

**Die Bedeutung des Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in  
Tumorzellen für die strahlentherapeutische Behandlung  
maligner Tumore.**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

**Dr. rer. nat.**

der Fakultät für Biologie  
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Evgenija Mersch

aus Armawir, Russland

April 2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2012 bis März 2015 im Arbeitskreis von Prof. Dr. med. Eric Metzen am Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 01.07.2015

Gutachter: Prof. Dr. med. Eric Metzen  
Prof. Dr. George Iliakis

Vorsitzender: Prof. Dr. Verena Jendrossek

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1 HYPOXIE</b>	<b>6</b>
<b>1.2 DER HYPOXIE-INDUZIERBARE TRANSKRIPTIONSFAKTOR HIF-1<math>\alpha</math></b>	<b>7</b>
1.2.1 STRUKTURELLER AUFBAU UND REGULATION VON HIF-1 $\alpha$	7
1.2.2 FUNKTION VON HIF-1 $\alpha$	9
1.2.3 DIE ROLLE VON HIF-1 $\alpha$ BEI TUMORERKRANKUNGEN	11
<b>1.3 WIRKMECHANISMEN DER RADIOTHERAPIE</b>	<b>12</b>
1.3.1 PHYSIKALISCHE MECHANISMEN UND ZELLULÄRE WIRKUNGSWEISE	12
1.3.2 BIOLOGISCHE MECHANISMEN UND STRAHLENRESISTENZ	14
1.3.3 DIE ROLLE VON HIF-1 $\alpha$ FÜR DIE STRAHLENTHERAPIE	15
<b>2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
<b>3.1 MATERIALIEN</b>	<b>18</b>
3.1.1 CHEMIKALIEN	18
3.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	18
3.1.3 GERÄTE	18
3.1.4 PUFFER UND LÖSUNGEN	19
3.1.5 ANTIKÖRPER	21
3.1.6 KOMMERZIELLE KITS	22
3.1.7 PLASMIDE, sh-RNA SEQUENZEN UND EINGESETZTE qPCR UND PCR-PRIMER	23
3.1.8 EINGESETZTE ZELLINIEN UND URSPRUNG DER ZELLKULTUREN	24
<b>3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>25</b>
3.2.1 ISOLIERUNG VON RNA AUS ZELLEN UND GEWEBE	25
3.2.2 REVERSE TRANSKRIPTION ZUR HERSTELLUNG DER cDNA	25
3.2.3 AMPLIFIZIERUNG UND AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN	26
3.2.6 QUANTITATIVE REALTIME-PCR	26
<b>3.3 BIOCHEMISCHE METHODEN</b>	<b>27</b>
3.3.1 HERSTELLUNG VON PROTEINLYSATEN	27
3.3.2 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	28
3.3.3 SODIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE)	28
3.3.4 WESTERN BLOT	28
3.3.6 IMMUNHISTOCHEMIE	29
<b>3.4 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>30</b>
3.4.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN	30
3.4.2 KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN	31
3.4.3 TRANSFEKTION VON ZELLEN	31
3.4.4 PRODUKTION VON LENTIVIREN IN HEK293T ZELLEN	32
3.4.5 TRANSDUKTION VON ZELLEN MIT LENTIVIREN	32
3.4.6 BESTRAHLUNG UND HYPOXISCHE BEHANDLUNG VON ZELLKULTUREN	33
3.4.7 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG DER APOPTOSE (FACS)	33
3.4.8 ZELLZYKLUS ANALYSE	33

