

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. habil. Dr. med. Michael Flentje

**Auswirkungen der Hypoxia Inducible Factor (HIF) - 1 - Hemmung durch Chetomin
auf Hypoxie-abhängige Transkription und Strahlensensibilität
in humanen Fibrosarkomzellen vom Typ HT 1080**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**Désirée Diehlmann
aus Aschaffenburg**

Würzburg, November 2016

Referenten

Referent: Prof. Dr. habil. Dr. med. Michael Flentje

Korreferent: Prof. Dr. med. Stephan Mielke

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2017

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Biologische Prinzipien bei der Tumorbestrahlung	3
1.1.1 Sauerstoffeffekt und Strahlensensibilität	3
1.1.2 Klinische Bedeutung der Tumorhypoxie.....	4
1.2 Der Transkriptionsfaktor Hypoxia Inducible Factor (HIF)	5
1.2.1 Struktur von HIF und HIF-1 α	5
1.2.2 Regulation der HIF-1 α -Aktivität.....	6
1.2.3 HIF-1-regulierte Gene und deren Rolle in Tumorzellen	8
1.3 Beschreibung des Versuchsmodells mit HT 1080 Zellen.....	9
1.4 Fragestellung der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Verwendete Materialien und Geräte	11
2.1.1 Chemische und Biologische Materialien	11
2.1.2 Geräte	15
2.1.3 Zubehör	18
2.1.4 Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien	20
2.1.5 Chetomin	22
2.2 Zellkultur.....	23
2.3 Durchflusszytometrie von 5HRE-hCMVmp-EGFP HT 1080 Zellen.....	26
2.3.1 Aussaat und Behandlung.....	26
2.3.2 Durchflusszytometrische Messung.....	29
2.3.3 Anmerkungen zur weiteren Auswertung	31
2.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	32
2.5 Strahlenbehandlung und Koloniebildungsassay.....	34
2.5.1 Aussaat und Behandlung.....	34
2.5.2 Bestrahlung	35
2.5.3 Kolonieaussaat.....	36
2.5.4 Abstoppen und Auszählung	37
2.5.5 Überlebenskurven.....	38
2.6 Western Blot	40
2.6.1 Aussaat und Behandlung.....	40
2.6.2 Zelllysate	41
2.6.3 Proteinbestimmung	42
2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.6.5 Immunblot.....	47

2.6.6 Immunologischer Nachweis von VEGF, CA9, EPO und β -Actin	49
2.6.7 Auswertung der Western Blots	51
2.7 Statistische Analyse	51
3 Ergebnisse	52
3.1 Auswertung der Versuche am Durchflusszytometer	52
3.1.1 HIF-1-abhängige transkriptionelle Aktivierung unter Chetomin	52
3.1.2 Einfluss von Chetomin auf HIF1 α -abhängige EGFP-Expression	53
3.1.3 Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit	55
3.2 Chetomineffekte auf die Expression von VEGF- und CA9-Protein	57
3.2.1 Auswertung der Western Blots	57
3.2.2 Auswertung der RT-PCR	60
3.3 Resultate der Bestrahlungsversuche: Klonogenes Überleben	62
3.3.1 Koloniaaussaat	62
3.3.2 Auswirkung auf die Platiereffizienz	63
3.3.3 Kloniales Überleben	64
3.3.4 Modifizierte Sauerstoffverstärkung	66
4 Diskussion	67
4.1 Wahl der Untersuchungsbedingungen	67
4.2 Suppression der Proteinexpression von VEGF und CA9	68
4.3 Klonogenes Überleben nach Radiatio	69
4.3.1 Bedeutung der basalen HIF-1 Funktion	70
4.3.2 Abhängigkeit der Strahlensensibilität von der HIF-1 α Aktivität	71
4.3.3 HIF-1 α und Zellspezifität	72
4.4 HIF-1 α als Target in der Tumorthherapie	73
5 Literatur	74
6 Abkürzungsverzeichnis	81

1 Einleitung

Heutzutage stellt die Diagnose „Krebs“ eine der Hauptursachen für die Mortalität in den Industrieländern dar. Mit zunehmender Globalisierung, der sich verlängernden Lebenserwartung und besseren Lebensbedingungen wird sie zukünftig vermehrt auch in Schwellenländern zum Problem [1]. Allein in der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich 450.000 Menschen neu an Krebs und 220.000 sterben daran. Experten schätzen, dass die Zahl der Krebserkrankungen bis zum Jahr 2050 um 30 Prozent zunehmen wird [2].

	Männer	Frauen
1	Prostatakrebs	Brustkrebs
2	Darmkrebs	Darmkrebs
3	Lungenkrebs	Lungenkrebs
4	Harnblasenkrebs	Gebärmutterkörperkrebs
5	Magenkrebs	Karzinom der Ovarien und Adnexe
6	Nierenkrebs	Magenkrebs
7	Krebs von Mundhöhle und Rachen	Malignes Melanom der Haut
8	Bauchspeicheldrüsenkrebs	Harnblasenkrebs
9	Malignes Melanom der Haut	Bauchspeicheldrüsenkrebs
10	Non-Hodgkin-Lymphome	Gebärmutterhalskrebs

Tabelle 1: Die zehn häufigsten Krebsarten in Deutschland für beide Geschlechter im Jahr 2006 [3]

Die fünf häufigsten Krebsarten sind für beide Geschlechter in allen Teilen Deutschlands weitgehend identisch (siehe Tabelle 1, aus [3]). Hierbei ist die weitaus häufigste Krebstodesursache beim Mann Lungenkrebs, bei der Frau Brustkrebs.

Mittlerweile gilt Rauchen als der größte Einzelrisikofaktor für Krebs als allgemein anerkannt und auch Ernährungsgewohnheiten sind an der Krebsentstehung beteiligt [4].

Der inzwischen erreichte Wissensstand impliziert ein beträchtliches Potenzial an Möglichkeiten zur Krebsprävention, aufgrund dessen die Krebssterblichkeit hierzulande deutlich niedriger sein könnte als sie de facto ist.

Vor diesem Hintergrund muss die therapeutische Perspektive der Krebs-

behandlung diesem Umstand Rechnung tragen. Neben operativen Maßnahmen und der Chemotherapie spielt hierbei die Strahlentherapie eine zentrale Rolle. Sie wird bei zahlreichen Behandlungsschemata angewendet, beispielsweise im Rahmen der neoadjuvanten Therapie zum Erreichen eines Downstaging vor der Operation solider Tumoren, oder auch als adjuvante Therapie bei zusätzlichem Lymphknotenbefall oder R1/2-Situation. Darüber hinaus wird bei manchen Krebsarten eine solitäre Radiatio durchgeführt, nicht nur als symptomatische oder palliative Therapie wie bei der Bestrahlung von Knochenmetastasen zur Schmerzreduktion, sondern ebenso als kurativer Ansatz unter anderem beim Prostatakarzinom [5].

Durch Wilhelm Conrad Röntgens Entdeckung der so genannten X-Strahlen im Jahr 1895 wurde der Grundstein der Radiotherapie gelegt: Zunächst dienten X-Strahlen zu diagnostischen Zwecken wie der Beurteilung von Knochenverletzungen, kurz darauf nutzte Leopold Freund sie 1896 als erste durchgeführte Radiotherapie für die Behandlung eines Naevus pigmentosus pilosus [6]. Die Anwendungsgebiete der Strahlentherapie dehnten sich immer weiter aus [7] und zeigten sich wertvoll für Diagnostik und Therapie aberranter Gewebe. Die schädliche Wirkung auf normales Gewebe äußerte sich in unerwarteten Veränderungen wie z. B. Hautulzerationen.

Durch ein tiefergehendes Verständnis sowohl der pathophysiologischen Besonderheiten von Tumorerkrankungen als auch der Wirkung von Strahlen gelang es, die Effizienz sowie Verträglichkeit der Radiotherapie erheblich zu steigern.

Im deutschsprachigen Raum finden Radiotherapie, Strahlentherapie und Radioonkologie als Synonyme Verwendung.

1.1 Biologische Prinzipien bei der Tumorbestrahlung

Ionisierende Strahlung bewirkt im Gewebe strukturelle und funktionelle Veränderungen, die verschiedene molekulare und zelluläre Mechanismen als Reaktion hervorrufen.

1.1.1 Sauerstoffeffekt und Strahlensensibilität

Durch die Anwesenheit von Sauerstoff wird die Wirkung ionisierender Strahlen auf biologische Objekte verstärkt. Dies wird als Sauerstoffeffekt bezeichnet und durch den Sauerstoffsensibilisierungsfaktor (Oxygen Enhancement Ratio, OER) quantitativ bestimmt.

Die modifizierte Oxygen Enhancement Ratio (OER') berechnet sich aus dem Verhältnis der Dosispunkte, bei denen das gleiche Überleben sowohl bei 0,1% O₂ als auch bei Raumluftsauerstoffkonzentrationen erzielt wird:

$$OER' = D_{Hypoxie} / D_{Normoxie}$$

Ab einem Sauerstoffpartialdruck von pO₂ = 30 mmHg erreicht die Strahlenempfindlichkeit ihren Maximalwert – eine weitere Erhöhung des Sauerstoffangebots hat dann keinen strahlenbiologischen Effekt mehr [8] [9].

In Folge einer Bestrahlung steigt der O₂-Partialdruck im Tumor an, da durch den Tod vieler hauptsächlich normoxischer Zellen der Sauerstoffverbrauch sinkt. Außerdem führt das abnehmende Tumolvolumen zu einer Verringerung des hydrostatischen Drucks und somit zu einer verbesserten Kapillarperfusion – letztendlich also zu einem steigenden Sauerstoffangebot [10]. Dies lässt sich therapeutisch aufgreifen, indem bei einer Radiotherapie Bestrahlungen mit zeitlichem Abstand von mehreren Tagen durchgeführt werden.

Primär hypoxisches Tumorgewebe hingegen ist schwieriger zu therapieren. Durch den fehlenden Sauerstoffeffekt wird nicht nur die Bestrahlung ineffizienter, auch viele Chemotherapeutika, die schnell proliferierende Zellen angreifen, verlieren an Zytotoxizität. Denn Sauerstoffmangel führt zu einer Hemmung der Zellproliferation und Zellen in hypoxischen Arealen proliferieren im Gegensatz zu solchen in normoxischen Arealen langsam bis gar nicht [11].

Weitere Einflussfaktoren auf die Strahlenresistenz umfassen durch Hypoxie-

bedingte Entwicklung einer genetischen Instabilität auftretende p53-Mutationen [12], in deren Folge eine verminderte apoptotische Aktivität durch Selektionsverschiebung zu beobachten ist [13]. Dies trägt neben der geringeren Strahlensensibilität zu einer erhöhten Metastasierungstendenz sowie Tumorprogression bei.

1.1.2 Klinische Bedeutung der Tumorphypoxie

Tumorphypoxie geht im Allgemeinen mit ungünstiger Prognose einher [14] [15].

Die Wirksamkeit konventioneller Therapieansätze wie Chemotherapie und Radiatio hängt maßgeblich von der Gewebeoxygenierung solider Tumoren ab. Ihr Scheitern ist ein wichtiger Grund für die Prognoseverschlechterung hypoxischer Tumoren. Die Oxygenierung des Tumorgewebes weist eine zeitliche sowie eine räumliche Heterogenität auf, meist sind hypoxische Zellen diffus im Tumor verteilt und auch neben normoxischen Arealen lokalisiert [16].

Wird der Blutfluss in den Tumorkapillaren zeitweise unterbrochen, resultiert eine perfusionslimitierte akute Hypoxie. Wird die Diffusionsstrecke vom Gefäß bis zum Tumorgewebe zu groß, entsteht durch das Sauerstoffkonzentrationsgefälle eine diffusionslimitierte chronische Hypoxie.

Die verminderte Verfügbarkeit von Sauerstoff kann zu Tumorprogression und erhöhter Behandlungsresistenz beim Patienten führen. Massive Tumorzellproliferation separiert die Zellen von den Blutgefäßen und führt dadurch zu einem Defizit an Sauerstoff und Nährstoffen in der näheren Umgebung. Die hypoxischen Bedingungen induzieren – in normalen wie neoplastischen Zellen – eine Reaktion auf molekularer Ebene, die in die Aktivierung eines Schlüssel-Transkriptionsfaktors mündet: Hypoxia Inducible Factor HIF. Dieser reguliert ein breites Spektrum an Genen, welche den Tumorzellen zum Überleben, zur Abwendung der Nährstoffunterversorgung, zur Invasivität und Behandlungsresistenz verhelfen [17] [18] [19].

1.2 Der Transkriptionsfaktor Hypoxia Inducible Factor (HIF)

Der Hypoxia Inducible Factor (HIF) ist ein Transkriptionsfaktor und spielt eine Schlüsselrolle bei der Genexpression in Zellen als Reaktion auf veränderte Bedingungen zum Beispiel im Rahmen einer Hypoxie [17].

1.2.1 Struktur von HIF und HIF-1 α

Erstmals erwähnt wurde der Hypoxia Inducible Factor HIF 1991 von Semenza et al.: In der 3'Enhancerregion des Erythropoietin (EPO)-Gens gelang es ihnen eine Bindungsstelle nachzuweisen, welche unter hypoxischen Bedingungen von einem Transkriptionsfaktor besetzt war, wodurch die Transkription des EPO-Gens eingeleitet wurde [20].

HIF besteht aus zwei Untereinheiten, α und β . Bei der α -Untereinheit wiederum sind drei verschiedene Verbindungen bekannt, und zwar HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α . Von allen HIF-Molekülen hat der HIF-1-Komplex mit HIF-1 α die größte Bedeutung und wurde darüber hinaus bislang auch am besten erforscht. Das Heterodimer HIF-1 enthält eine 120 kDa schwere HIF-1 α - und eine 91 bis 94 kDa schwere HIF-1 β -Untereinheit. HIF-1 β ist im Gegensatz zur HIF-1-spezifischen HIF-1 α -Untereinheit außerdem noch in anderen Transkriptionsfaktoren vorzufinden.

HIF-1 α enthält ebenso wie HIF-1 β am aminoterminalen Ende ein basisches Helix-Loop-Helix (bHLH)-Motiv und eine Per-ARNT-Sim (PAS)-Domäne [21]. Sie werden sowohl für die Bindung an die DNS als auch für die Dimerisierung der beiden Untereinheiten benötigt. Allein die konstitutiv transkribierte und translatierte α -Einheit ist sauerstoffabhängig reguliert. Sie besteht aus einer Oxygen Dependent Degradation (ODD)-Domäne, die unter normoxischen Zellbedingungen hydroxyliert und damit der proteasomalen Degradation zugeführt wird (siehe Kapitel 1.2.2 Regulation der HIF-1 α -Aktivität). Des Weiteren beinhaltet die HIF-1 α -Untereinheit am carboxyterminalen Ende zwei Transaktivierungsdomänen (TAD), deren Aufgabe die Regulation der HIF-1-Zielgene ist (siehe Abbildung 1, aus [22]).

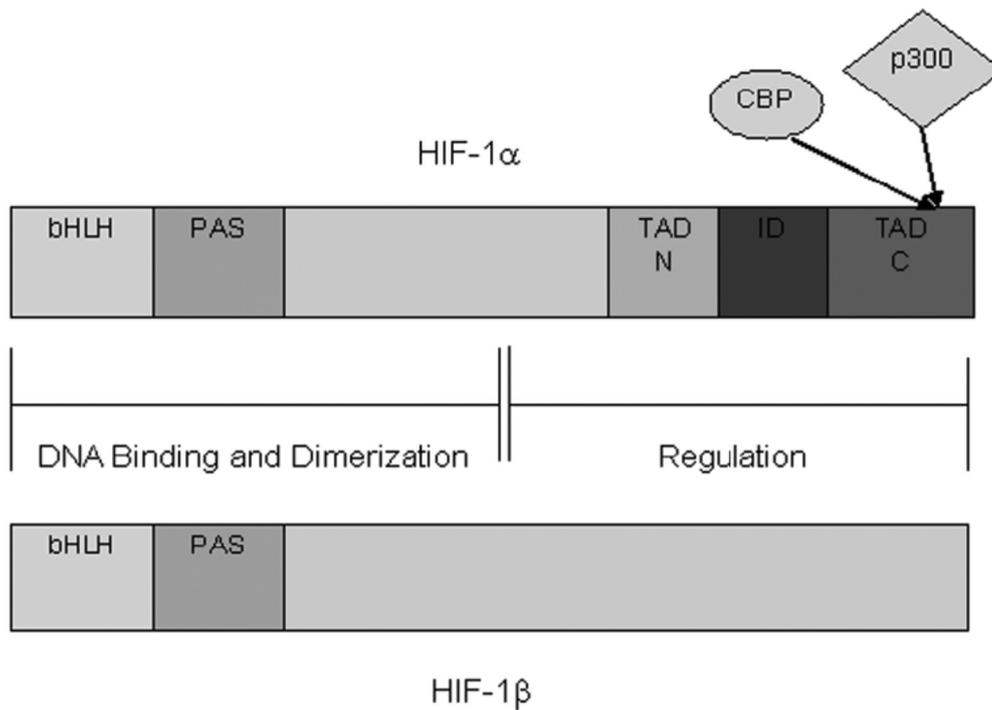


Abbildung 1: Struktur der HIF-1-Untereinheiten, aus [22]
 [mit freundlicher Genehmigung des Yale Journal of Biology and Medicine (YJBM)]

Bei HIF-1 β handelt es sich um ein ubiquitäres, nicht Sauerstoff-reguliertes Protein, das bereits als Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) bekannt war und mit dem Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR) heterodimerisiert, um gemeinsam den Dioxinrezeptor zu bilden [21]. Dieser agiert transkriptionsinitiiierend mit spezifischen Dioxin Response Elements (DREs).

1.2.2 Regulation der HIF-1 α -Aktivität

Unter normoxischen Bedingungen ist die regulierte α -Untereinheit (HIF-1 α) an Prolin 402 und 564 in der ODD-Region durch die Prolinhydroxylase 2 (PHD-2) hydroxyliert. Dies führt über den von Hippel-Lindau (vHL)-Ubiquitinierungskomplex zum Abbau durch das Proteasomensystem. Auf diese Weise wird die Menge an HIF-1 α bei Normoxie auf einem konstanten niedrigen Level gehalten. Sinkt der Sauerstoffgehalt in der Zelle, vermindert sich die Hydroxylierung an Prolin und HIF-1 α akkumuliert. Aufgrund zweier Nuclear Localization Signals (NLS) transloziert es in den Zellkern [23], um dort mit der konstitutiv vorhandenen β -Untereinheit (HIF-1 β , ARNT) zu heterodimerisieren.

Auch Asparagin 803 stellt einen der regulierten Hydroxylierung unterworfenen Bereich dar und erlaubt bei fehlender Hydroxylation die Rekrutierung der

Transkriptionskoaktivatoren p300 und CREB Bindungsprotein (CBP). Dieser Kofaktor p300/CBP, eine Histon-Acetyltransferase, konnektiert mit der carboxyterminalen Transaktivierungsdomäne (TAD-C) des HIF-1 α . Die Bindung des gesamten Komplexes bei der Erkennungssequenz 5'-RCGTG-3' am entsprechenden Hypoxia Responsive Element (HRE) im Zellkern führt zur Transaktivierung von Genen, die in ihrem Promotor oder Enhancer diese Elemente enthalten [24]. Die HIF-1 Bindungsstelle an der Ziel-DNS (HIF-1 Binding Site, HBS) besteht in ihrer Konsensus-Sequenz aus der Basenfolge 5'-RCGTG-3' [25]. Je nach Zielgen enthält die funktionelle cis-Aktivierungseinheit, das HRE, neben einer oder mehreren HBS zusätzlich noch unterschiedliche Bindungsstellen für Kofaktoren [26] [27] [28].

Abbildung 2 (aus [24]) zeigt ein vereinfachtes Schema:

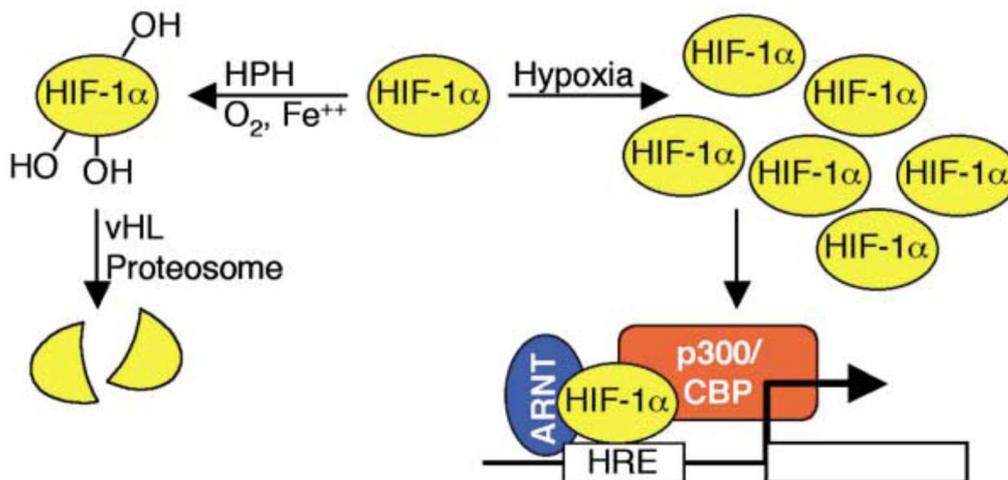


Abbildung 2: HIF-1 Hypoxie-Signalweg, aus [24]
[mit freundlicher Genehmigung von Elsevier, Lizenznummer 3913700383121]

Folglich wird HIF-1 durch ein Signaltransduktionssystem reguliert, welches auf sauerstoffabhängigen posttranslationalen Modifikationen basiert [29]. Die genannten Prolinhydroxylasen fungieren dabei als Sauerstoffsensoren.

Die Aktivierung über die hypoxische Stabilisierung des HIF-1 α repräsentiert die wichtigste Form der Signaltransduktion. Daneben existieren allerdings noch weitere Mechanismen, die auch unter normoxischen Bedingungen die HIF-1 α -Expression steigern: Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF), Insulin, Insulin-like Growth Factor (IGF) 1 und 2, Interleukin-1 β und Fibroblast

Growth Factor (FGF), desgleichen einige Zytokine [29]. Diese Proteine binden an eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), die je nach Zelllinie eine Signalkaskade über PI3-Kinase – PKB – FRAP oder über Ras/Raf – MEK – MAP-Kinase induziert [17] [29]. Die Inhibition der PI3-Kinase verursacht eine Verringerung der HIF-1 Aktivität [30] [31]. Bei Verlust des Tumorsuppressor-Gens PTEN erhöht sich die HIF-1 bedingte Genexpression. Einen interessanten Aspekt stellt die gesteigerte HIF-1 α Proteinsynthese durch eine Überexpression der Rezeptortyrosinkinase HER2/neu dar [32].

