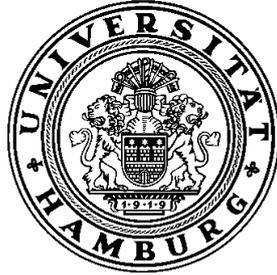


UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF



Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Klinikdirektorin: Prof. Dr. med. Cordula Petersen

**DIE EXPRESSION VON DNA-REPARATUR-PROTEINEN
UNTER HYPOXISCHEN BEDINGUNGEN
IN ZEHN PLATTENEPIHELKARZINOMLINIEN
AUS KOPF- UND HALSTUMOREN**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

JOHANNES GÖCKSCHU
aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 27.10.2010

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg**

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. Kerstin Borgmann

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. Ekkehard Dikomey

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	5
2	Einleitung	6
2.1	Allgemeine Tumorthherapie	6
2.2	Strahlentherapie und Strahlenwirkung	9
2.3	Hypoxie	11
2.4	Bedeutung der Hypoxie für die Metastasierung maligner Tumoren	21
2.5	Auswirkungen der Hypoxie auf den Zellzyklus	22
2.6	Auswirkungen der Hypoxie auf die Stabilität des Genoms	22
2.7	Reparatur von DNA-Schäden mittels Mismatch-Repair	23
2.8	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	23
2.8.1	Das Nicht Homologe Endjoining	24
2.8.2	Die Homologe Rekombination	24
2.9	Die Reparatur von DNA-Crosslinks	25
2.10	Die Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Zelllinien	28
3.2	Zellkulturhaltung	28
3.3	Inkubation der Zellen unter oxidischen und hypoxischen Bedingungen	29
3.4	Western Blot	29
3.4.1	Proteinisolierung nach Finnie	31
3.4.2	Proteinisolierung nach Snapfreeze	32
3.4.3	Proteinbestimmung	33
3.4.4	Nachweis der Proteine	33
3.4.5	Detektion der Proteine	34
3.5	Puffer und Lösungen	35
3.5.1	Reagenzien und Medien für die Zellkultur	35
3.5.2	Reagenzien zur Detektion von Proteinen	35
3.5.3	Allgemeine Puffer, Lösungen und Chemikalien	36
3.5.4	Antikörper gegen die Proteine β -Actin, Hif-1 alpha, RAD51, BRCA 2, Fanc D2, BRCA 1, Ku 70 und Lig-IV	39
3.5.5	Größenstandards	40

4	Ergebnisse	41
4.1	Methodische Vorarbeiten	41
4.1.1	Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden	41
4.1.2	Vergleich der Expressionsunterschiede nach Normierung auf Zellgröße oder Gesamtprotein	43
4.1.3	Detektion der Hypoxie	47
4.2	Expression von DNA-Reparaturproteinen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration	50
4.2.1	Expression der Ligase IV in der Zelllinie SAS in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration	50
4.2.2	Expression von RAD51 in der Zelllinie FaDu in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration	51
4.2.3	Expression des Hypoxie-Markers Hif1 α in 10 Tumorzelllinien aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches	53
4.2.4	Detektion acht verschiedener Proteine auf einer Membran zur standardisierten Vergleichbarkeit in verschiedenen Tumorzelllinien	57
4.2.5	Expression der DNA-Reparaturproteine BRCA1, BRCA2, FANCD2, Ligase IV, Ku70 und RAD51 in Abhängigkeit von der Sauerstoff- konzentration in 10 Tumorzelllinien	57
5	Diskussion	64
5.1	Methodische Vorarbeiten	64
5.1.1	Nachweis der Hif-1 α Expression als Marker der induzierten Hypoxie	64
5.1.2	Einsatz von β -Actin als Beladungskontrolle	67
5.2	Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie	68
5.2.1	Expression von DNA-Reparaturproteinen des NHEJ unter Hypoxie	68
5.2.2	Expression von DNA-Reparaturproteinen der HR unter Hypoxie	69
5.2.3	Expression von DNA-Reparaturproteinen anderer Wege unter Hypoxie	72
5.3	Bedeutung des Zellzyklus für die Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie	72
6	Zusammenfassung	75
7	Literaturverzeichnis	77
8	Danksagung	83
9	Eidesstattliche Versicherung	84

1 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Es konnte in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden, dass Tumorzellen unter Hypoxie eine erhöhte genomische Instabilität aufweisen. Der für diese genomische Instabilität ursächliche Mechanismus ist weitestgehend ungeklärt, die Entschlüsselung dieses Zusammenhanges könnte jedoch einen entscheidenden Beitrag zur Prädiktion der Prognose bei Tumorpatienten leisten.

Einzelbeobachtungen weisen darauf hin, dass möglicherweise eine veränderte Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie die Ursache für die erhöhte genomische Instabilität sein könnte. Unklar ist allerdings, ob sich von diesen Einzelbeobachtungen ein genereller Regulationsmechanismus für die Reparatur unter hypoxischen Bedingungen herleiten lässt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit erstmalig ein systematischer Ansatz gewählt, welcher zehn verschiedene Tumorzelllinien einer Tumorentität hinsichtlich der Expression von DNA-Reparaturproteinen mehrerer Reparaturwege in unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Von besonderem Interesse sind hierbei Ku70 und LigIV, essentielle Proteine des Nicht-Homologen Endjoinings (NHEJ), Rad51, das zentrale Protein der Homologen Rekombination (HR), FANCD2 und BRCA2 die der HR assoziiert sind, sowie BRCA 1, dessen Bedeutung sowohl für das NHEJ als auch die HR diskutiert wird. Die Expression der genannten Proteine soll in zehn Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf/Halsbereiches untersucht werden.

So sollen im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellungen überprüft werden:

1. Wirkt sich eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration spezifisch auf die Expression der am NHEJ beteiligten DNA-Reparatur-Proteine Ku70 und Lig IV aus?
2. Wirkt sich eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration verstärkt auf die Expression der an der HR beteiligten DNA-Reparatur-Proteine RAD51, FANCD2, BRCA1 und BRCA2 aus?
3. Handelt es sich bei den zu beobachtenden Expressionsunterschieden um Phänomene einzelner Zelllinien oder kann ein genereller Mechanismus für Tumorzelllinien aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf/Halsbereiches unter Hypoxie beobachtet werden?

2 EINLEITUNG

2.1 Allgemeine Tumorthherapie

Die Therapie maligner Tumoren basiert auf den drei Säulen der Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie. Bei chirurgischen Maßnahmen erfolgt eine direkte Exzision des Tumorgewebes, während bei der Chemo- und Strahlentherapie eine möglichst effektive Schädigung der Tumorzellen mit einem daraus resultierendem Absterben dieser Tumorzellen angestrebt wird. Das Ziel der kurativen Tumorthherapie ist hierbei die vollständige Eliminierung jeder einzelnen Tumorzelle.

Bei etwa der Hälfte aller Krebspatienten wird eine noch lokal begrenzte Tumorerkrankung diagnostiziert, von denen zwei Drittel durch lokale Therapiemaßnahmen (Chirurgie und Strahlentherapie) geheilt werden können. Von dem verbleibenden Drittel der Patienten versterben etwa 60% an einer Fernmetastasierung und 30% am lokoregional nicht kontrollierten Tumor (Nowack 2007). Diese Zahlen verdeutlichen das Ziel der lokal kurativen Therapiemaßnahme mit der Vernichtung aller Tumorzellen im Primärtumor, sowie gegebenenfalls in befallenen Lymphknoten und Lymphbahnen und der damit verbundenen Verhinderung eines Lokalrezidivs als wesentliche Voraussetzung für die Heilung.

Krebserkrankungen im Kopf-Hals-Bereich sind nach Prostata bzw. Brust, Kolon und Lungentumoren heute weltweit die sechsthäufigste Malignomerkrankung. Verlässlich evaluierte Angaben zur Gesamtzahl bösartiger Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland gibt es nicht. Geschätzt wird, dass in Deutschland pro Jahr etwa 50 von 100.000 Einwohnern an Krebs im Kopf-Halsbereich erkranken. Zum Vergleich: Bei Dick- und Mastdarmkrebs sind es – Männer und Frauen zusammengenommen – etwa 180 von 100.000 Einwohnern, bei Brustkrebs, der häufigsten Krebsart der Frau, 136 von 100.000 Frauen und bei Prostatakrebs, der häufigsten Krebsart des Mannes, 145 von 100.000 Männern.

Unter dem Begriff Kopf-Hals-Tumoren werden verschiedene Krebsarten zusammengefasst, die im Kopf-Halsbereich auftreten. Dazu zählen bösartige Tumoren

- der Mundhöhle (Mundhöhlenkarzinome), d.h. Tumoren von Lippen, Zunge, Mundboden, Gaumen, Speicheldrüsen
- des Rachens (Pharynxkarzinom)
- des Kehlkopfes (Larynxkarzinom)
- der Nase
- der Nasennebenhöhlen
- des äußeren Halses, insbesondere der Schilddrüse.

Die häufigste Krebsart im Kopf-Halsbereich ist nach Angaben des Robert Koch-Instituts der Kehlkopfkrebs. Jedes Jahr sind in Deutschland rund 3.000 Männer und 400 Frauen davon betroffen. Im Durchschnitt sind die Patienten zum Zeitpunkt ihrer Erkrankung 64 Jahre alt. An bösartigen Tumoren der Mundhöhle und des Rachens erkranken in Deutschland im Jahr etwa 7.800 Männer und 2.600 Frauen. Im Durchschnitt sind Männer zum Zeitpunkt der Diagnose 61 Jahre alt, Frauen 63 Jahre. Die höchsten Erkrankungsraten ergeben sich für Männer in den Altersgruppen zwischen 55 und 65 Jahren. Die Zahl der Todesfälle durch Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens beträgt bei Männern 3.450, was einem Anteil an allen Krebssterbefällen von 3,1 % entspricht (Frauen 994, 1,0 %).

Bei den meisten bösartigen Tumoren im Kopf-Halsbereich handelt es sich um so genannte Plattenepithelkarzinome, also Tumoren, die von Oberflächenzellen ausgehen. Seltener sind Adenokarzinome, Tumoren aus drüsenartigem Gewebe, die vor allem die Nase und Nasennebenhöhlen betreffen, und Sarkome, also Weichteiltumoren.

Zu den Hauptrisikofaktoren gehören insbesondere Tabak- und Alkoholkonsum. Raucher erkranken an bösartigen Neubildungen der Mundhöhle und des Rachens bis zu sechsmal häufiger als Nichtraucher, wobei die Kombination von Alkoholkonsum und Rauchen das Risiko verstärkt. Auch der orale Genuss von Tabak (zum Beispiel Kautabak) stellt ein Risiko dar. Weitere Risikofaktoren sind unzureichende Mundhygiene und ein zu geringer Verzehr von Obst und Gemüse. Für einige Unterarten dieser Krebserkrankungen wird auch eine Beteiligung von Viren, insbesondere des humanen Papilloma Virus, an ihrer Entstehung diskutiert.

Bei der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren wird zunächst eine Operation angestrebt. Sie kann durch eine Strahlentherapie oder eine kombinierte Strahlen-Chemotherapie ergänzt werden (adjuvante Behandlung). Bei bereits fortgeschrittenen Tumoren hat sich eine Kombination aus Strahlentherapie und zielgerichteter Therapie mit dem Antikörper Cetuximab als besonders effektiv erwiesen.

Ziel der Operation ist es, den Tumor vollständig zu entfernen, befallene Lymphknoten im Halsbereich werden, soweit möglich, ebenfalls entfernt. Bei ausgedehnten oder ungünstig liegenden Tumoren müssen die Patienten teilweise mit kosmetischen Beeinträchtigungen durch die Operation rechnen. Allerdings können diese mithilfe plastischer Chirurgie oftmals gebessert oder sogar behoben werden.

Eine Strahlentherapie wird bei Kopf-Hals-Tumoren im Allgemeinen im Anschluss an eine Operation (adjuvante Strahlentherapie) durchgeführt, wenn bei dem Eingriff nicht das gesamte Tumorgewebe entfernt werden konnte oder wenn der Tumor bereits in Lymphknoten oder andere Organe gestreut hat.

Seltener findet eine Bestrahlung vor der Operation statt. Sie dient dann dazu, die Heilungsaussichten bei der Operation zu verbessern, und wird in der Regel mit einer Chemotherapie kombiniert (Radiochemotherapie). Auch wenn ein Tumor aus medizinischen oder anderweitigen Gründen nicht operiert werden kann, wird die Bestrahlung mit einer Chemotherapie kombiniert. Beide Verfahren können gleichzeitig oder nacheinander eingesetzt werden.

Allerdings hat die Strahlentherapie für Tumore aus dem Kopf- und Halsbereich einen unterschiedlichen Stellenwert. So liegt bei einem Drittel der Patienten mit Kieferhöhlenkarzinomen nach einer präoperativen Radiatio kein Tumor mehr vor, ein weiteres Drittel weist einen fraglichen Resttumor auf und beim letzten Drittel findet sich eine deutlich verminderte Tumormasse. Bei Tumoren der Mundhöhle dagegen kommt die alleinige Strahlentherapie nur in prognostisch besonders ungünstigen Fällen zum Einsatz. Für Nasopharynxkarzinome spielt die Strahlentherapie bzw. die Radio-Chemotherapie eine besondere Rolle, weil sie operativ auf Grund der Gefahr eines Einbruchs in die Tube oder die Schädelbasis praktisch nie radikal anzugehen sind. Sind solche Nasopharynxkarzinome strahlensensibel, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 50%. Ist ein Nasopharynxkarzinom jedoch nicht strahlensensibel und zeigt sich gegenüber der Radiotherapie als resistent, fällt die 5-Jahres-Überlebensrate auf nur noch 15% ab. Stimmlippenkarzinome werden teilweise mit einer perkutanen Radiatio therapiert, weil sie nach der Therapie eine relativ gute Stimmqualität hinterlässt. Bei Tumoren des Oropharynx kann bei inoperablen Patienten mit einer Radiochemotherapie eine gleiche Überlebensprognose erreicht werden wie bei operablen Patienten nach einer chirurgischen Intervention mit anschließender Nachbestrahlung (Benninghaus und Lenarz 2005).

Die Daten zeigen, dass eine deutliche Variation in der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren zu beobachten ist und diese unter anderem von der Histologie des jeweiligen Tumors abhängt. Während Seminome und Lymphome sehr sensitiv für die Strahlentherapie sind und zum Beispiel in bestimmten Stadien des Seminoms mit einer alleinigen Radiotherapie eine Heilung von nahezu 100 % erreicht werden kann, sind histologisch divergente Tumore wie maligne Gliome oder Osteosarkome nahezu resistent gegenüber einer Strahlentherapie, wodurch diese erfolglos bleibt. Die bei den HNO-Tumoren am häufigsten auftretenden Plattenepithelkarzinome weisen eine intermediäre Empfindlichkeit gegenüber der Strahlentherapie auf. Sind Plattenepithelkarzinome auf einen Durchmesser von 1-2 cm begrenzt, können sie in der Regel mit Dosen zwischen 60 und 75 Gy geheilt werden, bei größeren Tumoren zeigen sich dann jedoch oft sehr große Unterschiede in der Strahlensensibilität auf.

So beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate nach alleiniger Bestrahlung von Plattenepithelkarzinomen des Zungengrundes 15-25%, des Zungenrandes 35-50% und des Mundbodens 30-50%. Die tatsächlichen Ursachen für die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit von Tumoren mit unterschiedlicher Histologie sind zum heutigen Zeitpunkt weitgehend unbekannt (Herrmann et al. 2006).

2.2 Strahlentherapie und Strahlenwirkung

Die Anwendung der alleinigen Strahlentherapie kann zu einer Heilung bei etwa 12% aller Tumoren eingesetzt werden. Kombiniert man die Strahlentherapie mit einer Chemotherapie oder einer chirurgischen Intervention, können zusätzlich ca. weitere 14% der Tumorerkrankungen kurativ behandelt werden. Die Radiotherapie erfolgt entweder extern als perkutane Bestrahlung oder als so genannte Brachytherapie.

Das Ziel der Strahlentherapie ist dabei die größtmögliche Vernichtung von Tumorzellen. Die dafür bedeutsame Zielstruktur in der Zelle ist die DNA im Zellkern, deren Schädigung zu strukturellen Veränderungen der Chromosomen führt. Durch die Induktion von letalen Chromosomenaberrationen verliert die Zelle sukzessive über mehrere Generationen genetische Information und daraus folgend stirbt die Zelle. Die strahlentherapeutische Behandlung von Tumoren nutzt den Verlust der Teilungsfähigkeit der Zellen.

Durch Photonen oder Sekundärelektronen kann es zu Ionisationen in der DNA kommen, welche das Potential zu vielfältigen, strukturellen Veränderungen der DNA haben. Die möglichen auftretenden Schäden sind Basenschäden, Einzelstrangbrüche, DNA-Protein-Vernetzungen, DNA-DNA-Vernetzungen, gehäufte Läsionen und DNA-Doppelstrangbrüche. Einzelne Ionisationen können zu Basenverlusten oder Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüchen führen. Treten mehrere Ionisationen innerhalb weniger Nanometer auf, können gehäufte Läsionen sowie Doppelstrangbrüche auftreten. Nach einer Dosis von 1 Gy werden 4.000 – 5.000 Basenschäden, 1.000 Einzelstrangbrüche, 150 DNA-DNA- und DNA-Protein-Vernetzungen und 20-40 Doppelstrangbrüche pro Zelle erzeugt (Borgmann et al. 2009).

Schädigungen der DNA können über den direkten oder den indirekten Effekt der ionisierten Strahlung hervorgerufen werden. Trifft die ionisierte Strahlung auf die DNA, kann dies zur Ionisation der DNA und damit sofortigen Induktion von DNA-Schäden führen, weshalb man hier von einem direkten Effekt spricht. Davon abweichend kann es durch die Ionisierung von Wassermolekülen zur Entstehung von diffusiblen Radikalen kommen. Die Schädigung der DNA erfolgt dann erst

sekundär über Radikalkettenreaktionen. In einem kompetitiven Gleichgewicht kann es entweder zu einer Reduktion mit einer damit verbundenen Restitution der DNA kommen, ohne dass die DNA dabei einen Schaden nimmt, oder es kommt zu einer Oxidation der DNA, die mit einer Manifestation eines DNA-Schadens einhergeht. Dieser Mechanismus wird auf Grund seiner Wirkweise als indirekter Effekt bezeichnet (Brown und Wilson 2004).

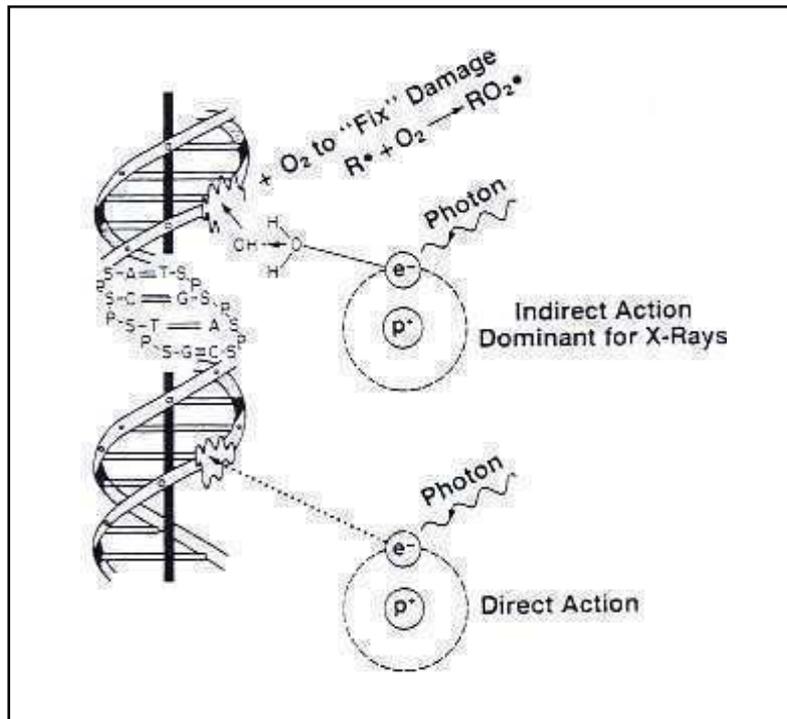


Abb. 2.1: Direkter und indirekter Effekt der ionisierten Strahlung. Photonen können entweder direkt durch Ionisation der DNA oder indirekt durch Ionisation des die DNA umgebenden Wassers zur Schädigung der DNA führen.

(Entnommen aus *Radiobiology for Radiobiologist*, Hall und Giaccia 2006)

Übersteigt der Schaden der DNA die Reparaturfähigkeit einer Zelle, kann dies zum Zelltod der betroffenen Zelle führen. Tumoren weisen hinsichtlich ihrer Sensibilität für die Radiotherapie große Unterschiede auf, wodurch die kurativen Bestrahlungsdosen für verschiedene Tumorentitäten sehr variabel sind. Strahlensensitive Tumore wie Seminome und Lymphome lassen sich in der Regel mit 30-45 Gy lokal kontrollieren. Maligne Gliome dagegen zählen zu den strahlenresistenten Tumoren, für die selbst mit einer Dosis von 60-80 Gy fast nie eine lokale Tumorkontrolle erreicht werden kann (Herrmann et al. 2006).

Unabhängig von der Tumorart wird jedoch in hypoxischen Tumoren eine erhöhte Strahlenresistenz beobachtet, die einen signifikant schlechteren klinischen Verlauf mit sich bringt (Brown und Wilson 2004, Overgaard 2007, Bristow und Hill 2008). Zum einen ist diese erhöhte Resistenz durch eine Abschwächung des indirekten Effektes bedingt durch die Hypoxie zu erklären. Zusätzlich steht die verstärkte Strahlenresistenz in hypoxischen Tumoren möglicherweise in einem Zusammenhang mit der unter Hypoxie veränderten DNA-Reparatur (Bindra et al. 2004, Bristow und Hill 2008).

2.3 Hypoxie

Die erste klinische Beschreibung einer erhöhten Strahlenresistenz in hypoxischen Anteilen der Haut erfolgte im Jahre 1909 von Gottwald Schwartz. Eine durch Kompression ausgelöste anämische Blutversorgung der Haut wurde von ihm als „Kompressionsanämie“ beschrieben und in diesem Bereich der Haut eine Reduktion der Röntgenempfindlichkeit auf ein Drittel des ursprünglichen Wertes beobachtet.

Die Darlegungen von Gottwald Schwartz in seinem Konzept der „Röntgentiefentherapie“ zur Behandlung von tief unter der Haut gelegenen Tumoren erfolgten dabei in einer Unwissenheit darüber, dass die Sauerstoffkonzentration für die geschilderte erhöhte Strahlenresistenz verantwortlich war (Overgaard 2007).

Erst lange Zeit danach konnte ein Zusammenhang zwischen der Sauerstoffkonzentration in Zellen und der damit verbundenen Strahlenempfindlichkeit hergestellt werden und so sollten die Ausführungen von Gottwald Schwartz später als hypoxische Radioresistenz bekannt werden. Trotz der langen Geschichte der Hypoxie in Tumoren und der damit verbundenen Strahlenresistenz ist die genaue Genese dieses Phänomens bis heute nur teilweise nachvollzogen.

In der Radiotherapie manifestiert sich der durch die ionisierte Strahlung hervorgerufene Schaden über den indirekten Effekt erst durch die Oxidation der DNA (Brown und Wilson 2004). Der DNA-Schaden wird daher durch die Anwesenheit von Sauerstoff „fixiert“ (Hall und Giaccia 2006). Dies hat zur Folge, dass bei einer verminderten Sauerstoffkonzentration unter Bestrahlung deutlich mehr Zellen überleben, als dies unter normoxischen Bedingungen der Fall ist. Um die gleiche Anzahl von Zellen zu zerstören muss daher für hypoxische Zellen eine höhere Bestrahlungsdosis verwendet werden. Mit dem Sauerstoffverstärkungsfaktor („Oxygen Enhancement Ratio“, OER) lässt sich berechnen, um wie viel die Bestrahlungsdosis bei hypoxischen Zellen erhöht werden muss um den gleichen biologischen Effekt in normoxischen Zellen zu erzielen.

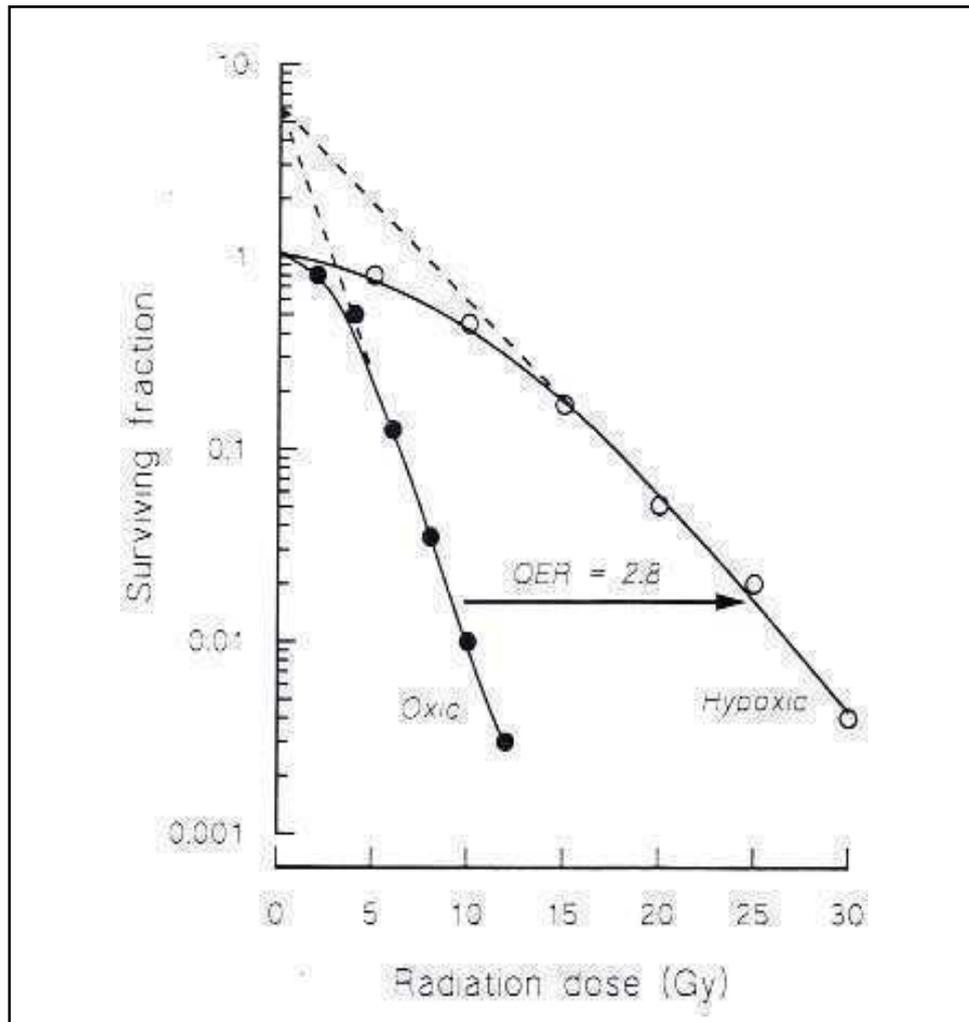


Abb. 2.2: Überlebensrate von Säugetierzellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in Abhängigkeit von der Dosis. Die Zellen wurden unter Normoxie und Hypoxie bestrahlt und die Anzahl der überlebenden Zellen gegen die Dosis aufgetragen. Der Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER) berechnet sich aus der Veränderung der Strahlenempfindlichkeit unter Hypoxie im Vergleich zur Oxie.