3.4.8 PROLIFERATIONS ASSAY (WST-1)	34
3.4.9 KLONOGENER ASSAY	34
3.4.10 PO <sub>2</sub> -MESSUNG	35
3.4.11 IMMUNFLUORESCENZ-53BP1 FOCI FÄRBUNG AN ZELLEN	35
3.4.12 ALKALISCHER COMET ASSAY	36
<b>3.5 TIEREXPERIMENTELLE METHODEN</b>	<b>37</b>
3.5.1 TIERHALTUNG	37
3.5.2 SUBKUTANE INJEKTION VON TUMORZELLEN UND BEHANDLUNG MIT DOXYCYCLIN	37
3.5.3 BESTIMMUNG DES TUMORWACHSTUMS	38
3.5.4 BESTRAHLUNG VON TIEREN	38
3.5.5 GEWEBEENTNAHME UND –VERARBEITUNG	40
3.5.6 STATISTIK	41
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>
<hr/>	
<b>4.1 ETABLIERUNG DER INDUZIERBAREN HIF-1<math>\alpha</math>-INAKTIVIERUNG IN MURINEN LLC-ZELLEN</b>	<b>42</b>
<b>4.2 HIF-1<math>\alpha</math>-INHIBITION FÜHRT ZU EINER RADIOSENSITIVIERUNG VON TUMORZELLEN</b>	<b>45</b>
4.2.1 HIF-1 $\alpha$ -EINFLUSS AUF DIE ZELLVITALITÄT NACH BESTRAHLUNG	45
4.2.2 EINFLUSS VON HIF-1 $\alpha$ AUF DIE APOPTOTISCHE ANTWORT NACH BESTRAHLUNG	48
4.2.3 HIF-1 $\alpha$ -INHIBITION FÜHRT ZU G <sub>2</sub> ARREST UND BEEINFLUSST DIE KLONOGENITÄT DER TUMORZELLEN NEGATIV	50
4.3 HIF-1 $\alpha$ -ABHÄNGIGE VERZÖGERUNG DER REPARATURPROZESSE VON DOPPELSTANGBRÜCHEN (DSB) NACH BESTRAHLUNG	53
<b>4.4 ETABLIERUNG DES HIF-1<math>\alpha</math>-INAKTIVIERUNG-SYSTEMS IN VIVO.</b>	<b>58</b>
<b>4.5 HIF-1<math>\alpha</math>-ABHÄNGIGE STRAHLENSENSITIVITÄT IN VIVO.</b>	<b>69</b>
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>75</b>
<hr/>	
<b>5.1 DIE AUSWIRKUNGEN DER HIF-1<math>\alpha</math>-INAKTIVIERUNG AUF DIE STRAHLENSENSITIVITÄT VON TUMORZELLEN</b>	<b>75</b>
5.1.1 EINFLUSS DER HIF-1 $\alpha$ INAKTIVIERUNG AUF DIE ZELLPROLIFERATION INFOLGE DER BESTRAHLUNG	76
5.1.2 HIF-1 $\alpha$ : PRO- ODER ANTI-APOPTOTISCH?	77
5.1.3 HIF-1 $\alpha$ UND DIE ZELLZYKLUS-REGULATION	78
<b>5.2 DIE BEDEUTUNG VON HIF-1<math>\alpha</math> BEI DEN ZELLULÄREN REPARATURPROZESSEN VON DOPPELSTRANGBRÜCHEN</b>	<b>80</b>
<b>5.3 HIF-1<math>\alpha</math>-VERMITTELTE STRAHLENSENSITIVITÄT IN VIVO.</b>	<b>83</b>
5.3.2 DARSTELLUNG DER HIF-VERMITTELTEN RADIOSENSITIVIERUNG VON TUMOREN ANHAND EINES KONSTITUTIVEN HIF-1 $\alpha$ - INAKTIVIERUNGS-SYSTEMS	85
<b>5.4 RESÜMEE UND PROBLEMDISKUSSION</b>	<b>89</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>92</b>
<hr/>	
<b>7. SUMMARY</b>	<b>93</b>

<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>94</b>
<b>9. ANHANG</b>	<b>105</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>109</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>
<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>112</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>113</b>
<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>115</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>116</b>