1.2.3 HIF-1-regulierte Gene und deren Rolle in Tumorzellen

Das hypoxische Milieu ist maßgeblicher Auslöser bei der Adaptation von Normalgewebs- und Tumorzellen mittels HIF-1. Durch die Hypoxie-bedingte Akkumulation von HIF-1 α und die daraufhin verstärkte Geninduktion, die die Anpassung des Zellmetabolismus an den Sauerstoffmangel evoziert, stellt sich HIF-1 α als der für die Reaktion auf Hypoxie bedeutendste Regulator des Organismus dar.

Bislang war es möglich, mehr als 70 durch HIF-1 regulierte Gene zu identifizieren [18]. Unter den translatierten Genprodukten befinden sich hauptsächlich solche, die an der Kontrolle des Glukosemetabolismus, der Glykolyse, an Zellüberleben und Angiogenese [19], dem Umbau der Extrazellulärmatrix, der Proliferation, Migration sowie Invasion beteiligt sind, und dies sowohl in normalen als auch in Tumorzellen.

Allerdings wird HIF-1 α in Tumorgewebe stärker exprimiert, was Zhong et al. [33] mittels immunhistochemischer Analysen untersuchten. Die überschießende Bildung von HIF-1 α wurde im Vergleich zu den entsprechenden Normalgeweben bzw. benignen Formationen in 13 von 19 Tumorgewebetypen nachgewiesen, außerdem in Lymphknoten- und Knochenmetastasen sowie in prämaligen Tumoren.

1.3 Beschreibung des Versuchsmodells mit HT 1080 Zellen

Fibrosarkome sind aus der Transformation von Bindegewebszellen hervorgegangene maligne solide Tumoren. Die humanen Fibrosarkomzellen vom Typ HT 1080 wurden von Rasheed et al. 1974 erstmals charakterisiert [34]. Extrahiert wurden die Zellen aus der Biopsie eines 35-jährigen Patienten aus dem Kaukasus. Da der Patient zuvor nicht radio- oder chemotherapeutisch behandelt wurde, weist die HT 1080 Zelllinie keine unerwünschten unnatürlichen Mutationen auf. Sie besitzt ein aktiviertes N-RAS Onkogen, das als zentraler Schalter in intrazellulären Signalprozessen fungiert, welche das genetische Programm sowie zentrale zelluläre Eigenschaften (z. B. Teilungsfähigkeit, Differenzierung) steuern [34].

Die HT 1080 Zellen zeigen auch in Kultur das für schnell proliferierende Zellen typische Wachstumsmuster: Nach einer langsamen Anlaufphase gehen die Zellen in eine exponentielle Wachstumsphase über, bevor sie in der stationären Phase stagnieren und schließlich absterben. Das organische Wachstum kann mit der empirischen Gompertz-Funktion, einer degressiven Sättigungsfunktion, mathematisch beschrieben werden [35] (siehe Abbildung 3).

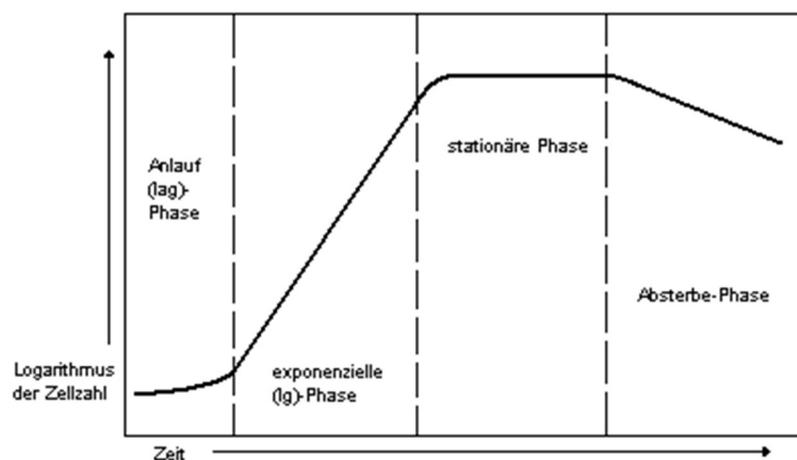


Abbildung 3: Wachstumskurve von Zellen, halblogarithmische Darstellung [selbst erstellt]

Aufgrund ihres schnellen Wachstums, ihrer frühen Metastasierungstendenz und der Möglichkeit zum Einbau verschiedener Promotoren mittels transfizierender Vektoren [36] stellen die HT 1080 Zellen ein beliebtes Untersuchungsobjekt zur Beeinflussbarkeit der molekularen Signalwege dar.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der nicht nur für den Zellmetabolismus und das Zellüberleben, sondern ebenso für die Zellproliferation und damit auch für die Entwicklung im Zellverbund eine herausragende Rolle einnimmt. Die physiologischen Funktionen erlangen durch die Überexpression von HIF-1 α in soliden Tumoren eine pathologische Bedeutung, da die Überexpression in hohem Maße mit der Ausbildung eines malignen Phänotyps sowie mit der Angiogenese, Tumorprogression, Metastasierung und geringerer Überlebensrate assoziiert ist. Des Weiteren moduliert HIF-1 α die Anfälligkeit gegenüber ionisierenden Strahlen in soliden Tumoren und geht infolgedessen mit einer ungünstigen Prognose nach primärer Strahlentherapie einher. Damit stellt HIF-1 α ein therapeutisch attraktives und relativ tumorspezifisches Target dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin zu untersuchen, ob die pharmakologische Hemmung des Transkriptionsfaktors HIF-1 mittels Chetomin, einem aus Pilzen stammenden antibiotischen Zytostatikum aus der Gruppe der Dithiodiketopiperazine, die Hypoxie-induzierte Strahlenresistenz menschlicher Tumorzellen beeinflusst.

Hierzu wurden Zellkulturen menschlicher Tumorzellen unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen in vitro bestrahlt und klonogene Assays erstellt.

Außerdem wurden Effekte auf die Transkription HIF-1-regulierter Gene und deren Bedeutung für eine Modulation der Strahlensensibilität untersucht.

Die daraus resultierenden Ergebnisse könnten die pharmakologische Hemmung von HIF-1 als Ansatzpunkt einer verbesserten und optimierten Tumorthherapie eröffnen.

2 Material und Methoden

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente führte die Autorin im Zelllabor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg zwischen September 2006 und Februar 2007 durch. Die Bestrahlungsversuche fanden in der angegliederten medizinischen Physik statt und wurden so geplant, dass der normale Klinikablauf nicht gestört wurde.

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

Der folgende Abschnitt enthält eine Aufstellung von Verbrauchsmaterialien, Medien und Gerätschaften, mit denen in den Versuchen gearbeitet wurde.

2.1.1 Chemische und Biologische Materialien

2.1.1.1 Zellkultur

HT 1080 WT-Zelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
HT 1080 5HRE-Zelllinie	Freundlicherweise von J.M. Brown, Stanford University USA, zur Verfügung gestellt
HT 1080 CMV-Zelllinie	Freundlicherweise von J.M. Brown, Stanford University USA, zur Verfügung gestellt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D5879, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	D8537, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline x10 (PBSx10)	D1408, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (mit 0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA und 4 Na/l HBSS)	T3024, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Fetal Bovine Serum (FBS)	CH 30160.03, Perbio Science, Bürstadt
Penicillin (10000 units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)	P4333, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Deferoxamin-Mesylat (DFO) (=Desferrioxamin- Mesylat)	D0533, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Minimum Essential Medium alpha (MEM α)	11900, GIBCO-Invitrogen, Darmstadt
Chetomin	350128M001, Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
<i>2.1.1.2 Zelllysate/Proteinbestimmung/Immunblot</i>	
Igepal CA-630	I3021, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Dinatriumsalz	E5134, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	S5886, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	L3771, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trishydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	T3252, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trishydroxymethylaminomethan-Base (Tris-Base)	T1503, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin (from Bovine Lung)	A1153, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin	L2023, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	P7626, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Pepstatin A	P5318, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdeoxycholate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DC Protein Assay Kit 2 (Proteinstandard 2mg/ml, Reagenz A, S und B)	5000112, Bio-Rad Laboratories, München
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	NP0004, Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE Antioxidant	NP0005, Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE MOPS Running Buffer (10x)	NP0001, Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	NP0006, Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE Sample Buffer LDS (4x)	NP0007, Invitrogen, Darmstadt
Marker Precision Plus All Blue	1610373, Bio-Rad Laboratories, München
PonceauS-Lösung 0,1%	P7170, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	T145.2, Carl Roth, Karlsruhe
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (TWEEN)	P7949, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECL Plus Western Blotting Lumigen™ PS-3 Detection Reagens	RPN 2133, Amersham Biosciences, Freiburg
Antikörper (AK):	
Primär-AK:	
Anti-VEGF-AK	ab1316, abcam, Cambridge, UK

Anti-CA9-AK	Bayer Healthcare, Elkhart, US
Anti- β -Actin-AK	A5316, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sekundär-AK:	
Goat-Anti-Mouse-AK (Meerrettichperoxidase- konjugiert)	P0447, Dako Cytomation, Hamburg
Goat-Anti-Rabbit-AK	P0449, Dako Cytomation, Hamburg
<i>2.1.1.3 Durchflusszytometrie</i>	
FACSFlow	342003, Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	340346, Becton Dickinson, Heidelberg
Cellwash	349524, Becton Dickinson, Heidelberg
CaliBRITETM FITC Beads (Fluoresceinisothiocyanat)	349502, Becton Dickinson, Heidelberg
<i>2.1.1.4 PCR</i>	
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim
Fast Start Master Hybridization Detektionssystem	Roche Diagnostics, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quantitect Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Hilden

2.1.1.5 Sonstiges

2-Mercaptoethanol	M7154, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	S5761, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natronlauge (NaOH) 1 M	K021.1, Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 1 M	A1434, Applichem, Darmstadt
Methanol	A0688, Applichem, Darmstadt
Destilliertes Wasser (Ampuwa für Spülzwecke 10 l)	PI 6064, Fresenius, Bad Homburg
Stickstoff 5.0	Messer, Frankfurt/Main
Kohlendioxid 4.5	Messer, Frankfurt/Main
Aer medicalis	Messer, Frankfurt/Main

2.1.2 Geräte

Sterilbank	HeraSafe HS12, Heraeus, Hanau
Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	BB5060, Heraeus, Hanau
Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	BB6220, Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Biofuge 13R, Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau
Wasserbad	WB14, Memmert, Schwabach
Wasserbad	WB7, Memmert, Schwabach

Wasserbad	1083, Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
Eismaschine	AF80, Scotsman, Mailand, Italien
Kühlschrank	ProfiLine ES, Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank -20°C	Premium no frost, Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank -80°C	Modell ECU-5085-5, Nacional Lab, Möllen
Stickstoffbehälter	Arpege 110, Air Liquide Kryotechnik, Düsseldorf
Zählkammer	Neubauer-Improved, Paul Marienfeld, Lauda- Königshofen
Absaugpumpe	N022AN.18, KNF- Neuberger, Freiburg
Abflammgerät	Flammy S, Schütt Labortechnik, Göttingen
Autoklav	Typ 23, Melag Medizintechnik, Berlin
Mikroskop	DMIL, Leica Microsystems, Wetzlar
Feinwaage	SBA 32, Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Grobwaage	CB 3D0.5N, Kern & Sohn, Balingen-Frommern
Spektralphotometer	UV/VIS Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Rüttler	L-40, Hartenstein

Einschweißgerät	Vacu Fix Electronic FS 500 A, Petra Electronic, Burgau
Magnetrührer	MR 2002, Heidolph Elektro, Kelheim
Magnetrührer	Ikamag Reo, IKA-Werke, Staufen
pH-Meter	pH 525, Wissenschaftlich- Technische-Werkstätten (WTW), Weilheim
Hypoxiewerkbank (mit Gasmixer)	invivo2, IUL Instruments, Königswinter
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg Mit: Power PC, Apple Macintosh Software: CELLQuest 3.1 f, Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresekammer	EI002, Xcell SureLock Electrophoresis Cell (mit Bot Modul), Invitrogen, Karlsruhe
Spannungsquelle	Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories, München
Röntgenkassette 18x24 cm	Hypercassette Blue, RPN13642, Amersham Biosciences, Freiburg
Entwicklermaschine	Kodak, Rochester, NY, USA
Personal Computer	MaxData, Marl
Scanner	HP Scanjet 4470C, Hewlett Packard, Böblingen

Densitometriesoftware	Kodak 1D 3.5, Kodak Scientific Imaging Systems, New Haven, USA
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel 2000, Microsoft Corporation
Textverarbeitung	Microsoft Word 2000, Microsoft Corporation
Mann-Whitney-U-Test (Statistica vs. 6.1 Software)	Statsoft, Tulsa, OK, USA
Pipetten	Pipetman (P2, P20, P100, P200, P1000), Gilson, Bad Camberg
Dispenserpipette	Distriman, Gilson, Bad Camberg
Elektrische Pipettierhilfe	Accu-Jet, Brand, Wertheim
Linearbeschleuniger	Primus, Siemens, Deutschland
 2.1.3 Zubehör	
Petrischalen 80x20	K 609.1 (Duran-Glas), Carl Roth, Karlsruhe
<p>Das Unterteil jeder einzelnen Petrischale wurde zum besseren Gasaustausch seitlich an mehreren Stellen dankenswerterweise von Herrn Ralf Schmitt eingekerbt.</p>	
Sterilisierbehälter für Petrischalen	C 846.1, Carl Roth, Karlsruhe
Sonstiges Glasmaterial	Schott Glas, Mainz
Plastikpetrischalen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Bottle-Top-Filter 500 ml	291-4520, Nalge Nunc International, Rochester, USA
Kryoröhrchen 2 ml	5000-0020, Nalge Nunc International, Rochester, USA
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Falcon 3136, Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber 24 cm	ZS23, Hartenstein, Würzburg
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Falcon 2096, Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon 2073, Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäß mit anhängendem Deckel (Caps) 1,5 ml	bio-one, 616201, Greiner
Küvetten	Halbmikroküvetten, 67.742, Sarstedt, Nümbrecht
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	NP 0322, Invitrogen, Karlsruhe
Westernblotmembran	Nitrocellulose membrane (0.2 µm), LC 200, Invitrogen, Karlsruhe
Röntgenfilm 18x24 cm	Hyperfilm ECL, RPN3103K, Amersham Biosciences, Freiburg
Röntgenfilm 5x7 inch	Hyperfilm ECL, RPN1674K, Amersham Biosciences, Freiburg
FACS-Röhrchen	Falcon 2054, Becton Dickinson, Heidelberg

Dispenserpipetten 1250 µl	DistriTip Mini, 02G01, Gilson, Bad Camberg
Dispenserpipetten 12,5 ml	BistriTip Maxi, 02D77, Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen blau (1000 µl)	PSBI, Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen gelb (200 µl)	PSGI, Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen Kristall (2 µl)	PSMI, Hartenstein, Würzburg
Gelloader-Spitzen	GS21, Hartenstein, Würzburg
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Handschuhe (Latex Puderfrei)	Kimberly-Clark, Roswell, USA

2.1.4 Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien

Die für die Versuche verwendete Zelllinie besteht aus humanen Fibrosarkomzellen (HT 1080 WT), die 1972 von der Biopsie eines 35-jährigen Kaukasiers entnommen und 1974 von Rasheed et al. charakterisiert wurden [34] (vgl. Kapitel 1.3 Beschreibung des Versuchsmodells mit HT 1080 Zellen). Zur Kultur eignet sich hier besonders Minimum Essential Medium alpha (MEM α) mit 10% Fetalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum, FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin.

Für die Experimente am Durchflusszytometer werden spezielle HT 1080 Zellen benutzt. Um die Genexpression hypoxieabhängiger Gene zu bestimmen, benutzte man früher ein Gen der Qualle *Aequorea victoria*, welches das Green Fluorescent Protein (GFP) transkribiert. Eine verbesserte Variante des GFP, das Enhanced GFP (EGFP), wurde 1996 von Zhang et al. entwickelt [36] [45] und zeichnet sich durch eine lichtstärkere Fluoreszenz aus, was eine größere

Sensitivität mit sich bringt. Darüber hinaus konnte auch die Halbwertszeit verlängert werden. Die Transfektion der Tumorzellen erfolgt mit einem destabilisierten EGFP-Vektor. Dazu wird ein d2EGFP-Fragment angewendet, welches eine Form des Wildtyp-GFP kodiert. Es besitzt folgende Eigenschaften:

Exzitationsmaximum	488 nm
Emissionsmaximum	507 nm
Halbwertszeit	ca. 2 h

Tabelle 2: Eigenschaften des d2EGFP-Fragments

Bestandteil dieses d2EGFP-Fragments ist zum einen der hypoxiesensible 5HRE-hCMVmp-Promotor und zum anderen der stark konstitutive CMV-Promotor als Positivkontrolle. Die Zellen nennt man demnach HT 1080 5HRE und entsprechend HT 1080 CMV. Der 5HRE-hCMVmp-Promotor setzt sich aus fünf Kopien eines 35-bp-Fragmentes des Hypoxia Responsive Element (HRE) des humanen VEGF-Gens sowie einem minimal promotor (mp) des humanen Zytomegalievirus (hCMV) zusammen [36].

Bei Sauerstoffmangel wird der 5HRE-hCMVmp-Promotor aktiviert und dadurch das d2EGFP-Gen angeschaltet. Dies führt zur Fluoreszenz des EGFP, welches nun mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden kann.

Nach der Hypoxiebehandlung wird die Korrelation von Fluoreszenz und Sauerstoffkonzentration beim EGFP aufgrund seiner Eigenschaften erst durch eine Reoxygenierungsphase von vier Stunden wiederhergestellt, wonach etwa 68% der maximalen Fluoreszenz der aeroben CMV-d2EGFP-Positivkontrolle erreicht sind [36].

Aus diesem Grund erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung stets vier bis sechs Stunden nach Beendigung der Hypoxiebedingungen.

2.1.5 Chetomin

Chetomin wird durch Fermentation der Pilzgattung *Chaetomium* sp. gewonnen, gefolgt von organischer Extraktion und Reinigung durch Silikongel und reverse Phase-C18-Chromatographie [24]. Es gehört zur Gruppe der Dithiodiketo-piperazine, die antibiotische Aktivität aufweisen. Zytotoxizität zeichnet es ebenso aus wie Inhibition von Tumorwachstum. Durch sowohl Con A-induzierte als auch LPS (Lipopolysaccharid)-induzierte Proliferation von Milzlymphozyten in Mäusen wirkt Chetomin als potenter Immunsuppressor. Sein Molekulargewicht beträgt 710,9 kDa und seine Strukturformel lautet $C_{31}H_{30}N_6O_6S_4$ [46], siehe Abbildung 4 (aus [47]):

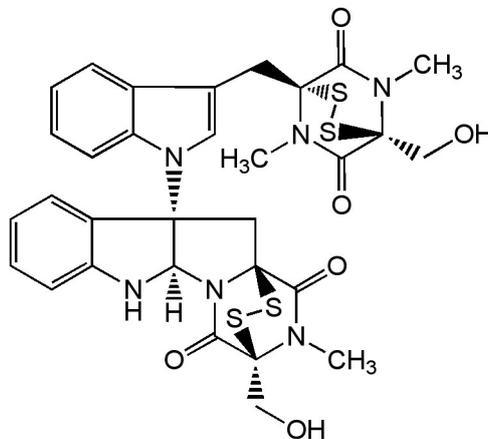


Abbildung 4: Struktur von Chetomin, aus [47]

[mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. A. Zeeck, BioViotica Naturstoffe GmbH]

Die Lagerung von Chetomin erfolgt kühl und trocken bei +4°C. Dimethylsulfoxid (DMSO) stellt das optimale Lösungsmittel dar, allerdings ist die Löslichkeit in Ethylacetat oder Pyridin gleichermaßen gewährleistet. Außerdem kann auch Methanol oder 100%iges Ethanol verwendet werden [46].

Sein molekularbiologischer Wirkmechanismus beruht auf der indirekten Hemmung des heterodimeren Transkriptionsfaktors Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) durch die Blockierung seines Koaktivators, des Proteins p300, genauer gesagt dessen CH1-Bindungsdomäne. Dies bewirkt eine Veränderung der Tertiärstruktur, die die Interaktion mit der TAD-C-Domäne des HIF-1 α inhibiert [24].

Unter normalen Sauerstoffbedingungen ist die regulierte α -Untereinheit (HIF-1 α) an Prolin 402 und 564 hydroxyliert, was über den von Hippel-Lindau (vHL)-Ubiquitinierungskomplex zum Abbau durch das Proteasomensystem führt. Auf diese Weise wird die Menge an HIF-1 α bei Normoxie auf einem konstanten Level gehalten. Wenn die Verfügbarkeit von Sauerstoff in der Zelle absinkt, lässt die Hydroxylierung an Prolin nach und HIF-1 α akkumuliert. Das führt zur Transaktivierung von Genen, die in ihrem Promotor oder Enhancer diese Elemente enthalten [24] (vgl. Kapitel 1.2.2 Regulation der HIF-1 α -Aktivität). Solche transaktivierten Gene sind beispielsweise der für die Angiogenese wichtige Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der Glukosetransporter 1 (Glut1), die Carboanhydrase IX (CA9) und Erythropoietin (EPO) [24].

2.2 Zellkultur

Den humanen Fibrosarkomzellen vom Typ HT 1080 wurde als Kulturmedium MEM α mit Zusatz von 10% Fetalem Kälberserum (FBS) und 1% von 10.000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin hinzugefügt. Die Langzeitlagerung der frischen Zellen erfolgte aufgrund der optimalen Haltbarkeit bei -200°C in flüssigem Stickstoff: HT 1080 WT (Wildtyp), Passagezahl P x +5 vom 15.03.2002. Üblicherweise wurden eine Million Tumorzellen in 1-1,5 ml eines Einfriermediums aus 70% Medium, 20% Fetalem Kälberserum (FBS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Kryoröhrchen langsam eingefroren. Dabei diente DMSO der Verhinderung einer möglichen Kristallbildung. Bei Bedarf konnten die Zellen jederzeit wieder aufgetaut werden: Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstoffbehälter geholt und ins 37°C warme Wasserbad gesetzt bis ein Farbumschlag stattfand, der die sorbetartige Konsistenz der Zellsuspension anzeigte, dann herausgenommen und desinfiziert. Die anschließende Verdünnung mit Medium war notwendig, da DMSO in hoher Konzentration zytotoxisch wirkt. Die Suspension wurde mit einer Pipette aufgesaugt und in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit insgesamt 10 ml MEM α -Medium verdünnt. Nun wurde bei 1200 U/min und 20°C fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen im abgesetzten Pellet am Boden löste man mit einer Pipettenspitze voll Medium und säte sie in einer 175 cm² großen, mit 30 ml Medium versetzten Kulturflasche aus. Inkubiert

wurden sie im befeuchteten Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Passagezahl lautete nun P x +6. Nach einigen Tagen (meist drei bis fünf), während die Zellen auf der Oberfläche anwuchsen und zu proliferieren begannen, musste die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase auf neue Kulturflaschen aufgeteilt (gesplittet) werden, bevor sie in die Stagnations- und schließlich in die Sterbephase übergang, in der die toten Zellen abschwimmen und Detritus bilden (vgl. Abbildung 3 in Kapitel 1.3 Beschreibung des Versuchsmodells mit HT 1080 Zellen).

