal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. Nature protocols *4*, 1798-1806.

31. Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research *29*, 313-326.

32. Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 9363-9367.

33. Dizdaroglu, M., and Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. Free radical research *46*, 382-419.

34. Eldh, T., Heinzelmann, F., Velalakan, A., Budach, W., Belka, C., and Jendrossek, V. (2012). Radiation-induced changes in breathing frequency and lung histology of C57BL/6J mice are time- and dose-dependent. Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft … [et al] *188*, 274-281.

35. Ergün, S., Tilki, D., and Klein, D. (2011). Vascular wall as a reservoir for different types of stem and progenitor cells. Antioxidants & redox signaling *15*, 981-995.

36. Fajardo, L.F. (2005). The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. Acta oncologica (Stockholm, Sweden) *44*, 13-22.

37. Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R.M., Barregard, L., Bhutta, Z.A., Brenner, H., Dicker, D.J., Chimed-Orchir, O., Dandona, R., Dandona, L., Fleming, T., Forouzanfar, M.H., Hancock, J., Hay, R.J., Hunter-Merrill, R., Huynh, C., Hosgood, H.D., Johnson, C.O., Jonas, J.B., Khubchandani, J., Kumar, G.A., Kutz, M., Lan, Q., Larson, H.J., Liang, X., Lim, S.S., Lopez, A.D., MacIntyre, M.F., Marczak, L., Marquez, N., Mokdad, A.H., Pinho, C., Pourmalek, F., Salomon, J.A., Sanabria, J.R., Sandar, L., Sartorius, B., Schwartz, S.M., Shackelford, K.A., Shibuya, K., Stanaway, J., Steiner, C., Sun, J., Takahashi, K., Vollset, S.E., Vos, T., Wagner, J.A., Wang, H., Westerman, R., Zeeb, H.,

Zoeckler, L., Abd-Allah, F., Ahmed, M.B., Alabed, S., Alam, N.K., Aldhahri, S.F., Alem, G., Alemayohu, M.A., Ali, R., Al-Raddadi, R., Amare, A., Amoako, Y., Artaman, A., Asayesh, H., Atnafu, N., Awasthi, A., Saleem, H.B., Barac, A., Bedi, N., Bensenor, I., Berhane, A., Bernabé, E., Betsu, B., Binagwaho, A., Boneya, D., Campos-Nonato, I., Castañeda-Orjuela, C., Catalá-López, F., Chiang, P., Chibueze, C., Chitheer, A., Choi, J.-Y., Cowie, B., Damtew, S., das Neves, J., Dey, S., Dharmaratne, S., Dhillon, P., Ding, E., Driscoll, T., Ekwueme, D., Endries, A.Y., Farvid, M., Farzadfar, F., Fernandes, J., Fischer, F., G/Hiwot, T.T., Gebru, A., Gopalani, S., Hailu, A., Horino, M., Horita, N., Husseini, A., Huybrechts, I., Inoue, M., Islami, F., Jakovljevic, M., James, S., Javanbakht, M., Jee, S.H., Kasaeian, A., Kedir, M.S., Khader, Y.S., Khang, Y.-H., Kim, D., Leigh, J., Linn, S., Lunevicius, R., El Razek, H.M.A., Malekzadeh, R., Malta, D.C., Marcenes, W., Markos, D., Melaku, Y.A., Meles, K.G., Mendoza, W., Mengiste, D.T., Meretoja, T.J., Miller, T.R., Mohammad, K.A., Mohammadi, A., Mohammed, S., Moradi-Lakeh, M., Nagel, G., Nand, D., Le Nguyen, Q., Nolte, S., Ogbo, F.A., Oladimeji, K.E., Oren, E., Pa, M., Park, E.-K., Pereira, D.M., Plass, D., Qorbani, M., Radfar, A., Rafay, A., Rahman, M., Rana, S.M., Søreide, K., Satpathy, M., Sawhney, M., Sepanlou, S.G., Shaikh, M.A., She, J., Shiue, I., Shore, H.R., Shrime, M.G., So, S., Soneji, S., Stathopoulou, V., Stroumpoulis, K., Sufiyan, M.B., Sykes, B.L., Tabarés-Seisdedos, R., Tadese, F., Tedla, B.A., Tessema, G.A., Thakur, J.S., Tran, B.X., Ukwaja, K.N., Uzochukwu, B.S.C., Vlassov, V.V., Weiderpass, E., Wubshet Terefe, M., Yebyo, H.G., Yimam, H.H., Yonemoto, N., Younis, M.Z., Yu, C., Zaidi, Z., Zaki, M.E.S., Zenebe, Z.M., Murray, C.J.L., and Naghavi, M. (2017). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. JAMA oncology *3*, 524-548.

38. Fridlender, Z.G., Kapoor, V., Buchlis, G., Cheng, G., Sun, J., Wang, L.-C.S., Singhal, S., Snyder, L.A., and Albelda, S.M. (2011). Monocyte chemoattractant protein-1 blockade inhibits lung cancer tumor growth by altering macrophage phenotype and activating CD8+ cells. American journal of respiratory cell and molecular biology *44*, 230-237.

39. Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2003). Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. Science (New York, N.Y.) *300*, 1155-1159.

40. Gazzaniga, S., Bravo, A.I., Guglielmotti, A., van Rooijen, N., Maschi, F., Vecchi, A., Mantovani, A., Mordoh, J., and Wainstok, R. (2007). Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. The Journal of investigative dermatology *127*, 2031-2041.