# 1. Einleitung

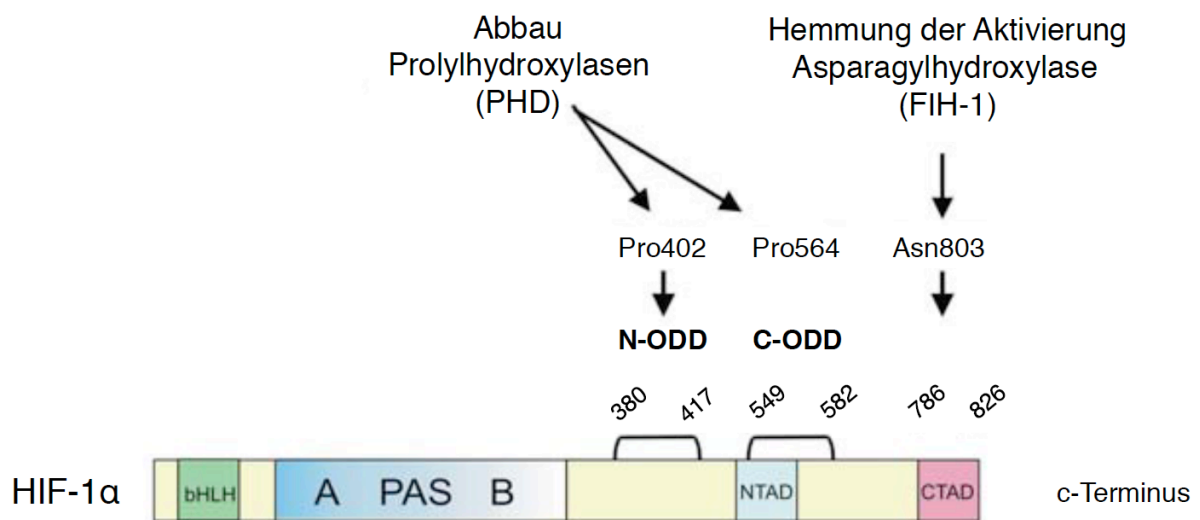
## 1.1 Hypoxie

Sauerstoff ( $O_2$ ) ist ein chemisches Element, das für fast alle Tier- und die meisten Pflanzenarten zur Gewinnung von Energie in Form von Adenosintri-phosphat (ATP) über den Prozess der oxidativen Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette der Zelle essentiell ist (Kaelin und Ratcliffe, 2008). In höheren Tierarten und im menschlichen Organismus sorgen das kardiovaskuläre und das respiratorische System für die Aufrechterhaltung eines Sauerstoffpartialdrucks ( $pO_2$ ) des arteriellen Blutes im Bereich 75-95 mmHg. Dies ist Voraussetzung für eine ausreichende Versorgung von Gewebe mit Sauerstoff. Die Verfügbarkeit von Sauerstoff kann jedoch infolge vieler physiologischer und pathophysiologischer Faktoren und Erkrankungen wie z.B. Herzinsuffizienz, Thrombose, Embolie, Gefäßverengungen, respiratorische oder pulmonale Erkrankungen beeinflusst sein, wobei es zu einer Mangelversorgung kommt (Weiss, 2004). Der Zustand einer Mangelversorgung von Gewebe mit  $O_2$  wird als Hypoxie bezeichnet. Je nach Ausmaß des hypoxischen Bereiches kann dies zu einer vitalen Bedrohung für den gesamten Organismus führen (Maltepe und Saugstad, 2009). Aus diesem Grund wird die Sauerstoffversorgung von Gewebe und Organsystemen kontinuierlich überwacht und reguliert. Eine zentrale Bedeutung bei der zellulären Anpassung an Sauerstoffmangel kommt den Transkriptionsfaktoren zu (Cummins und Taylor, 2005). Diese sind in der Lage schnelle phänotypische Veränderungen zu gewährleisten. Einer der bedeutendsten und bestuntersuchten Transkriptionsfaktoren ist HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$* ) (Semenza, 2007).