Das Medium mit Zelldetritus in der Kulturflasche wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml 37°C warmem Puffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS) gespült. Durch kurzes Schwenken der Flasche wurden jegliche Mediumreste beseitigt, insbesondere FBS, welches die Wirkung des nachfolgenden Trypsin-EDTA (mit 0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA und 4 Na/l HBSS) beeinträchtigt. PBS wurde wieder abgesaugt und Trypsin-EDTA hinzugegeben. Trypsin ist ein Enzym, welches Adhäsionsproteine der Zellen angreift und somit die Zellmembranen sowohl vom Flaschenboden als auch voneinander abhebt; die Tumorzellen runden sich ab, lösen sich von der Oberfläche und werden somit in Suspension überführt. Der sechszählige Chelatbildner EDTA unterstützt den Prozess der Ablösung, indem er durch Komplexierung der Magnesium- und Calciumionen die Adhäsionsproteine destabilisiert. Um seine volle Wirkung zu entfalten, musste Trypsin vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden, dann wurden 3 ml in die Kulturflasche gegeben. Leichtes Schwenken der Flasche stellte sicher, dass das Trypsin die gesamte Oberfläche bedeckte. Nach circa fünf Minuten Inkubationszeit im Brutschrank wurde es mittels 7 ml kaltem Medium abgestoppt, damit seine potenzielle Zytotoxizität den Zellen nicht schadete. Die Zellsuspension wurde hiernach in der entsprechenden Verdünnung auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Sobald genügend Tumorzellen für den Hypoxieversuch zur Verfügung standen, wurden sie in Petrischalen ausgesät. Dazu saugte man das Medium aus den Kulturflaschen ab, wusch die angewachsenen Zellen pro Flasche mit 10 ml warmem PBS und versetzte sie nach erneutem Absaugen mit 3 ml warmem Trypsin-EDTA. Abgestoppt wurde die Aufbereitung nach einem Zeitraum von fünf Minuten im Inkubationsschrank mit 7 ml kaltem Medium. Mithilfe des

Mikroskops wurde verifiziert, dass sich die Zellen abgelöst hatten und in Suspension befanden. Zusätzlich konnte durch seitliches Beklopfen der Kulturflaschen die Ablösung der Zellen vom Boden verbessert werden. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gewährleistete man die vollständige Überführung in Einzelzellsuspension. Nun pipettierte man die Suspension mehrerer Flaschen in ein 50 ml-Röhrchen, entnahm daraus eine Pipettenspitze (circa 50 μ l) und bestimmte in der Neubauer-Improved-Zählkammer unter dem Mikroskop die Anzahl der Zellen in allen 4x16 Zählfeldern, wodurch man die Gesamtzahl der Zellen im Tube berechnen konnte (Rechengang: Anzahl in allen Feldern wird durch 4 dividiert und mit 10.000 multipliziert, dadurch erhält man die Zellzahl pro ml, diese wird mit der Menge Suspension multipliziert, das Ergebnis stellt die Gesamtzahl an Tumorzellen dar). Zeitgleich zentrifugierte man das Röhrchen bei 1.200 U/min für fünf Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 0,1 ml Medium pro Million Zellen resuspendiert und davon 0,1 ml, das heißt eine Million Zellen, in jede bereits beschriftete und mit 10 ml Medium gefüllte 80 mm-Glaspetrischale ausgesät. Hierauf wurden die Petrischalen für etwa 24 Stunden (meist über Nacht) im Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag, während die Zellen noch exponentiell wuchsen, wurden sie mit Chetomin, dem pharmakologischen HIF-1-Inhibitor, weiter behandelt: Vier Stunden vor der eigentlichen Hypoxiebehandlung wurde es in einer Konzentration von 150 nM in die Petrischalen gegeben. In den Durchflusszytometrie-Experimenten wurde zusätzlich auch eine zwei-Stunden-Vorbehandlung untersucht. Im Anschluss kamen die HT 1080 Zellen für jeweils zwölf Stunden in die Hypoxiewerkbank (0,1% O₂) beziehungsweise in den befeuchteten Inkubationsschrank. In diesem Sinne wurden die Zellen 16 Stunden vor der Strahlenbehandlung respektive dem Anlegen des Western Blot mit Chetomin inkubiert (in manchen Durchflusszytometrie-Versuchen 14 Stunden).

Sobald die für die Versuche erforderliche Sauerstoffkonzentration von 0,1% in der Hypoxiebank erreicht war, kamen die Zellen ohne Mediumwechsel hinein. Die Bedingungen in der Kammer mussten auf 5% CO₂ und 37°C kalibriert sein, die gewünschte Sauerstoffkonzentration von 0,1% wurde eingegeben; anschließend wurde mit einer adäquaten Gasmischung aus Pressluft, N₂ und CO₂ über ein automatisches Mischmodul belüftet, um das Gasmengen-

verhältnis konstant zu halten. Vor Beginn des Versuchs musste darauf geachtet werden, dass alle Gasflaschen angeschlossen und ausreichend gefüllt waren, um den reibungslosen Ablauf der Hypoxie-Experimente zu gewährleisten. Aerobe Bedingungen für die Kontrollen waren im Inkubationsschrank mit 5% CO₂ und 20% O₂ gegeben.

2.3 Durchflusszytometrie von 5HRE-hCMVmp-EGFP HT 1080 Zellen

2.3.1 Aussaat und Behandlung

Um den Effekt von Chetomin auf die Bindung von HIF-1 an das Hypoxia Responsive Element (HRE) und die Gentransaktivierung zu untersuchen, wurden die speziellen, mit destabilisiertem EGFP-Vektor transfizierten HT 1080-HRE-Zellen unter der Kontrolle eines Hypoxie-sensiblen Promotors benutzt, welcher fünf Kopien des HRE aus dem VEGF-Gen enthält (vgl. Kapitel 2.1.4 Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien). Als Positivkontrolle dienten mit demselben EGFP transfizierte HT 1080 Zellen unter einem stark konstitutiven, Hypoxie-unabhängigen CMV-Promotor (HT 1080-CMV-Zellen) (siehe [36]). Beide Zelltypen wurden freundlicherweise bereitgestellt von J.M. Brown, Stanford University, USA.

Die Zellkultur erfolgte wie unter 2.2 beschrieben bis zur Aussaat von einer Million Zellen pro Glaspetrischale. In verschiedenen Versuchsdurchgängen wurden unterschiedliche Bedingungen erprobt, um die im Endeffekt optimale Konzentration und Einwirkdauer gegenüber der Zelltoxizität von Chetomin zu ermitteln.

Zusammengefasst ergaben sich folgende Bedingungen:

Zusatz	Menge [μ l] bzw. Konzentration [nM]	Einwirkdauer vor Hypoxiebehandlung [h]	Sauerstoffkonzentration [%]
ohne (KON)	-	-	20
ohne (KON)	-	-	0,1
DMSO/PBS 1:10 (KON*)	300	0	20
DMSO/PBS 1:10 (KON*)	300	0	0,1
DMSO	50	4	20
DMSO	50	4	0,1
DMSO	300	12	20
DMSO	300	12	0,1
Chetomin	50	4	20
Chetomin	50	4	0,1
Chetomin	50	2	20
Chetomin	50	2	0,1
Chetomin	50	0	20
Chetomin	50	0	0,1
Chetomin	100	4	20
Chetomin	100	4	0,1
Chetomin	100	2	20
Chetomin	100	2	0,1
Chetomin	100	0	20
Chetomin	100	0	0,1
Chetomin	150	4	20
Chetomin	150	4	0,1
Chetomin	150	2	20
Chetomin	150	2	0,1
Chetomin	150	0	20
Chetomin	150	0	0,1
Chetomin	200	12	0,1
Chetomin	200	4	0,1
Chetomin	200	2	0,1
Chetomin	200	0	0,1
Chetomin	300	12	20
Chetomin	300	12	0,1
Chetomin	300	4	20
Chetomin	300	4	0,1
Chetomin	300	2	0,1

Chetomin	300	0	20
Chetomin	300	0	0,1
Deferoxamin	100	0	20

Tabelle 3: FACS-Versuchsbedingungen

In den ersten Versuchen konnte eine starke Toxizität von DMSO in den vorliegenden Konzentrationen festgestellt werden, weshalb im Folgenden die Ansätze mit DMSO im Verhältnis von 1:10 mit PBS (Phosphate Buffered Saline) verdünnt und als KON* (Kontrolle*) bezeichnet wurden. Auf die alleinigen Kontrollen (KON) ohne Zusätze wurde daraufhin verzichtet. Da DMSO auch als Lösungsmittel für Chetomin fungiert, wurde hier ebenfalls mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt. Auf die Chetominkonzentration hatte dies keinen Einfluss. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von Chetomin musste auf eine adäquate Durchmischung mit dem wässrigen Puffer durch sorgfältiges Schwenken des Röhrchens geachtet werden.

Chetomin wurde derart in DMSO/PBS gelöst, dass 50 µl der Lösung genau 50 nM entsprachen. Hierbei wurde 1 mg Chetomin in Form von weißem Pulver in 14,066 ml DMSO solviert und circa 28 Aliquots à 500 µl angelegt. Dies bildete den bei -80°C zu lagernden Chetomin-Stock, der bei Bedarf, d. h. zu jeder Versuchsreihe, herausgenommen und mit PBS versetzt wurde (1 ml Chetomin auf 9 ml PBS). Nach dieser Prozedur bestand die gewünschte oben genannte Entsprechung, sodass die Konzentrationsangaben für Chetomin in obiger Tabelle 3 in Nanomolar (nM) galten und der zugegebenen Menge in Mikroliter (µl) äquivalent waren.

Auch in weiteren Experimenten der PCR-, Western Blot- und Überlebenskurven-Untersuchungen wurde jene Anordnung beibehalten.

Der Zeitpunkt der Zugabe der verschiedenen Substanzen vor der Hypoxiebehandlung ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Der Chelatbildner Deferoxamin (DFO) diente als versuchsinterne Positivkontrolle. Durch die Komplexbildung mit Eisen wurde eine HIF-1α-Akkumulation auch bei Normoxie ermöglicht, da die das HIF-1α abbauenden Prolylhydroxylasen Eisen als Kofaktor benötigen. In jede Petrischale der Bedingung DFO wurde 100 µl Deferoxamin gegeben.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Petrischalen jeweils für zwölf Stunden bei 5% CO₂ und 37°C entweder im Brutschrank (20% O₂) oder in der

Hypoxiebox (0,1% O₂).

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Schalen mit 5 ml warmem PBS gewaschen, mit 10 ml frischem Medium befüllt und für weitere vier Stunden im Brutschrank reoxygeniert. Eine Kühlung der Proben war nicht notwendig, da EGFP seine maximale Fluoreszenz erst nach vier Stunden Reoxygenierung erreicht (vgl. Kapitel 2.1.4 Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien).

Daraufhin schloss sich die Vorbereitung der Zellen aller Bedingungen auf die Messung im Durchflusszytometer an: Das Medium aus den Petrischalen wurde abgesaugt, die Zellen mit 5 ml warmem PBS gewaschen und mit 2 ml warmem Trypsin-EDTA fünf Minuten inkubiert, bevor das Trypsin durch 3 ml kaltes Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert wurde. Die Röhrchen aller Bedingungen wurden nun mit 1.200 U/min für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend saugte man den Überstand ab, resuspendierte das Pellet mit 300 µl PBS und pipettierte es hierauf in ein FACS-Röhrchen. Sobald sämtliche Proben dergestalt vorbereitet waren, konnte mit der FACS-Analyse¹ begonnen werden.

2.3.2 Durchflusszytometrische Messung

2.3.2.1 Prinzip

Die Methode der Durchflusszytometrie erlaubt schnelle Messungen von sich in einem Flüssigkeitsstrom bewegendem Partikeln oder Zellen. Dabei werden keine Durchschnittswerte der Gesamtpopulation ermittelt, sondern direkt Einzelmessungen der Zellen vorgenommen. Hieraus resultiert eine Vielzahl an Untersuchungsmöglichkeiten wie beispielsweise die Bestimmung von Enzymaktivitäten, von Kalziumfluss oder Membranpotenzialen. Durch diese Vielfalt etablierte sich die Durchflusszytometrie als eine wichtige Methode in der medizinischen und zellbiologischen Grundlagenforschung.

Für die Messungen wird ein LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) eingesetzt: Im Zytometer befindet sich ein luftgekühlter 15 mW Argonionenlaser, welcher einen kohärenten und polarisierten Lichtstrahl der

¹ FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting. Der Ausdruck ist eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson und bezeichnet das Verfahren der Durchflusszytometrie.

Wellenlänge 488 nm emittiert. Dieser trifft in der Flusskammer auf jede einzelne hindurchfließende Zelle und erfährt dadurch eine Ablenkung. Die auf diese Weise entstehenden Streustrahlen werden mittels Linsen gebündelt und über Detektoren aufgefangen. Einer der Detektoren fängt diejenigen durch Beugung des Lichtes hervorgerufenen Streustrahlen auf, die mit maximal 20° Abweichung von der Laserachse als Frontalstreuung (Forward Scatter, FSC) bezeichnet werden und ein Maß für die Zellgröße darstellen. Ein anderer erfasst die durch Brechung entstehende rechtwinklige Streuung (Right Angle Scatter, Sideward Scatter, SSC), die mehr als 20° von der Laserachse abweicht und als Maß für die Granularität dient. Gänzlich ungestreutes Laserlicht wird eliminiert und somit nicht gemessen.

Des Weiteren sind Spiegelsysteme im Gerät installiert. Sie trennen das von der bestrahlten Zelle ausgehende Licht nach seiner Wellenlänge und ermöglichen dadurch die Unterscheidung zwischen dem vom Laser ausgehenden Streulicht und der Fluoreszenz, die von der durch den Laser angeregten Zelle selbst stammt. Darüber hinaus ist auch die Differenzierung zwischen Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen möglich ($FL_1, FL_2, \dots FL_n$).

Das auf die Detektoren auftreffende Licht erzeugt eine Spannung zwischen null und zehn Volt, die proportional zur Anzahl der auftreffenden Photonen ist. Von den Detektoren werden die Signale zum Vorverstärker weitergeleitet, der nach Einrichten eines gewissen Schwellenwerts (Threshold) unerwünschtes „Hintergrundrauschen“ herausfiltert.

Im Verstärker werden die Impulse erneut amplifiziert sowie analoge Spannungsmesswerte in binäre Zahlenwerte für die computergestützte Auswertung konvertiert. Hierdurch ergeben sich multiple Möglichkeiten zur Darstellung und Analyse am Computer: Beim „Gating“ beispielsweise kann eine bestimmte Subpopulation im FSC-SSC-Diagramm ausgesucht und näher untersucht werden [48].

2.3.2.2 Durchführung

Um die Reproduzierbarkeit und Kompatibilität der Messungen zu gewährleisten, wurden zu Beginn prinzipiell folgende Einstellungen im Durchflusszytometer geladen:

Detectors/Amplifiers:

Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E-1	4,99	Log
P2	SSC	350	1,00	Lin
P3	FL ₁	480	1,00	Log

Tabelle 4: Einstellungen des Durchflusszytometers

Threshold: FSC 52

Nun erfolgte die Kalibrierung des Zytometers für den aktuellen Versuch, wozu die Fluoreszenz der in PBS gelösten Partikel gemessen wurde (CaliBRITE™ FITC Beads) [49]. Die FL₁-Voltage-Einstellung wurde jeweils derart verändert, dass die Fluoreszenz dieser Beads vor jedem Versuch denselben Wert anzeigte.

Zur Messung wurden anschließend wenige Mikroliter der Zellsuspension vom Gerät in die ständig mit FACS Flow gespülte Flusskammer („Flow Chamber“) gesaugt. Der Einstrom beider Flüssigkeiten erfolgte druckgesteuert.

Von jeder Probe wurden nacheinander 10.000 Zellen gemessen. Sämtliche ermittelten Werte speicherte der Computer automatisch. Mithilfe des oben genannten „Gatings“ wertete man durch Markierung im FSC-SSC-Diagramm immer nur Zellen einer homogenen Subpopulation der 10.000 Gesamtzellen aus und erreichte damit, dass tote Zellen oder Zelltrümmer ignoriert wurden.

2.3.3 Anmerkungen zur weiteren Auswertung

Der Computer erstellte zunächst ein Diagramm mit der Ordinatenachse „Häufigkeit“ und der Abszisse „Fluoreszenz“. Der Hauptbereich der Verteilung wurde manuell markiert (M1) und dadurch Ausreißer nach oben und unten ausgeschlossen. Anschließend berechnete der Computer den Mittelwert der Fluoreszenzintensität des markierten Bereichs, woraufhin man (mithilfe des

Tabellenkalkulationsprogramms Excel) Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean, SEM) der einzelnen Bedingungen ermittelt. Der SEM berechnet sich aus der Standardabweichung s der Einzelwerte der jeweiligen Bedingung geteilt durch die Wurzel der Anzahl der Versuche n .

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

2.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Durchführung der PCR übernahm dankenswerterweise Frau Melanie Beyer vom Labor der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Würzburg.

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) stellt in der Molekularbiologie eine etablierte Methode zur *in vitro*-Amplifizierung von spezifischen Nukleinsäure-Sequenzen dar. Sie eignet sich für Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Fragmente von Hunderten bis mehreren Tausend Basenpaaren Länge. Eine Variante der PCR, die RT-PCR (Reverse Transkriptions-PCR), erlaubt darüber hinaus die Verwendung von Ribonukleinsäuren (RNS) als Ausgangsmatrix. Hierbei wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase die isolierte messenger RNS (mRNS) in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben, bevor die Amplifikation gestartet wird [50 (S. 236)].

Nach der in Kapitel 2.2 Zellkultur beschriebenen Chetomin- und Hypoxiebehandlung (einschließlich der Vergleichskontrollen) wurden die Petrischalen der Bedingungen aus Tabelle 5 ohne Reoxygenierung der weiteren Behandlung zugeführt. Hierzu wurden sie in einer Kühlbox auf Eis in das PCR-Labor transportiert.

Probe	Bezeichnung	Zusatz	Menge [µl] bzw. Konzentration [nM]	Brutschrank (B)/ Hypoxie (H)
1	KON	DMSO/PBS	150	B
2	KON	DMSO/PBS	150	H
3	CHT	Chetomin	150	B
4	CHT	Chetomin	150	H
5	DFO	Deferoxamin	100	B

Tabelle 5: PCR-Bedingungen

Um die mRNA-Produktion der Gene von VEGF und CA9 zu quantifizieren, wurde die Echtzeit-RT-PCR mit Hilfe des LightCyclers und des Fast Start Master Hybridization Detektionssystems durchgeführt. Die isolierte RNS wurde aus einer Million HT 1080 Zellen gewonnen, unter Verwendung des RNeasy Mini Kit.

Aus 900 ng extrahierter RNS wurde nun mittels Reverser Transkriptase Primärstrang-cDNS hergestellt. Hierbei kam das Quantitect Reverse Transcriptase Kit zum Einsatz.

Als Ansatz wurde je Probe ein Gesamtvolumen von 20 µl pipettiert, welches sich zusammensetzte aus bidestilliertem Wasser, cDNS und dem Reagenzien-Mix, bestehend aus 2,0 µl 10xPCR-Puffer II, 3,6 µl Magnesiumchlorid, 4,0 µl Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP), 0,1 µl Taq-Polymerase und eine je nach zu detektierendem Amplikon unterschiedliche Menge an spezifischem Primer, im vorliegenden Fall 0,2 µl sowohl für VEGF als auch für CA9.

Zum Nachweis des Amplikons von VEGF wurden spezifische Oligonukleotid-Primer verwendet: 5'-cctttcccttctcgaact und 5'-cagaatcatcacgaagtgggtaa. Die CA9-spezifischen Oligonukleotid-Primer enthielten 5'-ttccaatatgaggggtctct und 5'-ttcagctgtgccgagagt.

Sämtliche Reagenzien inklusive der cDNS waren im Gefrierschrank bei -25°C gelagert, wovon allein die Taq-Polymerase in flüssigem Zustand vorlag. Sie wurde zum Schluss dem Reagenzien-Mix hinzugefügt.

Die Mischung wurde unverzüglich in die Tubes mit cDNS pipettiert und der gesamte Ansatz anschließend in die PCR-Maschine gestellt.

