

**Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Radioonkologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. M. Bamberg

**Wirkungen von YC-1 (3-(5'-hydroxymethyl-2'furyl)-1-
benzylindazole) auf Zellwachstum, Vitalität und
Radiosensibilität von Tumorzellen unter hypoxischem
Stress**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Sarah Strickmann, geb. Duszenko

aus

Tübingen

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Frau Professor Dr. V. Jendrossek

2. Berichtstatter: Professor Dr. S. Wesselborg

Inhalt

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	7
1.1. Tumorentstehung	7
1.2. Pathogenese der Tumorhypoxie	8
1.3. Bedeutung der Tumorhypoxie	10
1.4. Apoptose und ihre Bedeutung für den menschlichen Organismus	13
1.5. Apoptose und Hypoxie	18
1.6. Der Hypoxia Inducible Factor	19
1.7. YC-1, ein HIF1 α Inhibitor	21
2. Fragestellung	23
3. Material und Methoden	24
3.1. Material	24
3.1.1. Reagenzien	24
3.1.2. Puffer und Lösungen	25
3.1.3. Antikörper und Liganden	25
3.1.4. Zelllinien	26
3.1.5. Verbrauchsmaterial	27
3.1.6. Geräte	27
3.2. Methoden	29
3.2.1. Zellkultur	29
3.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
3.2.3. Zellzahlbestimmung	29
3.2.4. Trypan-Blau-Ausschlussfärbung	30
3.2.5. Zellkultur in Hypoxie	30
3.2.6. Erzeugung von Hypoxie mittels Gas Pak Systemen	31
3.2.7. Bestrahlung von Zellen	31

Inhalt

3.2.8.	Analyse des HIF-1 Transkriptionsfaktors	31
3.2.9.	Koloniebildungstests	32
3.2.10.	Bestimmung des Zelltodes	32
3.2.11.	Western-Blot-Analyse	35
4.	Ergebnisse	38
4.1.	Wirkung von YC-1 auf die Expression von HIF-1 und HIF-1-regulierten Proteinen	38
4.1.1.	Wirkung von YC-1 auf die Hypoxie-induzierte Aktivierung von HIF	38
4.1.2.	Wirkung von YC-1 auf die Expression von Glut-1	39
4.2.	Wirkung von YC-1 auf Tumorzelllinien	40
4.2.1.	Wirkung der relativen O ₂ -Konzentration auf das Zellwachstum	40
4.2.2.	Wirkung von YC-1 auf die Zellproliferation unter Normoxie und Hypoxie	42
4.2.3.	Wirkung von YC-1 auf den Zellzyklus unter Normoxie und Hypoxie	45
4.2.4.	Wirkung von YC-1 auf Apoptose von Tumorzellen unter Normoxie und Hypoxie	52
4.2.4.1.	Wirkung von YC-1 auf die Expression verschiedener Proteine der Bcl-2 Familie	62
4.2.4.2.	Einfluss von Hypoxie und YC-1 auf die Expression Zellzyklus-relevanter Proteine	68
4.3.	Wirkung von YC-1 auf Strahlenwirkung unter Normoxie und Hypoxie	71
4.3.1.	Einflüsse von YC-1 auf die strahleninduzierte Apoptose unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen	72
4.3.2.	Einflüsse von YC-1 auf den strahleninduzierten klonogenen Zelltod unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen	77

Inhalt

4.4.	Wirkung von YC-1 auf hypoxie-selektionierte therapieresistente Tumorzellen	81
4.4.1.	Wirkung von YC-1 auf die Hypoxie-induzierte Aktivierung von HIF	82
4.5.	Wirkung von YC-1 auf den Zellzyklus unter Normoxie und Hypoxie in NCI H 460 Zellen nach hypoxischer Selektion	82
4.6.	Koloniebildung	85
5.	Diskussion	91
5.1.	Die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 für die hypoxie-induzierte Strahlenresistenz von Tumorzellen	91
5.2.	Zusammenfassung	100
6.	Abkürzungen	101
7.	Literatur	102
8.	Danksagung	119

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1. Tumorentstehung

Tumorerkrankungen sind vor allem in den westlichen Industrieländern ein großes gesundheits- und sozialpolitisches Problem. Bösartige Tumore sind in Deutschland die zweithäufigste Todesursache (Schmoll, 1996; Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der Hansestadt Hamburg, 1999). Für die Entstehung von Tumoren gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Alle Tumoren sind in der Regel klonale Erkrankungen: Sie entstehen aus einzelnen Ursprungszellen, die eine kritische Zahl an Mutationen erworben haben und sich damit der physiologischen Wachstumskontrolle entziehen (Hanahan und Weinberg 2000). Man nimmt eine relativ kleine Anzahl von molekularen, biochemischen und zellulären Merkmalen – erworbenen Eigenschaften – an, die die meisten humanen Tumoren teilen. Diese Merkmale führen in menschlichen Zellen zu ungehemmtem Wachstum und determinieren die Aggressivität eines Tumors. (Hanahan and Weinberg 2000).

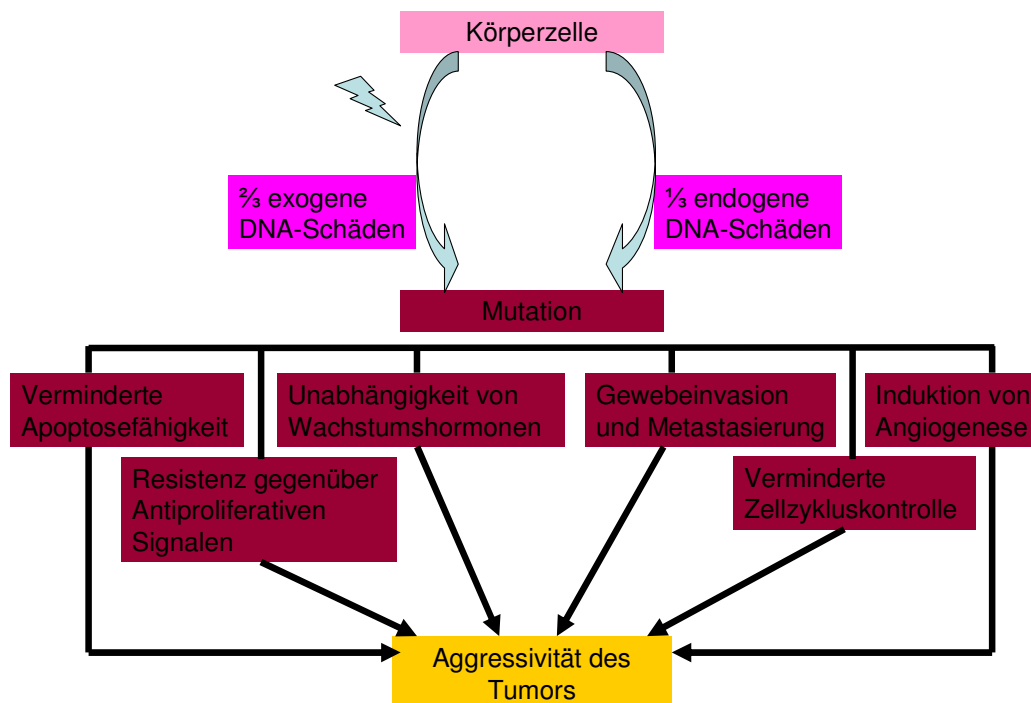


Abb. 1: Determinanten der Aggressivität von Tumoren.

Nach Hanahan and Weinberg, 2000

1. Einleitung

Von Bedeutung für die vorliegende Fragestellung sind dabei insbesondere drei Punkte. Die *Resistenz gegenüber antiproliferativen Signalen* beeinflusst vor allem den Zellzyklus. Sie verhindert, dass Zellen aus dem aktiven proliferativen Zyklus in die G0-Ruhephase gedrängt werden und dass Zellen ihr Proliferationspotential endgültig verlieren können, indem sie in einen postmitotischen Zustand wechseln, in dem sie meist auch weiter ausdifferenzieren. Viele antiproliferative Signale werden durch den pRb- (=Retinoblastomprotein-) Signalweg vermittelt. Die *verminderte Apoptosefähigkeit* führt dazu, dass die Zelle auf unerwünschte Signale wie DNA-Schädigung, Aktivierung von Onkogenen, verminderten Einstrom von Überlebenssignalen und Hypoxie nicht mehr mit Apoptoseinduktion reagiert. Apoptoseresistenz kann über eine Vielzahl von Mechanismen erworben werden und ist ein wesentliches Charakteristikum von Tumorzellen. Der Verlust eines proapoptotischen Regulationsproteins beinhaltet sicher die Mutation von p53. Die *Induktion von Angiogenese* ist vor allem ein Merkmal hypoxischer Tumoren.

Tumorgewebe unterscheidet sich schon grundsätzlich in mehreren Punkten vom Normalgewebe, so findet man im Tumor neben einem vergleichsweise hohen interstitiellen Druck, hohen Laktatkonzentrationen und einem relativ gesehen niedrigen pH-Wert auch geringere Glucosekonzentrationen und eine im Vergleich zum Normalgewebe schlechtere Versorgung mit Sauerstoff (Walenta et al., 2000; Vaupel et al., 2001b; Gatenby and Gillies, 2004). In der Mehrzahl dieser Tumoren finden sich außerdem zumindest Regionen mit erniedrigten Sauerstoffpartialdrücken (Vaupel et al., 1998), in denen sowohl Zytostatika als auch Bestrahlung eine deutlich schlechtere Wirkung zeigen, da in diesen hypoxischen Gebieten viele Zellfunktionen verändert und an die schlechteren Umgebungsbedingungen angepasst sind.

1.2. Pathogenese der Tumorhypoxie

Tumorhypoxie ist in erster Linie das Ergebnis eines Missverhältnisses von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Tumorgewebe. Dieses Missverhältnis entsteht zunächst durch die vom Normalgewebe abweichende Gefäßarchi-

1. Einleitung

tektur innerhalb maligner Tumoren. Ursprünglich sind solide Tumoren Strukturen ohne Gefäßversorgung, die ausschließlich durch Diffusion mit Sauerstoff und überlebensnotwendigen Substraten versorgt werden. Obwohl prä-maligne Läsionen oder *in-situ* Karzinome oft als stark vaskularisiert beschrieben werden, trifft diese Betrachtung nur aus makroskopischer Sicht zu. Prä-maligne Tumoren oder *in-situ*-Karzinome verfügen zwar über ein von vielen Gefäßen durchzogenes Zellbett, die Tumorzellen selbst sind aber durch die intakte Basalmembran räumlich von den Sauerstoff-versorgenden Gefäßen getrennt. Daher finden schon die frühe Karzinogenese und die Entwicklung hin zum malignen Phänotyp oft in hypoxischer Umgebung statt.

Wenn Tumoren zu einer Größe von 5×10^5 bis 10^6 Zellen herangewachsen sind, also zu einer Größe, die mit bloßem Auge noch nicht wahrnehmbar ist, ist eine kritische Schwelle erreicht. Von hier an ist kein weiteres Wachstum ohne eine eigene Gefäßversorgung möglich. Diese Gefäßversorgung wird durch die Tumorzellen selbst aktiv eingeleitet, durch Bildung von Transmitterstoffen werden Gefäßstümpfe dazu angeregt, in Richtung des Tumors zu wachsen. Dieser adaptiver Vorgang, der als Reaktion auf die Mangelversorgung mit Sauerstoff interpretiert werden kann (Giatromanolaki and Harris, 2001; Giatromanolaki et al., 2001) ist eine der frühesten Auswirkungen von Tumorphypoxie.

Tumorgefäße unterscheiden sich meist deutlich von normalen Blutgefäßen. Ihre 3-dimensionale Anordnung im Gewebe ist uneinheitlich und zum Teil sogar chaotisch mit atypischen Verzweigungsmustern, arterio-venösen Anastomosen, geknäuelten und dilatierten Abschnitten mit zum Teil blinden Enden, Shunts, Sinusoiden und Schleifen (Höckel and Vaupel, 2001a). Dadurch ist die Verteilung des Sauerstoffs nicht in allen Tumorregionen gleich (Rockwell, 1997a). Schon Zellen in der 4. bis 5. Zellreihe von einem Gefäß ausgehend erhalten deutlich weniger Substrate und Zellen der 10. Zelllage sind nahezu oder komplett anoxisch (Höckel and Vaupel, 2001b). Bereits in den 50er Jahren konnte gezeigt werden, dass jenseits von Diffusionstrecken von $160 \mu\text{m}$ (das entspricht etwa 8 bis 15 Zelllagen) keine lebenden Zellen mehr nachweisbar sind

1. Einleitung

(Vaupel et al., 1991; Gatenby and Gillies, 2004). Diese verlängerten Diffusionsstrecken führen zu Regionen chronischer Hypoxie, die überall im Tumor verteilt sind.

Aber auch in zeitlicher Hinsicht schwankt die Versorgung mit Sauerstoff. Neben der Abhängigkeit von räumlicher Nähe zu Gefäßen ist auch ein konstanter Blutfluss in den jeweiligen Gefäßen notwendig. In den meisten Tumorgefäßen ist das jedoch nicht gegeben, da sie sich auch in ihrer Funktionsweise von normalen Gefäßen unterscheiden. Glatte Muskulatur und damit auch die autonome Innervierung der Gefäßwand sind nicht oder kaum ausgebildet und sie verfügen über keine funktionierende Autoregulation des Gefäßtonus (Vaupel, 1999). Das Gefäß kann also im Unterschied zu normalen Gefäßen nicht selbstständig einen konstanten Blutfluss initiieren. Dadurch kommt es immer wieder zu erheblichen Schwankungen der Perfusion und damit zur zeitweiligen Unterversorgung von Zellen. Selbst Zellen in direkter Nähe zu Blutgefäßen können also für Sekunden, Minuten oder Stunden der Hypoxie, gefolgt von Reoxygenierung, ausgesetzt sein (Vaupel et al., 1998; Ljungkvist et al., 2005).

Ein dritter Faktor, der zusätzlich zur Hypoxie beitragen kann, ist eine oft reduzierte Sauerstofftransportkapazität des Bluts bei Tumorpatienten. Bei fortgeschrittenen Tumoren oder als Folge einer Therapie kann eine tumorassoziierte (*anaemia of chronic disease*) oder künstlich (iatrogen) verursachte Anämie auftreten (Vaupel et al., 2001; Birgegard et al. 2005). Selbst bei nur mäßig erniedrigtem Hämoglobingehalt des Blutes mit Werten von 10 bis 12 g/dl ist die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff beeinträchtigt, da Tumorgewebe aus den schon erwähnten Gründen eine schwankende Versorgung mit Sauerstoff ohnehin kaum kompensieren kann (Henke and Guttenberger, 2000; Vaupel et al., 2001; Birgegard et al. 2005).

1.3. Bedeutung der Tumorhypoxie

Die schon angeführte von hypoxischen Zellen gesteuerte Bildung von Gefäßen ist nicht die einzige Auswirkung von Hypoxie auf Tumorzellen. In Zellen unter

1. Einleitung

Sauerstoffentzug findet vermehrt anaerobe Glykolyse statt, es steht also nicht nur weniger Sauerstoff sondern auch weniger Energie zur Verfügung. Entsprechend werden alle nicht überlebensnotwendigen Funktionen eingeschränkt, auf der anderen Seite aber Prozesse gestartet, die die Situation potentiell verbessern. Hypoxie aktiviert insbesondere eine Reihe klassischer Transkriptionsfaktoren wie p53, NFκB oder AP-1, die auch in vielfältige allgemeine Stressreaktionen der Zelle involviert sind (Matsushita et al., 2000; Herr and Debatin, 2001; Kunz et al., 2001; Shen and White, 2001; Karashima et al., 2003; Renton et al., 2003). Bereits bei moderater Hypoxie wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 exprimiert, der unter anderem membranständige Glucosetransporter reguliert.

Die Hypoxie verursacht auch die Induktion von pro-angiogenen Proteinen in Tumorzellen (Forsythe et al., 1996; Biroccio et al., 2000), obwohl es inzwischen auch einige experimentelle Hinweise dafür gibt, dass solche Vorgänge bereits früher und nicht ausschließlich durch Hypoxie getrieben auftreten können (Li et al., 2000).

Hypoxie in Tumorzellen zeigt auch negative Konsequenzen für Zellteilung, Wachstum und Expansion der Zellen. Im Zellzyklus vermitteln Wachstumsstimulierende Signale den Eintritt der Zelle aus der G₀-Ruhephase in die G₁-Phase und aus der G₁- in die Synthese-Phase (S-Phase), indem sie die Transkription der G₁-Phasen Cycline (D-Typ Cyclin und Cyclin E) auslösen und die entsprechenden Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) aktivieren. Wachstums-hemmende Signale hingegen stimulieren Transkription und Aktivität von Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (p21^{Waf1/Cip1}, p27/^{Kip1} und p57/^{Kip2}) und aktivieren hierdurch Checkpunkte wie den G₁-Restriktionspunkt.

Zellzyklus-Analysen zeigen, dass ausgeprägte Hypoxie zum Arrest von Zellen im Übergang von der G₁ zur S-Phase führen kann (Höckel and Vaupel, 2001; Koritzinsky et al., 2001). Auf molekularer Ebene erklärt man sich diesen Effekt so, dass die Hypoxie zur Stabilisierung von p53 führt, das wiederum p21 aktiviert. p21 ist ein zentrales Regulatorprotein des Zellzyklus und vermittelt über Cyclin-abhängige Kinasen einen G₁/S-Block (Amellem et al., 1998; el

1. Einleitung

Deiry, 1998). Unter Anoxie werden Zellen auch unmittelbar in ihren jeweiligen Positionen im Zellzyklus arretiert (Amellem and Pettersen, 1991; Renton et al. 2003). In nativen Zellen führt starke Hypoxie zu Apoptose, in einer Zellpopulation wie sie beispielsweise in soliden Tumoren vorliegt führt Hypoxie somit zu einem vermehrten Selektionsdruck der Zellen, sie werden Apoptose-resistenter im Vergleich zu Zellen unter guten Umgebungsbedingungen.

Ausgeprägte Hypoxie stellt für eukaryote Zellen in vielerlei Hinsicht eine massive Stresssituation dar und sollte somit die Expansion von Zellen durch Zellzyklus-Effekte und Zelltod zunächst einmal hemmen. Seit den 80er Jahren wurden verschiedene Studien durchgeführt und veröffentlicht, die mit speziellen Sonden und verschiedenen nuklearmedizinischen Verfahren diese Annahme zu überprüfen versuchten. Alle diese Untersuchungen hatten ein gemeinsames Ergebnis: Gerade ausgeprägt hypoxische Tumoren sind durch besonders aggressive Verläufe mit schlechter Prognose gekennzeichnet (Höckel et al., 1998; Höckel et al., 1999; Sundfor et al., 2000; Nordmark et al., 2001).

Wie kommt es nun trotz der verschlechterten Proliferationsbedingungen zur erhöhten Resistenz gegenüber konventionellen Therapieverfahren? Eine mögliche (und tatsächlich die erste veröffentlichte) Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die ionisierende Strahlung alleine – wie auch verschiedene Medikamente alleine – keine ausreichenden Schäden in den Zellen setzen, sondern vielmehr über die Bildung von Sauerstoffradikalen wirken. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für eine ganze Reihe klassischer Zytostatika wie Alkylantien, Carboplatin und Anthrazykline beschrieben (Teicher, 1994; Koch et al., 2003; Shannon et al., 2003). Am Beispiel zahlreicher Arbeiten zum Einfluss von Hypoxie auf die Wirkung von Zytostatika wird allerdings klar, dass die möglichen Resistenzmechanismen aufgrund akuter Hypoxie deutlich komplexer sein können als der am Beispiel der Strahlentherapie geschilderte Sauerstoffeffekt (Shannon et al., 2003). Einige Daten legen nahe, dass die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise HIF1, unter Hypoxie zu einem veränderten Stoffwechsel und dadurch zu einem veränderten Metabolis-

1. Einleitung

mus verschiedener Arzneimittel führt (Comerford et al., 2002; Walenta et al., 1997; Walenta et al., 2000; Gatenby and Gillies, 2004).

Die zweite mögliche Erklärung ist ein hoher Selektionsdruck in Regionen mit schlechter Sauerstoffversorgung, der eine Entwicklung hin zu höherer Malignität fördert (Wouters et al., 2003). Es wurde eine Vielzahl von Hypoxie-induzierten genetischen und epigenetischen Veränderungen der Biologie von Tumorzellen beschrieben, die darauf hinweisen, dass die Hypoxie zu vermehrtem Tumorstadium und höherem Metastasierungspotential führt (Seimiya et al., 1999; Rofstad, 2000; Cairns et al., 2001; Höckel and Vaupel, 2001a; Höckel and Vaupel, 2001b; Harris, 2002).

Der dritte Erklärungsversuch umfasst schließlich die veränderten Eigenschaften hypoxischer Zellen, also die durch Induktion verschiedener Gene bewirkten Veränderungen in Zellzyklus-Kontrolle und exprimierten Oberflächenproteinen und -rezeptoren, die eine leichtere Metastasierung und schnelleres Wachstum begünstigen. Dies ist ein sehr komplexer Vorgang, dessen einzelne Komponenten bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und dessen Ablauf noch nicht zusammenhängend dargestellt wurde.

Fest steht jedoch, dass Hypoxie innerhalb maligner Tumoren für ein schlechtes Outcome und verminderte therapeutische Möglichkeiten steht. Die Frage die sich stellt ist also, ob es möglich ist, die vielfältigen Hypoxie-induzierten Veränderungen zu beeinflussen und welche zentralen Faktoren man manipulieren muss, um ein besseres Ergebnis der antineoplastischen Therapien zu erreichen.

1.4. Apoptose und ihre Bedeutung für den menschlichen Organismus

Apoptose, der so genannte „Programmierte Zelltod“, spielt im Leben aller mehrzelligen Organismen eine besondere Rolle. Apoptose ist der Tod einer Zelle zum Wohle des Gesamtorganismus, eine streng reglementierte Abfolge von definierten energieabhängigen Einzelschritten, an deren Ende das Ende der Zelle ohne negative Auswirkungen auf die Umgebung steht. Während Zell-

1. Einleitung

nekrose eher Folge eines plötzlichen gewaltsamen Eingriffs von außen ist, ist Apoptose oft das genetisch festgelegte natürliche Ende einer Zelle, viele exogene Noxen induzieren aber als letztendlichen Effekt auch Apoptose.

Schon in der Embryonalentwicklung, aber auch im erwachsenen Menschen ist Apoptose von größter Bedeutung: Nur eine genaue Regulation hält das Verhältnis aller Zellen zueinander im Gleichgewicht. Bei einem zu wenig an Apoptose kommt es zu Erkrankungen wie malignen Tumoren (Sarasin and Stary, 1997), bei einem zuviel an Apoptose zu Krankheitsbildern wie AIDS (Thompson, 1995) oder neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer (Cotman and Anderson, 1995) und M. Parkinson (Tatton et al., 2003).

Die beiden Arten von Zelltod lassen sich morphologisch deutlich voneinander unterscheiden: In nekrotischen Zellen kommt es nach der tödlichen Schädigung nicht zur Kondensation der Kernsubstanz wie in apoptotischen Zellen, sondern zum Anschwellen der Zellorganellen, was zum Platzen der Zelle durch Schädigung der Plasmamembran und konsekutivem Freisetzen zytoplasmatischer Makromoleküle (giftige Stoffe, als Abbauprodukte in den Lysosomen aber auch im Zytoplasma) führt. Diese rufen durch Anlockung von Fresszellen eine lokale Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe hervor. (Golstein et al., 1991; Kroemer et al., 1998).

Die Apoptose läuft in mehreren strikt regulierten Phasen ab. Am Anfang steht eine Verringerung des Zellvolumens. Die Organellen bleiben im Gegensatz zur Nekrose intakt, und der energieabhängige Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft über einen langen Zeitraum normal weiter. Es folgt die Exekutionsphase, gekennzeichnet durch die Schrumpfung des Zellkerns und eine Verdichtung des Chromatins. Phosphatidylserin wechselt von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Plasmamembran und an der Zytoplasmamembran zeigen sich Ausstülpungen und Bläschen (Zeiosis). Es folgt die Kernfragmentierung und als letztes der Abbau der DNA. Schließlich schnüren sich Membranschlossene Vesikel - die so genannten „apoptotic bodies“ - von der Zelle ab (Green and Reed, 1998). In der letzten Phase der Apoptose, der so genannten

1. Einleitung

Terminationsphase, werden dann die apoptotischen Körperchen mitsamt ihrem für andere Zellen teilweise gefährlichen Inhalt von benachbarten Zellen oder von Zellen des Immunsystems (z.B. Makrophagen) mittels Phosphatidylserin-spezifischer Rezeptoren erkannt, phagozytiert und durch lysosomale Enzyme abgebaut (Savill et al., 1990; Fadok et al., 1992, Krammer, 1999; Dive et al., 1992). Dadurch, dass die „apoptotic bodies“ phagozytiert werden, bevor die Integrität ihrer Zellmembran endgültig verloren geht, wird eine inflammatorische Reaktion vermieden (Voll et al., 1997). Der programmierte Zelltod wird damit zu einem physiologischen Prozess (Green and Reed, 1998).

Das biochemische Korrelat der klassischen Apoptose ist die Aktivierung von Caspasen. Dieses proteolytische System, welches durch posttranslationale Proteinmodifikationen die typischen morphologischen Veränderungen der Zelle bedingt, führt schließlich zu ihrer Desintegration und zur anschließenden Phagozytose durch Fresszellen. Caspasen sind proteinspaltende Enzyme (Proteasen), die aspartathaltige Aminosäuresequenzen in ihren Substraten erkennen und diese spezifisch schneiden. Die Apoptoseinduktion führt zu einer Aktivierung von Caspasen in einer proteolytischen Kaskade, die der Verstärkung des apoptotischen Signals dient (Afford et al. 2000; Los et al. 1999; Fischer et al. 2003).

Die Aktivierung von Caspasen kann im Wesentlichen über drei verschiedene Wege eingeleitet werden: über Liganden membranständiger Todesrezeptoren, durch allgemeinen Zellstress wie Hitze, osmotischen Schock (Bortner and Cidlowski, 1998), Gamma- oder UV-Strahlen (Rosette and Karin, 1996) oder Chemotherapeutika (Carriers et al., 2002; Wieder et al., 2001), die DNA-Schäden, oxidativen Stress (Rosette and Karin, 1996) und Schädigung der Mitochondrien hervorrufen, und (am wenigsten bekannt) über das Endoplasmatische Retikulum.

Der extrinsische oder Rezeptor-vermittelte Signalweg wird durch die Bindung von Zelltod-Liganden an membranständige Zelltodrezeptoren eingeleitet

1. Einleitung

(Baetu and Hiscott 2002; Igney and Krammer 2002; Ashkenazi 2002; Marini and Belka 2003).

Der intrinsische (entwicklungsgeschichtlich ältere) Apoptosesignalweg wird über die Mitochondrien der Zellen vermittelt, ausgelöst durch allgemeinen Zellstress wie Zytostatika, ionisierende oder UV-Strahlung, aber auch durch Stauroporin oder Ceramide (von Haefen et al. 2002; Wesselborg et al. 1999; Stepczynska et al. 2001; Gruber et al. 2004). Es ist auch der entscheidende Signalweg für die Hypoxie-vermittelte Apoptose (Weinmann et al. 2004). Extrinsische und intrinsische Signalwege sind aber nicht vollständig unabhängig voneinander. Es gibt Situationen, in denen sie einander verstärken, wenn nicht sogar initiieren.

Hauptmerkmal der DNA-damage induzierten mitochondrialen Apoptose ist die Stabilisierung von p53, das über nachgeschaltete Effektoren wie Puma oder Noxa eine Aktivierung und Konformationsänderung pro-apoptotischer Proteine wie Bax mit konsekutiver Translokation und Schädigung des Mitochondriums vermittelt (Asker et al. 1999; Oda et al. 2000; Rudner et al. 2001).

Die Schädigung des Mitochondriums mit Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ist das zentrale Ereignis der intrinsischen Apoptose. Dieser Zusammenbruch führt zum Austritt von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Zytoplasma. Der mitochondriale Signalweg steht unter der Kontrolle einer Vielzahl pro- und anti-apoptotischer Proteine einer Familie von Zellzyklus regulierenden Proteinen, der sogenannten Bcl-Familie. Diese Proteine erhielten ihren Namen vom ersten entdeckten Mitglied, das in einem malignen Lymphom entdeckt wurde (Bcl für B-cell Lymphoma).

Da vor allem die anti-apoptotischen Proteine Bcl-xL und Bcl-2 mehrere zentrale Schritte der mitochondrialen Apoptose hemmen, kann Bestrahlungs- oder Zytostatika-induzierte Apoptose in vielen Zellsystemen durch Überexpression von Bcl-2 nahezu komplett unterbunden werden (Rudner et al. 2001b; Belka and Budach 2002; Rudner et al. 2002). Die komplexen Mechanismen der Apoptose-hemmenden Wirkung von Bcl-2 sind Gegenstand aktueller Diskussionen. Als

1. Einleitung

wahrscheinlichstes Modell gilt, dass Bcl-2, Bcl-xl und deren funktionelle Homologa die Wirkung der Apoptose-Promotoren Bax, Bak und Bok inhibieren.

Bax, Bak und Bok können im Rahmen der Apoptose-Einleitung direkt Mitochondrien aktivieren, die daraufhin Cytochrom c und ATP aus dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran freisetzen. Der Verlust der Bax-Expression führt in den meisten Tumorarten zur Resistenz gegen zytotoxische Therapien.

Die Unterfamilie der BH3-only Proteine der Bcl-2 Genfamilie reguliert den Vorgang der Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs, indem sie Apoptose-hemmende Proteine wie Bcl-xL und Bcl-2 aus der Bindung an Bax verdrängen können und hierdurch Bax (oder auch Bak) aktivieren. Solche Wirkungen wurden mittlerweile für Bad, Bim und Bid gezeigt. Diese pro-apoptotischen BH3-only Proteine agieren wahrscheinlich als Bindeglieder zwischen spezifischen Signalkaskaden und der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade.

Durch die Entdeckung einer im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verankerten Caspase und deren Aktivierung durch spezifische endoplasmatische Proteine wurde die Rolle des ER beim Regulierungsprozess des Apoptoseprogramms festgestellt (Nagakawa et al., 2000). Bislang konnte der genaue Ablauf des Signalweges der ER-induzierten Apoptose nicht vollständig aufgeklärt werden. Allerdings scheinen zwei Hauptwege, der eine abhängig von Transkriptionsfaktoren, der andere Caspasen-abhängig, beteiligt zu sein (Szegezdi et al., 2003).

Neben diesen klassischen Formen der Apoptose, die durch biochemische Kriterien wie Aktivierung von Caspasen und durch die oben genannten morphologischen Kennzeichen definiert sind, gibt es auch andere Formen akuten Zelltodes, die als aberrante Apoptoseformen oder Mischformen von Apoptose und Nekrose gekennzeichnet werden (Leist and Jäätelä 2001). Hypoxie kann beispielsweise unter Umständen auch über solche Signalwege zum Zelltod führen (Cheng et al. 1999). Hypoxie induziert bei vielen Zelllinien die pro-apoptotischen Proteine NIX und NIP3 (Bruick 2000; Sowter et al. 2001). Obwohl es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials kommt, verläuft der

1. Einleitung

NIP3-vermittelte Zelltod unabhängig von Cytochrom c und der Aktivierung von Caspasen.

1.5. Apoptose und Hypoxie

Welche Apoptose-Signalwege in welchem Ausmaß für die Hypoxie-induzierte Apoptose eine Rolle spielen ist bisher nur zum Teil verstanden. Eine ganze Reihe von Arbeiten zeigt die Beteiligung intrinsischer also mitochondrial vermittelter Signalwege auf. So wurde bei einer ganzen Reihe experimenteller Modelle *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, dass die Hypoxie-induzierte Apoptose durch Bcl-2 und Bcl-xL gehemmt wird (Tamatani et al., 1998; Shimizu et al. 1996b; Tsujimoto et al. 1997). Die chemische Hemmung von Caspase-9 reduziert ebenfalls die Sensitivität von Zellen gegen hypoxischen Stress, was auf eine funktionelle Rolle des Apoptosoms hinweist (Malhotra et al., 2001). Die Rolle von p53 bei der Hypoxie-induzierten Apoptose ist ebenfalls nicht völlig geklärt. Sicher ist nur, dass ausgeprägte Hypoxie zur Stabilisierung und Aktivierung von p53 führt. Bei einer ganzen Reihe von zellexperimentellen Arbeiten wurde eine Abhängigkeit des hypoxischen Zelltodes von funktionellem p53 beobachtet (Graeber et al., 1996; Banasiak and Haddad, 1998; Rupnow et al., 1998). Allerdings wurden auch p53-unabhängige Formen Hypoxie-induzierter Apoptose beschrieben (Bialik et al., 1997). Diese teilweise gegensätzlichen experimentellen Beobachtungen könnten auf zelltypspezifischen Unterschieden beruhen.

Auch Elemente extrinsischer Signalwege könnten eine funktionelle Bedeutung für die Hypoxie-induzierte Apoptose haben. So kann Hypoxie zur Hochregulation von Zelltodrezeptoren und ihren Liganden führen (Yaniv et al., 2002). Zwei Arbeiten zeigten auch, dass die Inhibition von Caspase-8 oder FADD unter Umständen zur erhöhten Resistenz gegen Hypoxie führen (Malhotra et al., 2001; Chao et al., 2002). Darüber hinaus ist es nicht ganz ungewöhnlich, dass Elemente verschiedener Apoptose-Signalwege nebeneinander vorkommen, einige Arbeiten zeigen auch eine mögliche Verknüpfung des ex- und intrinsischen Signalwegs auf mehreren Ebenen (Scaffidi et al., 1998; Li et al., 1998).

1.6. Der Hypoxia Inducible Factor

Die meisten Anpassungsreaktionen hypoxischer Zellen sind genetisch festgelegt und werden auf molekularer Ebene durch veränderte Transkription gesteuert. Ein zentraler Faktor bei der zellulären Anpassung an Hypoxie ist der Transkriptionsfaktor HIF (hypoxia inducible factor), von dem 3 Untertypen existieren: HIF 1-3.

HIF2, das 1997 zum ersten Mal geklont wurde, ist nicht in allen Zelltypen nachgewiesen, bislang wurde es hauptsächlich in Endothelien gefunden. Wo es vorhanden ist, aktiviert es eine Vielzahl von spezifischen Genen. Beispielsweise ist im Nierenzellkarzinom HIF2 und nicht HIF1 verantwortlich für das Wachstum des Tumors (Kaelin et al., 2002). Zu HIF3 existieren bislang wenige Untersuchungen. HIF2 und HIF3 scheinen aber eher spezielle Zelltyp- und zeitabhängige Funktionen zu haben.

HIF1 ist in Bezug auf sauerstoffabhängige Stoffwechselregulationen der wichtigste der drei, da er in fast jeder Zelle exprimiert wird und hauptsächlich direkt auf die Sauerstoffkonzentration reagiert (Carmeliet et al., 1998), in vielen Tumorarten aber auch konstitutiv überexprimiert wird. HIF1 ist das zentrale Molekül der hypoxischen Anpassung.

HIF1 besteht wiederum aus 2 Untereinheiten, HIF1 α und HIF1 β . Während HIF1 β (ARNT) fortwährend synthetisiert wird und frei im Nukleus schwimmt, wird HIF1 α zwar ebenfalls ständig produziert, aber sofort ins Zytosol verlagert und dort in Normoxie gleich wieder durch Ubiquitilierung abgebaut. In Hypoxie kann die Hydroxylierung von zwei Prolin-Resten durch Sauerstoff-abhängige Prolylhydroxylasen (PHD1 - PHD3) nicht stattfinden, der proteasomale Abbau über einen Ubiquitin-Ligase Komplex ist dadurch gehemmt (Semenza et al., 1997; Wenger, 2000; Semenza, 2002). HIF1 α transloziert nun in ausreichender Menge zurück in den Nukleus, wo es auf seinen Gegenpart HIF1 β trifft und mit ihm ein stabiles aktives Dimer bildet. Durch Bindung an spezifische HRE-Konsensus-Sequenzen werden die Promotoren Hypoxie-abhängiger Zielgene aktiviert (Semenza 2002).

1. Einleitung

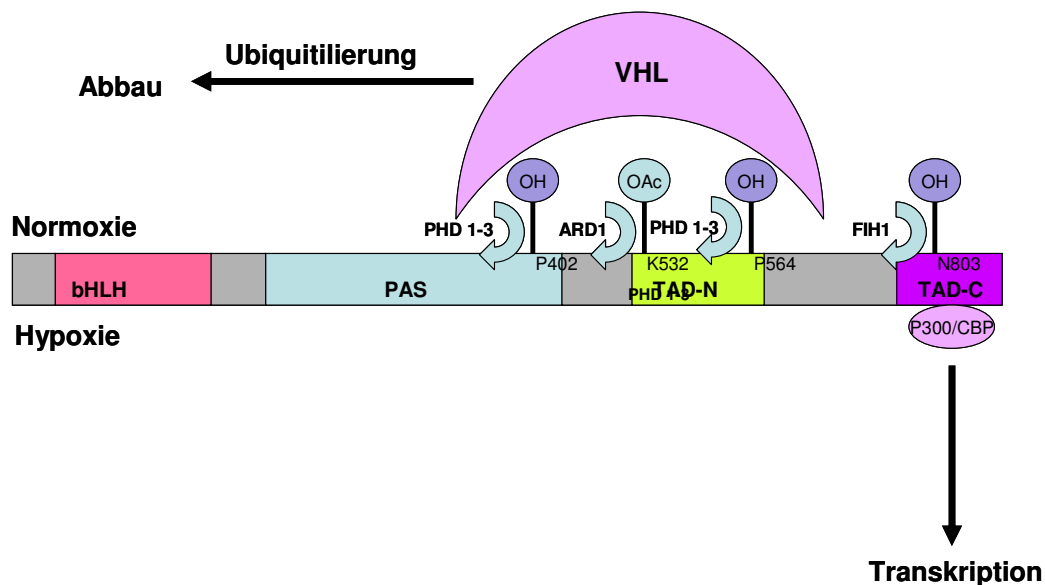


Abb. 2: Der Sauerstoff-abhängige Abbau von HIF-1

Modifiziert nach Hitchon et al. 2004

Der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 wird bereits bei relativ moderater Hypoxie ($<1-3\% \text{ O}_2 \approx 7-21 \text{ mmHg pO}_2$) aktiviert. Dagegen treten antiproliferative Hypoxieeffekte wie reduziertes Zellwachstum, die Induktion von Apoptose oder von Zellzyklusarrest bei den meisten Tumorzellen erst bei deutlich ausgeprägterer Hypoxie ($< 0,5-0,1\% \text{ O}_2$) auf (Jiang et al., 1996; Wenger et al., 1998; Höckel and Vaupel, 2001).