## 1.2 Der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$

### 1.2.1 Struktureller Aufbau und Regulation von HIF-1 $\alpha$

Der Transkriptionsfaktor HIF ist ein Heterodimer, bestehend aus einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit (auch ARNT, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) und einer sauerstoffregulierten  $\alpha$ -Untereinheit: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  (auch *Endothelial PAS domain protein 1* EPAS1) oder HIF-3 $\alpha$  (Loboda *et al.*, 2010, Gu *et al.*, 1998). Im Weiteren werden die Struktur und die Regulation am Beispiel von HIF-1 $\alpha$  dargestellt (s. Abb. 1).



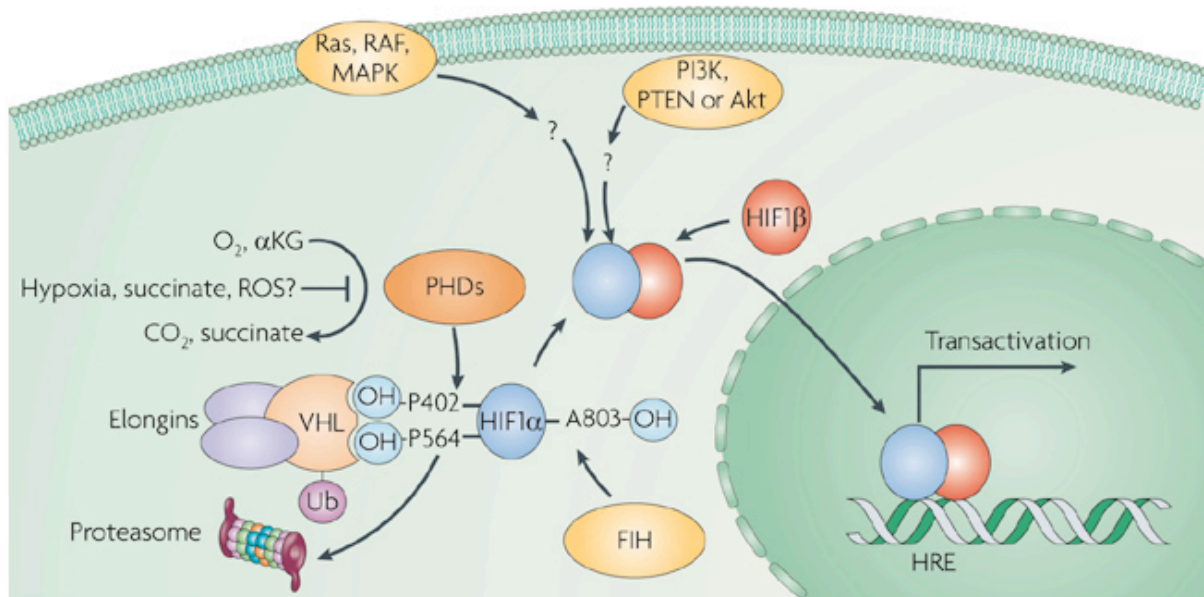
**Abbildung 1: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus und der Regulation von HIF-1 $\alpha$ .** Unter hohem  $pO_2$  erfolgen der Abbau (Prolylhydroxylasen, PHDs) wie auch die Hemmung der Aktivierung (Asparagylhydroxylase, FIH-1) durch posttranslationale Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$ . Schematische Darstellung der regulatorischen Abschnitte der HIF- $\alpha$  Isoform. Abkürzungen: N- und C-terminale transaktivierende Domäne (NTAD bzw. CTAD), N- und C-terminale *oxygen dependent degradation domain* (N-ODD bzw. C-ODD) (aus Fandrey, 2007).