41. Ghafoori, P., Marks, L.B., Vujaskovic, Z., and Kelsey, C.R. (2008). Radiation-induced lung injury. Assessment, management, and prevention. Oncology (Williston Park, N.Y.) *22*, 37-47; discussion 52-3.

42. Gil-Bernabé, A.M., Ferjancic, S., Tlalka, M., Zhao, L., Allen, P.D., Im, J.H., Watson, K., Hill, S.A., Amirkhosravi, A., Francis, J.L., Pollard, J.W., Ruf, W., and Muschel, R.J. (2012). Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. Blood *119*, 3164-3175.

43. Giridhar, P., Mallick, S., Rath, G.K., and Julka, P.K. (2015). Radiation induced lung injury: prediction, assessment and management. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP *16*, 2613-2617.

44. Goradel, N.H., Hour, F.G., Negahdari, B., Malekshahi, Z.V., Hashemzehi, M., Masoudifar, A., and Mirzaei, H. (2018). Stem Cell Therapy: A New Therapeutic Option for Cardiovascular Diseases. Journal of cellular biochemistry *119*, 95-104.

45. Graves, P.R., Siddiqui, F., Anscher, M.S., and Movsas, B. (2010). Radiation pulmonary toxicity: from mechanisms to management. Seminars in radiation oncology *20*, 201-207.

46. Gross, N.J., Narine, K.R., and Wade, R. (1988). Protective effect of corticosteroids on radiation pneumonitis in mice. Radiation research *113*, 112-119.

47. Hamalukic, M., Huelsenbeck, J., Schad, A., Wirtz, S., Kaina, B., and Fritz, G. (2011). Rac1-regulated endothelial radiation response stimulates extravasation and metastasis that can be blocked by HMG-CoA reductase inhibitors. PloS one *6*, e26413.

48. Han, S., Gu, F., Lin, G., Sun, X., Wang, Y., Wang, Z., Lin, Q., Weng, D., Xu, Y., and Mao, W. (2015). Analysis of Clinical and Dosimetric Factors Influencing Radiation-Induced Lung Injury in Patients with Lung Cancer. Journal of Cancer *6*, 1172-1178.

49. Hawkins, P.G., Boonstra, P.S., Hobson, S.T., Hearn, J.W.D., Hayman, J.A., Haken, R.K. ten, Matuszak, M.M., Stanton, P., Kalemkerian, G.P., Ramnath, N., Lawrence, T.S.,

Schipper, M.J., Spring Kong, F.-M., and Jolly, S. (2017). Radiation-induced lung toxicity in non-small-cell lung cancer: Understanding the interactions of clinical factors and cytokines with the dose-toxicity relationship. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology *125*, 66-72.

50. Heneberg, P. (2016). Paracrine tumor signaling induces transdifferentiation of surrounding fibroblasts. Critical reviews in oncology/hematology *97*, 303-311.

51. Hiratsuka, S., Ishibashi, S., Tomita, T., Watanabe, A., Akashi-Takamura, S., Murakami, M., Kijima, H., Miyake, K., Aburatani, H., and Maru, Y. (2013). Primary tumours modulate innate immune signalling to create pre-metastatic vascular hyperpermeability foci. Nature communications *4*, 1853.

52. Huang, Y., Zhang, W., Yu, F., and Gao, F. (2017). The Cellular and Molecular Mechanism of Radiation-Induced Lung Injury. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research *23*, 3446-3450.

53. Ip, W.K., Wong, C.K., and Lam, C.W.K. (2006). Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways. Clinical and experimental immunology *145*, 162-172.

54. Jaillet, C., Morelle, W., Slomianny, M.-C., Paget, V., Tarlet, G., Buard, V., Selbonne, S., Caffin, F., Rannou, E., Martinez, P., François, A., Foulquier, F., Allain, F., Milliat, F., and Guipaud, O. (2017). Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences. Scientific reports *7*, 5290.

55. Johnston, C.J., Wright, T.W., Rubin, P., and Finkelstein, J.N. (1998). Alterations in the expression of chemokine mRNA levels in fibrosis-resistant and -sensitive mice after thoracic irradiation. Experimental lung research *24*, 321-337.

56. Ketteler, J., Wittka, A., Leonetti, D., Roy, V.V., Estephan, H., Maier, P., Reis, H., Herskind, C., Jendrossek, V., Paris, F., and Klein, D. (2020). Caveolin-1 regulates the ASMase/ceramide-mediated radiation response of endothelial cells in the context of tumor-stroma interactions. Cell death & disease *11*, 228.

57. Kim, J.H., Jenrow, K.A., and Brown, S.L. (2014). Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. Radiation oncology journal *32*, 103-115.

58. Kim, J.-Y., Kim, Y.-S., Kim, Y.-K., Park, H.-J., Kim, S.-J., Kang, J.-H., Wang, Y.-P., Jang, H.-S., Lee, S.-N., and Yoon, S.-C. (2009). The TGF-beta1 dynamics during radiation therapy and its correlation to symptomatic radiation pneumonitis in lung cancer patients. Radiation oncology (London, England) *4*, 59.

59. Klein, D. (2016). Vascular Wall-Resident Multipotent Stem Cells of Mesenchymal Nature within the Process of Vascular Remodeling: Cellular Basis, Clinical Relevance, and Implications for Stem Cell Therapy. Stem cells international *2016*, 1905846.