Zu den HIF-1-induzierten Genen gehören unter anderem die membranständigen Glucosetransporter GLUT-1 und GLUT-3, die unter Hypoxie hochreguliert werden und damit die Glucoseaufnahme hypoxischer Zellen steigern (Lin et al., 2000). Schlüsselenzyme der anaeroben Glykolyse wie Aldolase A, Glycerinaldehyd-3-phosphatase, Dehydrogenase, Hexokinase 1 + 2, Lactatdehydrogenase A und Phosphofruktokinase werden ebenfalls hochreguliert und damit der Energiestoffwechsel auf anaerobe Glykolyse umgestellt (Harris, 2002; Gatenby and Gillies, 2004). Dieser so genannte Warburg-Effekt, die gesteigerte Glykolyse auch unter anaeroben Bedingungen, ist ein Kennzeichen maligner Zellen und wird mittlerweile als Folge der konstitutiv erhöhten HIF-1-Aktivität in Tumoren interpretiert (Gatenby and Gillies, 2004). Andere Hypoxie-regulierte

1. Einleitung

Gene sind der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und VEGF-Rezeptor, Erythropoietin (EPO), PDGF, Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 und Cyclooxygenase 1 (COX1) (Forsythe et al., 1996; Carmeliet et al., 1998; Bazan et al., 2002; Sivridis et al., 2002; Weinmann et al., 2002), also Gene die zur besseren Vaskularisierung bzw. Verbesserung der Sauerstofftransportkapazität beitragen (Maxwell et al., 1997; Ryan et al., 1998; Pugh and Ratcliffe, 2003).

HIF1 ist also ein zentrales Molekül der hypoxischen Anpassung und verantwortlich für die meisten Hypoxie-getriggerten Malignitätsfaktoren. Durch die Hemmung von HIF1 lässt sich die Wirksamkeit antineoplastischer Therapien deutlich steigern (Cairns et al. 2008, Yasui et al. 2007).

1.7. YC-1, ein HIF1 α -Inhibitor

YC-1, 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole, wurde ursprünglich als vasoaktive Substanz zur Behandlung von Hypertonie entwickelt (Galle et al., 1999).

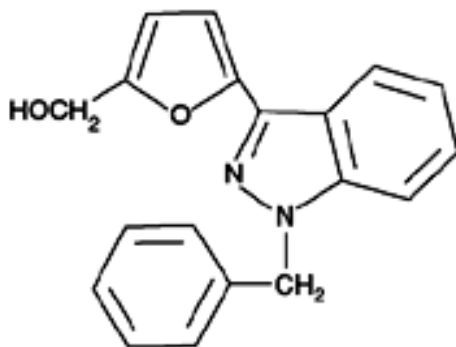


Abb. 3: 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole

YC-1 hemmt auch die Plättchen-Aggregation (Teng et al., 1997) über ein neues pharmakologisches Prinzip, das zur Verbesserung der Therapie cardiovascularer Erkrankungen beitragen kann. In Thrombozyten wie in glatter Muskulatur aktiviert YC-1 die lösliche Guanylatzyklase und erhöht dadurch den intrazellulären cGMP-Spiegel. Diese Effekte erinnern stark an die

Wirkungsweise von NO-Donoren wie beispielsweise Nitroglycerin, sind aber tatsächlich Stickstoff-unabhängig. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings noch immer unklar. Eine koreanische Arbeitsgruppe des Seoul National University College of Medicine unter Leitung von Jong-Wan Park veröffentlichte 2000 zuerst die antineoplastischen Eigenschaften des Stoffes. Sie stellten die Frage, ob die NO-ähnlichen Eigenschaften von YC-1 auch auf die Hemmung der HIF-1-gesteuerten Anpassung an hypoxische Bedingungen über-

1. Einleitung

tragbar seien. YC-1 hemmte im Versuch die Expression von HIF-1 α auf posttranskriptionaler Ebene und reduzierte die Menge an zellulär exprimierter mRNA von EPO und VEGF in hypoxischen Zellen (Yeo et al., 2003). Es reduziert auch die DNA-Bindungsaktivität und die Aktivität von HIF-1 als Transkriptionsfaktor (Chun et al., 2003). YC-1 ist ein kleines, stark unpolares Molekül, das auf Grund seiner Größe und seiner Hydrophobizität leicht in den Nukleus translozieren kann, wo es dann an HRE-Konsensussequenzen der DNA bindet und so die Transkription von HIF1 und HIF1-abhängigen Proteinen verhindert. Im Tierversuch zeigen mit YC-1 behandelte Tumoren weniger Vaskularität und eine geringere Konzentration sowohl an HIF-1 als auch an HIF-abhängigen Proteinen wie VEGF, Aldolase A und Enolase 1 (Yeo et al., 2003). Außerdem verringert YC-1 die Metastasierung von Lebercarcinomen (Shin et al., 2007). YC-1 scheint das Tumorstadium zum einen durch Hemmung der Angiogenese, zum anderen durch Erschwerung der Anpassung an Hypoxie zu bremsen. Es bleibt abzuwarten, ob YC-1 insbesondere in Kombination mit anerkannten Behandlungsmethoden wie Zytostatika-Therapie oder Bestrahlung zu einer weiteren Therapieoptimierung beitragen kann.

2. Fragestellung

2. Fragestellung

Unter hypoxischen Bedingungen wird in Tumorzellen eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aktiviert, die eine breite Palette kompensatorischer Anpassungsleistungen auf Hypoxie vermitteln und in deren Zentrum HIF-1 steht. HIF-1 kommt in fast allen Zellen vor und ist ein Dimer, dessen einer Teil, HIF-1 α , weitgehend exklusiv durch Hypoxie aktiviert wird. Die HIF-1 α vermittelte Geninduktion ist ein Schlüsselereignis der Tumorangiogenese, führt aber auch zur Anpassung an die Sauerstoffverknappung durch Hochregulation von Enzymen der Glykolyse und Umschaltung auf anaeroben Stoffwechsel. HIF-1 α ist vermutlich direkt in die Regulation Apoptose-relevanter Proteine involviert, man geht von einer kausalen Bedeutung von HIF-1 α für Tumorprogression und Metastasierung aus.

YC-1 (*3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole*) hemmt in neueren Untersuchungen die HIF-1 α Aktivität *in vitro* und *in vivo*. YC-1 zeigt *in vivo* antiangiogenetische Wirksamkeit und führt zu verzögertem Tumorwachstum.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, zu untersuchen, ob durch selektive Hemmung von HIF-1 die Anpassung an hypoxische Umgebungsbedingungen soweit unterbunden werden kann, dass es zum vermehrten Zelltod und damit zu einer Verbesserung der Prognose stark HIF-exprimierender Tumoren kommen kann. Weiterhin wurde untersucht, ob die beschriebene HIF-1 antagonisierende Wirkung von YC-1 eine tatsächliche klinische Relevanz hat, ob also die antineoplastische Wirksamkeit von YC-1 mit seiner Hemmwirkung auf die Hypoxie-induzierte Aktivierung von HIF-1 korreliert und in wie weit diese pharmakologische Hemmung von HIF-1 eine Auswirkung auf die Hypoxietoleranz von Tumorzellen im Hinblick auf Tumorwachstum, Apoptoseresistenz und klonogenes Überleben hat. Weiterhin sollte analysiert werden, ob YC-1 die Hypoxietoleranz von Tumorzellen verändert und radioresistente Zellen gegenüber der Wirkung ionisierender Strahlung zu sensibilisieren vermag.

3. Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Reagenzien

Ampicillin	Sigma, Deidenhofen, Deutschland
Aprotinin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Deidenhofen, Deutschland
BSA (10 µg/µl)	New England Biolabs, Schwalbach/T, Deutschland
CCCP	Sigma, Deidenhofen, Deutschland
DMSO (für Zellkultur)	Sigma, Deidenhofen, Deutschland
Fetales Kälberserum	Gibco BRL/Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Ficoll (Biocoll), d=1,077 g/l	Biochrome- Seromed, Berlin, Deutschland
Gel 30 (30%-ige AA/BisAA-Lösung, 37,5:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Genicitin (G418)	Gibco BRL/Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Hoechst 33342	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Leupeptin	Sigma, Deidenhofen, Deutschland
Mowiol	Sigma, Deidenhofen, Deutschland
PHA	Sigma, Deidenhofen, Deutschland
Ponceau-S-Lösung	Sigma, Deidenhofen, Deutschland
Propidiumiodid	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Proteinmarker für SDS-PAGE	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Protein-Farbstoffkonzentrat	BioRad, München, Deutschland
RPMI 1640 (100 mg/l Ca(NO ₃) ₂ , 400 mg/l KCl, 100 g/l MgSO ₄ , 6 g/l NaCl, 2 g/l NaHCO ₃ , 800 g/l Na ₂ HPO ₄)	Gibco BRL/Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
SDS-Laufpuffer	BioRad, München, Deutschland
TBE-Puffer, 5x	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3. Material und Methoden

TMRE	Molecular Probes, Mobitech
YC-1 [3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl) - Alexis Biochemicals 1-benzylindazole]	
zVAD-FMK	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deidenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.1.2. Puffer und Lösungen

PBS:	8,0 g/l NaCl, 1,5 g/l Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ pH 7,4-7,6
TBS:	150 mM NaCl, 10 mM Tris ad 1000 ml dest. Wasser, pH 8,0
TBS-Triton:	TBS + 0,02 % (v/v) Triton X-100

3.1.3. Antikörper und Liganden

Primärantikörper (Western-Blots)

rabbit-anti- β Aktin, 1:5000	Sigma, Deidenhofen, Deutschland
rabbit-anti-Akt/-Phospho-Akt, 1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
rabbit-anti-Bad/-Phospho-Bad, 1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
rabbit-anti-Bak, 1:1000	BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland
rabbit-anti-Bax, 1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
mouse-anti-Bcl-2, 1:5000	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
rabbit-anti Bcl-xl, 1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
rabbit-anti-Bid, 1:1000	R&D
rabbit-anti-Bim, 1:1000	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
mouse-anti-CDK4, 1:2000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
rabbit-anti-CyclinD1, 1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland

3. Material und Methoden

rabbit-anti-Foxo, 1:2500	Sigma, Deidenhofen, Deutschland
rabbit-anti-Phospho-Foxo, 1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
rabbit-anti-Glut1, 1:1000	RDI
goat-anti-Hexokinase2, 1:500	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
mouse-anti-HIF-1, 1:500	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
mouse-anti-p21 Waf1/Cip1 DCS60, 1:2000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
rabbit-anti-p27, 1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
rabbit-anti-PARP, 1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
rabbit-anti-cleaved-PARP, 1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
rabbit-anti-pRb, 1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, Deutschland
mouse-anti-X-iap, 1:250	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

Sekundärantikörper (Western-Blots)

anti-mouse, AP-konjugiert, 1:2000	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-rabbit, AP-konjugiert, 1 :2000	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-goat, AP-konjugiert, 1 :2000	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

3.1.4. Zelllinien

Jurkat-E6-T-Zell-Lymphom Zellen und NCI-H460- Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC), Bethesda, MD, USA bezogen. Bcl-2-überexprimierende Jurkat-Zellen und die respektiven Vektorkontrollzellen (Jurkat-V) waren etablierte Zellreihen der Arbeitsgruppe (Handrick et al. 2005).

Die hypoxische Selektion wurde in der humanen Lungen-Adenokarzinomlinie NCI H 460 erreicht (Weinmann et al. 2004), die Versuche wurden in etablierten Zellreihen der Arbeitsgruppe durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1.5. Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen	Greiner, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier Whatman 3 MM	Roth, Karlsruhe, Deutschland
GasPak-Anaerobier-Pouch	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kopierfolien	Xerox, Neuss, Deutschland
0,4 cm-Küvetten	BioRad, München, Deutschland
Methylenblau Indikator Streifen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
1,5 ml- und 2ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hyperfilm® ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Röntgenfilm	Kodak, Jahnsdorf, Deutschland
15 ml/50 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner, Essen, Deutschland

3.1.6. Geräte

Bestrahlungsgerät LINAC SL 25, Phillips	Elekta/ Phillips, Hamburg, Deutschland
ELISA-Reader Anthos 2010 plate reader,	Anthos, Krefeld, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert200	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Photometrix SensysCam Kamerasystem	Photometrix, Kew, Australien
4054 UV-VIS-Spectrophotometer	LKB Biochrom/Pharmacia
Ultraspec P	Biosystems, Cambridge, UK
Konfokales Laser Scan Mikroskop Leica	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
TCS NT	
FACS Calibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

3. Material und Methoden

Dekonvolution: MetaMorphs, Visitron Systems GmbH.	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland
Sequi-Gen GT Sequencing Cell	BioRad, München, Deutschland
Trans-Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München, Deutschland
Elektroporator Gene Pulser [®] II	BioRad, München, Deutschland
SDS-Gelelektrophoresekammer	Whatmann Biometra, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotanta RPC Laborzentrifuge (für Zellkultur)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Sorvall [®] SUPER T21, Rotor SL-50T (für DNA-Aufreinigung)	Kendro GmbH, Langenselbold, Deutschland
Zellkulturtank 35 VHC	Taylor-Wharton, Husum, Deutschland
Gas Pak 100 Hypoxie-Kammer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Hypoxie-Brutschrank Heraeus C42	Heraeus, Hanau, Deutschland
Schüttler	Whatmann Biometra, Göttingen, Deutschland

3. Material und Methoden

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Die Zellen wurden routinemäßig in 75 ml-Zellkulturflaschen mit Filterdeckel bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640 ohne Antibiotika verwendet, dem 10% FCS zugesetzt wurde.

3.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren von Zellen erfolgte bei -80°C. Zunächst wurden die Zellen für 4 min. bei 1200U/min in Raumtemperatur zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 1ml Einfriermedium (70% RPMI 1640, 20% FCS, 10% DMSO) pro 1-2 Millionen Zellen resuspendiert und in Einfriereröhrchen überführt (1-1,5 ml pro tube). Die Zellen wurden dann in einem verstellbaren Gestell im Zellkulturtank 35 VHC (Taylor-Wharton) stufenweise eingefroren, bevor sie schließlich im flüssigen Stickstoff gelagert wurden.

Kryokonservierte Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut bis sie 0°C erreichten. Zur Entfernung von DMSO wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dazu wurden die Zellen im DMSO-haltigen Medium abzentrifugiert, in PBS aufgenommen, resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Zur Anzucht wurden sie für die ersten 48 Stunden bis zum ersten splitting in Vollmedium mit 20% FCS aufgenommen. Nach der Erholungsphase der Zellen nach dem Auftauen wurden sie schließlich wie unter 3.2.1. vorbeschrieben weiter kultiviert.

3.2.3. Zellzahlbestimmung

Eine Neubauer-Zählkammer wurde mit Zellsuspension befüllt und in der üblichen Weise (4 mal 16 Quadrate, insgesamt 64 Quadrate) gezählt. Das Volumen innerhalb von 16 Quadraten entspricht 0,1 µl, daher wurde die durchschnittliche Zellzahl mit 10⁴ multipliziert, das Ergebnis als Zelldichte im

3. Material und Methoden

Medium/ml angegeben. Gezählt und verwendet wurden nur lebende Zellen (Kontrolle durch Trypan-Blau-Ausschlussfärbung).

3.2.4. Trypan-Blau-Ausschlussfärbung

Trypan-Blau ist ein Farbstoff, der durch seine negative Ladung spezifisch nur in Zellen penetrieren kann, deren inneres Membranpotential zusammengebrochen ist. Da das Membranpotential in lebenden Zellen aktiv aufrechterhalten werden muss, kann man davon ausgehen, dass gefärbte Zellen irreparabel beschädigt sind. Daher dient die Trypan-Blau-Färbung als Ausschlusskontrolle bei der Bestimmung lebender Zellen.

3.2.5. Zellkultur in Hypoxie

Für hypoxischen Stress (milde Hypoxie:= 1% O₂, starke Hypoxie:= ≤0,1% O₂) verwendeten wir unterschiedliche Methoden: Zur Erlangung moderater Hypoxie wurden die Zellkulturen in einem Hypoxie-Brutschrank (C42 Inkubator, Hereaus) einer ≈94% N₂/≈5% CO₂/1% O₂ Atmosphäre ausgesetzt. Als Hypoxieperiode definierten wir die Zeitspanne zwischen Schließen (t₀) und erneutem Öffnen des Inkubators. Nach einer Auswaschperiode von etwa 30 min. wurde nach Angabe des Herstellers die angestrebte Sauerstoffkonzentration erreicht.

Ausgeprägte Hypoxie wurde durch Inkubation in Hypoxie- Kammern erzeugt: In Gas Pak 100 Systemen oder, wenn unter hypoxischen Bedingungen bestrahlt wurde, in GasPak Anaerobier „Pouch“- Systemen. Der Beginn der Hypoxie-Periode (t₀) wurde hier ebenfalls als der Zeitpunkt des Verschließens der Boxen bzw. der Beutel definiert. Ausgeprägte Hypoxie war etwa nach 60 min. erreicht, was durch Farbumschlag eines Methylenblau Indikator Systems (Becton Dickinson) in der Kammer bzw. der Tüte angezeigt wurde. Die jeweiligen Kontrollzellen wurden unter normaler atmosphärischer Sauerstoffkonzentration (21%) in H₂O-gesättigter Luft mit 5% CO₂ (Brutschrank) gehalten.

3. Material und Methoden

3.2.6. Erzeugung von Hypoxie mittels Gas Pak Systemen

Ausgeprägte Hypoxie erreichten wir mit Hilfe der BBL Gas Pack Systeme der Firma Becton Dickinson. Dabei platzierten wir unsere Zellkulturflaschen zusammen mit einem BBL Gas Pack Plus Päckchen (bestehend aus Natriumborhydrid, Natriumbicarbonat und Zitronensäure, sowie Filterpapier und einem Palladium Katalysator) in einem luftdicht zu verschließendem Topf der BBL Gas Pack 100 Serie. Nach Angaben des Herstellers gaben wir Aqua dest. zu und stellten den verschlossenen Topf für die Dauer der Hypoxie in einen Zellkultur-Brutschrank.

3.2.7. Bestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit 6MV-Photonen an einem Linearbeschleuniger (SL25 Phillips) mit einer Dosisrate von 4 Gy/min bei Raumtemperatur. Für eine homogene Strahlendosis im Medium und um einen Aufbaueffekt zu verhindern, wurde unter die Zellkulturflaschen ein 10 cm dicker Epoxydharzblock platziert. Außerdem wurden die Zellen mit einem 1,5 cm dicken Epoxydharzblock von oben abgedeckt.

Für Bestrahlungen in Hypoxie wurden die Zellen 2h vor der Bestrahlung in ein GasPak Pouch System (Beckton Dickinson) mit ausgeprägt hypoxischer Atmosphäre (< 0,1% O₂) gesetzt. Die Zellen wurden bis zur weiteren Analyse in Hypoxie gehalten.

3.2.8. Analyse des HIF-1 Transkriptionsfaktors

Die Stabilisierung, nukleäre Translokation und DNA-Bindung von HIF-1 wurde mittels eines ELISA-basierten HIF-1 Transkriptionsfaktor-Kits (Active Motif, Rixensart, Belgium) quantifiziert.

Verwendete Puffer

Hypotoner Puffer:	20 mM HEPES pH 7,5, 5 mM NaF, 10 μ M Na ₂ MoO ₄ , 0,1 mM EDTA
Lyse Puffer I:	PBS (pH 7.5) + Phosphatase Inhibitor Puffer (PIB) (125

3. Material und Methoden

Lyse Puffer II: mM NaF, 250mM α -Glycerophosphat, 250 mM para-nitrophenyl Phosphat (PNPP), 25 mM NaVO₃
20 mM Hepes, pH 7,5, 400 mM NaCl, 20% Glycerol, 0,1 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 mM Na₂MoO₄, 1 mM NaVO₃, 10 mM PNPP, 10 mM α -Glycerophosphate, 0.1 M Dithiothreitol (DTT), 1% Protease Inhibitor Cocktail

3.2.9. Koloniebildungstests

Für die Koloniebildungstests wurden jeweils zwischen 40 und 4000 NCI H 460-Zellen in 6-Well-Platten oder Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bis zur Adhärenz der Zellen in Vollmedium inkubiert und dann mit der entsprechenden Dosis YC-1 (10-50 μ M) behandelt. Anschließend wurden die Platten im Zellkulturschrank unter normoxischen Bedingungen für mindestens 12 Tage inkubiert. Die Kolonien wurden mit Formaldehyd 3,7% fixiert und mit Kristallviolett gefärbt, getrocknet und alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen pro Plaque als „Kolonie-bildende Einheit“ (CFU für Colony Forming Unit) gezählt. Um den Einfluss ausgeprägter Hypoxie auf das klonogene Überleben nach Bestrahlung zu untersuchen, wurden die Platten nach 2 Stunden Inkubation mit YC-1 in Gas Pak-„Pouches“ transferiert. Nach 2 stündiger Inkubation in Hypoxie (< 0,1% O₂) wurden sie parallel zu normoxischen Kontrollen mit einer Einzeldosis von 2,5 bis 10 Gy bestrahlt. 48 Stunden nach Bestrahlung wurden die Zellen reoxygeniert.

3.2.10. Bestimmung des Zelltodes

Die Apoptoserate wurde, wenn nicht anders angegeben, unmittelbar nach den Hypoxieperioden ermittelt um Einflüsse durch Reoxygenierung auszuschließen. Der Einfluss der unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen auf die Wachstumsraten wurde nach entsprechender Exposition durch Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer nach Trypan-Blau-Färbung untersucht. Im Koloniebildungsassay waren die Zellen einer insgesamt 48 stündigen Hypoxieperiode unterworfen, zu deren Anfang sie bestrahlt wurden.

3. Material und Methoden

Spezifische Apoptose wurde wie folgt berechnet: $100 \times ([\text{Apoptose unter Experimentalbedingung (10Gy in 21\%O}_2 \text{ bzw. 0,1\% O}_2) (\%)] - \text{Spontanapoptose (0Gy in 21\%O}_2 \text{ bzw., 0,1\% O}_2) (\%)] / [100\% \times - \text{Spontanapoptose (0Gy in 21\%O}_2 \text{ bzw., 0,1\% O}_2) (\%)]$.

Fluoreszenzmikroskopie nach Hoechst 33342-Färbung:

Der Farbstoff Hoechst 33342 (Calbiochem) ist membrangängig und ermöglicht durch DNA-Färbung eine rasche morphologische Analyse z.B. der Kernveränderungen im Rahmen des Apoptoseprozesses. Nach Anregung des Farbstoffs mit einer Quecksilberlampe kann die Fluoreszenz unter Verwendung eines 380 nm-Filters detektiert werden. Zur Analyse wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS für 5-15 min bei Raumtemperatur im Medium mit 1 µg/ml des Hoechst-Farbstoffs und 0,5µg/ml Propidiumjodid inkubiert. Bei dieser Färbung bewirkt Propidiumjodid bei durch Nekrose geschädigter Membran in der Zelle einen Farbausschlag. In Kombination erlauben beide Stoffe eine klare Differenzierung von Nekrose zusätzlich zur morphologischen Analyse apoptotischer Zellen.

Die Zellen wurden anschließend manuell mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200 (Carl Zeiss) ausgezählt. Pro Gesichtsfeld wurden 100 Zellen gezählt, 2 Gesichtsfelder pro well, mindestens 3 wells pro Wert.

Durchflusszytometrie/Scattercharakteristik

Die Durchflusszytometrie wurde zur Analyse der Granularität und Größe einzelner Zellen eingesetzt. Aus dem in die Vorwärtsrichtung gestreuten Licht (FSC für **F**orward **S**catter) kann die Zellgröße durch Fluoreszenzeigenschaften abgeleitet werden; das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht (SSC für **S**ideward **S**catter) misst die Granularität. Da apoptotische Zellen in der Regel kleiner und granulärer sind als gesunde Zellen besteht die Möglichkeit, beide Zellpopulationen anhand der FSC- und SSC-Eigenschaften voneinander zu differenzieren und zu quantifizieren. Diese Methode wurde insbesondere bei den dafür geeigneten Jurkat-Lymphom-Zelllinien zur Quantifizierung der Apoptose genutzt.

$\Delta\Psi_m$ -Bestimmung

3. Material und Methoden

Zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ wurden die Zellen mit 25 nM TMRE (Molecular Probes, Mobitech) für 30-60 min bei 37°C inkubiert.

TMRE ist ein membranpermeabler potentialabhängiger Farbstoff, der nur in Zellen mit gesunden Mitochondrien mit intaktem Membranpotential innerhalb der Membran akkumuliert. Bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen, so wird der Farbstoff aus den Mitochondrien in das Cytosol ausgewaschen. Zellen mit intaktem mitochondrialen Stoffwechsel weisen somit eine höhere Fluoreszenzintensität auf, als Zellen in denen das mitochondriale Membranpotential zusammengebrochen ist.

Die Messung wurde in einem Histogramm durch Auftragung der bei bestimmter Fluoreszenzintensität im Kanal FL-2 detektierten Ereignisse dargestellt oder in einem Koordinatensystem ausgewertet, in dem FL-2 gegen SSC aufgetragen wurde.

Als Positivkontrolle dienten mit 1 μ M des Cyanid-Derivats CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon; Sigma) behandelte Zellen. CCCP entkoppelt die Atmungskette und führt so zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials.

DNA Fragmentierung

Die Messung der DNA-Fragmentierung im Flow-Cytometer ermöglicht sowohl eine Quantifizierung der Apoptoserate als auch eine quantitative Aussage der Zellzyklus- Stadien. Zur Messung wurden die Zellen zu 10^5 - 10^6 pro ml in Nicoletti-Färbelösung (0,1% NaCitrat mit 50 μ g/ml Propidiumjodid und 0,1% TritonX 100) aufgenommen und für 30-60 min bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und gemessen (Nicoletti et al. 1991). Die Messung wurde in einem Histogramm durch Auftragung der bei bestimmter Fluoreszenzintensität im Kanal FL-2 detektierten Ereignisse dargestellt oder in einem Koordinatensystem ausgewertet, in dem FL-2 gegen SSC aufgetragen wurde.

3. Material und Methoden

3.2.11. Western-Blot-Analyse

Zum Nachweis der Aktivierung von Caspase 3, 8 und 9, der Spaltung von PARP, sowie der Expression von Akt, Phospho-Akt, Bad, Phospho-Bad, Bid, Bim, Bak, Bax und Bcl-2, Bcl-xL, CDK4, Cyclin D1, Foxo-3a, Phospho-Foxo, p21, p27, pRb und X-iap wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen lysiert, per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des jeweiligen spezifischen Erstantikörpers und einem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper, an den die alkalische Phosphatase (AP) oder Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Nach Zugabe einer Substratlösung (H₂O₂ plus Chloronaphthol) wird bei Umsetzung des Substrats Licht emittiert, welches auf einem Röntgenfilm als Schwärzung in Form von Banden nachgewiesen werden kann.

Herstellung von Lysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen bei 500 x g sedimentiert und in eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurde das Zellpellet zu je 2 x 10⁶ Zellen in 200 µl SDS-Lysepuffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Gemisch bei 95°C mit Probenpuffer für 5 min aufgekocht und für die Versuche direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der vertikalen diskontinuierlichen SDS-PAGE (**Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese**) werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt: Um die Trennung zu optimieren, wurde über dem Trenngel ein 4,5%-iges Sammelgel gegossen, durch das die Proteine schnell wandern und sich in der Grenzschicht zwischen Trenn- und Sammelgel konzentrieren, bevor sie im 10-14%-igem Trenngel aufgetrennt werden.

Zusammensetzung der Gele (Angaben pro Gel):

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12%	14%	

3. Material und Methoden

bidest. Wasser	6,25 ml	5,25 ml	4,25 ml	3,00 ml
Trennpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	–
Sammelpuffer	–	–	–	1,25 ml
Gel 30	5,00 ml	6,00 ml	7,00 ml	0,75 ml
APS, 10% w/v	75 µl	75 µl	75 µl	50 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	5 µl
SDS, 20% w/v	75 µl	75 µl	75 µl	–

10% Gele wurden für Proteine der Größe 20 kDa bis 300 kDa verwendet, 12% Gele für 10 kDa bis 200 kDa und 14% Gele für 3 kDa bis 100 kDa.

Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Multigel-Long Kammer (Biometra) zunächst bei 60V, (im Sammelgel) und dann bei 160V (im Trenngel). Als Puffer diente SDS-Laufpuffer.

Detektion der Proteine

Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF Membran (Amersham Pharmacia Biotech) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte in einer Trans-Blot[®] *Electrophoretic Transfer*-Zelle (BioRad) im Transferpuffer bei 80V über 1 Stunde.

Um freie Bindungsstellen abzudecken, wurde die Membran für 1 Stunde in der Blocklösung inkubiert. Dann wurde die Membran über Nacht in einer Blocklösung mit dem Erstantikörper bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde nachfolgend zweimal für je 10 min. und dreimal für je 5 min. in einer TBS-Tween-Lösung gewaschen, bevor sie für weitere 60 min in einer Blocklösung (TBS Puffer mit 5% „low fat“ Milchpulver oder in TBS Puffer mit 0,05% Tween 20/ 5% FCS) zusammen mit dem AP-konjugierten oder HRP-konjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Schließlich wurde die Membran wieder zweimal für je 10 min. und dreimal für je 5 min. in einer TBS-Tween-Lösung gewaschen, bevor sie 5 min lang in Substratlösung inkubiert wurde. Zur Entwicklung wurde die Membran dann in einer Filmkassette zwischen zwei Folien glattgestrichen und ein Film (Hyperfilm[®] ECL Filmmaterial, Amersham Pharmacia Biotech) auf die Membran platziert.

3. Material und Methoden

Durch anschließende Färbung der Membran für 5 min. mit Coomassie-Blue-Lösung (Sigma) (0,2% in bidest. Wasser verdünnt) wurden eine gleichmäßige Proteinauftragung und ein gleichmäßiger Proteintransfer überprüft.

Verwendete Puffer und Lösungen

Blocklösung:	TBS + 0,05% (v/v) Tween + 5% (v/v) FCS
SDS-Lysepuffer:	125 mM NaCl, 25 mM HEPES, 10 mM NaF, 10 mM Natrium-pyrophosphat, 10 mM EDTA, 1,0% (v/v) Triton X-100, 0,5% (w/v) Desoxycholat, 0,1% (w/v) SDS Der Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt und vor Gebrauch wurden pro 1 ml Puffer 20 µl DTT Aprotinin/Leupeptin (je 5 mg/ml) hinzugefügt.
SDS-Probenpuffer:	2 ml Glycerin, 2 ml SDS, 10%, 0,025 g Bromphenolblau, 2,5 ml Sammelpuffer, ad 10 ml bidest. Wasser
SDS-Sammelpuffer:	60,6 g/l Tris, 0,4% SDS auf pH 6,8 mit HCl eingestellt.
SDS-Trennpuffer:	18,17 g/l Tris, 0,4% SDS auf pH 8,8 mit HCl eingestellt
SDS-Laufpuffer	0,025 M Tris; 0,192 M Glycin, 0,15% SDS
Transferpuffer	192 mM Glycin, 25 mM TRIS, 0,1% (w/v) SDS, 10% (v/v) Methanol; pH 8,3
TBS-Tween:	TBS + 0,05% (v/v) Tween

4. Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1. Wirkung von YC-1 auf die Expression von HIF-1 und HIF-1-regulierten Proteinen

4.1.1. Wirkung von YC-1 auf die Hypoxie-induzierte Aktivierung von HIF

Auf Grund seiner zentralen Rolle bei der zellulären Anpassung an hypoxische Bedingungen wurde zunächst die Hypoxie-vermittelte Hochregulation von HIF und dessen Hemmung durch YC-1 untersucht. Da HIF-1 aus zwei Untereinheiten besteht, von denen nur eine direkt durch Hypoxie reguliert wird, untersuchten wir die Wirkung von YC-1 auf die Expression des Hypoxie-regulierten Anteils, HIF-1 α , am Modell der NCI-H460 Adenocarcinom Zellen.

Der Protein-Nachweis wurde mittels Western Blot Analyse geführt. Wie erwartet wurde zeigte sich, dass in NCI-H460 Zellen HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen kaum exprimiert war, aber durch Hypoxie stark induziert wurde (Vgl. Abb. 4; Bahnen 1 und 6). Dieser Effekt wurde durch YC-1 Zugabe teilweise aufgehoben (Abb. 4; Bahnen 8 bis 10). Der Effekt verstärkte sich mit steigender YC-1 Konzentration bis zur fast vollständigen Hemmung der HIF-1 Induktion unter Behandlung mit 50 μ M YC-1 (Abb. 4; Bahn 10).

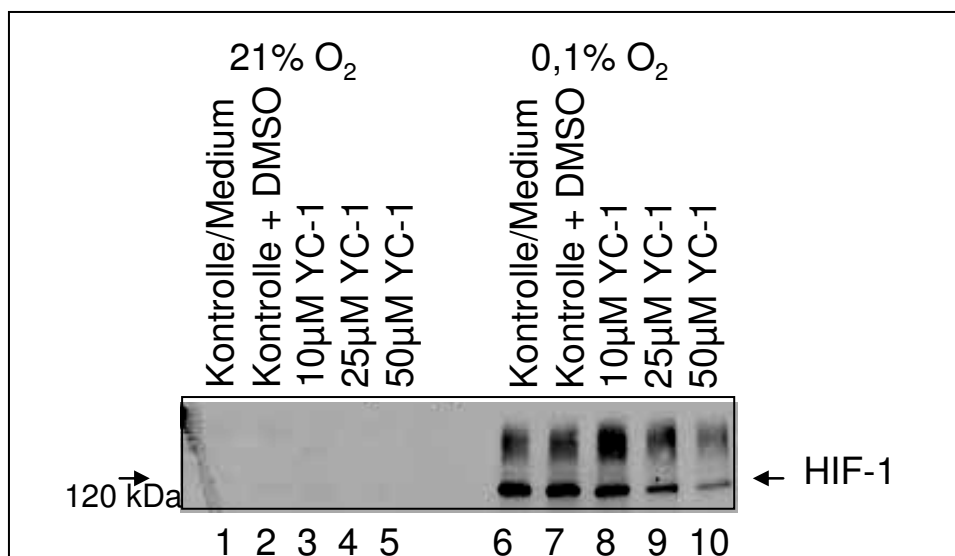


Abb. 4: Effekt von YC-1 auf die Hypoxie-induzierte Aktivierung von HIF-1

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (aus n=3) mit anti-HIF-1 Antikörper unter Verwendung von Lysaten von NCI-H460 Adenocarcinom-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden unter normoxischen bzw. stark hypoxischen (0,1% O₂) Bedingungen in Gegenwart von YC-1 und 0,1% DMSO inkubiert, die Zugabe von YC-1 erfolgte 2 Stunden vor Hypoxie-Induktion. Man erkennt die deutliche Induktion von HIF-1 unter hypoxischen Bedingungen und dessen Hemmung durch steigende Dosen YC-1.

4.1.2. Wirkung von YC1 auf die Expression von Glut-1

Nach dem Nachweis der direkten Wirkung von YC1 auf den Hypoxia inducible Factor 1 (HIF-1) untersuchten wir auch dessen Wirkung auf die Hypoxie-induzierte Expression HIF-1-abhängiger Proteine am Beispiel des Glukosetransporters Glut-1. Glut-1 (Glucosetransporter vom Typ I) ist ein nicht insulin-abhängiger membranständiger Glucosetransporter der ubiquitär vorhanden ist. Unter Energieverbrauch transportiert Glut-1 Glucose vom Extrazellulärraum durch die Zellmembran in die Zelle wo sie zum weiteren Verbrauch zur Verfügung steht. Glut-1 wird unter Hypoxie vermehrt exprimiert und gilt als Zielgen von HIF-1, wird also bei erhöhter HIF-Aktivität ebenfalls vermehrt exprimiert.

Wie auch HIF-1 zeigte Glut-1 im Western Blot eine deutliche Zunahme in hypoxischen gegenüber in normaler Kultur gehaltenen Zellen (Vgl. Abb. 5; Bahnen 1 und 6). Dieser Hypoxie-induzierte Anstieg ließ sich durch Gabe von YC-1 deutlich reduzieren, mit der Höchstdosis von 50µM YC-1 erreichte man etwa das Glut-1 Niveau unbehandelter Zellen (Abb. 5; Bahnen 6 bis 8).

4. Ergebnisse

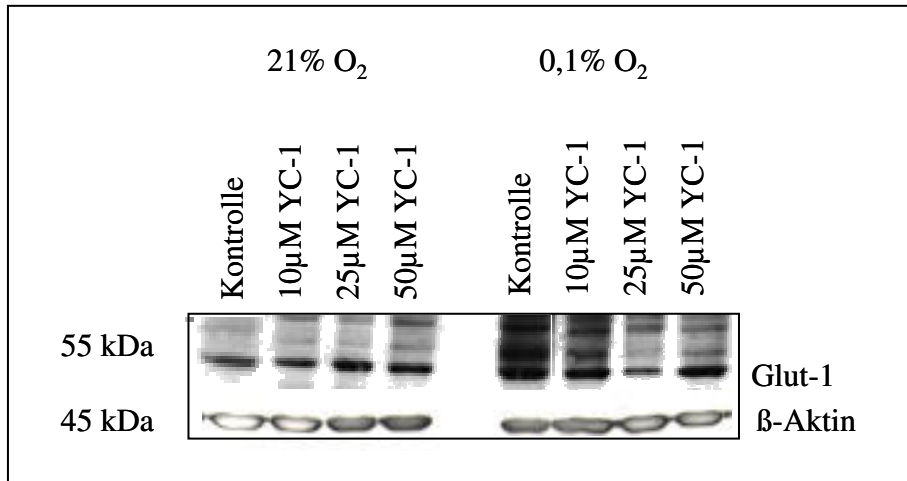


Abb. 5: Effekt von YC-1 auf die Hypoxie-induzierte Aktivierung von Glut-1

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (aus n=3) mit anti-Glut-1 Antikörper in NCI-H460 Adenocarcinom-Zellen nach 24 Stunden Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) in Gegenwart von YC-1 und 0,1% DMSO (solvent Kontrolle). Man erkennt die deutliche Induktion von Glut-1 unter hypoxischen Bedingungen und dessen Hemmung durch steigende Dosen YC-1. β-Aktin dient als Ladekontrolle.