(Entnommen aus Radiobiology for Radiobiologist, Hall und Giaccia 2006)

Vergleicht man die Radiosensibilität einer bestimmten Zelllinie unter verschiedenen normoxischen bis hin zu hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen, kann bei Sauerstoffkonzentrationen von 0,5% (3 mmHg) eine Radiosensibilität beobachtet werden, die genau in der Mitte zwischen der von normoxischen Zellen und hypoxischen Zellen liegt. Dies impliziert, dass bereits eine sehr geringe Sauerstoffkonzentration für eine effektive Radiotherapie ausreichend ist (Hall und Giaccia 2006).

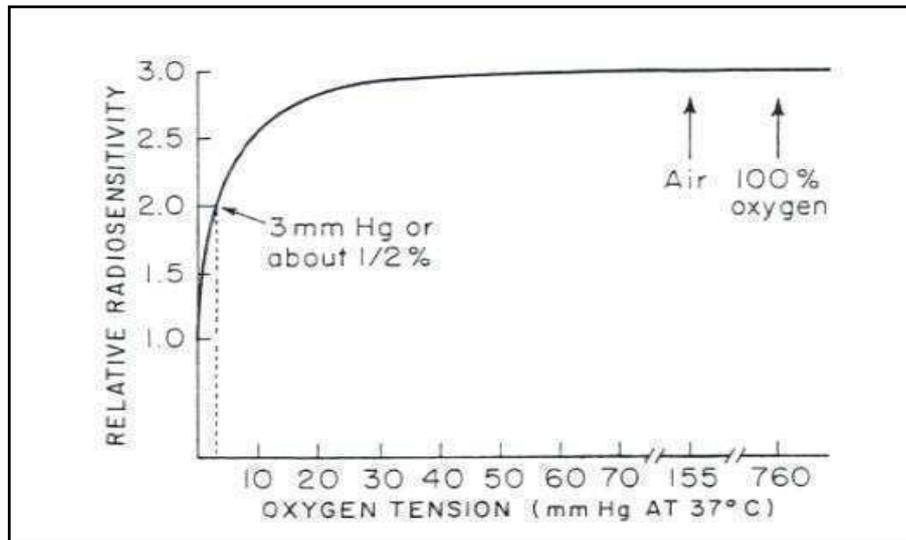


Abb. 2.3: Relative Strahlenempfindlichkeit in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. Die relative Strahlenempfindlichkeit wurde für unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen bestimmt und gegen den Sauerstoffpartialdruck aufgetragen.

(Entnommen aus *Radiobiology for Radiobiologist*, Hall und Giaccia 2006)

Der Begriff „Hypoxie“ beschreibt einen Mangel an Sauerstoff im Vergleich zur normalen Sauerstoffkonzentration von 160 mm Hg in der Umgebungsluft (21% Sauerstoff). Die Inspirationsluft vermischt sich mit der Alveolarluft wodurch der pO_2 auf 100 mm Hg in den Alveolen absinkt. Das Blut der Lungenarterien/kapillaren hat nur noch einen Sauerstoffpartialdruck von 40 mm Hg. Die Differenz zwischen dem Sauerstoffpartialdruck der Alveolen und Lungenkapillaren bedingt dann den Übertritt des Sauerstoffes in das Blut und wird als Oxygenierung bezeichnet. Sie liegt nach Übertritt des Sauerstoffes im arteriellen Blut wieder bei etwa 100 mm Hg. Allerdings kann der Sauerstoffgehalt in den menschlichen Geweben sehr variabel und stark von der Gefäßversorgung und den damit verbundenen Stoffaustauschkapazitäten abhängig sein.

Ein Zusammenhang von einer verminderten Sauerstoffkonzentration mit einer erhöhten Strahlenresistenz in Tumoren wird bei Werten unter 10 mm Hg (Bristow und Hill 2008) oder bei 5 mm Hg und weniger (Overgaard 2007) beobachtet. Die für die Strahlentherapie bedeutsame Hypoxie dürfte daher bei Sauerstoffkonzentrationen in dem Bereich von 1 mm Hg bis 10 mm Hg liegen.

Es gibt zwei unterschiedliche Formen der Hypoxie, einerseits die chronische und andererseits die akute Hypoxie. Die Diffusion von Sauerstoff aus den Blut-

gefäßen in das Gewebe ist durch die Diffusionsstrecke, also der Distanz zwischen dem Gewebe und dem Gefäß, begrenzt. Je weiter eine Zelle von einem versorgenden Blutgefäß entfernt ist, desto schlechter ist seine Sauerstoffversorgung. Ab einer Diffusionsstrecke von ca. $70\mu\text{m}$ ist die Diffusion erschwert, so dass in Zellen die etwa $100\mu\text{m}$ von einem Gefäß entfernt sind, eine chronische Minderversorgung mit Sauerstoff vorherrscht, die als chronische Hypoxie bezeichnet wird.

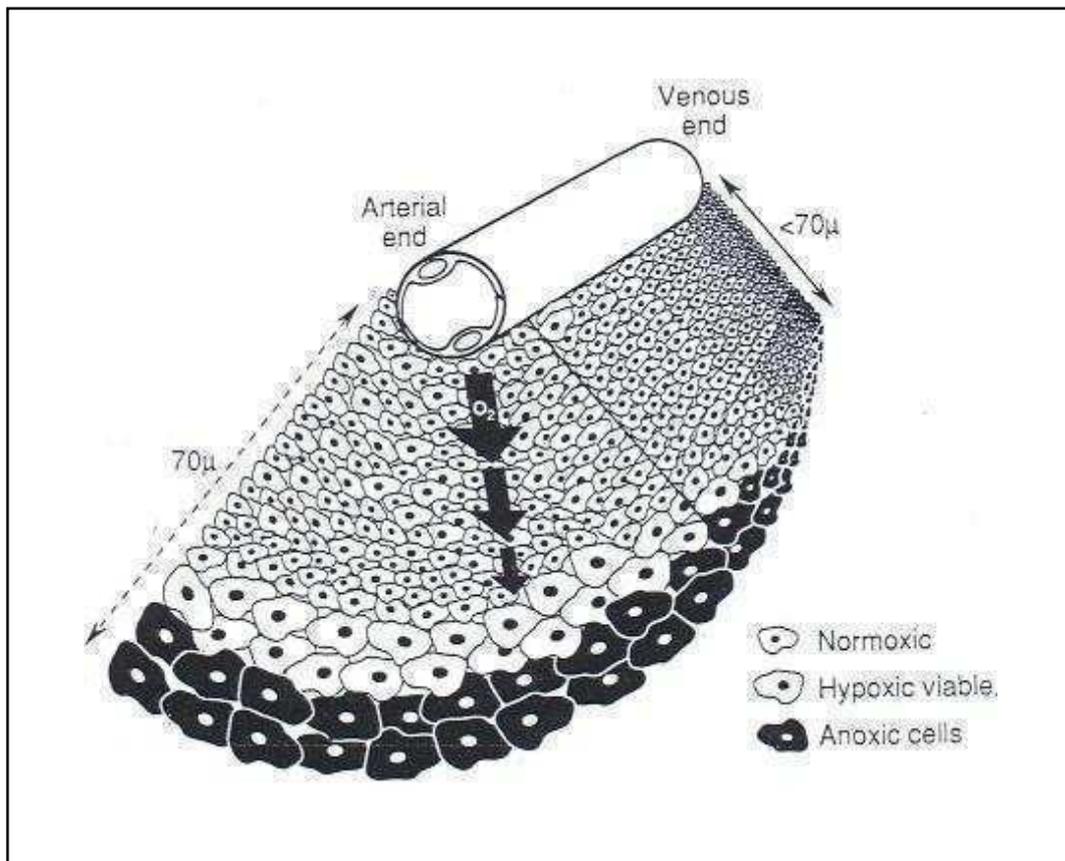


Abb. 2.4: Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration von der Diffusionsstrecke. Mit zunehmender Entfernung vom Gefäß nimmt der Sauerstoffpartialdruck kontinuierlich ab, so dass bei einer Entfernung von ca. $70\mu\text{m}$ kein Sauerstoff mehr vorhanden ist.

(Entnommen aus *Radiobiology for Radiobiologist*, Hall und Giaccia 2006)

Durch kurzfristig verschlossene Gefäße kann es in den umliegenden Zellen, auch in unmittelbarer Nähe des Gefäßes, zu einem akuten Sauerstoffmangel einer sogenannten akuten Hypoxie kommen. Treten solche kurzfristigen Verschlüsse im Wechsel mit einer wiederkehrenden Perfusion auf, spricht man auch von einer zyklischen Hypoxie.

Solide Tumore werden von dem umliegenden gut durchbluteten Gewebe, dem sogenannten Tumorstroma, mit Sauerstoff versorgt. In Abhängigkeit von der Größe

des Tumors entstehen dann durch die Hypoxie bedingte zentrale Nekrosen. Diese zentralen Nekrosen wurden erstmalig von Thomlinson und Gray, 1955 in histologischen Schnitten von Bronchialkarzinomen beobachtet. Kleine Tumoren mit einer Größe von 160 μm oder weniger wiesen histologisch keine zentralen Nekrosen auf, während im Gegensatz dazu in Tumoren mit einer Größe von 200 μm oder mehr immer eine zentrale Nekrose nachgewiesen werden konnte. Tumorzellen, die sich in unmittelbarer Nähe zu der zentralen Nekrose befinden werden im Allgemeinen als chronisch hypoxische Zellen betrachtet.

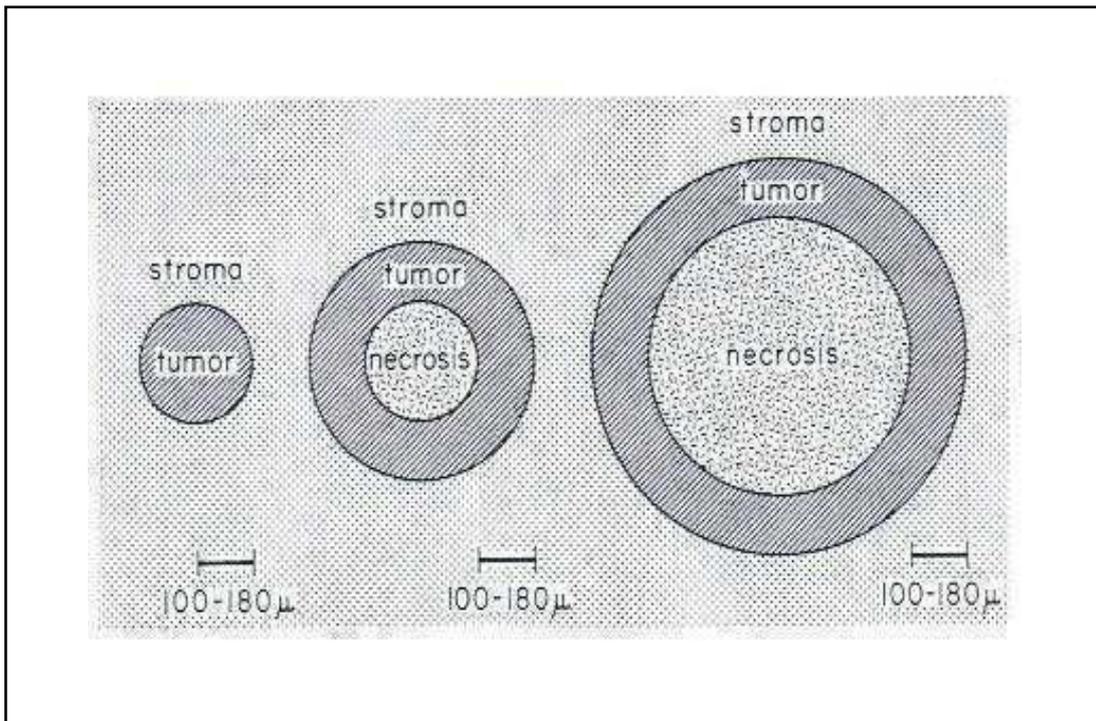


Abb. 2.5: Modell für die Entstehung von zentralen Nekrosen in Bronchialkarzinomen, die von gut durchblutetem Stromagewebe umgeben sind und von diesem versorgt werden. Tumore bis zu einer Größe von 180 μm zeigen keine Nekrose, bei größeren Tumoren zeigen sich dann mit zunehmender Größe größere Areale mit nekrotischem Gewebe.

(Entnommen aus Radiobiology for Radiobiologist, Hall und Giaccia 2006)

Inwiefern es Unterschiede in der Radiosensibilität von akuten, zyklischen oder chronisch hypoxischen Zellen gibt ist bisher nur unzureichend beschrieben (Bristow und Hill 2008). Es ist beispielsweise denkbar, dass sich chronisch hypoxische Zellen besser an die Umgebungsbedingungen anpassen können und sie damit einhergehend bessere Reparaturkapazitäten für DNA-Schäden aufweisen, als dies für akut hypoxischen Zellen der Fall ist.

Wird eine Zelle einer physiologisch wirksamen Hypoxie ausgesetzt, führt dies zu einer Induktion der Genexpression von bestimmten Proteinen. Das als Transkriptionsfaktor fungierende Hif-1 α (**H**ypoxia-**i**nducible **f**actor) ist unter Hypoxie deutlich stärker exprimiert und spielt eine wesentliche Rolle für die Regulation der Sauerstoffversorgung in der Zelle. So beeinflusst Hif-1 α unter Hypoxie die Expression von über 30 Zielgenen.

Es wurde mehrfach beobachtet, dass die Existenz hypoxischer Tumorareale zu einer deutlich schlechteren Überlebensprognose für den Patienten mit einer schlechteren Überlebensprognose führt (Höckel et al. 1996, Carnell et al. 2006). Ursächlich für diese deutlich schlechtere Prognose könnte neben anderen Faktoren auch eine veränderte Fähigkeit der Tumorzellen in der Beseitigung von DNA-Schäden unter Hypoxie sein.

Verbesserungsstrategien für die Strahlentherapie von hypoxischen Tumoren

Auf Grund der erhöhten Strahlenresistenz von hypoxischen Tumoren, wurden in den letzten Jahren verschiedene Strategien entwickelt um die Effektivität der Strahlentherapie zu optimieren.

Fraktionierte Bestrahlung und Reoxygenierung

Mit dem Oxygen Enhancement Ratio kann eine Aussage über den Unterschied der Strahlenempfindlichkeit von anoxischen gegenüber zu normoxischen Tumorzellen gemacht werden. Die Bestrahlungsdosis muss demnach für anoxische Tumorzellen etwa um den Faktor 3 erhöht werden, um den gleichen biologischen Effekt zu erzielen.

Dies führt dazu, dass durch eine Bestrahlung von Tumorgewebe in erster Linie strahlenempfindliche Tumorzellen mit einer guten Sauerstoffversorgung geschädigt werden. Unmittelbar nach einer Bestrahlung findet sich daher ein hoher Anteil von hypoxischen Tumorzellen, die auf Grund ihrer erhöhten Strahlenresistenz überlebt haben.

Innerhalb von Stunden nimmt der Anteil an hypoxischen Tumorzellen jedoch zunehmend ab, was als Reoxygenierung bezeichnet wird. Eine Abnahme der Tumormasse nach Bestrahlung verkürzt die Diffusionsstrecke zwischen den hypoxischen Tumorzellen und den versorgenden Gefäßen, wodurch sie eine im Vergleich zum Zustand vor Bestrahlung deutlich verbesserte Sauerstoffversorgung erhalten. Die Tumorschrumpfung führt darüber hinaus zu einer Abnahme des

Tumorgewebedruckes, was eine verbesserte Mikrozirkulation und eine damit verbundene optimierte Sauerstoffversorgung zur Folge hat. Im Zuge der nächsten Bestrahlungsfraction werden nun abermals vorwiegend die strahlenempfindlichen Tumorzellen mit einer guten Sauerstoffversorgung geschädigt, während die hypoxischen Tumorzellen überleben (Herrmann et al. 2006).

Je stärker die Fraktionierung ist, desto vollständiger ist die Reoxygenierung und der damit verbundene Effekt gegenüber hypoxischen Tumorzellen.

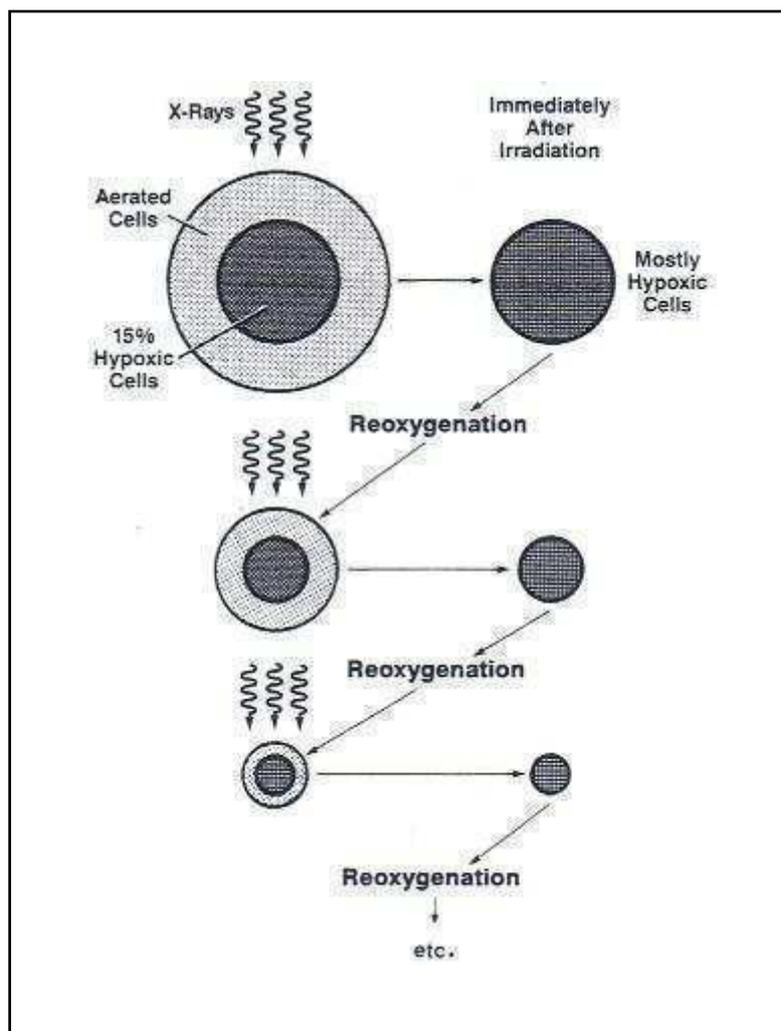


Abb. 2.6: Modell der schrittweisen Reoxygenierung hypoxischer Tumorareale unter fraktionierter Bestrahlung. Durch die Bestrahlung mit einer Fraktion kommt es zur Zerstörung oxidischer Zellen mit der Folge, dass hypoxische Areale reoxygeniert werden können, welche in der nächsten Fraktion deutlich strahlenempfindlicher werden.

(Entnommen aus *Radiobiology for Radiobiologist*, Hall und Giaccia 2006)

Nitroimidazole und Tirapazamine

Nitroimidazole wie Misonidazol können die Strahlensensibilität von hypoxischen Geweben erhöhen, indem sie zu einer vermehrten Entstehung von Radikalen unter Hypoxie und somit zu einer deutlich stärkeren Schädigung der DNA führen. Daher werden sie als sogenannte „Radiosensitizer“ verwendet. Auf diese Weise konnte für Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf- und Halsbereich eine bessere lokoregionäre Kontrolle der Tumors nach einer Radiotherapie und zusätzlicher Gabe eines Radiosensitizers beobachtet werden (Eriksen und Overgaard 2007). Um den Effekt von Misonidazol als Radiosensitizer nutzen zu können, muss eine ausreichend hohe Dosis verwendet werden. Die hierfür benötigte Dosis führt im klinischen Gebrauch jedoch bei vielen Patienten zu einer peripheren Neuropathie, auf Grund derer ein routinemäßiger Gebrauch im klinischen Alltag nicht möglich ist (Overgaard 2007).

Im Laufe der Forschung wurde mit Tirapazamin eine Substanz entdeckt, die einen tumortoxischen Effekt für hypoxische Zellen aufweist. Das unter oxygenierten Bedingungen nicht-toxische Tirapazamin wird durch eine Reduktase unter Übertragung eines Elektrons in eine radikalische Form überführt, aus dem unter Abspaltung von H_2O ein Benzotriazinylradikal (BTZ) entsteht. BTZ führt dann zu einer Schädigung der DNA mit der Folge von gehäuft auftretenden DNA-Doppelstrangbrüchen kommt. Die Wirksamkeit von Tirapazamin wird derzeit noch in klinischen Studien evaluiert und ist durch seine toxischen Nebenwirkungen in der Dosierung limitiert (Brown und Wilson 2004).

Für Patienten mit Glioblastomen (Glioblastoma multiforme) wurde in einer Phase-II Studie die Gabe von Tirapazamine in zwei verschiedenen Dosierungen von 159 mg/m^2 und 260 mg/m^2 und ihre Auswirkung auf die Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe nach der RPA-Klassifizierung untersucht. Es konnte kein signifikant höheres Überleben der Patienten durch die Gabe von Tirapazamin für beide Dosierungen nachgewiesen werden. Lediglich die Gabe von 159 mg/m^2 Tirapazamin für Patienten in der RPA-Klassifikation III brachte eine deutlich höhere Überlebenszeit, die jedoch nicht signifikant war (Del Rowe et al. 2000).

Diese Beobachtungen wurden bestätigt durch Williamson et al. 2005, die in einer Phase-III Studie eine Chemotherapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms mit Paclitaxel und Carboplatin mit und ohne Zusatz von Tirapazamin verglichen. Im Ergebnis wiesen die Patienten, die zusätzlich Tirapazamine bekommen hatten doppelt so häufig toxische Nebenwirkungen wie abdominale Krämpfe, Müdigkeit, vorübergehende Hörverluste, fieberhafte Neutropenien, Blutdruckabfälle und Myalgien auf, als die Referenzgruppe auf.

Dies führte dazu, dass mehr als 40% der Studienpatienten auf Grund der Toxizität nicht die angestrebte Dosierung von Tirapazamin erhalten konnten. Nachdem sich für die Patienten mit zusätzlicher Gabe von Tirapazamin ein deutlich schlechteres medianes Überleben zeigte (37,5% höhere Überlebenszeit bei Therapie ohne Tirapazamin) wurde die Studie aus ethischen Gründen abgebrochen. Somit lässt sich mit der zusätzlichen Gabe von Tirapazamine bei der Chemotherapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms keine verlängerte Überlebenszeit erreichen.

Auf dem derzeitigen Stand der Studienlage ist davon auszugehen, dass eine zusätzliche Gabe von Tirapazamine zu den üblichen Therapieschemata keinen Vorteil für die Patienten mit sich bringt.

Hyperbare Sauerstofftherapie (HBO) mittels ARCON und Erythropoetin

Bei einer modernen Form der hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) dem Therapieschema nach ARCON (Accelerated Radiotherapy with carbogen and nicotinamide) wird mittels der Inhalation von Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentration der Atemantrieb gefördert, so dass es zu einer Hyperventilation und einer damit verbunden besseren Sauerstoffversorgung im Körper kommt. Die zusätzliche Gabe von Nikotinamiden dient der Bildung von NADPH, welches als energielieferndes Coenzym in der Atmungskette von Bedeutung ist und die akute Hypoxie verbessern soll. In einer Studie von Kaanders et al. 2002 konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von ARCON das Überleben von Patienten mit einem Kopf-Halstumor deutlich verbesserte.

Krebspatienten leiden häufig unter einer Anämie, da die Blutbildung im Knochenmark durch den Tumor selbst oder auch als Folge einer Chemotherapie vermindert ist. Bei einer Anämie sind nicht genügend Erythrozyten vorhanden um einen ausreichenden Sauerstofftransport aus der Lunge in den restlichen Körper zu gewährleisten. Daher kann eine Anämie zu einer verminderten Sauerstoffversorgung im Gewebe führen. Das in der Niere und Leber gebildete Erythropoetin ist ein Wachstumsfaktor für die Bildung der Erythrozyten, dessen Ausschüttung in menschlichen Körper durch den Sauerstoffgehalt des arteriellen Blutes reguliert wird. Erythropoetin führt über einen Anstieg der Retikulozyten und einem gesteigertem Sauerstofftransport zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung im Körper. Um diesen Effekt in der Tumorthherapie nutzen zu können, hat man in klinischen Studien eine alleinige Radiotherapie mit der zusätzlichen Gabe von Erythropoetin zur Radiotherapie verglichen. Trotz des theoretisch nachvollziehbaren

Vorteils konnte in einem Großteil der klinischen Studien bisher kein positiver Effekt durch die zusätzliche Gabe von Erythropoetin zur Radiotherapie erzielt werden.

Für Tumoren aus dem Kopf- und Halsbereich wurden in einer Arbeit von Lambin et al. 2009 vier klinische Studien (Henke 2003, Rosen 2003, Machtay 2007, Overgaard 2007) miteinander verglichen, die zur Therapie dieser Tumoren eine Radiotherapie in Kombination mit der Gabe von Erythropoetin sowie eine alleinige Radiotherapie verwendet haben. Die alleinige Radiotherapie erzielte in drei dieser vier Studien eine bessere lokale Tumorkontrolle. Nur eine Studie mit einer relativ geringen Patientenzahl konnte einen leichten Vorteil einer Radiotherapie in Kombination mit der Gabe von Erythropoetin aufweisen. In der Therapie von Tumoren aus dem Kopf- und Halsbereich ist demnach davon auszugehen, dass eine zusätzliche Gabe von Erythropoetin zur Radiotherapie einen negativen Effekt mit sich bringt und somit zur Besserung der Prognose von Patienten mit hypoxischen Tumoren ungeeignet ist.