60. Klein, D. (2018). The Tumor Vascular Endothelium as Decision Maker in Cancer Therapy. Frontiers in oncology *8*, 367.

61. Klein, D., Schmetter, A., Imsak, R., Wirsdörfer, F., Unger, K., Jastrow, H., Stuschke, M., and Jendrossek, V. (2016). Therapy with Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Protects Lungs from Radiation-Induced Injury and Reduces the Risk of Lung Metastasis. Antioxidants & redox signaling *24*, 53-69.

62. Klein, D., Steens, J., Wiesemann, A., Schulz, F., Kaschani, F., Röck, K., Yamaguchi, M., Wirsdörfer, F., Kaiser, M., Fischer, J.W., Stuschke, M., and Jendrossek, V. (2017). Mesenchymal Stem Cell Therapy Protects Lungs from Radiation-Induced Endothelial Cell Loss by Restoring Superoxide Dismutase 1 Expression. Antioxidants & redox signaling *26*, 563-582.

63. Kong, F.-M., Haken, R.T., Eisbruch, A., and Lawrence, T.S. (2005). Non-Small Cell Lung Cancer Therapy-Related Pulmonary Toxicity: An Update on Radiation Pneumonitis and Fibrosis. Seminars in Oncology *32*, 42-54.

64. Korpela, E., and Liu, S.K. (2014). Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage. Radiation oncology (London, England) *9*, 266.

65. (2019). Krebs in Deutschland 2015/2016. 12. Ausgabe. (Berlin).

66. Krump-Konvalinkova, V., Bittinger, F., Olert, J., Bräuninger, W., Brunner, J., and Kirkpatrick, C.J. (2003). Establishment and characterization of an angiosarcoma-derived cell line, AS-M. Endothelium : journal of endothelial cell research *10*, 319-328.

67. Liang, H., Deng, L., Chmura, S., Burnette, B., Liadis, N., Darga, T., Beckett, M.A., Lingen, M.W., Witt, M., Weichselbaum, R.R., and Fu, Y.-X. (2013). Radiation-induced equilibrium is a balance between tumor cell proliferation and T cell-mediated killing. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *190*, 5874-5881.

68. Liauw, S.L., Connell, P.P., and Weichselbaum, R.R. (2013). New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. Science translational medicine *5*, 173sr2.

69. Lierova, A., Jelicova, M., Nemcova, M., Proksova, M., Pejchal, J., Zarybnicka, L., and Sinkorova, Z. (2018). Cytokines and radiation-induced pulmonary injuries. Journal of radiation research *59*, 709-753.

70. Lim, S.Y., Yuzhalin, A.E., Gordon-Weeks, A.N., and Muschel, R.J. (2016). Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. Oncotarget *7*, 28697-28710.

71. Lu, B., Rutledge, B.J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., North, R., Gerard, C., and Rollins, B.J. (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. The Journal of experimental medicine *187*, 601-608.

72. Matsushima, K., Larsen, C.G., DuBois, G.C., and Oppenheim, J.J. (1989). Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. The Journal of experimental medicine *169*, 1485-1490.

73. Mehrad, B., Keane, M.P., and Strieter, R.M. (2007). Chemokines as mediators of angiogenesis. Thrombosis and haemostasis *97*, 755-762.

74. Mercer, P.F., Johns, R.H., Scotton, C.J., Krupiczojc, M.A., Königshoff, M., Howell, D.C.J., McAnulty, R.J., Das, A., Thorley, A.J., Tetley, T.D., Eickelberg, O., and Chambers, R.C. (2009). Pulmonary epithelium is a prominent source of proteinase-activated receptor-1-inducible CCL2 in pulmonary fibrosis. American journal of respiratory and critical care medicine *179*, 414-425.

75. Mercer, P.F., Williams, A.E., Scotton, C.J., José, R.J., Sulikowski, M., Moffatt, J.D., Murray, L.A., and Chambers, R.C. (2014). Proteinase-activated receptor-1, CCL2,

and CCL7 regulate acute neutrophilic lung inflammation. American journal of respiratory cell and molecular biology *50*, 144-157.

76. Miettinen, M., Rikala, M.-S., Rys, J., Lasota, J., and Wang, Z.-F. (2012). Vascular endothelial growth factor receptor 2 as a marker for malignant vascular tumors and mesothelioma: an immunohistochemical study of 262 vascular endothelial and 1640 nonvascular tumors. The American journal of surgical pathology *36*, 629-639.

77. Milliat, F., François, A., Tamarat, R., and Benderitter, M. (2008). Rôle de l'endothélium dans les dommages radio-induits aux tissus sains. Annales de cardiologie et d'angeiologie *57*, 139-148.

78. Mirolo, M., Fabbri, M., Sironi, M., Vecchi, A., Guglielmotti, A., Mangano, G., Biondi, G., Locati, M., and Mantovani, A. (2008). Impact of the anti-inflammatory agent bindarit on the chemokinome: selective inhibition of the monocyte chemotactic proteins. European cytokine network *19*, 119-122.

79. Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., and Iliakis, G. (2013). DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. Frontiers in oncology *3*, 113.

80. Mora, E., Guglielmotti, A., Biondi, G., and Sassone-Corsi, P. (2012). Bindarit: an anti-inflammatory small molecule that modulates the NFκB pathway. Cell cycle (Georgetown, Tex.) *11*, 159-169.

81. Mouiseddine, M., François, S., Semont, A., Sache, A., Allenet, B., Mathieu, N., Frick, J., Thierry, D., and Chapel, A. (2007). Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. BJR *80 Spec No 1*, S49-55.

82. Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacological reviews *52*, 145-176.

83. Namiki, M., Kawashima, S., Yamashita, T., Ozaki, M., Hirase, T., Ishida, T., Inoue, N., Hirata, K., Matsukawa, A., Morishita, R., Kaneda, Y., and Yokoyama, M. (2002). Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces

infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology *22*, 115-120.

84. Naruse, K., Ueno, M., Satoh, T., Nomiyama, H., Tei, H., Takeda, M., Ledbetter, D.H., Coillie, E.V., Opdenakker, G., Gunge, N., Sakaki, Y., Iio, M., and Miura, R. (1996). A YAC contig of the human CC chemokine genes clustered on chromosome 17q11.2. Genomics *34*, 236-240.

85. Nattermann, J. (2008). Korezeptoren und Chemokine: Was tun sie eigentlich? In Entry Inhibitoren, H. Jäger, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 11–16.

86. Onoda, J.M., Kantak, S.S., and Diglio, C.A. (1999). Radiation induced endothelial cell retraction in vitro: correlation with acute pulmonary edema. Pathology oncology research : POR *5*, 49-55.

87. Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodieci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., and Kolesnick, R. (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. Science (New York, N.Y.) *293*, 293-297.

88. Provatopoulou, X., Athanasiou, E., and Gounaris, A. (2008). Predictive markers of radiation pneumonitis. Anticancer research *28*, 2421-2432.

89. Rannou, E., François, A., Toullec, A., Guipaud, O., Buard, V., Tarlet, G., Mintet, E., Jaillet, C., Iruela-Arispe, M.L., Benderitter, M., Sabourin, J.-C., and Milliat, F. (2015). In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury. Scientific reports *5*, 15738.

90. Rantapää-Dahlqvist, S., Boman, K., Tarkowski, A., and Hallmans, G. (2007). Up regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in anti-citrulline antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor positive subjects precedes onset of inflammatory response and development of overt rheumatoid arthritis. Annals of the rheumatic diseases *66*, 121-123.

91. Riccardi, C., and Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nature protocols *1*, 1458-1461.

92. Robert Koch-Institut (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014 (Berlin: RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut)).

93. Robnett, T.J., Machtay, M., Vines, E.F., McKenna, M.G., Algazy, K.M., and McKenna, W. (2000). Factors predicting severe radiation pneumonitis in patients receiving definitive chemoradiation for lung cancer. International journal of radiation oncology, biology, physics *48*, 89-94.

94. Rodemann, H.P., and Blaese, M.A. (2007). Responses of normal cells to ionizing radiation. Seminars in radiation oncology *17*, 81-88.

95. Rollins, B.J. (1996). Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. Molecular medicine today *2*, 198-204.

96. Rübe, C.E., Uthe, D., Wilfert, F., Ludwig, D., Yang, K., König, J., Palm, J., Schuck, A., Willich, N., Remberger, K., and Rübe, C. (2005). The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. International journal of radiation oncology, biology, physics *61*, 1482-1492.

97. Sasaki, M., Miyakoshi, M., Sato, Y., and Nakanuma, Y. (2010). Modulation of the microenvironment by senescent biliary epithelial cells may be involved in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. Journal of hepatology *53*, 318-325.

98. Sedlmayer, F. (2012). Entwicklung der Radioonkologie in Österreich. Ihre Vernetzung mit den Entwicklungen in Deutschland sowie die Bedeutung der Mitherausgeberschaft unserer gemeinsamen Zeitschrift Strahlentherapie und Onkologie. Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft … [et al] *188 Suppl 3*, 350-352.

99. Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. Genes & cancer *2*, 1097-1105.

100. Sica, A., Wang, J.M., Colotta, F., Dejana, E., Mantovani, A., Oppenheim, J.J., Larsen, C.G., Zachariae, C.O., and Matsushima, K. (1990). Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *144*, 3034-3038.

101. Sironi, M., Guglielmotti, A., Polentarutti, N., Fioretti, F., Milanese, C., Romano, M., Vigini, C., Coletta, I., Sozzani, S., Bernasconi, S., Vecchi, A., Pinza, M., and Mantovani, A. (1999). A small synthetic molecule capable of preferentially inhibiting the

production of the CC chemokine monocyte chemotactic protein-1. European cytokine network *10*, 437-442.

102. Stamatovic, S.M., Keep, R.F., Kunkel, S.L., and Andjelkovic, A.V. (2003). Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. Journal of cell science *116*, 4615-4628.

103. Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Phan, S.H., Rollins, B.J., and Strieter, R.M. (1991). Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. The Journal of biological chemistry *266*, 9912-9918.

104. Statistisches BundesamtStatistisches Bundesamt (2019). Todesursachen nach Krankheitsarten 2017. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprg229156. 31.07.2019 08:06.

105. Steiner, J.L., Davis, J.M., McClellan, J.L., Guglielmotti, A., and Murphy, E.A. (2014). Effects of the MCP-1 synthesis inhibitor bindarit on tumorigenesis and inflammatory markers in the C3(1)/SV40Tag mouse model of breast cancer. Cytokine *66*, 60-68.