4.2. Wirkung von YC-1 auf Tumorzelllinien

4.2.1. Wirkung der relativen O₂-Konzentration auf das Zellwachstum

Die vorausgehenden Untersuchungen zeigten, dass die eingesetzten Hypoxie-Bedingungen zu erhöhten Proteinmengen von HIF-1 führten und dass dieses HIF-1 auch physiologisch aktiv war und zur vermehrten Expression konsekutiv gesteuerter Proteinen wie Glut-1 führte. Um die Ausgangsbedingungen für die Inhibitorversuche zu ermitteln, untersuchten wir zunächst das Verhalten von Tumorzellen in Kultur bezüglich Proliferation, Zellzyklus und Zellüberleben unter normoxischen gegen stark hypoxische Bedingungen. In beiden Zelllinien hemmte Hypoxie effektiv das Wachstum der Zellen und induzierte in Abhängigkeit von Zelltyp und Sauerstoffkonzentration Zelltod (Vgl. Abb. 6 und 7).

4. Ergebnisse

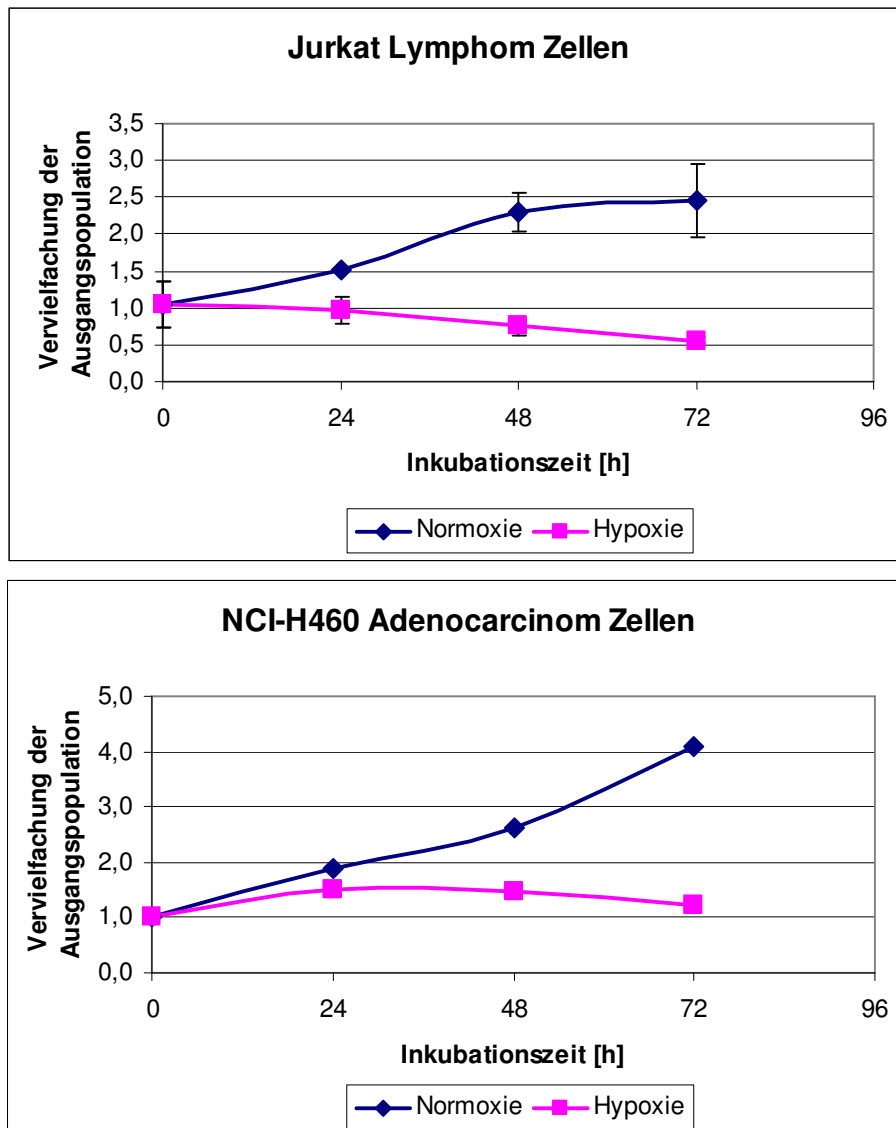


Abb. 6, 7: relatives Wachstum von Jurkat-Lymphom Zellen und NCI-H460 Adenocarcinom Zellen in Abhängigkeit der relativen O₂-Konzentration.

Die Daten Zahl der lebenden Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden wurde mittels Trypan-Blau-Färbung und Zellzählung in Neubauer Zählkammern erfasst. Um das Wachstum im Vergleich zum Wachstum der unbehandelten Kontrolle zu ermitteln wurden die Absolutwerte ins Verhältnis zum Wachstum der Kontrollzellen nach 24 h gesetzt. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei n=3. Normoxische Bedingungen vs. stark hypoxische Bedingungen (0,1% O₂).

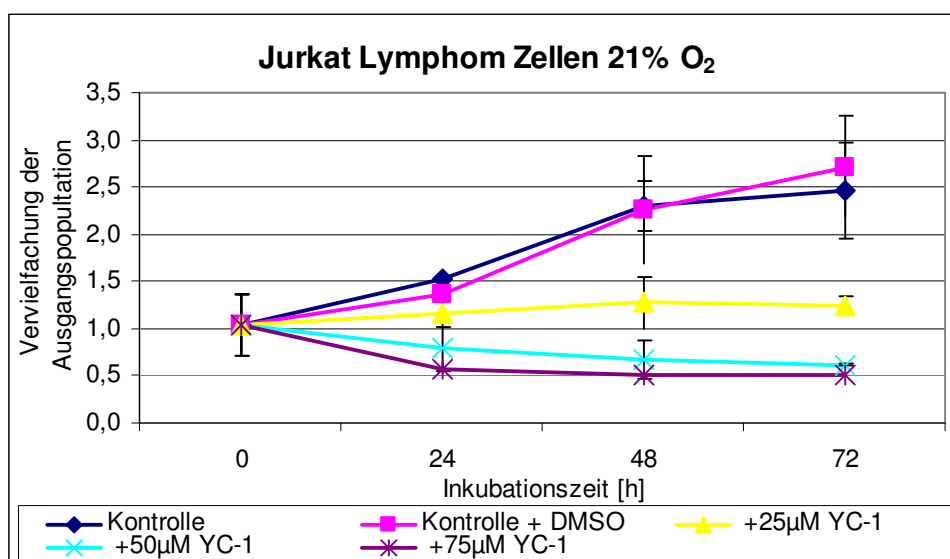
4. Ergebnisse

4.2.2. Wirkung von YC-1 auf die Zellproliferation unter Normoxie und Hypoxie

Um die Auswirkungen einer Behandlung mit YC-1 auf das Wachstum verschiedener Tumorzelllinien zu ermitteln wurden diese Zellen in geeignetem Nährmedium unter Zugabe von YC-1 bis zu 3 Tage lang inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde außerdem unter Entzug von Sauerstoff, in einer Atmosphäre mit nur 0,1% O₂, gehalten um neben dem direkten Effekt von Hypoxie auf Zellen auch die Auswirkung von YC-1 auf hypoxische Zellen zu untersuchen. Jurkat Lymphom-Zellen wurden direkt mit YC-1 behandelt und nach zwei Stunden Inkubation in Hypoxie gebracht. Die Auswertung wurde nach 24/ 48/ 72h Hypoxie mittels Trypanblau-Färbung durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass Jurkat Lymphom-Zellen unbehandelt in Normoxie annähernd exponentiell wuchsen, mit einer Verdopplungszeit von etwas weniger als zwei Tagen. In Normoxie führte YC-1 in geringeren Konzentrationen (bis 25µM) zu einer Verlangsamung des Zellwachstums bis zur Stase, bei höheren Dosen (50µM) überwogen die zytotoxischen Effekte, die Zellzahl nahm effektiv ab (Vgl. Abb. 8 a)).

In Hypoxie ließ sich in Jurkat Lymphom Zellen durch YC-1 in steigender Dosierung eine Beschleunigung des effektiven Zelluntergangs gegenüber der Ausgangszahl erreichen. Allerdings führte Hypoxie alleine bereits zur kompletten Hemmung der Proliferation (Abb. 8 b))



4. Ergebnisse

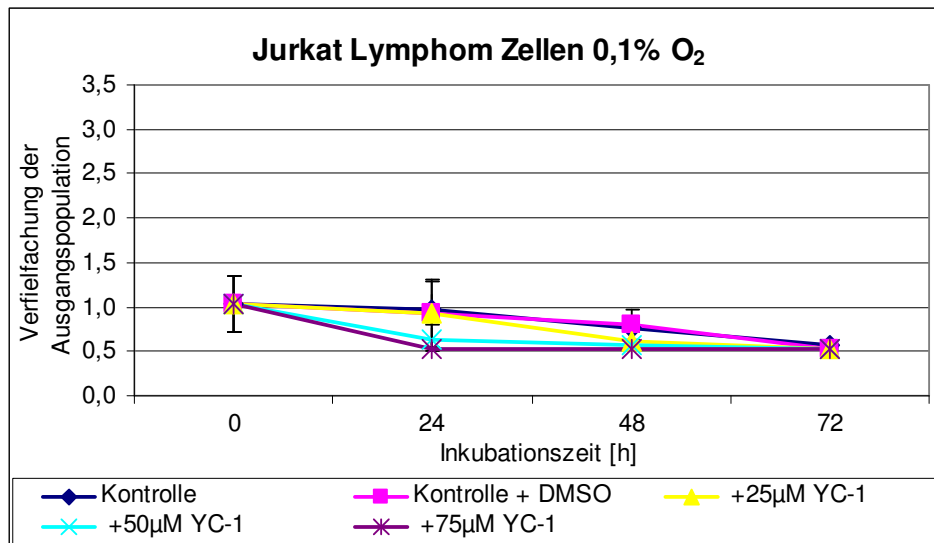


Abb. 8a) und b): relatives Wachstum von Jurkat-Lymphom Zellen in Anwesenheit von YC-1 in Normoxie (a) und starker Hypoxie (b).

Jurkat-Lymphom Zellen wurden mit 0, 25, 50 oder 75µM YC-1 behandelt und nach 24, 48 oder 72 Stunden mittels Zellzählung in Neubauer Zählkammern ausgewertet. Um das Wachstum im Vergleich zum Wachstum der unbehandelten Kontrolle zu ermitteln wurden die Absolutwerte ins Verhältnis zum Wachstum der Kontrollzellen nach 24 h gesetzt. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei $n=3$.

Unbehandelt in Normoxie wuchsen NCI-H460 Lungen Adenocarcinom Zellen ebenfalls annähernd exponentiell. Durch Zugabe von YC-1 ließen sich vergleichbare Effekte wie auch schon bei Jurkat Lymphom Zellen erzielen. Auch hier führten geringere Konzentrationen zu verlangsamtem Zellwachstum, größere Mengen YC-1 dagegen verringerten die Gesamtzellzahl. NCI-H460-Adenocarcinom Zellen schienen gegenüber YC-1 allerdings eher etwas resistenter zu sein als Jurkat Lymphom Zellen. Das Zellwachstum war hier in Normoxie wie in Hypoxie weniger stark beeinträchtigt (Vgl. Abb. 9 a) und b)).

In NHI-H460 Adenocarcinom-Zellen in Hypoxie verlangsamte YC-1 das Zellwachstum ebenfalls deutlich, nach einer Inkubationszeit von über 24h kam es zum effektiven Zelluntergang. Hier schien jedoch zumindest in geringeren Dosen ein zytostatischer Effekt von YC-1 zu überwiegen (Abb. 9 b)).

4. Ergebnisse

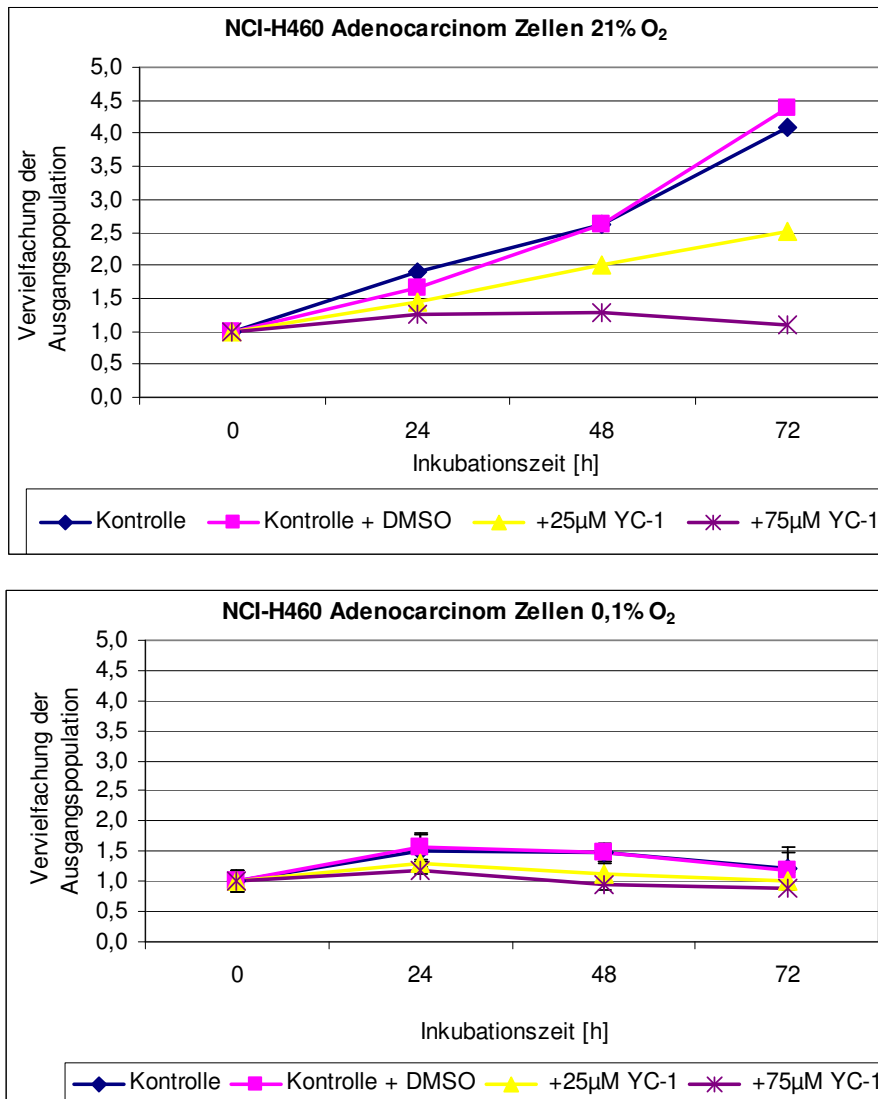


Abb. 9 a) und b): relatives Wachstum von NCI-H460 Adenocarcinom Zellen in Normoxie (a) und starker Hypoxie (b) in Anwesenheit von YC-1

NCI-H460 Adenocarcinom Zellen wurden nach 24h Anwachsphase mit verschiedenen Konzentrationen YC-1 stimuliert, mit 0, 25, 50 oder 75µM YC-1 behandelt, nach 2 Stunden wurde mittels Gas Pak Pouches starke Hypoxie erzeugt und nach weiteren 2 Stunden wurden die Zellen bestrahlt. Nach 24, 48 oder 72 Stunden erfolgte die Zellzählung in Neubauer Zählkammern. Um das Wachstum im Vergleich zum Wachstum der unbehandelten Kontrolle zu ermitteln wurden die Absolutwerte ins Verhältnis zum Wachstum der Kontrollzellen nach 24 h gesetzt. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei n=3.

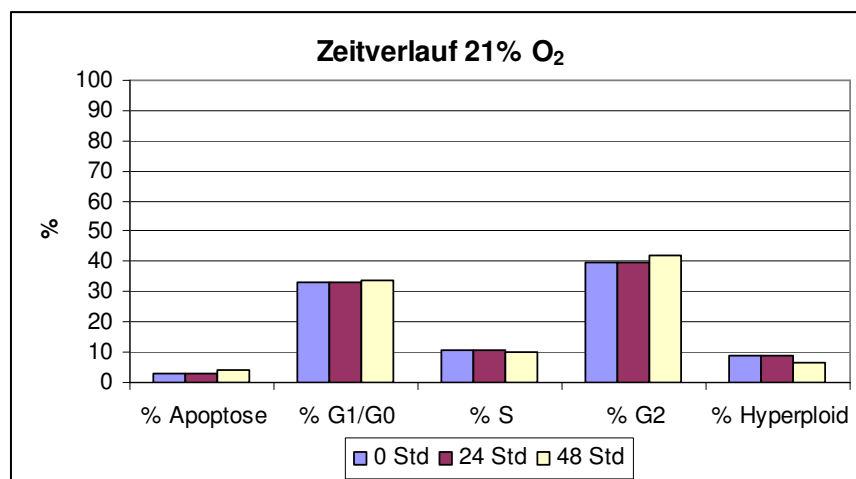
4. Ergebnisse

4.2.3. Wirkung von YC-1 auf den Zellzyklus unter Normoxie und Hypoxie

Das Durchlaufen des Zellzyklus ist ein engmaschig kontrollierter Prozess. Sind diese Kontrollmechanismen gestört, wie es häufig bei Tumorzellen zu beobachten ist, kommt es zu unkontrolliertem Wachstum.

Zur Messung des phasenhaften Verlaufs des Zellzyklus in Tumorzellen und der Auswirkungen von Hypoxie auf der einen und YC-1 auf der anderen Seite wurden Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach 24h Anwuchsphase mit verschiedenen Konzentrationen YC-1 stimuliert, nach 2 Stunden wurde mittels Gas Pak Pouches starke Hypoxie erzeugt und nach weiteren 2 Stunden wurden die Zellen bestrahlt. Die Auswertung erfolgte nach 24 bzw. 48 Stunden Hypoxie.

Betrachtete man nun zunächst den Einfluss von Hypoxie auf den regelhaften Ablauf der Zellzyklusphasen, bemerkte man bereits nach 24-stündiger Hypoxie eine Abnahme der Zellen in G2 (und eine leichte Abnahme der Zellen in S) im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Vgl. Abb. 10 a) und b)). Nach 48-stündiger Hypoxie wurde dieser Effekt deutlicher und es war zu sehen, dass diese Abnahme nicht zuerst durch Zelluntergang bedingt war, sondern es zum G1/G0-Arrest der hypoxischen Zellen kam (Abb. 10 b)). Dies ist ein in anderen Zelllinien bereits vorbeschriebener Effekt.



4. Ergebnisse

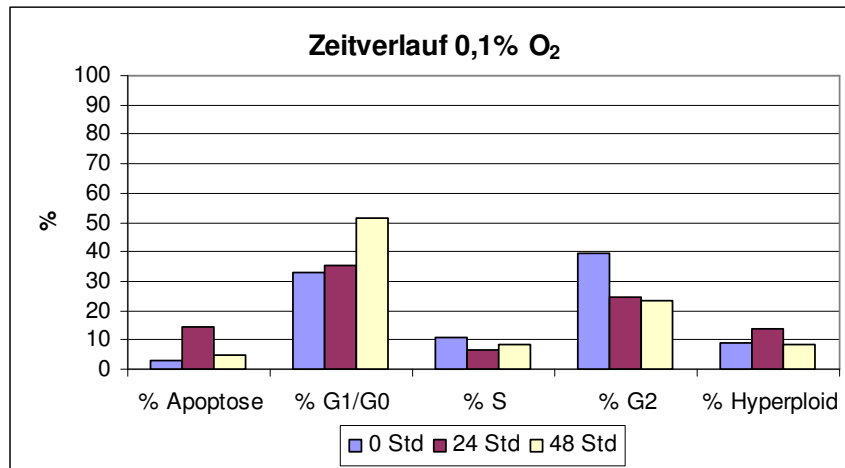


Abb. 10 a) und b): Anteil der einzelnen Zellzyklusphasen von NCI-H460 Adeno-Carcinom Zellen in Abhängigkeit der Zeit unter Sauerstoffentzug.

Die Daten wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie (Nicoletti-Färbung) nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48h in Normoxie (a) versus starke (0,1% O₂) Hypoxie (b) erfasst. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei n=3. Verteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen, man erkennt deutlich die Abnahme der Zellen in G2-Phase unter Hypoxie und dass YC-1 zu vermehrter Apoptose der Zellen bei gleichzeitiger Abnahme der Zellen in G1/G0 führte.

Sieht man die Ergebnisse desselben Versuchs nun unter dem Aspekt der Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit von der umgebenden Sauerstoffkonzentration, zeigt sich, dass sich eine Umverteilung der Zellen aus G2 (und in geringerem Maße auch aus S) zugunsten apoptotischer Zellen wie auch Zellen in G1/G0 unter Hypoxie ergab (Vgl. Abb 11 a) und b)).

4. Ergebnisse

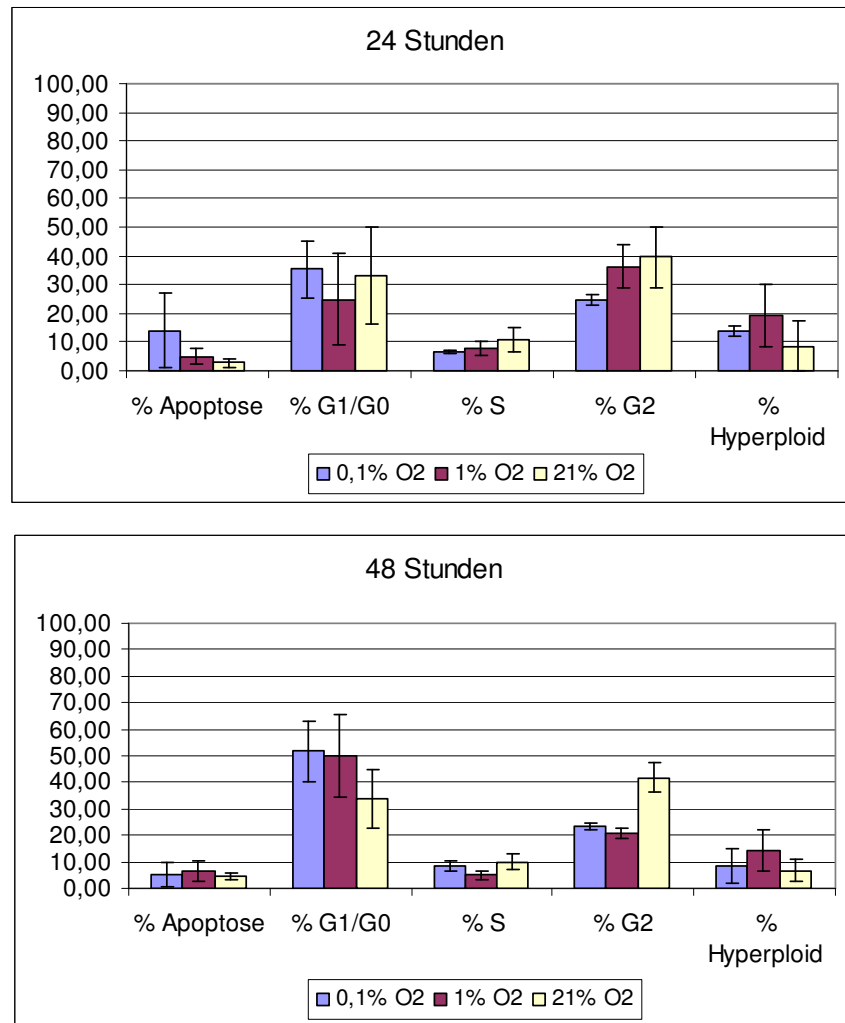


Abb. 11 a) und b): Zellzyklusverteilung von NCI-H460 Adeno-Carcinom Zellen in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration.

Die Daten wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie (Nicoletti-Färbung) nach einer Inkubationszeit von 24h (a) bzw. 48h (b) erfasst. Dazu wurden Zellen nach einer kurzen Anwachsphase im Brutschrank unter Normoxie bzw. milder Hypoxie (1% O₂, im Hypoxie-Brutschrank Heraeus C42) oder starker Hypoxie (0,1% O₂, in GasPak Pouches) inkubiert. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei n=3. Verteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen, man erkennt deutlich die Abnahme der Zellen in G2-Phase sowie eine allgemeine leichtere Umverteilung der Phasenverteilung.

4. Ergebnisse

Nahm man nun den Einfluss von YC-1 auf die Verteilung der Zellzyklusphasen mit in die Betrachtung auf, bemerkte man zunächst in Normoxie eine leichte Abnahme des Zellanteils in G1/G0. Diese Zellen schienen durch Schädigung aus G1/G0 heraus in die Apoptose zu gehen, da der Anteil an apoptotischen Zellen konsekutiv zunahm (Abb. 12 a) und b)).

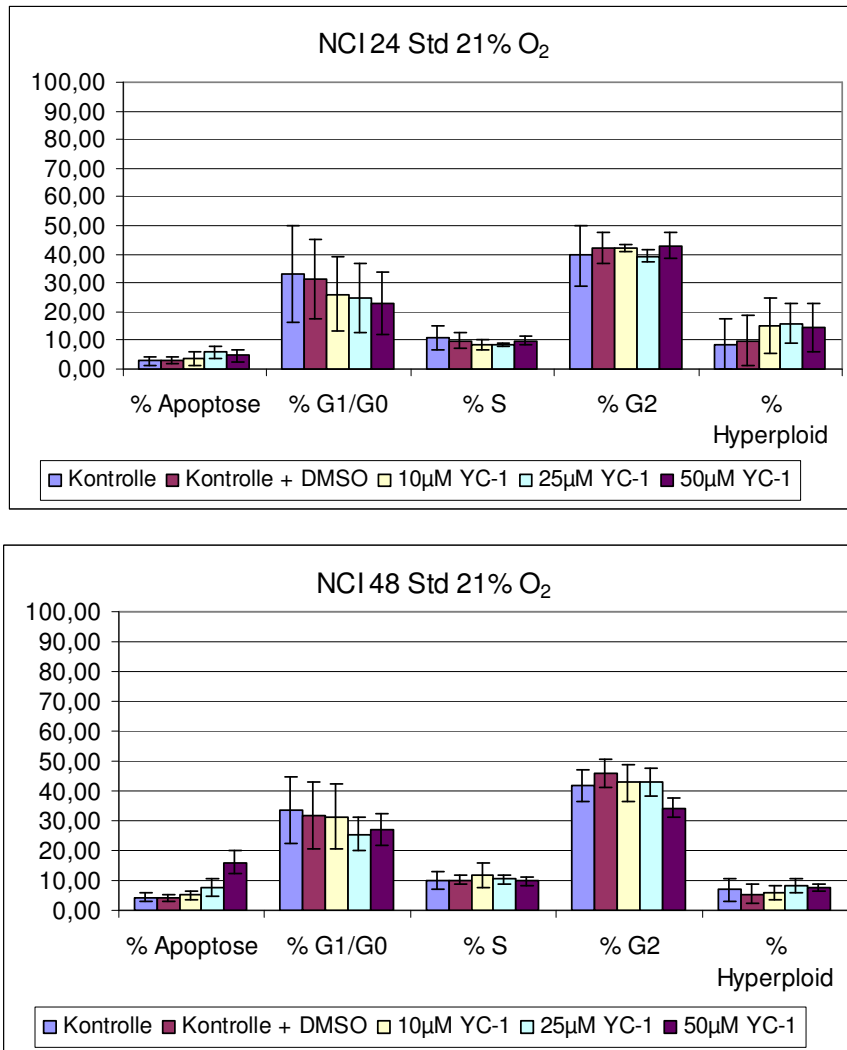


Abb. 12 a) und b): Zellzyklusanalyse von NCI-H460 Adeno-Carcinom Zellen in Normoxie bei veränderlichen YC-1 Konzentrationen.

Die Daten wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie (Nicoletti-Färbung) nach einer Inkubationszeit von 24h (a) bzw. 48h (b) in Normoxie unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 µM YC-1 erfasst. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt bei n=3. Verteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen, man erkennt, dass YC-1 auch hier zu einer Umverteilung der Zellen zu Ungunsten der G1/G0 Phase führte.

4. Ergebnisse

Führte man denselben Versuchsaufbau in milder Hypoxie (1% O₂) durch, fiel zunächst wieder die, im Zeitverlauf deutlicher werdende, Verschiebung von Zellen aus der G1/G0 Phase auf. Da durch die Hypoxie der Anteil der Zellen in G1/G0 in der Kontrolle bereits erhöht war, fiel der Effekt hier mehr ins Auge als in Normoxie (Abb. 13 a) und b)). Allerdings war der Anteil der mit 50µM YC-1 behandelten Zellen in G1/G0 noch immer etwa gleich hoch wie der der unbehandelten Kontrolle in Normoxie. Auch der Anteil der apoptotischen Zellen nahm unter Behandlung mit YC-1 in steigenden Dosen zu.

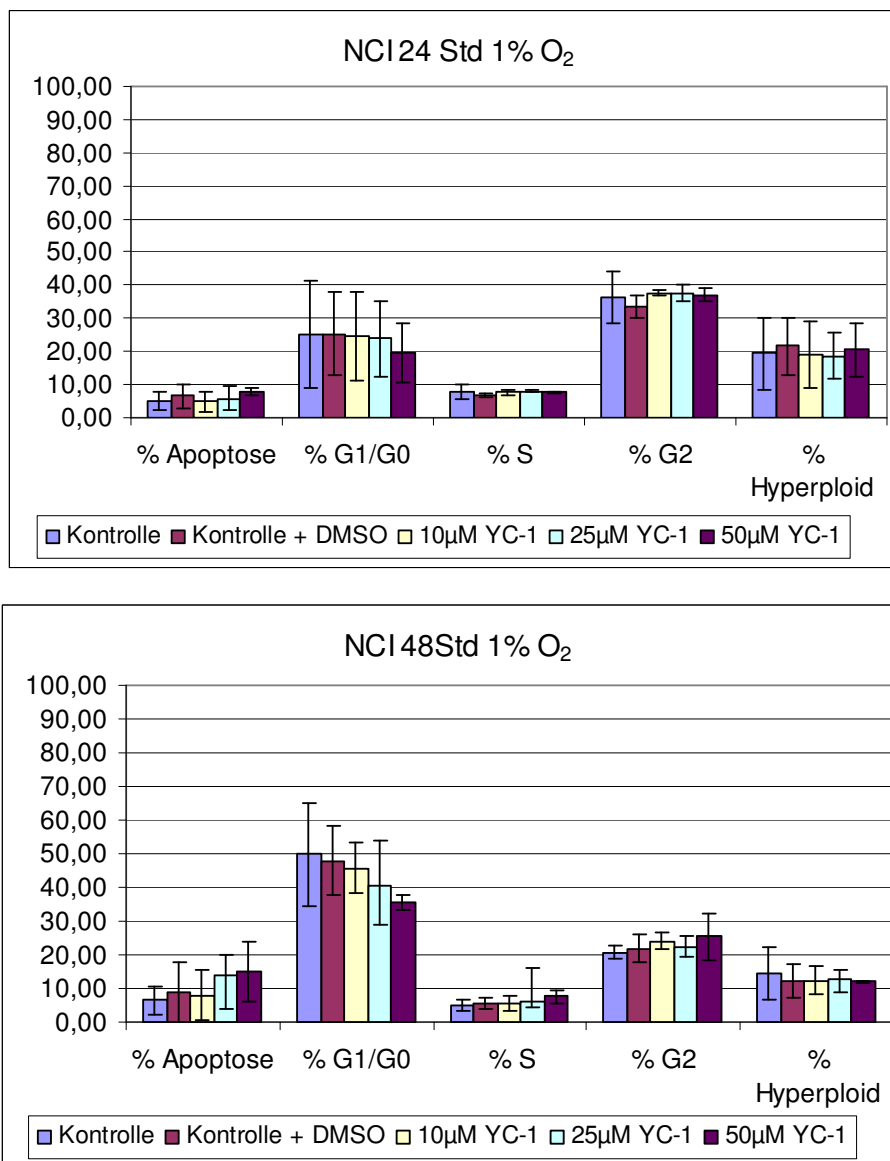
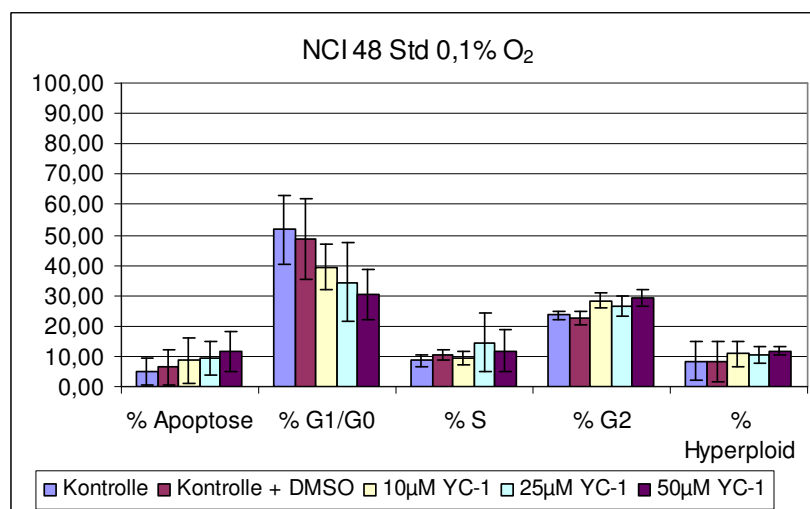
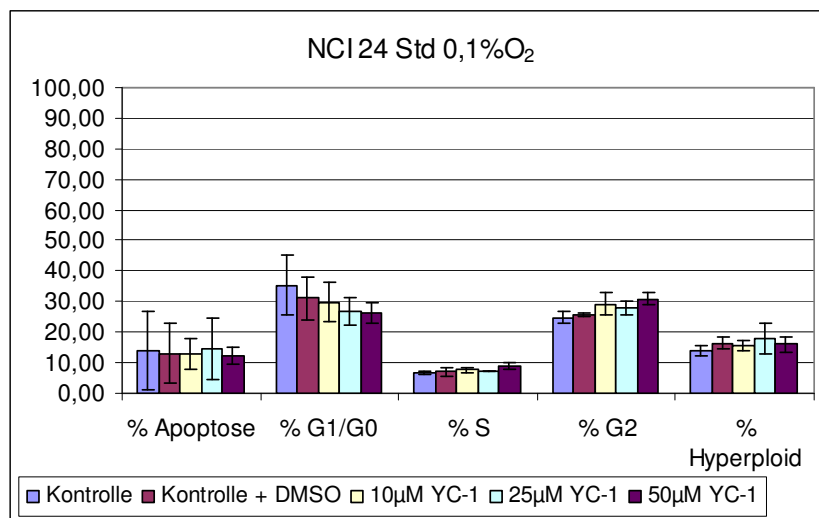


Abb. 13 a) und b): Zellzyklusanalyse von NCI-H460 Adeno-Carcinom Zellen in milder Hypoxie bei veränderlichen YC-1 Konzentrationen.

4. Ergebnisse

Die Daten wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie (Nicoletti-Färbung) nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48h in milder (1% O₂) Hypoxie unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 µM YC-1 erfasst. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt bei n=3. Verteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen, man erkennt, dass YC-1 hier zu einer deutlichen Umverteilung der Zellen zu Ungunsten der G1/G0 Phase führte.

Beim Vergleich der entsprechenden Werte in starker Hypoxie (0,1% O₂) waren dieselben Effekte wie auch schon in milder Hypoxie (1% O₂) beobachtbar, aber nun in stärkerer Ausprägung (Abb. 14 a) und b)). Vor allem nach 48-stündiger Inkubation war der Rückgang der Zellen in G1/G0 klar zu erkennen. Eine Zunahme von Zellen in anderen Zellzyklusphasen fiel nicht deutlich ins Gewicht, man meinte jedoch eine leichte Zunahme von Zellen in G2 und S zu sehen.



4. Ergebnisse

Abb. 14 a) und b): Zellzyklusanalyse von NCI-H460 Adeno-Carcinom Zellen in Normoxie bei veränderlichen YC-1 Konzentrationen.

Die Daten wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie (Nicoletti-Färbung) nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48h erfasst. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei $n=3$. Verteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen, man erkennt, dass YC-1 hier zu einer deutlichen Umverteilung der Zellen zu Ungunsten der G1/G0 Phase führte, der Hypoxie-Effekt war nicht mehr erkennbar.

Vermutlich starben Zellen aus G1/G0 frühzeitig ab und waren daher in der Analyse nach 48 Stunden nicht mehr detektierbar. Hier war der Anteil der Zellen in G1/G0 unter Behandlung mit 50 μ M YC-1 sogar etwas geringer als in der unbehandelten normoxischen Kontrolle. Hypoxie führte also zu einem G0/G1 Arrest, der durch YC-1 in allen geprüften Sauerstoff-Konzentrationen antagonisiert wurde (Vgl. Abb. 15).