An den aminoterminalen Enden der Untereinheiten ist die *basic helix-loop-helix* (*bHLH*)-Domäne lokalisiert, die eine Bindung an die DNA erlaubt. Eine weitere aminoterminal PER-ARNT-SIM (PAS)-Domäne ermöglicht die Dimerisierung der  $\alpha$ -

und  $\beta$ -Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist dabei spezifisch für HIF, wohingegen die  $\beta$ -Untereinheit auch mit weiteren Transkriptionsfaktoren der bHLH-PAS-Familie dimerisieren kann (Wang und Semenza, 1995). Für die Aktivierung der Zielgene rekrutieren HIF-Dimere durch zwei Transaktivierungsdomänen (TAD) weitere Kofaktoren, wie z.B.: CBP/p300. Die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 $\alpha$  wird sauerstoffabhängig durch das Enzym FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*) reguliert. FIH hydroxyliert den Asparagylrest N803 in der carboxyterminalen TAD (C-TAD) von HIF-1 $\alpha$ , wodurch die Interaktion mit dem Kofaktor-Komplex CBP/p300 verhindert wird (Makino *et al.*, 2001).

Die Proteinstabilität der  $\alpha$ -Untereinheit, die biologische Funktionalität hat, wird sauerstoffabhängig über die *oxygen-dependent degradation domain* (ODD) reguliert. Unter Normoxie wird HIF-1 $\alpha$  durch Prolylhydroxylasen (PHD's) an zwei spezifischen Prolylresten (P402 und P564) innerhalb der ODD hydroxyliert (Kaelin und Ratcliffe, 2008; Metzzen *et al.*, 2003; Epstein *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Die Aktivität der PHDs wird dabei durch die Verfügbarkeit von Eisenionen, Vitamin C und  $\alpha$ -Ketoglutarat limitiert. Nach Hydroxylierung kann die HIF- $\alpha$ -Untereinheit durch das Tumorsuppressor-Protein von-Hippel-Lindau (pVHL) erkannt, ubiquitinyliert und im 26S-Proteasomkomplex degradiert werden (Ohh *et al.*, 2000; Maxwell *et al.*, 1999). Unter hypoxischen Bedingungen führt die Hemmung der Degradationsmaschinerie zur einer verstärkten Akkumulation und Translokation von HIF-1 $\alpha$  in den Zellkern. Dort resultiert die Heterodimerisierung mit HIF-1 $\beta$  über die Interaktion mit Kofaktoren in einer Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  spezifischen Zielgenen (Semenza *et al.*, 2001). Diese erfolgt durch die Bindung des HIF-Komplexes an die Sequenz 5'-ACGTG-3' im HRE (*hypoxia responsible element*)-Bereich der Promotor- und Enhancerregion des jeweiligen Zielgens (Semenza, 2003). Darüber hinaus kann HIF-1 $\alpha$ , wie in Abbildung 2 dargestellt, auch sauerstoffunabhängig durch Wachstumsfaktoren wie Zytokine (*EGF* oder *IGF*) oder bei Tumorerkrankungen durch Aktivierung von Onkogenen vermehrt gebildet werden oder durch Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *VHL* und *PTEN* stabilisiert werden (Hao *et al.*, 2008). Eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  durch ROS (*reactive oxygen species*) nach Bestrahlung wurde in Normoxie ebenfalls diskutiert (Chandel und Schumacker, 2000).