Ein möglicher Grund für diese Ergebnisse könnte ein Rezeptor sein, an den das Erythropoetin bindet und wodurch es dann zur Auslösung einer Zellreaktion kommen kann. Solche Rezeptoren befinden sich nicht nur auf Erythrozyten, sondern konnten auch in Tumorzellen im Knochenmark oder in Brustkrebszellen nachgewiesen werden.

Anti VEGF

Ein Tumor wird sowohl vom umliegenden Gewebe, dem Tumorstroma als auch vom eigenen Gefäßnetz mit Sauerstoff versorgt. Dabei entsteht das tumoreigene Gefäßnetz im Rahmen einer Gefäßneubildung, die als Tumorangiogenese bezeichnet wird. Der VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ist der treibende Faktor dieser Gefäßneubildung, welcher die Angiogenese über die Stimulation des Endothelwachstums stimuliert. Bleibt diese tumorabhängige Gefäßneubildung aus, geht dies meist mit einer geringen Proliferation des Tumors einher. Entgegen der Vorstellung, dass durch die Unterdrückung der Gefäßneubildung die Hypoxie verstärkt wird konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass sich der Sauerstoffpartialdruck deutlich erhöhte wenn die Tiere mit einem Antikörper gegen den VEGF behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle (20,5 pO₂/14,0 pO₂) (Lee et al. 2000).

Die medikamentöse Unterdrückung der tumorbedingten Gefäßneubildung ist ein neuer Ansatz zur Kontrolle des lokalen Tumorwachstums und der Metastasierung. Mit Bevacizumab, einem Antikörper gegen VEGF wird selektiv die

Tumorangiogenese gehemmt. Es konnte gezeigt werden, dass für Patienten, die mit Bevacizumab einem Inhibitor des VEGF therapiert wurden, eine abgeschwächte Tumorprogression beobachtet erzielt wurde (Yang et al. 2003). Bevacizumab ist mittlerweile für die Therapie von metastasiertem Darmkrebs, Brustkrebs, Lungen- und Nierenkrebs zugelassen (Zweifel und Rüegg 2006).

Die Auflistung der Therapieansätze zeigt sehr deutlich, dass die Problematik der erhöhten Strahlenresistenz in hypoxischen Tumoren im klinischen Alltag mittlerweile von sehr großer Bedeutung ist, so dass zunehmend versucht wird mit diversen Therapiemethoden einen verbesserten Therapieerfolg zu erzielen. Mit der fraktionierten Bestrahlung, modernen Formen der hyperbaren Sauerstofftherapie (ARCON) und Inhibition des VEGF durch Bevacizumab wurden erste vielversprechende Erfolge erreicht. Andere Maßnahmen wie die Gabe von Nitroimidazolen, Tirapazamine oder Erythropoetin erwiesen sich im Unterschied dazu als wenig wirkungsvoll. Zum aktuellen Zeitpunkt ist jedoch bis auf die Gabe Bevacizumab und dies nur in weit fortgeschrittenen Fällen keine dieser neuen Methoden für den alltäglichen klinischen Gebrauch etabliert. Aus diesem Grund müssen die Hypoxie in Tumoren und die von ihr induzierten Mechanismen in den Zellen besser verstanden werden.

2.4 Bedeutung der Hypoxie für die Metastasierung maligner Tumoren

Herabgesetzte Sauerstoffkonzentrationen spielen für die maligne Progression eines Tumors eine wichtige Rolle. Es verdichten sich klinische Hinweise, die einen generellen Zusammenhang zwischen der Hypoxie in Tumoren und der Aggressivität dieses Tumors vermuten lassen (Carnell et al. 2006). Die genauen Mechanismen dieses Phänomens sind größtenteils noch ungeklärt. Eine klonale Selektion von mutierten Zellen auf Grund einer veränderten Reparaturkapazität der Zellen oder eine Auslese von Tumorzellen mit einer reduzierten Sensibilität für die Apoptose sind denkbar (Hall und Giaccia 2006).

Es wurde ebenfalls beobachtet, dass eine Hypoxie mit einer gehäuften Metastasierung der Tumoren einhergeht (Brown und Wilson 2004, Bristow und Hill 2008, Hall und Giaccia 2006) und begrenzt damit die kurativen Therapiemöglichkeiten (zum Beispiel im chirurgischen Bereich). Dies trägt ebenfalls zur deutlich verschlechterten Überlebensprognose von Patienten mit hypoxischen Tumorarealen bei.

2.5 Auswirkungen der Hypoxie auf den Zellzyklus

Im Verlauf eines Zellzyklus teilen sich eukaryotische Zellen in der Mitose (M-Phase) nach deren Durchlaufen sich eine Ruhephase (G1-Phase) anschließt, gefolgt von der Synthesephase (S-Phase) in der die Replikation stattfindet, wieder gefolgt von einer Ruhephase (G2-Phase). Der Zellzyklus koordiniert und kontrolliert die Zellteilung und Replikation von Zellen und auch von Tumorzellen.

Unter hypoxischen Bedingungen kann es in Tumorzellen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Hammond et al. 2003, Yoshida et al. 2008) oder in der S-Phase (Hammond et al. 2003, Mizuno et al. 2009) kommen. Ein solcher Zellzyklusarrest kann sich möglicherweise auf die Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen auswirken, die zellzyklusabhängig reguliert wird. So ist das Nicht-Homologe-Endjoining zellzyklusunabhängig und in allen Zellzyklusphasen aktiv, die Homologe Rekombination nur in der S- und G2-Phase in der Lage DNA-Doppelstrangbrüche zu beheben.

2.6 Auswirkungen der Hypoxie auf die Stabilität des Genoms

Der Erhalt und die korrekte Weitergabe des genetischen Materials sind für alle lebenden Organismen von essentieller Bedeutung. Die Integrität des Genoms ist jedoch durch Schädigungen der DNA kontinuierlich gefährdet. DNA-Schäden werden durch endogene oder exogene Prozesse verursacht.

Endogene DNA-Schäden können beispielsweise durch freie Sauerstoffradikale im Laufe des normalen Zellstoffwechsels oder auch durch ein hypoxisches Umfeld entstehen (Bristow und Hill 2008, Hall und Giaccia 2006).

Bei fehlender sowie fehlerhafter Entfernung dieser DNA-Schäden können Mutationen entstehen, die ihrerseits zum Absterben der Zelle oder zur Transformation führen können. Das Erkennen und die Reparatur solcher Schäden sind lebensnotwendig für die Zelle, der Erhalt der genomischen Stabilität ihre wichtigste Aufgabe. Zu diesem Zweck existieren in allen Organismen komplexe und genau regulierte Reparaturmechanismen. So gibt es für die einzelnen Schadenstypen entsprechende Reparaturwege, wobei die Reparaturgenauigkeit vor allem in Hinblick auf die Tumorentstehung eine sehr bedeutende Rolle spielt.

Basenschäden und Einzelstrangbrüche werden durch die Basenexzisions-, Nukleotidexzisions-, oder Mismatchreparatur beseitigt, indem der intakte komplementäre Strang als Matrize für die Wiederherstellung der Originalsequenz dient. Vernetzungen zwischen beiden DNA-Strängen bzw. zwischen DNA und Protein werden vermutlich durch die Koppelung verschiedener Mechanismen

repariert, DNA-Doppelstrangbrüche durch das Nicht-Homologe-Endjoining (NHEJ) oder die Homologe Rekombination (HR). Ein Defekt in der Reparatur von DNA-Schäden hat das Potential, die Mutationsrate zu erhöhen. Die dadurch verursachten genetischen Veränderungen können auf die nächste Zellgeneration übertragen werden und in einer zunehmenden Instabilität der genetischen Information resultieren. Geht die genomische Instabilität auf eine veränderte Genregulation zurück, so kann sich beispielsweise ein Defekt in den Mismatch-Repair-Genen in einem erhöhten Risiko für das hereditäre nicht polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) manifestieren (Bonis et al. 2007).

2.7 Reparatur von DNA-Schäden mittels Mismatch-Repair

Für die fehlerfreie Weitergabe der DNA von einer Generation zur nächsten, spielt die Mismatch-Reparatur eine wichtige Rolle. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Korrektur von Basenfehlpaarungen zwischen Guanin und Thymidin sowie von Insertions-Deletions-Schleifen der DNA. Die Erkennung der Basenfehlpaarungen erfolgt im wesentlichen durch drei Proteinheterodimere (hMut α , hMut β und hMut γ), die sich aus den Proteinen hMSH2, hMSH6, hMSH3, hMLH1 und hMPMS2 zusammensetzen (Rädle und Plotz 2004).

2.8 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche entstehen durch eine Kontinuitätsunterbrechung eines vorbestehenden DNA-Moleküls, z. B. in der Folge ionisierender Bestrahlung. Der Bruch beider Stränge eines DNA-Moleküls an gegenüberliegenden Stellen stellt eine der bedrohlichsten DNA-Läsionen dar, da es bei fehlerhafter Reparatur zur Bildung von Chromosomenaberrationen (Burma et al. 2006) führen kann.

Geht beispielsweise durch ein Doppelstrangbruch ein ganzer Chromosomenarm verloren, führt dies zu einem Verlust an genetischer Information von mehr als 100 Millionen Basenpaaren (Helleday et al. 2007). Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen erfolgt grundsätzlich über zwei Hauptreparaturwege, dem Nicht-Homologen-Endjoining und der Homologen Rekombination. Das NHEJ vermittelt die sequenzunabhängige Ligation der Bruchenden und stellt in nicht synchronisierten Zellen höherer Organismen den Hauptreparaturweg dar (Sonoda et al. 2006).

Daneben existieren homologieabhängige Reparaturwege, die als konservative homologe Rekombination (HR) zu einer vollständigen Wiederherstellung der an der Bruchstelle zerstörten Sequenz führen, bzw. in Form des Single Strand Annealing (SSA) mit einer Deletion einhergehen und somit zu einem nicht-konservativen Reparaturprodukt führen können.

Die einzelnen Reparaturwege unterscheiden sich somit in der Qualität der Reparatur, den beteiligten DNA-Reparaturproteinen und in ihrer Abhängigkeit vom Zellzyklus. Die ausbleibende oder fehlerhafte Reparatur eines Doppelstrangbruches kann zu Chromosomenaberrationen führen und somit die Integrität des Genoms gefährden.

2.8.1 Das Nicht homologe Endjoining

Für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch das Nicht-Homologe-Endjoining wird keine oder nur eine sehr kurze etwa 1-6 Basenpaare lange Homologie für die Verknüpfung der beiden DNA-Enden benötigt (Lieber 2008). Das Nicht-Homologe-Endjoining ist ein einfacher schnell ablaufender Reparaturprozess von DNA-Doppelstrangbrüchen, der lediglich die gebrochenen DNA-Enden miteinander verknüpft. Hierdurch ergibt sich möglicherweise eine nicht exakte und teilweise fehlerhafte Reparatur, bei der einige Nukleotide verloren gehen können. Im NHEJ wird das Bruchende des Doppelstrangbruches mittels des aus den Untereinheiten Ku70 und Ku80 bestehenden Heterodimeres erkannt, in dessen Folge sich die katalytische Untereinheit des Komplexes die DNA-PKcs anlagern kann, welche durch Artemis unterstützt den Reparaturprozess katalysiert, die Polymerasen μ und λ füllen Lücke der Basensequenz auf und die Enden werden durch den Komplex aus Ligase IV, XRCC4 und XLF geschlossen (Beucher 2009).

2.8.2. Die Homologe Rekombination

Konservative Homologe Rekombination ermöglicht eine präzise und fehlerfreie Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Im Verlauf der HR kommt es nicht zu einem Verlust an genetischer Information im Bereich der Bruchstelle, es erfordert allerdings eine deutlich aufwändigeres Prozessieren der Bruchenden, um die umgebende Basensequenz freizulegen und eine homologe Sequenz aufzusuchen. Als Matrize für die Reparatursynthese wird eine mehrerer hundert Basenpaare lange, homologe Sequenz meist vom Schwesterchromatid benötigt. Nach Erkennung des Doppelstrangbruches durch den MRN-Komplex muss der

Doppelstrangbruch zunächst exonukleolytisch reseziert werden, wodurch ein einzelsträngiger Überhang erzeugt wird, der sofort mit dem Replikationsprotein A (RPA) geschützt und gleichzeitig die Anlagerung von RAD51, dem zentralen Protein der HR, ermöglicht. Zusammen mit seinen Paralogen RAD51B, C, D, XRCC2 und XRCC3 bilden sie das zentrale Element der HR (Helleday et al. 2007). Dabei ist RAD51 auf das koordinierte Zusammenspiel weiterer Proteine wie RAD52 und RAD54 angewiesen. Die Proteine BRCA2 und FANCD2 ermöglichen den Transport von RAD51 in den Kern sowie dessen Beladung auf den defekten DNA-Strang. Während BRCA2 hauptsächlich in die Reparatur mittels HR eingeschlossen ist greift BRCA1 sowohl in NHEJ als auch HR ein.

2.9 Die Reparatur von DNA-Crosslinks

Die Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika, sowie Bestrahlung von Tumoren kann ebenfalls zu Quervernetzungen der beiden DNA-Stränge untereinander, den sogenannten „Crosslinks“ führen. Diese Vernetzungen können zwischen benachbarten Basen (Intrastrand-Crosslink) und gegenüberliegenden Basen (Interstrand-Crosslink) die dann als DNA-DNA-Crosslinks bezeichnet werden oder zwischen DNA und Proteinen als „DNA-Protein-Crosslinks“ entstehen.

Für hypoxische Hamsterzellen des Ovars konnte gezeigt werden, dass eine Bestrahlung zu einer höheren Anzahl von DNA-Protein-Crosslinks führt, als dies bei normoxischen Hamsterzellen der Fall ist (Meyn et al. 1987). Jene Crosslinks bringen, falls sie nicht repariert werden können, eine hohe Letalität für die betroffene Zelle mit sich (Sprong et al. 2006). Daher spielt die Reparatur von DNA-Crosslinks vor allem bei hypoxischen Zellen sowie hypoxischen Tumorzellen eine besondere Rolle, während sie unter normoxischen Bedingungen von geringerer Bedeutung ist (Murray et al. 1993).

Für die Reparatur von DNA-Crosslinks ist in erster Linie die Gruppe der Fanconi Anemia Proteine (FANCA-M) verantwortlich, bei denen das FANCD2 von besonderer Bedeutung ist. Die Proteine FANCA-G aktivieren das FANCD2 durch Monoubiquitinierung wodurch es seine DNA-bindende Aktivität erhält (Collis et al. 2006).

2.10 Die Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie

Eine Vielzahl von Hinweisen deutet an, dass sich die Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie deutlich von der Expression unter normoxischen Sauerstoffkonzentrationen unterscheidet.

Eine deutlich veränderte Expression unter Hypoxie von Proteinen der Mismatch-Reparaturproteine konnte sowohl für dermale Fibroblasten als auch für die Zelllinie HeLa, aus einem Zervix-Karzinom generiert, beobachtet werden. Dabei zeigten sie, dass die Proteine MLH1 und PMS2 eine Reduktion unter Hypoxie nach Inkubation für 48h aufwiesen, während sich für die andere Mismatch-Reparaturproteine wie MSH2 und MSH6 keine Auswirkungen der Hypoxie auf die Proteinexpression zeigten (Mihaylova et al. 2003). Dagegen beobachteten (Koshiji et al. 2005) auch für die Mismatch-Reparaturproteine MSH2 und MSH6 eine deutliche Reduktion in der Expression unter Hypoxie in HCT116-Zellen aus einem Kolonkarzinom.

Für die Proteine Ku70, Ligase IV und DNA-PK des Nicht-Homologen-Endjoining konnte eine verminderte Expression bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,2 % in DU145-Zellen (Prostatatumor) nach 48-72 Stunden nachgewiesen werden (Meng et al. 2005). Diese Beobachtung wurde bestätigt durch (Lara et al. 2008) die ebenfalls eine Reduktion von Ku70 und Ku80 unter Hypoxie (pO_2 jeweils unter 10 mm Hg bzw. unter 5 mm Hg) in Zelllinien des Zervixkarzinoms beobachteten. Keine veränderte Expression von Ku70 und Ku80 im Vergleich von normoxischen zu hypoxischen Bedingungen (48 h, 0,01% Sauerstoff) konnte von (Bindra et al. 2005) in Zelllinien eines Kolonkarzinoms (RKO), Mammakarzinoms (MCF7) und eines Lungenkarzinoms (A549) festgestellt werden. Dagegen wurde eine deutliche Zunahme der Expression von Proteinen des Nicht-homologen Endjoinings in Zelllinien des Leberkarzinoms beobachtet, die für einen Zeitraum von zwei bis acht Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 1% ausgesetzt waren (Um et al. 2004).

Bezogen auf die Expression von DNA-Reparaturproteinen der Homologen Rekombination konnte eine deutliche Verminderung von RAD51 unter Hypoxie in Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft festgestellt werden. So zeigten MCF7-, A549-, HeLa-, SW480-, RKO-, PC3- und A431-Zellen unter Hypoxie (Sauerstoffkonzentration von 0,01 % für 48 Stunden) eine verminderte RAD51 Expression. Für die DNA-Reparaturproteine Rad50, Rad51B, Rad52 und Rad54B zeigte sich dagegen keine veränderte Expression unter Hypoxie (Bindra et al. 2004). Dagegen konnte eine Verminderung in der Expression von Rad51, Rad51C, Rad51D, Rad52, Rad54, XRCC3, BRCA1 und BRCA2 bei Sauerstoff-

konzentrationen von 0,2 % über einen Zeitraum von 48-72 Stunden in den Prostatatumorzellen DU145 und PC3 beobachtet werden (Meng et al. 2005).

Fasst man die Daten zusammen so zeigt sich ein eher heterogenes Bild für Änderungen in der Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie. Einige Hinweise deuten in Richtung eines Anstieges von Proteinen des NHEJ, die meisten weisen jedoch darauf hin, dass die Hypoxie zu einer Reduktion sowohl von Mismatch-Reparaturproteinen, Proteinen des NHEJ als auch der HR führt. Alle aufgelisteten Beobachtungen basieren auf Tumorzelllinien sehr unterschiedlicher Herkunft, unter Einsatz unterschiedlicher Zeiträume und unterschiedlicher Ausprägung der Hypoxie. Keine dieser Studien ist systematisch an Tumorzelllinien einer Tumorentität, beispielsweise des Kopf/Halsbereiches durchgeführt worden. Für diese Tumorentität wird dem Ausmaß der Hypoxie eine entscheidende Rolle bezogen auf die Prognose der Patienten beigemessen. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung der Frage leisten, ob sich die Expression von DNA-Reparaturproteinen des NHEJ und der HR in gleicher Weise in zehn Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf/Hals-Bereiches verändern.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zelllinien

Alle Experimente wurden mit zehn Tumorzelllinien durchgeführt. Die Zelllinien wurden aus Plattenepithelkarzinomzellen von menschlichen Primärtumoren bzw. Metastasen aus dem Kopf- und Halsbereich gewonnen, die über eine Explantatkultur der Biopsie generiert wurden. Die zehn Tumorzelllinien weisen folgende Klassifikationen auf:

Bezeichnung	Ursprung	Präparat	Histologie
1. FaDudd	Hypopharynx	Primärtumor	Grad IV
2. UTSCC 14	Zunge	Primärtumor	Grad II
3. SAS	Zunge	Primärtumor	Grad IV
4. HSC 4	Zunge	Primärtumor	Grad I
5. Cal 33	Zunge	Primärtumor	Grad I
6. UTSCC 15	Zunge	Primärtumor	Grad I
7. UTSCC 5	Zunge	Metastase	Grad II
8. XF 354	Mundboden	LK- Metastase	Grad I
9. UTSCC 8	Larynx	Metastase	Grad I
10. UTSCC 45	Mundboden	Primärtumor	Grad II

3.2 Zellkulturhaltung

Die Zellkulturhaltung erfolgte durch Aussaat der Zellen in Gewebekulturflaschen (Falcon) unter Zugabe des Nährmediums DMEM, welches mit fetalem Kälberserum, NaHCO₃, Natriumpyruvat, HEPES, L-Glutamat und Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin) versetzt wurde, bei 37°C in einem Inkubator mit 10% CO₂ und 21% O₂. Ein- bis zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen für 1-2 min mit 5 ml 0,25% Trypsin versetzt, um die Haftung der Zellen am Flaschenboden aufzuheben. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und in geringerer Dichte ausgesät.

3.3 Inkubation der Zellen unter oxischen und hypoxischen Bedingungen

Alle Experimente wurden mit exponentiell wachsenden Zellen durchgeführt. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen für 1-2 min mit 5 ml 0,25% Trypsin versetzt, in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einer Dichte ausgesät, die ein exponentielles Wachstum über einen Zeitraum von 48h erlauben, um einen auf Stress zurückzuführende Stoffwechselveränderung aufgrund der mangelnden Ausbreitungsmöglichkeiten zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Gewebekulturflaschen für 48h in einer Hypoxiekammer (Labotect Inkubator C42) transferiert und mit einer Sauerstoffkonzentration von 21%, 5%, 1% bzw. 0,1% inkubiert. Nach 48h wurden die Zellen aus der Hypoxiekammer entnommen und sofort auf Eis gekühlt, um durch Herabsetzen der Stoffwechselaktivität eine mögliche Reoxygenierung zu verhindern.

3.4 Western Blot

Der Western Blot ist die wichtigste Methode zum Nachweis von Proteinen, die von Edwin Southern erfunden wurde (Abdolvahad-Emminger 2003). Bei den von ihm entwickelten „Blotting Verfahren“ handelt es sich um den elektrisch unterstützten Transfer von DNA (Southern), RNA (Northern) oder Protein (Western) aus einer gelartigen Träger-substanz auf eine Membran. Für diesen Transfer werden die Ladungseigenschaften der Proteine ausgenutzt.

Zur Vorbereitung des eigentlichen Proteintransfers werden die Proteine zunächst nach ihrer Größe mittels eines SDS-PAGE aufgetrennt, indem der Proteinextrakt in eine am oberen Ende eines Polyacrylamidgels (Agarose wird nur für DNA und RNA verwendet) befindliche Tasche gegeben wird. Durch eine senkrecht angelegte elektrische Spannung wandern die Proteinen je nach Proteingröße in unterschiedlichen Geschwindigkeiten von den negativ geladenen Startpunkt in den positiv geladenen unteren Bereich des Polyacrylamidgels. Der eigentliche Blot erfolgt durch auflegen einer Nitrozellulose Membran auf das Polyacrylamidgel und dem Anlegen einer waagerechte elektrische Spannung, so dass die Proteine aus dem Agarosegel in die Nitrozellulose Membran wandern. Die Proteine befinden sich hiernach je nach Proteingröße auf unterschiedlichen Höhen der Nitrozellulose Membran.

Mit einem spezifischen Antikörper, der das Protein (Antigen) bindet werden die einzelnen Proteine spezifisch detektiert. Mit einem zweiten Antikörper wird der vorhandene Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht. Der zweite Antikörper setzt den Antigen-Antikörper-Komplex enzymatisch um, so dass er auf einem

Röntgenfilm eine dunkle Markierung hervorruft, die im Western Blot in Form einer Bande (siehe Abb. 3.1) sichtbar wird.

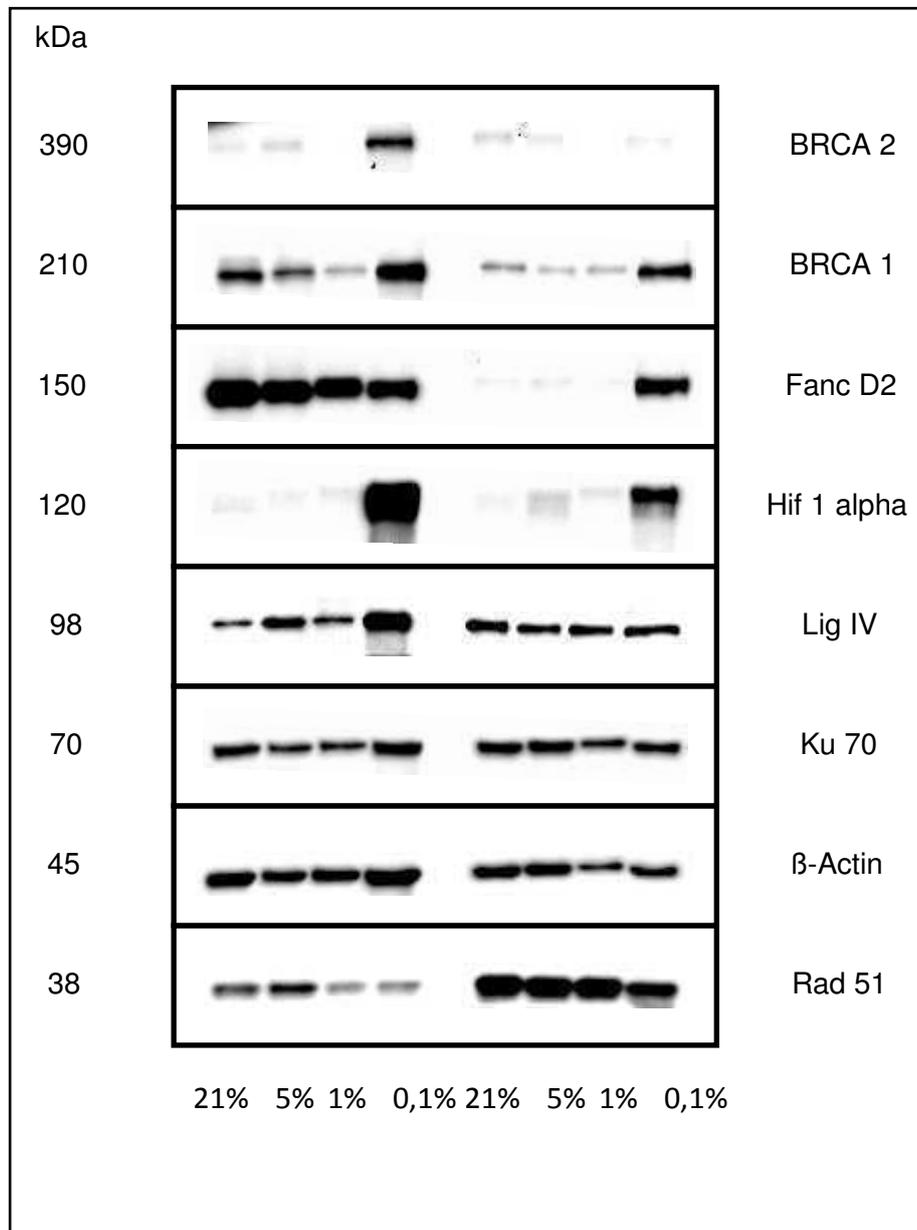


Abb. 3.1: Proteinexpression der 8 Proteine BRCA2, BRCA1, Fanc D2, Hif1 α , Lig IV, Ku 70, β -Actin und Rad 51 in verschiedenen Tumorzelllinien nach Inkubation mit 21 %, 5%, 1% und 0,1 % Sauerstoff. Die Proteine wurden isoliert und mittels Antikörper gegen die 8 verschiedenen Proteine detektiert.