106. Stöver (2018). Praxismanual Strahlentherapie (Springer Berlin Heidelberg).

107. Trimboli, A.J., Cantemir-Stone, C.Z., Li, F., Wallace, J.A., Merchant, A., Creasap, N., Thompson, J.C., Caserta, E., Wang, H., Chong, J.-L., Naidu, S., Wei, G., Sharma, S.M., Stephens, J.A., Fernandez, S.A., Gurcan, M.N., Weinstein, M.B., Barsky, S.H., Yee, L., Rosol, T.J., Stromberg, P.C., Robinson, M.L., Pepin, F., Hallett, M., Park, M., Ostrowski, M.C., and Leone, G. (2009). Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. Nature *461*, 1084-1091.

108. Tsoutsou, P.G., and Koukourakis, M.I. (2006). Radiation pneumonitis and fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research. International journal of radiation oncology, biology, physics *66*, 1281-1293.

109. van Deventer, H.W., Palmieri, D.A., Wu, Q.P., McCook, E.C., and Serody, J.S. (2013). Circulating fibrocytes prepare the lung for cancer metastasis by recruiting Ly-6C+ monocytes via CCL2. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *190*, 4861-4867.

110. Wannenmacher, Debus, and Wenz (2006). Strahlentherapie (Berlin: Springer).

111. Weber, K.S., Nelson, P.J., Gröne, H.J., and Weber, C. (1999). Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology *19*, 2085-2093.

112. Weiss, L., Si-Mohamed, A., Giral, P., Castiel, P., Ledur, A., Blondin, C., Kazatchkine, M.D., and Haeffner-Cavaillon, N. (1997). Plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 but not those of macrophage inhibitory protein-1alpha and RANTES correlate with virus load in human immunodeficiency virus infection. The Journal of infectious diseases *176*, 1621-1624.

113. Wiesemann, A., Ketteler, J., Slama, A., Wirsdörfer, F., Hager, T., Röck, K., Engel, D.R., Fischer, J.W., Aigner, C., Jendrossek, V., and Klein, D. (2019). Inhibition of Radiation-Induced Ccl2 Signaling Protects Lungs from Vascular Dysfunction and Endothelial Cell Loss. Antioxidants & redox signaling *30*, 213-231.

114. Wirsdörfer, F., Cappuccini, F., Niazman, M., Leve, S. de, Westendorf, A.M., Lüdemann, L., Stuschke, M., and Jendrossek, V. (2014). Thorax irradiation triggers a local and systemic accumulation of immunosuppressive CD4+ FoxP3+ regulatory T cells. Radiation oncology (London, England) *9*, 98.

115. Wirsdörfer, F., and Jendrossek, V. (2016). The Role of Lymphocytes in Radiotherapy-Induced Adverse Late Effects in the Lung. Frontiers in immunology *7*, 591.

116. Wirsdörfer, F., Leve, S. de, Cappuccini, F., Eldh, T., Meyer, A.V., Gau, E., Thompson, L.F., Chen, N.-Y., Karmouty-Quintana, H., Fischer, U., Kasper, M., Klein, D., Ritchey, J.W., Blackburn, M.R., Westendorf, A.M., Stuschke, M., and Jendrossek, V. (2016). Extracellular Adenosine Production by ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Enhances Radiation-Induced Lung Fibrosis. Cancer research *76*, 3045-3056.

117. Wolf, M.J., Hoos, A., Bauer, J., Boettcher, S., Knust, M., Weber, A., Simonavicius, N., Schneider, C., Lang, M., Stürzl, M., Croner, R.S., Konrad, A., Manz, M.G., Moch, H., Aguzzi, A., van Loo, G., Pasparakis, M., Prinz, M., Borsig, L., and Heikenwalder, M. (2012). Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. Cancer cell *22*, 91-105.

118. Wolf, S., Johnson, S., Perwitasari, O., Mahalingam, S., and Tripp, R.A. (2017). Targeting the pro-inflammatory factor CCL2 (MCP-1) with Bindarit for influenza A (H7N9) treatment. Clinical & translational immunology *6*, e135.

119. Wu, Z., Chang, J., Ren, W., Hu, Z., Li, B., and Liu, H. (2017). Bindarit reduces the incidence of acute aortic dissection complicated lung injury via modulating NF-κB pathway. Experimental and therapeutic medicine *14*, 2613-2618.

120. Wynn, T.A., and Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. Nature medicine *18*, 1028-1040.

121. Xu, T., Zhang, Y., Chang, P., Gong, S., Shao, L., and Dong, L. (2018). Mesenchymal stem cell-based therapy for radiation-induced lung injury. Stem cell research & therapy *9*, 18.

122. Yao, Y., and Tsirka, S.E. (2011). Truncation of monocyte chemoattractant protein 1 by plasmin promotes blood-brain barrier disruption. Journal of cell science *124*, 1486-1495.

123. Yoshimura, T., Robinson, E.A., Tanaka, S., Appella, E., and Leonard, E.J. (1989a). Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *142*, 1956-1962.

124. Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S.K., Appella, E., Lerman, M.I., and Leonard, E.J. (1989b). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. FEBS Letters *244*, 487-493.

125. Zanoni, M., Cortesi, M., Zamagni, A., and Tesei, A. (2019). The Role of Mesenchymal Stem Cells in Radiation-Induced Lung Fibrosis. International journal of molecular sciences *20*.

126. Zhang, K., Wang, H., Xu, M., Frank, J.A., and Luo, J. (2018). Role of MCP-1 and CCR2 in ethanol-induced neuroinflammation and neurodegeneration in the developing brain. Journal of neuroinflammation *15*, 197.