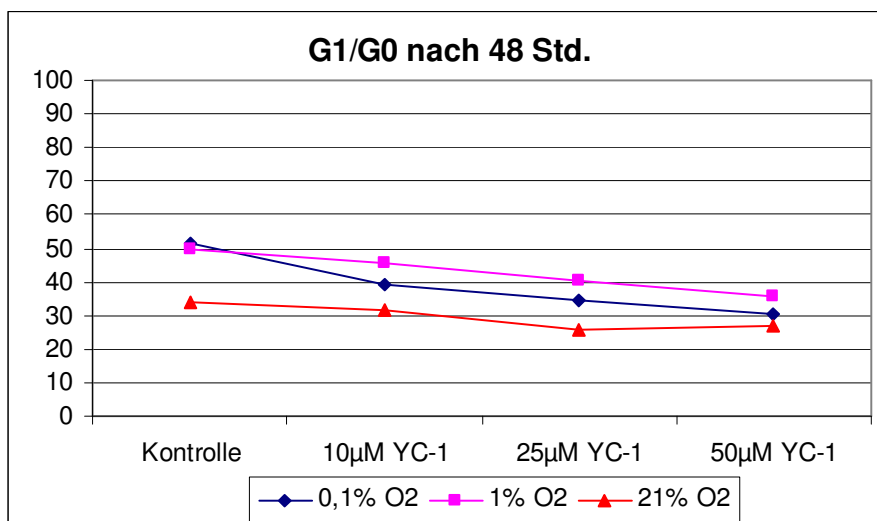


Abb. 15: Veranschaulichung des G1/G0- Arrestes unter Hypoxie und dessen Aufhebung durch YC-1 in steigender Dosierung.

Die Daten wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie (Nicoletti-Färbung) nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48h erfasst. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei $n=3$.

4. Ergebnisse

4.2.4. Wirkung von YC-1 auf Apoptose von Tumorzellen unter Normoxie und Hypoxie

Um die Apoptoseraten in Tumorzellen zu bestimmen, wurde zunächst die apoptotetypische Kernfragmentierung mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Hoechst-Färbung quantifiziert. Zuerst wurde die Apoptoseraten von Zellen in Hypoxie ohne Zusatz ermittelt. Hierzu wurden NCI-H460 und Jurkat Zellen nach Adhärenz für 24, 48 oder 72 Stunden starker Hypoxie (0,1% O₂) ausgesetzt. Nach Ende der hypoxischen Periode erfolgte die Auswertung mittels Hoechst-Färbung im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 16 und 17).

Hier zeigten sich in den verschiedenen verwendeten Tumorzelllinien jeweils vergleichbare Reaktionen auf Sauerstoffentzug. Es kam zu einem vermehrten Anteil an Zellen mit Apoptose-typischer Morphologie, am besten ließ sich dieser Effekt nach 48stündiger Hypoxie beobachten. Längere Inkubation unter hypoxischen Bedingungen zeigte eher keine zusätzlichen Effekte.

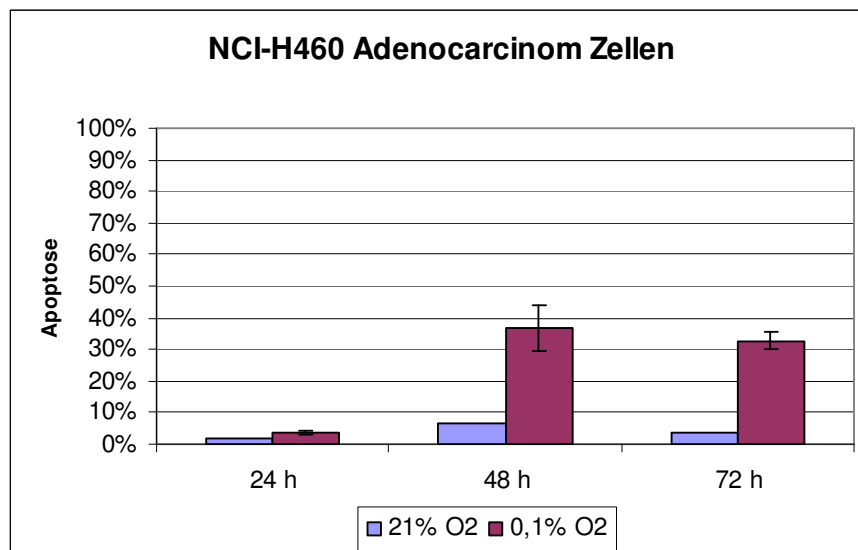


Abb. 16: Apoptoseinduktion durch Hypoxie in NCI-H460 Adenocarcinom-Zellen

Der Anteil der Zellen mit Apoptose-typischer Morphologie wurde nach Färbung mit Hoechst 33342-Farbstoff durch manuelles Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Die Daten stellen Momentaufnahmen nach 24, 48 und 72 h Inkubation in Normoxie versus starke Hypoxie (0,1% O₂) dar. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt bei n=3.

4. Ergebnisse

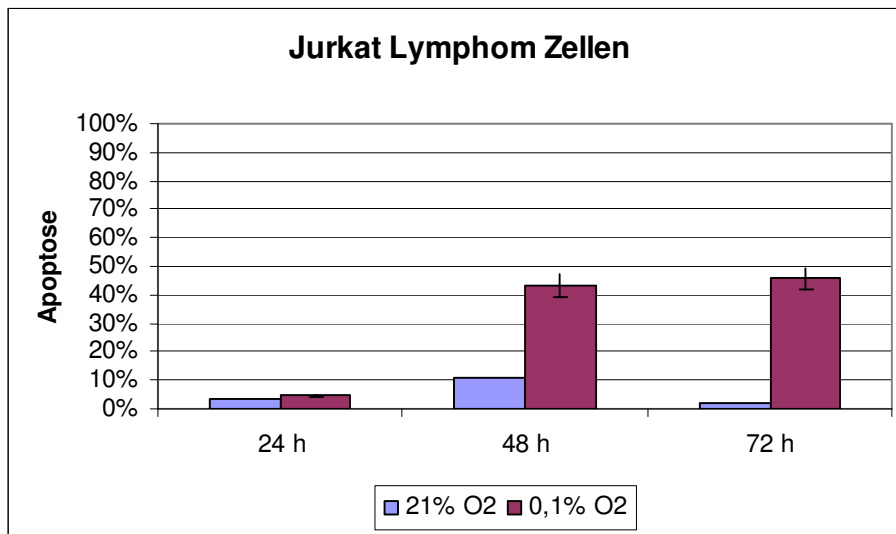


Abb. 17: Apoptoseinduktion durch Hypoxie in Jurkat Lymphom-Zellen

Der Anteil der Zellen mit Apoptose-typischer Morphologie wurde nach Färbung mit Hoechst 33342-Farbstoff durch manuelles Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Die Daten stellen Momentaufnahmen nach 24, 48 und 72 h Inkubation in Normoxie versus starke Hypoxie (0,1% O₂) dar. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei n=3.

Um die Zytotoxizität von YC-1 festzustellen wurden die Zellen nun für 24 bis 72 Stunden mit 10 bis 75 μ M YC-1 in Normoxie und starker Hypoxie (0,1% O₂) behandelt. Die DMSO-Konzentration lag dabei zunächst bei 10%. Nach YC-1 Zugabe wurden die Zellen für 24 Stunden in Hypoxie inkubiert.

DMSO-Konzentrationen von 10% erwiesen sich als stark zytotoxisch (Abb. 18), der zusätzliche Effekt von YC-1 war aufgrund des hohen Zellsterbens nach DMSO-Zugabe kaum auswertbar. Daher wurde in der Folge mit einer 100mM YC-1 Stocklösung gearbeitet, so dass die DMSO-Konzentration unter 1% lag. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Hoechst-Färbung) und Flow-Zytometer (TMRE-Färbung).

4. Ergebnisse

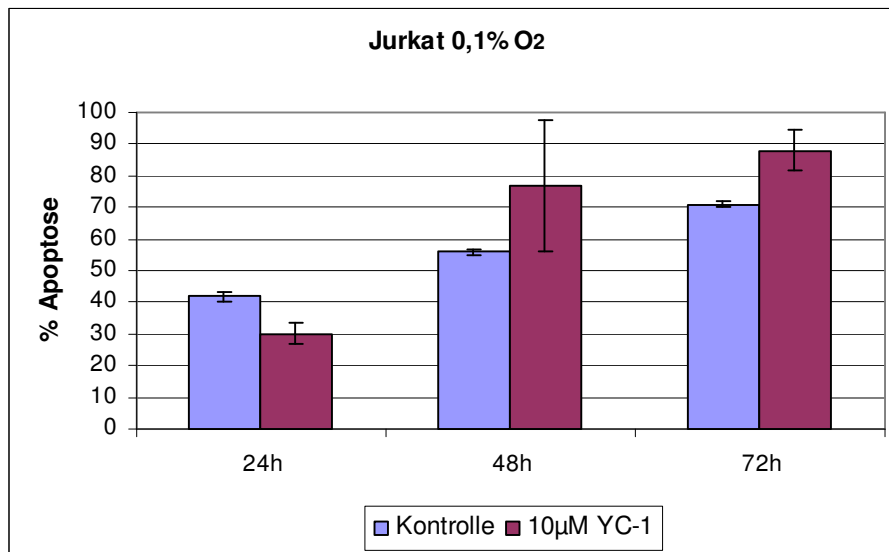


Abb. 18: Apoptoseinduktion in Jurkat Lymphom-Zellen nach Inkubation in starker Hypoxie in Anwesenheit von YC-1

Der Anteil der Zellen mit Apoptose-typischer Morphologie wurde nach Färbung mit Hoechst 33342-Farbstoff durch manuelles Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Die Daten stellen Momentaufnahmen nach 24, 48 und 72 h Inkubation in starker Hypoxie (0,1% O₂) dar. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt bei n=3. Man erkennt einen geringen zusätzlichen Zelluntergang bei Behandlung mit YC-1 bei ausgeprägter spontaner Zelltodrate (10% DMSO in allen Proben zugesetzt).

Milde Hypoxie (1% O₂) über 24 Stunden bewirkte einen Anstieg der Apoptose-rate um weniger als 10% gegenüber der Spontanapoptose; dieser Effekt war zeitabhängig, aber auch nach 72h Hypoxie nur wenig ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). Starke Hypoxie vervielfachte dagegen die Anzahl der apoptotischen Zellen (Abb. 19-24). Nach 24h starker Hypoxie war fast die Hälfte aller Zellen tot. Je länger die Zellen hypoxisch waren, desto ausgeprägter wurde auch das Zellsterben. Geringe Dosen YC-1 (bis 10 μM) hatten eher keine Auswirkung auf das Zellüberleben (Vgl. Abb. 18).

In Normoxie zeigte YC-1 in Dosierungen zwischen 25 und 75 μM eine recht hohe, dosisabhängige Zytotoxizität (Vgl. Abb. 19 und 21). In starker Hypoxie war der zusätzliche Effekt durch YC-1 deutlich geringer. Wegen der relativ hohen

4. Ergebnisse

Spontanapoptose und vor allem der hohen Apoptoserate unter Hypoxie war das Ergebnis allerdings nur schwer interpretierbar.

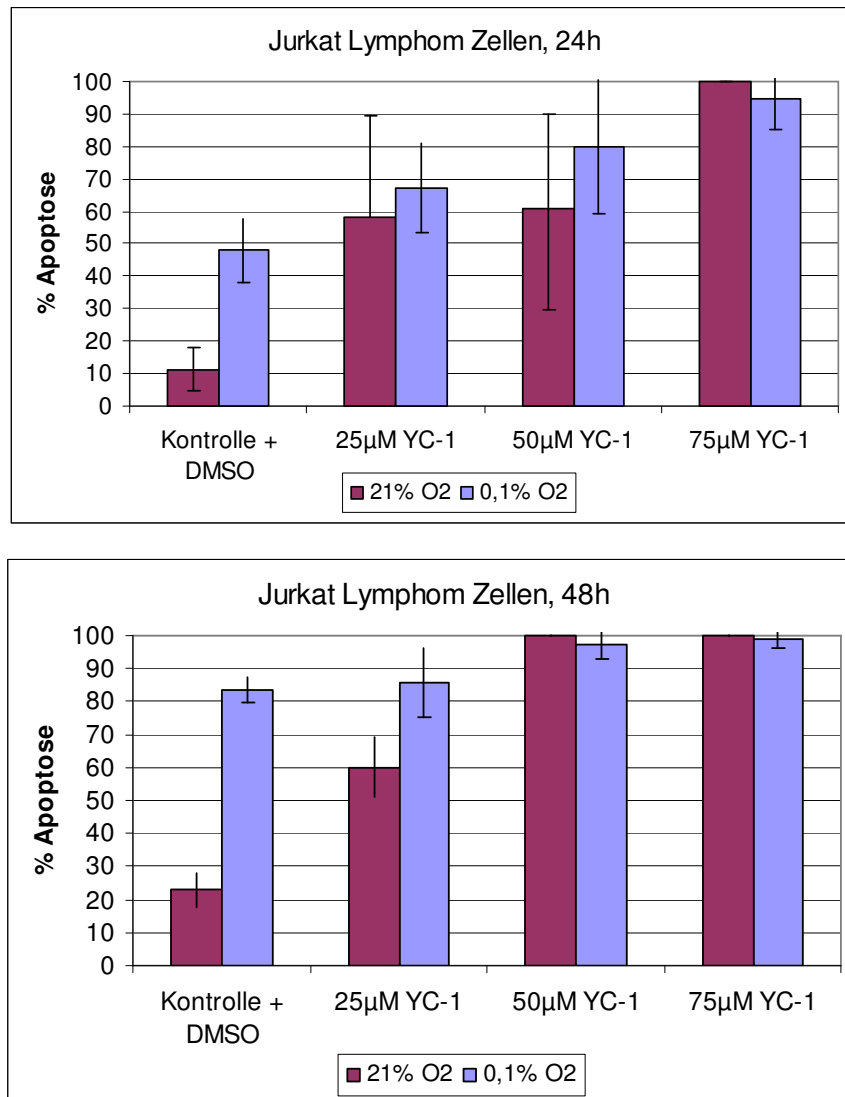


Abb. 19 a) und b): Apoptoseinduktion in Jurkat Lymphom-Zellen nach Inkubation in Normoxie (a) versus starke Hypoxie (b) in Anwesenheit von YC-1

Der Anteil der Zellen mit Apoptose-typischer Morphologie wurde nach Färbung mit Hoechst 33342-Farbstoff durch manuelles Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Die Daten stellen Momentaufnahmen nach 24, 48 und 72 h Inkubation in Normoxie versus starke Hypoxie (0,1%O₂) dar. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei n=3. Man erkennt die ausgeprägte Zytotoxizität von YC-1 in Normoxie wie in Hypoxie.

4. Ergebnisse

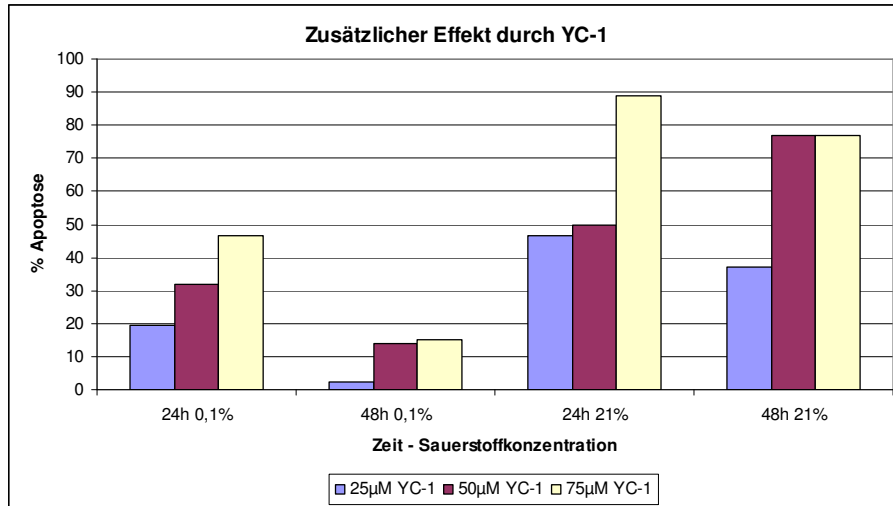


Abb. 20: Zusätzlicher, durch YC-1 ausgelöster Zellkill in Jurkat Lymphomzellen nach Inkubation in Normoxie versus starke Hypoxie

Der Anteil der Zellen mit Apoptose-typischer Morphologie wurde nach Färbung mit Hoechst 33342-Farbstoff durch manuelles Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Die Daten stellen Momentaufnahmen nach 24, 48 und 72 h Inkubation in Normoxie vs. starke Hypoxie (0,1% O₂) dar. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei n=3, die Darstellung erfolgte in % der normoxischen unbehandelten Kontrollzellen (experimental apoptosis (%) - spontaneous apoptosis (%)). Man erkennt die ausgeprägte Zytotoxizität von YC-1 in Normoxie wie in Hypoxie.

Die Messung des Zusammenbruchs des Membranpotentials zeigte, dass Hypoxie alleine etwa die Rate der Spontanapoptose je gemessener Inkubationszeit verdoppelte: Unabhängig von der Sauerstoffkonzentration starben in der doppelten Inkubationszeit etwa doppelt so viele Zellen. YC-1 induzierte wiederum deutlich Apoptose in Jurkat Lymphom-Zellen und steigerte auch die Hypoxie-induzierte Apoptose (vgl. Abb. 21). Nach 24h Inkubation mit YC-1 in Normoxie verdoppelten 25µM die Apoptoserate, wurde die YC-1 Konzentration auf 50µM gesteigert, so verdoppelte sich die Apoptoserate erneut. Bei einer Konzentration von 50µM war die Apoptoserate so hoch, dass eine weitere Erhöhung keinen messbaren Effekt haben konnte. Bei Inkubation in Hypoxie für 24h induzierten 25µM YC-1 bereits 90% Apoptose, so dass eine weitere Konzentrationsstei-

4. Ergebnisse

gerung kaum einen zusätzlichen Effekt ausüben konnte (Abb. 21 a)). Nach 48h Inkubation mit YC-1 starben die meisten hypoxischen Zellen schon in der Kontrolle, die Werte der normoxischen Zellen ähnelten hier denen der hypoxischen nach 24h (Abb. 21 b)).

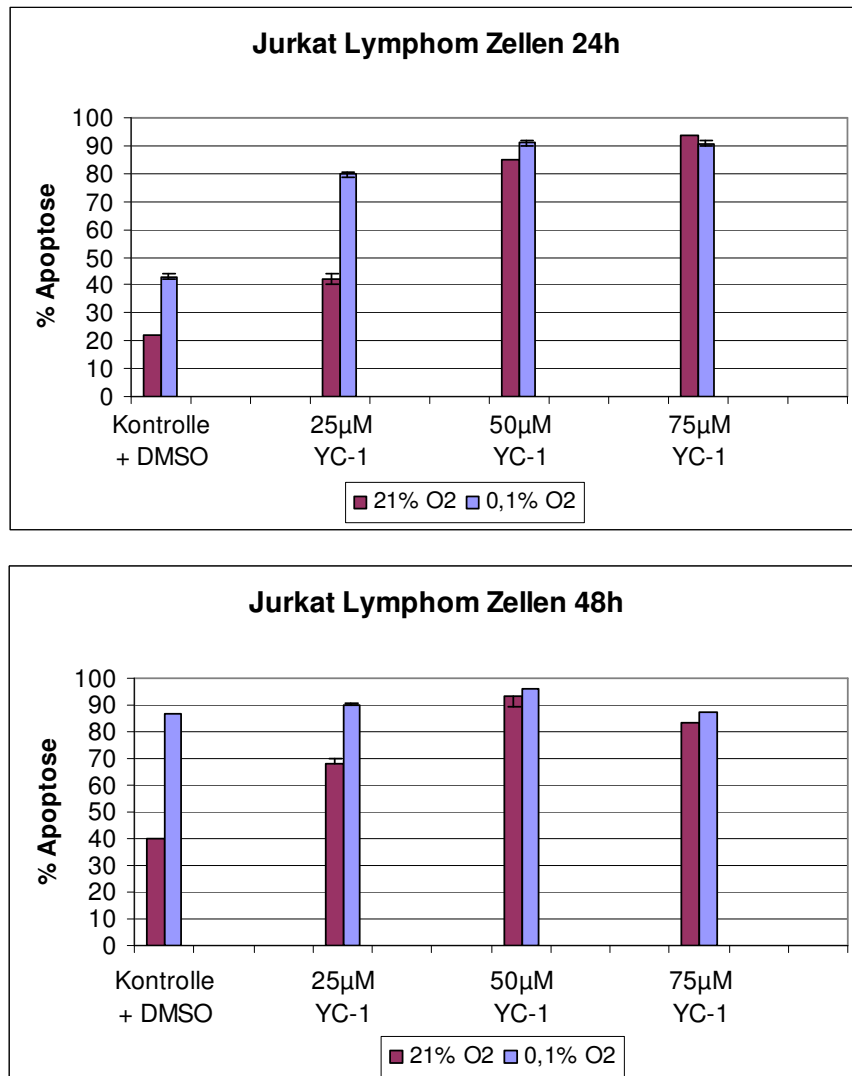


Abb. 21 a) und b): Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in Jurkat Lymphom-Zellen nach Inkubation in starker Hypoxie in Anwesenheit von YC-1

Die Daten wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie (TMRE-Färbung) nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 h in Normoxie (a) versus starke Hypoxie (0,1% O₂) (b) unter Zugabe von 25, 50 oder 75 µM YC-1 erfasst. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt bei n=3.

4. Ergebnisse

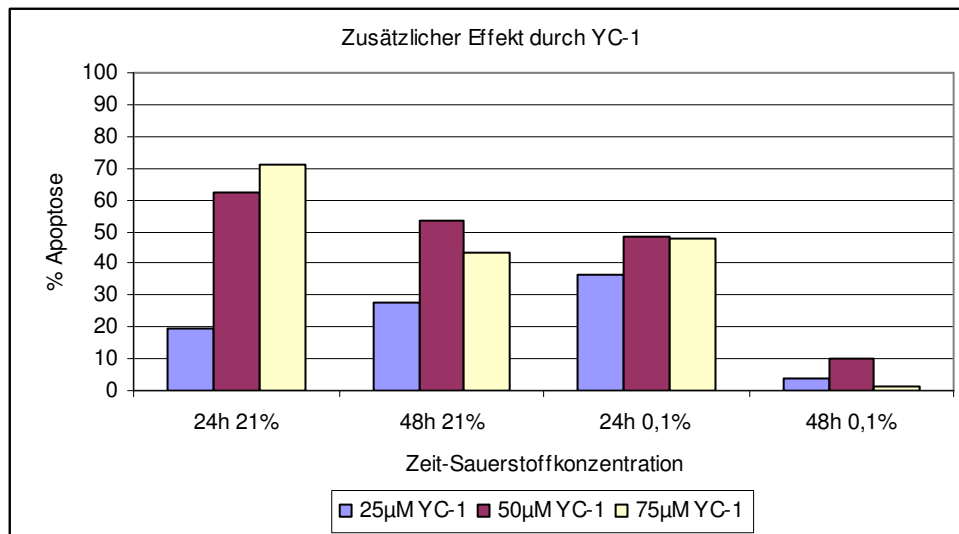


Abb. 22: Zusätzlicher, durch YC-1 ausgelöster Zellkill in Jurkat Lymphomzellen nach Inkubation in Normoxie versus starke Hypoxie

Der Anteil der Zellen mit Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie (TMRE-Färbung) ermittelt. Die Daten stellen Momentaufnahmen nach 24 und 48h Inkubation in Normoxie vs. starke Hypoxie (0,1% O₂) dar. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei n=3. Man erkennt die ausgeprägte Zytotoxizität von YC-1 in Normoxie wie in Hypoxie.

In Hinblick auf morphologische Veränderungen (Hoechst-Färbung) zeigte sich ein etwas anderes Bild als bei der Untersuchung des Membranpotentials (TMRE-Färbung). Dies lag sicher zum Teil auch daran, dass die Messung in TMRE-Färbung Apoptose zu einem früheren Zeitpunkt erkennt, dass also auch Zellen als apoptotisch erfasst werden, die in Hoechst-Färbung erst einige Stunden später Veränderungen zeigen würden. Der Anteil an spezifischer Apoptose, ausgelöst durch YC-1 und dargestellt als Vergleich zur Apoptose in normoxischen unbehandelten Kontrollzellen, stellte sich dagegen in beiden Analyse-Methoden in der Tendenz kaum unterschiedlich dar (Abb. 20, 22).

In NCI-H460 Adenocarcinom-Zellen bewirkte milde Hypoxie weder nach 24 noch nach 48 Stunden einen Anstieg der Apoptose. Auch starke Hypoxie hatte

4. Ergebnisse

über 24h kaum zytotoxische Effekte (Abb. 23 a)). Längere Hypoxiezeiten erhöhen den Zelltod dagegen deutlich (Abb. 23 b)). Während geringere YC-1 Konzentrationen (bis 25µM) eher keinen vermehrten Zelltod in Normoxie bewirkten, hatten höhere Dosen YC-1 (ab 50µM) deutlich stärkere zytotoxische Effekte. In starker Hypoxie war auch bei geringeren YC-1 Konzentrationen Zelluntergang sichtbar, der sich mit höheren Konzentrationen und über längere Zeiträume verstärkte. In milder Hypoxie war der YC-1 Effekt nicht nachweisbar.

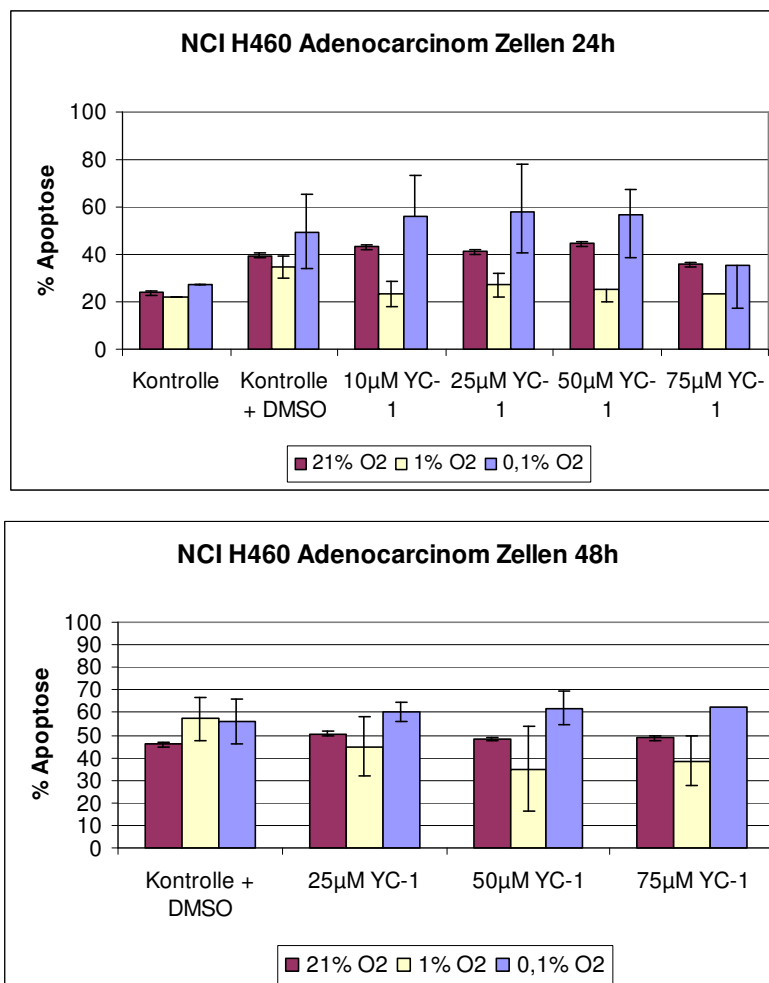


Abb. 23 a) und b): Apoptoseinduktion in NCI-H460 Adenocarcinom-Zellen nach Inkubation in Normoxie versus milde (1% O₂) und starke Hypoxie (0,1% O₂) in Anwesenheit von YC-1

Der Anteil der Zellen mit Apoptose-typischer Morphologie wurde nach Färbung mit Hoechst 33342-Farbstoff durch manuelles Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Die Daten stellen Momentaufnahmen nach 24h (a) und 48h (b) Inkubation in Normoxie versus milde und starke Hypoxie (1% O₂) dar.

4. Ergebnisse

Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei n=3.

YC-1 induzierte auch in NCI-H460 Adenocarcinom Zellen einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, eines weiteren Phänomen des apoptotischen Zelltods. Dieser Effekt war aber eher nicht von der Menge an YC-1 abhängig und daher eher auf den DMSO-Effekt zurückzuführen. In milder Hypoxie (1% O₂) trat dieser DMSO-Effekt ebenfalls auf, Zugabe von YC-1 schien allerdings Apoptose zu verhindern. Nach 24-stündiger Inkubation war diese Auswirkung auf das Zellüberleben besser zu sehen, nach 48-stündiger Inkubationszeit schien die allgemeine Toxizität der hypoxischen Umgebung zuzunehmen. Nach Inkubation in starker Hypoxie (0,1% O₂) war das allgemeine Zellsterben höher, geringere Dosen YC-1 hatten eher keinen Effekt mehr, höhere Dosen (ab 50µM YC-1) verbesserten auch hier das Überleben der Zellpopulation. Nach längerer hypoxischer Phase (48 h) ließ sich kein Effekt mehr beobachten, es starben so viele Zellen unter den schlechten Umgebungsbedingungen, dass YC-1-Zugabe keine Auswirkungen mehr zu haben schien.

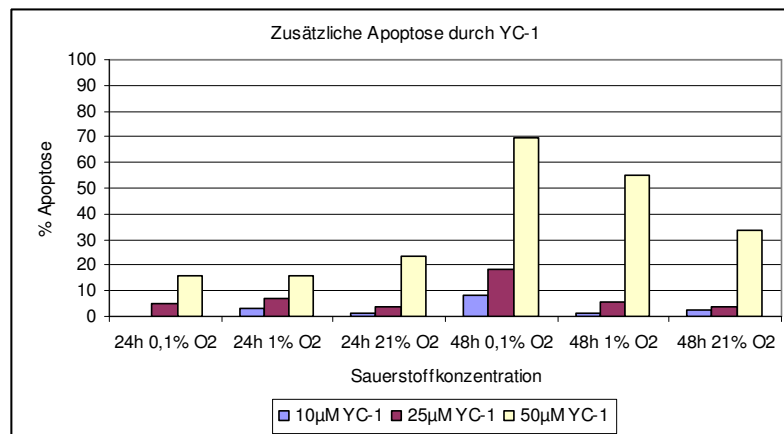


Abb. 24: Zusätzlicher, durch YC-1 ausgelöster Zellkill in NCI-H460 Adenocarcinom-Zellen nach Inkubation in Normoxie versus milde und starke Hypoxie

Der Anteil der Zellen mit Apoptose-typischer Morphologie wurde nach Färbung mit Hoechst 33342-Farbstoff durch manuelles Auszählen unter dem Fluores-

4. Ergebnisse

zenzmikroskop ermittelt. Die Daten stellen Momentaufnahmen nach 24, und 48 h Inkubation in Normoxie versus milde Hypoxie (1% O₂) dar. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei n=3.

Um zu beweisen, dass es sich beim beobachteten Zelltod tatsächlich um Apoptose handelt, führten wir zusätzlich Western Blot Analysen mit anti-PARP Antikörper durch. Die Aktivierung von Caspasen durch proteolytische Spaltung ist eine weitere Eigenschaft apoptotischer Zellen. PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) ist ein Substrat von Caspasen und initiiert die DNA-Reparatur Kaskade. Es ist ein Reparaturenzym, das spezifisch an DNA-Strangbrüche bindet, ubiquitär vorkommt und während der Apoptoseinduktion durch Caspasen gespalten wird. Da die proteolytische Spaltung von PARP nur beim apoptotischen Zelltod auftritt, kann man mit diesem Assay Apoptose eindeutig von Nekrose unterscheiden.

YC-1 induzierte konzentrationsabhängig in Normoxie wie in Hypoxie zunehmend PARP-Spaltung und damit Apoptose. Dieser Effekt war in Normoxie etwa gleich stark wie in Hypoxie, die Effekte waren in NCI-H460 Adenocarcinom wie in Jurkat Lymphom Zellen beobachtbar (Daten nicht gezeigt). Durch Hypoxie wurde nur wenig PARP-Spaltung induziert (Abb. 25), es schien sich beim hier beobachteten Zelluntergang also eher nicht um Apoptose zu handeln.

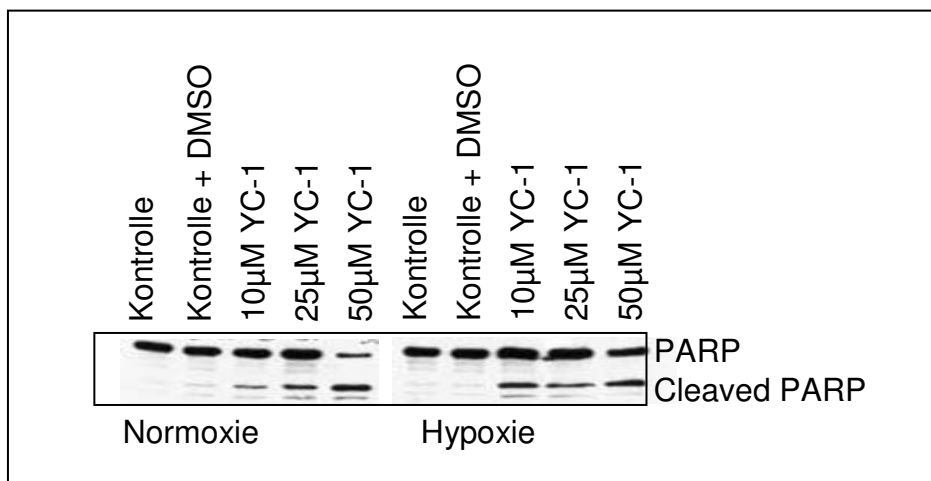


Abb. 25: PARP-Spaltung in NCI-H460 Adenocarcinom Zellen nach Inkubation in starker Hypoxie in Anwesenheit von YC-1

4. Ergebnisse

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot mit anti-PARP und anti-cleaved PARP Antikörper in NCH-H460 Adenocarcinom-Zellen nach 48stündiger Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 µM YC-1. Man erkennt deutlich die Zunahme an gespalte-tem PARP bei Anwesenheit von YC-1.

4.2.4.1. Wirkung von YC-1 auf die Expression verschiedener Proteine der Bcl-2 Familie

Hypoxie führt in Tumorzellen zu Apoptose, vermittelt über den mitochondrialen Signalweg (Weinmann et al. 2004). Auch für mit YC-1 behandelte Zellen konnten wir vermehrte Apoptose nachweisen (siehe 4.2.4.).

Um eine genauere Aussage zur Apoptoseregulation hypoxischer und mit YC-1 behandelter Zellen zu bekommen, untersuchten wir nun eine Reihe unterschiedlicher Apoptose-relevanter Proteine auf ihre Expression unter Versuchsbedingungen. Dabei waren vor allem die Proteine der Bcl-2 Familie von Interesse, da sie für die Regulation der Apoptose über den mitochondrialen Weg verantwortlich sind. Die Untersuchungen erfolgten mittels Western Blot Analyse nach 24stündiger Inkubation mit YC-1 unter Normoxie bzw. starker Hypoxie.

Bax und Bcl-2 zeigten keine Hypoxie-induzierten Veränderungen der Expression; Bcl-xL, Bak, Bad und Bim wurden dagegen unter hypoxischen Bedingungen vermindert exprimiert. (Abb. 26, 27, 28). Die BH3-only Proteine (BID, BIM) zeigten kaum Veränderung, es ist unter hypoxischen Bedingungen eine leichte Abnahme der Proteinmenge erkennbar (Abb. 30).

Proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie

Bax und dessen Homologon Bak wirken pro-apoptotisch. Sie können im Rahmen der Apoptose-Einleitung direkt Mitochondrien aktivieren, die daraufhin Cytochrom c und ATP aus dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran freisetzen. Der Verlust der Bax- und/oder Bak-Expression kann in Tumorzellen zur Resistenz gegen zytotoxische Therapien beitragen. Daher wurde untersucht, ob die YC-1 induzierte Apoptose auch mit Veränderungen der Expression von Bax oder seinem Homologon Bak einhergeht.

4. Ergebnisse

Die Expression von Bax änderte sich in unserer Versuchsanordnung weder durch Hypoxie noch durch YC-1 Behandlung.

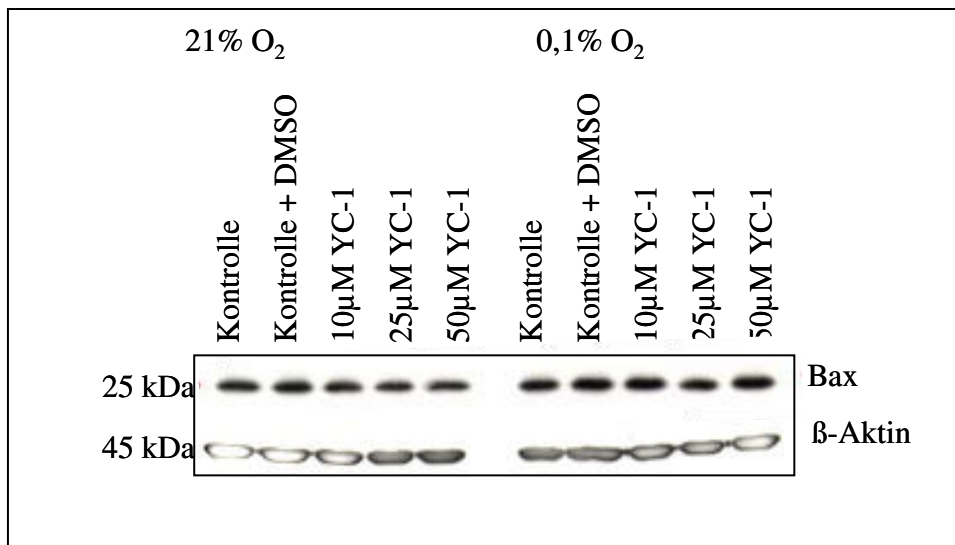


Abb. 26: Expression von Bax unter Hypoxie und Behandlung mit YC-1 in NCH-H460 Adenocarcinom-Zellen

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (aus n=3) mit anti-Bax Antikörper. Der Nachweis des Proteins wurde nach 48-stündiger Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 µM YC-1 geführt.

Die Veränderung der Expression von Bak war eindeutiger als die von Bax. Hier schien es, dass in Normoxie YC-1 zu einer leicht verminderten Expression führte, während sich in starker Hypoxie Bak allgemein schwächer darstellte, durch vermehrte YC-1 Zugabe jedoch wie auch Bax nicht veränderte. Die Auslöschung in unbehandelten hypoxischen Zellen ließ sich nicht reproduzieren, hier muss es sich um einen Fehler im Versuchsaufbau handeln.