Mit einem computergestütztem Verfahren kann nun aus der Signalstärke der sichtbaren Banden auf die vorhandenen Proteinmengen geschlossen werden.

In den Experimenten sollten mittels Western Blot pro Proteinextrakt acht verschiedene Proteine (siehe Abb. 3.1) nachgewiesen werden. Da bei jedem

Detektionsvorgang auf der Membran befindliche Proteine unspezifisch abgelöst werden können und man somit maximal drei Proteine pro Membran detektieren sollte, wurde die Membran nach dem Blotten an zwei Positionen entlang der mittels Markerproteine abgeschätzten Proteingröße geschnitten. Dadurch wurden drei Membran-Abschnitte eines Blots erzeugt, wodurch die mögliche Anzahl der aufeinander folgenden Nachweise von Proteinen auf derselben Membran auf neuen erhöht wurde. Um abschätzen zu können auf welcher Höhe sich welche Proteine einer bestimmten Größe befinden, wurden in den Experimenten die beiden Spezialmarker Kaleidoscope Prestained Standards und See blue Plus 2 Prestained Standard verwendet. In der SDS-Gelelektrophorese in der ersten Tasche aufgetragen, hinterlassen die Marker am Ende der Elektrophorese farbige Banden auf bestimmten Höhen der Membran für bestimmte Proteingrößen. Dies ermöglicht eine gute Orientierung und einen präzisen Schnitt der Nitrozellulose Membran.

In den Experimenten wurde die Nitrozellulose Membran so auf zwei Höhen zwischen 120 kDa und 150 kDa, sowie zwischen 70 kDa und 98 kDa geschnitten. Dadurch erhielt man einen oberen, einen mittleren und einen unteren Membran-Abschnitt. Auf dem oberen Membran-Abschnitt wurden die Proteine BRCA2, BRCA1 und FANCD2, auf dem mittleren Membran-Abschnitt die Proteine Hif-1 α , Lig IV und Ku70 und auf dem unteren Membran-Abschnitt die Proteine β -Actin und Rad 51 nachgewiesen.

Mit diesen Schnitten war es möglich nach drei Durchgängen des Nachweisverfahrens bereits alle acht Proteine mit größtmöglicher Qualität nachzuweisen.

Divergente Extraktionsmethoden können zu unterschiedlichen Proteinausbeuten bzw. Kompositionen führen, deshalb wurden zunächst zwei verschiedene Extraktionsmethoden ausprobiert.

3.4.1 Proteinisolierung nach Finnie

Zunächst wird die Methode nach Finnie (Finnie et al. 1995) für die Isolierung von Proteinen eingesetzt. Bei dieser Methode wird das gesamte Protein der Zelle extrahiert.

Zunächst wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 5 ml 0,25% Trypsin inkubiert und sofort in Kulturmedium (DMEM) aufgenommen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten danach bei 4°C und auf einer sterilen Werkbank (Heraeus), um eine Degradation der Proteine zu verhindern. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und 8 min mit 328 g bei 4°C zentrifugiert (Laborfuge 400R). Anschließend wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig

abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 5 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Zellsuspension wurde erneut bei 4 °C mit 151 g für 8 min zentrifugiert (Microfuge R). Parallel wurden 146 µl des Puffers A auf Eis aufgetaut, mit 5 µl PMSF und 50 µl Glycerol versetzt und gemischt. Das Volumen des Zellsediments wurde abgeschätzt, und es wurde ein dem Sedimentvolumen gleiches Volumen an Extraktionspuffer zugegeben. Bei einem sehr kleinen Sediment wurden 20 µl Extraktionspuffer eingesetzt. Die Zellen wurden in dem Extraktionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die zellulären Strukturen durch Schockfrieren aufgebrochen. Hierfür wurde das Reaktionsgefäß abwechselnd 1 min in flüssigem Stickstoff und 1 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Anschließend wurden die Zellbestandteile für 10 min bei 10822 g und 4 °C (Microfuge R) sedimentiert. Der Proteinextrakt wurde abgenommen, in ein neues, steriles 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gemischt. Für die Proteinbestimmung wurden 2 µl des Extraktes abgenommen. Der verbleibende Zellextrakt wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Proteinisolierung nach Snapfreeze

Für die Extraktion von Proteinen wurde neben der Methode nach Finnie auch die Methode nach Snapfreeze verwendet. Bei dieser Methode wird ebenfalls das gesamte Protein der Zelle extrahiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C und auf einer sterilen Werkbank (Heraeus), um eine Degradation des Proteinextrakts zu verhindern. Das Nährmedium in den Zellkulturflaschen (Falcon) wurde mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Der Zellrasen wurde mit auf Raumtemperatur erwärmten TBS gespült und anschließend vollständig abgesaugt. Die verschlossenen Zellkulturflaschen wurden auf das Trockeneis gelegt, bis die Zellen gut gefroren waren. Während der Inkubation der Zellen auf dem Trockeneis wurde der Extraktionspuffer hergestellt und etwa 500 µl bei einer Zellkulturflasche von 75 cm² eingesetzt. Dann wurden die Zellkulturflaschen vom Trockeneis genommen, so dass die Zellen im Extraktionspuffer auftauten. Die Zellen wurden vom Flaschenboden abgeschabt und mit einer 2 ml Pipette in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellsuspension wurde mit einer 20G-Nadel fünfmal resuspendiert und anschließend bei 4 °C mit 13 000 g für 15 min zentrifugiert. Das Proteinextrakt wurde abgenommen, in ein neues, steriles 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gemischt.

Für die Proteinbestimmung wurden 2 µl des Extraktes abgenommen. Der verbleibende Zellextrakt wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Proteinbestimmung

Für die Quantifizierung der extrahierten Proteine wurde die BCA-Methode (Smith et al. 1985) mit dem Reagenz der Firma Pierce eingesetzt. Basierend auf der Biuret-Reaktion werden Cu^{2+} -Ionen durch das Protein zu Cu^+ -Ionen reduziert und bilden einen Komplex mit einem kolorimetrischen Reagenz, das Bicinchoninsäure (BCA) enthält. Der Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Absorption steigt im Messbereich zwischen 20 und 2.000 µg/ml linear mit der Proteinkonzentration an.

2 µl des Proteinextraktes wurden in 48 µl sterilem H_2O bidest. verdünnt. Als Blindprobe diente H_2O bidest. Das Farbreagenz wurde durch Mischen von 50 Teilen Reagenz A mit einem Teil Reagenz B angesetzt. Zu den verdünnten Proteinextrakten und der Blindprobe wurden je 1 ml Farbreagenz gegeben. Die Proben wurden gemischt und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz bei Raumtemperatur abgekühlt, in Küvetten transferiert und die Extinktion bei 562 nm im Photometer gemessen. Jede Messung wurde innerhalb von 10 min vollendet.

Als Standard diente Rinderserumalbumin. Die Standardkurve wurde mit sechs Verdünnungen zwischen 25 und 1000 µg/ml BSA aufgenommen und im Gerät gespeichert. Jeder Standardwert wurde dreimal bestimmt.

3.4.4 Nachweis der Proteine

20 µg Proteinextrakt wurden mit 5x Probenpuffer und H_2O bidest. versetzt, gemischt und für 8 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Das Volumen der Probe durfte 25 µl nicht überschreiten. Die gekochten Proben wurden auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte durch ein 7,5 %iges Tris-HCl Polyacrylamid-Gel für 5 min bei 100 V (Sammelphase) und 55 min bei 200 V (Trennphase). Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte im Criterion Blotter (BioRad) für 25 min bei 100 V im Kühlschrank. Vor dem Transfer wurde die Membran 10 sec in Methanol aktiviert und 5 min in aqua bidest. gewaschen. Anschließend wurden sowohl das Gel als auch die Membran 5 min in Towbin-Transferpuffer äquilibriert.

Nach dem Transfer wurde die Membran einmal kurz mit PBS abgespült und zur Blockade der freien Bindungsstellen für 1 h mit 5% MM-PBS blockiert. Anschließend wurde die Membran einmal kurz mit PBST abgespült und dreimal 10 min mit PBST unter Schütteln gewaschen.

3.4.5 Detektion der Proteine

Die Detektion der sechs DNA-Reparaturproteine BRCA 2, BRCA 1, Fanc D2, Lig IV, Ku 70 und Rad 51 erfolgte mittels monoklonalem Antikörper gegen das jeweilige Protein in der unter 3.5.4 angegebenen Konzentration. Zur Kontrolle des Oxigenierungsgrades wurde Hif 1 α in der unter 3.5.4 beschriebenen Konzentration eingesetzt. Für die Beladungskontrolle wurde β -Actin eingesetzt. Alle Antikörperinkubationen erfolgten für 48h unter Schwenken bei 4°C. Nach der Detektion der Proteine wurde die Membran erneut einmal kurz mit PBST abgespült und dreimal 10 min mit PBST gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörper für 75 min unter Schwenken. Die Membran wurde einmal kurz und dreimal 10 min mit PBST gewaschen. Zur Detektion wurde das ECL Western Blotting Detection Reagent eingesetzt. Je 2 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 wurden gemischt, auf die Membran pipettiert und für 1 min inkubiert. Die Lösung wurde mit Filterpapier aufgesaugt und die Membran ohne Luftblasen eingeschweißt. Das Chemolumineszenz-Signal wurde zunächst mit einer ultrasensitiven CCD-Kamera (NightOwl) mit Hilfe der Software Winlight aufgezeichnet und quantitativ analysiert. Im Anschluss wurde ein Röntgenfilm, je nach Signalstärke, für 30s bis hin zu 20 min. aufgelegt und in einer Entwicklermaschine (Amersham pharmacia biotech) entwickelt und fixiert. Als quantitative Kontrolle wurde auf derselben Membran β -Actin nachgewiesen.

Die Auswertung der aufgenommenen Chemolumineszenz-Signale erfolgte mit Hilfe der Software Winlight. Die relative Menge der sechs DNA-Reparaturproteine BRCA 2, BRCA 1, Fanc D2, Lig IV, Ku 70, Rad 51 und von Hif 1 α errechnete sich, indem von den jeweils spezifischen Signalen der Proteine der Hintergrund abgezogen und das so korrigierte Signal der sechs DNA-Reparaturproteine und des Hif 1 α auf das korrigierte Signal des β -Actins normiert wurde.

3.5 Puffer und Lösungen

3.5.1 Reagenzien und Medien für die Zellkultur

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung/Hersteller</i>
DMEM	DMEM 1 x GIBCO (10938)
Fötale Kälberserum (FCS)	FBS Superior BIOCHROM AG (S0615)
HEPES	HEPES (1M) SIGMA (H4034-500G)
Kulturmedium	425 ml DMEM, 50 ml FCS, 5 ml Natriumpyruvat, 5 ml HEPES, 5 ml Pen/Strep, 10 ml L-Glutamat
L-Glutamat	L-Glutamine 200 mM 100 x GIBCO (25030)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin (je 10,000 Units/ml) GIBCO (15140)
Natriumpyruvat	Sodium pyruvate (100 mM) BIOCHROM AG (L 0473)
Trypsin	0,05 % Trypsin-EDTA 1 x GIBCO (25300)

3.5.2 Reagenzien zur Detektion von Proteinen

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
BCA Protein Assay	Fa. Pierce
ECL-Lösung (Enhanced Chemolumineszenz)	Amersham Bioscience

3.5.3 Allgemeine Puffer, Lösungen und Chemikalien

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung/ Hersteller</i>	<i>Lagerung</i>
Agarose	3 % (w/v) in 1x TBE, Bio-Rad	RT
Carnoy`s Fixativ	75 % (v/v) Methanol 25 % (v/v) Essigsäure, Merck	RT
Colcemid	0,02 % Demecolcine in PBS Steril filtrieren	4 °C
Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie Brillant Blue R250 0,05 % (w/v) coomassie brillant blue G250 44,7 % (v/v) Ethanol abs. 10,5 % (v/v) Eisessig über Nacht unter Rühren lösen	RT
Coomassie-Entfärber	13 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig	RT
Entwickler für Röntgenfilme	1:10 Eukobrom, Tetenal	RT
Fixierer für Röntgenfilme	1 : 5 Superfix, Tetenal	RT
2 % Formaldehyd	5,4 % (v/v) Formaldehyd in 1x PBS (Stamm 37 % w/v, End 2 % w/v)	frisch angesetzt
Giensa-Färbelösung	4 % (v/v) Giensa, Sigma (Stamm 0,4 % w/v, End 0,016 % w/v) in 1xPBS	frisch angesetzt

Kristallviolett-Färbelösung	0,1 % (w/v) in H ₂ O bidest.	RT
1x Laufpuffer	10 % (v/v) 10x TG-Puffer 1 % (v/v) SDS (Stamm 10 % w/v, End 0,1 % w/v)	frisch angesetzt
PMSF	200 mM in Isopropanol	Aliquots bei 20 °C
Puffer A	20 mM Hepes 450 mM NaCl 50 mM NaF 0,2 mM EDTA 0,5 mM DTT 0,5 µg/ml Leupeptin 0,5 µg/ml Pepstatin A 1,0 µg/ml Trypsin Inhibitor 0,5 µg/ml Aprotinin 40 µg/ml Bestatin	Aliquots bei -20 °C
Puffer nach G. Lammering	9,2 ml Stammlösung 500 µl Glycerol 100 µl Triton X-100 1 mini-complete Tablette (Protease-Inhibitor) 100 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 100 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	RT

5 % MM-PBS	5%(w/w)Magermilchpulver (Naturaflor), Toepfer, in 1xPBS	frisch angesetzt
1x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 2 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O Autoklaviert	RT
PBST	0,05 % (v/v) Tween 20 in 1x PBS	RT
PBS+	0,15 % Glycin 0,5 % BSA in 1x PBS	
5x Probenpuffer nach Laemmli	50 mM tris-HCl, ph 6,8 100 mM DTT 2 % (w/v) SDS 0,1 % Bromphenolblau 10 % Glycerol	in Aliquots bei -20°C
Propidiumjodid (PI)	MP Biomedicals	
RNAse (Ribonuclease A From Bovine Pancreas)	Sigma-Aldrich	
10 % SDS	10 % (w/v) SDS in H ₂ O bidest.	RT

1x Transferpuffer nach Towbin	10 % (v/v) 10x TG-Puffer	frisch
	20 % (v/v) Methanol	angesetzt
	kühlen bei 4 °C im Eis	
	0,5 % (v/v) SDS (Stamm 10 % w/v, End 0,05 % w/v)	
10x Tris-Glycin (TG)-Puffer	1,92 M Glycin	RT
	250 mM Tris Base	
	Ph = 8,3 , nicht korrigieren	
	Autoklavieren	
0,1 % Triton X-100	0,1 % (v/v) Triton X-100 in 1x PBS	RT
5x TBE	0,445 M Tris Borat	RT
	0,002 M EDTA	
	Ph = 8,3	

3.5.4 Antikörper gegen die Proteine β -Actin, Hif-1 alpha, RAD51, BRCA 2, Fanc D2, BRCA 1, Ku 70 und Lig-IV

Western Blot

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller/Nummer</i>	<i>Inkubationsbedingungen</i>
β -Actin mouse monoclonal ab, clone AC-15	Sigma, A5441	1:10.000 in 5 % MM-PBS 12 μ l/12ml 48 h bei 4°C
Hif-1 alpha mouse monoclonal IgG ₁ clone 54	BD Bioscience: 610958	1:250 in 5 % MM-PBS 50 μ l/12,5ml 48 h bei 4°C

Anti-RAD51 (Ab-1) rabbit pAb	Calbiochem: PC130	1:3000 in 5 % MM-PBS 8µl/12ml 48 h bei 4°C
Anti-BRCA 2 mouse monoclonal IgG clone 5.23	Upstate: 05-566	1:500 in 5 % MM-PBS 25µl/50ml 48 h bei 4°C
FANCD2 (F117) mouse monoclonal Ab	Santa Cruz: sc-20022	1:500 in 5 % MM-PBS 25µl/12,5ml 48 h bei 4°C
Anti-BRCA 1, CT rabbit monoclonal clone M4C7	Upstate: 05-819	1:500 in 5 % MM-PBS 25µl/12,5ml 48 h bei 4°C
Ku 70 (N3H10) mouse monoclonal anti-Ku70	Novus Biologicals: NB100-1915	1:1000 in 5 % MM-PBS 12µl/12ml 48 h bei 4°C
Lig IV Polyclonal antibody to DNA Ligase IV (rabbit)	Acris Antibodies: SP1275	1:000 in 5 % MM-PBS 12µl/12ml 48 h bei 4°C

3.5.5 Größenstandards

Folgende Größenstandards wurden verwendet, um das Molekulargewicht von RAD51 und β -ACTIN in Polyacrylamidgelen zu überprüfen:

MagicMark Western Standard, Invitrogen	Standardbanden werden nach Detektion mit dem Sekundärantikörper auf der Membran sichtbar.
Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad	Standardbanden sind bereits im Gel und direkt nach dem Transfer auf der Membran sichtbar.
See blue Plus 2 Prestained Standard, Invitrogen	Standardbanden sind bereits im Gel und direkt nach dem Transfer auf der Membran sichtbar.

4 ERGEBNISSE

Das Ziel der kurativen Tumorthherapie ist die vollständige Eliminierung jeder einzelnen Tumorzelle. Dabei variieren Tumoren sehr deutlich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung. Eine der Ursachen für die deutlichen Sensitivitätsunterschiede der Tumorzellen nach Bestrahlung ist ihr unterschiedlicher Oxygenierungsgrad. Tumoren mit großen hypoxischen Arealen sind deutlich strahlenresistenter als gut oxygenierte Tumoren. Die Ursache für diese Unterschiede werden zu einem bedeutenden Teil auf die geringere Wirkung der Strahlung unter Hypoxie, durch den Wegfall des indirekten Effektes zurückgeführt, was jedoch nicht das gesamte Ausmaß des Unterschiedes von Oxygenie zu Hypoxie erklärt. Einige neuere Einzelbeobachtungen konnten zeigen, dass die Expression insbesondere von DNA-Reparaturproteinen der Homologen Rekombination unter Hypoxie deutlich verringert ist. Dabei ist unklar, ob es sich bei dieser Reduktion um ein generelles Phänomen handelt oder dies nur in einzelnen Tumorentitäten von Bedeutung ist. In dieser Arbeit soll die Bedeutung der Expression von DNA-Reparaturproteinen der Homologen Rekombination sowie des Nicht-Homologen-Endjoinings unter oxidischen und hypoxischen Bedingungen in Tumorzellen aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches untersucht werden.

4.1 Methodische Vorarbeiten

In den methodischen Vorarbeiten sollten zunächst Bedingungen geschaffen werden, die es erlauben zweifelsfreie Aussagen über die Expression von DNA-Reparaturproteinen unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen zu machen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Extraktionsmethoden, Standardisierungen und Hypoxie-Markerproteine überprüft.

4.1.1 Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden

Ziel dieses Experimentes war es, zu ermitteln welche Methode zur Isolierung von Proteinen zu einer höchstmöglichen Proteinausbeute unter Vermeidung von Degradation führt. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden verglichen. Dabei wurde eine Extraktionsmethode eingesetzt in der die Zellen ausschließlich mechanisch, durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen wurden (Finnie et al. 1995) oder mit einer

Methode die sowohl mechanisch, als auch in Anwesenheit von die Membran degradierenden Detergenzien (Lammering et al. 2004) zu einem Proteinaufschluss führt, verglichen. Beide Methoden resultieren in einer Isolierung des Gesamtzellextraktes. Das vorteilhaftere Verfahren sollte dann als Methode der Wahl in allen zukünftigen Versuchen der Experimente verwendet werden. Zur Überprüfung der beiden Extraktionsmethoden wurden vier verschiedene Zelllinien in Zellkultur gehalten. In zwei separaten Experimenten wurden die Proteine mit der Methode nach Finnie (Finnie et al. 1995) und nach Snapfreeze (Lammering et al. 2004) aus einer jeweils gleichen Zellzahl isoliert. Die Menge an isoliertem Protein wurde mittels Western Blot für das Protein Ku70 detektiert und als Beladungskontrolle wurde β -Actin eingesetzt.

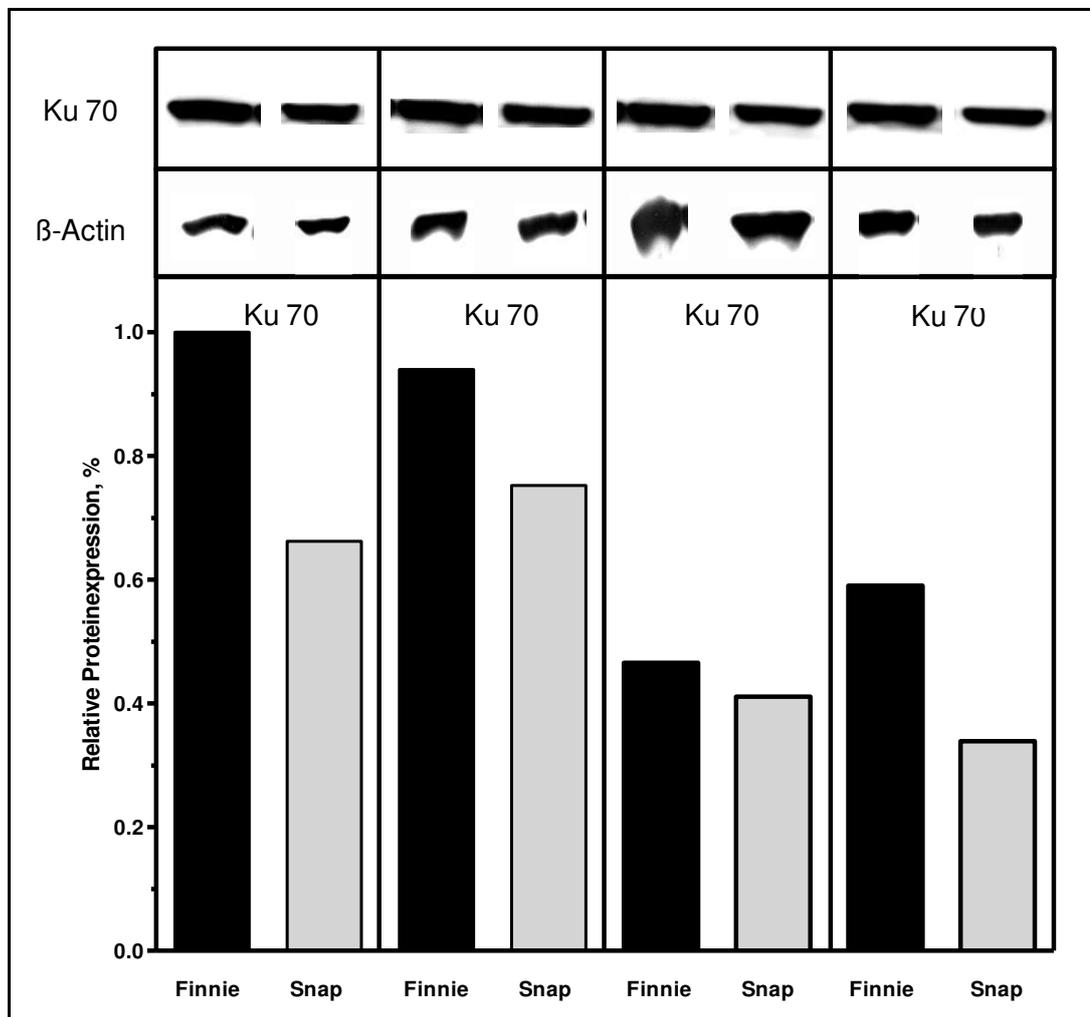


Abb. 4.1: Relative Expression des Ku70 Proteins nach Extraktion mit zwei verschiedenen Methoden im Western Blot. Die Proteine wurden isoliert und mittels Antikörper gegen das Ku70 Protein detektiert. Als Ladungskontrolle diente die Detektion von β -Aktin.

Die Abb. 4.1 zeigt die relative Proteinexpression des Ku 70 Proteins in vier verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit der gewählten Methode zur Proteinisolierung, mit entsprechenden Beispielbanden im oberhalb abgebildeten Western Blot. Für die Zelllinie FANC A- konnte mit einer relativen Proteinmenge von 1 die höchste Proteinkonzentration erreicht werden, in Zelllinie FANC D2+ mit 0,34 die geringste. Vergleicht man die beiden Extraktionsmethoden innerhalb einer Zelllinie so zeigte sich für die Zelllinie FANC A- bei Extraktion nach Finnie mit einer Proteinmenge von 1, eine deutlich höhere Menge im Vergleich zu Snap Freeze, mit 0,66. Die Zelllinie FANC A+ weist ebenfalls eine deutlich höhere relative Proteinexpression von Ku 70 nach Finnie im Vergleich zu Snap Freeze, mit 0,94 zu 0,75 auf. Dieselbe Beobachtung trifft für die Zelllinie FANC D2- mit einer relativen Proteinexpression von 0,47 nach Finnie gegenüber 0,41 nach Snapfreeze zu, allerdings nicht in einem so starken Ausmaß wie in den anderen Zelllinien. Die relative Proteinexpression von Ku 70 liegt in der Zelllinie FANC D2+ nach Finnie bei 0,6 und nach Snapfreeze bei 0,34.

Allen vier Zelllinien ist gemeinsam, dass bei der Proteinisolierung nach Finnie höhere Konzentrationen des DNA-Reparaturproteins Ku 70 gewonnen werden konnten. Ein deutlicher Unterschied mit einer etwa zweifach höheren Proteinkonzentration findet sich in der vierten Zelllinie, während der Unterschied in der dritten Zelllinie dagegen nur etwa 10% betrug. In diesem Versuch konnte sehr deutlich gezeigt werden, dass die Proteinisolierung mit der Methode nach Finnie eine effizientere Möglichkeit zur Gewinnung des DNA-Reparaturproteins Ku 70 darstellt, als dies mit der Methode nach Snapfreeze der Fall ist.