127. Zhang, K., Yang, S., Zhu, Y., Mo, A., Zhang, D., and Liu, L. (2012). Protection against acute radiation-induced lung injury: a novel role for the anti-angiogenic agent Endostar. Molecular medicine reports *6*, 309-315.

128. Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity *12*, 121-127.

129. Zoja, C., Corna, D., Benedetti, G., Morigi, M., Donadelli, R., Guglielmotti, A., Pinza, M., Bertani, T., and Remuzzi, G. (1998). Bindarit retards renal disease and prolongs survival in murine lupus autoimmune disease. Kidney international *53*, 726-734.

130. Zollo, M., Di Dato, V., Spano, D., Martino, D. de, Liguori, L., Marino, N., Vastolo, V., Navas, L., Garrone, B., Mangano, G., Biondi, G., and Guglielmotti, A. (2012). Targeting monocyte chemotactic protein-1 synthesis with bindarit induces tumor regression in prostate and breast cancer animal models. Clinical & experimental metastasis *29*, 585-601.

8 ANHANG

8.1 SUPPLEMENTÄRE DATEN

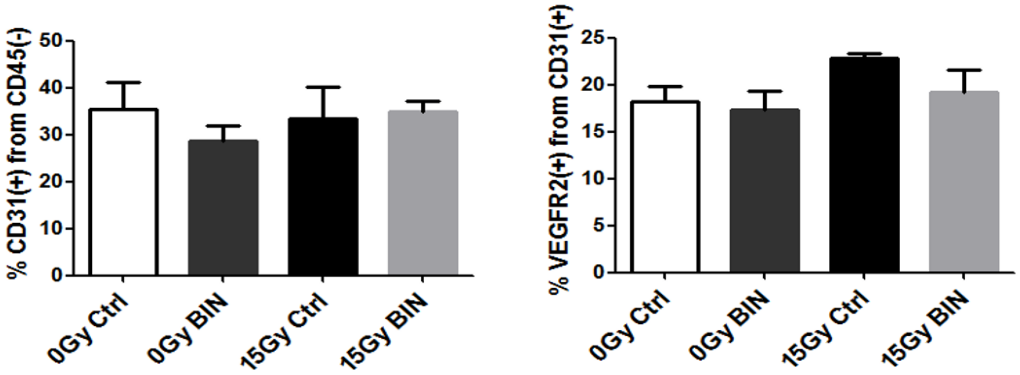

Abb. 16 Durchflusszytometrie der pulmonalen Endothelzellen.
Durchflusszytometrische Messung des Zellgemisch von frisch isoliertem Lungengewebe. Mittels FACS-Analyse wurde der Anteil endothelialer Zellen, sowie die VEGFR 2- Expression der EC des Lungengewebes am 21. Tag nach Bestrahlung und BIN-Behandlung untersucht. A) Die EC wurden anhand des CD31/PECAM1-Markers identifiziert. 21 Tage nach Bestrahlung zeigt sich ein regulärer Anteil endothelialer Zellen in den verschiedenen Versuchsgruppen. B) Es wurde die VEGFR 2-Expression der CD31-positiven EC bestimmt. 21 Tage nach Bestrahlung zeigte sich tendenziell eine Hochregulation der VEGFR 2-Expression, welche durch die BIN-Behandlung limitiert wurde. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM (n=5-6 für jede Gruppe) dargestellt. Die Abbildung wurde freundlicherweise von PD Dr. Klein zur Verfügung gestellt und ist in der entsprechenden Publikation (Wiesemann et al., 2019) als Abbildung 1H (Figure 1H) gezeigt.