4. Ergebnisse

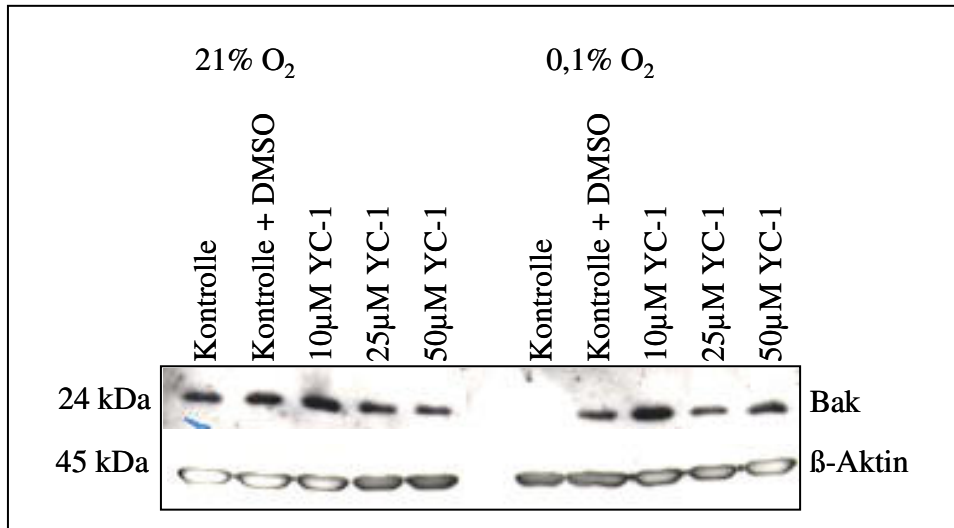


Abb. 27: Expression von Bak unter Hypoxie und Behandlung mit YC-1 in NCH-H460 Adenocarcinom-Zellen

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (aus n=3) mit anti-Bak Antikörper. Der Nachweis des Proteins wurde nach 48-stündiger Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 µM YC-1 geführt.

Antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie

Bcl-2 ist das wichtigste anti-apoptotische Protein der Bcl-Familie. Bcl-2, Bcl-xl und deren funktionelle Apoptose-hemmenden Homologa inhibieren vermutlich direkt die Wirkung der Apoptose-Promotoren Bax und Bak.

Wie bei der Expression von Bax konnten wir auch bei Bcl-2 weder in Hypoxie noch unter YC-1 Behandlung eine Änderung beobachten. Die Behandlung mit niedrigen Dosen YC-1 (10 µM) in Hypoxie führte ebenso wie bei Bak zu einem leichten Anstieg der Expression von Bcl-xL. Da die Untersuchungen nach 48h Inkubation durchgeführt wurden bleibt unklar, ob die beobachteten Effekte ursächlich für oder Folge der Apoptoseinduktion sind (Abb. 28).

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, scheint es, dass Bcl-xL, Bak, Bad und Bim unter hypoxischen Bedingungen vermindert exprimiert sind, und YC-1 zumindest unter hypoxischen Bedingungen einen Einfluss auf die Expression von Bak, Bcl-xL, Bim und Bid hat. Unter Behandlung mit YC-1 zeigt aber auch Bcl-xL nur wenig spezifische Veränderungen.

4. Ergebnisse

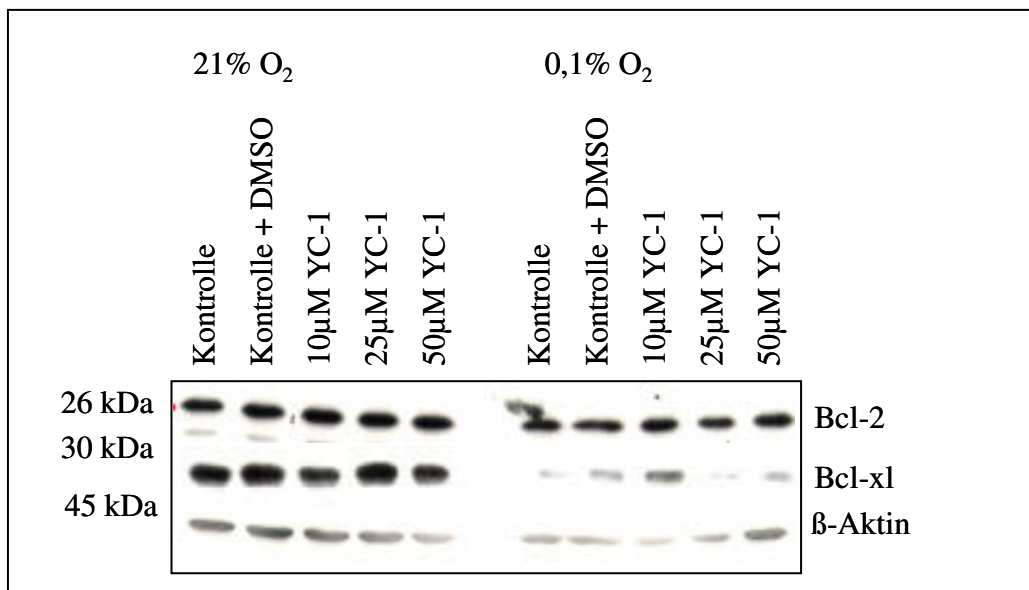


Abb. 28: Expression von Bcl-2 und Bcl-xL unter Hypoxie und Behandlung mit YC-1 in NCH-H460 Adenocarcinom-Zellen

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (aus n=3) mit anti-Bcl-2 bzw. anti-Bcl-xL Antikörper. Der Nachweis des Proteins wurde nach 48-stündiger Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 µM YC-1 geführt.

BH3-only Proteine

Die Unterfamilie der BH3-only Proteine der Bcl-2 Genfamilie können Apoptose-hemmende Proteine wie Bcl-xL und Bcl-2 aus der Bindung an Bax verdrängen und hierdurch Bax (oder auch Bak) aktivieren. Diese pro-apoptotischen BH3-only Proteine agieren wahrscheinlich als Bindeglieder zwischen spezifischen Signalkaskaden und der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade.

In unseren Untersuchungen führte Hypoxie zur leichten Verminderung der Expression von Bad und auch Phospho-Bad. Die Behandlung mit YC-1 hatte in Normoxie keinen wesentlichen modulierenden Einfluss auf die Expression von Bad und Phospho-Bad, während man in starker Hypoxie eine leichte Zunahme der Expression beider Proteine unter geringen Dosen YC-1 (10 µM) und eine Vverminderte Expression in Inkubation mit viel YC-1 (25, 50 µM) sah (vgl. Abb. 29).

4. Ergebnisse

Hypoxie reprimierte erkennbar die BID- und BIM-Expression. Zugabe von YC-1 vermindert in Hypoxie mehr als in Normoxie die Expression der Proteine (Abb. 30).

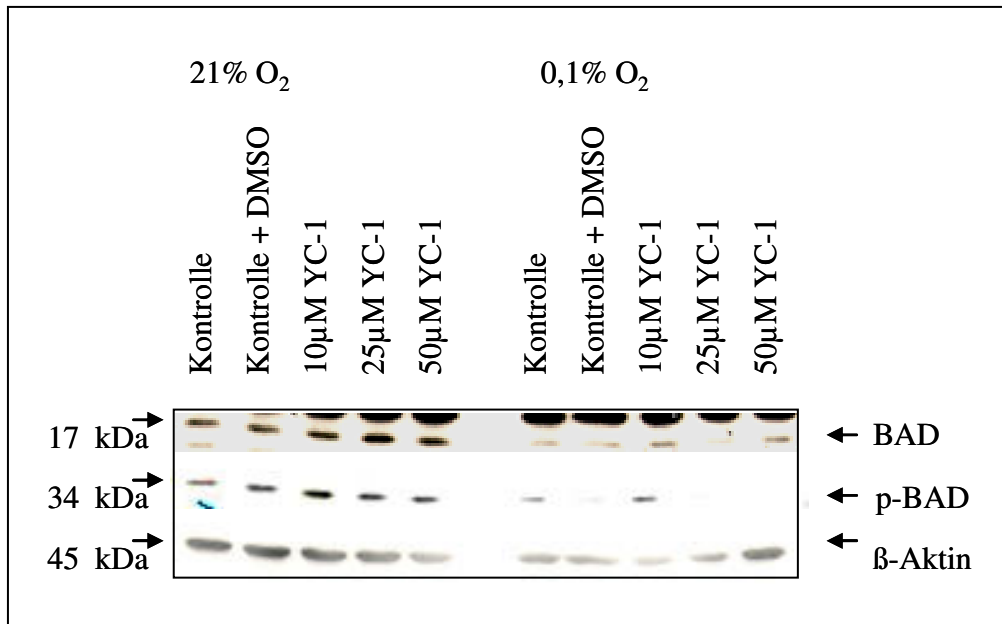


Abb. 29: Expression von Bad und phosphoryliertem Bad unter Hypoxie und Behandlung mit YC-1 in NCH-H460 Adenocarcinom-Zellen

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (aus n=3) mit anti-Bad und anti-phosphoryliertem Bad Antikörper. β-Aktin dient zur Ladekontrolle. Der Nachweis des Proteins wurde nach 48-stündiger Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 μM YC-1 geführt.

4. Ergebnisse

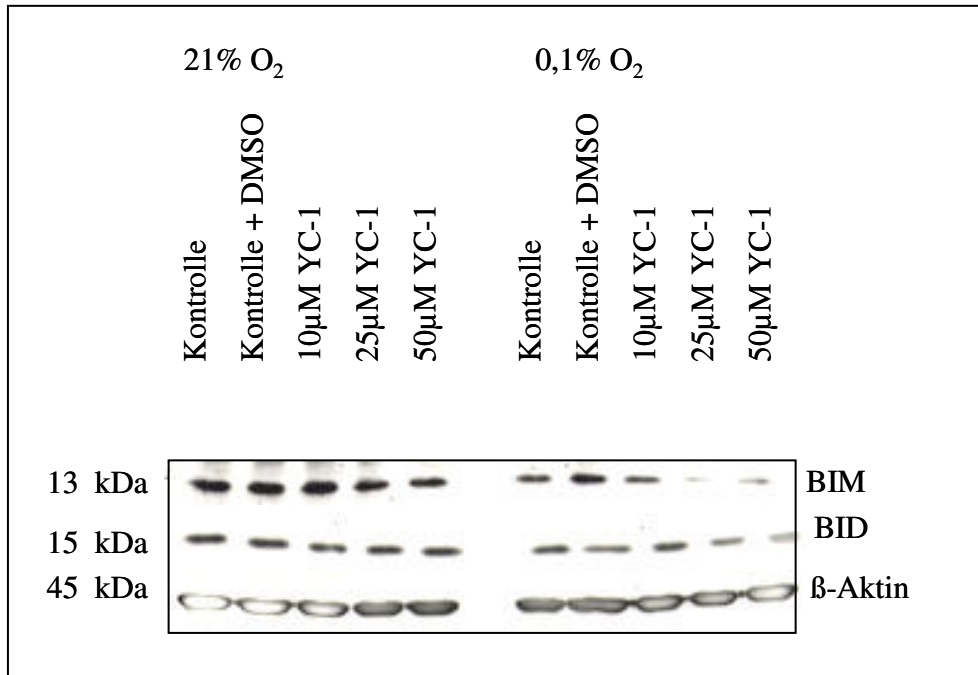


Abb. 30: Expression von Bid und Bim unter Hypoxie und Behandlung mit YC-1 in NCH-H460 Adenocarcinom-Zellen

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (aus n=3) mit anti-Bid und anti-Bim Antikörper. β-Aktin dient zur Ladekontrolle. Der Nachweis des Proteins wurde nach 48-stündiger Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 µM YC-1 geführt.

X-iap

X-iap (human X chromosome linked Inhibitor of Apoptosis Protein) ist eines der bedeutendsten Mitglieder der anti-apoptische wirkenden Familie der IAPs (*inhibitor-of-apoptosis proteins*). X-iap bindet direkt an verschiedene Caspasen, darunter Caspase 3, 7 und 9 und inhibiert sie dadurch. Während des Prozesses der Apoptose wird x-iap spezifisch durch Caspase 3 gespalten und verliert so einen Teil seiner Funktionen. Um weitere Informationen in Bezug auf Caspasen-Aktivierung unter Hypoxie zu gewinnen untersuchten wir die X-iap Expression unserer NCI-H460 Adenocarcinom Zellen.

In der Western Blot Analyse zeigte X-iap durch YC-1 Zugabe in Normoxie eine leichte Abnahme des full-length Proteins. Das könnte bedeuten, dass die

4. Ergebnisse

Expression vermindert wird, kann aber auch ein Hinweis auf Caspase-abhängigen Abbau sein.

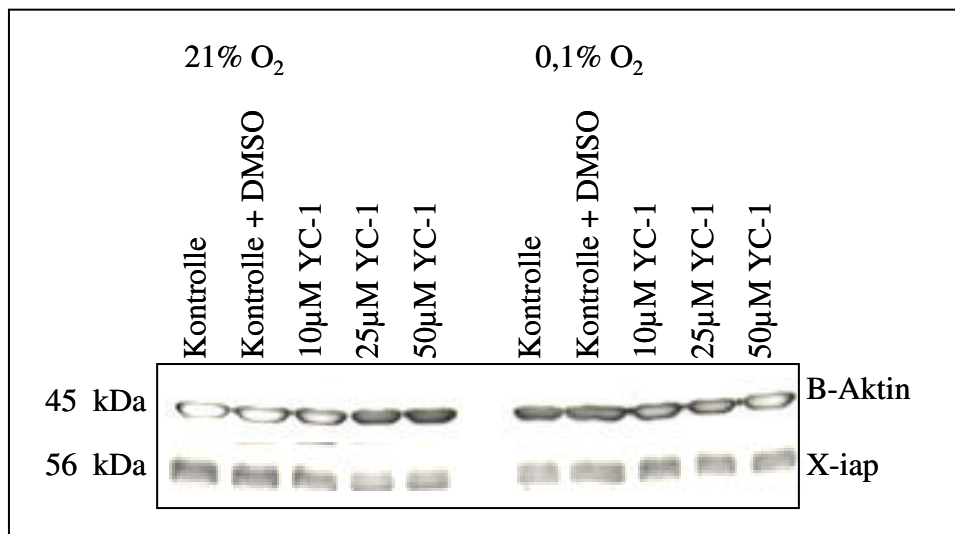


Abb. 31: Expression von X-iap unter Hypoxie und Behandlung mit YC1 in NCH-H460 Adenocarcinom-Zellen

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot mit anti-X-iap Antikörper. β -Aktin dient zur Ladekontrolle. Der Nachweis des Proteins wurde nach 48-stündiger Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 μ M YC-1 geführt.

4.2.4.2. Einfluss von Hypoxie und YC-1 auf die Expression Zellzyklus-relevanter Proteine

Nachdem wir mittels Western Blot Analyse die Veränderungen von für die Apoptose relevanten Proteinen untersucht hatten, nutzten wir die gleiche Technik um Erkenntnisse über die am Zellzyklus beteiligten Proteine zu erhalten. Bereits in der Analyse per Durchflusszytometrie hatten wir Hypoxie-vermittelte Anpassungen des Zellzyklus beobachten können. Nun versuchten wir Proteine auszumachen, die an diesen Anpassungen beteiligt sind. Auch YC-1 führte zu einer Umverteilung von Zellen im Zellzyklus, daher wurde untersucht welche der Zellzyklus-bestimmenden Protein dabei in erster Linie beeinflusst werden.

Abb. 32 zeigt, dass die Expression von Cyclin D1 durch Hypoxie deutlich gehemmt wurde, während YC-1 unter Normoxie eher keine Veränderungen be-

4. Ergebnisse

wirkte. In Hypoxie kam es unter Zugabe von YC-1 in hohen Konzentrationen zu einer Zunahme der Expression. CDK4 wurde durch YC-1 in Normoxie und durch Hypoxie alleine reprimiert, in Hypoxie durch YC-1 aber eher induziert. pRb wurde durch Hypoxie reprimiert, YC-1 zeigte keinen sichtbaren Einfluss.

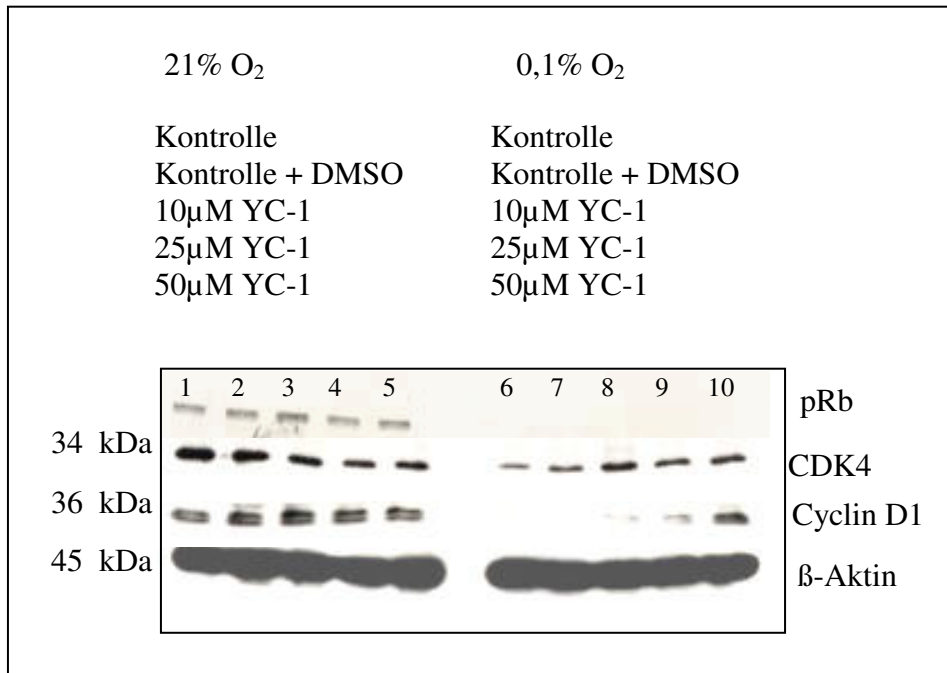


Abb. 32: Expression von Cyclin D1, CDK4 und pRb unter Hypoxie und Behandlung mit YC-1 in NCH-H460 Adenocarcinom-Zellen

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (aus n=3) mit anti-Cyclin D1, anti-CDK4 und anti-pRb Antikörper. β-Aktin diente zur Ladekontrolle. Der Nachweis der Proteine wurde nach 48-stündiger Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 µM YC-1 geführt.

Die verminderte Expression von Cyclin D1 und pRb in hypoxischen Zellen erklärt vielleicht die Veränderungen im Zellzyklus hypoxischer Zellen. CDK4 wurde unter Hypoxie ebenfalls vermindert exprimiert. p21 schien sich dagegen eher nicht zu verändern (Abb. nicht gezeigt).

4. Ergebnisse

Akt und Phospho-Akt

Akt ist ein Enzym des PI3K/Akt-Signalweges, das zahlreiche Auswirkungen auf die Homöostase der Zelle hat und Überleben, Apoptose, Proliferation und Stoffwechsel reguliert. Akt wird in mehreren energieabhängigen Schritten phosphoryliert und somit aktiviert. Eine erhöhte Aktivität des Akt-Signalweges wurde im Zusammenhang mit einer ganzen Reihe onkogener Mutationen beschrieben. Aus diesem Grund prüften wir nun, ob auch Akt durch Hypoxie und/oder YC-1 verändert wird. Dazu führten wir, wie auch bei den vorhergehenden Proteinen, Western Blot Analysen der Protein-Expression unter Normoxie und Hypoxie sowie unter Inkubation mit YC-1 durch.

Die Expression der p-Akt wie auch der Akt Bande war in Hypoxie im Vergleich zu Normoxie reduziert. In Normoxie sank die Expression durch Zugabe von YC-1 dosisabhängig, in Hypoxie war aufgrund der insgesamt geringen Expression kaum ein zusätzlicher Einfluss von YC-1 messbar, es scheint aber, dass die Konzentration an Akt unter YC-1 Zugabe in Hypoxie wieder leicht zunahm.

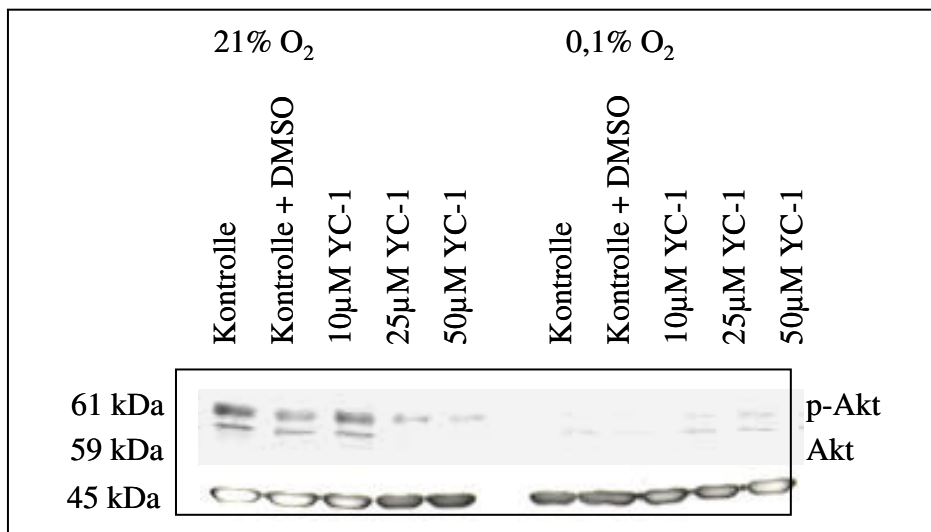


Abb. 33: Expression von Akt und phosphoryliertem Akt unter Hypoxie und Behandlung mit YC-1 in NCH-H460 Adenocarcinom-Zellen

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (aus n=3) mit anti-Akt und anti-phosphoryliertem Akt Antikörper. β -Aktin dient zur Ladekontrolle. Der Nachweis des Proteins wurde nach 48-stündiger Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 μ M YC-1 geführt.

4. Ergebnisse

Akt downstream targets

Die Familie der *forkhead box o* (*foxo*)-Transkriptionsfaktoren umfasst beim Menschen drei Proteine. Sie spielen unter anderem in der Entwicklung von Neoplasien eine Rolle: *forkhead related transcription factor* (FKHR, entspricht Foxo 1a), *FKHR-like1* (FKHRL1, entspricht Foxo 3a) und *ALL1-fused-gene-from-chromosome-X* (AFX, entspricht Foxo 4). Wir untersuchten die Einflüsse ausgeprägter Hypoxie und die Wirkung aufsteigender Konzentrationen von YC-1 auf die Expression von Foxo 3a als Beispiel für von Akt beeinflusste Proteine. Foxo 3a wurde in Normoxie wie in Hypoxie durch höheren Dosen YC-1 leicht reprimiert. Eine schwache Induktion von Foxo-3a durch DMSO- oder geringe YC-1-Zugabe ist vermutlich ein Artefakt, das auf die Wirkung des DMSO zurückzuführen ist. Die Expression von Phospho-Foxo bleibt in Hypoxie wie unter Behandlung mit YC-1 nicht nachweisbar.

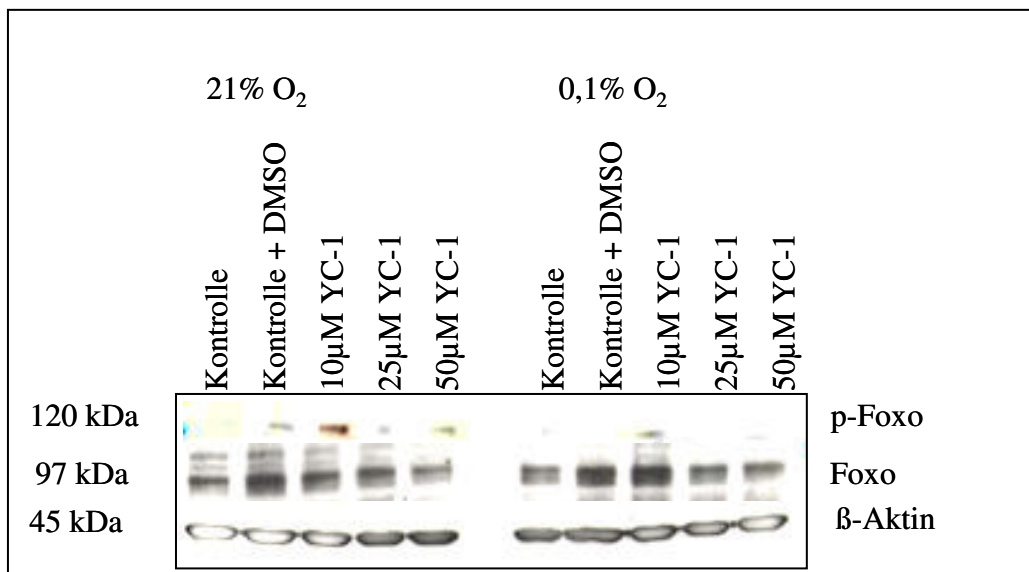


Abb. 34: Expression von Foxo 3a und phosphoryliertem Foxo unter Hypoxie und Behandlung mit YC-1 in NCH-H460 Adenocarcinom-Zellen

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen FOXO3A und das phosphorylierte Protein. β-Aktin dient zur Ladekontrolle. Der Nachweis der Proteine wurde nach 48-stündiger Inkubation in Normoxie oder starker Hypoxie (0,1% O₂) unter Behandlung mit 10, 25 oder 50 μM YC-1 geführt.

4. Ergebnisse

4.3. Wirkung von YC-1 auf Strahlenwirkung unter Normoxie und Hypoxie

4.3.1. Einflüsse von YC-1 auf die strahleninduzierte Apoptose unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen

Nachdem wir die Wirkung von YC-1 auf Tumorzellen in Normoxie wie auch in unterschiedlichen Ausprägungen von Hypoxie untersucht hatten, wandten wir uns jetzt der strahleninduzierten Apoptose und dem Einfluss der Sauerstoffkonzentration der Umgebungsbedingungen auf die Apoptoseinduktion zu. Um Aufschlüsse über die normale Reaktion von Tumorzellen auf Bestrahlung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen zu erhalten, untersuchten wir zunächst das Ausmaß der Strahlen-induzierten Apoptose in NCI-H460 Adenocarcinom und Jurkat Lymphom Zellen.

Hierzu wurde starke Hypoxie in Gas Pak Pouches erzeugt. Nach 2stündiger Hypoxie erfolgte die Bestrahlung mit 10 Gy. Nach weiteren 20 Stunden starker Hypoxie folgte eine Reoxigenierungsphase, die eine regenerative Schädigung der vorher hypoxischen Zellen durch sekundäre Sauerstoffeffekte induzieren sollte. 24 Stunden nach Bestrahlung erfolgte die Auswertung mittels Hoechst-Färbung (vgl. Abb. 35).

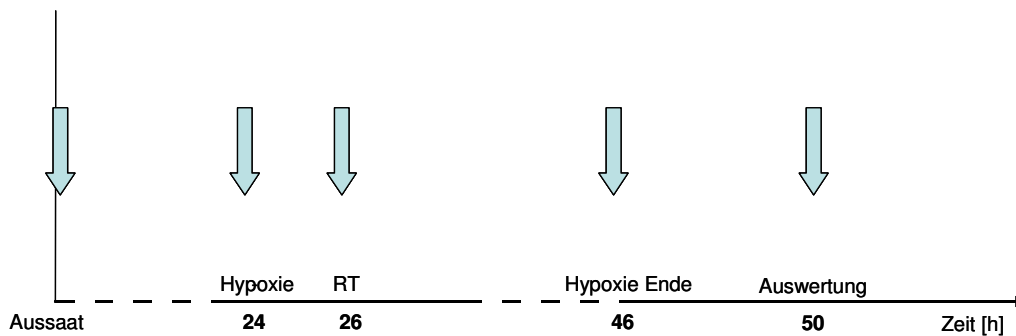


Abb. 35: Schema der Versuche zur Strahlenwirkung.

Nach Adhärenz der Zellen (24h nach Aussaat) wurden die Zellen mittels Gas Pak Pouches in starke Hypoxie (0,1% O₂) gebracht. Nach weiteren 2 Stunden erfolgte die Bestrahlung. Nach insgesamt 22 Stunden Hypoxie nahmen wir die Zellen aus den Gas Pak Pouches heraus. Die Auswertung erfolgte 50 Stunden nach Versuchsbeginn.

4. Ergebnisse

Wie Abbildung 36 a) zeigt, führte die Bestrahlung mit 10 Gy bei rund 10% der NCI-H460 Zellen in Normoxie zur Apoptose (Hoechst). Hypoxische Zellen starben ebenfalls, waren aber weniger strahlensensibel (Abb. 36 b)). In Jurkat Zellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie mit NCI-H460 Zellen (vgl. Abb. 39), allerdings bei sehr hoher Rate an Spontanapoptose, so dass die Resultate relativ schwer interpretierbar sind.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss aufsteigender Konzentrationen von YC-1 auf die Strahlen-induzierte Apoptose unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen in beiden Zelllinien untersucht. Die Hypoxie wurde wiederum 2 Stunden vor Bestrahlung in Gas Pak Pouches induziert. Es folgte eine Reoxigenierung ca. 20h nach Bestrahlung. Die Apoptoserate wurde mittels Hoechst-Färbung ermittelt.

Hypoxie alleine bewirkte in NCI-H460 Adenocarcinom Zellen eine Verdrei- bis Vervierfachung des Zellsterbens, verglichen mit der Spontanapoptose in Normoxie (vgl. Abb. 36). Bei Bestrahlung mit 10Gy in Normoxie starben etwa dreifach so viele Zellen, verglichen mit der Spontanapoptose, Bestrahlung in Hypoxie verursachte kein vermehrtes Zellsterben im Vergleich zu Hypoxie alleine. YC-1 alleine tötete in Normoxie mit steigender Dosis zunehmend mehr Zellen, bei 25µM entsprach der Effekt dem der alleinigen Bestrahlung. In Kombination mit Bestrahlung mit 10Gy verschob sich die Apoptose-Kurve um den Anteil der Apoptose durch Bestrahlung alleine nach oben (Abb. 37). Das spricht für einen additiven Effekt beider Behandlungen in Normoxie. In Hypoxie hat YC-1 alleine schon einen Effekt auf das Zellsterben, in Kombination mit Bestrahlung erhöht sich dieser Effekt minimal.

Zur besseren Darstellung der Effekte unserer Behandlungen auf die Apoptoserate erfolgte die Darstellung unserer Ergebnisse als Apoptotic Ratio (Abb. 38, 40; vgl. Weinmann et al., 2004)

4. Ergebnisse

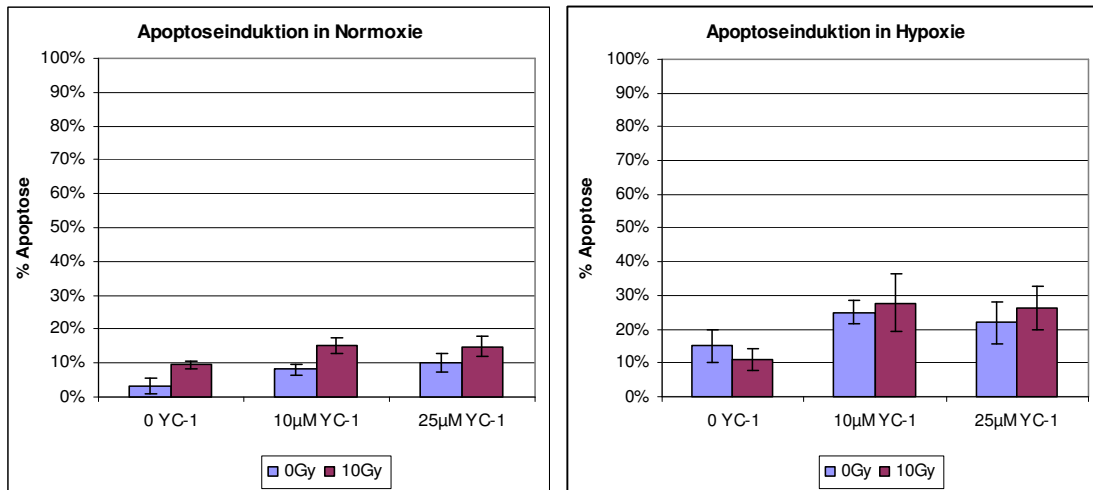


Abb. 36 a) und b): Apoptoseinduktion in NCI-H460 Adenocarcinom Zellen durch Bestrahlung in Normoxie vs. Hypoxie unter Zugabe von YC-1

Die Daten wurden nach Färbung mit Hoechst 33342 -Farbstoff durch manuelles Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Für diesen Versuch wurden Zellen in starke Hypoxie gebracht und so bestrahlt. Die Auswertung erfolgte nach 24-stündiger Inkubation in Hypoxie. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei n=3.

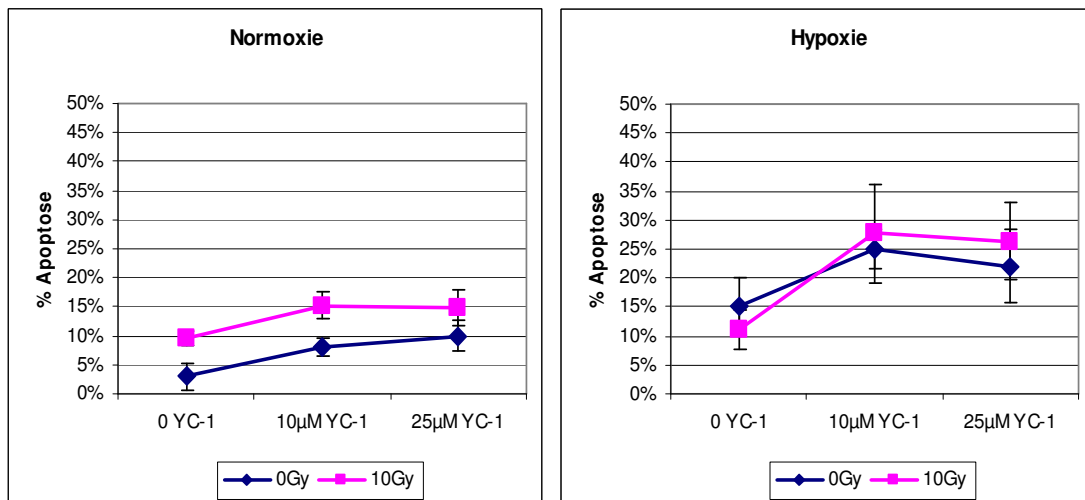


Abb. 37 a) und b): Apoptoseinduktion in NCI-H460 Adenocarcinom Zellen durch Bestrahlung in Normoxie vs. Hypoxie unter Zugabe von YC-1

4. Ergebnisse

Die Daten wurden nach Färbung mit Hoechst 33342 -Farbstoff durch manuelles Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Für diesen Versuch wurden Zellen in Anwesenheit von YC-1 in starke Hypoxie gebracht und so bestrahlt. Die Auswertung erfolgte nach 24-stündiger Inkubation in Hypoxie. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei $n=3$.

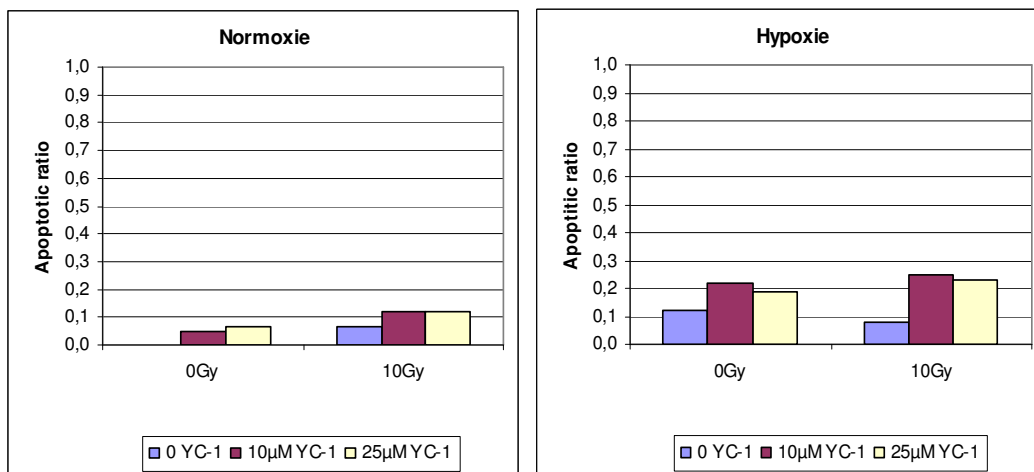


Abb. 38 a) und b): Apoptoseinduktion in NCI-H460 Adenocarcinom Zellen durch Bestrahlung in Normoxie vs. Hypoxie unter Zugabe von YC-1, Angabe als Apoptotic ratio: $(100 \times [\text{experimental apoptosis (\%)} - \text{spontaneous apoptosis (\%)}]) / [100\% - \text{spontaneous apoptosis (\%)}]$; vgl. Weinmann IJROBP 2004.

Wie Abb. 39 zeigt, führte Hypoxie alleine in etwa der Hälfte aller Jurkat Lymphom Zellen zu Apoptose. YC-1 alleine tötet ein Normoxie mit steigender Dosis zunehmend Zellen, bei 25µM waren es fast 50%. Bestrahlung mit 10 Gy in Normoxie tötete fast 20% der Zellen, Bestrahlung in Hypoxie führte hier zu keinem additiven Effekt der beiden Einzelmethoden. Die Kombination von YC-1 und Bestrahlung mit 10Gy verschob die Apoptose-Kurve um den Anteil der Apoptose durch Bestrahlung alleine nach oben. Das spricht für einen additiven Effekt beider Behandlungen. In Hypoxie hatte YC-1 alleine eher keinen zusätz-

4. Ergebnisse

lichen Effekt zur ohnehin recht hohen Zahl von Apoptosen, in Kombination mit Bestrahlung starben etwas mehr Zellen (Abb. 39 b)).