4.1.2 Vergleich der Expressionsunterschiede nach Normierung auf Zellgröße oder Gesamtprotein

Für vergleichende Untersuchungen mehrerer Zelllinien bezüglich ihrer Proteinexpression ist es notwendig Bedingungen zu schaffen, welche zu einer sicheren Voraussage endogener Expressionsunterschiede führt. In den meisten Publikationen wird die zu vergleichende Proteinexpression auf die Menge an eingesetztem Gesamtprotein normiert. Dabei wird nicht berücksichtigt, dass Zellen entsprechend ihrer Größe und ihres Verhältnisses von Kern zu Zytoplasma Unterschiede aufweisen könnten die nicht auf eine unterschiedliche Proteinexpression zurückzuführen sind. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde die Proteinexpression relativ großer Tumorzellen wie z. B. FaDu mit relativ kleinen Tumorzellen wie z. B. UTSCC 8 hinsichtlich der Expression des Ku70 Proteins

verglichen. Für dieses Experiment wurden die Zelllinien FaDu und UTSCC 8 in Zellkultur gehalten und aus beiden Zelllinien einmal Proteinextrakte aus der gleichen Anzahl oder aus einer beliebigen Anzahl an Zellen mit der Methode nach Finnie isoliert. Anschließend wurden einmal jeweils die gleiche Proteinmenge (40µg) oder das gleiche Volumen an Proteinextrakt (6,8µl) eingesetzt und mittels Western Blot für das DNA-Reparaturprotein Ku 70 detektiert. Als Beladungskontrolle wurde β -Actin eingesetzt. Die Abb. 4.2a zeigt die relative Proteinexpression des Ku 70 Reparaturproteins der Zelllinien UTSCC 8 und FaDu bei gleicher Menge und gleichem Volumen an gewonnenem Proteinextrakt. Über dem Diagramm sieht man die jeweiligen dazugehörigen Banden aus dem Western Blot. Bei Auftragung der gleichen Proteinmenge zeigten UTSCC 8 eine geringere relative Proteinexpression von Ku 70 im Vergleich zu FaDu mit 0,52 zu 0,78. Vergleicht man die Auftragung der Extrakte bei Einsatz der gleichen Zellzahl zeigt sich ebenfalls eine geringere Proteinmenge für die UTSCC8 im Vergleich zu FaDu, allerdings mit deutlich geringerem Unterschied von 0,78 zu 1,00. Somit konnte in beiden Ansätzen eine deutlich geringere relative Proteinexpression von Ku 70 in UTSCC8 im Vergleich zu FaDu beobachtet werden, mit einem Unterschied von 50% bei Vergleich der gleichen Proteinmenge und 28% bei Einsatz der gleichen Zellzahl. Es geht aus diesem Experiment sehr deutlich hervor, dass die Berücksichtigung der Zellgröße und somit des Zellvolumens zu Unterschieden in der Menge an extrahiertem Protein führt.

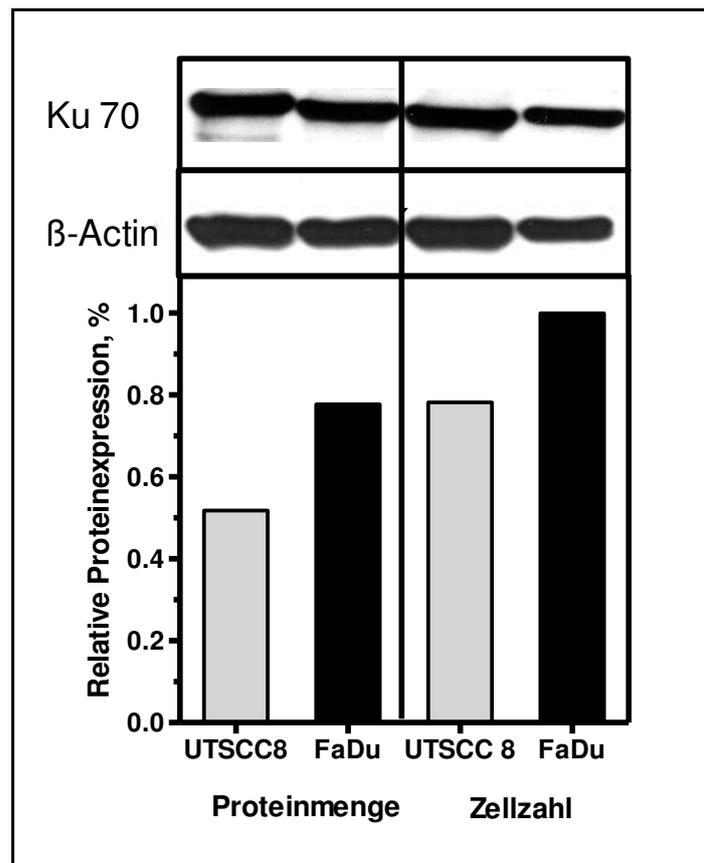


Abb. 4.2a: Vergleich der relativen Expression des Ku70 Proteins bei Einsatz von gleicher Proteinmenge bzw. Zellzahl. Die Proteine wurden isoliert und mittels Antikörper gegen das Ku 70 Protein im Western Blot detektiert. Als Ladungskontrolle diente das β -Actin.

Im Weiteren sollte untersucht werden ob es sich bei dem für das Ku70 Protein beobachteten Phänomen, dass Zellen kleineren Ausmaßes weniger Protein aufweisen als größere um einen generellen Zusammenhang handelt. Zu diesem Zweck wurden die Experimente wie für das Experiment in Abb. 4.2a beschrieben durchgeführt, allerdings erfolgte die Detektion eines anderen Reparaturproteins, des Rad51 Proteins. Es wurden wieder Extrakte nach gleicher Proteinmenge normiert aufgetragen und mit Extrakten die aus der gleichen Zellzahl isoliert wurden mittels Western Blot detektiert und verglichen.

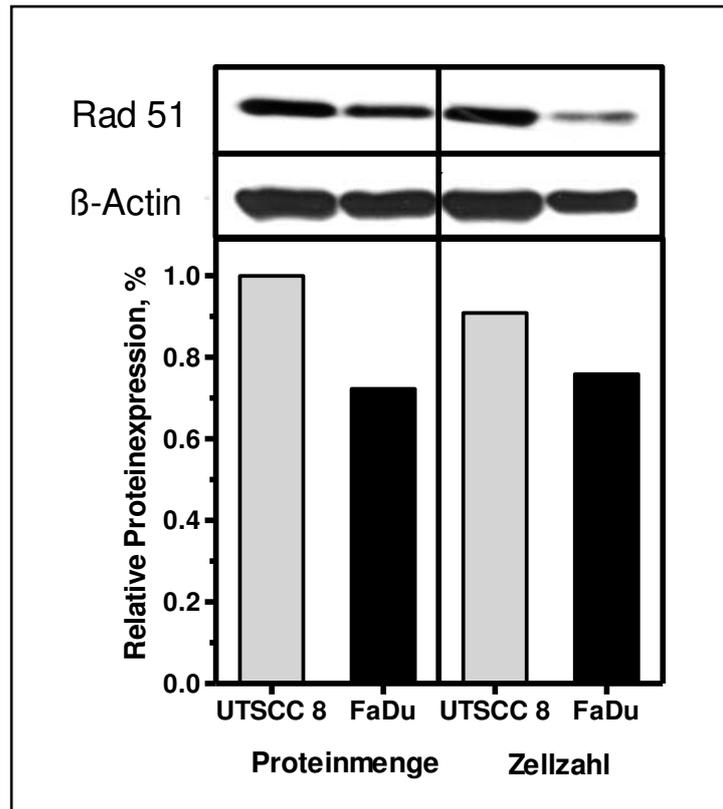


Abb. 4.2b: Vergleich der relativen Expression des Rad51 Proteins bei Einsatz von gleicher Proteinmenge bzw. Zellzahl. Die Proteine wurden isoliert und mittels Antikörper gegen das Rad51 Protein im Western Blot detektiert. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin.

Abb. 4.2b zeigt die relative Proteinexpression des Rad 51 Reparaturproteins der Zelllinien UTSCC 8 und FaDu bei Einsatz der gleichen Menge bzw. der gleichen Zellzahl. Über dem Diagramm sieht man die jeweiligen dazugehörigen Banden aus dem Western Blot. Es zeigte sich für die Zelllinie mit dem kleineren Umfang UTSCC 8 eine deutlich höhere relative Proteinexpression von Rad 51 im Vergleich zur Zelllinie FaDu größeren Umfangs mit 1,00 zu 0,72. Derselbe Zusammenhang zeigte sich auch bei dem Vergleich der Expression unter Verwendung der gleichen Zellzahl für die Extraktion mit 0,91 in UTSCC8 zu 0,76 in FaDu. In beiden Experimenten zeigte die kleinere Zelllinie UTSCC8 eine deutlich höhere relative Proteinexpression von Rad 51 im Vergleich zur größeren Zelllinie FaDu. Allerdings war dieser Unterschied deutlicher bei Einsatz der gleichen Proteinmenge als bei Einsatz derselben Zellzahl, mit 38% im Vergleich zu 20%.

Beide untersuchten Reparaturproteine zeigten, dass der Einsatz von auf die Proteinmenge normierten Extrakten zu deutlicheren Unterschieden in zu vergleichenden Tumorzellen führt als der Einsatz gleicher Zellzahlen. In den

folgenden Experimenten findet die Größe der Tumorzellen somit keine weitere Berücksichtigung sondern es wurden nur Experimente bei Einsatz gleicher Proteinmengen durchgeführt.

4.1.3 Detektion der Hypoxie

Eine Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes in Zellen bewirkt die Modifikation der Proteinexpression. Einer der ersten auf diese Veränderung reagierenden und wichtigsten Transkriptionsfaktoren ist der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF), der die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff reguliert, indem er eine Balance zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffversorgung herstellt. HIF besteht aus einer labilen α -Untereinheit, die in drei Isoformen, HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α existiert und einer β -Untereinheit. Unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) ist die α -Untereinheit an zwei spezifischen Prolyl-Resten hydroxyliert wodurch das HIF1- α -Protein über das von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-Protein abgebaut wird. Unter Hypoxie ist die Hydroxylierung von HIF-1 α gehemmt. Der so stabilisierte Transkriptionsfaktor aktiviert eine Kaskade weiterer Gene, die zur Anpassung der Zelle an eine mangelnde Sauerstoffversorgung erforderlich sind. Somit kann die Messung der Expression des Hif1 α -Proteins zur Überprüfung der Sauerstoffsituation einer Zelle eingesetzt werden.

Im folgenden Experiment wurde die Plattenepithel-Tumorzelllinie HSC 4 den Sauerstoffkonzentrationen 21%, 5%, 1% und 0,1% für 48h in einer Hypoxiekammer ausgesetzt und die Expression des Hif-1 α -Proteins mittels Western Blots bestimmt. Direkt im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden aus den Zellkulturen Proteine mit der Extraktionsmethode nach Finnie isoliert. Die Menge an isoliertem Protein wurde mittels Western Blot für das Protein Hif-1 α detektiert. Als Beladungskontrolle wurde β -Actin eingesetzt. Die Abb. 4.3a zeigt die qualitative und quantitative Proteinexpression von Hif-1 α der Zelllinie HSC 4 in Abhängigkeit zu der Sauerstoffkonzentration, welcher die Zellen für 48h ausgesetzt waren. Über dem Diagramm sind die entsprechenden Banden des Western Blots abgebildet.

Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Hif1 α -Proteinexpression mit Abnahme der Sauerstoffkonzentration für die Tumorzelllinie HSC 4. So zeigte sich bei 21% Sauerstoff eine relative Proteinexpression für Hif-1 α von 0,17, bei 5% Sauerstoff lag sie bei 0,23, bei 1% bei 0,38 und bei 0,1% zeigte sich eine relative Proteinexpression von 1,00. Die maximale Proteinexpression von Hif-1 α zeigte sich bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1% für die Tumorzelllinie HSC 4. Es zeigte sich somit ein sechsfacher Anstieg gegenüber dem Ausgangswert bei der

Sauerstoffkonzentration von 21%. Dieser sehr deutliche Anstieg gewährleistet eine zuverlässige Unterscheidung zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen und kann zur sicheren Detektion der Hypoxie in weiteren Experimenten eingesetzt werden.

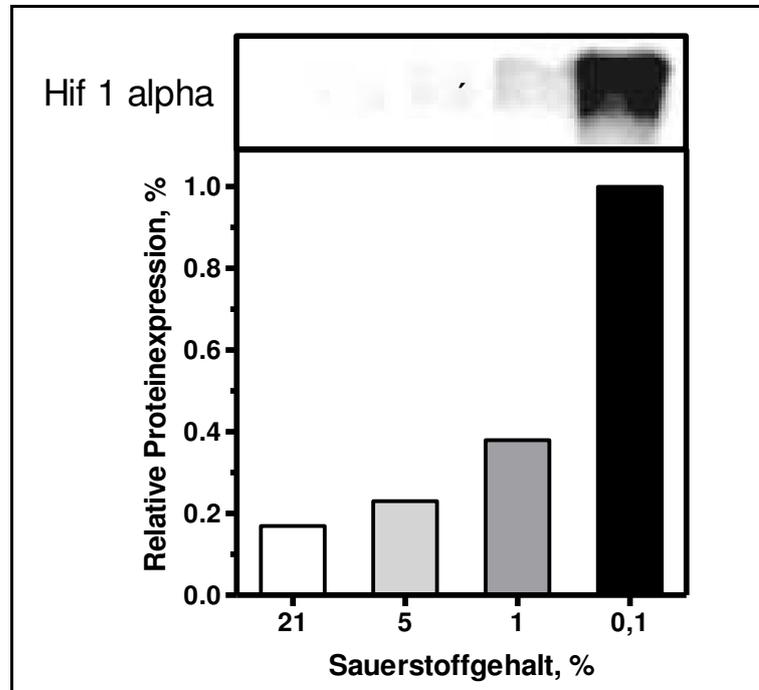


Abb. 4.3a: Relative Expression der Tumorzelllinie HSC 4 für Hif-1 α in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. HSC4 Tumorzellen wurden mit 21 %, 5%, 1% und 0,1 % Sauerstoff bei 37°C für 48h inkubiert, die Proteine wurden isoliert und mittels Antikörper gegen das Protein Hif-1 α detektiert. Zur Normierung wurde die Detektion von β -Actin eingesetzt.

Vergleichende Untersuchungen der Proteinexpression bedienen sich zur Quantifizierung unterschiedlicher Expressionen einer Beladungskontrolle. Diese wird meist durch ein so genanntes „House-keeping“- Gen erreicht, welches stabil während des gesamten Zellzyklus in gleicher Weise exprimiert wird. In der folgenden Untersuchung wurde überprüft ob sich β -Aktin, welches neben Tubulin das am Häufigsten verwendete Protein zur Kontrolle der Beladung ist, auch unter hypoxischen Bedingungen stabil verhält. Zu diesem Zweck wurden Proteine aus Zellkulturen gewonnen, die vorher mit 21%, 5%, 1% und 0,1% deutlich unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt waren. Es wurden vier Ansätze von SAS-Tumorzellen in Zellkultur hergestellt, die in einer Hypoxiekammer für 48h den Sauerstoffkonzentrationen von 21 %, 5 %, 1% und 0,1 % ausgesetzt

wurden. Direkt im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden aus den Zellkulturen mit der Extraktionsmethode nach Finnie Proteine isoliert. Die Menge an isoliertem Protein wurde mittels Western-Blot für das Protein β -Aktin detektiert.

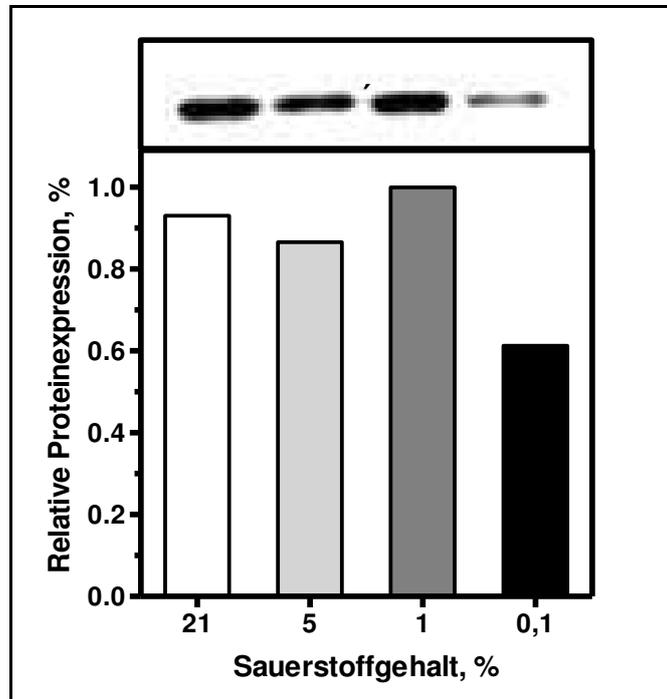


Abb. 4.3b: Relative Expression von β -Aktin in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in SAS Zellen. Die Zellen wurden unter 21 %, 5%, 1% und 0,1 % Sauerstoff für 48h inkubiert, direkt im Anschluss wurden die Proteine extrahiert und mittels Antikörper gegen β -Aktin die Expression detektiert und quantifiziert.

Die Abb. 4.3b stellt die relative Proteinexpression der Zelllinie SAS von β -Aktin in Abhängigkeit zu der Sauerstoffkonzentration, der die Zellen für 48h ausgesetzt waren, qualitativ und quantitativ dar. Oberhalb der quantitativen Auswertung im Diagramm ist die entsprechende Bande der im Western Blot detektierten Proteine abgebildet. Unter normoxischen Sauerstoff (21 %) zeigte sich eine relative Proteinexpression des β -Aktins von 0,93. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 5 % zeigte sich ein Wert von 0,87 vor und bei 1% zeigte sich mit 1,0 die höchste Konzentration an β -Aktin. Die niedrigste Expression von β -Aktin zeigte sich bei einer Sauerstoffkonzentration von 0.1%, mit 0,61. Es zeigte sich somit keine kontinuierliche Abnahme der β -Aktin Konzentration in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration und die geringfügige Schwankung von β -Aktin ist ein häufig beobachtetes Phänomen so dass im Folgenden β -Aktin als Ladungskontrolle eingesetzt wurde.

4.2 Expression von DNA-Reparaturproteinen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

In bereits veröffentlichten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es unter hypoxischen Bedingungen zu einer reduzierten Expression von DNA-Reparaturproteinen der Homologen Rekombination in Zelllinien aus Prostata-, Mamma- und Lungenkarzinomen kommen kann (Bindra et al. 2004). Im Folgenden sollte untersucht werden ob diese beobachteten Unterschiede auch bei Zelllinien aus Kopf- und Halstumoren zu beobachten sind.

4.2.1 Expression der Ligase IV in der Zelllinie SAS in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

Im Folgenden wurde die Expression von Ligase IV, einem dem NHEJ zugeordneten DNA-Reparaturproteins, in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in der Zelllinie SAS untersucht. Zu diesem Zweck wurden Proteinextrakte der Zelllinie SAS unter abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% Sauerstoff hergestellt. Je eine der vier Zellkulturflaschen mit exponentiell wachsenden SAS-Tumorzellen wurde in einer Hypoxiekammer für 48h den Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1 % ausgesetzt. Direkt im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden Proteinextrakte mit der Methode nach Finnie hergestellt. Mittels spezifischen Antikörpers gegen Ligase IV wurde die Menge an isoliertem Protein mittels Western-Blot in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration detektiert. Als Marker der Hypoxie wurde das Protein Hif-1 α eingesetzt und als Beladungskontrolle fungierte β -Aktin.

Unter normoxischer Sauerstoffkonzentration mit 21 % zeigen die SAS-Zellen eine relative Proteinexpression für Ligase IV von 0,21. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 5 % zeigte sich ein Anstieg der relativen Proteinexpression mit 0,34, die sich bei einer Konzentration von 1% nicht deutlich veränderte, mit 0,29. Das stärkste Signal zeigte sich bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1% mit 1,00. Dies entspricht einem fünffachen Anstieg gegenüber normoxischen Bedingungen.

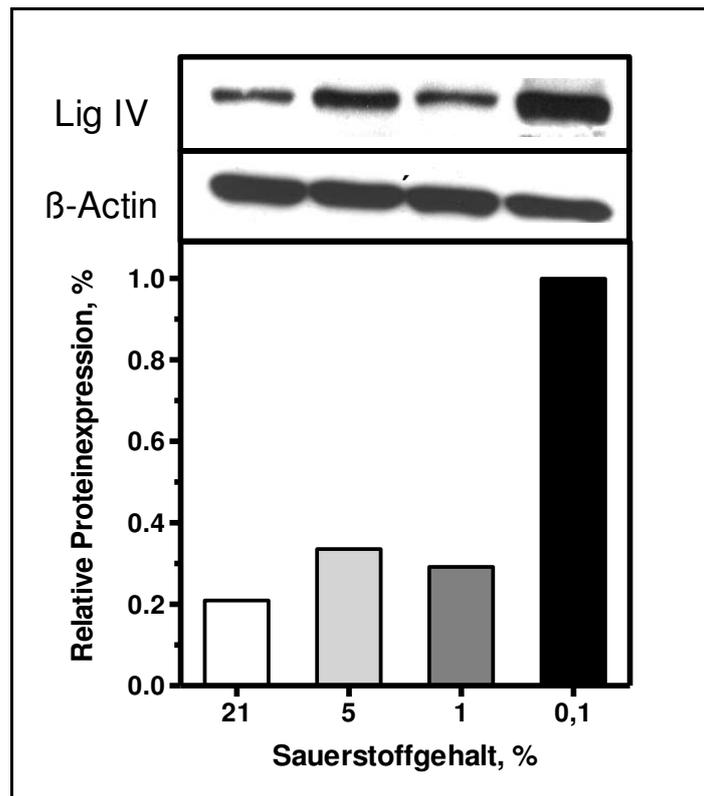


Abb. 4.4a: Qualitative und quantitative Expression der Ligase IV in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in SAS Zellen. Die Zellen wurden mit 21 %, 5%, 1% und 0,1 % Sauerstoff inkubiert, direkt im Anschluss die Proteine isoliert und mittels Antikörper gegen Ligase IV detektiert. Die Hypoxie wurde mittels Hif1 α überprüft und als Ladungskontrolle diente β -Actin.

4.2.2 Expression von RAD51 in der Zelllinie FaDu in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

In dem vorhergehendem Experiment zeigte sich für die Tumorzelllinie SAS unter abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% ein deutlicher Anstieg der relativen Proteinexpression für Ligase IV. Um zu prüfen, ob auch andere Tumorzelllinien eine veränderte Proteinexpression in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration zeigen, wurde das DNA-Reparaturprotein RAD51, welches als das Schlüsselprotein der homologen Rekombination angesehen wird, in der Tumorzelllinie FaDu untersucht.

Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene Zellkulturflaschen mit exponentiell wachsenden FaDu-Zellen den Sauerstoffkonzentrationen 21 %, 5 %, 1% und 0,1% für 48h ausgesetzt und direkt im Anschluss wurden Proteinextrakte mit der Methode nach Finnie isoliert. Die Menge des RAD51-Proteins wurde mittels spezifischen Antikörpers im Western-Blot detektiert. Als Indikator der Hypoxie wurde Hif-1 α und als Beladungskontrolle β -Aktin eingesetzt. Die Abb. 4.4b: zeigt die qualitative und quantitative Proteinexpression von Rad 51 in Abhängigkeit zu der Sauerstoffkonzentration in der Zelllinie FaDu. Oberhalb der quantitativen Auswertung sind die entsprechenden Banden des Western Blots abgebildet.

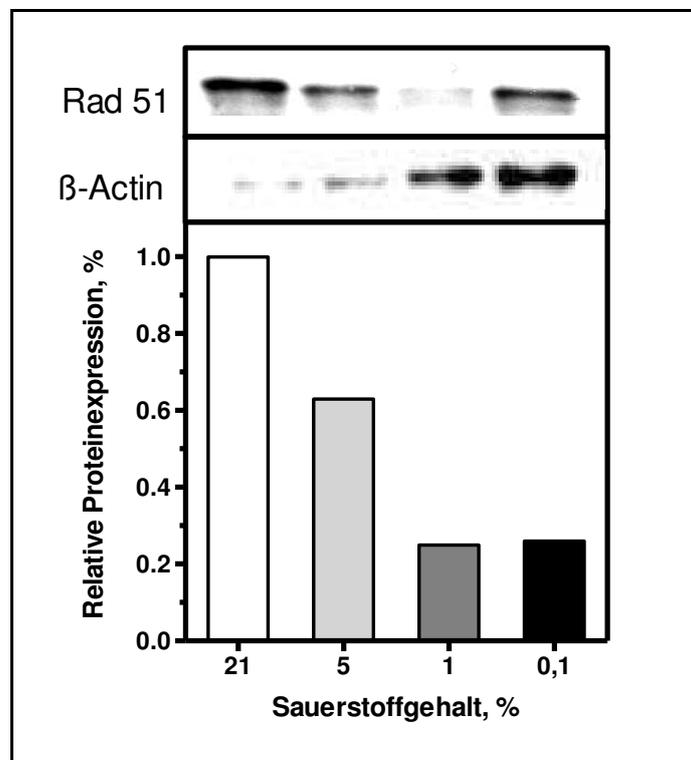


Abb. 4.4b: Relative Expression von Rad 51 in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in der Zelllinie FaDu. Exponentiell wachsende Zellen wurden für 48h mit 21 %, 5%, 1% und 0,1 % Sauerstoff inkubiert, die Proteine isoliert und mittels Antikörper gegen das Rad 51 Protein detektiert. Als Marker der Sauerstoffkonzentration wurde Hif-1 α eingesetzt und als Ladungskontrolle diente β -Aktin.

Unter einer normoxischen Sauerstoffkonzentration von 21 % zeigen die FaDu-Zellen eine relative Rad51-Expression von 1,00. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 5% zeigte sich eine deutliche Reduktion der RAD51-Expression, mit 0,63, die bei einer Sauerstoffkonzentration noch deutlicher reduziert war, mit 0,25. Es zeigte sich keine weitere Abnahme der RAD51 Expression bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 % mit 0,26. Somit zeigte sich für diese Tumorzelllinie aus einem Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches eine vierfache Reduktion der RAD51 Expression bei abnehmender Sauerstoffkonzentration. Die in Abb. 4.4a und 4.4b dargestellten Daten zeigen sehr deutlich, dass eine veränderte Sauerstoffkonzentration zu einer veränderten Expression von DNA-Reparaturproteinen führen kann. Im Folgenden sollen sechs verschiedene DNA-Reparaturproteine in insgesamt 10 verschiedenen Tumorzelllinien untersucht werden.