45 Reaktionszyklen wurden mit den in Tabelle 6 dargestellten Parametern durchlaufen:

VEGF:	95°C für 600s:	95°C für 9s 55°C für 15s 72°C für 20s 40°C für 30s
CA9:	95°C für 600s:	95°C für 9s 60°C für 15s 72°C für 20s 40°C für 30s

Tabelle 6: PCR-Zyklen

2.5 Strahlenbehandlung und Koloniebildungsassay

2.5.1 Aussaat und Behandlung

Zur Vorbereitung auf die Bestrahlungsversuche wurden die HT 1080 WT Zellen einer niedrigen Passagezahl (z. B. P x +19) verwendet, seit mehreren Tagen inkubiert in 175 cm² großen Kulturflaschen mit jeweils 30 ml MEM α -Medium bei 37°C und 5% CO₂ im befeuchteten Brutschrank. Wie in Kapitel 2.2 Zellkultur beschrieben, wurde das Medium in den Kulturflaschen abgesaugt, mit PBS gewaschen und die Zellen mittels Trypsin-EDTA vom Boden gelöst. Die gewonnene Einzelzellsuspension der Flaschen wurde in einem 50 ml-Röhrchen zusammengeführt und daraus eine Pipettenspitze (entspricht etwa 50 μ l) Suspension in die Neubauer-Improved-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop zählte man die Felder aus und errechnete damit die Anzahl der Zellen im Tube (vgl. Kapitel 2.2 Zellkultur). Das Ziel bestand in der möglichst genauen Ermittlung der Zellzahl, um eine Million Zellen pro Glaspetrischale mit 10 ml Medium auszusäen. Über Nacht fand die Inkubation im Brutschrank statt. Am nächsten Tag wurde Chetomin in der Konzentration von 150 nM zugefügt, respektive 150 μ l DMSO/PBS für die Kontrollen (Verhältnis 1:10, siehe Kapitel 2.3.1 Aussaat und Behandlung). Auch hier galt aufgrund der entsprechenden Lösung von Chetomin in DMSO/PBS die Äquivalenz von Menge und Konzentration (150 μ l \cong 150 nM). Nach vier Stunden kamen die Schalen für zwölf Stunden bei 0,1% Sauerstoff in die Hypoxiebank. Die Kontrollen verblieben im Brutschrank. Insgesamt erfuhren die Zellen eine Inkubationsdauer mit Chetomin von 16 Stunden. Zur Bestrahlung wurden die anaeroben

Bedingungen in luftdichte Schalen verpackt und die Zellen je nach Voraussetzung mit einer Dosis von 0, 2, 5 oder 10 Gray (Gy) bestrahlt. In der Zusammenschau ergab sich folgende Übersicht der Versuchsbedingungen:

Messpunkt- Nummer	Beschriftung	Brutschrank (AIR) oder Hypoxie (0,1% O ₂)	Zusatz (jeweils 150µl bzw. 150nM)	Bestrahlungs- dosis [Gy]
1	KON + AIR	AIR	DMSO/PBS	0
2	KON + AIR	AIR	DMSO/PBS	2
3	KON + AIR	AIR	DMSO/PBS	5
4	KON + AIR	AIR	DMSO/PBS	10
5	KON + 0,1%	0,1% O ₂	DMSO/PBS	0
6	KON + 0,1%	0,1% O ₂	DMSO/PBS	2
7	KON + 0,1%	0,1% O ₂	DMSO/PBS	5
8	KON + 0,1%	0,1% O ₂	DMSO/PBS	10
9	CHT + AIR	AIR	Chetomin	0
10	CHT + AIR	AIR	Chetomin	2
11	CHT + AIR	AIR	Chetomin	5
12	CHT + AIR	AIR	Chetomin	10
13	CHT + 0,1%	0,1% O ₂	Chetomin	0
14	CHT + 0,1%	0,1% O ₂	Chetomin	2
15	CHT + 0,1%	0,1% O ₂	Chetomin	5
16	CHT + 0,1%	0,1% O ₂	Chetomin	10

Tabelle 7: Bestrahlungsbedingungen

2.5.2 Bestrahlung

Noch in der Hypoxiebank wurden die Petrischalen der Messpunkte 5 bis 8 und 13 bis 16 in luftdichte Perspex-Schalen gepackt, um bis zur Bestrahlung jeglichen Gasaustausch und somit eine Reoxygenierung zu verhindern. Sämtliche Bedingungen wurden in mit Eis unterlegten Styroporboxen zum Linearbeschleuniger transportiert. Die aeroben Kontrollen befanden sich in vergleichbaren Perspex-Schalen mit Luftlöchern zum ungehinderten Luftaustausch. Die Bestrahlung erfolgte mit 6 MV-Photonen (X-Rays) und einer Dosisrate von 2,5 Gy/min. Bei Raumtemperatur wurden die Petrischalen mit jeweils 2, 5 oder 10 Gy bestrahlt. Die Kontrollen (Schalen 1, 5, 9 und 11) wurden nicht bestrahlt.

2.5.3 Kolonieaussaat

Um die Koloniebildung zu bestimmen und damit das zelluläre Überleben anhand von Überlebenskurven quantifizieren zu können, mussten die Zellen unmittelbar nach Bestrahlung ausgesät werden. Hierzu wurde das Medium sämtlicher Bedingungen abgesaugt und durch etwa 5 ml frisches, eiskaltes MEM α ersetzt; zudem wurden die Petrischalen auf Eis gelegt, damit der Zellmetabolismus während der Aussaat sistierte.

Für jeden Messpunkt wurden vier Plastikpetrischalen zur Kolonieaussaat angelegt. Darum bedurfte es zur Vorbereitung des Richtens von 4x16, das heißt 64, beschrifteten Schalen. Zudem setzte man MEM α -Medium, PBS und Trypsin-EDTA ins warme Wasserbad und stellte sicher, dass genügend Medium im Kühlschrank vorrätig blieb.

Nun wurden die ersten vier Schälchen durch Absaugen von Medium befreit, dann mittels warmem PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA behandelt. Abgestoppt wurden die Zellen daraufhin mit 3 ml kaltem Medium (MEM α). Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren löste man eventuell noch anhaftende Zellen, entnahm eine Pipettenspitze der Zellsuspension und brachte diese in die Neubauer-Improved-Zählkammer ein. Unter dem Mikroskop konnte jetzt die Zellzahl pro Milliliter Suspension bestimmt werden, indem die Zellen im Raster der 4x16 Zählfelder zusammengezählt, durch 4 dividiert und mit 10.000 multipliziert wurden. Die Menge an Suspension errechnete sich im Weiteren durch die Division:

$$100.000 / \text{Zellzahl pro Milliliter.}$$

Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms wurde das Verhältnis von Suspension zu Medium ermittelt. So konnte für jeden Messpunkt die benötigte Zellzahl exakt ausgesät werden.

Hierbei ergab sich jeweils ein unterschiedlicher Wert in der pro Messpunkt auszusäenden Zellzahl: Bei den Kontrollen ohne Bestrahlung beispielsweise mussten aufgrund der zu erwartenden relativ hohen Proliferationsrate eher weniger Zellen ausgesät werden, während bei solchen mit 10 Gy Bestrahlung eine größere Menge eingesetzt wurde, damit genügend Kolonien in den Schalen anwachsen konnten.

Bei den Versuchen hat sich die in Tabelle 8 gezeigte Verteilung als optimal herausgestellt. Die Werte bedeuten die pro Petrischale ausgesäte Zellzahl, die umklammerten Ziffern sind die Messpunktnummern.

	KON + AIR	KON + 0,1%	CHT + AIR	CHT + 0,1%
0 Gy	100 (1)	100 (5)	100 (9)	100 (13)
2 Gy	200 (2)	100 (6)	500 (10)	200 (14)
5 Gy	2.000 (3)	1.000 (7)	2.000 (11)	5.000 (15)
10 Gy	100.000 (4)	10.000 (8)	100.000 (12)	100.000 (16)

Tabelle 8: Koloniaussaat

Das errechnete Verhältnis von Suspension zu Medium wurde nun für jeden Messpunkt in einem beschrifteten 15 ml-Tube angesetzt (meistens für 10.000 Zellen/ml). Daraus wurde nach dem Schwenken des Tubes 1 ml entnommen und einem zweiten Tube mit 9 ml Medium zugefügt. In Letzterem galt nun eine Zellverteilung von 1.000/ml, aus der jeweils 100 µl für 100 Zellen in jede Petrischale pipettiert wurden, abhängig von der benötigten Zellzahl des Messpunktes. Zuletzt sollte jede Schale 10 ml Suspension enthalten, das Auffüllen erfolgte mit Medium.

Nun verblieben die insgesamt 64 Petrischalen für die Dauer von 10 bis 14 Tagen im Brutschrank. In diesem Zeitraum fand die Zellvermehrung und Koloniebildung statt.

2.5.4 Abstoppen und Auszählung

Nach 14 Tagen wurde das Medium aus sämtlichen Petrischalen abgeschüttet und mit Fixativ bedeckt. Fixativ ist eine Mischung aus 375 ml Methanol und 125 ml 100%iger Essigsäure und stoppt die Zellprozesse. Darüber hinaus verhindert es das ungewollte Lösen der Zellen vom Untergrund. Der Boden der Schalen musste vollständig bedeckt sein. Etwa 15 Minuten später schüttete man das Fixativ ab und entsorgte es in Abfallbehälter. Daraufhin gab man Kristallviolett (1 g/l) in die Plastikschalen und ließ die Kolonien 20 bis 30 Minuten anfärben, bevor auch hier sorgfältig in die Abfallflaschen entsorgt wurde. Zum Abschluss wurden die Petrischalen mit destilliertem Wasser gewaschen, welches ebenfalls in den Abfallbehälter gegossen wurde, und zum

Trocknen aufgereiht.

Die in den Petrischalen gewachsenen, durch obiges Verfahren gefärbten Kolonien konnten nun ausgezählt werden. Hierbei wurden alle Kolonien berücksichtigt, die aus mindestens 50 Zellen bestanden (vgl. Kapitel 2.5.5.1).

2.5.5 Überlebenskurven

2.5.5.1 Allgemeines

Eine Zellüberlebenskurve beschreibt die Beziehung zwischen der Bestrahlungsdosis und dem Anteil der überlebenden Zellen. Überlebende Zellen, die ihre proliferative Kapazität bewahrt haben und sich frei vermehren können, werden als klonogen bezeichnet. Während für ausdifferenzierte Zellen wie Neuronen, Muskel- oder Drüsenzellen der Zelltod als Verlust einer spezifischen Funktion beschrieben werden kann, bedeutet dies bei allen proliferierenden Zellen – hier wären zu nennen hämatopoetische Stammzellen oder auch Zellen in Kultur – den Verlust der Fähigkeit zur ständigen Proliferation, auch bezeichnet als Verlust der reproduktiven Integrität.

Im Proliferationsverhalten nach Bestrahlung zeigt sich die Notwendigkeit der genauen Differenzierung zwischen klonogenen Zellen, welche ihre reproduktive Integrität bewahrt haben, und Zellen, die zwar noch immer präsent und intakt erscheinen mögen, Proteine herstellen, DNS vervielfältigen und eventuell sogar zu ein bis zwei Mitosen imstande sind, jedoch ihre Fähigkeit zu unbegrenzter Teilung und Produktion einer großen Nachkommenschaft verloren haben, also per definitionem tot sind. In Zellüberlebenskurven wird diesem Sachverhalt Rechnung getragen, indem allein solche Kolonien, die mehr als eine bestimmte Zellzahl (in den vorliegenden Versuchen mindestens 50) aufweisen, mitgezählt, alle anderen hingegen unberücksichtigt gelassen werden.

Die Fähigkeit einer einzelnen Zelle, zu einer großen Kolonie anzuwachsen, die man leicht mit bloßem Auge sehen kann, stellt einen geeigneten Beweis für ihre reproduktive Integrität dar. Der Verlust dieser Fähigkeit wird als Funktion der Bestrahlungsdosis in den Dosis-Überlebenskurven aufgezeichnet.

Alle Zellen, die eine Kolonie umfassen, sind die Nachkommen einer einzelnen Zelle. Idealerweise sollten in der Schale mit 100 ausgesäten Zellen auch 100

Kolonien gewachsen sein, doch war dies selten der Fall aus einer Vielzahl von Gründen: angefangen von Fehlern und Unsicherheiten im Auszählen der Zellsuspension, nicht ganz optimalem Medium bis hin zur Traumatisierung durch die Trypsinbehandlung und Bearbeitung.

Wurde neben dieser Kontrolle eine weitere Petrischale mit ausgesäten Zellen einer Strahlung von zum Beispiel 10 Gray ausgesetzt (siehe Messpunkte 4, 8, 12 und 16 aus Tabelle 7), anschließend zwei Wochen inkubiert und zuletzt fixiert und gefärbt, konnten folgende Konstellationen beobachtet werden:

- 1 Einige der ausgesäten Zellen erschienen immer noch vereinzelt und hatten sich nicht geteilt (Interphasetod).
- 2 Manche Zellen konnten ein oder zwei Mitosen bewerkstelligen und eine winzige vernachlässigbare Kolonie bilden (Reproduktivtod).
- 3 Andere waren zu großen Kolonien herangewachsen, die sich wenig von denen der nicht bestrahlten Kontrollen unterschieden, außer dass sie variable Größe aufwiesen.

Diese Zellen galten als Überlebende, denn sie hatten ihre reproduktive Integrität behalten.

2.5.5.2 Berechnungen und Kurvenerstellung

Der Begriff Platieffizienz (Plating Efficiency, PE) gibt den Prozentsatz der zu Kolonien gewachsenen von allen ausgesäten Zellen an:

$PE = \text{Anzahl der Kolonien} / \text{Anzahl ausgesäter Zellen}$

Das Verhältnis der PE von bestrahlten Zellen zu Kontrollen, korrigiert unter der Berücksichtigung von Abweichungen der PE bei den nichtbestrahlten Kontrollen, ergibt das Relative Überleben (Survival Fraction, SF) in Prozent:

$$SF = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Ausgesäte Zellen} * \left(\frac{PE \text{ der Kontrollen}}{100}\right)}$$

In Überlebenskurven wird SF als eine Funktion der Bestrahlungsdosis D aufgetragen. Mit Optimierung [51] der Konstanten α und β (siehe unten) werden die einzelnen Daten in folgendes linear-quadratisches Modell eingesetzt:

$$S(D) = \exp [-(\alpha D + \beta D^2)]$$

Die Gleichung beschreibt eine Dosis-Wirkungsbeziehung mit einer „Schulter“ –

der flach verlaufende Anfangsteil in einer linear auf logarithmischen Maßstab aufgetragenen Dosis-Effekt-Kurve, die Hinweise auf die zelluläre Reparaturkapazität liefert. Die weitere Funktion verläuft exponentiell abfallend [52].

Die beiden den Zelltod beschreibenden Komponenten bestehen aus einem linearen (α) und einem quadratischen (β) Ausdruck. Der α -Wert steht hierbei für die Strahlensensitivität bei niedrigen Strahlendosen, der β -Wert beschreibt das Maß für die Strahlensensitivität bei hohen Strahlendosen. Die Dosis, bei der die zwei Anteile gleich sind, entspricht dem Verhältnis α/β . Theoretisch lassen sich damit die Strahlenempfindlichkeiten unterschiedlicher Gewebe nach der Gesamtdosis einer Strahlentherapie beschreiben.

2.6 Western Blot

2.6.1 Aussaat und Behandlung

In Kapitel 2.2 wurde die Beschreibung von Zellkultur und Aussaat ausführlich dargelegt. Auch für den Western Blot (WB) wurden in jeder Petrischale eine Million Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank belassen. Pro Bedingung waren mindestens vier Petrischalen nötig, um eine Auswertung mit einer ausreichenden Menge an Protein gewährleisten zu können. Am folgenden Tag wurden bei zwei der Tabelle 9 zu entnehmenden Bedingungen 150 nM Chetomin zugegeben und vier Stunden später die jeweiligen Petrischalen für zwölf Stunden im befeuchteten Brutschrank respektive der Hypoxiebank (bei 0,1% O₂, 5% CO₂ und 37°C) inkubiert. In der Hypoxiebank mussten Glaspetrischalen verwendet werden, während für die Brutschrankbedingungen Plastikschalen ausreichten. Im Gegensatz zu den Durchflusszytometrie-Experimenten erfolgte keine anschließende Reoxygenierung. Die einzelnen Versuchsbedingungen gehen aus Tabelle 9 hervor:

Bezeichnung	Zusatz	Menge [μ l] bzw. Konzentration [nM]	Brutschrank (B) oder Hypoxie (H)	Anzahl Petrischalen
KON	DMSO/PBS	150	B	4
KON	DMSO/PBS	150	H	4
CHT	Chetomin	150	B	4
CHT	Chetomin	150	H	4
DFO	Deferoxamin	100	B	4

Tabelle 9: Western Blot-Bedingungen

2.6.2 Zellysate

Nach der Entnahme aus dem Brutschrank respektive der Ausschleusung aus der Hypoxiebank mussten die Petrischalen umgehend auf Eis gestellt werden, damit der Zellmetabolismus vollständig zum Erliegen kam. Während der Durchführung aller Schritte musste die Kühlkette gewährleistet sein, was die Lagerung auf Eis und die Verwendung kalter Chemikalien erforderte. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und den Zellen circa 5 ml eiskaltes PBS pro Schale zugefügt. Mit dem Zellschaber wurden die Zellen durch vorsichtiges Kratzen vom Boden gelöst. Für jede Bedingung war ein eigener Schaber zu verwenden. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml fassendes Zentrifugenröhrchen pipettiert und solange auf Eis gelagert, bis sämtliche Bedingungen diese Prozedur durchlaufen hatten. Im Anschluss wurden die Röhrchen mit 1.200 U/min für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 50 μ l von mit Proteaseinhibitoren ergänztem RIPA-Puffer resuspendiert. Der Puffer bestand aus 50 mM Tris-HCl (mittels Salzsäure wurde auf den pH-Wert von 7,4 titriert), 1% NP-40 (Igepal), 0,25% Natriumdeoxycholat, 150 mM NaCl und 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Einem Milliliter dieses RIPA-Puffers wurden kurz vor Gebrauch die Proteaseinhibitoren wie folgt zugegeben:

2 µl Pepstatin A (0,5 mg/ml)
0,5 µl Aprotinin (2,1 mg/ml)
2 µl Leupeptin (0,5 mg/ml)
10 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (100 mM)

Die durch den Puffer resuspendierten Pellets wurden in Caps 30 Minuten auf Eis inkubiert. Hierauf folgte die Zentrifugierung bei 4°C mit diesmal 12.000 U/min für zwölf Minuten. Im Überstand befanden sich nun die Zelllysate, die in Caps pipettiert und bei -20°C eingefroren wurden. Das Pellet wurde verworfen.

2.6.3 Proteinbestimmung

Die Messung des Proteingehalts der Zelllysate wurde nach der Biuret-Methode durchgeführt. Die Nachweisreaktion färbt Peptidbindungen zwischen Aminosäuren spezifisch an. Biuret entsteht durch die Addition von Harnstoff und Isocyansäure und weist ähnliche Strukturmerkmale auf wie Eiweiß: Die Proteine reagieren mit Kupferionen zu einem blau-violetten Farbkomplex, dessen Intensität sich proportional zur Menge der Peptidbindungen verhält. Die mit der Proteinmenge steigende Extinktion lässt sich spektrometrisch am Photometer ermitteln.

Zunächst stellte man den Proteinstandard her, wozu die Bio-Rad-Reagenzien B, S und A in dem in der Vorbereitung verwendeten Puffer RIPA mit einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst wurden. Aliquots à 100 µl wurden bei -20°C eingefroren.

Für die Proteinmessung wurden die Proben aus Kapitel 2.6.2 und ein Standard-Aliquot langsam im Eis aufgetaut und das Working-Reagenz A' angefertigt. Hierzu wurde pro Milliliter Reagenz A 20 µl Reagenz S in ein Röhrchen pipettiert.

Zur Untersuchung im Photometer benötigte man für die Ermittlung der Eichgeraden acht Küvetten und pro Bedingung jeweils eine.

Jede Küvette wurde mit 100 µl A' versetzt. Anschließend wurde RIPA-Puffer inklusive Proteaseinhibitoren (RIPA), Proteinstandard (Standard) und Zelllysate (Probe) der einzelnen Bedingungen (1, 2, ..., n-1, n) in der entsprechenden Menge – wie in Tabelle 10 illustriert – in die Küvetten pipettiert. In unseren Versuchen wurden fünf Proben bzw. Bedingungen untersucht (n = 5). Hierzu

gehörten die Kontrollen unter Normoxie, Hypoxie und Deferoxamin sowie die mit Chetomin versetzten Proben (vgl. Tabelle 9 in Kapitel 2.6.1 Aussaat und Behandlung).

Zum Schluss wurden jeweils 800 µl Reagenz B hinzugefügt. Alle verwendeten Chemikalien und Proben mussten frisch aufgetaut, während des Pipettierens auf Eis gelagert und nachfolgend erneut bei -20°C eingefroren beziehungsweise verworfen werden.

Küvetten- bezeichnung	Reagenz A' [µl]	RIPA [µl]	Standard [µl]	Probe [µl]	Reagenz B [µl]
Leerwert	100	20	0	0	800
0,1 µg	100	19	1	0	800
0,25 µg	100	17,5	2,5	0	800
0,5 µg	100	15	5	0	800
0,75 µg	100	12,5	7,5	0	800
1,0 µg	100	10	10	0	800
1,5 µg	100	5	15	0	800
2,0 µg	100	0	20	0	800
Probe 1	100	15	0	5	800
Probe 2	100	15	0	5	800
...	100	15	0	5	800
Probe n-1	100	15	0	5	800
Probe n	100	15	0	5	800

Tabelle 10: Pipettierschema zur Proteinbestimmung

Die gefüllten Küvetten wurden bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. In dieser Zeit lief die Biuretreaktion linear ab. Bei einer Wellenlänge von 750 nm wurde die Extinktion anschließend im Photometer gemessen. Hierbei maß man zu Beginn die Küvette mit 0 mg Standardprotein (Leerwert) und kalibrierte unabhängig vom Messwert die Extinktion auf 0. Nachfolgend wurden alle

anderen Küvetten gemessen.

Sollte aus einer sehr großen Proteinmenge trotz der üblichen 1:4-Verdünnung der Proben mit RIPA eine sehr hohe Extinktion resultieren, wurde zusätzlich noch eine 1:10-Verdünnung mit erneuter Messung durchgeführt, um eine genaue Auswertung zu ermöglichen.