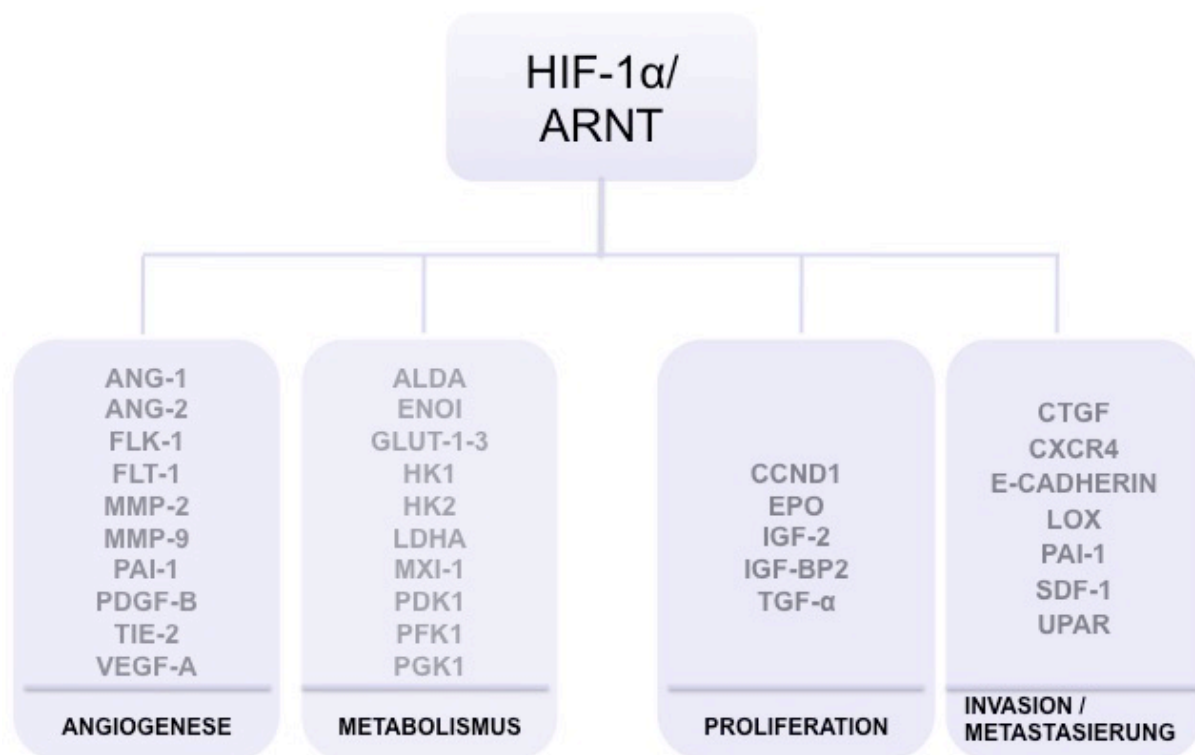


**Abbildung 2: Regulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1α unter Hypoxie und Normoxie.** In Normoxie führt die Aktivität von Prolylhydroxylasen (PHD) zu einer sauerstoffabhängigen Hydroxylierung von HIF-1α. Als Folge davon wird die Ubiquitinierung (Ub) von HIF-1α durch von Hippel-Lindau (pVHL)-Elongin-Komplex vermittelt, was anschließend in einer proteasomalen Degradation von HIF-1α resultiert. Hypoxie oder auch Zwischenstufen des Tricarbonsäurezyklus, wie Succinat, können die Aktivität der PHDs inhibieren und dadurch HIF-1α stabilisieren. Im Zellkern führt die Interaktion des stabilisierten HIF-1α mit HIF-1β sowie weiteren Koaktivatoren zur Bindung von HIF-1α an Hypoxie-responsive Elemente (HRE) und letztlich zur Transaktivierung der HIF-1α-Zielgene. Zudem kann die Aktivierung des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)- oder des PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*)-Signalweges eine sauerstoffunabhängige Induktion von HIF-1α bewirken. αKG, α-Ketoglutarat; ROS, *reactive oxygen species* (aus Denko, 2008).

### 1.2.2 Funktion von HIF-1α

Es wird angenommen, dass HIF-1α in der Kontrolle der Expression von 2–5% des gesamten Genoms beteiligt ist (Manalo *et al.*, 2005). Dadurch kann eine rapide phänotypische Adaptation an Hypoxie gewährleistet werden. Die bisher eindeutig identifizierten HIF-1α Zielgene lassen sich in zwei Gruppen einordnen: 1. Gene, deren Produkte durch Steigerung der anaeroben Glykolyse ATP bereitstellen. Hierzu zählen u.a. die Glukose-Transporter (*GLUT-1*, *GLUT-3*, Laktatdehydrogenase A (*LDHA*), Phosphoglyzerat-Kinase (*PGK-1*) (Iyer *et al.*, 1998). 2. Gene, deren Produkte die Gewebeoxygenierung durch gesteigerte Gefäßneubildung, Gefäßweitstellung wie *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und *bFGF* (*Basic Fibroblast Growth Factor*), oder Erhöhung der O<sub>2</sub>-Kapazität des Blutes durch