4.2.3 Expression des Hypoxie-Markers Hif1 α in 10 Tumorzelllinien aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches

Der Hypoxie-induzierte-Faktor 1 (HIF-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der regulativ in Abhängigkeit von der Sauerstoffversorgung der Zelle wirkt. HIF-1 ist ein Heterodimer, der aus einer 120 kDa großen α -Untereinheit (HIF-1 α) und einer 91-94 kDa großen β -Untereinheit (HIF-1 β) besteht (Wang et al. 1995). Die HIF-1 α -Untereinheit ist sauerstoffsensitiv und ihr zellulärer Gehalt ist ausschließlich posttranslational kontrolliert. Am C- und N-Terminus des Proteins befindet sich je eine Transaktivierungsdomäne (TAD-C bzw. TAD-N). Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 α rasch abgebaut, was vorwiegend durch das Ubiquitin-Proteasom-System vermittelt wird (Salceda und Caro 1997). Die Bindung des Von-Hippel-Lindau-Proteins (pVHL) an hydroxylierte Prolinreste in der Oxygen-dependent degradation domain (ODDD) markiert das HIF-1 α -Protein für den proteasomalen Abbau (Jaakkola et al. 2001). Als für die Hydroxylierung der Prolinreste entscheidende Enzyme wurden drei verschiedene Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD1, PHD2, PHD3) identifiziert, deren Aktivität auf Sauerstoff angewiesen ist (Epstein et al. 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α ein Mitglied der Familie von Transkriptionsfaktoren ist, zu der auch ARNT gehört. Sobald das HIF-1 α -Protein unter Hypoxie stabilisiert ist, wird es in den Zellkern transloziert. Dort dimerisiert es mit HIF-1 β und bindet als HIF-1-Komplex an die DNA der Gene, die in ihrem Promotor oder Enhancer Hypoxia-response elements besitzen (Camenisch et al. 2001).

Wird eine Zelle einer physiologisch wirksamen Hypoxie ausgesetzt, führt dies zu einer Induktion von Hif-1 α auf Proteinebene. In den folgenden Experimenten

werden Tumorzellen für 48h in einer Hypoxiekammer unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% ausgesetzt. Um belegen zu können, dass die unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen auch physiologisch in den Tumorzellen vorhanden sind, soll Hif-1 α als Nachweis dienen. Es wird erwartet, dass mit der abnehmenden Sauerstoffkonzentration die relative Proteinexpression für Hif-1 α deutlich zunimmt. Ziel des Experimentes ist es somit Hif-1 α als Indikator eines hypoxischen Zustandes für alle zehn Tumorzelllinien, die für die Experimente vorgesehen sind, zu etablieren. Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene Zellkulturflaschen der zehn exponentiell wachsenden Tumorzelllinien den Sauerstoffkonzentrationen 21 %, 5 %, 1% und 0,1% für 48h ausgesetzt und direkt im Anschluss Proteinextrakte mit der Methode nach Finnie hergestellt. Die Auswirkung der Hypoxie wurde mittels Hif-1 α überprüft und als Beladungskontrolle wurde β -Aktin eingesetzt. Die Abb. 4.6a zeigt die relative Proteinexpression der Tumorzelllinien Cal 33, SAS, FaDu, HSC 4 und UTSCC 8 von Hif-1 α in Abhängigkeit zu der Sauerstoffkonzentration, der die Zellen 48h ausgesetzt waren. Oberhalb der quantitativen Auswertung sind die entsprechenden Banden des Western Blots abgebildet. Die Abb. 4.6b zeigt die entsprechenden Resultate für die Zelllinien UTSCC 14, XF 354, UTSCC 15, UTSCC 5 und UTSCC 45.

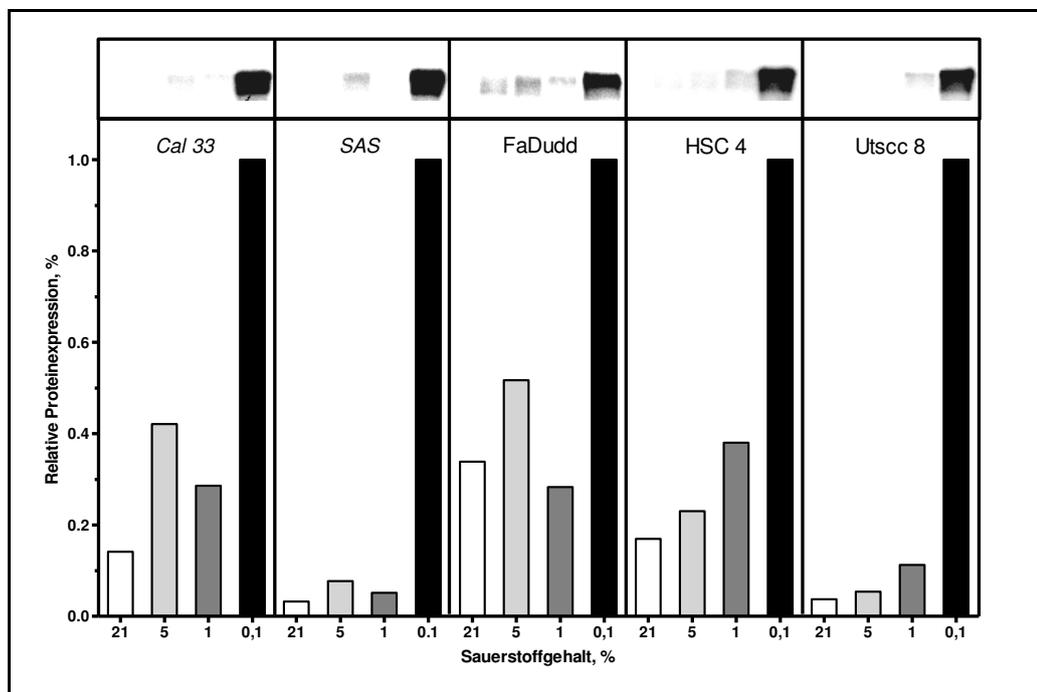


Abb. 4.6a: Relative Expression für Hif-1 α in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. Die Tumorzelllinien Cal 33, SAS, FaDu, HSC 4 und UTSCC 8 wurden mit 21 %, 5%, 1% und 0,1 % Sauerstoff für 48h inkubiert, die Proteine isoliert und mittels Antikörper gegen das Protein Hif-1 α detektiert. Oberhalb des Diagramms ist die entsprechende Bande des Western Blots abgebildet.

Abb. 4.6a: Die Tumorzelllinie Cal 33 zeigt bei 21% Sauerstoff eine relative Proteinexpression für Hif-1 α von 0,14. Bei 5% liegt sie bei 0,42 und bei 1% bei 0,29. Unter hypoxischen 0,1% finden wir die höchste relative Proteinexpression für Hif-1 α mit 1,00 vor. In der Tumorzelllinie SAS liegt die relative Proteinexpression für Hif-1 α bei 21% Sauerstoff bei 0,03. Unter 5% Sauerstoff liegt die relative Proteinexpression für Hif-1 α bei 0,08 und bei 1% Sauerstoff bei 0,05. Die höchste relative Proteinexpression für Hif-1 α von 1,00 zeigt sich ebenfalls bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1%. Für die Tumorzelllinie FaDu zeigt sich bei 21% Sauerstoff eine relative Proteinexpression für Hif-1 α von 0,34 und bei 5 % Sauerstoff von 0,52. Die relative Proteinexpression für Hif-1 α liegt bei 1% Sauerstoff bei 0,28 und bei hypoxischen 0,1% Sauerstoff bei 1,00. In der Tumorzelllinie HSC 4 liegt die relative Proteinexpression für Hif-1 α bei 21% Sauerstoff bei 0,17, bei 5% Sauerstoff bei 0,23, bei 1% Sauerstoff bei 0,38 und bei hypoxischen 0,1% Sauerstoff bei 1,00. Die Tumorzelllinie UTSCC 8 zeigt bei 21% Sauerstoff eine relative Proteinexpression für Hif-1 α von 0,04 und für 5% Sauerstoff von 0,05. Bei 1% Sauerstoff liegt die relative Proteinexpression für Hif-1 α bei 0,11 und bei einer hypoxischen Sauerstoffkonzentration von 0,1% beträgt sie 1,00.

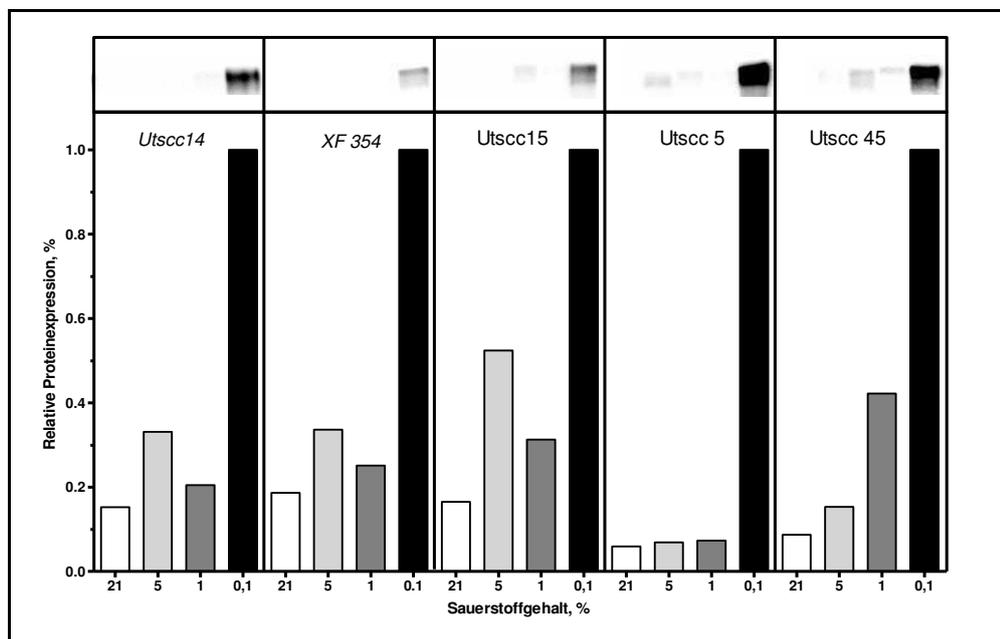


Abb. 4.6b: Relative Expression für Hif-1 α in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. Die Tumorzelllinien UTSCC 14, XF 354, UTSCC 15, UTSCC 5 und UTSCC 45 wurden mit 21 %, 5%, 1% und 0,1 % Sauerstoff für 48h inkubiert, die Proteine isoliert und mittels Antikörper gegen das Protein Hif-1 α detektiert. Oberhalb des Diagramms ist die entsprechende Bande des Western Blots abgebildet.

Abb. 4.6b: Die Tumorzelllinie UTSCC 14 zeigt bei 21% Sauerstoff eine relative Proteinexpression für Hif-1 α von 0,15. Bei 5% Sauerstoff liegt sie bei 0,33 und bei 1% Sauerstoff bei 0,20. Unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff finden wir eine relative Proteinexpression für Hif-1 α von 1,00 vor. In der Tumorzelllinie XF 354 liegt die relative Proteinexpression für Hif-1 α bei 21% Sauerstoff bei 0,18. Unter 5% Sauerstoff liegt die relative Proteinexpression für Hif-1 α bei 0,33 und bei 1% Sauerstoff bei 0,25. Eine relative Proteinexpression für Hif-1 α von 1,00 zeigt sich bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1%. Für die Tumorzelllinie UTSCC 15 zeigt sich bei 21% Sauerstoff eine relative Proteinexpression für Hif-1 α von 0,17 und bei 5 % Sauerstoff von 0,52. Die relative Proteinexpression für Hif-1 α liegt bei 1% bei 0,31 und bei hypoxischen 0,1% Sauerstoff bei 1,00. In der Tumorzelllinie UTSCC 5 liegt die relative Proteinexpression für Hif-1 α bei 21% Sauerstoff bei 0,06, bei 5% Sauerstoff bei 0,07, bei 1% Sauerstoff bei 0,07 und bei hypoxischen 0,1% Sauerstoff bei 1,00. Die Tumorzelllinie UTSCC 45 zeigt bei 21% Sauerstoff ein relative Proteinexpression für Hif-1 α von 0,09 und für 5% Sauerstoff von 0,15. Bei 1% Sauerstoff liegt die relative Proteinexpression für Hif-1 α bei 0,42 und bei einer hypoxischen Sauerstoffkonzentration von 0,1% beträgt sie 1,00.

Alle zehn Tumorzelllinien zeigen bei hypoxischen 0,1% Sauerstoff eine maximale relative Proteinexpression von 1,00. Diese beinhaltet einen Anstieg gegenüber der Ausgangsbasis von einer Sauerstoffkonzentration von 21%, der jeweils deutlich aber höchst unterschiedlich zwischen dem 3-fachem und dem 30-fachen des Ausgangswertes liegt. Tumorzelllinien wie UTSCC 8 und SAS zeigen unter 21%, 5% und 1% nur sehr geringe relative Proteinexpressionen für Hif-1 α , während andere Tumorzelllinien wie FaDu auch unter nicht hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen von 21% und 5% eine relative Proteinexpression für Hif-1 α aufweisen die sogar bei 0,33 und 0,52 liegen (Abb. 4.6a). In der Abb. 4.6b zeigte sich ein vergleichbarer Verlauf mit einem deutlichen Anstieg gegenüber der Ausgangsbasis von 21% Sauerstoff, der jeweils deutlich aber höchst unterschiedlich zwischen dem fünffachen und dem 15-fachen des Ausgangswertes liegt. Tumorzelllinien wie UTSCC 14, XF 354 und UTSCC 15 zeigen unter 21% und 5% bereits relative Proteinexpressionen für Hif-1 α , die zwischen 0,15 und 0,52 liegen. Die beiden Tumorzelllinien UTSCC 5 und UTSCC 45 weisen unter 21% und 5% Sauerstoff dagegen eine nur geringe relative Proteinexpression für Hif-1 α , die 0,15 nicht überschreitet.

Da wir mit Hif-1 α hypoxische Tumorzellen deutlich und mit großer Sicherheit von normoxischen Tumorzellen abgrenzen können, kann man zusammenfassend sagen, dass Hif-1 α für alle zehn Tumorzelllinien ein deutlicher und zuverlässiger

Indikator einer physiologisch bedeutsamen Hypoxie in den Tumorzellen ist. Damit ist Hif-1 α als „Hypoxienachweis“ etabliert.

4.2.4 Detektion acht verschiedener Proteine auf einer Membran zur standardisierten Vergleichbarkeit in verschiedenen Tumorzelllinien

Normalerweise ist die Anzahl der Detektionen von Proteinen mittels Western Blot je Membran auf maximal drei bis vier Antikörper limitiert, da bei jedem Detektions- bzw. Waschschrift unspezifisch Proteine von der Membran gelöst werden. Um kleinste Unterschiede in der Proteinexpression möglichst zweifelsfrei bestimmen zu können empfiehlt es sich jedoch, möglichst eine einzige Membran zu verwenden. Zu diesem Zweck wurden Proteinextrakte exponentiell wachsender Tumorzelllinien gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Trägermembran transferiert. Diese Membranen wurden im Anschluss horizontal geschnitten um bis zu 12 Proteine gleichzeitig detektieren zu können. So konnten kleine Proteine, wie RAD51 mit 38 kDa und β -Aktin mit 45 kDa auf dem unteren Teil, Ku70 mit 70 kDa, Ligase IV mit 98 kDa und Hif-1 α mit 120kDa, und auf dem mittleren Abschnitt und FANCD2 mit 150 kDa, BRCA1 mit 210 kDa und BRCA2 mit 390 kDa auf dem oberen Teil der Membran gleichzeitig detektiert werden. Die Abb. 3.1 zeigt die Detektion von acht verschiedenen Proteinen einer Membran mittels Western Blot in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration.

4.2.5 Expression der DNA-Reparaturproteine BRCA1, BRCA2, FANCD2, Ligase 4, Ku70 und RAD51 in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in 10 Tumorzelllinien

Die Strahlentherapie hat sich in den letzten Jahren für bestimmte Tumoridentitäten, zu eine der tragenden Säulen einer modernen onkologischen Therapie entwickelt. In Kombination mit anderen onkologischen Therapieformen, wie z. B. der chirurgisch onkologischen Intervention, haben wir in der Strahlentherapie oft eine kurative Zielsetzung. Eine erfolgreiche kurative onkologische Therapie beinhaltet eine vollständige Elimination der Tumorzellen im menschlichen Körper. Tumorareale mit einer deutlich verminderten Sauerstoffversorgung erweisen sich hierbei als besonders schwierig zu therapieren. Das Phänomen der Hypoxie in Tumorzellen und die damit verbundene Therapieresistenz der Tumorzellen stellen ein gewichtiges Problem in der modernen onkologischen Strahlentherapie dar. In der

intensiven Forschung nach der Ursache dieser Therapieresistenz der hypoxischen Tumorzellen, entdeckte man, dass die diese Tumorzellen in der Regulation ihrer DNA-Reparaturproteine verändert sind. Da die Strahlentherapie mit der gezielten Setzung von DNA-Doppelstrangbrüchen erst ihre Wirksamkeit entfaltet, kann ein verändertes Reparaturverhalten hypoxischer Tumorzellen für DNA-Doppelstrangbrüche die Therapieresistenz solcher Tumorzellen gegenüber der Strahlentherapie erklären. Ziel des folgenden Experimentes war es, die relative Proteinexpression von 6 verschiedenen DNA-Reparaturproteinen der homologen und nicht homologen Rekombination in 10 verschiedenen Tumorzelllinien, die abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% ausgesetzt waren, zu untersuchen.

Es wurden Tumorzellen der Zelllinien Cal 33, SAS, FaDuDD, XF 354, HSC 4, UTSCC 5, UTSCC 8, UTSCC 14, UTSCC 15 und UTSCC 45 in Zellkultur gehalten. Um 4 verschiedene Sauerstoffkonzentrationen untersuchen zu können, wurden aus jeder Zellkultur der 10 Tumorzelllinien jeweils 4 getrennte Zellkulturen gewonnen. Diese 4 Zellkulturen wurden in einer Hypoxiekammer für 48h unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% ausgesetzt. Direkt im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden aus den Zellkulturen mit der Methode nach Finnie Proteine isoliert. Die Menge an isoliertem Protein wurde mittels Western-Blot für die 6 DNA-Reparaturproteine BRCA2, BRCA1, Fanc D2, Lig IV, Ku 70 und Rad 51 detektiert. Als Beladungskontrolle wurde β -Actin eingesetzt und als Hypoxieindikator Hif 1 α nachgewiesen.

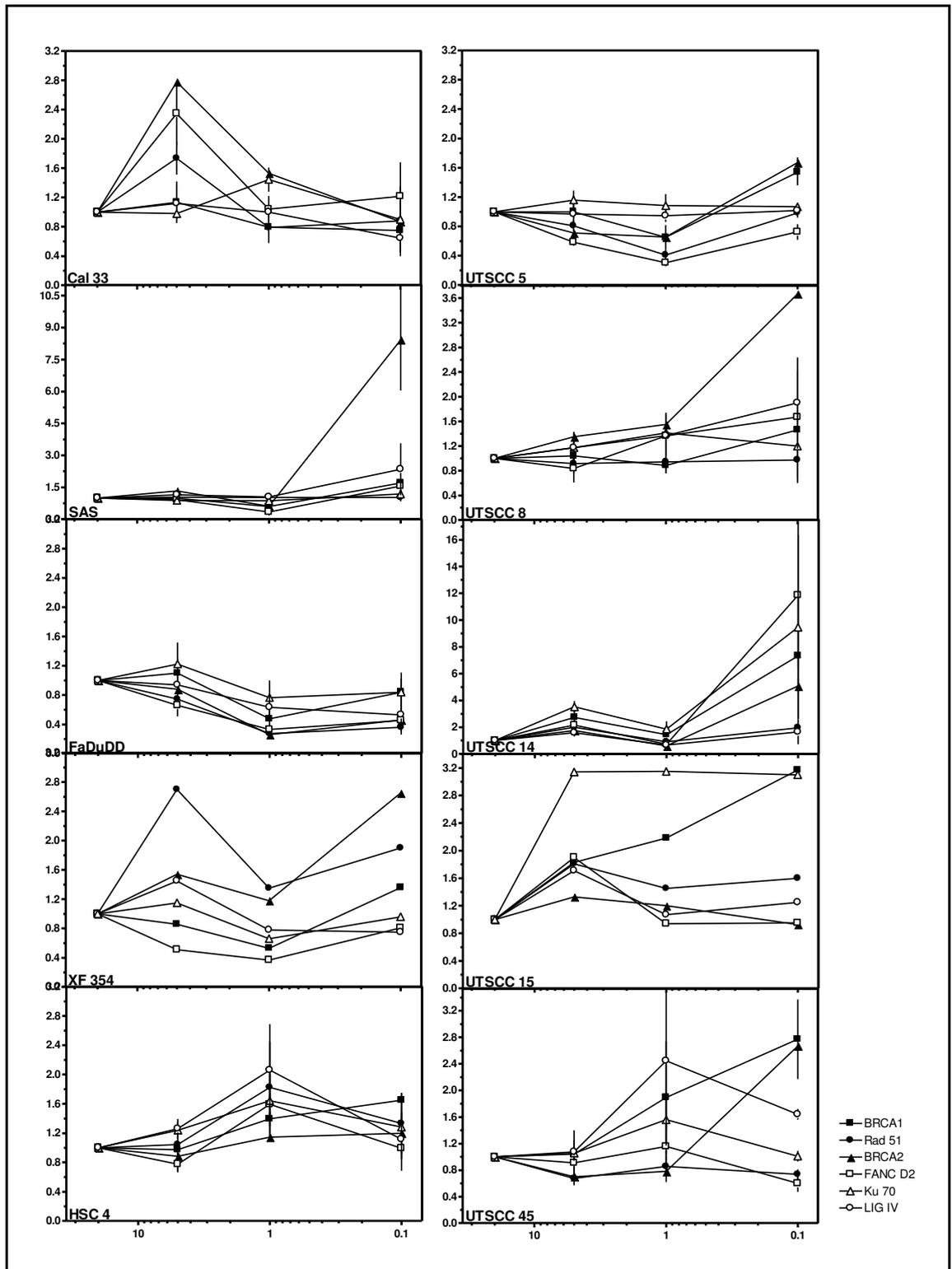


Abb. 4.7: Relative Expression der Tumorzelllinien Cal 33, SAS, FaDuDD, XF354, HSC 4, UTSCC 5, UTSCC 8, UTSCC 14, UTSCC 15 und UTSCC 45 für die 6 DNA-Reparaturproteine BRCA2, BRCA1, Fanc D2, Lig IV, Ku 70 und Rad 51 nach Inkubation mit 21%, 5%, 1% und 0,1 % Sauerstoff. Die Proteine wurden isoliert und mittels Antikörper gegen die 6 DNA-Reparaturproteine detektiert.

Die Abb. 4.7 zeigt die relative Proteinexpression der Tumorzelllinien Cal 33, SAS, FaDuDD, XF 354, HSC 4, UTSCC 5, UTSCC 8, UTSCC 14, UTSCC 15 und UTSCC 45 für die 6 DNA-Reparaturproteine BRCA2, BRCA1, Fanc D2, Lig IV, Ku 70 und Rad 51 in Abhängigkeit zu der Sauerstoffkonzentration, der die Zellen 48h ausgesetzt waren.

Ku 70

Die relative Proteinexpression des DNA-Reparaturproteins Ku 70 zeigt unter abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% für einen Großteil der 10 Tumorzelllinien nur leichte Veränderungen.

Die relative Proteinexpression von Ku 70 weist unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu der normoxischen Ausgangssituation von 21% Sauerstoff für die Tumorzelllinien FaDuDD, Cal 33 und XF 354 einen leichten Rückgang auf bis zu 0,84 auf. Die Tumorzelllinien HSC 4, UTSCC 8, SAS, UTSCC 5 und UTSCC 45 zeigen für die relative Proteinexpression von Ku 70 dagegen einen leichten Anstieg, der maximal für HSC 4 bei 1,28 liegt. Die beiden Tumorzelllinien UTSCC 15 und UTSCC 14 zeigen unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu den normoxischen 21% Sauerstoff einen rasanten Anstieg der relativen Proteinexpression für Ku 70 von 3,10 bzw. 9,47.

Zusammenfassend kann man sagen, dass 8 der 10 untersuchten Tumorzelllinien unter hypoxischen Bedingungen nur leichte Veränderungen der relativen Proteinexpression von Ku 70 aufweisen. Die Rückgänge gehen auf bis zu 0,84 zurück, während die Zunahme bei maximal 1,28 liegt. Die beiden Tumorzelllinien UTSCC 15 und UTSCC14 stechen dagegen in der Entwicklung der relativen Proteinexpression von Ku 70 unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff heraus, indem sie einen enormen Anstieg der relativen Proteinexpression für Ku 70 von 3,10 bzw. 9,47 aufweisen.

LIG IV

Die relative Proteinexpression des DNA-Reparaturproteins Lig IV zeigt unter abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% für den überwiegenden Teil der untersuchten 10 Tumorzelllinien deutliche Unterschiede auf. Die relative Proteinexpression von Lig IV weist unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu der normoxischen Ausgangssituation von 21% Sauerstoff für die Tumorzelllinien FaDuDD, Cal 33 und XF 354 einen zum Teil deutlichen Rückgang

auf bis zu 0,53 für FaDuDD auf. Einen gleich bleibenden bzw. leicht ansteigenden Verlauf der relativen Proteinexpression für Lig IV findet sich für die Tumorzelllinien UTSCC 15, HSC 4 und UTSCC 5 mit maximal 1,25 für UTSCC 15. Die 4 Tumorzelllinien SAS, UTSCC 8, UTSCC 14 und UTSCC 45 zeigen unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu normoxischen 21% Sauerstoff einen starken Anstieg der relativen Proteinexpression für Lig IV, der zwischen 1,64 und 2,35 liegt.

Insgesamt betrachtet sehen wir, dass es in der Entwicklung der relativen Proteinexpression für Lig IV unter hypoxischen Bedingungen sowohl ansteigende, gleichbleibende als auch abfallende Verläufe gibt. Auffällig ist hierbei, dass die 3 Tumorzelllinien FaDuDD, Cal 33 und XF 354 unter hypoxischen Bedingungen für beide DNA-Reparaturproteine KU 70 und Lig IV der nicht homologen Rekombination einen Rückgang der relativen Proteinexpression verzeichnen. Mit den beiden Tumorzelllinien UTSCC 14 und UTSCC15 haben wir als Gegenstück dazu zwei Tumorzelllinien die für beide DNA-Reparaturproteine Ku 70 und Lig IV der nicht homologen Rekombination einen Anstieg relativen Proteinexpression aufweisen.