Mithilfe des Programms Microsoft Excel 2000 erstellte man anhand der Extinktionen (A) der Proteinstandards die Eichgerade. Anhand der Extinktionen der Proben sowie der Steigung der Eichgerade ermittelte man die Proteinkonzentration (mg/ml) und die Menge an Probe (μ l) beziehungsweise an RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren (μ l). Dies wurde für die Auftragung von 10 oder 20 μ g Protein bei der Elektrophorese benötigt, wie an der folgenden Darstellung des Versuchs vom 07.12.06 mit Auswertung am 13.12.2006 veranschaulicht wird:

Standards in RIPA	mg/ml	A
	0	0,000
	0,1	0,030
	0,25	0,079
	0,5	0,133
	0,75	0,197
	1	0,251
	1,5	0,347
	2	0,426

Tabelle 11: Zellysate am 13.12.06, A: Extinktion im Photometer

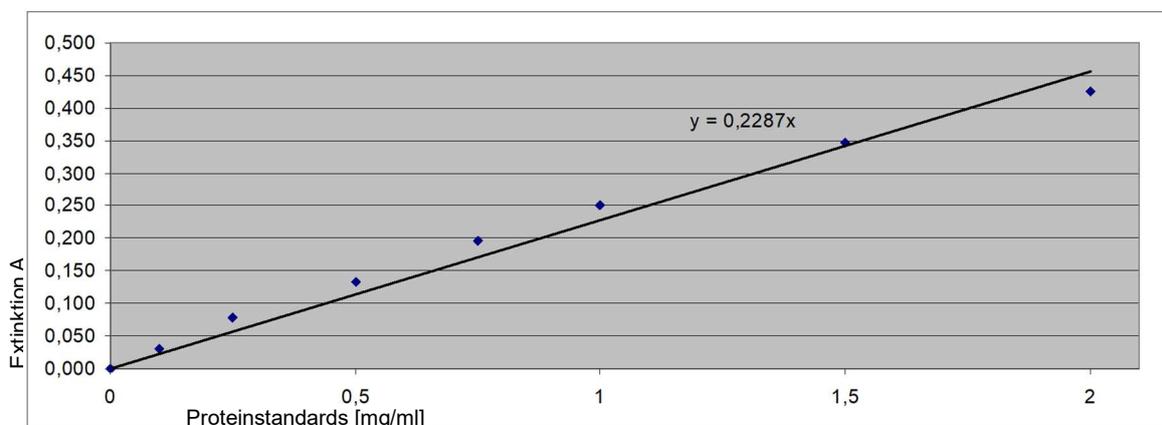


Abbildung 5: Eichgerade der Proteinstandards vom 13.12.06

Verd.	Proben	Extinktion A	Konzentration mg/ml	für 20 µg Protein		für 15µg Protein		für 10 µg Protein		für 5 µg Protein	
				Menge Probe in µl	Menge RIPA in µl						
1	1:10 HT1080WT MEMalpha Brutschrank + 150µl DMSO/PBS 08.12.06	0,296	12,94	1,70	13,30	1,27	13,73	0,85	14,15	0,43	14,57
2	1:10 HT1080WT MEMalpha 0,1% O2 + 150µl DMSO/PBS 08.12.06	0,276	12,07	1,83	13,17	1,37	13,63	0,91	14,09	0,46	14,54
3	1:10 HT1080WT MEMalpha Brutschrank + 150nM Chetomin in DMSO/PBS 08.12.06	0,323	14,12	1,56	13,44	1,17	13,83	0,78	14,22	0,39	14,61
4	1:10 HT1080WT MEMalpha 0,1% O2 + 150nM Chetomin in DMSO/PBS 08.12.06	0,154	6,73	3,27	11,73	2,45	12,55	1,63	13,37	0,82	14,18
5	1:10 HT1080WT MEMalpha Brutschrank + DFO 08.12.06	0,221	9,66	2,28	12,72	1,71	13,29	1,13	13,87	0,57	14,43
6	1:10 HT1080WT MEMalpha Brutschrank 08.12.06	0,360	15,74	1,40	13,60	1,05	13,95	0,70	14,30	0,35	14,65
7	1:10 HT1080WT MEMalpha Brutschrank + 150µl DMSO/PBS 09.12.06 DD	0,221	9,66	2,28	12,72	1,71	13,29	1,13	13,87	0,57	14,43
8	1:10 HT1080WT MEMalpha 0,1% O2 + 150µl DMSO/PBS 09.12.06 DD	0,265	11,59	1,90	13,10	1,42	13,58	0,95	14,05	0,48	14,52
9	1:10 HT1080WT MEMalpha Brutschrank + 50nM Chetomin in DMSO/PBS 09.12.06 DD	0,207	9,05	2,44	12,56	1,82	13,18	1,21	13,79	0,61	14,39
10	1:10 HT1080WT MEMalpha 0,1% O2 + 50nM Chetomin in DMSO/PBS 09.12.06 DD	0,124	5,42	4,07	10,93	3,04	11,96	2,02	12,98	1,02	13,98
11	1:10 HT1080WT MEMalpha Brutschrank + 150nM Chetomin in DMSO/PBS 09.12.06 DD	0,146	6,38	3,45	11,55	2,58	12,42	1,72	13,28	0,86	14,14
12	1:10 HT1080WT MEMalpha 0,1% O2 + 150nM Chetomin in DMSO/PBS 09.12.06 DD	0,115	5,03	4,39	10,61	3,28	11,72	2,18	12,82	1,10	13,90
13	1:10 HT1080WT MEMalpha Brutschrank + DFO 09.12.06 DD	0,146	6,38	3,45	11,55	2,58	12,42	1,72	13,28	0,86	14,14
14	1:10 HT1080WT MEMalpha Brutschrank 09.12.06 DD	0,233	10,19	2,16	12,84	1,62	13,38	1,07	13,93	0,54	14,46

Tabelle 12: Bestimmung der Proteinkonzentrationen 13.12.06

2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.6.4.1 Prinzip

Elektrophorese bedeutet zunächst die Wanderung eines Ions durch einen als Trägermaterial dienenden Stoff in einem elektrischen Feld, wobei verschiedene Faktoren die Wanderungsgeschwindigkeit des Moleküls beeinflussen: Seine Ladung Q , die Feldstärke E und – umgekehrt proportional – der Teilchenradius r und die Viskosität η des Stoffes [50 (S. 65)].

Die Gelelektrophorese ist in der Chemie und Molekularbiologie eine analytische Methode zum Auftrennen verschiedener Arten von Teilchen, wobei ein Stoffgemisch aus den zu trennenden Molekülen unter Einfluss eines elektrischen Felds durch ein als Molekularsieb wirkendes Gel wandert, das in einer ionischen Pufferlösung liegt. Hierbei wirkt sich zusätzlich das Verhältnis

zwischen dem Teilchenradius und der Porenweite des Trägermediums auf die elektrophoretische Mobilität aus. Kleine, negativ geladene Anionen wandern am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode, Kationen mit positiver Ladung vice versa zur negativen Kathode.

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) befinden sich im Gel molekulare Poren, deren Gittergröße durch den Vernetzungsgrad, d. h. die Konzentration des Acrylamids bestimmt wird [50 (S. 65)]. Beim Anlegen einer Spannung werden die Moleküle durch das Polymer gezogen und nach Ladung und Größe der Teilchen elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses Verfahren eignet sich besonders für Proteine und Nukleinsäuren.

Eine spezielle Variante der PAGE stellt die SDS-PAGE dar. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, welches durch seine Eigenladung die Nettoladung der Proteine maskiert. Es werden ca. 1,4 g SDS benötigt, um ein Gramm Protein zu binden, sodass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Der starke Denaturierungseffekt hebt die Quartärstruktur komplexer Proteine auf: SDS heftet sich mit dem aliphatischen Ende an die Proteinmoleküle und stößt sich mit der negativ geladenen Seite von in der Nachbarschaft gebundenen ebenfalls negativen SDS-Molekülen ab, was zur völligen Auffaltung der Polypeptide führt [50 (S. 65)]. Nichtkovalente Bindungen wie Wasserstoffbrücken werden somit durch das SDS zerstört und mit gleichzeitiger Linearisierung der Moleküle die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgebrochen. Optional können vorhandene Disulfidbrücken durch reduzierende Thiolverbindungen wie Mercaptoethanol gespalten werden [50 (S. 65)]. Das Anlegen der elektrischen Spannung bewirkt die Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel zur Anode. Hierbei wandern kleine Proteine relativ leicht durch die Maschen des Gels, während große eher zurückgehalten werden und infolgedessen das Durchlaufen langsamer vonstattengeht.

Mit dieser Methode wird folglich die molekulare Masse der Proteinuntereinheiten ermittelt, was bedeutet, dass die Proteine bei dieser besonderen Art der Elektrophorese nach Größe sortiert sind. Die Eigenladung der Moleküle spielt aufgrund der Maskierung durch SDS keine Rolle mehr. Durch Färbeverfahren oder immunologischen Nachweis wie beim Western Blot (siehe Kapitel 2.6.5 Immunblot) können sie sichtbar gemacht werden.

2.6.4.2 Durchführung

Zur Vorbereitung für die Elektrophorese wurden die Proben je nach erzielter Proteinmenge in den Zelllysaten mit 10 µg Protein pro Lane eingesetzt. Dazu beschriftete man Caps für jede Bedingung und lagerte diese während des Pipettierens auf Eis. In jedes Cap wurde nacheinander die berechnete Menge an RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren und anschließend die Proteinprobe gegeben, um zusammen 15 µl verdünnte Probe zu erhalten. Daraufhin wurde in jedes Cap 5 µl Sample Buffer sowie 2 µl Sample Reducing Agent hinzugegeben, sodass ein Cap jeweils 22 µl enthielt. Sämtliche Proben wurden nun für zehn Minuten im 70°C warmen Wasserbad erwärmt und im Anschluss als Quick Run bis circa 5000 U/min anzentrifugiert. Zwischenzeitlich erfolgte die Vorbereitung der Gele (4-12% Bis-Tris), welche in die Elektrophoresekammer gefüllt wurden. Zwischen die Gele wurde daraufhin der Upper Buffer gegeben, während der Lower Buffer außerhalb der Gele in die Elektrophoresekammer gegossen wurde. Nun konnten pro Bedingung 20 µl der verdünnten Proben in die jeweilige Lane pipettiert werden sowie 5 µl eines Proteinmarkers in die Taschen der beiden äußersten Lanes. Dieser markiert auf der Western Blot Membran und dem Röntgenfilm standardmäßig die Molekularmassen 10, 15, 20, 25, 37, 50, 100, 150 und 250 kDa.

Die Elektrophorese läuft nun 50 Minuten bei einer Spannung von 200 Volt. Hierbei kann die Stromquelle durch Veränderung der Stromstärke je nach Widerstand im Gel ein konstantes elektrisches Feld aufbauen, das die Erzielung unverfälschter Ergebnisse gewährleistet.

2.6.5 Immunblot

2.6.5.1 Prinzip

Durch den Western Blot oder Immunblot ergibt sich die Möglichkeit, das Bandenbild der Gelelektrophorese zu konservieren. Beim Blotten werden die auf dem Gel separierten Proteine auf eine Trägermembran wie Nitrozellulosepapier oder Nylonfolie übertragen [50 (S. 65)]. Färbemethoden und Waschvorgänge haben nun keinen Einfluss mehr auf die Bandenverteilung, da die

fixierten Proteine nicht herunter gewaschen werden können. Die Blots mit den immobilisierten Proteinbanden können im Anschluss mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden.

2.6.5.2 Durchführung

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele der Kammer entnommen und die Gekassetten vorsichtig aufgebrochen. Daraufhin weichte man fünf Schaumstoffschwämme, vier Filterpapiere und zwei Nitrozellulose-Membranen mit $0,2\ \mu\text{m}$ Porengröße in Transfer Buffer ein und fügte diese gemeinsam mit den Gelen sandwichartig unter Druck in einer Blotting-Einheit zusammen. Hierbei musste explizit die Berührung mit Fingern vermieden und auf die ausschließliche Arbeit mit Pinzetten geachtet werden. Das Blotting-Sandwich ist wie folgt aufgebaut (siehe Abbildung 6):

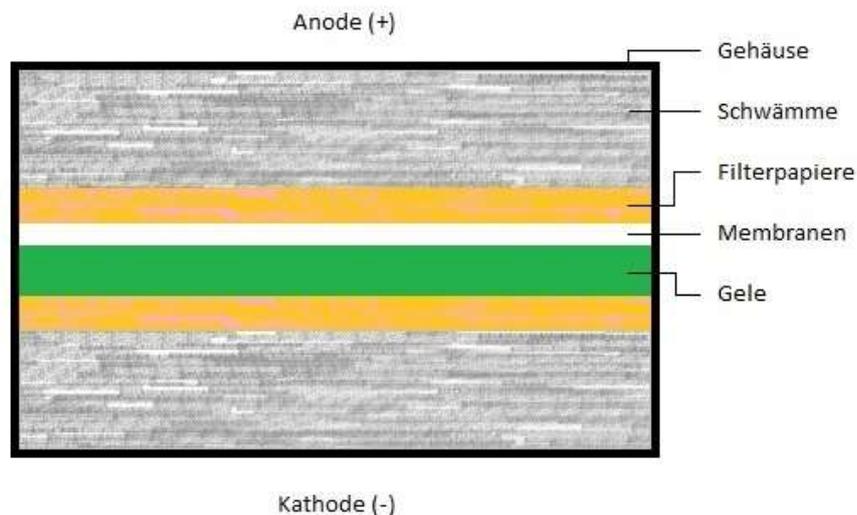


Abbildung 6: Aufbau des Western Blot Systems [selbst erstellt]

Dieses System wurde in einer Elektrophoresekammer platziert und mit Transfer Buffer gefüllt. Außerhalb der Blotting-Einheit wurde destilliertes Wasser in die Kammer gegossen. Der Blotvorgang erfolgte bei einem durch die Stromquelle konstant gehaltenen elektrischen Feld mit einer Spannung von 30 Volt. Nach einer Dauer von 120 Minuten entnahm man die Membranen per Pinzette und färbte sie 30 Minuten mit Coomassie-Färbelösung, um sie hinterher drei Stunden mittels Entfärbelösung wieder zu entfärben, bis das Gel durchsichtig

wurde. Dies diente dem Nachweis von möglichen Protein-Rückständen im Gel. Die Membranen wurden auf einen Datenträger gescannt und anschließend auf dem Schüttler für zehn Minuten in 0,2%iger PonceauS-Lösung angefärbt. Daraufhin folgte die erneute Entfärbung durch circa fünfminütiges Waschen mit destilliertem Wasser, bis der Hintergrund weiß erschien und nur noch die Lanes koloriert waren. Diese sollten nun alle gleichstark angefärbt sein. PonceauS färbte die auf der Membran gebundenen Proteine und zeigte so, ob sich in jeder Lane etwa die gleiche Proteinmenge befand. Zur Dokumentation wurden die Membranen erneut eingescannt. Damit im Laufe der weiteren Immunblotbehandlung unspezifische Bindungsstellen für Antikörper gesättigt waren, wurden die Membranen zum Blockieren in 4%ige Milch (Milchpulver in PBS/0,1% TWEEN-20) gelegt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.6.6 Immunologischer Nachweis von VEGF, CA9, EPO und β -Actin

2.6.6.1 Prinzip

Das Prinzip des Immunblots beruht auf der Bindung von spezifischen Antikörpern an ein Epitop oder Antigen des nachzuweisenden Proteins wie VEGF, CA9, EPO oder β -Actin. β -Actin ist ein Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt und üblicherweise als Kontrollprotein fungiert. Die aus Kaninchen gezüchteten Primärantikörper dienen als Antigen für markierte Goat-Anti-Rabbit-Sekundärantikörper, die nach Bindung an den F_c-Teil der Erstantikörper mithilfe des an sie gebundenen Enzyms eine Reaktion katalysieren [50 (S. 794f.)]. Hierdurch wird eine intensive Chemolumineszenz mit maximaler Emission bei einer Wellenlänge von 430 nm generiert.

Das System „ECL Plus Western Blotting Detection Reagents“ dient der Bereitstellung der Reagenzien für die Chemolumineszenz-Reaktion und basiert auf der Oxidation von Acridan zu Acridiniumester, der unter alkalischen Bedingungen mit Peroxid reagiert. Katalysiert wird diese Oxidation von Peroxid und dem Enzym Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) des Sekundärantikörpers, wodurch sich die Protein-Antikörper-Komplexe wie in Abbildung 7 als dunkle Banden darstellen lassen [50 (S. 323)].



Abbildung 7: Beispiel für einen Western Blot [eigene Daten]

2.6.6.2 Durchführung

Die Membranen wurden mit 4 µl des jeweiligen Primärantikörpers (Anti-VEGF-, Anti-CA9-, Anti-EPO- oder Anti-β-Actin-Kaninchenantikörper) und 2 ml Milch (1:500) in Plastikfolien eingeschweißt – was der bestmöglichen Ausnutzung der Antikörperlösung dient – und für zwei Stunden bei 4°C in den Kühlschrank gelegt. Daraufhin wurden sie bei Raumtemperatur in geeigneten Behältern mit PBS/0,1% TWEEN-20 auf dem Schüttler für dreimal zehn Minuten mit jeweils erneuertem PBS-TWEEN gewaschen. Der nächste Schritt beinhaltete das Einlegen der Membranen in Milch inklusive dem mit Meerrettichperoxidase konjugierten Ziege-Anti-Kaninchen-Zweitantikörper (im Verhältnis 1:2.000). Hierfür wurden sie erneut in Plastikfolien eingeschweißt und eine Stunde im Kühlschrank gelagert. Der anschließende Waschvorgang erfolgte wie der vorangehende.

Die nun folgenden Schritte spielten sich in der Dunkelkammer ab: Die Spülflüssigkeit wurde abgeschüttet und die Mischung aus den Reagenzien ECL-A (5 ml) und ECL-B (125 µl) frisch angesetzt. Diese wurde jetzt in die Plastikbehälter mit den Membranen gegeben. Nach fünf Minuten Inkubationszeit entnahm man die Membranen und legte sie in eine Röntgenkassette, um die Röntgenfilme zu belichten. Die Belichtungszeit hing von der Bandenintensität ab, im Regelfall bewegte sie sich zwischen einer halben und fünf Minuten. Bei VEGF und EPO lag der Richtwert bei drei Minuten, während er bei CA9 und β-Actin im Sekundenbereich angesiedelt war (CA9 circa zehn Sekunden, β-Actin fünf Sekunden). In der Entwicklermaschine wurden die Filme automatisch entwickelt.

2.6.7 Auswertung der Western Blots

Die entwickelten Filme wurden eingescannt und die Proteinbanden von VEGF und CA9 mithilfe der „Kodak-1D Image Analysis Software“ quantitativ ausgewertet. Neben der Funktion Band Int für die Bandenintensität ermittelte das Programm auch die Nettointensität der Banden unter Berücksichtigung des Hintergrunds (Net Int). Für statistische Berechnungen und die Erstellung von Kurven und Graphiken wurde allein der Nettowert einbezogen. Die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2000. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche untereinander zu erreichen, wurde für die Positivkontrolle jeweils der Quotient aus VEGF, CA9 oder EPO im Zähler und β -Actin im Nenner gebildet und auf 100% normiert. Die übrigen Bedingungen ergaben daraus abgeleitete Prozentwerte.

Von allen Bedingungen errechnete man darüber hinaus den Mittelwert aller Versuche inklusive dessen Standardfehler (Standard Error of the Mean, SEM, vgl. Kapitel 2.3.3 Anmerkungen zur weiteren Auswertung).

2.7 Statistische Analyse

Zur statistischen Aufarbeitung der gewonnenen Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test (Statistica vs. 6.1 Software) verwendet, ein nicht-parametrischer statistischer Test. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% ($p \leq 0,05$) festgelegt, das heißt ein signifikanter Unterschied (gekennzeichnet mit einem *) wurde bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von über 95% angenommen.

3 Ergebnisse

Allen Ergebnissen lagen, sofern nicht anders angegeben, mindesten drei Versuchsdurchgänge zugrunde ($n = 3$). Die Fluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer stellten exemplarische Einzelmessungen dar.

3.1 Auswertung der Versuche am Durchflusszytometer

Die Darstellung der Daten erfolgte primär als Histogramm, das die Fluoreszenzintensität als Häufigkeitsverteilung wiedergibt. Hierbei entspricht die Fluoreszenz der Expression hypoxieabhängiger Gene, das Integral der Kurve entspricht der Gesamtanzahl an untersuchten Zellen.

3.1.1 HIF-1-abhängige transkriptionelle Aktivierung unter Chetomin

Die Auswertung der Durchflusszytometrie-Experimente mit EGFP transfizierten humanen HT 1080 Fibrosarkom-Zellen zeigte eine signifikante Suppression des Signals und damit des hypoxiebedingten Wachstums unter Behandlung mit 150 nM Chetomin. In Abbildung 8 erkennt man unter 0,1%igem Sauerstoff die deutliche Verschiebung der Chetomin-Kurve (schwarz) nach links gegenüber derjenigen der Kontrollzellen (grau unterlegte Kurve), was die Expressions-suppression der hypoxieabhängigen Gene anzeigt. Auf der Ordinate ist das Fluoreszenzsignal (FL1-H) logarithmisch verteilt, die Abszisse zeigt die Häufigkeit der im Durchflusszytometer gezählten Zellen (Counts).

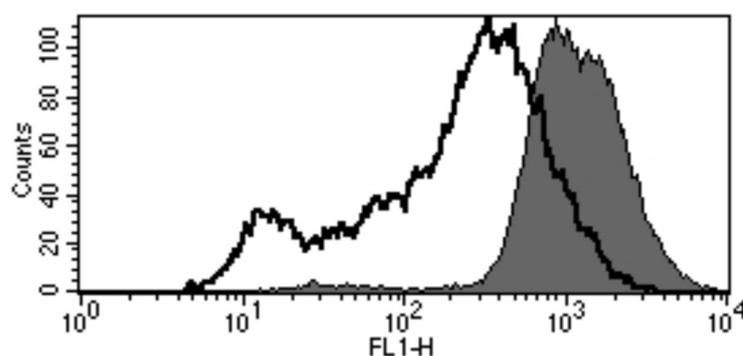


Abbildung 8:
HT 1080 Zellen unter Chetomin bei Hypoxie (schwarze Kurve),
Kontrollkurve ohne Chetomin grau unterlegt; FL1-H: EGFP-
Fluoreszenzsignal, Counts: im Zytometer gezählte Einheiten

3.1.2 Einfluss von Chetomin auf HIF1 α -abhängige EGFP-Expression

In den FACS-Experimenten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Chetomin keinen Effekt auf HRE-unabhängige EGFP-Fluoreszenz aufweist:

HT 1080 Zellen mit Hypoxie-abhängigem Promotor (5HRE) wurden mit solchen verglichen, die mit einem Hypoxie-unabhängigen konstitutiven CMV-Promotor (CMV) ausgestattet waren.