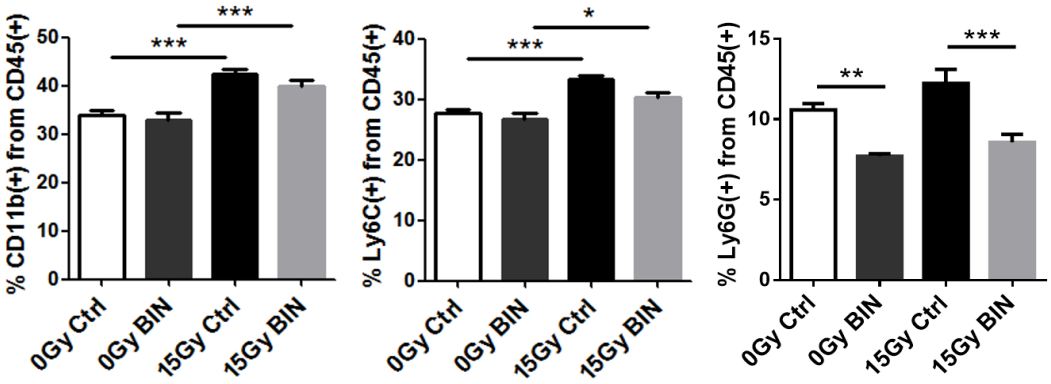

Abb. 17 Durchflusszytometrie der Immunzellen im Lungengewebe.
Durchflusszytometrie zur Analyse des myeloischen Zellkompartiments im Lungengewebe. Leukozyten wurden innerhalb der Zellsuspension von frisch isoliertem Lungengewebe mittels CD45-Expression und FACS-Analyse am 21. Tag post radiationem identifiziert. Myeloische Zellen wurden mit CD11b-, Ly6C- und Ly6G-Antikörpern weiter charakterisiert. Die Anteile der CD11b(+)-Myeloischen Zellen der CD45(+)-Leukozyten, insbesondere der Ly6C(+)-Zellen, waren signifikant und der der Ly6G(+)-Zellen tendenziell erhöht nach XRT. Während die BIN-Therapie die Infiltration von CD11b(+)- und Ly6C(+)-Zellen nur bedingt beeinflussen konnte, reduzierte sie den prozentualen Anteil der Ly6G(+)-Zellen im Lungengewebe nach XRT signifikant. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM (n=5-6 für jede Gruppe) dargestellt. Statistische Signifikanz: Oneway ANOVA gefolgt von einem Bonferroni-post-hoc Test, *$p \leq 0{,}05$, **$p \leq 0{,}01$, ***$p < 0{,}005$. Die Abbildung wurde freundlicherweise von PD Dr. Klein zur Verfügung gestellt und ist in der entsprechenden Publikation (Wiesemann et al., 2019) als Abbildung 1E (Figure 1E) gezeigt.

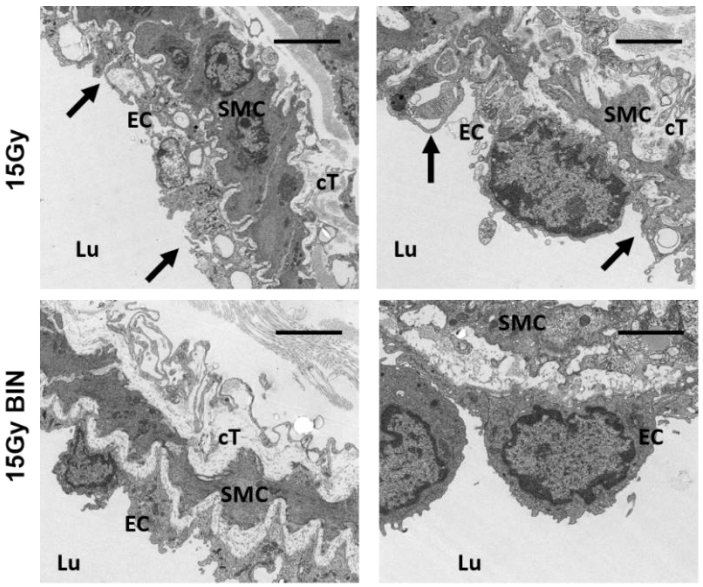

Abb. 18 Elektronenmikroskopie des mikrovaskulären Systems des Lungengewebes.
Bindarit normalisiert die EC-Morphologie im Lungengewebe nach XRT. Die morphologische Analyse der Lungengefäße wurde mittels Elektronenmikroskopie 3 Wochen nach der Bestrahlung durchgeführt. Maßstab links 5 µm. Maßstab rechts 2 µm. In den Lungen der BIN-behandelten Tiere (15Gy BIN, untere Bilder) lag eine regelmäßige Gefäßstruktur sowie eine intakte Endothelzell-Morphologie vor, während die unbehandelten Endothelzellen zahlreiche Vakuolen und destruierte Mitochondrien aufweisen (15Gy, obere Bilder). Pfeile zeigen in Richtung EC. Lu = Lumen, SMC = glatte Muskelzelle, cT = Bindegewebe. Die Abbildung wurde freundlicherweise von PD Dr. Klein zur Verfügung gestellt und ist in der entsprechenden Publikation (Wiesemann et al., 2019) als Abbildung 1F (Figure 1F) gezeigt.

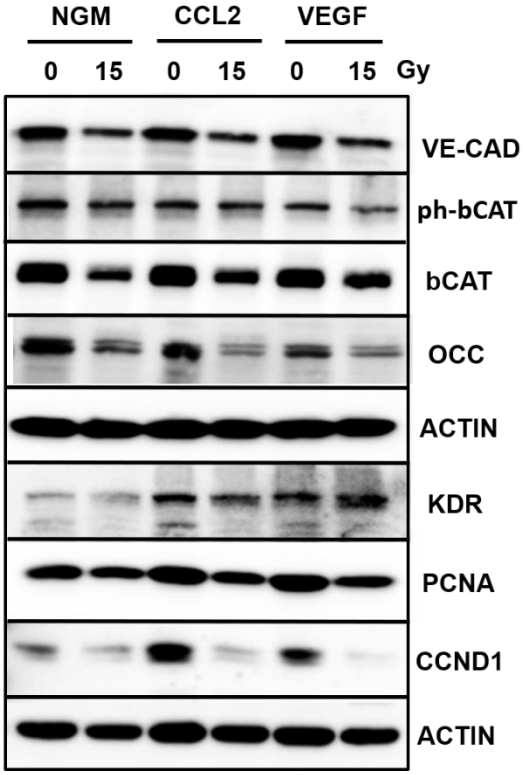

Abb. 19 Der Einfluss von Ccl2 auf die Proliferations- und Adhäsionseigenschaften pulmonaler Endothelzellen.
Die Expressionsniveaus der angezeigten Proteine wurden in vollständigen Proteinlysaten 96h nach der Bestrahlung und anschließender Wachstumsfaktor-behandlung mittels Western-Blot-Analyse analysiert. Es wurde eine Ccl2-Konzentration von 20ng/ml und eine VEGF-Konzentration von 10ng/ml eingehalten. Es werden repräsentative Blots aus vier verschiedenen Experimenten gezeigt (n=4). Die Abbildung wurde freundlicherweise von PD Dr. Klein zur Verfügung gestellt und ist in der entsprechenden Publikation (Wiesemann et al., 2019) als Abbildung 5A (Figure 5A) gezeigt.