RAD 51

Die relative Proteinexpression des DNA-Reparaturproteins Rad 51 zeigt unter abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% für sieben der untersuchten 10 Tumorzelllinien deutliche Veränderungen.

Die relative Proteinexpression von Rad 51 weist unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu der normoxischen Ausgangssituation von 21% Sauerstoff für die Tumorzelllinien FaDuDD, UTSCC 45 und Cal 33 einen zum Teil enormen Rückgang auf bis zu 0,36 für FaDuDD auf. Eine nahezu unveränderte relative Proteinexpression für Rad 51 findet sich für die Tumorzelllinien SAS, UTSCC 5 und UTSCC 8. Die minimalen Unterschiede liegen hier zwischen 0,98 und 1,02. Die 4 Tumorzelllinien UTSCC 14, XF354, UTSCC 15 und HSC 4 zeigen unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu normoxischen 21% Sauerstoff einen starken Anstieg der relativen Proteinexpression für Rad 51, der zwischen 1,33 und 1,96 liegt.

Insgesamt betrachtet sehen wir, dass es in der Entwicklung der relativen Proteinexpression für Rad 51 unter hypoxischen Bedingungen sowohl ansteigende, gleichbleibende als auch abfallende Verläufe gibt. Der enorme Rückgang der relativen Proteinexpression für Rad 51 unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff von FaDuDD auf rund ein Drittel des Ausgangswertes bei 21% Sauerstoff tritt hier besonders hervor.

BRCA 2

Die relative Proteinexpression des DNA-Reparaturproteins BRCA 2 zeigt unter abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% für den Großteil der untersuchten 10 Tumorzelllinien sehr deutliche Unterschiede.

Die relative Proteinexpression von BRCA 2 weist unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu der normoxischen Ausgangssituation von 21% Sauerstoff für die Tumorzelllinien FaDuDD, Cal 33 und UTSCC 15 einen zum Teil starken Rückgang auf bis zu 0,46 für FaDuDD auf. Die restlichen sieben Tumorzelllinien SAS, UTSCC 14, UTSCC 8, UTSCC 45, XF 354, UTSCC 5 und HSC 4 zeigen unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu den normoxischen 21% Sauerstoff einen zum Teil rasanten Anstieg der relativen Proteinexpression für BRCA 2 der zwischen 1,20 und 8,43 liegt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sämtliche Tumorzelllinien unter hypoxischen Konditionen im Vergleich zu der normoxischen Ausgangsposition sehr starke Veränderungen aufweisen. Es gibt für keine Tumorzelllinie einen gleichbleibenden Verlauf. Während FaDuDD mit 0,46 einen besonders starken Rückgang in der relativen Proteinexpression für BRCA 2 aufweist, zeigen die beiden Tumorzelllinien UTSCC 14 und SAS mit 5,08 und 8,43 einen enormen Anstieg in der relativen Proteinexpression für BRCA 2.

FANC D2

Die relative Proteinexpression des DNA-Reparaturproteins FANC D2 zeigt unter abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% für einen Großteil der 10 Tumorzelllinien sichtbare Veränderungen.

Die relative Proteinexpression von FANC D2 weist unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu der normoxischen Ausgangssituation von 21% Sauerstoff für die Tumorzelllinien FaDuDD, UTSCC 45, UTSCC 5 und XF 354 einen zum Teil starken Rückgang auf, der maximal für FaDuDD bei 0,46 liegt. Die Tumorzelllinien HSC 4 und UTSCC 15 zeigen hierbei eine gleichbleibende Entwicklung, bei der es zu einem maximalen Rückgang auf 0,95 kommt. Die Tumorzelllinien UTSCC 14, UTSCC 8, SAS und Cal 33 zeigen unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu den normoxischen 21% Sauerstoff einen deutlichen Anstieg der relativen Proteinexpression für FANC D2 der zwischen 1,22 und 11,86 liegt.

Insgesamt betrachtet sehen wir, dass es in der Entwicklung der relativen Proteinexpression für FANC D2 unter hypoxischen Bedingungen sowohl ansteigende, gleichbleibende als auch abfallende Verläufe gibt. Wiederholt zeigt die

Tumorzelllinie FaDuDD mit 0,46 den stärksten Rückgang in der relativen Proteinexpression für FANC D2. Die Tumorzelllinien UTSCC 14 weist mit 11,86 einen enormen Anstieg der relativen Proteinexpression für FANC D2 auf, der einem Vielfachen des Zuwachses der relativen Proteinexpression für FANC D2 anderer Tumorzelllinien entspricht.

BRCA 1

Die relative Proteinexpression des DNA-Reparaturproteins BRCA 1 zeigt unter abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% für alle untersuchten Tumorzelllinien sehr deutliche Unterschiede.

Mit Cal 33 und FaDuDD haben wir zwei Tumorzelllinien, die unter hypoxischen 0,1 % Sauerstoff im Vergleich zu normoxischen 21% Sauerstoff einen Rückgang der relativen Proteinexpression für BRCA 1 verzeichnen, der bei 0,75 und 0,84 liegt. Die acht Tumorzelllinien UTSCC 14, UTSCC 15, UTSCC 45, SAS, HSC4, UTSCC 5, UTSCC 8 und XF 354 zeigen unter hypoxischen 0,1% Sauerstoff im Vergleich zu den normoxischen 21% Sauerstoff einen meist starken Anstieg der relativen Proteinexpression für BRCA 1 der zwischen 1,36 und 7,34 liegt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sämtliche Tumorzelllinien unter hypoxischen Konditionen im Vergleich zu der normoxischen Ausgangsposition starke Veränderungen aufweisen. Es gibt für keine Tumorzelllinie einen gleichbleibenden Verlauf. Während mit Cal 33 und FaDuDD nur zwei Tumorzelllinien überhaupt einen Rückgang in der relativen Proteinexpression für BRCA 1 verzeichnen, zeigen alle anderen Tumorzelllinien einen deutlichen Anstieg in der relativen Proteinexpression für BRCA 1, der maximal für UTSCC 14 bei 7,34 liegt.

5 DISKUSSION

Die Strahlentherapie nutzt die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zur Inaktivierung von Tumorzellen. Dabei zeigen Tumoren deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung. Dies hängt unter anderem vom Oxygenierungsgrad der Tumorzellen ab. Man geht davon aus, dass Tumore mit großen hypoxischen Arealen eine deutlich erhöhte Strahlenresistenz gegenüber oxygenierten Tumoren (Overgaard et al. 2005, Bristow und Hill 2008) aufweisen. Diese unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit könnte auch auf eine differentielle Reparaturleistung der Zellen in hypoxischen im Vergleich zu oxischen Zellen zurückzuführen sein. So konnte sowohl eine veränderte Expression von Proteinen des Nicht-Homologen-Endjoinings (Lara et al. 2008) als auch der homologen Rekombination (Chan et al 2008, Bindra et al. 2004, Meng et al. 2005) unter Hypoxie beobachtet werden. Dabei ist unklar, ob es sich bei dieser Veränderung um ein generelles Phänomen handelt oder nur in einzelnen Tumoridentitäten von Bedeutung ist.

Mit dieser Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluss die Veränderung von oxischen zu hypoxischen Bedingungen auf die Expression von DNA-Reparaturproteinen der Homologen Rekombination und des Nicht-Homologen-Endjoinings in zehn Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches haben.

5.1 Methodische Vorarbeiten

5.1.1 Nachweis der Hif-1 α Expression als Marker der induzierten Hypoxie

Um die Bedeutung einer veränderten Sauerstoffkonzentration auf die Expression von DNA-Reparaturproteinen untersuchen zu können musste zunächst gewährleistet werden, dass eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration zweifelsfrei detektiert werden konnte.

In den Experimenten wurden zehn Tumorzelllinien aus Plattenepithelkarzinomen für 48h in einer Hypoxiekammer unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% ausgesetzt. Die Expression des Proteins Hif-1 α wurde als Indikator einer induzierten und physiologisch vorhandene Hypoxie eingesetzt.

Hif-1 α ist ein Transkriptionsfaktor, welcher bei einer reduzierten Sauerstoffkonzentration eine deutlich erhöhte Expression zeigt, als unter normoxischen Bedingungen. Hif-1 α wurde erstmals von Wang und Semenza (Wang und Semenza

1993) identifiziert. Wird eine Zelle einer physiologisch wirksamem Hypoxie ausgesetzt, führt dies zu einer Induktion von Hif-1 α auf Proteinebene. Im Umkehrschluss kann man so mit dem Nachweis von Hif-1 α einen indirekten Nachweis für einen biologischen Prozesses mit hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen in menschlichen Tumoren erzielen (Overgaard 2007).

Das als Transkriptionsfaktor fungierende Hif-1 α reguliert unter Hypoxie die Expression von über 30 Zielgenen. Hierzu zählen auch die Gene VEGFR (vascular endothelium growth factor) und GLUT 1 (Glucosetransporter 1) (Vaupel und Mayer 2005). Der VEGF ist ein Signalmolekül, das bei einer mangelnden Sauerstoffversorgung in der Zelle die Angiogenese zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung stimuliert und GLUT 1 ist ein Transportprotein, welches Glukose aus dem Blut in die Zellen transportiert (Vaupel und Mayer 2005). Ein Sauerstoffmangel in den Zellen führt zu einer gesteigerten anaeroben Glykolyse und somit einem gesteigerten Glukosebedarf mit einem ebenso erhöhten Glukosetransport durch GLUT 1.

VEGF und GLUT 1 können ebenfalls als Indikatoren der Hypoxie eingesetzt werden (Bindra et al. 2004, Meng et al. 2005, Koshiji et al. 2005, Mihaylova et al. 2003, Pouysségur et al. 2006, Gibson et al. 2005). Allerdings steht Hif-1 α als Transkriptionsfaktor in der hypoxischen Signalkaskade weit über den von ihm regulierten Faktoren VEGF und GLUT 1. Dadurch ist Hif-1 α eher als ein frühzeitigerer Indikator für eine Hypoxie anzusehen als VEGF und GLUT 1. Da die Überexpression von Hif-1 α unter Hypoxie eine bestenfalls als gleichwertig zu bewertende Überexpression, der von ihm regulierten Faktoren VEGF und GLUT 1 mit sich bringt (Bindra et al. 2004), ist Hif-1 α als Indikator für eine physiologisch bedeutsame Hypoxie die erste Wahl.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der veränderten Hif-1 α Expression so zeigt sich bereits nach Minuten ein deutlicher Anstieg (Bell et al. 2005), der ebenso nach einer Inkubation mit einer Sauerstoffkonzentration von 1% nach 2 Stunden nachweisbar ist (Um et al. 2004). Diese erhöhte Expression des Hif-1 α kann über sehr lange Zeiträume beobachtet werden, bis hin zu 72h (Bindra et al. 2005, Gibson et al. 2005, Chan et al. 2008, Meng et al. 2005). Werden die Zellen dann wieder in normoxische Bedingungen überführt, kommt es sehr schnell zu einer beginnenden Degradierung des Hif-1 α , die innerhalb weniger Minuten nach Reoxygenierung beginnt (Wiesener et al. 2003). Zur kompletten Degradation des Hif-1 α benötigt die Zelle allerdings bis zu 24h (Howold 2008). Der in dieser Arbeit gewählte Inkubationszeitraum von 48h unter Hypoxie kann somit zweifelsfrei durch die Expression des Hif-1 α überwacht werden. Dieser lang anhaltende Inkubations-

zeitraum unter Hypoxie ist insofern von großer Bedeutung, da eine Veränderung der Expression von DNA-Reparaturproteinen, wie beispielsweise von Rad51 erst nach 24 h deutlich zu beobachten war, sich jedoch bis 48h noch weiter steigern ließ (Bindra et al. 2004). Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Inkubation der Zellen unter Hypoxie von 48h gewählt. Von einem längeren Inkubationszeitraum wurde Abstand genommen, da in diesen Experimenten die Auswirkung einer eher akuten Hypoxie und nicht einer chronischen Hypoxie, mit der Folge weiterer Veränderungen der Stoffwechselprozesse, untersucht werden sollte.

Werden Zellen nach einem längeren Zeitraum unter hypoxischen Bedingungen anschließend wieder einem normoxischen Zustand ausgesetzt, ist Hif-1 α instabil und wird mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Minuten degradiert. Ein unter Hypoxie nachgewiesener deutlicher Anstieg von Hif-1 α ist somit nach einer Reoxygenierung von 24h praktisch nicht mehr nachweisbar (Bindra et al. 2004). Aus dieser Konsequenz heraus musste die Proteinextraktion von Tumorzellen, die einer Hypoxie ausgesetzt waren, unter Bedingungen erfolgen, die die oben genannte Degradation von Hif-1 α unter Normoxie berücksichtigen. Unmittelbar nach der 48-stündigen Inkubation, wurden die Tumorzellen mit Hilfe von Trockeneis gekühlt, um die degradierenden Stoffwechselprozesse zu verlangsamen und es erfolgte eine sehr zeitige Gewinnung der Proteinextrakte aus den Tumorzellen.

Das eine übermäßige Degradation von Hif-1 α in den Experimenten dieser Arbeit erfolgreich verhindert wurde, lässt sich an den deutlichen Unterschieden im Vergleich von Hif-1 α unter normoxischen zu hypoxischen Bedingungen belegen.

Die Aktivierung von Hif-1 α zeigt sich bereits bei einer Sauerstoffkonzentration von 5%, steigt in der Expression progressiv an bis zu einer maximalen Expression bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,2-0,1% (Pouysségur et al. 2006). Unter anoxischen Bedingungen scheint die Expression von Hif-1 α dann wieder abzunehmen (Chan et al. 2008). Dies zeigt deutlich, dass die minimale Sauerstoffkonzentration für die Experimente im Bereich von 0,2-0,01% Sauerstoff anzusetzen sind. Dies zeigt sich auch in den Resultaten anderer Arbeitsgruppen die Konzentrationen von 0,2% Sauerstoff (Meng et al. 2005, Chan et al. 2008) oder 0,01% Sauerstoff (Bindra et. al 2004, Gibson et al 2005), mit jeweils guten Nachweisen von Hif-1 α eingesetzt haben. Daher wurden in dieser Arbeit zur Verlaufsbeurteilung und maximalen Expression von Hif-1 α Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% eingesetzt und Hif-1 α als deutlicher und zuverlässiger Marker für eine physiologisch bedeutsame Hypoxie verwendet. Insbesondere die Abgrenzung von normoxischen zu hypoxischen Tumorzellen konnte mit absoluter Sicherheit erreicht werden.

5.1.2 Einsatz von β -Actin als Beladungskontrolle

Die vergleichende Untersuchung der Expression von DNA-Reparaturproteinen in unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen benötigt den Nachweis eines Markerproteins welches sich in seiner Expression nicht durch Hypoxie verändern lässt. Als Beladungskontrolle wurde das Protein β -Actin verwendet und vorhandene Abweichungen in der Expression der DNA-Reparaturproteine zunächst mit der β -Actin-Konzentration korrigiert, bevor sie bewertet wurden.

β -Actin ist der als Ladungskontrolle am häufigsten verwendeter Marker (Bindra et al. 2004, Gibson et al. 2005, To et al. 2006, Meng et al. 2005). Neben β -Actin wird häufig auch Tubulin als Ladungskontrolle eingesetzt (Bindra et al. 2004, Gibson et al. 2005). Diese Proteine eignen sich insbesondere als Beladungskontrolle, da sowohl β -Actin, als auch Tubulin als Bestandteile des Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen zu der Gruppe der Strukturproteine zählen. Damit gehören sie zu den häufigsten Proteinen in Eukaryoten und sind unabhängig von physiologischen Veränderungen. Allerdings wurde beobachtet, dass sich β -Actin als ungeeignete Ladungskontrolle für gering exprimierte Proteine erweist (Dittmer und Dittmer 2006). Die Proteinkonzentrationen der DNA-Reparaturproteine in der vorliegenden Arbeit waren jedoch überwiegend hoch, so dass dies für die Experimente nur eine untergeordnete Rolle spielte. Allerdings wurde beobachtet, dass eine verminderte Sauerstoffkonzentration schon zu einer leichten Abnahme der β -Actin-Expression führen kann (Chan et al. 2008), so dass in einigen Arbeiten die Expression von MSH6 Protein verwenden, welches keine veränderter Expression unter Hypoxie zeigt (Mihaylova et al. 2003) und insbesondere bei chronischer Hypoxie als Ladungskontrolle verwendet wird (Gibson et al. 2006). Auch das Protein GAPDH unterliegen keiner Regulation unter Hypoxie (Said et al. 2007) und ist als Ladungskontrolle bei Untersuchungen in Gliomen, Hepatozelluläre Karzinomen und Adenokarzinomen der Lunge geeignet (Said et al. 2009).

Im Zusammenhang mit der auf Translations-Ebene gering veränderten Expression von β -Actin unter hypoxischen Bedingungen ist β -Actin als Ladungskontrolle sicherlich geeignet. Es könnten auch andere Proteine wie Tubulin, MSH6-Protein oder GAPDH alternativ als Ladungskontrolle im Western Blot eingesetzt werden. Ob eine Ladungskontrolle mit Proteinen, wie MSH6 oder GAPDH, welche unter Hypoxie keiner Regulation unterliegen, für spezifische Tumoridentitäten wie den in dieser Arbeit untersuchten Plattenepitheltumoren besser geeignet ist bleibt zu überprüfen. Da sich in den Experimenten die Expression von β -Actin in einer akzeptablen Schwankungsbreite bezüglich der relativen Proteinexpression in den zehn untersuchten Plattenepithelkarzinomen bei

unterschiedlichen normoxischen bis hin zu hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen ergab, wurde für die Untersuchungen β -Actin als geeignete Ladungskontrolle erachtet.

5.2 Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie

Eine Hypoxie in Tumorzellen kann zu einer veränderten Expression von Proteinen, die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind führen. Dies wurde sowohl für Proteine der Doppelstrangbruchreparatur, wie der Homologen Rekombination (Bindra et al. 2004, Bindra et al. 2005, Gibson et al. 2006, Meng et al. 2005, Chan et al. 2008), als auch Proteinen des Nicht-Homologen-Endjoinings (Meng et al. 2005, Lara et al. 2008, Um et al. 2004) beobachtet. Es wurden ebenfalls Auswirkungen der Hypoxie auf die Expression von Proteinen der Mismatch-Reparatur beobachtet (Mihaylova et al. 2003, Koshiji et al. 2005). In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung die jeweiligen an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligten DNA-Reparaturproteine gesondert nach den Reparaturwegen (NHEJ, HR und MMR) zu betrachten, denen sie zugeordnet werden können und zu überprüfen ob sich eine Veränderung der Expression auch auf die Tumorzelllinien aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereich auswirkt. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit die Expression von Proteinen des NHEJ mit Ku70 und Ligase IV als auch eher der HR zugeordneter Proteine mit RAD51, FANCD2, BRCA2 und BRCA1, nach Inkubation mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in zehn Linien von Plattenepithelkarzinomen untersucht.

5.2.1 Expression von DNA-Reparaturproteinen des NHEJ unter Hypoxie

Beim NHEJ erfolgt die Reparatur weitestgehend durch sequenzunabhängige Ligation der DNA-Enden. Daher ist das NHEJ in allen Zellzyklusphasen aktiv und wird im Wesentlichen durch zwei Proteinkomplexe durchgeführt, an denen die DNA-Reparaturproteine Ku70 und Lig IV beteiligt sind, wobei Ku70 als Heterodimer in Verbindung mit Ku80 zu Beginn der Reparatur, die Ligase IV am Ende der Reparatur im Komplex mit XRCC4 und XLF zur Ligation der Bruchenden von Bedeutung ist (Beucher et al. 2009).

In dieser Arbeit wurde die Expression der beiden am NHEJ direkt beteiligten DNA-Reparaturproteine Lig IV und Ku70 nach unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Dabei zeigte sich in acht der zehn untersuchten

Zelllinien eine deutliche Veränderung der Expression unter hypoxischen Bedingungen. Die veränderte Expression unter Hypoxie zeigte sich dabei immer in beiden untersuchten Proteinen, wobei FaDu, Cal 33 und XF354 unter Hypoxie eine verminderte Expression aufwiesen, während die Proteinexpression von Ku70 und Lig IV in den Tumorzelllinien UTSCC14 und UTSCC15 deutlich erhöht war.

Eine verminderte Expression von Ku70, Lig IV und DNA-PK_{CS} wurde ebenfalls bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,2% für 48 und 72 h in DU145-Zellen (Prostatatumor) beobachtet (Meng et al. 2005). Diese Beobachtung wurde bestätigt durch (Lara et al. 2008), die ebenfalls eine Reduktion von Ku70 und Ku80 in Zelllinien des Zervixkarzinoms beobachteten (pO_2 jeweils unter 10 mmHg bzw. unter 5 mmHg).

Dagegen konnte eine deutliche Zunahme der Expression von Proteinen des NHEJ in Zelllinien des Leberkarzinoms beobachtet werden, die für einen Zeitraum von zwei bis acht Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 1% ausgesetzt waren (Um et al. 2004). Kein Effekt auf die Expression von am NHEJ beteiligter Proteine unter Hypoxie wurde dagegen in RKO-Zellen (Kolonkarzinom), MCF7-Zellen (Mammakarzinom) und A549-Zellen (Lungenkarzinom) beobachtet (Bindra et al. 2005).

Somit ist kein genereller Effekt der Hypoxie auf die Expression am NHEJ beteiligter Proteine zu beobachten, da es sowohl zu einer zunehmenden, abnehmenden, als auch unveränderten Expression unter Hypoxie kommen kann. Es wird allerdings in allen Arbeiten sehr deutlich gezeigt, dass die auftretenden Veränderungen immer alle untersuchten Proteine des NHEJ betrafen. Dies lässt somit auf eine Regulation des gesamten Reparaturweges und keine proteinspezifische Regulation unter Hypoxie vermuten.

5.2.2 Expression von DNA-Reparaturproteinen der HR unter Hypoxie

Bei der Homologen Rekombination erfolgt eine präzise sequenzabhängige Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Zu ihren zentralen DNA-Reparaturproteinen zählt RAD51, das mit der Unterstützung von FANCD2, BRCA1 und BRCA2 auf den einzelsträngigen Überhang, welcher vorher an einem Doppelstrangbruch generiert wurde, geladen wird und somit im Schwesterchromatid nach möglichen Sequenzhomologien für die Reparatur suchen kann (Beucher et al. 2009). Deshalb nimmt man an, dass die HR nur in der späten S-Phase und in der G2-Phase zum Einsatz kommt.

In dieser Arbeit wurde die Expression der DNA-Reparaturproteine RAD51, FANCD2, BRCA1 und BRCA2, die an der Homologen Rekombination im weitesten Sinne beteiligt sind, bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Es zeigte sich eine mehrheitlich veränderte Expression der DNA-Reparaturproteine unter hypoxischen Bedingungen. Während für die Expression von RAD51 und FANCD2 sowohl eine verminderte, gleichbleibende oder gesteigerte Expression beobachtet wurde, zeigte sich für BRCA1 und BRCA2 in acht der zehn Tumorzelllinien ein Anstieg der Expression und nur ein leichter Rückgang in zwei Linien. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass RAD51 und FANCD2 keine bevorzugte Veränderung in der Expression unter Hypoxie in Plattenepithelkarzinomen erkennen lassen, während die beiden DNA-Reparaturproteine BRCA1 und BRCA2 eher verstärkt exprimiert werden. Auffallend ist, dass alle vier DNA-Reparaturproteine in den gleichen Tumorzelllinien einen vergleichbaren Verlauf in der Expression aufzeigen. So stößt man unter hypoxischen Bedingungen in den Tumorzelllinien FaDu und Cal 33 für die DNA-Reparaturproteine Rad51, BRCA1 und BRCA2 auf eine verminderte Proteinexpression und in den Tumorzelllinien HSC4, XF354 und UTSCC14 auf eine erhöhte Expression. Betrachtet man gesondert BRCA1 und BRCA2, so trifft dieser Zusammenhang in besonderem Maße zu. Diese beiden DNA-Reparaturproteine sind nur in den Tumorzelllinien FaDu und Cal 33 unter Hypoxie vermindert und in den anderen dagegen deutlich vermehrt exprimiert.

Die in der Literatur publizierten Daten über die Veränderungen in der Expression von DNA-Reparaturproteinen der HR zeigen ebenfalls ein heterogenes Bild. Eine deutliche Reduktion von RAD51 in Tumoren unterschiedlichen Ursprunges (Mammakarzinom: MCF-7-Zellen, Lungenkarzinom: A549-Zellen, Zervixkarzinom: Hela-Zellen, Kolonkarzinom: SW480- und RKO-Zellen, Prostatakarzinom: PC3-Zellen und in Tumoren der Epidermis: A431-Zellen) und unter extremer Hypoxie (Sauerstoffkonzentration von 0,01% für 48 h) wurde von (Bindra et al. 2004) beobachtet. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte keinen Effekt der Hypoxie auf weitere HR Proteine, wie RAD50, RAD51b, RAD52 und RAD54b, aber eine Reduktion von BRCA1 (Bindra et al. 2005) beobachten. Gibson et al. 2006 beobachteten ebenfalls eine Reduktion von BRCA1 unter Hypoxie in hypoxischen MCF-7-Zellen (Mammakarzinom), A549-Zellen (Lungenkarzinom), Hela-Zellen (Zervixkarzinom), RKO-Zellen (Kolonkarzinom) und HCT15-Zellen (Kolonkarzinom), unter denselben Bedingungen. Eine Reduktion RAD51, RAD51c, RAD51d, RAD52, RAD54, XRCC3, BRCA1 und BRCA2 bei einer Sauerstoffkonzentrationen von 0,2% über einen Zeitraum von 48-72 h wurde dagegen von (Meng et al. 2005)

beobachtet. Im Gegensatz dazu wird nur für RAD51, RAD51b, RAD51c, RAD54, XRCC3 und kein Effekt auf BRCA1 und BRCA2 in H1299-Zellen unter Hypoxie beobachtet (Chan et al. 2008).

Auf den genannten Veröffentlichungen basierend, wurde in letzter Zeit zunehmend die Meinung vertreten, dass die DNA-Reparaturproteine der Homologen Rekombination unter Hypoxie spezifisch und signifikant herunter reguliert sind. Für die in dieser Arbeit untersuchten zehn Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf- und Halsbereich fand sich dagegen keine spezifische herabgesetzte Expression von DNA-Reparaturproteinen der HR unter Hypoxie, sondern speziell für BRCA1 und BRCA2 eine gegenteilig deutlich vermehrte Expression in hypoxischen Tumorzellen.