Die Promotoren beeinflussten jeweils die Transkription von EGFP, die sich in der resultierenden Fluoreszenz quantifizieren ließ. Die Zellen wurden verschiedenen Bedingungen ausgesetzt, siehe dazu auch Tabelle 3 FACS-Versuchsbedingungen in Kapitel 2.3.1 Aussaat und Behandlung:

- air: Raumluft bei 20% Sauerstoffkonzentration
- 0,1% O₂: Hypoxie bei 0,1% Sauerstoffkonzentration

sowie

- DMSO
- Chetomin (CHT)

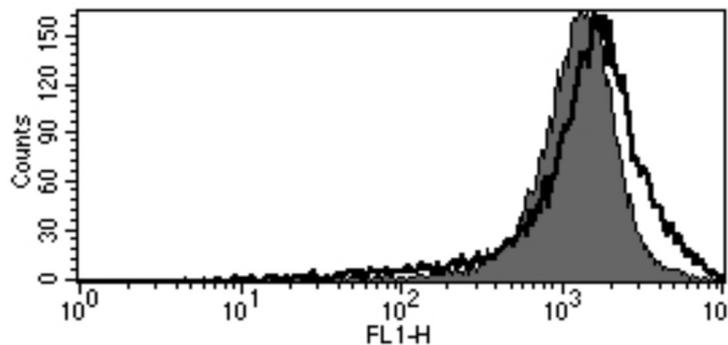


Abbildung 9:
CMV Zellen unter Chetomin bei 20% O₂ (schwarze Kurve),
Kontrollkurve ohne Chetomin grau unterlegt; FL₁-H: EGFP-
Fluoreszenzsignal, Counts: im Zytometer gezählte Einheiten

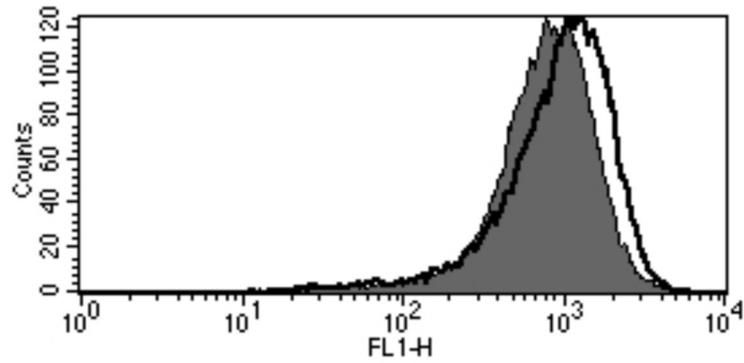


Abbildung 10:
 CMV Zellen unter Chetomin bei 0,1% O₂ (schwarze Kurve),
 Kontrollkurve ohne Chetomin grau unterlegt; FL₁-H: EGFP-
 Fluoreszenzsignal, Counts: im Zytometer gezählte Einheiten

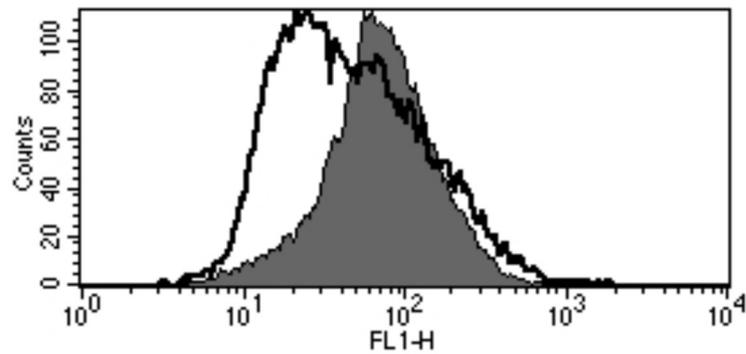


Abbildung 11:
 5HRE Zellen unter Chetomin bei 20% O₂ (schwarze Kurve),
 Kontrollkurve ohne Chetomin grau unterlegt; FL₁-H: EGFP-
 Fluoreszenzsignal, Counts: im Zytometer gezählte Einheiten

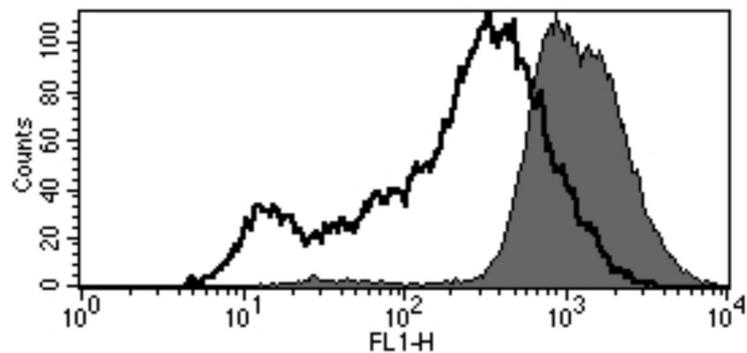


Abbildung 12:
 5HRE Zellen unter Chetomin bei 0,1% O₂ (schwarze Kurve),
 Kontrollkurve ohne Chetomin grau unterlegt; FL₁-H: EGFP-
 Fluoreszenzsignal, Counts: im Zytometer gezählte Einheiten

In den Abbildungen 9-12 symbolisiert der schwarze Graph die Fluoreszenz von Versuchszellen, die mit 150 nM Chetomin behandelt wurden, während die grau unterlegte Fläche unter der Kurve die Fluoreszenz der Kontrollzellen wiedergibt. Ein direkter Effekt von Chetomin auf die EGFP-Fluoreszenz in CMV-Zellen konnte durch die fehlende relevante Abweichung der Kurven in den Bedingungen CMV air und CMV 0,1% O₂ ausgeschlossen werden.

Demgegenüber bewirkt Chetomin eine Fluoreszenzminderung in 5HRE-Zellen, und zwar sowohl Hypoxie-induziert (5HRE 0,1% O₂) als auch unter basalen normoxischen Bedingungen (5HRE air).

Das Signal der Hypoxie-abhängigen 5HRE Zellen war in der Kontrolle ohne Chetomin unter hypoxischen Bedingungen erwartungsgemäß höher als bei Raumluft.

3.1.3 Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit

Die Suppression des EGFP-Fluoreszenzsignals hing sowohl von der Chetominkonzentration als auch von der Chetomininkubationszeit ab. Die Ergebnisse wurden aus jeweils vier repräsentativen Versuchsdurchgängen (n = 4) ermittelt.

Graphisch lassen sich die Ergebnisse in Abbildung 13 wie folgt darstellen:

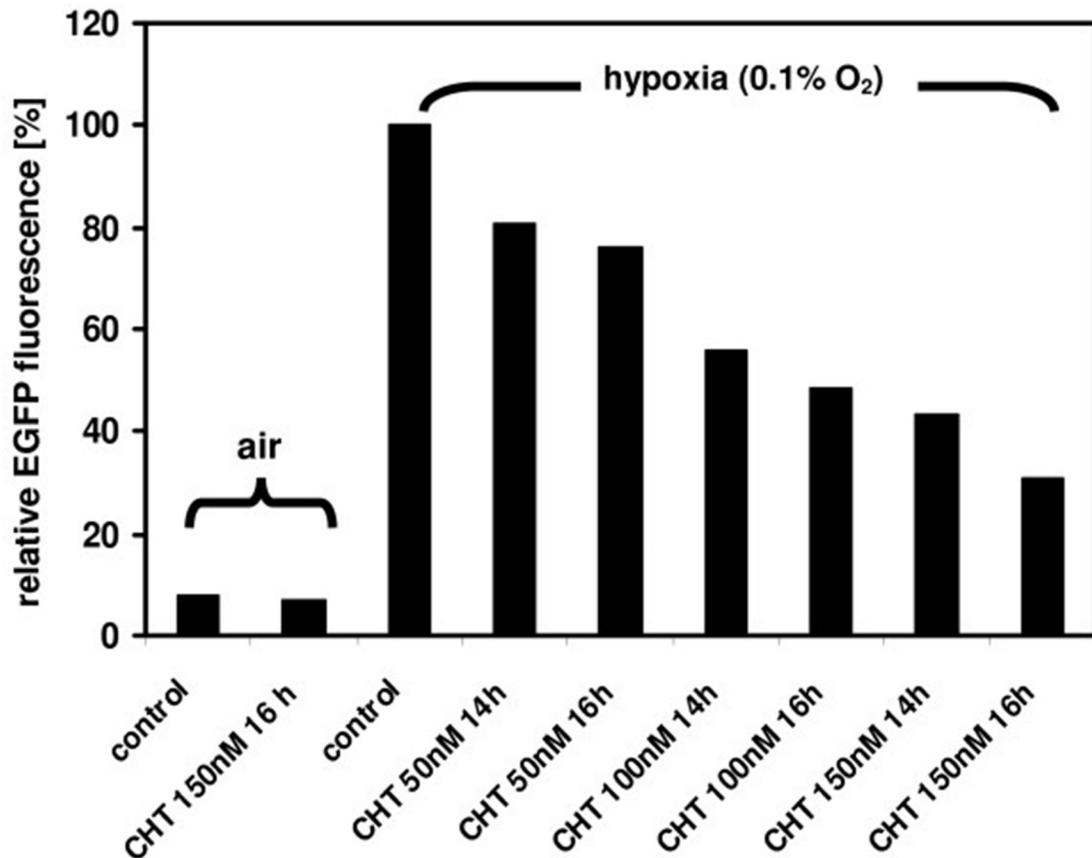


Abbildung 13:
Suppression der EGFP-Fluoreszenz von 5HRE Zellen unter verschiedenen Chetomin(CHT)-Dosen und -Inkubationszeiten, Versuchsdurchgänge jeweils n = 4

Die nicht mit Chetomin behandelten 5HRE Zellen (control), welche einer zwölfstündigen Hypoxie von 0,1% O₂ ausgesetzt waren (hypoxia), dienten als Referenzwert (100%). Unter Normoxie inkubierte Zellen (air) zeigten lediglich eine Basalfluoreszenz von weniger als 10% in Bezug auf die Positivkontrolle (100%). Hier bot sich kein relevanter Unterschied zwischen der Kontrollprobe (control) und der für 16 Stunden mit 150 nM Chetomin inkubierten Probe (CHT 150nM 16h). Indessen ließ sich unter 0,1% Sauerstoffkonzentration (hypoxia) in Relation zur Kontrollprobe ohne Chetomin (control) ein Abfall des Fluoreszenzsignals bei steigender Chetominkonzentration (CHT 50nM, CHT 100nM und CHT 150nM) erkennen. Bei gleicher Chetominkonzentration wurde außerdem ein Unterschied zwischen 14- und 16-stündiger Inkubationszeit festgestellt.

Hierzu wurden die Zellen zwei respektive vier Stunden vor der Hypoxiebankinkubation mit Chetomin vorbehandelt. Im Anschluss wurden die Kulturen für zwölf Stunden einer 0,1%igen Sauerstoffkonzentration ausgesetzt, woraus sich insgesamt eine Chetominbehandlungsdauer von 14 beziehungsweise 16 Stunden erschließt.

Eine maximale EGFP-Fluoreszenzsuppression wurde mit 150 nM Chetomin unter vierstündiger Vorbehandlung erreicht. Dies konnte in den repräsentativen FACS-Experimenten demonstriert werden (vgl. Kapitel 2.3 Durchflusszytometrie von 5HRE-hCMVmp-EGFP HT 1080 Zellen). Höhere Chetomindosen zeigten hingegen keinen zusätzlichen Effekt, vielmehr führten diese zu einem erhöhten Verhältnis zugunsten von vollständig EGFP-negativen Zellen, ein Indikator für substantielle Zytotoxizität.

3.2 Chetomineffekte auf die Expression von VEGF- und CA9-Protein

3.2.1 Auswertung der Western Blots

Untersucht wurde die Wirkung von Chetomin auf die Expression von Proteinen des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sowie der Carboanhydrase IX (CA9) mittels Western Blot (vgl. Kapitel 2.6).

Wie in Kapitel 2.2 Zellkultur beschrieben, wurden HT 1080 Zellen mit 150 nM Chetomin vier Stunden vorinkubiert und danach in zwölfstündige Hypoxie bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1% überführt. Die Kontrollen waren normalen aeroben Bedingungen (20% Sauerstoffkonzentration) ausgesetzt.

Um die Vergleichbarkeit der Versuche untereinander zu gewährleisten, wurden die Nettointensitäten mithilfe von β -Actin normiert (vgl. Kapitel 2.6.7 Auswertung der Western Blots). Das Molekulargewicht von β -Actin beträgt 42 kDa.

Abbildung 14 zeigt die Banden für VEGF mit dem Molekulargewicht 121 kDa unter den Bedingungen Kontrolle unter Normoxie (B), Kontrolle mit Hypoxie (H), Normoxie mit Zusatz des Trägers (B+150 μ lPBS/DMSO), Hypoxie mit Zusatz des Trägers (H+150 μ lPBS/DMSO), Normoxie mit Zusatz von Chetomin (B+150nMChet), Hypoxie mit Zusatz von Chetomin (H+150nMChet) sowie Normoxie mit Zusatz des Chelatbildners Deferoxamin (B+DFO).

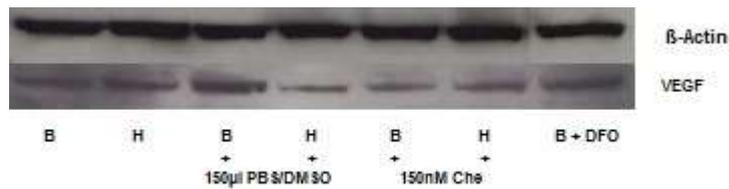


Abbildung 14:

Exemplarisches Bandenmuster eines Western Blot von VEGF in HT 1080-Zellen; β-Actin: HIF-1-unabhängige Kontrolle, B: Normoxie, H: Hypoxie, B+150µl PBS/DMSO: Normoxie mit Zusatz der Trägersubstanz, H+150µl PBS/DMSO: Hypoxie mit Zusatz der Trägersubstanz, B+150nM Che: Normoxie mit Zusatz von Chetomin, H+150nM Che: Hypoxie mit Zusatz von Chetomin, B+DFO: Normoxie mit Zusatz von Deferoxamin

Für CA9 galten die gleichen Bedingungen wie für VEGF. Das Molekulargewicht liegt bei 52/54 kDa. Eine exemplarische Folie für den Western Blot ist in Abbildung 15 wiedergegeben:

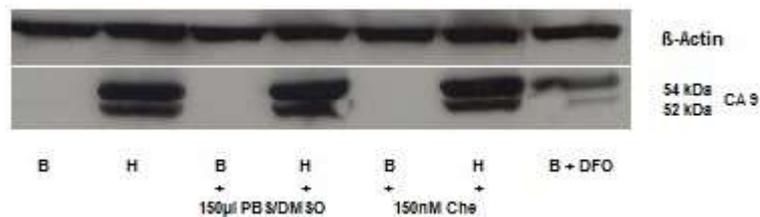


Abbildung 15:

Exemplarisches Bandenmuster eines Western Blot von CA9 in HT 1080 Zellen; β-Actin: HIF-1-unabhängige Kontrolle, B: Normoxie, H: Hypoxie, B+150µl PBS/DMSO: Normoxie mit Zusatz der Trägersubstanz, H+150µl PBS/DMSO: Hypoxie mit Zusatz der Trägersubstanz, B+150nM Che: Normoxie mit Zusatz von Chetomin, H+150nM Che: Hypoxie mit Zusatz von Chetomin, B+DFO: Normoxie mit Zusatz von Deferoxamin

Die auf β-Actin normierten Nettointensitäten von VEGF sowie CA9 wurden aus den Versuchsdurchgängen (n = 6) gemittelt und die Positivkontrolle (H, 0,1% Sauerstoffkonzentration) mit 100% als Bezugswert deklariert.

Unter normoxischen Bedingungen (B, 20% Sauerstoffkonzentration) ergab sich eine niedrige basale Proteinexpression von VEGF, während sie unter Hypoxie gesteigert war. Mit Zugabe von Chetomin 150 nM (H+150nMChe) konnte die VEGF-Proteinexpression in Bezug auf die Positivkontrolle auf 82,9% gesenkt werden.

Die Suppression der Proteinexpression von CA9 nach zwölfstündiger Hypoxie

und Inkubation mit 150 nM Chetomin (H+150nMChe) auf 66,9% war noch deutlicher zu erkennen (siehe Tabelle 13).

Nebenbefundlich bewirkte die Trägersubstanz PBS/DMSO in der Dosis von 150 µl ebenfalls eine leicht verminderte Translation der untersuchten Proteine.

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die Ergebnisse graphisch aufbereitet.

	VEGF	%	CA9	%
B	0,28	80,11	0,02	1,41
H	0,35	100	1,47	100
B+150µlPBS/DMSO	0,35	98,52	0,01	0,59
H+150µlPBS/DMSO	0,32	92	1,4	95,51
B+150nMChe	0,25	71,03	0,02	1,28
H+150nMChe	0,29	82,88	0,98	66,88
B+DFO	0,39	111,76	0,73	49,96

Tabelle 13: Gemittelte und normierte Nettointensitäten von VEGF und CA9;
B: Normoxie, H: Hypoxie, +150µl PBS/DMSO: Zusatz der Trägersubstanz, +150nM Che: Zusatz von Chetomin, +DFO: Zusatz von Deferoxamin, Versuchsdurchgänge n = 6

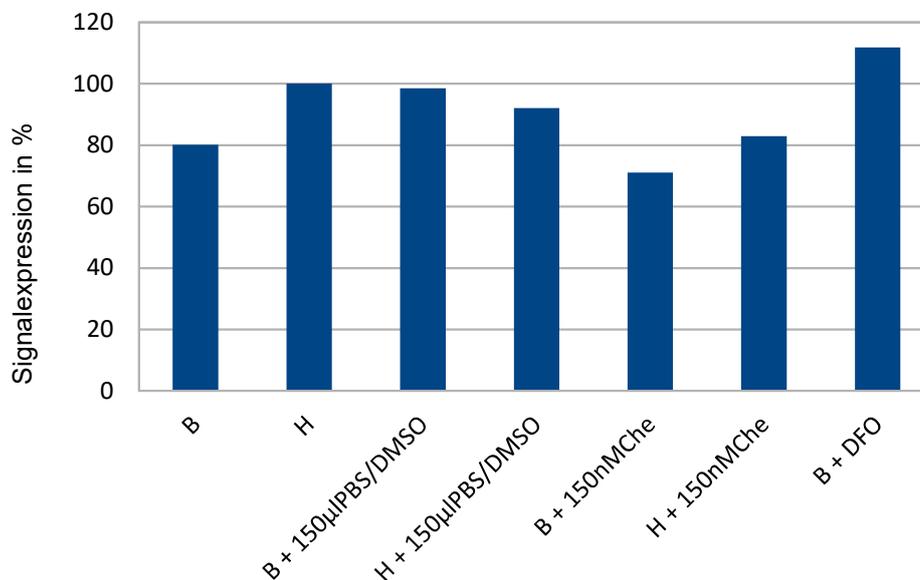


Abbildung 16:
Western Blot von VEGF;
B: Normoxie, H: Hypoxie, +150µl PBS/DMSO: Zusatz der Trägersubstanz,
+150nM Che: Zusatz von Chetomin, +DFO: Zusatz von Deferoxamin,
Versuchsdurchgänge n = 6

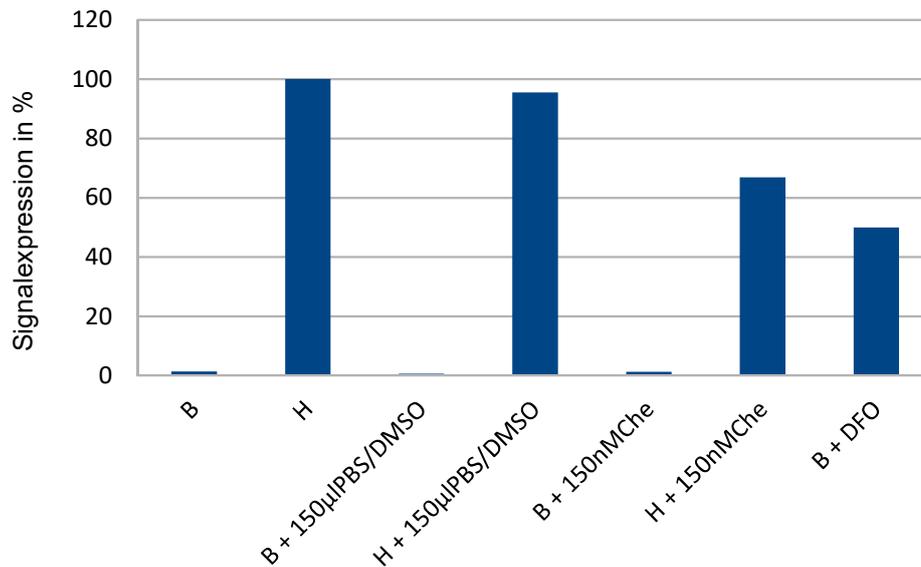


Abbildung 17:
Western Blot von Carboanhydrase IX (CA9);
B: Normoxie, H: Hypoxie, +150µl PBS/DMSO: Zusatz der Trägersubstanz,
+150nM Che: Zusatz von Chetomin, +DFO: Zusatz von Deferoxamin,
Versuchsdurchgänge n = 6

3.2.2 Auswertung der RT-PCR

Um die Auswirkungen auf die Genprodukte VEGF und CA9 zu quantifizieren, wurde die jeweilige messenger Ribonukleinsäure (mRNS) mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) gemessen (vgl. Kapitel 2.4).

In drei repräsentativen Versuchsdurchgängen (n = 3) konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung der HT 1080 Zellen mit 150 nM Chetomin unter Hypoxie eine signifikante Reduktion (Signifikanzniveau $p < 0,05$; vgl. Kapitel 2.7 Statistische Analyse) der mRNS-Expression von VEGF und CA9 bewirkte (siehe Abbildung 18).

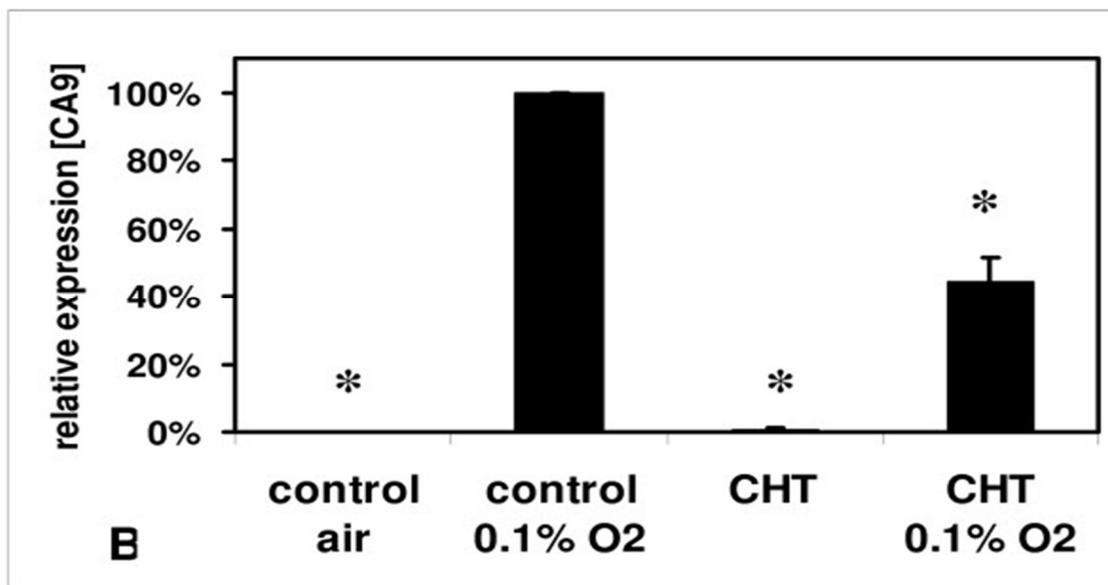
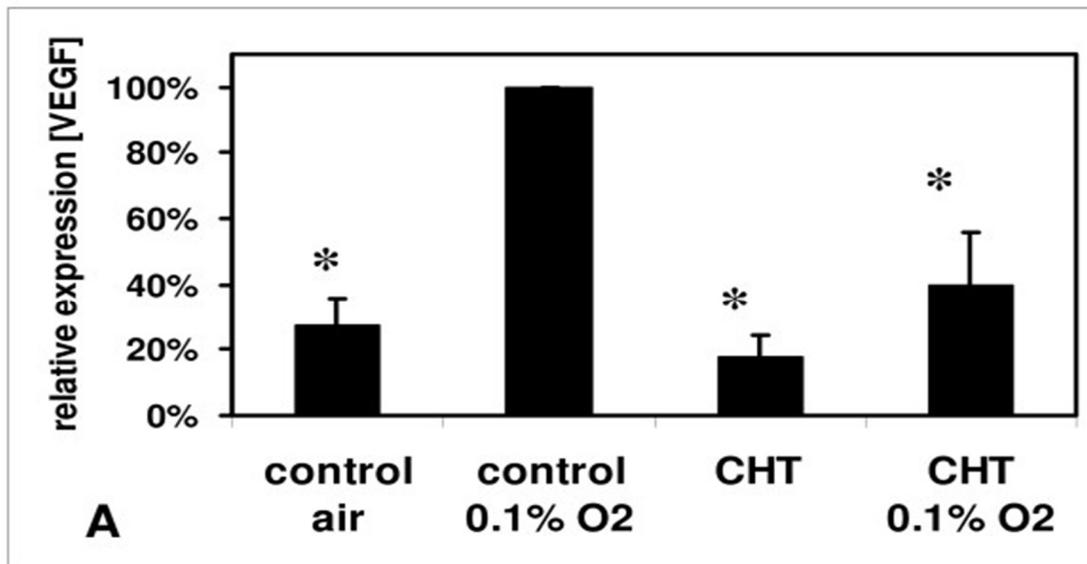


Abbildung 18:
 Relative mRNA-Expression der Gene VEGF [Graphik A] und CA9 [Graphik B] unter Chetomin (CHT) und Hypoxie (0,1% O₂), signifikante Differenzen ($p < 0,05$) zur hypoxischen Kontrolle (control 0,1% O₂) sind mit einem * gekennzeichnet, Versuchsdurchgänge $n = 3$

Graphik A stellt die Ergebnisse der Versuchsbedingungen für VEGF zusammen, Graphik B zeigt die relative mRNA-Expression von CA9. Hierbei sind auf der Ordinate die einzelnen Versuchsbedingungen (control air, control 0,1% O₂, CHT und CHT 0,1% O₂), auf der Abszisse die relative mRNA-Expression aufgetragen.