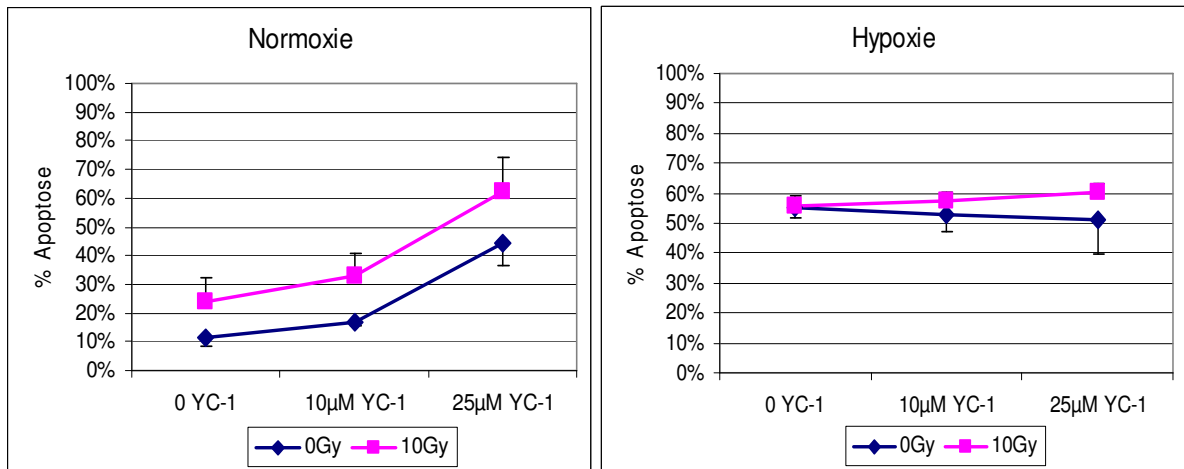


Abb. 39 a) und b): Apoptoseinduktion in Jurkat Lymphom Zellen durch Bestrahlung in Normoxie vs. Hypoxie unter Zugabe von YC-1

Die Daten wurden nach Färbung mit Hoechst 33342-Farbstoff durch manuelles Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Für diesen Versuch wurden Zellen in Anwesenheit von YC-1 in starke Hypoxie gebracht und so bestrahlt. Die Auswertung erfolgte nach 24-stündiger Inkubation in Hypoxie. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei $n=3$. Auftragung: % Apoptose bei Zugabe von YC-1 in bestrahlten vs. unbestrahlten Zellen.

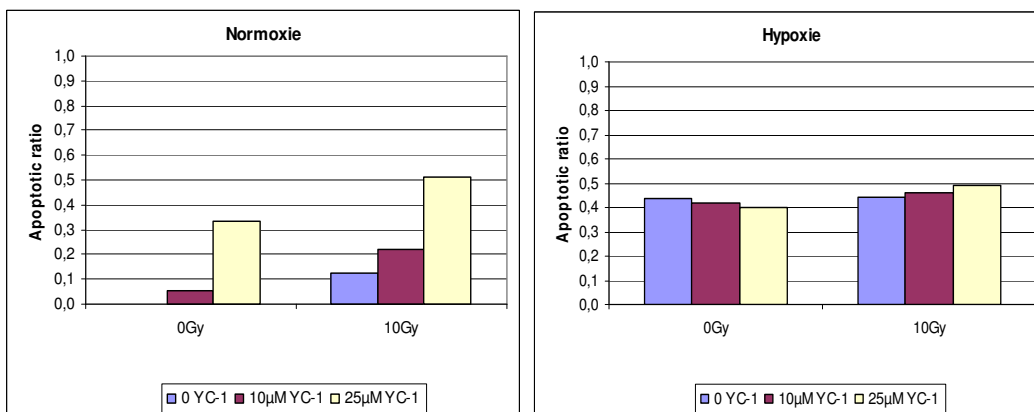


Abb. 40 a) und b): Apoptoseinduktion in Jurkat Lymphom Zellen durch Bestrahlung in Normoxie vs. Hypoxie unter Zugabe von YC-1, Angabe als Apoptotic ratio: $(100 \times [\text{experimental apoptosis (\%)} - \text{spontaneous apoptosis (\%)}]) / [100\% - \text{spontaneous apoptosis (\%)}]$; vgl. Weinmann IJROBP 2004.

4. Ergebnisse

4.3.2. Einflüsse von YC-1 auf den strahleninduzierten klonogenen Zelltod unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen

Nachdem die kurzfristigen Effekte von Hypoxie, YC-1 und Bestrahlung auf Tumorzellen untersucht worden waren, versuchten wir nun, den tatsächlichen, klinisch relevanten Zelltod in Langzeitversuchen zu ermitteln. Um die Einflüsse von YC-1 auf den strahleninduzierten klonogenen Zelltod (und damit das Zellverhalten *in vivo*) unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen näher zu untersuchen, wurden Koloniebildungs-Assays mit NCI-H460 Adenocarcinom Zellen durchgeführt.

24 Stunden nach Aussaat der Zellen wurden diese nach mit YC-1 behandelt und nach 2 Stunden mit Gas Pak Pouches in starke Hypoxie gebracht. Nach weiteren 2 Stunden wurden die Zellen bestrahlt. Die Hypoxiephase wurde nach 48 Stunden beendet, die Auswertung erfolgte nach Ausbildung von Kolonien (Vgl. Abb. 41).

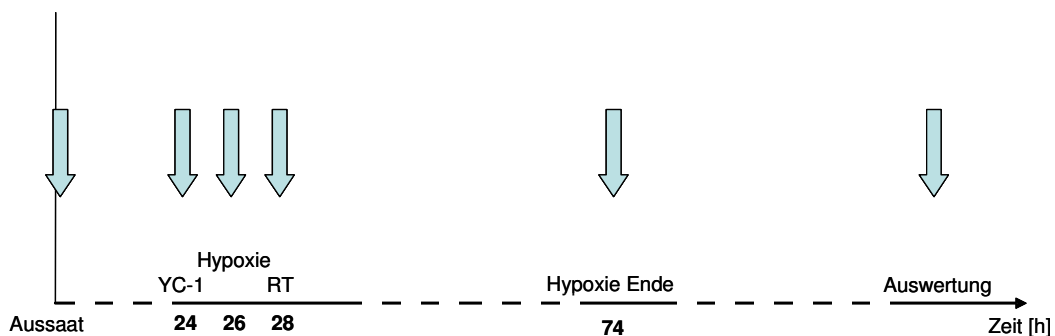


Abb. 41: Schema der Koloniebildungs-Assays.

Nach Adhärenz der Zellen (24h nach Aussaat) erfolgte die Behandlung mit YC-1, zwei Stunden später wurden die Zellen mittels Gas Pak Pouches in starke Hypoxie (0,1% O₂) gebracht. Nach weiteren 2 Stunden erfolgte die Bestrahlung. Nach insgesamt 48 Stunden Hypoxie nahmen wir die Zellen aus den Gas Pak Pouches heraus. Die Auswertung erfolgte nach der Ausbildung von Kolonien, frühestens 2 Wochen nach Aussaat.

Hypoxie alleine zeigte eine Tendenz die Anzahl an lebenden und vermehrungsfähigen Zellen im Koloniebildungs-Assay zu verringern. Trotzdem überlebten

4. Ergebnisse

genügend Zellen um weitere Aussagen über verschiedene Behandlungsmethoden zu ermöglichen.

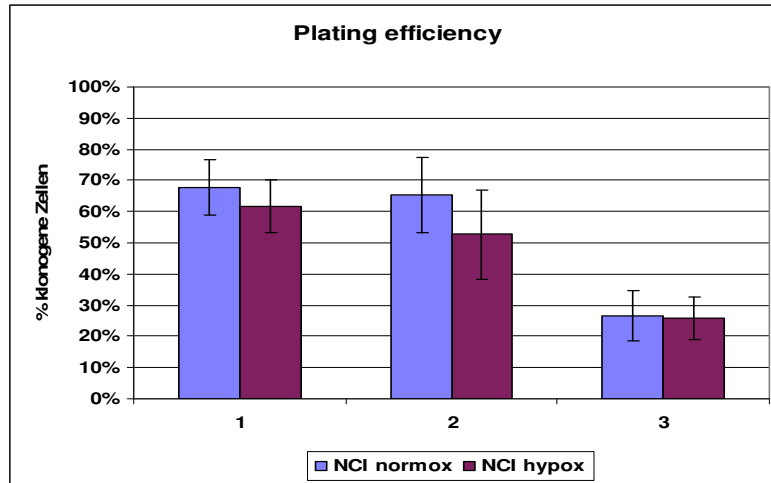


Abb. 42: Plating efficiency des Koloniebildungs-Assays.

Die Abbildung zeigt die Rate der klonogenen Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der ausgesäten Zellen in drei unabhängigen Versuchen. Für den Koloniebildungs-Assay behandelten wir Zellen nach dem Schema (Abb. 41) und zählten dann die klonogenen (= Kolonie-bildenden) Zellen aus. Man sieht, dass Inkubation in Hypoxie zu einem leichten Rückgang an lebenden Zellen führte.

Im nächsten Schritt untersuchten wir den Effekt von YC-1 in Kombination mit Bestrahlung auf NCI-H460 Adenocarcinom-Zellen in Normoxie oder Hypoxie. YC-1 führte zur Eradikation klonogener Zellen. YC-1 alleine tötete bei einer Dosis von 50µM etwa 70% der Zellen. Es verstärkte seine antineoplastische Wirkung mit steigender Dosierung in normoxischen Zellen nur mäßig, hier deutete sich ein „ceiling-Effekt“ an, das bedeutet, dass die Rate an Zelltod sich durch vermehrte YC-1 Zugabe nicht mehr proportional steigern ließ. Bestrahlung alleine tötete bei 10 Gy bis zu 99,8% der Zellen ab. Die Kombination von YC-1 mit Bestrahlung in steigender Stärke führte zu verstärkter Eradikation klonogener Tumorzellen. Die Kombination ließ sich am ehesten als additiver Effekt beschreiben (vgl. Abb 43 a), b)). Dies wird vor allem deutlich, wenn man die Steigung der Kurven in Abb. 43 betrachtet: Bestrahlung führt mit höherend

4. Ergebnisse

Dosen zu einem Steilerwerden der Kurve, steigende Dosen YC-1 verschieben die Kurven dagegen parallel. Der YC-1 Effekt wirkt also additiv zum bekannten Effekt der Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen.

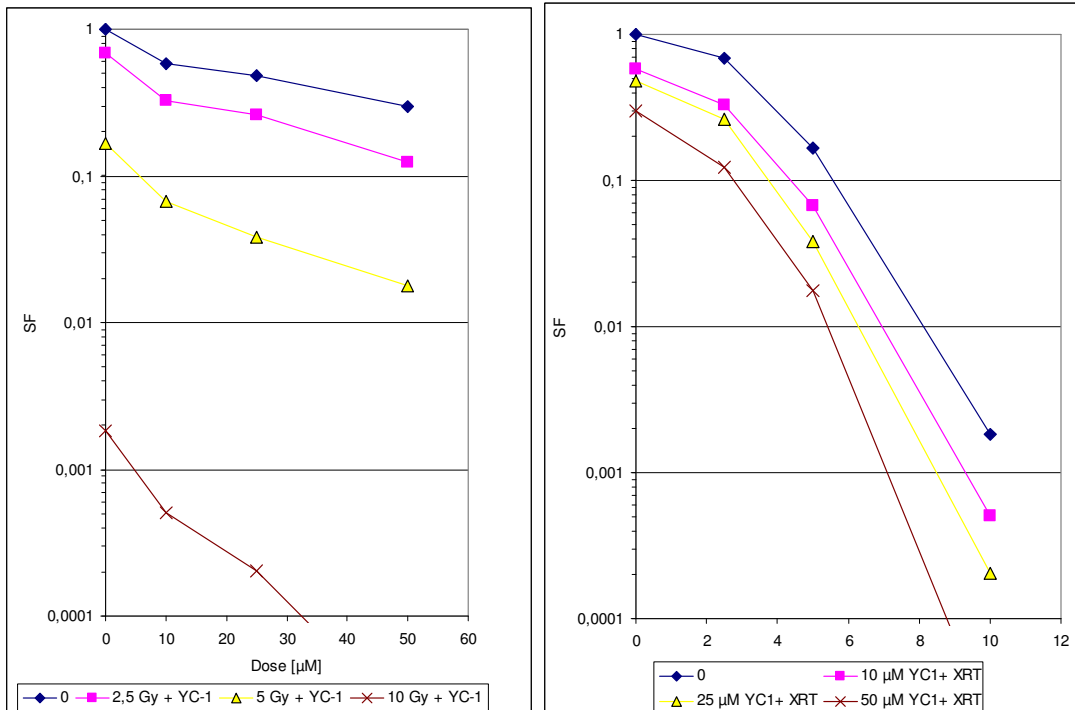


Abb. 43 a), b): Auswirkungen der Bestrahlung unter Zugabe von YC-1 auf das klonogene Überleben von NCI-H460 Adenocarcinom-Zellen in Normoxie.

Die Analyse des klonogenen Überlebens erfolgte mittels Kolonie-Bildungs-Assay, die Abbildungen zeigen die surviving fraction (SF) der Zellen. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei $n=3$.

a) Auftragung der surviving fraction der mit steigenden Dosen bestrahlten Zellen gegen die Menge des zugegebenen YC-1. b) Auftragung der surviving fraction der mit steigenden Mengen YC-1 behandelten Zellen gegen die Bestrahlungsdosis.

Die Eradikation klonogener Zellen stieg mit steigender YC-1 Konzentration wie auch mit steigender Bestrahlungsdosis.

In starker Hypoxie verstärkte YC-1 seine antineoplastische Wirkung mit steigender Dosierung und in Kombination mit Bestrahlung in steigender Stärke (Abb.

4. Ergebnisse

44). Im Vergleich zur Normoxie waren die Effekte jedoch geringer ausgeprägt. Hohe Bestrahlungsdosen wirkten effektiver auf klonogene Zellen als hohe YC-1 Dosen. Bestrahlung allein wirkte auch in Hypoxie auf Tumorzellen, der Effekt war aber deutlich schlechter als in Normoxie (Abb. 44 a)). Auch YC-1 bewirkte in Hypoxie einen Zellkill, der im Vergleich zur Wirkung in Normoxie sogar ausgeprägter war (Abb. 44 b)). Vergleicht man die Kombinationskurven, sieht es so aus als verschiebe die Kombination von Bestrahlung und YC-1 die Überlebenskurve der Zellen ungefähr parallel sowohl gegenüber der Bestrahlung als auch gegenüber YC-1 alleine.

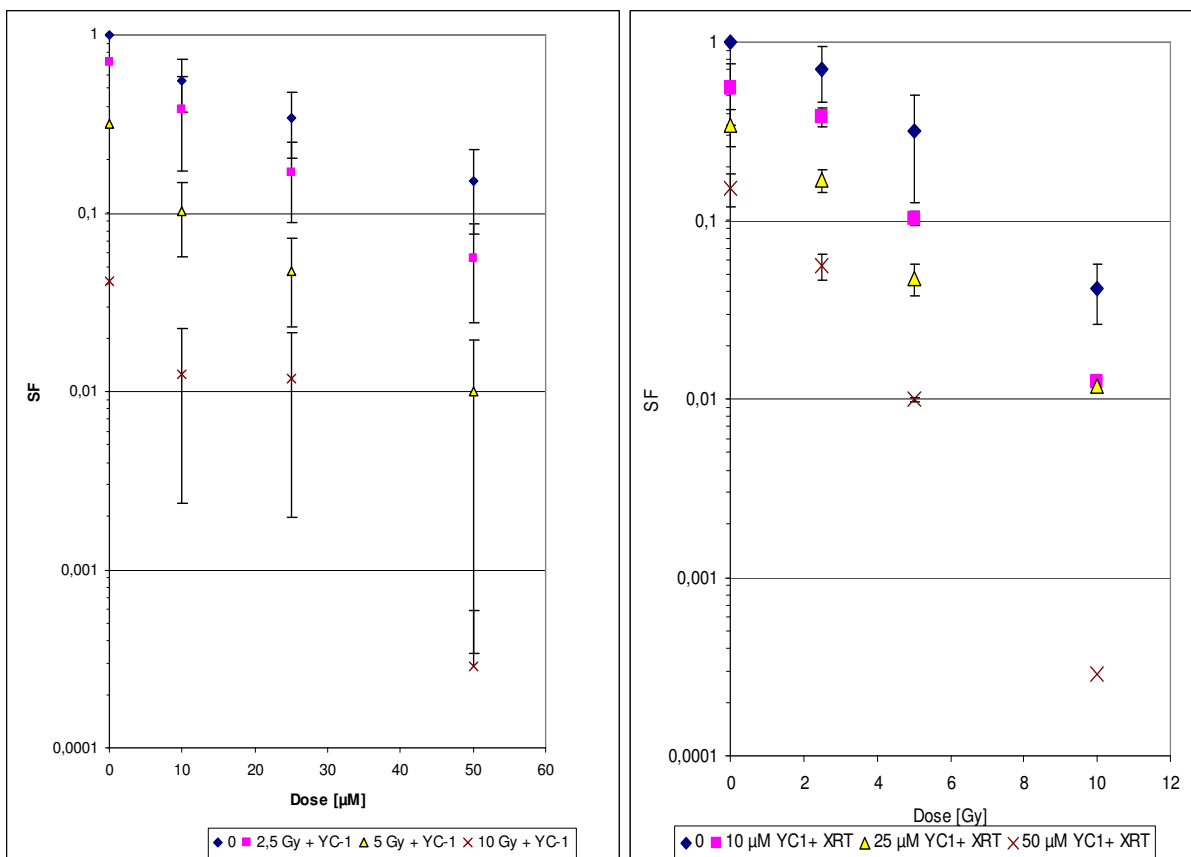


Abb. 44 a), b): Auswirkungen der Bestrahlung unter Zugabe von YC-1 auf das klonogene Überleben von NCI-H460 Adenocarcinom Zellen in starker Hypoxie (0,1% O₂).

Erhebung der Daten mittels Kolonie-Bildungs-Assay, die Abbildungen zeigen die surviving fraktion der Zellen. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei n=3. a) Auftragung der surviving fraktion

4. Ergebnisse

der mit steigenden Dosen bestrahlten Zellen gegen die Menge an zugegebenem YC-1. b) Auftragung der surviving fraktion der mit steigenden Mengen YC-1 behandelten Zellen gegen die Bestrahlungsdosis.

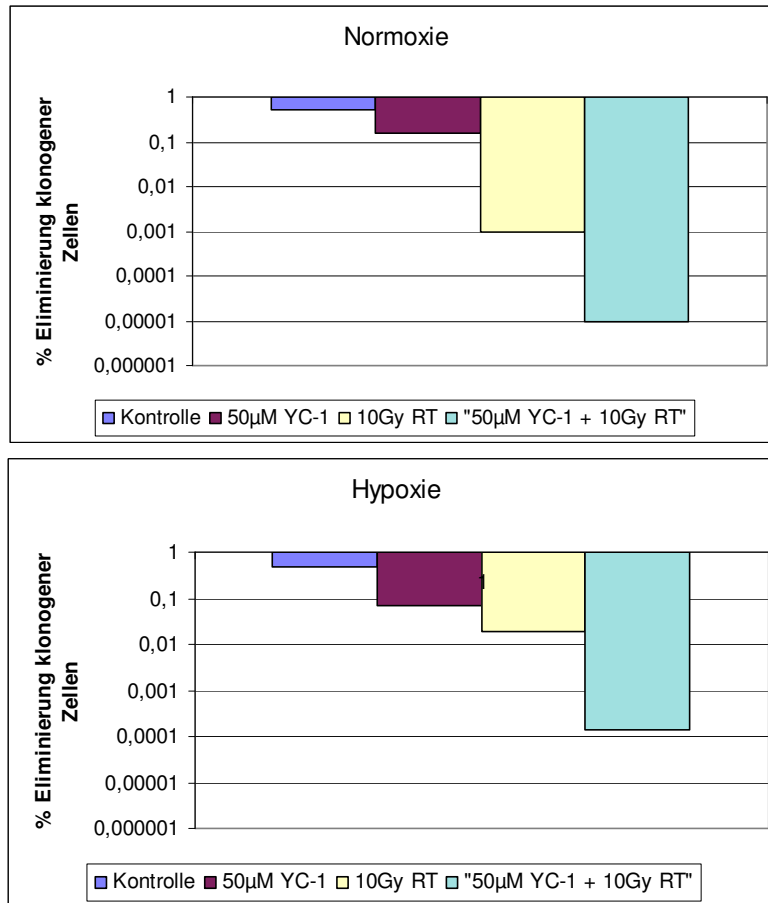


Abb. 45, 46: Relativer zusätzlicher Beitrag von YC-1 zum radiogenen Zelltod in Normoxie und Hypoxie in NCI-H460 Adenocarcinom-Zellen

Erhebung der Daten mittels Kolonie-Bildungs-Assay, die Abbildungen zeigen eine Gegenüberstellung der Daten aus den Berechnungen der surviving fraction. Gezeigt wird der Anteil an eliminierten Zellen unter maximaler Dosis der Bestrahlung wie auch YC-1. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei n=3.

4.4. Wirkung von YC-1 auf hypoxie-selektionierte therapieresistente Tumorzellen

Bei unseren Versuchen versuchten wir bislang immer, die direkten Effekte von Hypoxie auf Tumorzellen und deren Auswirkungen auf unterschiedliche Aspekte des Zell(über-)lebens und des Zelltodes zu beschreiben. Dies sind besonders die Auswirkung der Hypoxie auf die Sensitivität gegenüber Bestrahlung und YC-1. Nun fragten wir uns, in wieweit YC-1 auf Zellen mit Therapieresistenz durch Hypoxie-vermittelte Selektion wirkt. Betrachtet man die tatsächlichen hypoxischen Areale solider Tumoren in vivo sieht man, dass diese Zellen einen ständigen Wechsel hypoxischer und normoxischer Bedingungen unterworfen sind. Es stellt sich also die Frage, ob die beobachteten Phänomene wirklich durch die reine Hypoxie oder durch den Wechsel von Hypoxie und Reoxigenierung bedingt sind. Um diesen Aspekt zu untersuchen wurden Hypoxie-selektionierte Zellen ausgesät (vgl. Weinman et al 2005).

4.4.1. Wirkung von YC-1 auf die Hypoxie-induzierte Aktivierung von HIF

HIF-1 ließ sich in hypoxie-selektionierten NCI-H460 Adenocarcinom Zellen nur unter normoxischen Bedingungen nachweisen. Unter hypoxischen Bedingungen schien es, anders als in nicht selektionierten Zellen, nicht vorhanden zu sein. In Normoxie war HIF-1 bei Zugabe von YC-1 deutlich vermindert. In Hypoxie hatte YC-1 keinen sichtbaren Effekt (Daten nicht gezeigt).

4.5. Wirkung von YC-1 auf den Zellzyklus unter Normoxie und Hypoxie in NCI H 460 Zellen nach hypoxischer Selektion

Analog zu den Versuchen mit nicht selektionierten Zellen (vgl. 4.2.3.) stimulierten wir unsere Zellen mit verschiedenen Konzentrationen YC-1, brachten die Zellen in starke Hypoxie und bestrahlten mit 10 Gy. Die Auswertung erfolgte im Durchflusszytometer (Nicoletti- Färbung) nach 24 bzw. 48 Stunden Hypoxie.

24stündige Hypoxie führte zu einer Verminderung der Zellzahl in G1/G0 und G2 in den Kontrollzellen. Der Anteil der Zellen in der S-Phase stieg an, ebenso die Anzahl der hyperploiden Zellen (Abb. 48). Die Zahl der apoptotischen Zellen veränderte sich nicht deutlich, während im Versuch mit nicht-selektionierten Kontrollzellen die Zahl der apoptotischen Zellen anstieg (vgl. Abb. 12). In

4. Ergebnisse

Normoxie zeigte DMSO alleine deutliche Effekte: Es verschob Zellen aus der S-Phase in G1/G0 und erhöhte die Zahl der hyperploiden Zellen deutlich. YC-1 in steigender Dosierung erhöhte den Anteil der hyperploiden und apoptotischen Zellen (Abb. 49). In Hypoxie zeigte sich der beschriebene DMSO-Effekt nicht. In milder Hypoxie verminderte YC-1 tendenziell eher den Anteil der Zellen in S und erhöhte den Anteil der G2 Zellen ebenso wie der apoptotischen und (nicht so deutlich) der hyperploiden Zellen (Abb. 50). Diese Ergebnisse zeigten sich in drei räumlich und zeitlich voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen (vgl. Standardabweichung). Starke Hypoxie und YC-1 zeigten ähnliche Ergebnisse wie bei milder Hypoxie (Abb. 51). In der Kontrolle hatten wir in milder Hypoxie kaum Veränderungen und in starker Hypoxie eine Verschiebung von Zellen aus G1/G0 zugunsten von G2 unter YC-1 Zugabe beobachtet.

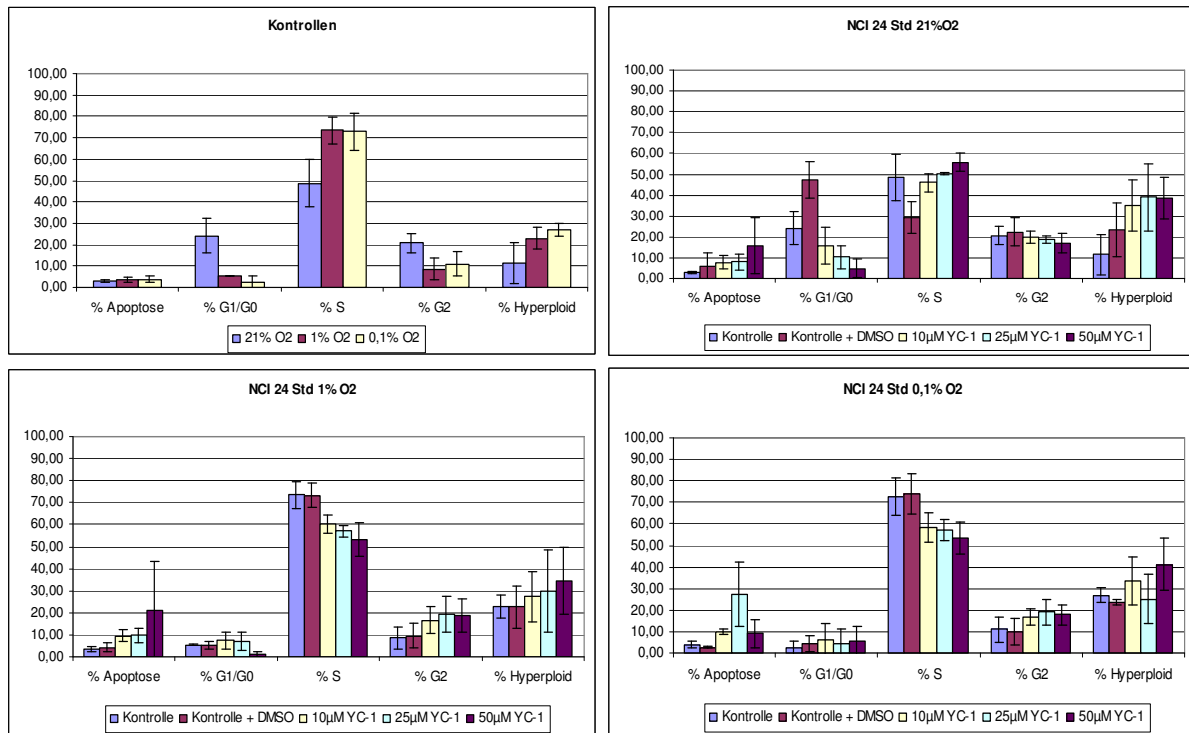


Abbildung 48-51: Zellzyklusanalyse von Hypoxie-selektionierten NCI-H460 Adeno-Carcinom Zellen in Anwesenheit von YC-1

Die Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat mit YC-1 behandelt, nach weiteren 2 Stunden erfolgte die Einleitung von Hypoxie. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h werteten wir die Daten mit Hilfe von Durchflusszytometrie (Nicoletti-Färbung) aus. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

4. Ergebnisse

chung dargestellt bei n=3. Als Kontrolle dienen unbehandelte Hypoxie-selektionierte NCI-H460 Zellen.

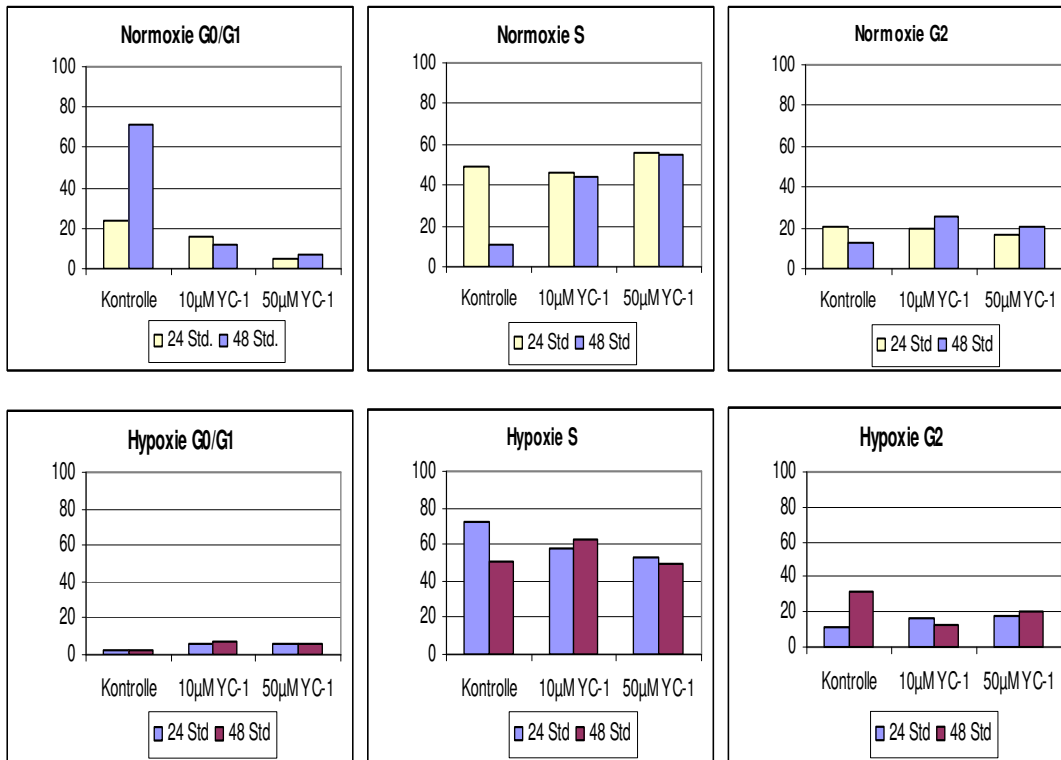


Abb. 52 a) bis f): Zeitverlauf der Zellverteilungen in die einzelnen Zellzyklusphasen in Normoxie und starker Hypoxie (0,1% O₂)

Verteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen entsprechend der umgebenden Sauerstoffkonzentration unter Zugabe von YC-1. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei n=3. Als Kontrolle dienen unbehandelte Hypoxie-selektionierte NCI-H460 Zellen.

48stündige Hypoxie erhöhte leicht die Apoptoserate und deutlich die Zahl der Hyperploiden Zellen. Sie drängte Zellen massiv aus der G1/G0 Phase (Abb. 53). Die Gesamtzahl der Zellen in G2 erhöhte sich bei starker Hypoxie (Abb. 54, 56). Das bedeutet vermehrten Zelltod verglichen mit nicht-selektionierten Zellen. In Normoxie wie in Hypoxie bewirkte YC-1 eine stark vermehrte Apoptose. Insgesamt waren die Veränderungen unter YC-1 Zugabe aber vergleichbar mit denen der nicht-selektionierten Kontrollzellen (Abb. 55, 56).

4. Ergebnisse

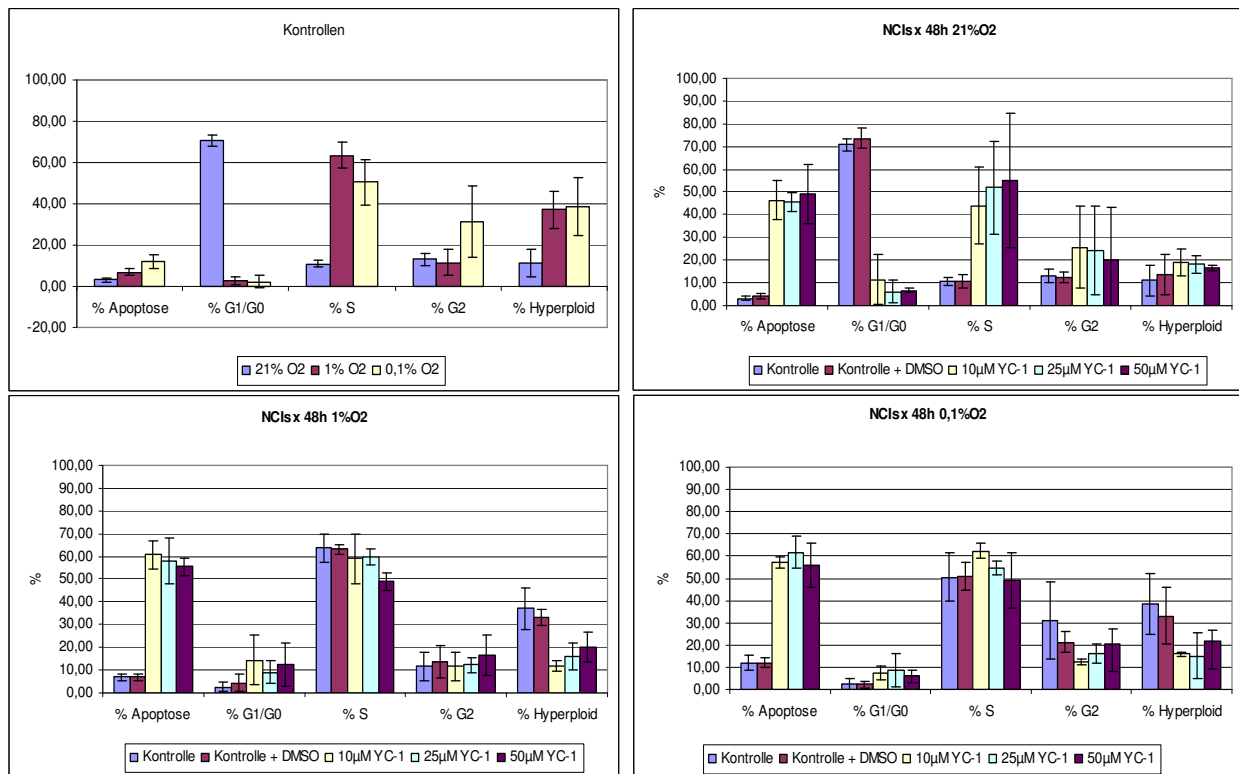


Abbildung 53-56: Zellzyklusanalyse von hypoxie-selektierten NCI-H460 Adenocarcinom Zellen in Anwesenheit von YC-1

Die Die Zellen wurden 48 Stunden nach Aussaat mit YC-1 behandelt, nach weiteren 2 Stunden erfolgte die Einleitung von Hypoxie. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h werteten wir die Daten mit Hilfe von Durchflusszytometrie (Nicoletti-Färbung) aus. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei $n=3$. Als Kontrolle dienen unbehandelte Hypoxie-selektierte NCI-H460 Zellen.

4.6. Koloniebildung

Analog zu unseren Untersuchungen an nicht selektierten Zellen untersuchen wir die Sensibilität von selektierten NCI-H460 Adenocarcinom Zellen gegenüber Bestrahlung und YC-1. Nach Adhärenz (nach 24 Stunden) wurden die Zellen nach Schema (vgl. Abb. 41) mit YC-1 behandelt und nach 2 Stunden mit Gas Pak Pouches in starke Hypoxie gebracht. Nach weiteren 2 Stunden wurde bestrahlt. Die Hypoxiephase wurde nach 48 Stunden beendet, die Auswertung erfolgte frühestens nach 2 Wochen.

4. Ergebnisse

In Normoxie zeigten selektionierten NCI-H460 Adenocarcinom Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Bestrahlung im Vergleich zu hypoxischen Bedingungen. Bestrahlung tötete Zellen ebenfalls ungefähr exponentiell. Hypoxische Zellen starben erst bei höheren Bestrahlungsdosen als normoxische, selektionierte eher als nicht-selektionierte (Vgl. Abb. 57, 58).

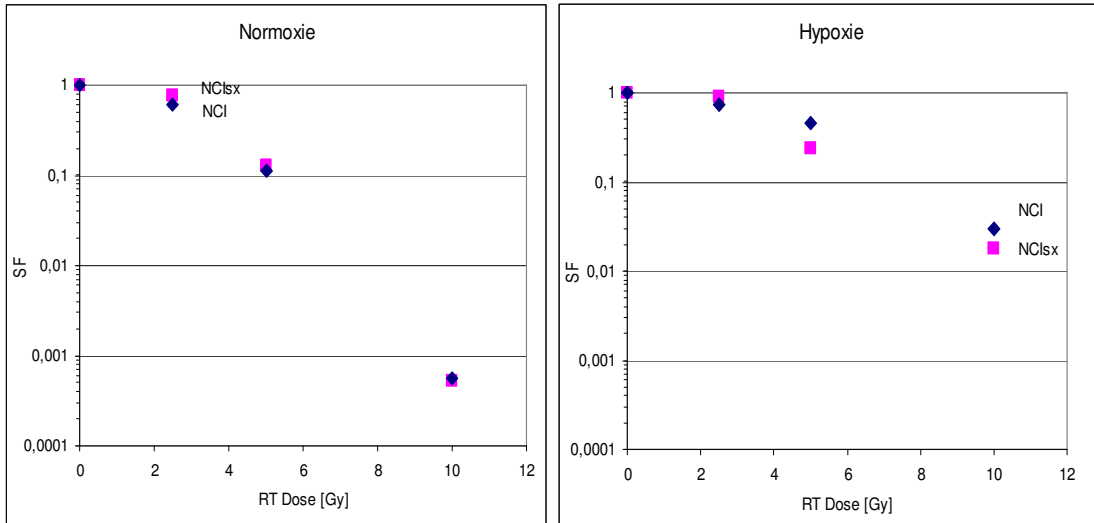


Abb. 57, 58: Vergleich des klonogenen Überlebens hypoxie-selektionierter vs. nicht-selektionierter NCI-H460 Adenocarcinom Zellen.