Die Expositionszeit, in der die verschiedenen Tumorzellen den hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt waren, lag übereinstimmend sowohl in den publizierten als auch in dieser Arbeit bei 48 h. Damit steht die Expositionszeit in keinem Zusammenhang zu den unterschiedlichen Ergebnissen. In dem Ausmaß der Hypoxie, welche durch die Höhe der Sauerstoffkonzentration bestimmt wird, finden sich sowohl zwischen den verschiedenen veröffentlichten Arbeiten als auch im Vergleich zu den in unseren Experimenten gewählten Rahmenbedingungen deutliche Abweichungen. So werden Sauerstoffkonzentrationen von 0,01% (Bindra et al. 2005, Gibson et al. 2006) und 0,2% (Meng et al. 2005, Chan et al. 2008) gewählt, die sich nicht unerheblich von den in dieser Arbeit verwendeten Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5%, 1% und 0,1% unterscheiden.

Werden Zellen einer Sauerstoffkonzentration von 0,01% ausgesetzt, so ist diese einer anoxischen Stoffwechselsituation, in der überhaupt kein Sauerstoff mehr zur Verfügung steht, sehr ähnlich. Daher ist es wahrscheinlich, dass eine Hypoxie unter solchen nahezu anoxischen Bedingungen andere zelluläre Mechanismen und Regulationsvorgänge in Gang setzt, als dies bei Sauerstoffkonzentrationen von 0,2-0,1% der Fall ist. Ein Vergleich der Expression von DNA-Reparaturproteinen unter solchen unterschiedlichen Rahmenbedingungen erscheint daher als wenig sinnvoll, da bedingt durch den Mangel an Sauerstoff in unterschiedlichem Ausmaß verschiedene „Stresssituationen“ der Zelle simuliert werden und somit kein vergleichender Informationsgewinn möglich ist. Um die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen publizierten Daten zu vergleichen, sind am ehesten die Arbeiten von Meng et al. 2005 und Chan et al. 2008 geeignet, da die in diesen Arbeiten verwendete hypoxische Sauerstoffkonzentration von 0,2% relativ nah an der in dieser Arbeit verwendeten Sauerstoffkonzentration von 0,1% liegt.

Auffällig in diesem Zusammenhang ist, dass in dieser und anderen Arbeiten die untersuchten Proteine der HR sich in den entsprechenden Zelllinien meistens in

gleicher Weise, d.h. entweder zunehmend oder abnehmend verhielten, was darauf hinweist, dass der gesamte Reparaturkomplex von einer veränderten Regulation unter Hypoxie betroffen ist.

5.2.3 Expression von DNA-Reparaturproteinen anderer Wege unter Hypoxie

Überprüft man die Literatur hinsichtlich der Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie wurde ebenfalls ein deutlicher Effekt auf die Mismatch-Reparatur beobachtet. Die Hauptaufgabe der Proteine der Mismatch-Reparatur besteht in der Korrektur von Basenfehlpaarungen zwischen Guanin und Thymin, sowie von Insertions-Deletions-Schleifen der DNA. Die Erkennung der Basenfehlpaarungen erfolgt im Wesentlichen durch drei Proteinheterodimere (hMutS α , hMutS β und hMutL α), die sich aus den Proteinen hMSH2, hMSH6, hMSH3, hMLH1 und hMPMS2 zusammensetzen (Rädle und Plotz 2004).

Unter Hypoxie konnte ein deutlicher Effekt auf die Expression der Mismatch-Reparaturproteine MLH1 und PMS2 beobachtet werden, dagegen zeigten sich keine Auswirkungen auf MSH2 und MSH6 nach Inkubation für 48h in Fibroblasten und HeLa-Zellen (Mihaylova et al. 2003). Diese Beobachtung wird durch (Koshiji et al. 2005) erweitert, die auch für MSH2 und MSH6 eine Verminderung der Expression in HCT116-Zellen unter Hypoxie beobachteten.

5.3 Bedeutung des Zellzyklus für die Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie

Proliferierende eukaryotische Zellen durchlaufen in einem Zellzyklus nacheinander die G1-, die S-, die G2-, und die M-Phase. Es gibt Hinweise, dass die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen vom Zellzyklus abhängig ist. Während für das NHEJ angenommen wird, dass es in allen Zellzyklusphasen in gleicher Weise aktiv ist, wird vermutet, dass die HR hauptsächlich in der späten S-Phase und in der G2-Phase aktiv ist, da zur Reparatur ein intaktes Schwesterchromatid benötigt wird. Dies wird bestätigt durch Arbeiten, die eine Zellzyklus-abhängige Expression von RAD51 beobachteten, mit einer geringen Expression in der G1-, einem deutlichen Anstieg in der S-, und einer gleichbleibend hohen Expression in der G2-Phase (Yamamoto et al. 1996, Chen et al. 1997 und Bindra et al. 2004).

Ein Effekt der Hypoxie auf Zellzykluskontrollpunkte konnte von mehreren Gruppen beobachtet werden. Am bedeutsamsten und längsten bekannt ist der

durch die Hypoxie induzierte S-Phase-Arrest. So konnte man schon sehr frühzeitig beobachten, dass die für die Nukleotid-Synthese notwendigen Proteine unter Hypoxie nicht synthetisieren und damit die Progression durch die S-Phase verhindert wird, allerdings erst bei einer sehr geringen Sauerstoffkonzentration von 0.01% (Thelander et al. 1983, Loffler 1989). Diese sehr frühen Untersuchungen werden unterstützt durch Arbeiten von Hammond et al. 2002, 2003, und 2006) die ebenfalls einen durch Hypoxie induzierten Arrest in der S-Phase beobachteten. So konnten sie zeigen, dass infolge einer Reduktion der Sauerstoffkonzentration ATR nukleäre Foci bildet und sowohl p53, H2AX, als auch Chk1 phosphoryliert, unabhängig von ATM. Dabei bilden sich lange einzelsträngige Bereiche an DNA aus, die erst unter Reoxygenierung in DNA-Doppelstrangbrüchen resultierten. Desweiteren wurde beobachtet, dass Chk2 in Abhängigkeit von ATM unter Hypoxie aktiviert wird und seinerseits entweder über die Aktivierung von Cdc25 und Cdc2/CyclinB eine G2-Arrest auslöst oder über die Phosphorylierung von BRCA1, mit der Folge der Aktivierung von BRCA2 und RAD51 entweder die HR initiiert (S-Phase-Arrest) oder die Zellen in die Apoptose treibt (Freiberg et al. 2006).

Unter moderaten hypoxischen Bedingungen scheint es möglicherweise eher zu einem G1-Arrest, assoziiert mit einer Aktivitätsabnahme einiger Cyclin-abhängigen CDK Komplexe zu kommen, die für die Hypophosphorylierung des Retinoblastomproteins (RB) verantwortlich sind und somit die Zellzyklusprogression verhindern (Krtolkica et al. 1998, Gardner et al. 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Hif1 α selbst durch seine Aktivität als Transkriptionsfaktor unabhängig von p53 die Expression von p27 erhöht und somit seinerseits für die Hypophosphorylierung von RB, mit der Folge des G1-Arrestes, verantwortlich sein kann (Goda et al. 2003). Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches konnten eine unterschiedliche Sensitivität der Zellen gegenüber einer Hypoxie mit einem daraus resultierenden unterschiedlichen Ausmaß des G1-Arrestes beobachten. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 2% beobachteten sie in einigen Linien einen Anstieg der G1-Phasezellen um 80% bzw. 65% im Vergleich zu normoxischen Bedingungen (Yoshida et al. 2008). Ebenfalls einen Anstieg der G1-Phasezellen um 20-30% konnte auch von (Bindra et al. 2004) beobachtet werden, allerdings erst bei sehr niedriger Sauerstoffkonzentration von 0,01%. Das Ausmaß des beobachteten G1-Arrestes scheint dabei von der untersuchten Zelllinie, dem p53- und p21 Status sowie dem Ausmaß der Hypoxie abzuhängen (Mizuno et al. 2009).

Überträgt man die aufgelisteten Befunde auf die Ergebnisse dieser Studie so kann die mögliche Abnahme von an der HR beteiligten Proteine wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurde auf Zellzyklusverschiebungen unter Hypoxie zurückzuführen sein. So könnte der beobachtete Anstieg der HR Proteine in einigen Zelllinien auf eine Akkumulation der Zellen in der S- bzw. G2-Phase hindeuten, eine Abnahme dagegen auf eine Akkumulation der Zellen in der G1-Phase oder eine vermehrte Degradation der Zellen durch Apoptose. Es könnte allerdings auch auf eine schadensinduzierte Induktion der RAD51 Expression zurückzuführen sein wie sie auch nach Bestrahlung beobachtet werden konnte, die sich möglicherweise je nach Sensitivität der Zelllinie unterschiedlich stark ausprägt. Die veränderte Expression der am NHEJ beteiligten Proteine lässt sich mit den Verschiebungen im Zellzyklus allerdings nicht erklären.

Zur weiteren Analyse der Bedeutung der Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie müssten Zellzyklusverteilungen, sowie die Vitalität der Zellen nach unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen überprüft werden. In diesem Zusammenhang wäre sicherlich die Aktivierung der PI3-Kinasen ATM und ATR von besonderem Interesse, da sie einen detaillierteren Aufschluss der Aktivierung einzelner Reparaturwege geben könnten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Es konnte beobachtet werden, dass Tumorzellen unter Hypoxie eine erhöhte genomische Instabilität aufweisen. Der für diese genomische Instabilität ursächliche Mechanismus ist weitestgehend ungeklärt, die Entschlüsselung dieses Zusammenhanges könnte jedoch einen entscheidenden Beitrag zur Prädiktion der Prognose bei Tumorpatienten leisten. Einzelbeobachtungen weisen darauf hin, dass möglicherweise eine veränderte Expression von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie die Ursache für die erhöhte genomische Instabilität sein könnte. Unklar ist allerdings, ob sich von diesen Einzelbeobachtungen ein genereller Regulationsmechanismus für die Reparatur unter hypoxischen Bedingungen herleiten lässt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit erstmalig ein systematischer Ansatz gewählt, welcher zehn verschiedene Tumorzelllinien einer Tumorentität hinsichtlich der Expression von DNA-Reparaturproteinen mehrerer Reparaturwege in unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen untersucht.

Zu diesem Zweck wurde in zehn Zelllinien, welche aus Plattenepithel-Karzinomen des Kopf/Halsbereiches generiert wurden, die Expression der DNA-Reparaturproteine Ku70, LigIV, RAD51, FANCD2, BRCA1 und BRCA2 bei den Sauerstoffkonzentrationen 21%, 5%, 1% und 0,1% gemessen; zur Sicherstellung der Hypoxie wurde der Anstieg von Hif-1 α überprüft.

Es konnte kein genereller Mechanismus der Regulation von DNA-Reparaturproteinen unter Hypoxie für Zelllinien von HNO-Tumoren beobachtet. Für beide untersuchten Proteine des NHEJ zeigte sich sowohl eine Reduktion als auch ein Anstieg der Expression unter Hypoxie. So konnte für das Ku70 Protein in acht Linien eine Veränderung beobachtet werden, wobei zwei einen deutlichen Anstieg, mit einer 3- bzw. 10-fachen Erhöhung bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1% zeigten. Das Protein Lig IV zeigte ein divergenteres Bild, mit sowohl ansteigender, unveränderter als auch abfallender Expression in Abhängigkeit zur Abnahme der Sauerstoffkonzentration. Auffällig ist, dass in acht der zehn untersuchten Zelllinien die Veränderung der Expression beider am NHEJ beteiligten Proteinen in gleicher Weise unter Hypoxie reguliert wurde.

Für die eher der HR zuzuordnenden Proteine zeigte sich ebenfalls ein sehr heterogenes Bild in der Expression in Abhängigkeit zur Sauerstoffkonzentration. Für das Protein RAD51 ließ sich sowohl eine ansteigende, unveränderte als auch abfallende Proteinexpression beobachten. Allerdings konnte nur in einer Zelllinie (FaDu) eine extreme Reduktion unter Hypoxie beobachtet werden. Auch die relative Proteinexpression von FANCD2 wies unter hypoxischen Bedingungen sowohl an-

steigende, gleichbleibende als auch abfallende Verläufe auf, mit einer Zelllinie (UTSCC14) die einen extremen Anstieg unter Hypoxie aufwies. Der stärkste Effekt der Hypoxie auf die Proteinexpression zeigte sich für die Proteine BRCA 1 und BRCA 2, bei denen in allen Zelllinien ein Effekt beobachtet wurde. So zeigten zwei Zelllinien (FaDu, Cal33) eine deutliche Reduktion, alle anderen dagegen einen starken Anstieg mit um das bis zu 7-fache für BRCA1 (UTSCC14) und 8-fache für BRCA2 (SAS) der Konzentration unter oxischen Bedingungen.

Die beobachtete Variabilität in der Expression unter hypoxischen Bedingungen könnte darauf zurückzuführen sein, dass für Tumorzelllinien sowohl eine Akkumulation in der G1-Phase als auch der S-Phase beobachtet wurde, welche sich in der Folge auch auf die Expression von DNA-Reparaturproteinen auswirken könnte. Der Effekt des Zellzyklus unter Hypoxie auf die Expression von Reparaturproteinen solle Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdolvahad-Emminger H (2003) Physikum exakt. Das gesamte Prüfungswissen in einem Band, 3. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart. Seite 750.
- Bell EL, Emerling BM, Chandel NS (2005) Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Mitochondrion*. 5(5):322-32.
- Benninghaus H-G, Lenarz T (2005) HNO, 12. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Beucher A (2009) Untersuchungen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in der G2-Phase des Zellzyklus. Naturwissenschaftliche Dissertation. Universität Darmstadt.
- Bindra RS, Schaffer PJ, Meng A, Woo J, Måseide K, Roth ME, Lizardi P, Hedley DW, Bristow RG, Glazer PM (2004) Down-regulation of Rad51 and decreased homologous recombination in hypoxic cancer cells. *Mol Cell Biol*. 24(19):8504-18.
- Bindra RS, Gibson SL, Meng A, Westermark U, Jasin M, Pierce AJ, Bristow RG, Classon MK, Glazer PM (2005) Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs. *Cancer Res*. 65(24):11597-604.
- Bonis PA, Trikalinos TA, Chung M, Chew P, Ip S, DeVine DA, Lau J (2007) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: diagnostic strategies and their implications. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. (150):1-180.
- Borgmann K (2010) Prädiktion der Normalgewebereaktion nach Strahlentherapie. Naturwissenschaftliche Habilitation. Universität Hamburg.
- Bristow RG, Hill RP (2008) Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. 8(3):180-92.
- Brown JM, Wilson WR (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 4(6):437-47.
- Burma S, Chen BPC, Chen DJ (2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair* 5(9-10):1042-8.
- Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M, Wenger RH (2001) Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflugers Arch*. 443(2):240-9.
- Carnell DM, Smith RE, Daley FM, Saunders MI, Bentzen SM, Hoskin PJ (2006) An immunohistochemical assessment of hypoxia in prostate carcinoma using pimonidazole: implications for radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 65(1):91-9.
- Chan N, Koritzinsky M, Zhao H, Bindra R, Glazer PM, Powell S, Belmaaza A, Wouters B, Bristow RG (2008) Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to offset chemoresistance and radioresistance. *Cancer Res*. 68(2):605-14.

- Chen F, Nastasi A, Shen Z, Brenneman M, Crissman H, Chen DJ (1997) Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat Res.* 384:205-11.
- Collis SJ, Barber LJ, Ward JD, Martin JS, Boulton SJ (2006) *C. elegans* FANCD2 responds to replication stress and functions in interstrand cross-link repair. *DNA Repair.* 5(11):1398-406.
- Del Rowe J, Scott C, Werner-Wasik M, Bahary JP, Curran WJ, Urtasun RC, Fisher B (2000) Single-arm, open-label phase II study of intravenously administered tirapazamine and radiation therapy for glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol.* 18(6):1254-9.
- Dittmer A, Dittmer J (2006) Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis.* 27(14):2844-5.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 107(1):43-54.
- Eriksen JG, Overgaard J; Danish Head and Neck Cancer Study Group (DAHANCA) (2007) Lack of prognostic and predictive value of CA IX in radiotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck with known modifiable hypoxia: an evaluation of the DAHANCA 5 study. *Radiother Oncol.* 83(3):383-8.
- Finnie NJ, Gottlieb TM, Blunt T, Jeggo PA, Jackson SP (1995) DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(1):320-4.
- Freiberg RA, Krieg AJ, Giaccia AJ, Hammond EM (2006) Checking in on hypoxia/reoxygenation. *Cell Cycle.* 5(12):1304-7.
- Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV (2001) Hypoxia inhibits G₁/S transition through regulation of p27 expression. *J. Biol. Chem.* 276(11):7919-7926.
- Gibson SL, Bindra RS, Glazer PM (2005) Hypoxia-induced phosphorylation of Chk2 in an ataxia telangiectasia mutated-dependent manner. *Cancer Res.* 65(23):10734-41.
- Gibson SL, Bindra RS, Glazer PM (2006) CHK2-dependent phosphorylation of BRCA1 in hypoxia. *Radiat Res.* 166(4):646-51.
- Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS (2003) Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol.* 23(1):359-69.
- Hall EJ, Giaccia AJ 2006 *Radiobiology for the Radiologist*, 6. Auflage. Lippincott Williams & Wilkins Verlag Philadelphia USA.
- Hammond EM, Denko NC, Dorie MJ, Abraham RT, Giaccia AJ (2002) Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. *Mol. Cell. Biol.* 22(6):1834-1843.

- Hammond EM, Green SL, Giaccia AJ (2003) Comparison of hypoxia-induced replication arrest with hydroxyurea and aphidicolin-induced arrest. *Mutat Res.* 532(1-2):205-13.
- Hammond EM, Freiberg RA, Giaccia AJ (2006) The roles of Chk 1 and Chk 2 in hypoxia and reoxygenation. *Cancer Lett.* 238(2):161-7.
- Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst).* 6(7):923-35.
- Herrmann Th, Baumann M, Dörr W (2006) *Klinische Strahlenbiologie kurz und bündig*, 4. Auflage. Urban & Fischer Verlag München.
- Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P (1996) Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 56(19):4509-15.
- Howold N (2008) Beeinflussung der Stabilisierung von HIF-1 α in HepG2-Zellen und ihrer Vitalität durch Zitratzyklusmetabolite in einem Organtransplantationsmodell. Medizinische Dissertation. Universität Gießen.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 292(5516):468-72.
- Kaanders JH, Pop LA, Marres HA, Bruaset I, van den Hoogen FJ, Merks MA, van der Kogel AJ (2002) ARCON: experience in 215 patients with advanced head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 52(3):769-78.
- Koshiji M, To KK, Hammer S, Kumamoto K, Harris AL, Modrich P, Huang LE (2005) HIF-1 α induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS α expression. *Mol Cell.* 17(6):793-803.
- Krtolica A, Krucher NA, Ludlow JW (1998). Hypoxia-induced pRB hypophosphorylation results from downregulation of CDK and upregulation of PP1 activities. *Oncogene* 17(18):2295-2304.
- Lambin P, Ramaekers BL, van Mastrigt GA, Van den Ende P, de Jong J, De Ruyscher DK, Pijls-Johannesma M (2009) Erythropoietin as an adjuvant treatment with (chemo) radiation therapy for head and neck cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* (3):CD006158.
- Lammering G, Hewit TH, Holmes M, Valerie K, Hawkins W, Lin PS, Mikkelsen RB, Schmidt-Ullrich RK (2004) Inhibition of the type III epidermal growth factor receptor variant mutant receptor by dominant-negative EGFR-CD533 enhances malignant glioma cell radiosensitivity. *Clin Cancer Res.* 10(19):6732-43.
- Lara PC, Lloret M, Clavo B, Apolinario RM, Bordón E, Rey A, Falcón O, Alonso AR, Belka C (2008) Hypoxia downregulates Ku70/80 expression in cervical carcinoma tumors. *Radiother Oncol.* 89(2):222-6.

- Lee CG, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, Suit HD, Boucher Y (2000) Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res.*60:5565-70.
- Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Bio.Chem* 283(1):1-5.
- Löffler M (1989) The biosynthetic pathway of pyrimidine (deoxy)nucleotides: a sensor of oxygen tension necessary for maintaining cell proliferation? *Exp. Cell Res.* 182(2):673-680.
- Meng AX, Jalali F, Cuddihy A, Chan N, Bindra RS, Glazer PM, Bristow RG (2005) Hypoxia down-regulates DNA double strand break repair gene expression in prostate cancer cells. *Radiother Oncol.* 76(2):168-76.
- Meyn RE, vanAnkeren SC, Jenkins WT (1987) The induction of DNA-protein crosslinks in hypoxic cells and their possible contribution to cell lethality. *Radiat Res.* 109(3):419-29.
- Mihaylova VT, Bindra RS, Yuan J, Campisi D, Narayanan L, Jensen R, Giordano F, Johnson RS, Rockwell S, Glazer PM (2003) Decreased expression of the DNA mismatch repair gene Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 23(9):3265-73.
- Mizuno S, Bogaard HJ, Voelkel NF, Umeda Y, Kadowaki M, Ameshima S, Miyamori I, Ishizaki T (2009) Hypoxia regulates human lung fibroblast proliferation via p53-dependent and -independent pathways. *Respir Res.* 10:17.
- Murray D, Prager A, Meyn RE, Davison S, Green AD (1993) Relationships between DNA damage and the survival of radiosensitive mutant Chinese hamster cell lines exposed to gamma-radiation: Part 2. Effect of cellular redox status. *Int J Radiat Biol.* 63(2):199-206.
- Nowack (2007) Letale Chromosomenaberrationen als Indikator für das Risiko eines Erythems nach Strahlentherapie. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
- Overgaard J, Eriksen JG, Nordmark M, Alsner J, Horsman MR (2005) Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia sensitiser nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 6(10):757-64.
- Overgaard J (2007) Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol.* 25(26):4066-74.
- Pouysségur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 441(7092):437-43.
- Rädle J, Plotz G (2004) Untersuchungen zum Mechanismus der Mismatch Reparatur. Homburg/Saar. [URL:http://archiv.med-rz.uniklinik-saarland.de/mediadb/Uniklinik_Homburg/Kliniken/Gastroenterologie/Forschung/forschung_mmr.pdf](http://archiv.med-rz.uniklinik-saarland.de/mediadb/Uniklinik_Homburg/Kliniken/Gastroenterologie/Forschung/forschung_mmr.pdf) (Stand: 18.04.2010, 12:52).

- Said HM, Hagemann C, Stojic J, Schoemig B, Vince GH, Flentje M, Roosen K, Vordermark D (2007) GAPDH is not regulated in human glioblastoma under hypoxic conditions. *BMC Mol Biol.* 8:55.
- Said HM, Polat B, Hagemann C, Anacker J, Flentje M, Vordermark D (2009) Absence of GAPDH regulation in tumor-cells of different origin under hypoxic conditions in - vitro. *BMC Res Notes.* 2:8.
- Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 272(36):22642-7.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1):76-85.
- Sprong D, Janssen HL, Vens C, Begg AC (2006) Resistance of hypoxic cells to ionizing radiation is influenced by homologous recombination status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 64(2):562-72.
- Sonoda E, Hochegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S (2006) Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair* 5(9-10):1021-9.
- Thelander L, Gräslund A, Thelander M (1983) Continual presence of oxygen and iron required for mammalian ribonucleotide reduction: possible regulation mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110(3):859-65.
- Thomlinson RH, Gray LH (1955) The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer.* 9(4):539-49.
- To KK, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, Huang LE (2006) The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *EMBO J.* 25(20):4784-94.
- Um JH, Kang CD, Bae JH, Shin GG, Kim DW, Kim DW, Chung BS, Kim SH (2004) Association of DNA-dependent protein kinase with hypoxia inducible factor-1 and its implication in resistance to anticancer drugs in hypoxic tumor cells. *Exp Mol Med.* 36(3):233-42.
- Vaupel P, Mayer A (2005) Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus Clin Biol.* 12(1):5-10.
- Wang GL, Semenza GL (1993) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(9):4304-8.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(12):5510-4.
- Wiesener MS, Maxwell PH (2003) HIF and oxygen sensing; as important to life as the air we breathe? *Ann Med.* 35(3):183-90.

- Williamson SK, Crowley JJ, Lara PN Jr, McCoy J, Lau DH, Tucker RW, Mills GM, Gandara DR (2005) Phase III trial of paclitaxel plus carboplatin with or without tirapazamine in advanced non-small-cell lung cancer: Southwest Oncology Group Trial S0003. *J Clin Oncol.* 23(36):9097-104.
- Yamamoto A, Taki T, Yagi H, Habu T, Yoshida K, Yoshimura Y, Yamamoto K, Matsushiro A, Nishimune Y, Morita T (1996) Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells. *Mol Gen Genet.* 251:1-12.
- Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA (2003) A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med.* 349(5):427-34.
- Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shiota T, Hatori M, Shintani S (2008) Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol.* 45(2):109-15. Epub 2008 Aug 16.
- Zweifel M, Rüegg C (2006) Tumorigenese-Hemmung in der onkologischen Therapie. Heutiger Stand und offene Fragen. *Onkologie* 2/2006: Seite 32-36.

8 DANKSAGUNG

Vornehmlich möchte ich mich bei PD. Dr. Kerstin Borgmann für die hervorragende Betreuung bedanken. Ihre stets konstruktive Kritik und die Faszination für die Wissenschaft waren für mich ein großes Glück.

Frau Prof. Dr. med. Cordula Petersen und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Strahlentherapie und Radioonkologie anfertigen zu können.

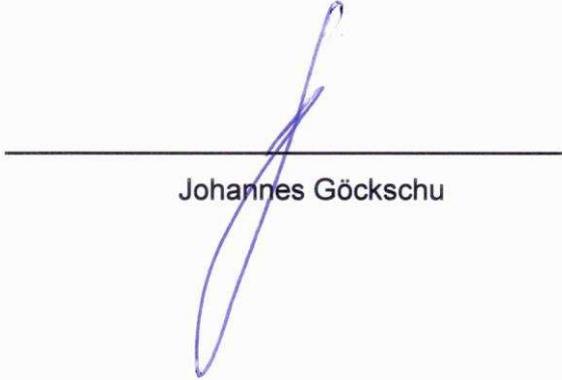
Ich danke Frau Britta Riepen für die freundliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft, Frau Alexandra Zielinski und Frau Agnieszka Wrona für die immer zuvorkommende und hilfsbereite Begleitung meiner Experimente. Frau Jutta Schäfer danke ich ebenso für die Einführung in die Welt des Western Blots sowie einer ewigen und geduldigen Suche nach verschollenen Proben in den riesigen Tiefkühltruhen.

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 24.06.2010



Johannes Göckschu