Der Wert der hypoxischen Kontrolle (control 0,1% O₂) ist auf jeweils 100% festgelegt.

Hiervon ergibt sich in Graphik A unter hypoxischer Chetominbehandlung (CHT 0,1% O₂) eine signifikante Expressionsreduktion von VEGF-mRNS auf 39,6% mit 16,0% Standardabweichung (Mittelwert ± SEM = 39,6 ± 16,0%).

Graphik B: Der signifikant verminderte Wert der CA9-mRNS-Expression unter Chetomin und Hypoxie (CHT 0,1% O₂) beläuft sich auf 44,4 ± 7,2% der hypoxischen Kontrolle (control 0,1% O₂).

In der Abbildung sind die Bedingungen mit signifikanter Differenz zur hypoxischen Kontrolle (control 0,1% O₂) mit einem * gekennzeichnet.

3.3 Resultate der Bestrahlungsversuche: Klonogenes Überleben

3.3.1 Kolonieaussaat

Bei den Bestrahlungsversuchen mit Kolonieaussaat wurden die Ergebnisse aus drei verwertbaren und repräsentativen Versuchsdurchgängen (n = 3, Mittelwert ± SEM) erstellt. Trotz der Vorkehrungen zur Gewährleistung der Luftdichtigkeit in den Perspex-Schalen (vgl. Kapitel 2.5.2 Bestrahlung) kam es bei einigen Versuchsdurchgängen zu verfälschten Ergebnissen aufgrund mangelnder Hypoxie der entsprechenden Bedingungen. Mögliche Gründe hierfür könnten spröde Gummiringe der Perspex-Schalen, mit bloßem Auge nicht sichtbare Mikrorisse oder Unwägbarkeiten beim Transport gewesen sein. Diese Versuchsdurchgänge wurden daraufhin wiederholt.

Die ausgezählten überlebenden Kolonien sind in Tabelle 14 gemittelt zusammengefasst (Die Kolonieanzahl der einzelnen Messpunkte besteht aus dem gerundeten Mittelwert der vier angesetzten Petrischalen pro Messpunkt aus allen drei Versuchen; die weitere Berechnung erfolgte mit den ungerundeten Rohdaten).

Messpunkt-Nummer	Bedingung	Bestrahlungsdosis in Gray	Ausgesäte Zellzahl pro Petrischale	Anzahl der überlebenden Kolonien	Platier-effizienz (PE) in %	Relatives Überleben (SF) in %
1	KON + AIR	0	100	68	67,50	100,00
2	KON + AIR	2	200	60	(29,78)	44,12
3	KON + AIR	5	2000	133	(6,65)	9,85
4	KON + AIR	10	100000	149	(0,15)	0,22
5	KON + 0,1%	0	100	72	71,75	100,00
6	KON + 0,1%	2	100	43	(43,33)	60,39
7	KON + 0,1%	5	1000	185	(18,54)	25,84
8	KON + 0,1%	10	10000	147	(1,47)	2,05
9	CHT + AIR	0	100	49	49,41	100,00
10	CHT + AIR	2	500	91	(18,12)	36,67
11	CHT + AIR	5	2000	72	(3,58)	7,25
12	CHT + AIR	10	100000	81	(0,08)	0,16
13	CHT + 0,1%	0	100	30	29,63	100,00
14	CHT + 0,1%	2	200	32	(16)	54,01
15	CHT + 0,1%	5	5000	189	(3,78)	12,76
16	CHT + 0,1%	10	100000	132	(0,13)	0,44

Tabelle 14: Ergebnisse der Koloniaussaat

Bei jeder der vier Bedingungen (KON + AIR, KON + 0,1%, CHT + AIR und CHT + 0,1%) liegt der Berechnung des Relativen Überlebens (Survival Fraction SF, siehe Kapitel 2.5.5.2) die Platier-effizienz (Plating Efficiency PE, siehe Kapitel 2.5.5.2) der jeweils nicht bestrahlten Kontrolle (0 Gray) zu Grunde. Davon ausgehend ist die für den weiteren Rechenweg irrelevante PE der bestrahlten Bedingungen in Klammern gesetzt.

3.3.2 Auswirkung auf die Platier-effizienz

Aus den Bestrahlungsversuchen konnte eine signifikante Reduktion der Platier-effizienz bereits unter alleiniger Chetomin-Behandlung bei normoxischen Bedingungen in vitro gemessen werden. Bei normaler Sauerstoffkonzentration ergab sich eine Reduktion der PE von $67,5 \pm 5,6\%$ (Mittelwert \pm SEM) der Kontrolle (KON + AIR) auf eine PE von $49,41 \pm 5,61\%$ unter 16-stündiger

150 nM Chetomin-Inkubation (CHT + AIR). Unter Hypoxie erfuhr die PE eine noch deutlichere Reduktion: Vom Ausgangswert $71,75 \pm 9,42\%$ der hypoxischen Kontrolle (KON + 0,1%) sank die PE unter 16-stündiger 150 nM Chetomin-Behandlung (CHT + 0,1%) auf $29,63 \pm 5,35\%$.

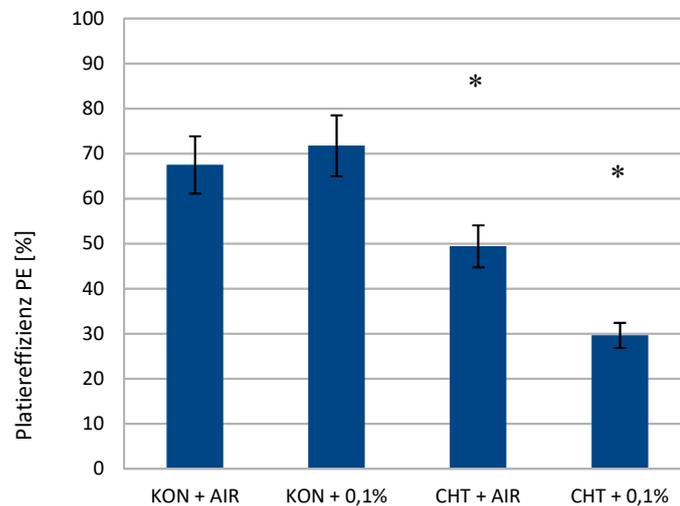


Abbildung 19:
Reduktion der Platiereffizienz der Koloniaussaat unter Chetomin (CHT), KON: Kontrolle, AIR: Normoxie, 0,1%: Hypoxie, signifikante Differenzen ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet, Versuchsdurchgänge $n = 3$

Die Ergebnisse sowohl der normalen als auch der reduzierten Sauerstoffkonzentration (CHT + AIR und CHT + 0,1%) erfüllen die Signifikanzvoraussetzung $p < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test), was in der Abbildung 19 mit einem * markiert ist.

3.3.3 Koloniales Überleben

In Tabelle 15 ist zur Übersicht das Relative Überleben SF der Versuchsbedingungen zusammengestellt (Versuchsdurchgänge $n = 3$).

	KON + AIR	KON + 0,1%	CHT + AIR	CHT + 0,1%
0 Gy	100,00	100,00	100,00	100,00
2 Gy	44,12	60,39	36,67	54,01
5 Gy	9,85	25,84	7,25	12,76
10 Gy	0,22	2,05	0,16	0,44

Tabelle 15: Relatives Überleben SF der bestrahlten Kolonien in %

Das Relative Überleben SF in % ist in Abbildung 20 logarithmisch als Funktion der Bestrahlungsdosis D in Gray aufgetragen.

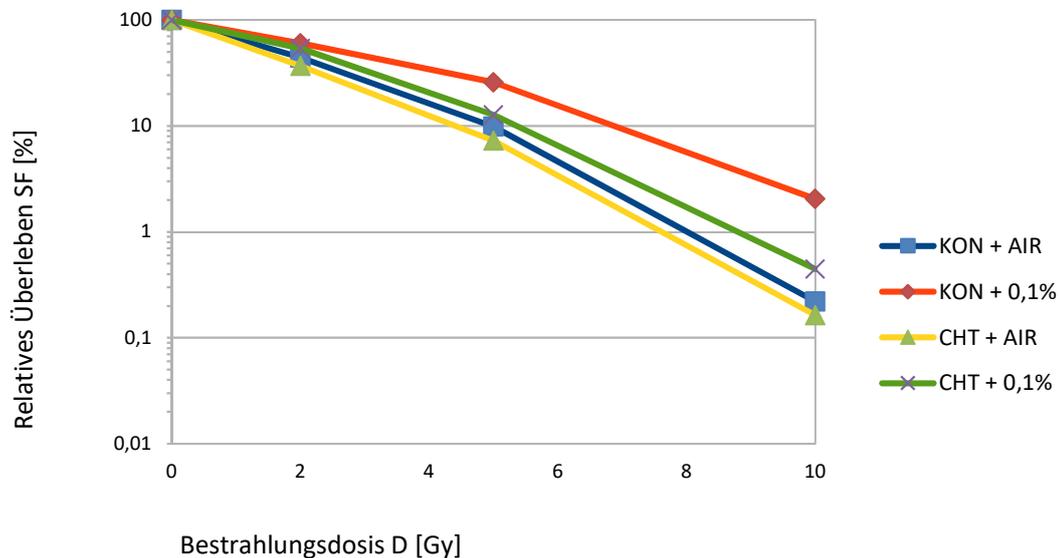


Abbildung 20:
Überlebenskurve der Koloniewaage unter Chetomin und Hypoxie nach Bestrahlung,
KON: Kontrolle, CHT: Chetomin, AIR: Normoxie, 0,1%: Hypoxie,
halblogarithmische Darstellung, Versuchsdurchgänge n = 3

Mit steigender Bestrahlungsdosis verringerte sich das Relative Überleben sämtlicher Proben und unter Hypoxie zeigten sich erwartungsgemäß höhere Überlebensraten als unter Normoxie. Bei den normoxischen Kontrollen liegt die Kurve von CHT + AIR knapp unterhalb der von KON + AIR, was ein Indikator für die Zelltoxizität von Chetomin sein mag, ansonsten hatte Chetomin keinen relevanten Einfluss auf die Strahlensensibilität.

Unter Hypoxie erhöhte Chetomin die Strahlensensibilität wesentlich: In der hypoxischen Kontrolle KON + 0,1% entwickelten die Zellen ohne Chetomin eine Strahlenresistenz – unter Chetominbehandlung, zusätzlich zur 0,1%igen Sauerstoffkonzentration, liegt die Überlebenskurve wieder deutlich darunter. Das Relative Überleben SF unter Hypoxie ist hierbei im Vergleich zur normoxischen Kontrolle CHT + AIR erhöht, signifikant jedoch nur bei der 10 Gy Dosis (Mann-Whitney-U-Test).

3.3.4 Modifizierte Sauerstoffverstärkung

Die Sauerstoffverstärkung OER (Oxygen Enhancement Ratio, vgl. Kapitel 1.1.1 Sauerstoffeffekt und Strahlensensibilität) wurde durch die Festlegung der α - und β -Werte bei 10%, 37% und 50% klonogenen Überlebens ermittelt. Die modifizierte Sauerstoffverstärkung (OER') errechnet sich aus dem Verhältnis der Dosispunkte, bei denen das gleiche Überleben bei Hypoxie (0,1% O₂) sowie bei Normoxie (20% O₂) erzielt wird. Diese Dosispunkte wurden durch Auswertung der Überlebenskurven eruiert und gingen in folgende Formel ein:

$$\text{OER}' = D_{\text{Hypoxie}}/D_{\text{Normoxie}}$$

Tabelle 16 zeigt die OER' bei einem Relativen Überleben SF von 10%, 37% und 50%.

Relatives Überleben SF	OER' (KON + 0,1% / KON + AIR)	OER' (CHT + 0,1% / CHT + AIR)
10%	1,38	1,22
37%	1,56	1,42
50%	1,57	1,58

Tabelle 16: Modifizierte Sauerstoffverstärkung OER'

Unter Chetominbehandlung (CHT + 0,1% / CHT + AIR) war der modifizierte Sauerstoffeffekt in Bezug auf die Kontrollen (KON + 0,1% / KON + AIR) mit Ausnahme der 50% SF reduziert.

Mit abnehmendem Relativen Überleben verringerte sich die OER' darüber hinaus sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Chetominbedingungen.

4 Diskussion

4.1 Wahl der Untersuchungsbedingungen

Die Bedingungen, unter denen die oben dargestellten Versuche durchgeführt wurden, waren anhand früherer Studienergebnisse gewählt. Vordermark et al. [55] hatten gezeigt, dass bei einer Hypoxiedauer von zwölf Stunden und einer Sauerstoffkonzentration von 0,1% eine nahezu maximale Expression von HIF-1 α erreicht wird. Diese Konzentration repräsentiert außerdem ein Hypoxielevel, welches häufig in soliden Tumoren anzutreffen ist und somit Relevanz für die Radiobiologie aufweist [55].

Die einleitenden Versuche zur Bestimmung der idealen Chetomindosis und -inkubationszeit zeigten, dass bei einem Dosislevel von 150 nM und einer Gesamtchetominbehandlungsdauer von 16 Stunden ein maximaler spezifischer Effekt auf die HRE-regulierte Expression von EGFP erreicht war. Dies wurde durch die zunehmende Abschwächung des Fluoreszenzsignals gemessen. Höhere Chetomindosen zeigten in unseren Experimenten keine zusätzliche Signalabschwächung und somit keine weitere Suppression der Aktivität von HRE (siehe Kapitel 3.1.3 Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit). Insgesamt konnte durch die Durchflusszytometrie-Experimente eine signifikante Suppression des hypoxiebedingten Wachstums der HT 1080 Zellen unter Behandlung mit 150 nM Chetomin in vitro nachgewiesen werden.

In ihrer wegbereitenden Arbeit hatten Kung et al. [24] bereits eine Hemmung der HIF-vermittelten Transkription in Tumorzellen durch Chetomin gezeigt. Dabei wurde für Hep3B-Zellen eine effektive HIF-1 Funktionssuppression für eine Dosis von 50 nM in vitro ermittelt. Die Forschungsgruppe konnte den Effekt auch in vivo nachweisen, indem bei HCT116 Xenograft Tumor Mäusen, denen systemisch Chetomin injiziert wurde, eine Abschwächung des HIF-Stoffwechselfades mittels molekularer Bildgebung nachgewiesen wurde. Es zeigte sich darüber hinaus eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums mittels absoluter Messung des Tumorumfanges. Die maximal tolerierte Einzeldosis für intravenöse Applikation in Mäusen betrug hierbei 2 mg/kg Körpergewicht [24], wobei lokale Spitzenkonzentrationen von 300 nM in den Xenograft Tumoren gemessen wurden. Die in unseren Experimenten

verwendete Chetomindosis von 150 nM lag also zwischen den von Kung et al. verwendeten in vitro und ihren in vivo Dosierungen.

4.2 Suppression der Proteinexpression von VEGF und CA9

Die unter Hypoxie gesteigerte Proteinexpression von VEGF und CA9 konnte durch 150 nM Chetomin deutlich gesenkt werden, wie sich im Western Blot anschaulich zeigte (vgl. Kapitel 3.2.1 Auswertung der Western Blots). Die Quantifizierung der messenger RNS (mRNS) der entsprechenden Proteingene mittels RT-PCR bewies darüber hinaus die Signifikanz der Expressionsreduktion (siehe Kapitel 3.2.2 Auswertung der RT-PCR). Bedeutung erhält dies in pathophysiologischen Modellen, denn die infolge Hypoxie aktivierten Gene VEGF oder auch EPO (Erythropoietin) tragen zur Optimierung der Sauerstoffversorgung im Gewebe bei, insbesondere durch die VEGF-vermittelte Neovaskulogenese. Allerdings sind die neugebildeten Blutgefäße vielfach deformiert und irregulär und infolgedessen weniger effizient beim Sauerstoff- und Nährstofftransport sowie bei der Medikamentenverteilung.

VEGF wird nicht nur in normalen Zellen, sondern auch und verstärkt in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert und bewirkt ebenfalls eine vermehrte invasive Potenz und damit erhöhte Metastasierung. Zhong et al. [33] zeigten die Korrelation zwischen HIF-1 α -Überexpression und dem Grad der Tumorkaskularisation anhand von primären Neoplasien im zentralen Nervensystem (mit stärkster Ausprägung bei multiformen Glioblastomen und Hämangioblastomen).

Neben der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanz Chetomin, die auf molekularer Ebene über den HIF-Weg die Bildung des Genprodukts VEGF hemmt, existieren weitere in das VEGF-System eingreifende Medikamente wie Rezeptorinhibitoren oder auch mRNS schädigende Stoffe [56] [57].

Carboanhydrase IX (CA9) zeigte sich in unseren Experimenten als valider Marker für HIF-1 α -Aktivität. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Kessler et al. [58]: Die Arbeitsgruppe untersuchte die Auswirkungen auf hypoxische Strahlenresistenz infolge HIF-1 α -Inhibition durch kleine interferierende RNS (small interfering RNS, siRNS) sowie Chetomin in humanen Gliomzellen mittels Messung der CA9-Expression. Hierbei demonstrierten sie, dass die Proteinexpression sowie mRNS-Quantifizierung von CA9 die Inhibition der HIF-

1 α -Aktivität kongruent anzeigt.

4.3 Klonogenes Überleben nach Radiatio

In den Bestrahlungsversuchen erhöhte 150 nM Chetomin die Strahlensensibilität von HT 1080 Zellen unter hypoxischen Bedingungen, was sich in einer signifikanten Reduktion des Zellüberlebens bzw. der Platiereffizienz zeigte (siehe Kapitel 3.3 Resultate der Bestrahlungsversuche: Klonogenes Überleben). Die Experimente erbrachten zum Zeitpunkt der Durchführung den ersten Nachweis einer erhöhten Radiosensitivität hypoxischer Zellen durch Hemmung des HIF-1 α -Signalwegs *in vitro* mittels Chetomin. Nachfolgende Studien bestätigten dieses Ergebnis: Staab et al. [59] untersuchten ebenfalls hypoxische HT 1080 Fibrosarkomzellen, in denen die Strahlensensibilisierung durch HIF-1 α -Hemmung mittels small interfering RNS (siRNS) *in vitro* erreicht wurde. Kessler et al. [58] verglichen den Effekt von siRNS und Chetomin auf die Strahlenresistenz von Gliomzellen *in vitro*. Hierbei zeigte sich eine Erhöhung der Strahlensensibilität unter Hypoxie bei beiden Substanzen, wohingegen der Effekt bei Normoxie differierte. Die Gliomzelllinie U251MG zeigte unter Normoxie nach Behandlung mit siRNS eine reduzierte Strahlensensibilität, während diese bei U343MG erhöht war. Chetomin verstärkte den Bestrahlungseffekt bei normoxischen U251MG Gliomzellen, ließ jedoch bei den normoxischen U343MG Zellen keine Wirkung erkennen. Jin et al. [60] untersuchten das Gleiche an Osteosarkomzellen. Sowohl siRNS als auch Chetomin reduzierten die Strahlenresistenz unter Hypoxie, wiesen allerdings ebenfalls unterschiedliche Effekte unter normoxischen Bedingungen auf. In unseren Versuchen war das klonogene Überleben der normoxischen Kontrollen am ehesten aufgrund der Zelltoxizität von Chetomin leicht vermindert, es fand sich kein relevanter Einfluss auf die Radiosensibilität.

Huang et al. [61] zeigten an einer Prostatakarzinomzelllinie die Abnahme der Strahlenresistenz mittels siRNS *in vitro* ausschließlich unter normoxischen Bedingungen. Die Reparaturvorgänge *postradiatio* waren in den Zellen reduziert, wodurch eine gesteigerte Apoptose sowie ein Zellzyklusarrest in der proliferativen Phase resultierte.

Den Effekt einer anderen Substanz untersuchten Moon et al. [62]. Sie wiesen die Strahlensensibilisierung von hypoxischen Plattenepithelkarzinomzellen des

Larynx durch Behandlung mit YC-1 nach. YC-1 hemmt die HIF-1 α -Translation über den PI3K/Akt/mTOR/4E-BP-Signalweg und wurde bereits in weiteren Antitumormodellen in vitro sowie in vivo untersucht [63] [64].