Erhebung der Daten mittels Kolonie-Bildungs-Assay (vgl. Abb. 41), die Abbildungen zeigen die surviving fraction der selektionierten vs. nicht selektionierten Zellen. Errechnet wurde der Anteil an überlebenden klonogenen Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der ausgesäten Zellen. Auswertung eines repräsentativen Einzelversuchs aus n=3. NCI = NCI-H460 Adenocarcinom Zellen, NCIsx = NCI-H460 Adenocarcinom Zellen nach hypoxischer Selektion.

YC-1 tötete Tumorzellen mit exponentiell angenäherter Kurve, in normoxischen wie auch in hypoxischen Zellen. Dabei war das Zellüberleben unabhängig von der Konzentration in den selektionierten Zellen etwas geringer als in der nicht-selektionierten Kontrolle (Abb. 59). Bei hypoxie-selektionierten NCI-H460 Adenocarcinom Zellen verstärkte YC-1 seine antineoplastische Wirkung in Normoxie mit steigender Dosierung nur mäßig, der Effekt der kleinsten Dosis

4. Ergebnisse

gegenüber der nicht behandelten Kontrolle war allerdings auch hier deutlich (Abb. 59 b)).

YC-1 wirkte in selektionierten Zellen besser als in nicht-selektionierten Zellen, die surviving fraction war in Normoxie größer als in Hypoxie (sowohl bei selektionierten wie bei nicht-selektionierten Zellen). Wir sahen also eine Tendenz zu verbesserter YC-1 Wirkung in Hypoxie gegenüber Normoxie (Abb. 59).

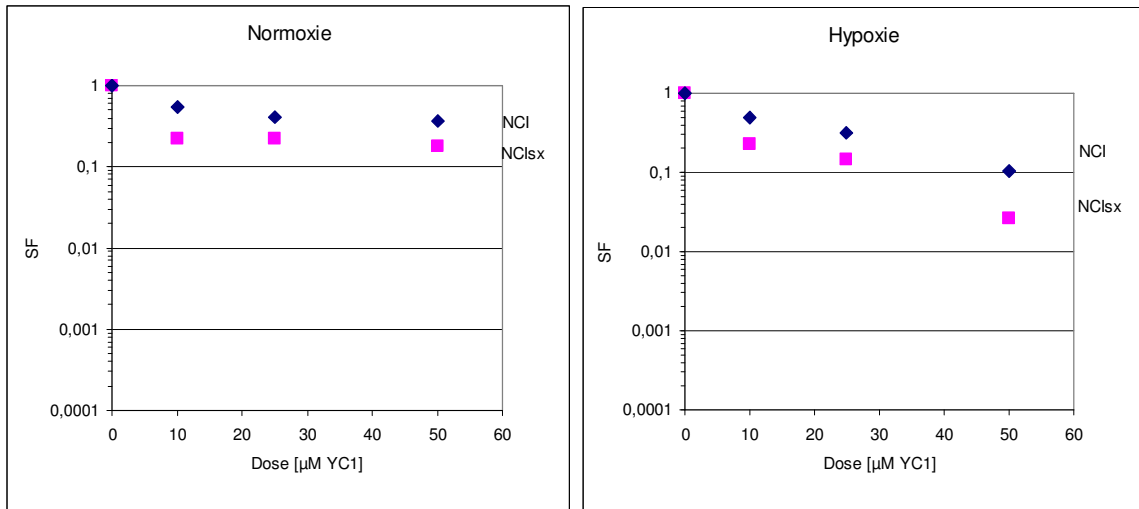


Abb. 59 a)-b): Vergleich des klonogenen Überlebens hypoxie-selektionierter vs. nicht-selektionierter NCI-H460 Adenocarcinom Zellen.

Erhebung der Daten mittels Kolonie-Bildungs-Assay, die Abbildungen zeigen die surviving fraction der selektionierten vs. nicht selektionierten Zellen. Auswertung eines repräsentativen Einzelversuchs aus n=3.

4. Ergebnisse

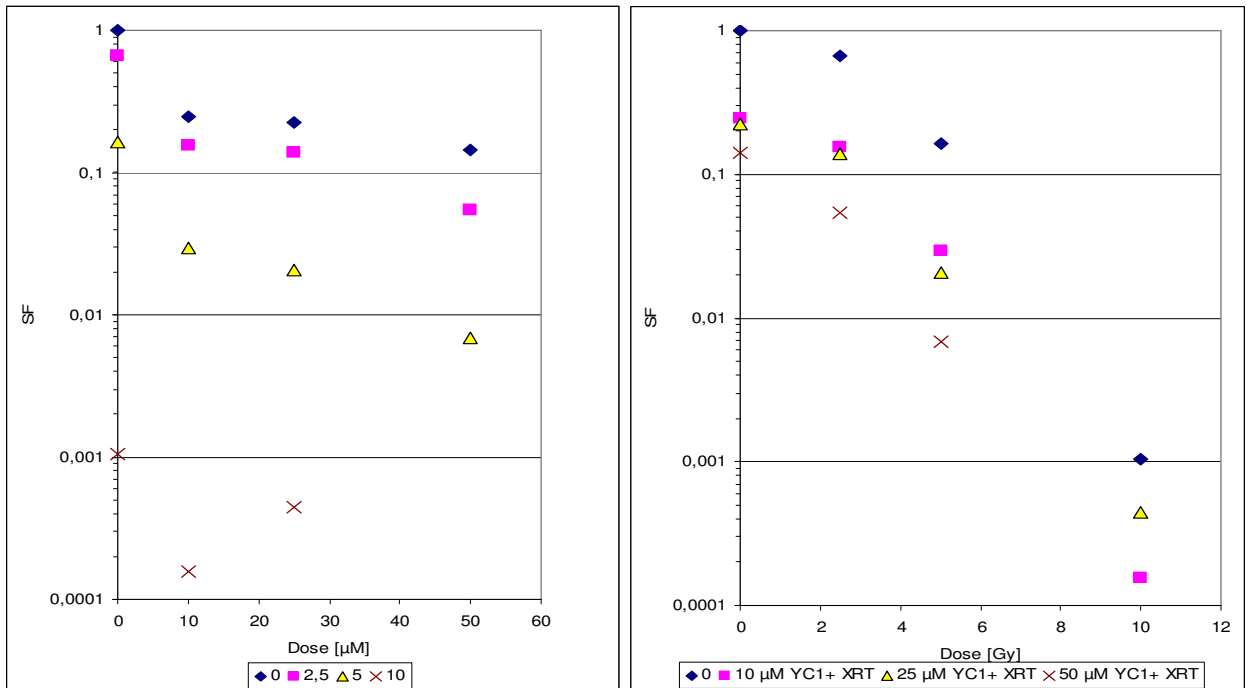


Abb. 60, 61: Auswirkungen der Bestrahlung unter Zugabe von YC-1 auf das klonogene Überleben hypoxie-selektionierter NCI-H460 Adenocarcinom Zellen in Normoxie.

Erhebung der Daten mittels Kolonie-Bildungs-Assay, die Abbildungen zeigen die surviving fraktion der Zellen. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei $n=3$. Abb. 60: Auftragung der surviving fraktion der mit steigenden Dosen bestrahlten Zellen gegen die Menge zugegebenes YC-1. Abb. 61: Auftragung der surviving fraktion der mit steigenden Mengen YC-1 behandelten Zellen gegen die Bestrahlungsdosis.

In Hypoxie verstärkte YC-1 seine antineoplastische Wirkung mit steigender Dosierung, vor allem der Effekt der kleinsten Dosis gegenüber Kontrolle war deutlich. In Kombination mit Bestrahlung in steigender Stärke blieb der zusätzliche Effekt allerdings etwa gleich. 10 μM YC-1 und 5 Gy waren etwa gleich effektiv. 10 Gy töteten 53mal so viele Zellen wie die unbehandelte Kontrolle, 50 μM YC-1 27mal so viele (Abb. 62, 63).

4. Ergebnisse

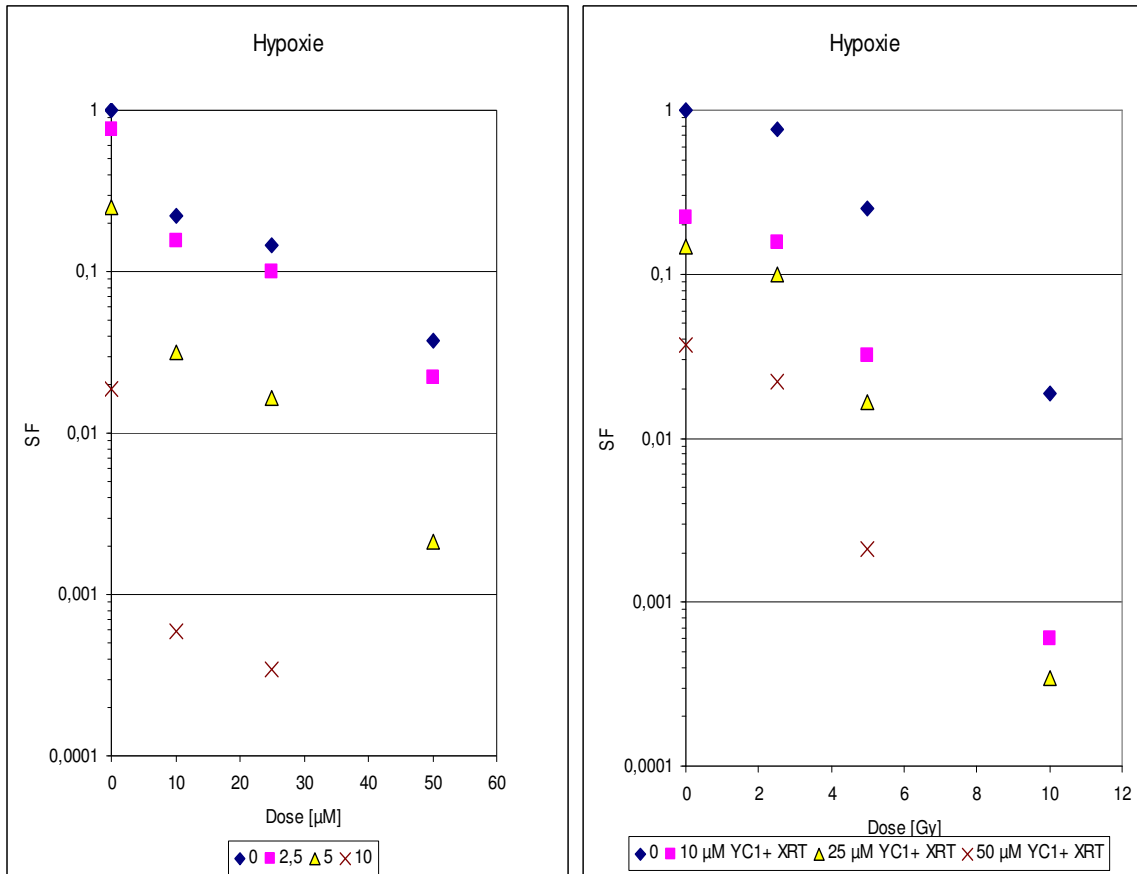


Abb. 62, 63: Auswirkungen der Bestrahlung unter Zugabe von YC-1 auf das klonogene Überleben hypoxie-selektionierter NCI-H460 Adenocarcinom Zellen in Hypoxie.

Erhebung der Daten mittels Kolonie-Bildungs-Assay, die Abbildungen zeigen die surviving fraktion der Zellen. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei $n=3$. Abb. 62: Auftragung der surviving fraktion der mit steigenden Dosen bestrahlten Zellen gegen die Menge zugegebenes YC-1. Abb. 63: Auftragung der surviving fraktion der mit steigenden Mengen YC-1 behandelten Zellen gegen die Bestrahlungsdosis.

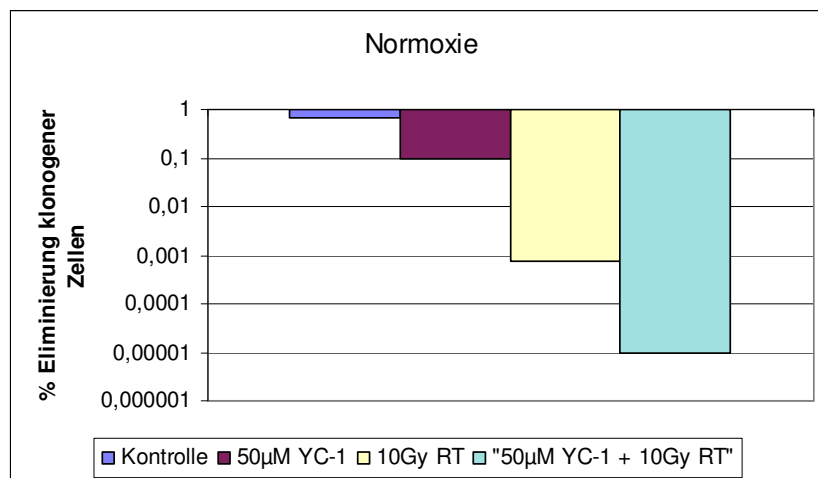
Um nun den Effekt unserer beiden Behandlungen, Bestrahlung (Abb. 60, 61) und Zugabe von YC-1 (Abb. 62, 63) miteinander vergleichen und gegeneinander aufrechnen zu können, ermittelten wir zuletzt den Anteil eliminerter klonogener Zellen unter beiden Behandlungsmodalitäten sowie unter der Kombination beider Methoden.

4. Ergebnisse

Abb. 64 zeigt, dass von den unbehandelten Zellen im Koloniebildungsassay etwa 99,9% überlebten, die entspricht einer nativen Zelltodrate von 0,1%. Unter der Kombination beider Behandlungen in deren Maximaldosis überlebten 0,001% der ausgesäten Zellen, das entspricht einer Zelltodrate von 99,999%. Nur Radiatio mit 10 Gy überlebten 0,1%, nur Behandlung mit 50 µM YC-1 10% der klonogenen Zellen.

Zieht man jeweils die native Zelltodrate ab, kommt man auf einen Zellkill von 99,8% für Bestrahlung mit 10 Gy und von 89,9% für Behandlung mit 50µM YC-1. Auch im Koloniebildungsassay ergibt sich somit ein additiver Effekt beider Behandlungsmodalitäten in der Kombination.

In Hypoxie ergibt sich eine native Zelltodrate von ebenfalls etwa 0,1%, hier kommt man nach Abzug des Spontanzelltodes auf einen Zellkill von 98,8% für Bestrahlung mit 10 Gy und von 94,9% für Behandlung mit 50µM YC-1. Die Kombination tötete entsprechend insgesamt 99,9988% der Zellen war somit also geringfügig weniger effektiv als die Kombinationsbehandlung in normoxischen Zellen.



4. Ergebnisse

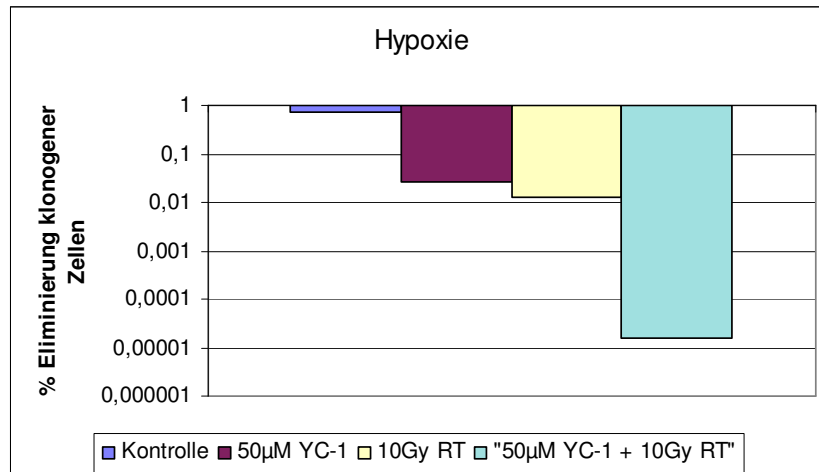


Abb. 64, 65: Relativer zusätzlicher Beitrag von YC-1 zum radiogenen Zelltod in Normoxie und Hypoxie

Erhebung der Daten mittels Kolonie-Bildungs-Assay, die Abbildungen zeigen den Anteil der eradizierten Zellen. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte dargestellt bei n=3.

5. Diskussion

5.1. Die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 für die hypoxie-induzierte Strahlenresistenz von Tumorzellen

Tumorzellen in akuter aber auch in wechselnden Phasen chronischer Hypoxie sind deutlich resistenter gegenüber Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen als Zellen, die ausreichend mit Sauerstoff versorgt sind (Höckel et al., 1998; Höckel et al., 1999; Sundfor et al., 2000; Nordmark et al., 2001). Gleichzeitig weist die Mehrzahl aller soliden Tumore zumindest Regionen mit erniedrigten Sauerstoffpartialdrücken auf (Vaupel et al., 1998). Dies ist eines der großen aktuellen Probleme der Strahlentherapie. Eine zentrale Rolle in diesem Anpassungsprozess spielt der Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktor HIF-1 (hypoxia inducible factor 1), der nicht nur die Anpassung zellulärer Stoffwechselfvorgänge an Sauerstoff-reduzierte Umgebungsbedingungen reguliert, sondern auch an zahlreichen anderen regulatorischen Vorgängen beteiligt ist.

Im direkten Nachweis von HIF-1 zeigte sich YC-1 als potenter Gegenspieler des zelleigenen HIF-1. Mit dessen Nachweis im Western Blot etablierten wir YC-1 für unsere Versuchsreihe als HIF-1 Inhibitor. Auch in der Literatur wurde YC-1 bereits verschiedentlich als HIF-1 Inhibitor beschrieben (Yeo 2003), jedoch bislang nicht in den von uns verwendeten Zelllinien. Die Hemmung der HIF-1 Expression geschieht auf post-transkriptionaler Ebene, YC-1 reduziert sowohl die Menge an zellulär exprimierter mRNA von downstream-targets wie EPO und VEGF in hypoxischen Zellen (Yeh et al., 2007) als auch die DNA-Bindungsaktivität und die Aktivität von HIF-1 als Transkriptionsfaktor (Yeo et al., 2003, Chun et al., 2003). Wir konnten auch nachweisen, dass die Hypoxie-vermittelte Hochregulation verschiedener HIF-1 abhängiger Proteine durch Einsatz von YC-1 deutlich vermindert werden kann, deutlich vor allem beim HIF-1 abhängigen Glukosetransporter GLUT-1, der bei Sauerstoffmangel vermehrt in die Zellmembran eingebaut wird, um so die Versorgung mit Energie zu verbessern. In dem von uns verwendeten Zellsystem lag die zur Suppression von HIF-1 benötigte Menge bei etwa 25 bis 50µM, eine Dosis die deutlich über der in der

5. Diskussion

Literatur beschriebenen Dosierung liegt (Yeo 2003; Park 2000). In der Folge konnten wir einige Eigenschaften von YC-1 zum ersten Mal zeigen, vor allem eine spezifische Zelltoxizität, die so noch nicht beschrieben wurde. Wir vermuten hier eine dosisabhängige Nebenwirkung der Substanz. Die Wirkungen der toxischen Trägersubstanz DMSO konnten wir durch Ansätze, in denen DMSO in weniger als 0,1%iger Konzentration vorlag, minimieren.

Nun untersuchten wir mittels Durchflusszytometrie den Effekt von Hypoxie auf den regelhaften Ablauf des Zellzyklus in unserer Zellpopulation.

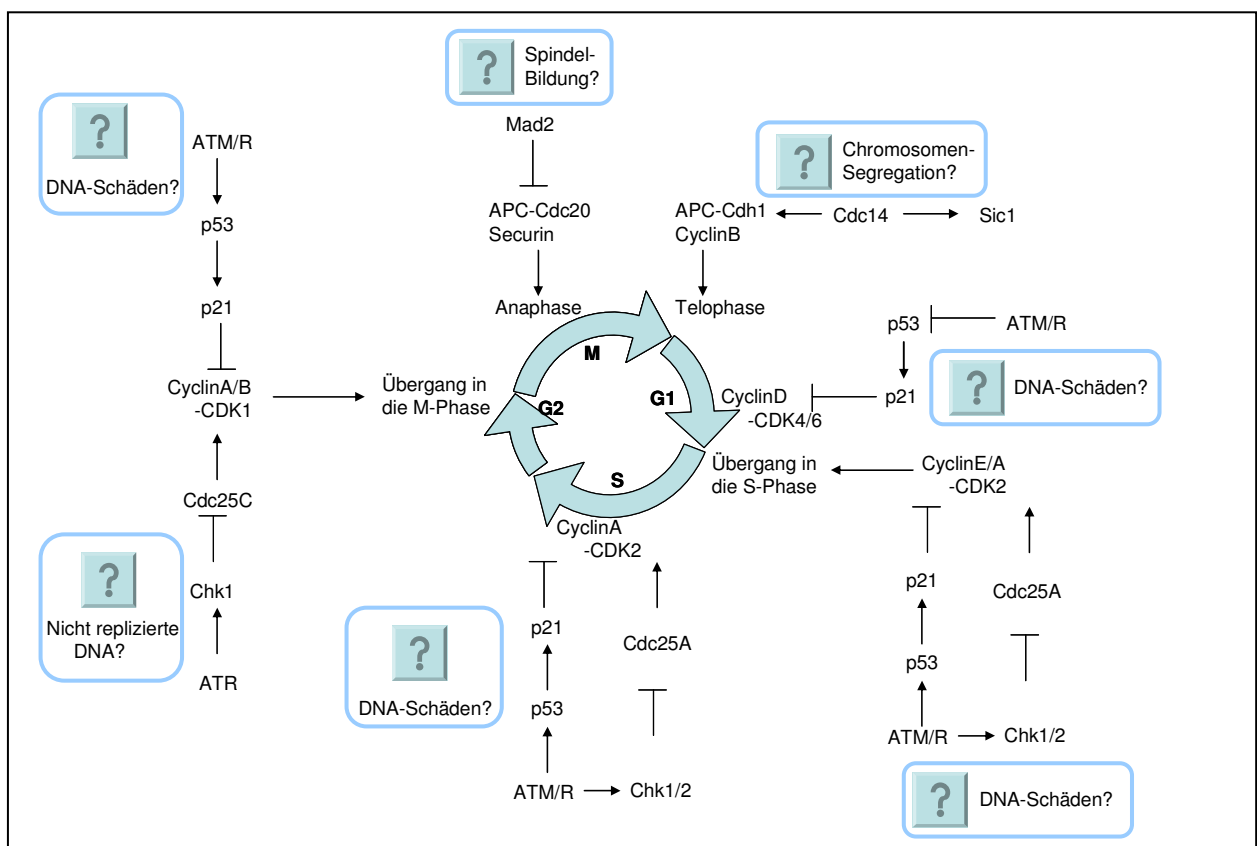


Abb. 66: Übersicht über Regulationsvorgänge des Zellzyklus

Der Zellzyklus beschreibt die Lebensabschnitte einzelner Zellen, dabei wird dieser Zyklus ein oder mehrmals durchlaufen, zum Teil mit sehr langen Pausen in denen die Zelle sich nicht teilen kann. An wichtigen Punkten dieses Zyklus, an denen über Proliferation oder Zelluntergang entschieden wird, wird über verschiedene Mechanismen kontrolliert, ob die Zelle Schäden erlitten hat. Diese Kontrollpunkte entscheiden über die weiteren molekularen Vorgänge, die die

5. Diskussion

Apoptose-Einleitung oder aber die Zellteilung beginnen. Diese Kontrollpunkte sind damit grundlegende Voraussetzung für eine Selbstkontrolle der Zellen und entscheidend für das Erkennen von DNA-Schäden.

Modifiziert nach Daniel et al.

Bei der Analyse der Auswirkungen der YC-1 Behandlung auf die Zellproliferation konnten wir zeigen, dass sich in Hypoxie das Wachstum der Tumorzellen deutlich verlangsamt, abhängig von der verbleibenden Sauerstoff-Konzentration. Die Behandlung unserer Zellen mit YC-1 führte in Normoxie wie in Hypoxie zu einer weiteren Abnahme des Anteils an lebenden Zellen, diese Zelltoxizität nahm bei steigenden Dosen YC-1 zu und führte zeitabhängig zum Untergang aller lebenden Zellen in unserer Population. Insgesamt werten wir unsere Versuchsergebnisse dahingehend, dass Hypoxie die Proliferationsfähigkeit nativer Tumorzellen zeitabhängig und nicht alleine durch Expression von HIF-1 hemmt, da in unseren Versuchen der Einsatz des HIF-1 Inhibitors YC-1 eher zu einem weiteren Zelluntergang als zu dessen Hemmung führte. Auf Grund der Zytotoxizität von YC-1 auch in Normoxie kann man sicher auch argumentieren, dass es zu einem Zelluntergang durch YC-1 selbst kommt, der die geringe Hemmung der Hypoxie-vermittelten Proliferationshemmung überlagert. Insgesamt scheint es jedoch, dass HIF-1 Expression alleine keine Auswirkung auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen hat und es sich in erster Linie um eine dosisabhängige Zytotoxizität von YC-1 handelt, die nicht mit dessen HIF-1 hemmender Wirkung in Zusammenhang steht.

Betrachtet man Zellen in hypoxischer Umgebung, so sieht man, dass die erste Folge einer Hypoxie die Induktion von p53 darstellt. Falls der betroffene Zellklon bezüglich p53 noch intakt ist, führt dieser normale Regulationsmechanismus zum G1-Arrest, und damit letztendlich zur Apoptose im zentralen, unterversorgten Tumorgewebe (Amellem et al., 1998; el Deiry, 1998). Tritt im p53-Gen eine inaktivierende Mutation auf, wird ein überlebensfähiger Zellklon hervorgehen. Solchermaßen veränderte Zellen akkumulieren rasch weitere Mutationen (Schmitt et al. 2002).

5. Diskussion

In unseren Untersuchungen verschob Hypoxie den Ablauf des Zellzyklus, eine Reaktion die wir durch Einsatz unseres HIF-1 Inhibitors, YC-1, umkehren konnten. Dies deckt sich mit den bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Wang 2004; Goda 2002, Yeo 2006). Unsere Ergebnisse zeigen auch, dass es möglich ist, diese Mechanismen zu manipulieren. Hypoxie führt in den von uns untersuchten Tumorzellen zu einem deutlich verlangsamten Zellzyklus mit einer scheinbaren Blockade der Zellen in G0/G1. Diese Beobachtung entsprach ebenfalls unseren Erwartungen, da akute Hypoxie schlechte Bedingungen für vermehrte Zellteilungen bietet. Diesen Effekt konnten wir durch Zugabe von YC-1 weitgehend verhindern, die behandelten hypoxischen Zellen verhielten sich im Versuch ähnlich wie die unbehandelte normoxische Kontrolle. Diese Beobachtung bestätigt frühere Untersuchungen, dass der verzögerte Zellzyklus eine direkt HIF-1-vermittelte Reaktion auf Hypoxie darstellt. Das heißt, unter akuter Hypoxie greift HIF-1 direkt in die Steuerungszyklen für den regelrechten Zellzyklus ein. YC-1 induziert dagegen einen Arrest von Zellen in der S-Phase (vgl. auch Yeo et al., 2006), dieser Effekt überwindet offenbar die Hypoxie-induzierte Blockade in G0/G1.

In Folge untersuchten wir nun die Effekte von YC-1 auf die Zelltodrate unserer Zelllinien und insbesondere auf die Apoptose-Einleitung. Apoptose kann grundlegend durch zwei Mechanismen initiiert werden: Von außen vermittelt (extrinsisch) oder durch intrazelluläre Schäden hervorgerufen (intrinsisch).

5. Diskussion

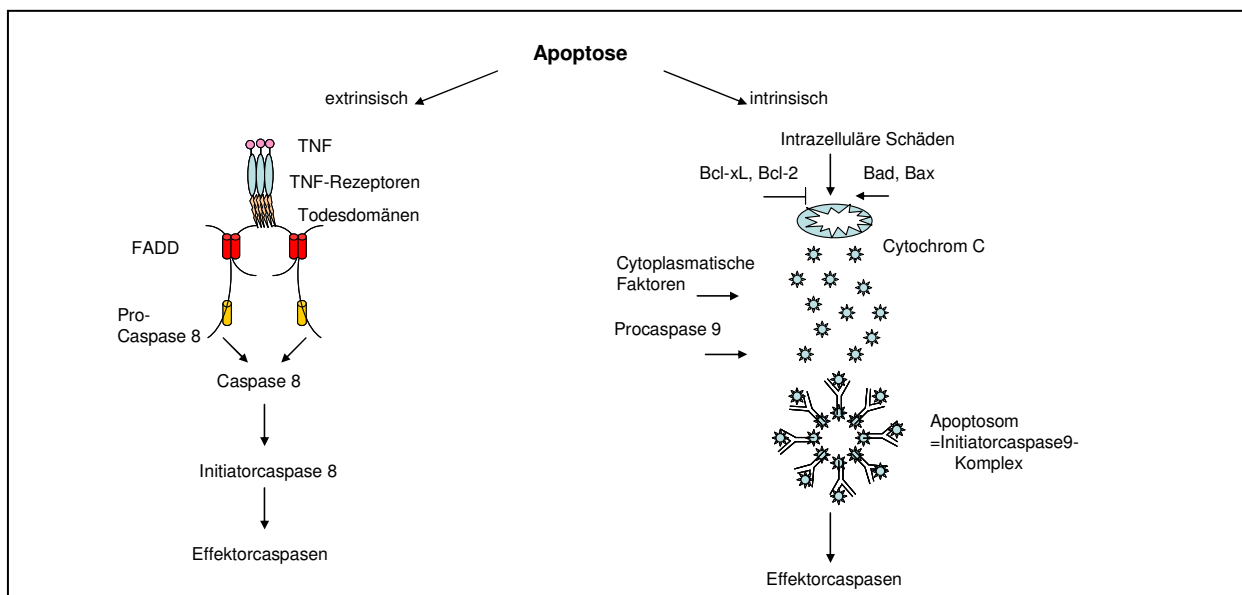


Abb. 67: Übersicht über Vorgänge bei der extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Einleitung

Der extrinsische Weg wird eingeleitet durch Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie. Beim intrinsischen Weg kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Dieser Weg kann ausgelöst werden durch Tumorsuppressoren, wie beispielsweise p53, das die Expression pro-apoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2 Familie (z. B. Bax, Bad) stimuliert. Dieser Weg spielt bspw. bei Zytostatika-Therapie, ionisierender oder UV-Strahlung eine Rolle.

Modifiziert nach Daniel et al.

Unter Behandlung mit YC-1 stieg die Zelltodrate in NCI-H460 Adenocarcinom- und Jurkat Lymphomzellen deutlich an. In Hypoxie ist das Zellsterben hoch, wie auch bei den Versuchen zur Proliferation zeigt Zugabe von YC-1 einen zusätzlichen Effekt auf den Zelluntergang, es ist aber schwer zu differenzieren ob diese Wirkung in Zusammenhang mit der Hemmung der HIF-1 Regulation steht. Um zu zeigen, dass es sich bei dem beobachteten Zelluntergang tatsächlich um Apoptose handelt, wiesen wir das Apoptose-spezifische Protein PARP, resp. dessen Spaltungsprodukt nach. Dessen Expressionsmuster bestätigte unsere Ergebnisse, die wir mittels Immunfluoreszenzfärbung gewonnen hatten.

5. Diskussion

Um weiteren Aufschluss über die Regulation der Hypoxie-induzierten Apoptose und ihre Abhängigkeit von HIF-1 zu bekommen untersuchten wir die Expression verschiedener Apoptose-relevanter Proteine wie Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL und einige BH3-only Proteine. Dabei zeigte Bax und auch Bcl-2 selbst als antiapoptotisches Protein keine Veränderung der Expression, weder durch Hypoxie noch durch YC-1. Bak wie auch BH3-only Proteine (BID, BIM) zeigten eine geringe Hypoxie-induzierte Verringerung der Expression, durch HIF-1 Inhibition durch YC-1 konnte dieses eher nicht verändert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit in der Literatur beschriebenen Veränderungen (Sermeus 2008), auch hier zeigten sich gering ausgeprägte Veränderungen der Proteine, die dort jedoch unter HIF-1 Suppression (hier durch siRNA) nicht mehr nachzuweisen waren. Bcl-xL, das eine anti-apoptotische Funktion ausübt, in dem es Bak und Bax hemmt, konnten wir unter zunehmend hypoxischen Bedingungen vermindert nachweisen. Auch dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die den Verlust der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL als Voraussetzung für Hypoxie-induzierten Zelltod ansehen (Shroff 2007).

In der Expression einiger Proteine wie Bad, Cyclin D1 und Akt zeigte sich eine zum Teil geringe Verminderung der Expression durch Hypoxie, die zum Teil durch YC-1 aufgehoben wurde. Die unterschiedlichen Funktionen dieser Proteine erlauben es aber nicht, daraus zu schließen, über welche Signalwege HIF-1 Apoptose und Zellzyklusveränderungen beeinflusst.

CDK4 zeigte als einziges der von uns untersuchten Proteine eine ausgeprägt verminderte Expression in Hypoxie und einen deutlichen Anstieg nach Zugabe von YC-1. Dieser Effekt scheint tatsächlich durch HIF-1 und dessen Hemmung induziert zu sein, da die Zugabe von YC-1 in Normoxie eher zu einem Abfall von CDK4 führt.

CDK4 ist ein zentrales Protein der Steuerung des Zellzyklus und ist notwendig um einen vom Protein pRB gebundenen weiteren Transkriptionsfaktor (E2F) freizusetzen, der den Zellzyklus weiterführt. HIF-1 Induktion verlangsamt also den Zellzyklus durch die Freisetzung von CDK4. Vergleicht man das mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung von Zellen in Hypoxie

5. Diskussion

und unter YC-1 Zugabe scheint es, dass der oben beschriebene G1/G0-Arrest in Hypoxischen Zellen tatsächlich CDK4-vermittelt ist und sich durch die Verringerung der CDK4-Expression durch HIF-1 Hemmung aufheben lässt.

Nachdem wir zeigen konnten, dass YC-1 in Normoxie, aber vor allem in Hypoxie zytotoxisch wirkt, stellten wir uns die Frage was passiert, wenn man diese beiden Modalitäten mit ionisierenden Strahlen verbindet. In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass der HIF-1 Inhibitor YC-1 die Strahlenresistenz hypoxischer Tumorzellen verringerte. In unseren Händen zeigten NCI-H460 Adeno-Carcinom und Jurkat T-Lymphom Zellen in Hypoxie eine verminderte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung. Betrachtet man die Wirkung ionisierender Strahlen auf Tumorzelllinien, die in Normoxie kultiviert wurden im Vergleich zu Tumorzellen in hypoxischer Umgebung, zeigt sich, dass unter den normoxischen Kontrollzellen der Anteil der geschädigten Zellen viel höher ist als unter den Zellen in sauerstoffarmer Umgebung (vgl. auch Gatenby et al. 1988; Brizel et al. 1997; Brizel et al. 1999; Nordmark and Overgaard 2000). Die Zugabe von YC-1 ergab bei den normoxischen Zellen eine erhöhte Zytotoxizität beider Behandlungen (YC-1 und Bestrahlung), dies entspricht in etwa einem additiven Effekt. In Zellen unter Hypoxie zeigt sich ein sogar überadditiver Effekt der Kombination. Hier könnte eine HIF-1 Hemmung zur Überwindung der Hypoxie-vermittelten Strahlenresistenz beitragen.

In der Literatur ist eine verminderte Strahlenresistenz in Hypoxie unter HIF-1 Hemmung bereits vorbeschrieben (Höckel et al., 1998; Höckel et al., 1999; Sundfor et al., 2000; Nordmark et al., 2001). Trotzdem kann man zusätzliche andere Wege der zellulären Beeinflussung nicht gänzlich ausschließen.

Der Vergleich unserer Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppe stützt jedoch unsere Annahme, dass HIF-1 als zentrales Molekül der zellulären Anpassung an Hypoxie auch für die Hypoxie-induzierte Strahlenresistenz in erster Linie verantwortlich ist (Yasui 2008).

5. Diskussion

Nachdem wir die Wirkung der Kombination Hypoxie-YC-1-Bestrahlung in Kurzzeitassays gezeigt hatten, versuchten wir nun, die Auswirkungen auf klinisch relevante Endpunkte mittels Kolonie-Bildungs-Assay zu bestimmen. Unsere Versuche zu den Effekten von Bestrahlung und YC-1 in NCI-H460 Adenocarcinom Zellen belegten in Normoxie eine deutliche Wachstumsreduktion durch Bestrahlung mit bis zu 10 Gy und einen schwächeren Effekt von YC-1. In Kombination beider Behandlungen verstärken sich die anti-neoplastischen Effekte. Dies deutet auf eine HIF-1 unabhängige Wachstums-hemmende Wirkung von YC-1 auf maligne Zellen hin.

In starker Hypoxie zeigte sich auch im Kolonie-Bildungs-Assay deutlich die geringere Wirksamkeit einer alleinigen Bestrahlung während YC-1 in etwa die gleiche Wirksamkeit wie in normoxischen Zellen hatte, in höheren Dosen sind die Effekte etwas deutlicher. Möglicherweise addieren sich hier HIF-1 abhängige und unabhängige Effekte.

Wir untersuchten auch Zellen, die in mehreren Zyklen starker Hypoxie und anschließender Reoxygenierung dahingehend selektioniert wurden, dass Stress-resistentere Zellen erzeugt wurden (Weinmann et al. 2004). Dieses Verfahren ist in ähnlicher Form ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben (Dong and Wang 2003). Die zugrunde liegende Idee ist dabei, dass nicht angepasste Zellen in starker Hypoxie schnell absterben und nur Zellen, die beispielsweise von vorne herein eine erhöhte HIF-Expression haben, sich an die veränderten Umgebungsbedingungen adaptieren. Setzt man also Zellen wiederholten Zyklen starker Hypoxie und anschließender Reoxygenierung aus, so erhöht sich der relative Anteil Hypoxie-resistenter Zellen. Diese Zellen zeigten in unseren Versuchen überraschenderweise ein eher verlangsamtes Wachstum, allerdings auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Stressoren wie Hypoxie oder Bestrahlung. Man könnte sich also vorstellen, dass diese Zellen weniger teilungsfreudig sind, weil sie in dieser Phase sensitiver gegenüber Schädigung sind oder auch weil sie überleben können, wenn viele Stoffwechselfvorgänge zurückgefahren wurden. Auch Dong and Wang fanden 2003 ein verlangsamtes

5. Diskussion

Wachstum Stress-selektierter Zellen kombiniert mit einer erhöhte Resistenz gegenüber erneutem Zell-Stress.