8.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AG	Arbeitsgruppe
Ccl2	CC-Chemokin-Ligand 2
CCR2	CC-Chemokin Rezeptor Typ 2
Cdkn1a/p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EBD	Evans Blue Dye
EC	Endothelzellen
ECG	Endothelial Cell Growth Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
Gy	Gray
h	Stunde/Stunden
NG	Nachwuchsgruppe
nm	Nanometer
PE	Plating Efficiency
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodide
RILF	Radiation-induced Lung Fibrosis
RILI	Radiation-induced Lung Injury
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Radiation Pneumonitis
Rpm	rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT	Radiotherapie
SASP	Seneszenz-assoziierten sekretorischer Phänotyp
SF	Surviving Fraction
VEGF	Vascular endothelial growth Factor
VEGFR2	Vascular endothelial growth Factor Receptor 2
WT	Wildtyp
WTI	Thoraxbestrahlung/whole thorax irradiation

8.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Die häufigsten Tumorlokalisationen aller Krebserkrankungen in Deutschland im Jahr 2016. 9
Abb. 2 Das therapeutische Fenster der Strahlentherapie. 11
Abb. 3 Darstellung der Thoraxbestrahlungseinheit. 32
Abb. 4 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Extravasation zirkulierender Tumorzellen. Die Durchführung ist unter 3.3.5 beschrieben. 36
Abb. 5 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der pharmakologischen Ccl2-Inhibition im *in vivo* Mausmodell. 42
Abb. 6 Der Einfluss der Bindarit-Behandlung auf die Ccl2- und CCR2- Expression des Lungengewebes. 43
Abb. 7 Der Einfluss der Bindarit-Behandlung auf die vaskuläre Permeabilität des Lungengewebes. 45
Abb. 8 Der Einfluss der Bindarit-Behandlung auf die Extravasation zirkulierender Tumorzellen ins Lungengewebe. 47
Abb. 9 Der Einfluss der Bindarit-Behandlung auf die zelluläre Seneszenz des Lungengewebes. 51
Abb. 10 Der Einfluss der CCR2-Defizienz auf die vaskuläre Funktion und auf strukturelle Charakteristika des Gefäßsystems im Lungengewebe. 53
Abb. 11 Der Einfluss der CCR2-Defizienz auf die Ansiedlung zirkulierender Tumorzellen und auf die Immunzellinfiltration ins Lungengewebe. 54
Abb. 12 Einfluss von Ccl2 auf die Zellviabilität endothelialer Zellen. 57
Abb. 13 Der Einfluss von Ccl2 auf den Apoptosegrad pulmonaler Endothelzellen. 58
Abb. 14 Der Einfluss von Ccl2 auf das Langzeitüberleben pulmonaler Endothelzellen. ... 59
Abb. 15 Ein Modellschema zur Darstellung des Einfluss von Ccl2 auf strahleninduzierte Schäden des mikrovaskulären Systems und zur Darstellung des therapeutischen Potenzials der Ccl2-CCR2-Signalhemmung. 67
Abb. 16 Durchflusszytometrie der pulmonalen Endothelzellen. 85
Abb. 17 Durchflusszytometrie der Immunzellen im Lungengewebe. 85
Abb. 18 Elektronenmikroskopie des mikrovaskulären Systems des Lungengewebes. 86
Abb. 19 Der Einfluss von Ccl2 auf die Proliferationsund Adhäsionseigenschaften pulmonaler Endothelzellen. 86

8.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Verwendete Zelllinien 21
Tab. 2 Verwendete Mausstämme 21
Tab. 3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien 21
Tab. 4 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen 22
Tab. 5 Hergestellte Lösungen und Puffer 22
Tab. 6 Verwendete Wirkstoffe und Kits 23
Tab. 7 Verwendete Antikörper 23
Tab. 8 Verwendete Arbeitsgeräte 23
Tab. 9 Verwendete Software 23

9 DANKSAGUNG

Allen voran möchte ich mich bei Prof. Dr. Verena Jendrossek und Prof. Dr. Diana Klein für die Überlassung des Dissertationsthemas und der Möglichkeit diverse wissenschaftliche Erfahrungen zu sammeln, bedanken. Darüber hinaus geht ein besonderer Dank an Prof. Dr. Diana Klein für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung und Korrektur dieser Arbeit, sowie ihre motivierende und zuverlässige Betreuung.

Ein großer Dank geht an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie für die nette Arbeitsatmosphäre und die praktische Hilfe im Laboralltag. Mein besonderer Dank richtet sich hier an Mohamed Benchellal, Inge Spratte und Eva Gau für ihre technische Unterstützung und ihr Know-How bei der Durchführung der Versuche. Ohne euch wäre diese Arbeit nie möglich gewesen.
Julia Ketteler möchte ich hier besonders für ihre seelische Unterstützung in den vielen frühmorgendlichen Laborstunden und ihrem persönlichen Beistand während der gesamten Zeit danken.

Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden bin ich für ihre Unterstützung nicht nur während der Promotionszeit, sondern auch während des gesamten Studiums dankbar. Ohne euren Halt und eure vielen aufbauenden Worte wäre all dies nicht möglich gewesen.

Schließlich möchte ich mich von Herzen bei Julian bedanken. Dem aufgrund seiner unendlichen Geduld, Fürsorge und persönlichen Stütze mein größter Respekt und meine tiefste Dankbarkeit gilt.

10 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.