4.3.1 Bedeutung der basalen HIF-1 Funktion

In den Zellüberlebenskurven konnte bereits unter Normoxie eine verringerte Überlebensrate festgestellt werden, was durch die Suppression der basalen HIF-1 Funktion mittels Chetomin verursacht wird. Diese basale Aktivität existiert in den HT 1080 Zellen auch unter normalen Sauerstoffbedingungen, wie die durch Vordermark et al. [36] beschriebene basale EGFP-Fluoreszenz unter der Kontrolle des Hypoxie-abhängigen Promotors zeigt. Deren Unterdrückung allerdings wirkt sich nicht zusätzlich auf die Strahlenempfindlichkeit der Zellen aus.

Die Hemmung von HIF-1 α verursacht eine Sauerstoff-unabhängige Zytotoxizität von Chemotherapeutika und induziert eine von Protein p53 unabhängige Apoptose. In unseren Bestrahlungsversuchen wurde diese Wirkung in der Überlebenskurve sichtbar als leichte Reduktion des Überlebens von Chetomin-behandelten normoxischen Zellen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (vgl. Kapitel 3.3.3 Koloniales Überleben).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Dai et al. [65] bei ihren Untersuchungen an malignen U87 Glioblastomzellen. Sie behandelten die Zellen mit Antisense-HIF-1 α -ODN, was zu einer endogenen HIF-1-Suppression von bis zu 80% sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen führte und was zu einer Beschleunigung der Apoptose ohne den Weg über die p53-Aktivierung beitrug. Die U87 Zellen entwickelten eine signifikante additive Empfindlichkeit auf die Zytotoxizität der untersuchten Chemotherapeutika Cisplatin, Etoposid und Vincristin.

Desgleichen konnten Li et al. [66] an D54MG-Glioblastomzellen eine Sensibilisierung für Temozolomid nachweisen. Die Antitumorthherapie mit dem alkylierenden Zytostatikum in Kombination mit der HIF-1-Hemmung wies eine hohe synergistische Effizienz auf.

4.3.2 Abhängigkeit der Strahlensensibilität von der HIF-1 α Aktivität

Die durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigte synergistische Wirkung von HIF-1 α -Inhibition mit anderen Behandlungsmodalitäten wie der Strahlentherapie wurde bereits durch Moeller et al. [67] belegt, die den Zusammenhang zwischen HIF-1-Aktivität und Strahlensensibilität erforschten.

Mehr noch, Moeller et al. [68] fanden zudem heraus, dass Bestrahlung zur Aktivierung von HIF führt. Nach der Bestrahlung führte die Reoxygenierung des Tumors zu einer Stabilisierung des HIF-1-Dimers mittels Zwischenstufen freier Radikale und zur Depolymerisation Hypoxie-induzierter Translations-Suppressoren, die als Stressgranula bekannt sind. Die Reoxygenierung induzierte auf diese Weise die nukleäre Akkumulation des HIF-1 sowie – sekundär zur Depolymerisierung von Stressgranula – eine gesteigerte Translation HIF-1-regulierter Transkriptionsprodukte. Dies ruft eine vermehrte VEGF- und FGF-Expression hervor, welche in einer Strahlenresistenz resultieren kann. Da die Reoxygenierung den entscheidenden Faktor darstellt, können therapeutische Mittel, die die Sauerstoffversorgung des Tumors erhöhen – eingeschlossen Hyperthermie, Hormonablation und einige Chemotherapeutika – zu einem verminderten Behandlungserfolg führen.

Sasabe et al. [69] berichteten, dass die Herunterregulierung der HIF-1 α Expression durch kleine interferierende RNS (siRNS) die Suszeptibilität von oralen Plattenepithelkarzinomen auf Chemo- sowie Strahlentherapie erhöht.

Pore et al. [70] zeigten in vitro und in vivo die Strahlensensibilisierung bei Expressionshemmung von VEGF sowie HIF-1 α durch den Proteaseinhibitor Nelfinavir, wobei interessanterweise der Effekt in vivo noch deutlicher zutage trat, was wahrscheinlich auf die zusätzliche Oxygenierungswirkung der untersuchten Substanz zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten Arvold et al. [71], dass in Fibroblasten von Mausembryonen die Hypoxie-vermittelte Strahlenresistenz unabhängig von HIF-1 α ist. Die in vitro Untersuchungen wurden mit transformierten Fibroblasten (HIF-1 $\alpha^{+/+}$ versus HIF-1 $\alpha^{-/-}$) durchgeführt und ergaben unter hypoxischen Bedingungen (0,2% O₂) in beiden Zelllinien gleichermaßen eine erhöhte Strahlenresistenz sowie identische OERs. Allerdings ist anhand der Versuchsanordnung fragwürdig, ob HIF-1 in den Wildtyp-Zellen vor der Bestrahlung tatsächlich ausreichend aktiviert wurde. Aus

Sorge vor einer zytotoxischen Wirkung durch eine verlängerte Hypoxie wurden die Zellen einer nur vierstündigen Hypoxiedauer ausgesetzt. Dies mag für die Aktivierung von HIF-1 selbst ausreichen, allerdings möglicherweise nicht für einen signifikanten Anstieg der nachgelagerten Proteinproduktion. Ohne eine suffiziente Aktivierung dieser für das klonogene Überleben nach Radiotherapie entscheidenden Proteine ist es nicht überraschend, dass die Strahlenresistenz der Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den HIF-1 α ^{-/-} Knockout-Zellen nicht erhöht war [72]. In unseren Versuchen hingegen wurde durch die zwölfstündige Inkubation der HT 1080 Zellen in der Hypoxiewerkbank eine ausreichende Expression der HIF-1-regulierten Proteine sichergestellt.

4.3.3 HIF-1 α und Zelltypspezifität

Die Auswirkungen der HIF-1 α -Suppression unter Hypoxie wurden in der vorliegenden Arbeit an HT 1080 Zellen untersucht. Jedoch ist die HIF-1 α -Aktivität nicht zwangsläufig unbegrenzt auf andere Zelltypen übertragbar. Vordermark et al. [55] konstatieren die Zelltypspezifität der HIF-1 α -Akkumulation: Die HIF-1 α -Expression in HT 1080 Zellen unter 5%iger Sauerstoffkonzentration ergab keinen relevanten Unterschied zu derjenigen unter 0,1% O₂, während sich bei einer anderen Zelllinie, den humanen Pharynxkarzinomzellen FaDu, bei 5% O₂ ein halb maximaler HIF-1 α -Spiegel im Vergleich zu 0,1% Sauerstoff zeigte. Ebenso konnte die Korrelation zwischen HIF-1 α -Proteinlevel und hypoxischer Strahlenresistenz für FaDu, jedoch nicht für HT 1080 belegt werden. Die Beobachtung, dass die HIF-1 α -Spiegel nach einer Stunde Anstieg dann über 24 Stunden konstant blieben, deckt sich mit Ergebnissen einer Studie von Jewell et al. [73], die einen HIF-1 α -Anstieg nach bereits zwei Minuten in HeLaS3 Zellen schilderten, was die Schlussfolgerung zulässt, HIF-1 α als zelltypspezifischen Marker für sowohl chronische als auch akute Hypoxien zu deklarieren [74].

Nicht alle hypoxischen Zellen exprimieren HIF-1 α . Und auch nicht-hypoxische Zellen können durch die Hypoxie-unabhängige HIF-Aktivierung erhöhte HIF-1 α -Spiegel zeigen [75]. HIF-1 α akkumuliert also weder hypoxiespezifisch [33] noch tumorspezifisch [76] [77].

4.4 HIF-1 α als Target in der Tumorthherapie

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen sowie weiteren veröffentlichten Daten kann festgestellt werden, dass HIF ein attraktives Ziel darstellt, Hypoxie-induzierte Strahlenresistenz zu überwinden. Kung et al. [24] konnten in vitro als auch in vivo zeigen, dass die Anwendung von Chetomin die Hypoxie-induzierbare Transkription in Tumorzellen hemmt und Tumorwachstum verhindert. Hierbei wird die Möglichkeit geschaffen, den Signaltransduktionsweg zu stören, indem in vivo durch ein kleines Molekül die Funktion eines transkriptionellen Koaktivators unterbunden wird.

Die hier präsentierten Ergebnisse sind auf ein in vitro-Modell und eine HIF-1 beeinflussende Zielsubstanz fokussiert. Die Auswahl an klinisch vielversprechenden Substanzen wird breiter gefächerte Versuchsreihen benötigen, die mehrere Substanzen in einem Panel von Zelllinien in vitro untersuchen und die Resultate in in vivo Experimenten bestätigen.

Kürzlich veröffentlichte Studien konstatieren, dass der Erfolg der HIF-1-Inhibition in vivo auch von anderen kritischen Faktoren im Mikrometabolismus des Tumors abhängt, wie des Glukosemetabolismus und des pH-Werts [78] [79] und außerdem von der Fähigkeit, durch jegliche erworbene Strategie fast die komplette HIF-1-Funktion auszuschalten. Dies zeigten Williams et al. [80] in Zellmixexperimenten, in denen 1% der Zellen mit intakter HIF-1-Funktion in einem Tumor genügte, das Tumorwachstum aufrecht zu erhalten.

Anhand der vorliegenden Arbeit kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die HIF-1-Hemmung mittels Chetomin die Expression von durch HIF-1 gesteuerten Genen wie CA9 und VEGF herunterreguliert und die Strahlensensibilität unter streng hypoxischen Bedingungen in humanen HT 1080 Zellen erhöht.

Allerdings sind weitere Studien nötig, um die Wirkung der selektiven Hemmung des Mediators HIF-1 auf die Strahlensensibilität auch in vivo zu untersuchen.

5 Literatur

1. Bray, F. and B. Møller, *Predicting the future burden of cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 63-74.
2. Krebs Karzinom. *Informationen über verschiedene Krebsarten*. 2016 [23.09.16]; Available from: krebs-tumoren.de.
3. Deutsche Krebsgesellschaft. *Krebshäufigkeit*. 2006 [03.01.2012]; Available from: <http://www.krebsgesellschaft.de/krebshaeufigkeit,11267.html>.
4. DKFZ. *Krebsatlas des Deutschen Krebsforschungszentrums*. 2008 [19.11.2010]; Available from: www.dkfz.de/de/krebsatlas.
5. *Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Urologie*. 2009 [24.11.2010]; Available from: <http://www.dgu.de/index.php?id=113&frame=awmf>.
6. Scherer E., Sack H.: *Strahlentherapie*. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg 3. Auflage, 1996.
7. Nias, A.H.W., *An introduction to radiobiology*. 2nd ed1998, Chichester; New York: Wiley. xii, 384 p.
8. Hall, E., *The oxygen effect and reoxygenation*, in *Radiobiology for the radiologist* 1994, J.B. Lippincott Company: Philadelphia.
9. Schönen, J. *Biologische Wirkungen*. [03.01.2012]; Available from: <http://www.j-schoenen.de/abc-manual/a/BiologischeWirkungen.html>.
10. Bussink, J., J.H. Kaanders, and A.J. van der Kogel, *Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers*. Radiother Oncol, 2003. **67**(1): p. 3-15.
11. Wouters, B.G., et al., *Hypoxia as a target for combined modality treatments*. Eur J Cancer, 2002. **38**(2): p. 240-57.
12. Lee, J.M. and A. Bernstein, *p53 mutations increase resistance to ionizing radiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5742-6.
13. Graeber, T.G., et al., *Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours*. Nature, 1996. **379**(6560): p. 88-91.
14. Gee, H.E., et al., *hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer*. Cancer, 2010. **116**(9): p. 2148-58.
15. DeClerck, K. and R.C. Elble, *The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy*. Front Biosci, 2010. **15**: p. 213-25.

16. Vaupel, P. and M. Höckel: *Oxygenation of human tumors*, in *Blood perfusion and microenvironment of human tumors – implications for clinical radiooncology*, M. Molls and P. Vaupel, Editors. 2000, Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg-New York. p. 63ff.
17. Semenza, G.L., *HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics*. Trends Mol Med, 2002. **8**(4 Suppl): p. S62-7.
18. Kaufman, B., et al., *Proceedings of the Oxygen Homeostasis/Hypoxia Meeting*. Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3350-6.
19. Semenza, G.L., *HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia*. J Appl Physiol, 2000. **88**(4): p. 1474-80.
20. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5680-4.
21. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
22. Ziello, J.E., I.S. Jovin, and Y. Huang, *Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia*. Yale J Biol Med, 2007. **80**(2): p. 51-60.
23. Maynard, M.A. and M. Ohh, *Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer*. Am J Nephrol, 2004. **24**(1): p. 1-13.
24. Kung, A.L., et al., *Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway*. Cancer Cell, 2004. **6**(1): p. 33-43.
25. Wenger, R.H. and M. Gassmann, *Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1*. Biol Chem, 1997. **378**(7): p. 609-16.
26. Damert, A., E. Ikeda, and W. Risau, *Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells*. Biochem J, 1997. **327** (Pt 2): p. 419-23.
27. Firth, J.D., B.L. Ebert, and P.J. Ratcliffe, *Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21021-7.

28. Galson, D.L., et al., *The orphan receptor hepatic nuclear factor-4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 2135-44.
29. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 993-8.
30. Sodhi, A., et al., *MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(1): p. 292-300.
31. Stiehl, D.P., et al., *Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway*. FEBS Lett, 2002. **512**(1-3): p. 157-62.
32. Laughner, E., et al., *HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3995-4004.
33. Zhong, H., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases*. Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5830-5.
34. Rasheed, S., et al., *Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)*. Cancer, 1974. **33**(4): p. 1027-33.
35. Zwietering, M.H., et al., *Modeling of the Bacterial Growth Curve*. Appl. Environ. Microbiol., 1990; **56**: 1875-1881.
36. Vordermark, D., T. Shibata, and J.M. Brown, *Green fluorescent protein is a suitable reporter of tumor hypoxia despite an oxygen requirement for chromophore formation*. Neoplasia, 2001. **3**(6): p. 527-34.
37. Tilikidis, A. and A. Brahme, *Microdosimetric description of beam quality and biological effectiveness in radiation therapy*. Acta Oncol. 1994. **33**(4): p. 457-69.
38. Melillo, G., *Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(9): p. 601-5.
39. Taucher-Scholz, G., et al., *Detection of heavy-ion-induced DNA double-strand breaks using static-field gel electrophoresis*. Radiat Environ Biophys, 1995. **34**(2): p. 101-6.

40. Vaupel, P., et al., *Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements*. Cancer Res, 1991. **51**(12): p. 3316-22.
41. Nordmark, M., et al., *The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **35**(4): p. 701-8.
42. Rampling, R., et al., *Direct measurement of pO₂ distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1994. **29**(3): p. 427-31.
43. Dahm-Daphi, J., E. Dikomey, and I. Brammer, *DNA-repair, cell killing and normal tissue damage*. Strahlenther Onkol, 1998. **174** Suppl 3: p. 8-11.
44. Brahimi-Horn, M.C., J. Chiche, and J. Pouyssegur, *Hypoxia and cancer*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(12): p. 1301-7.
45. Zhang, G., V. Gurtu, and S.R. Kain, *An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **227**(3): p. 707-11.
46. *Produktbeschreibung der Firma Alexis biochemicals*. Available from: www.biochemicals.net.
47. Produktliste BioViotica Naturstoffe GmbH [08.10.2016]; Available from: <http://www.adipogen.com/bvt-0161/chetomin.html>.
48. Holzknacht, B. 2003 [10.01.2012]; Available from: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/holzknacht-barbara-juliane-2003-07-14/HTML/chapter3.html>.
49. *Darstellung einer unkompenzierten CaliBRITETM Bead-Messung von BD*. [10.01.2012]; Available from: http://www.biologie.uni-duesseldorf.de/Institute/Funktionelle_Genomforschung/FACS_Facility/Protokolle/Datenauswertung.
50. Löffler G., Petrides P.E.: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg 7. Auflage, Oktober 2002.
51. Hall, E., *Radiobiology for the radiologist*. 4th ed1994, Philadelphia: J.B. Lippincott Company.
52. *Ermittlung der Strahlensensitivität mit dem Zellkoloniebildungstest*. [08.09.2013]; Available from: <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/00/00H220/t4.pdf>.
53. leinco.com. [10.01.2012]; Available from: http://www.leinco.com/general_wb.

54. Wardman, P., *Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2007. **19**(6): p. 397-417.
55. Vordermark, D., et al., *Cell type-specific association of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) protein accumulation and radiobiologic tumor hypoxia*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(4): p. 1242-50.
56. Rini, BI., et al., *Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma: current status and future directions*. Clin Cancer Res., Feb 2007. **13** (4): p. 1098–106.
57. Folkman, J., et al., *Endogenous angiogenesis inhibitors*. APMIS, 2004. **112** (7–8): p. 496–507.
58. Kessler, J., et al., *HIF-1 α inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 605.
59. Staab, A., et al., *Small interfering RNA targeting HIF-1alpha reduces hypoxia-dependent transcription and radiosensitizes hypoxic HT 1080 human fibrosarcoma cells in vitro*. Strahlenther Onkol, 2011. **187**(4): p. 252-9.
60. Jin, Z., et al., *Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 alpha radiosensitized MG-63 human osteosarcoma cells in vitro*. Tumori, 2015; **101**(5): p. 578-84.
61. Huang, Y, et al., *Effect of small interfering RNA targeting hypoxia-inducible factor-1 α on radiosensitivity of PC3 cell line*. Urology, 2012; **79**(3): p. 744.e17-24.
62. Moon, SY, et al., *Using YC-1 to overcome the radioresistance of hypoxic cancer cells*. Oral Oncol., 2009; **45**(10): p. 915-9.
63. Sun, H.L., et al., *YC-1 inhibits HIF-1 expression in prostate cancer cells: contribution of Akt/NF-kappaB signaling to HIF-1alpha accumulation during hypoxia*. Oncogene, 2007. **26**(27): p. 3941-51.
64. Wu, S.Y., et al., *YC-1 induces apoptosis of human renal carcinoma A498 cells in vitro and in vivo through activation of the JNK pathway*. Br J Pharmacol, 2008. **155**(4): p. 505-13.
65. Dai, S., et al., *Inhibition of hypoxia inducible factor 1alpha causes oxygen-independent cytotoxicity and induces p53 independent apoptosis in glioblastoma cells*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **55**(4): p. 1027-36.

66. Li, L., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 inhibition in combination with temozolomide treatment exhibits robust antitumor efficacy in vivo*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(15): p. 4747-54.
67. Moeller, B.J., et al., *Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules*. Cancer Cell, 2004. **5**(5): p. 429-41.
68. Moeller, B.J. and M.W. Dewhirst, *Raising the bar: how HIF-1 helps determine tumor radiosensitivity*. Cell Cycle, 2004. **3**(9): p. 1107-10.
69. Sasabe, E., et al., *The involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells*. Int J Cancer, 2007. **120**(2): p. 268-77.
70. Pore, N., et al., *Nelfinavir down-regulates hypoxia-inducible factor 1alpha and VEGF expression and increases tumor oxygenation: implications for radiotherapy*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9252-9.
71. Arvold, N.D., et al., *Hypoxia-induced radioresistance is independent of hypoxia-inducible factor-1A in vitro*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **62**(1): p. 207-12.
72. Moeller, B.J. and M.W. Dewhirst, *In regard to Arvold et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys., 2005. **63**(3): p. 970-1; author reply 971.
73. Jewell, U.R., et al., *Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous*. FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1312-4.
74. Bache, M., et al., *Elevated tumor and serum levels of the hypoxia-associated protein osteopontin are associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 132.
75. Patten, D.A., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(18): p. 3247-57.
76. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease*. Pediatr Res, 2001. **49**(5): p. 614-7.
77. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology*. Trends Mol Med, 2001. **7**(8): p. 345-50.
78. Sorensen, B.S., et al., *Hypoxia induced expression of endogenous markers in vitro is highly influenced by pH*. Radiother Oncol, 2007. **83**(3): p. 362-6.

79. Staab, A., et al., *Modulation of glucose metabolism inhibits hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha)*. *Strahlenther Onkol*, 2007. **183**(7): p. 366-73.
80. Williams, K.J., et al., *Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1*. *Radiother Oncol*, 2005. **75**(1): p. 89-98.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AHR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
Air	Sauerstoffpartialdruck 20%
AK	Antikörper
Akt = PKB	Proteinkinase B
ARNT = HIF-1 β	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
B	Brutschrank (normoxische Bedingungen)
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
BisTris	Bishydroxyethylamino-Trishydroxymethylmethan
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CA	Carboanhydrase
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB Bindungsprotein
Che, CHT	Chetomin
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
Con A	Concanavalin A
CREB	cAMP Response Element Bindungsprotein
DFO	Deferoxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRE	Dioxin Response Element
4E-BP	eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) Binding Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EPO	Erythropoietin
et al.	et alii (und andere)
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum

FGF	Fibroblast Growth Factor
FL	Fluoreszenz
FRAP = mTOR	FKBP12-Rapamycin-Assoziiertes Protein
FSC	Forward Scatter
GFP	Green Fluorescent Protein
Gy	Gray (Einheit der Energiedosis ionisierender Strahlung)
H	Hypoxie
h	Stunde
HBS	HIF-1 Binding Site
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HER2/neu	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HRE	Hypoxia Response Element
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Hypoxie	Sauerstoffpartialdruck 0,1%
IGF	Insulin-like Growth Factor
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
KON	Kontrolle
l	Liter
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (Mol/Liter)
MAP	Mitogen-Activated Protein
MEK = MAPKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MEM α	Minimum Essential Medium alpha
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mp	minimal promotor
mRNS	messenger Ribonukleinsäure

mTOR = FRAP	mammalian Target Of Rapamycin
MV	Megavolt
mW	Milliwatt
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
NLS	Nuclear Localization Signal
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
Normoxie	Sauerstoffpartialdruck 20%
ODD	Oxygen Dependent Degradation
OER	Oxygen Enhancement Ratio (Sauerstoffverstärkung)
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii
PHD	Prolinhydroxylase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB = Akt	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma (Proteinkinase)
Ras	Rat sarcoma (Proto-Onkogen)
RNS	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Real-Time PCR
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
siRNS	kleine interferierende (small interfering) Ribonukleinsäure
SSC	Sideward-Scatter = Right Angle Scatter
TAD-C	Carboxyterminale Transaktivierungsdomäne

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
vHL	von Hippel-Lindau
vs.	versus
WT	Wildtyp
YC-1	synthetisches Benzylindazolderivat
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Flentje für die Ermöglichung einer Dissertation an der Klinik für Strahlentherapie bedanken. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. S. Mielke für die Übernahme des Korreferates.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. A. Staab für die Betreuung während der Entstehung der Arbeit sowie die stets nette und kompetente Beratung.

Allen Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung bei den praktischen Versuchen.

Hier sei besonders Frau A. Katzer gedankt für die zuvorkommende Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei den Laborarbeiten.

An dieser Stelle möchte ich auch herzlich meinen Eltern danken, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mir stets motivierend zur Seite standen.