Wir untersuchten jetzt die Hypoxie-selektionierte Population auf ihr Proliferationsverhalten unter HIF-Blockade mittels YC-1 in Normoxie. Proliferation und Zelluntergang dieser Zellen glichen unbehandelt dem Verhalten nicht-selektio- nierter Zellen in Hypoxie, gibt man YC-1 hinzu, entspricht ihre Radiosensitivität der der nicht-selektionierten normoxischen Kontrolle. Es scheinen also tatsäch- lich in Hypoxie-selektionierten Zellen Stoffwechselfvorgänge abzulaufen, die den Anpassungsvorgängen von Tumorzellen in Hypoxie entsprechen, auch wenn wir eine Erhöhung des HIF-1 Spiegels in den von uns selektionierten Zellen nicht direkt nachweisen konnten. Trotzdem ließen sich diese Anpassungsvor- gänge durch Zugabe von YC-1 umkehren.

In der Hypoxie-selektionierten Zellpopulation stieg unter normoxischen Bedin- gungen der Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen deutlich im Vergleich zur nicht-selektierten Kontrolle. Hypoxie verstärkte diesen Effekt noch deutlich, während die Zellen in G1/G0 deutlich abnahmen. Durch Zugabe von YC-1 konnten wir in Normoxie die Zellpopulation in G1/G0 etwas verringern, auch nahm der Anteil der apoptotischen und hyperploiden Zellen zu. Dies überrascht nicht, bedenkt man, dass andere Arbeitsgruppen bereits einen Anstieg der Zel- len in der S-Phase durch YC-1 beschrieben (Yeo et al., 2006). Diese Ergeb- nisse stützen unsere Annahme, dass unsere Zellen nach Selektion HIF-1 konsitutionell überexprimieren und durch HIF-1 Blockade in die S-Phase über- führt werden, wie es Yeo et al. in nicht-selektionierten Zellen unter hypoxischen Bedingungen bereits beschrieben. Das Ergebnis passt auch zu der Tatsache, dass sich die verringerte Strahlensensibilität der selektierten Zellen durch die Zugabe von YC-1 aufheben ließ wie auch zur von uns nachgewiesenen HIF-1 Expression in normoxischen selektierten Zellen.

Als wir unsere selektierten Zellen in milde bis starke Hypoxie brachten, nahm die Zahl der Zellen in G0/G1 deutlich weiter ab, der YC-1 vermittelte Anstieg der

5. Diskussion

Zellen in S kehrte sich um. Dies zeigt eine gegenteilige Wirkung von YC-1 bei hypoxie-selektionierten Zellen unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen. In anderen Modellsystemen (Dong and Wang 2003) wurde zunächst eine ausgeprägte Apoptose-Resistenz selektierter Zellen gesehen, und zwar sowohl gegenüber Hypoxie als auch gegenüber verschiedenen Zytostatika. Einflüsse auf den Zellzyklus wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Dagegen konnten Wang et al. ebenfalls einen Zellzyklus- und Wachstumsarrest von HCC-Zellen unter Behandlung mit YC-1 nachweisen (Wang et al. 2004). Nimmt man die Tatsache dazu, dass wir HIF-1 in selektierten hypoxischen Zellen im Western Blot nicht nachweisen konnten, scheint es nachvollziehbar, dass die Hemmung von HIF-1 in Zellen, die kein HIF-1 exprimieren, nicht wirksam ist.

Kolonie-Bildungs-Assays zeigten bei hypoxie-selektionierten Zellen ein ähnliches Verhalten wie in Kontrollzellen. Beide Zelltypen zeigten unter Behandlung mit YC-1 und Bestrahlung eine deutliche Verminderung der Zahl an klonogenen Zellen sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie, wobei eine Behandlung allein nicht zum völligen Zelluntergang führt und Bestrahlung alleine eine stärkere Wirkung zeigte als die alleinige Behandlung mit YC-1. Beide Zellarten wiesen eine ausgeprägte Ähnlichkeit der Kurvenform unter Hypoxie resp. Normoxie auf. In Hypoxie wurde jedoch der zusätzliche Zelluntergang durch Bestrahlung geringer, durch YC-1 stärker im Vergleich zur normoxischen Kontrolle.

Diese Ergebnisse untermauern unsere Aussage, dass hypoxie-selektierte Zellen Stress-resistenter bei Bestrahlung sind als normale Zellen. Weshalb die Behandlung mit ionisierenden Strahlen bei beiden Zelllinien aber kaum Unterschiede zeigt ist weniger offensichtlich. Da Tumorzellen ohnehin eine ganze Reihe von Erbgut-schädigenden Ereignissen durchlaufen müssen um zu entarten, könnte es sein, dass die zusätzliche wiederholte Hypoxie weniger Effekte auf Tumoren *in vitro* hat als es im Experiment zunächst den Anschein hatte. Durch den Koloniebildungs Assay ist es möglich, ein relativ genaues Abbild der Ereignisse in tatsächlichem Tumorgewebe zu erhalten, da er uns die Möglichkeit bietet, mit der Klonogenität auch längerfristige Einflüsse zu erfassen.

5. Diskussion

sen, während direkte Messungen des Zelltods Zellen, die zwar nicht sofort untergehen aber nicht mehr reproduktionsfähig sind, nicht erfassen können. Da der Erhalt der Klonogenität nicht nur vom direkten Zelluntergang sondern auch von subletalen Schädigungen und Verschiebungen des Zellzyklus abhängt, kann das gleiche Ergebnisse durch verschiedene Prozesse ausgelöst werden. Für die Evaluation der Sensitivität gegenüber YC-1 bedeutet dies eine bessere Darstellung der tatsächlichen Abläufe innerhalb eines soliden Tumors, da wir durch Koloniebildungs Assays die Möglichkeit haben, die Zahl der lebenden und klonogenen Zellen zu erfassen und bessere Vorhersagen über die benötigte Dosis des Pharmacons zu treffen. Sieht man dagegen lediglich den tatsächlichen Zelluntergang können Schäden, die erst zu einem späteren Zeitpunkt manifest werden, leicht übersehen werden.

5.2. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der postulierte HIF-1 Inhibitor YC-1 die hypoxie-induzierte Expression von HIF-1 und HIF-1 regulierter Gene vermindert. Hypoxie alleine führte zu einer Reduktion der Zellproliferation, starke Hypoxie dagegen zur Induktion der Apoptose in Jurkat- und NCI-H460-Zellen, was mit mitochondrialen Veränderungen und der Aktivierung von Caspasen einherging. YC-1 verminderte das Wachstum von Tumorzellen in Normoxie und verstärkte den Hypoxie-induzierten Wachstumsarrest. Darüber hinaus wirkte YC-1 selbst zytotoxisch und verstärkte die hypoxie-induzierte Apoptose. Mögliche Mediatoren der YC-1 vermittelten zytostatischen und zytotoxischen Wirkung sind zum einen die von uns angestrebte HIF-1 Hemmung in hypoxischen Zellen, zum anderen scheint es aber auch eine HIF-1 unabhängige Zytotoxizität zu geben, hier kann man sich gut vorstellen, dass das zumindest teilweise an der Trägersubstanz DMSO liegt.

YC-1 verstärkte die Wirkung ionisierender Strahlung und verminderte die Hypoxie-vermittelte Strahlenresistenz von Adenocarcinom und Lymphom Zellen. Die Steigerung der Zytotoxizität ionisierender Strahlung war sowohl in Kurzzeitassays zur Apoptose-Induktion als auch in Langzeitversuchen zu beobachten. Hypoxie bewirkte eine Verschiebung von Zellen aus G2 in G0/G1 im Zellzyklus, ein Effekt, der sich durch YC-1 umkehren ließ. In der Analyse Hypoxie-selektio- nierter Zellen ließen sich Veränderungen des Zellzyklus-Verhaltens nachweisen, die denen nicht-selektionierter hypoxischer Zellen ähnelten und sich ebenfalls durch YC-1 umkehren ließen.

Interessanterweise war YC-1 in der Lage, die Apoptoseresistenz Hypoxie-selektionierter Tumorzellen gegenüber Stimuli des mitochondrialen Apoptoseweges zu überwinden. Die Kombination aus Bestrahlung und YC-1 erzielte in den Hypoxie-selektionierten Zellen vergleichbare Effekte wie in nicht selektionierten normoxischen Zellen.

6. Abkürzungen

6. Abkürzungen

DNA	=	Deoxyribonucleic Acid
PDGF	=	platelet derived growth factor
TGF α/β	=	tumor growth factor α/β
GF	=	growth factor
Her2/neu	=	<u>h</u> uman <u>e</u> pidermal growth <u>r</u> eceptor <u>2</u>
pRb	=	Retinoblastomprotein
PI3K	=	phosphatidylinositol 3 kinase
PKB	=	Proteinkinase B
AIDS	=	acquired immunodeficiency syndrome
BSE	=	bovine spongiforme Enzephalopathie
UV	=	ultraviolett
ER	=	endoplasmatisches Reticulum
NF κ B	=	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
FADD	=	Fas Associated Death Domain
HIF	=	hypoxia inducible factor
VHL	=	von Hippel-Lindau Protein
VEGF	=	vascular endothelien growth factor
EPO	=	Erythropoetin
YC1	=	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole
cGMP	=	zyklisches Guanosinmonophosphat
RNA	=	ribonucleic acid
FACS	=	Fluorescence Activated Cell Sorter
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
TMRE	=	Tetramethylrhodaminethylester
PARP	=	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
Foxo	=	<i>forkhead box o</i> -Transkriptionsfaktoren
X-iap	=	human X chromosome linked Inhibitor of Apoptosis Protein
RT	=	Strahlung (Radiatio)

7. Literatur

- Afford S, R. S. (2000). "Apoptosis." *J Clin Pathol: Mol Pathol* **53**: 55-63.
- Amellem O, P. E. (1991). "The role of protein accumulation on the kinetics of entry into S phase following extreme hypoxia." *Anticancer Res.* **11**(3): 1083-87.
- Amellem O, P. E. (1991). "Cell inactivation and cell cycle inhibition as induced by extreme hypoxia: the possible role of cell cycle arrest as a protection against hypoxia-induced lethal damage." *Cell Prolif.* **24**(2): 127-41.
- Amellem O, S. J., Stokke T, Pettersen EO (1998). "The retinoblastoma protein-associated cell cycle arrest in S-phase under moderate hypoxia is disrupted in cells expressing HPV18 E7 oncoprotein." *Br J Cancer* **77**(6): 862-72.
- Ashkenazi A (2002). "Targeting Death and Decoy Receptors of the Tumournecrosis Factor Superfamily." *Nature* **2**: 420-430.
- Asker C, W. K., Selivanova G (1999). "p53-induced apoptosis as a safeguard against cancer." *Biochem Biophys Res Commun.* **265**(1): 1-6.
- Baetu TM, H. J. (2002). "On the TRAIL to apoptosis." *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**(3): 199-207.
- Banasiak KJ, H. G. (1998). "Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death." *Brain Res.* **797**(2): 295-304.
- Bazan NG, P.-P. R., Lukiw WJ (2002). "Hypoxia signaling to genes: significance in Alzheimer's disease." *Mol Neurobiol.* **26**(2-3): 283-98.
- Belka C, B. A., Marini P, Jendrossek V, Bamberg M, Budach W (2003). "Zelltodliganden in Kombination mit ionisierender Strahlung: Rationale und Kenntnisstand." *Strahlenther Onkol* **179**: 141-51.
- Belka C, B. W. (2002). "Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology." *Int J Radiat Biol.* **78**(8): 643-58.
- Bialik S, G. D., Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN (1997). "Myocyte Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in the Mouse Localizes to Hypoxic Regions but Occurs Independently of p53." *J. Clin. Invest.* **100**: 1363-1372.
- Birgegard G, A. M., Bokemeyer C, Dicato M, Drings P, Hornedo J, Krzakowski M, Ludwig H, Pecorelli S, Schmoll H, Schneider M, Schrijvers D, Shasha D, Van Belle S. (2005). "Cancer-related anemia: pathogenesis, prevalence and treatment." *Oncology* **68**(1): 3-11.

7. Literatur

- Biroccio A, C. A., Mottolese M, Sapora O, Albini A, Zupi G, del Bufalo D (2000). "Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and in vivo angiogenesis in a breast carcinoma line." *FASEB J.* **14**: 652–660.
- Bortner CD, C. J. (1998). "A necessary role for cell shrinkage in apoptosis." *Biochem Pharmacol.* **56**(12): 1549-59.
- Brizel DM, D. R., Clough RW, Dewhirst MW (1999). "Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome." *Radiother Oncol.* **53**(2): 113-17.
- Brizel DM, S. G., Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW (1997). "Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck." *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **38**(2): 285-89.
- Bruick RK (2000). "Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia." *PNAS* **97**(16): 9082–9087.
- Cairns RA, K. T., Hill RP (2001). "Acute (Cyclic) Hypoxia Enhances Spontaneous Metastasis of KHT Murine Tumors¹." *Cancer Res.* **61**: 8903–8908.
- Cairns RA, P. I., Sutphin PD, Denko NC (2007). "Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy." *PNAS* **104**(22): 9445-9450.
- Cariers A, R. R., Fischer R, Warskulat U, Haussinger D (2002). "c-Jun-N-terminal kinase dependent membrane targeting of CD95 in rat hepatic stellate cells." *Cell Physiol Biochem.* **12**(4): 179-86.
- Carmeliet P, D. Y., Herbert J-M, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, and J. R. Moons L, Collen D, Keshert E (1998). "Role of HIF-1a in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." *Nature* **394**: 485-490.
- Cheng WF, L. C., Chen CA, Chu JS, Kung CC, Hsieh CY, Hsieh FJ. (1999). "Comparison between 'in vivo' and 'in vitro' methods for evaluating tumor angiogenesis using cervical carcinoma as a model." *Angiogenesis.* **3**(4): 295-304.
- Christofori G, S. H. (1999). "The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene." *Trends Biochem. Sci.* **24**: 73-76.
- Comerford KM, W. T., Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP (2002). "Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene." *Cancer Res.* **62**: 3387-3394.

7. Literatur

- Cotman CW, A. A. (1995). "A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease." *Mol Neurobiol.* **10**(1): 19-45.
- Coussens LM, W. Z. (1996). "Matrix metalloproteinases and the development of cancer." *Chem. Biol.* **3**: 895-904.
- Dive C, G. C., Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH. (1992). "Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry." *Biochim Biophys Acta* **1133**: 275-85.
- Dong Z, W. J. (2004). "Hypoxia Selection of Death-resistant Cells. A Role for Bcl-XL." *J. Biol. Chem.* **279**: 9215-9221.
- El-Deiry WS (1998). "Regulation of p53 downstream genes." *Semin Cancer Biol.* **8** (5): 345-57.
- Fadok VA, S. J., Haslet C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM (1992). "Different Populations of Macrophages Use Either the Vitronectin Receptor or the Phosphatidylserine Receptor to Recognize and Remove Apoptotic Cells." *J Immunol.* **149**(12): 4029- 4035.
- Fedi P, T. S., Aaronson SA (1997). "Growth factors. In *Cancer Medicine.*" J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins),: 41-64.
- Fischer U, J. R., Schulze-Osthoff K (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspasesubstrates." *Cell Death Differ.* **10**: 76-100.
- Forsythe JA, J. B.-H., Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996). "Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia- Inducible Factor 1." *Mol Cell .Biol* **16**: 4604-4613.
- Fynan TM, R. M. (1993). "Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-b and its role in oncogenesis." *Crit. Rev. Oncog.* **4**: 493-540.
- Gatenby RA, G. R. (2004). "Why Do Cancers Have High Aerobic Glycolysis?" *Nat Rev Cancer* **4**: 891-899.
- Gatenby RA, K. H., Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, Broder GJ (1988). "Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **14** (5): 831-8.
- Giatromanolaki A, H. A. (2001). "Tumour hypoxia, hypoxia signaling pathways and hypoxia inducible factor expression in human cancer." *Anticancer Res.* **21**: 4317-24.

7. Literatur

- Giatromanolaki A, K. M., Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL (2001). "Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable nonsmall cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival." *Br J Cancer* **85**(6): 881-890.
- Goda N, R. H., Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS (2003). "Hypoxia-Inducible Factor 1 Is Essential for Cell Cycle Arrest during Hypoxia." *Mol Cell Biol.* **23**(1): 359-369.
- Golstein P, O. D., Young JD (1991). "Cell death mechanisms and the immune system." *Immunol Rev.* **121**: 29-65.
- Graeber TG, O. C., Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ (1996). "Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours." *Nature* **379**: 88-91.
- Green DR, R. J. (1998). "Mitochondria and Apoptosis." *Science* **281**: 1309-1312.
- Gruber C, H. M., Budach W, Belka C, Jendrossek V (2004). "Involvement of tyrosine kinase p56/Lck in apoptosis induction by anticancer drugs." *Biochem Pharmacol.* **67**(10): 1859-72.
- Hanahan D, W. R. (2000). "The Hallmarks of Cancer." *Cell* **100**: 57-70.
- Handrick R, R. J., Müller I, Eibl H, Belka C, Jendrossek V (2005). "Bcl-2 mediated inhibition of erucylphosphocholine-induced apoptosis depends on its subcellular localisation." *Biochem Pharmacol.* **70**(6): 837-50.
- Harris AL (2002). "Hypoxia — A Key Regulatory Factor in Tumour Growth." *Nat Rev Cancer* **2**: 38-47.
- Harris CC (1996). "p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic - an abridged historical perspective." *Carcinogenesis* **17**: 1187-1198.
- Hayflick L (1997). "Mortality and immortality at the cellular level. A review." *Biochemistry (Mosc)* **62**(11): 1180-90.
- Henke M, G. R. (2000). "Erythropoietin in radiation oncology - A review." *Oncology* **58**(2): 175-82.
- Herr I, D. K.-M. (2001). "Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy." *Blood* **98**: 2603-2614.
- Hitchon CA, E.-G. H. (2004). "Oxidation in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* **6** (6): 265-78.

7. Literatur

- Höckel M, S. K., Höckel S, Aral B, Schäffer U, Vaupel P (1998). "Tumor Hypoxia in Pelvic Recurrences of Cervical Cancer." *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* **79**: 365-369.
- Höckel M, S. K., Höckel S, Vaupel P (1999). "Hypoxic Cervical Cancers with Low Apoptotic Index Are Highly Aggressive." *Cancer Res.* **59**: 4525-4528.
- Hockel M, V. P. (2001). "Biological consequences of tumor hypoxia." *Semin Oncol* **28**(2): 36-41.
- Höckel M, V. P. (2001). "Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects." *J Natl Cancer Inst* **93**(266-76).
- Igney FH, K. P. (2002). "Death and Anti-death: Tumour Resistance to Apoptosis." *Nat Rev Cancer* **2**: 277-288.
- Jiang B-H, R. E., Wang G, Roe R, Semenza GL (1996). "Dimerization, DNA Binding, and Transactivation Properties of Hypoxia-inducible Factor 1." *J Biol Chem* **271**(30): 17771-17778.
- Johnson JP (1991). "Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease." *Cancer Metastasis Rev.* **10**: 11-22.
- Kaelin WG (2002). "How oxygen makes its presence felt." *Genes & Development* **16**: 1441-1445.
- Karashima T, S. P., Kamat A, Huang S, Kim SJ, Bar-Eli M, McConkey DJ, Dinney CPN (2003). "Nuclear Factor- κ B Mediates Angiogenesis and Metastasis of Human Bladder Cancer through the Regulation of Interleukin-8." *Clin Cancer Res.* **9**: 2786-2797.
- Koch S, M. F., Honecker F, Schittenhelm M, Bokemeyer C (2003). "Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro." *Br J Cancer* **89**: 2133-2139.
- Koritzinsky M, W. B., Amellem O, Pettersen EO (2001). "Cell cycle progression and radiation survival following prolonged hypoxia and re-oxygenation." *Int J Radiat Biol.* **77**(3): 319-28.
- Krammer PH (1999). "CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die." *Adv Immunol* **71**: 163-210.
- Kroemer G, D. B., Resche-Rigon M (1998). "The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis." *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 619-42.

7. Literatur

- Kunz M, I. S., Koczan D, Thiesen H-J, Köhler H-J, Acker T, Plate KH, Ludwig S, Rapp UR, Bröcker E-B, van Muijen GNP, Flory E, Gross G (2001). "Activation of c-Jun NH₂-Terminal Kinase/Stress-activated Protein Kinase (JNK/SAPK) Is Critical for Hypoxia-induced Apoptosis of Human Malignant Melanoma." *Cell Growth & Differ.* **12**: 137-145.
- Leist M, J. M. (2001). "Four Deaths and a Funeral: From Caspases to Alternative Mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 1-10.
- Li C-Y, L. J.-S., Ko Y-G, Kim J-I, Seo J-S (2000). "Heat Shock Protein 70 Inhibits Apoptosis Downstream of Cytochrome c Release and Upstream of Caspase-3 Activation." *J Biol Chem.* **275**(33): 25665-25671.
- Li YB, K. C., Ling EA (1998). "Neuronal degeneration and microglial reaction in the fetal and postnatal rat brain after transient maternal hypoxia." *Neurosci Res.* **32**(2): 137-48.
- Lin Z, W. J., Malhotra R, Merritt SE, Holzman LB, Brosius FC (2000). "GLUT-1 reduces hypoxia-induced apoptosis and JNK pathway activation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**: E958-E966.
- Ljungkvist AS, B. J., Kaanders JH, Rijken PF, Begg AC, Raleigh JA, van der Kogel AJ (2005). "Hypoxic cell turnover in different solid tumor lines." *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **62**(4): 1157-68.
- Los M, W. S., Schulze-Osthoff K (1999). "The Role of Caspases in Development, Immunity, and Apoptotic Signal Transduction: Lessons from Knockout Mice." *Immunity* **10**: 629-639.
- Lukashev ME, W. Z. (1998). "ECM signaling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour." *Trends Cell Biol.* **8**: 437-441.
- Malhotra R, L. Z., Vincenz C, Brosius FC (2001). "Hypoxia induces apoptosis via two independent pathways in Jurkat cells: differential regulation by glucose." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**: 1596-1603.
- Marini P, B. C. (2003). "Death receptor ligands: new strategies for combined treatment with ionizing radiation." *Curr Med Chem Anticancer Agents.* **3**(5): 334-42.
- Matsushita H, M. R., Nata T, Aoki M, Nakagami H, Taniyama Y, Yamamoto K, Higaki J, Yasufumi K, Ogihara T (2000). "Hypoxia-Induced Endothelial Apoptosis Through Nuclear Factor-kB (NF-kB)-Mediated bcl-2 Suppression. In Vivo Evidence of the Importance of NF-kB in Endothelial Cell Regulation." *Circ Res.* **86**: 974-981.
- Maxwell PH, D. G., Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ (1997). "Hypoxia-inducible factor-1 modulates

7. Literatur

- gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8104-8109.
- Nakagawa T, Y. (2000). "Cross-talk between Two Cysteine Protease Families: Activation of Caspase-12 by Calpain in Apoptosis." *J Cell Biol.* **150**(4): 887-894.
- Nicoletti I, M. G., Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *J Immunol Methods* **139**(2): 271-79.
- Nordsmark M, L. J., Chou SC, Havsteen H, Lindegaard JC, Davidson SE, Varia M, West C, Hunter R, Overgaard J, Raleigh JA (2001). "Invasive oxygen measurements and pimonidazole labeling in human cervix carcinoma." *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **49**(2): 581-86.
- Nordsmark M, O. J. (2000). "A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy." *Radiother Oncol.* **57**(1): 39-43.
- Oda E, O. R., Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000). "Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis." *Science* **288**: 1053-1058.
- Pahl HL, B. P. (1995). "A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-KB." *EMBO J.* **14**(11): 2580-2588.
- Pozzi S, M. G., Biunno I, Samaja M (2002). "Low-flow ischemia and hypoxia stimulate apoptosis in perfused hearts independently of reperfusion." *Cell Physiol Biochem.* **12**(1): 39-46.
- Renton A, L. S., Lu X (2003). "Hypoxia induces p53 through a pathway distinct from most DNA-damaging and stress-inducing agents." *Carcinogenesis* **24**(7): 1177- 1182.
- Rockwell S (1997). "Oxygen delivery: implications for the biology and therapy of solid tumors." *Oncol Res.* **9**(6-7): 383-90.
- Rofstad EK, S. K., Lyng H, Tropé CG (2000). "Hypoxia-induced treatment failure in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix is primarily due to hypoxia-induced radiation resistance rather than hypoxia-induced metastasis." *Br J Cancer* **83**(3): 354-359.

7. Literatur

- Rosette C, K. M. (1996). "Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors." *Science* **274** (5290): 1194-97.
- Rudner J, B. C., Marini P, Wagner RJ, Faltin H, Lepple-Wienhues A, Bamberg M, Budach W (2001). "Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells." *Int J Radiat Biol.* **77**(1): 1-11.
- Rudner J, J. V., Belka C (2002). "New insights in the role of Bcl-2 Bcl-2 and the endoplasmic reticulum." *Apoptosis* **7**(5): 441-47.
- Rudner J, L.-W. A., Budach W, Berschauer J, Friedrich B, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, Belka C (2001). "Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis." *J Cell Sci.* **114**: 4161-4172.
- Rupnow BA, M. A., Alarcon RM, Giaccia AJ, Knox SJ (1998). "Direct evidence that apoptosis enhances tumor responses to fractionated radiotherapy." *Cancer Res.* **58**(9): 1779-84.
- Ryan HE, L. J., Johnson RS (1998). "HIF-1a is required for solid tumor formation and embryonic vascularization." *EMBO J.* **17**(11): 3005-3015.
- Sarasin A, S. A. (1997). "Human cancer and DNA repair-deficient diseases." *Cancer Detect Prev.* **21**(5): 406-11.
- Savill J, D. I., Hogg N, Haslett C (1990). "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis." *Nature* **343**(6254): 170-73.
- Scaffidi C, F. S., Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin K-M, Krammer PH, Peter ME (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *EMBO J.* **17**(6): 1675-1687.
- Seimiya H, T. M., Oh-hara T, Tomida A, Naasani I, Tsuruo T (1999). "Hypoxia upregulates telomerase activity via mitogen-activated protein kinase signaling in human solid tumor cells." *Biochem Biophys Res Commun.* **260**(2): 365-70.
- Semenza GL, A. F., Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A (1997). "Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1." *Kidney Int.* **51**(2): 553-55.
- Sermeus A, C. J.-P., Crespin M, Mainfroid V, de Longueville F, Ninane N, Raes M, Remacle J, Michiels C (2008). "Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity." *Molecular Cancer* **7**(27).

7. Literatur

- Shannon AM, B.-H. D., Condrón CM, Toomey D (2003). "Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies." *Cancer Treat Rev.* **29**(4): 297-307.
- Shay JW, B. S. (1997). "A survey of telomerase activity in human cancer." *Eur. J. Cancer* **33**: 787-791.
- Shen Y, W. E. (2001). "p53-dependent apoptosis pathways." *Adv Cancer Res.* **82**: 55-84.
- Shimizu S, E. Y., Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y (1996). "Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors." *Oncogene* **13**(1): 21-29.
- Shin DH, K. J., Jung YJ, Kim KE, Jeong JM, Chun YS, Park JW (2007). "Preclinical evaluation of YC-1, a HIF inhibitor, for the prevention of tumor spreading." *Cancer Lett.* **255**(1): 107-16.
- Shroff EH, S. C., Chandel NS (2007). "Role of Bcl-2 Family Members in Anoxia Induced Cell Death." *Cell Cycle* **6**(7): 807-809.
- Sivridis E, G. A., Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI (2002). "Association of Hypoxia-Inducible Factors 1a and 2a with Activated Angiogenic Pathways and Prognosis in Patients with Endometrial Carcinoma." *Cancer Res.* **95**: 1055-63.
- Slamon DJ, C. G., Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." *Science* **235**: 177-182.
- Slamon DJ, C. G., Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." *Science* **235**: 177-182.
- Sowter HM, R. P., Watson P, Greenberg AH, Harris AL (2001). "HIF-1-dependent Regulation of Hypoxic Induction of the Cell Death Factors BNIP3 and NIX in Human Tumors." *Cancer Res.* **61**: 6669- 6673.
- Sporn MB (1996). "The war on cancer." *Lancet* **347**: 1377-1381.
- Stepczynska A, L. K., Engels IH, Janssen O, Kabelitz D, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (2001). "Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation." *Oncogene* **20**: 1193-1202.
- Sundfor K, L. H., Trope CG, Rofstad EK (2000). "Treatment outcome in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix: relationships to

7. Literatur

- pretreatment tumor oxygenation and vascularization." *Radiother Oncol.* **54**(2): 101-07.
- Szegezdi E, F. U., Samali A (2003). "Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far." *Ann N Y Acad Sci.* **1010**: 186-94.
- Tamatani M, O. S., Nunez G, Tohyama M (1998). "Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide." *Cell Death Differ.* **5**(10): 911-19.
- Tatton WG, C.-R. R., Brown D, Tatton N (2003). "Apoptosis in Parkinson's Disease: Signals for Neuronal Degradation." *Ann Neurol* **53**(3): 61-72.
- Teicher BA (1994). "Hypoxia and drug resistance." *Cancer Metastasis Rev.* **13**(2): 139-68.
- Teng CM, W. C., Ko FN, Lee FY, Kuo SC (1997). "YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits platelet-rich thrombosis in mice." *Eur J Pharmacol.* **320**(2-3): 161-66.
- Thompson CB (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." *Science* **267**(5203): 1456-62.
- Tsujimoto Y, S. S., Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H (1997). "Bcl-2 and Bcl-xL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways." *Leukemia* **3**: 380-82.
- Vaupel P, H. M. (1999). "Predictive power of the tumor oxygenation status." *Adv Exp Med Biol.* **471**: 533-39.
- Vaupel P, K. D., Thews O (1998). "Modulation of tumor oxygenation." *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **42**(4): 843-48.
- Vaupel P, K. D., Hockel M (2001). "Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy." *Semin Oncol.* **2**(8): 29-35.
- Vaupel P, S. K., Knoop C, Hockel M (1991). "Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements." *Cancer Res.* **51**(12): 3316-22.
- Vaupel P, T. O., Hoeckel M (2001). "Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia." *Med Oncol.* **18**(4): 243-59.
- Voll RE, H. M., Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." *Nature* **390**: 350-351.

7. Literatur

- von Haefen C, W. T., Gillissen B, Stärck L, Graupner V, Dörken B, Daniel PT (2002). "Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells." *Oncogene* **21**: 4009-4019.
- Walenta S, S. A., Lyng H, Evensen JF, Mitze M, Rofstad EK, Mueller-Klieser W (1997). "Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis." *Am J Pathol.* **150**(2): 409-15.
- Walenta S, W. M., Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W (2000). "High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers." *Cancer Res.* **60**: 916-921.
- Wang S-W, P. S.-L., Guh J-H, Chen H-L, Huang D-M, Chang Y-L, Kuo S-C, Lee FY, Teng C-M (2005). "YC-1 [3-(5-Hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl Indazole] Exhibits a Novel Antiproliferative Effect and Arrests the Cell Cycle in G0-G1 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells." *J Pharmacol Exp Ther.* **312**(3): 917-925.
- Weinmann M, J. V., Güner D, Goecke B, Belka C. (2004). "Cyclic exposure to hypoxia and reoxygenation selects for tumor cells with defects in mitochondrial apoptotic pathways." *FASEB J.* **18**(15): 1906-08.
- Weinmann M, J. V., Handrick R, Güner D, Goecke B, Belka C (2004). "Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis: critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/caspase-8 independent manner." *Oncogene* **23**(21): 3757-69.
- Weinmann M, M. P., Jendrossek V, Betsch A, Goecke B, Budach W, Belka C (2004). "Influence of Hypoxia on TRAIL-induced Apoptosis in Tumor Cells." *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **58**(2): 386-96.
- Weinmann M, T. O., Schroeder T, Vaupel P (2002). "Expression pattern of the urokinase-plasminogen activator system in rat DS-sarcoma: role of oxygenation status and tumour size." *Br J Cancer.* **86**(8): 1355-61.
- Wenger RH (2000). "Mammalian Oxygen Sensing, Signalling and Gene Regulation." *J Exp Biol.* **203**: 1253-1263.
- Wenger RH, C. G., Desbaillets I, Chilov D, Gassmann M (1998). "Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha is not sufficient for hypoxic/anoxic p53 induction." *Cancer Res.* **58**(24): 5678-80.
- Wesselborg S, E. I., Rossmann E, Los M, Schulze-Osthoff K (1999). "Anticancer Drugs Induce Caspase-8/FLICE Activation and Apoptosis in the Absence of CD95 Receptor/ Ligand Interaction." *Blood* **93**(9): 3053-3063.

7. Literatur

- Wieder T, P. A., Bagci B, Essmann F, Bernicke D, Schulze-Osthoff K, Dorken B, Schmalz HG, Daniel PT, Henze G (2001). "Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts." *Leukemia* **15**(11): 1735-42.
- Wouters BG, K. M., Chiu RK, Theys J, Buijsen J, Lambin P (2003). "Modulation of Cell Death in the Tumor Microenvironment." *Seminars in Radiation Oncology* **13**(1): 31-41.
- Wright WE, P.-S. O., Shay JW (1989). "Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts." *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3088-3092.
- Wyllie AH, K. J., Currie AR (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.
- Yaniv G, S. M., Lotan R, Berke G, Larisch S, Binah O (2002). "Hypoxia predisposes neonatal rat ventricular myocytes to apoptosis induced by activation of the Fas (CD95/Apo-1) receptor: Fas activation and apoptosis in hypoxic myocytes." *Cardiovasc Res.* **54**(3): 611-23.
- Yasui H, O. A., Asanuma T, Matsuda A, Kashiwakura I, Kuwabara M, Inanami O. (2008). "Inhibition of HIF-1alpha by the anticancer drug TAS106 enhances Xray- induced apoptosis in vitro and in vivo." *Br J Cancer.*
- Yeh W-L, L. D.-Y., Lin C-J, Liou H-C, Fu W-M (2007). "Inhibition of Hypoxia-Induced Increase of Blood-Brain Barrier Permeability by YC-1 through the Antagonism of HIF-1 Accumulation and VEGF Expression." *Mol Pharmacol.* **72**(2): 440-449.
- Yeo E-J, C. Y.-S., Cho Y-S, Kim J, Lee J-C, Kim M-S, Park J-W (2003). "YC-1: A Potential Anticancer Drug Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1." *J Natl Cancer Inst.* **95**(7): 516-25.
- Yeo E-J, R. J.-H., Chun Y-S, Cho Y-S, Jang I-J, Cho HS, Kim J, Kim M-S, Park J-W (2006). "YC-1 Induces S Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Activating Checkpoint Kinases." *Cancer Res* **66**(12): 6345-52.

8. Danksagung

8. Danksagung

Auf dem Weg zu einem erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit haben mich viele Menschen begleitet und unterstützt. Jeder einzelne von ihnen hat seinen Beitrag zum Erfolg geleistet. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

An erster Stelle möchte ich dem IZKF-Promotionskolleg für die finanzielle Förderung danken, besonders Frau Dr. Sabine Garbrecht-Büttner für ihre unbürokratische Hilfe und Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Bamberg und Herrn PD Dr. med. Claus Belka danken, die mir die Möglichkeit gaben in ihrer Abteilung wissenschaftlich zu arbeiten und deren Unterstützung mir bei der Realisation meines Projektes sehr geholfen hat.

Auch möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Verena Jendrossek für ihre Hilfe und ihr offenes Ohr bei vielen kleineren und größeren Problemen danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Martin Weinmann, der mich während der gesamten Zeit unterstützte und mir auch in schwierigen Situationen immer mit wertvollen Ratschlägen weiterhelfen konnte. Durch seine Geduld, sein Vertrauen und seine Gelassenheit wurden viele Hindernisse überwunden.

Frau Dipl. hum.-biol. Amelie Rübél und Frau Dipl. biol. Therese Eldh möchte ich besonders danken. In vielen gemeinsam verbrachten Stunden und ungezählten Diskussionen sind aus Arbeitskollegen Freunde geworden.

Danke auch Herrn Dr. rer. nat. René Handrick für seine geduldigen und immer hilfreichen Erklärungen und seine fortwährende freundliche und geduldige Unterstützung.

8. Danksagung

Mein Dank gilt auch Frau Heidi Faltin, Frau Barbara Göcke, Frau Ilka Müller und Frau Jutta Kun für ihre Hilfe und Anleitung bei der Arbeit im Labor.

Zu guter Letzt ein herzliches Dankeschön an meine Familie und Freunde für ihre Unterstützung und ihr geduldiges Zuhören in dieser Zeit. Vielen Dank!

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Sarah Strickmann, geb. Duszenko
Geburtsdatum: 6. Mai 1981
Geburtsort: Tübingen
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Prof. Dr. Michael Duszenko, geb. 15.01.1951
Professor am Interfakultären Institut für
Biochemie (Universität Tübingen)
Sigrid Duszenko, geb. 03.01.1950
Arzthelferin

Ausbildung

Schule
1991-2000 Kepler-Gymnasium in Tübingen
März 2000 Abitur in den Fächern Physik,
Englisch, Mathematik und Geschichte

Studium
2001-2007 Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
März 2003 Ärztliche Vorprüfung (mündl. Fächer:
Biochemie, med. Psychologie)
Mai 2007 Staatsexamen (neue Approbations
ordnung, mündl. Fächer: Innere
Medizin, Chirurgie, Pädiatrie,
Anästhesie)

Promotion
2004 Forschungsstipendium des IZKF-
Promotionskollegs
2004-2006 Promotion in der Klinik für
Strahlentherapie Tübingen unter der
Leitung von Prof. Dr. med. Bamberg

Beruf

seit September 2007 Assistenzärztin in der Klinik für
Neurologie, Klinikum Osnabrück
GmbH