Erythrozyten-Produktion (Erythropoietin/*EPO*) und einen verbesserten Eisenionentransport durch Transferrin gewährleisten (Fandrey, 2004). Weitere HIF-Zielgene sind zudem die proliferationsfördernden Wachstumsfaktoren (*Insulin Like Growth Factor (IGF-2)*, *Transforming Growth Factor (TGF- $\alpha/\beta$ )*, *Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)*, pH-Wert regulierende Karboanhydrase-IX (*CA-IX*) sowie weitere Transkriptionsfaktoren (Rankin und Giaccia, 2008; Wenger *et al.*, 2005; Vaupel *et al.*, 2004). HIF-1 $\alpha$  reguliert allerdings nicht nur die physiologische Adaptation an Hypoxie, sondern ist auch in zentraler Weise an einer Vielzahl pathophysiologischer Prozesse beteiligt. Zu nennen sind: Entzündungsprozesse, Ischämie und Tumorigenese (Harris, 2002). Besonders bei der Tumorigenese fördert HIF-1 $\alpha$  die Aktivierung des Chemokinrezeptors CXCR4, der Matrixmetalloproteinase-2 und der Lysyloxidase, die zu einer verstärkten Invasion und Metastasierung beitragen (Cabuk *et al.*, 2007; Mizokami *et al.*, 2006). Eine Auswahl von HIF-Zielgenen ist in Abbildung 3 zusammengestellt.



**Abbildung 3: HIF-1 regulierte Genexpression** (modifiziert nach Rankin und Giaccia, 2008).

### 1.2.3 Die Rolle von HIF-1 $\alpha$ bei Tumorerkrankungen

Hypoxie ist ein Charakteristikum vieler solider Tumorarten und korreliert mit einer schlechten Prognose bzw. Behandelbarkeit des Tumors und verminderter Überlebensdauer des Patienten (Osinsky *et al.*, 2009; Hockel und Vaupel, 2001).

Durch die rapide und abnorme Proliferation der Tumor-Zellen und aufgrund einer inadäquaten Gefäßneubildung kommt es in Tumoren schon bei einer Größe von  $> 1 \text{ mm}^3$  zu einer mangelhaften Nähr- und Sauerstoffversorgung. Es entstehen vermehrt hypoxische Areale (Vaupel *et al.*, 2004). Die initiale Antwort kann auf zellulärer Ebene in der Hemmung der Zellproliferation sowie der Einleitung der Apoptose bestehen. Es kommt aufgrund dessen zu einem erhöhten Selektionsdruck, der das Entstehen Hypoxie-adaptierter Subpopulationen fördert, die trotz des hypoxischen Mikromilieus zu einem Fortschreiten der Erkrankung führen können (Liao *et al.*, 2007; Brown, 2000). Die Anpassung an die intratumorale Hypoxie wird durch Stabilisierung und Überexpression von HIF-1 $\alpha$  erreicht. Die HIF-1 $\alpha$ -Expression induziert die Sekretion proangiogener Faktoren wie VEGF, die eine tumorinduzierte Angiogenese bewirken, sowie zu vermehrter Sekretion von Wachstumsfaktoren, die ein autonomes Zellwachstum und Inhibition der Apoptose fördern. HIF-1 $\alpha$  trägt dadurch zur Tumorprogression bei (Vaupel und Harrison, 2004).

Eine gesteigerte HIF-1 $\alpha$ -Expression in Geweben ist assoziiert mit Chemo- und Radioresistenz, genetischer Instabilität, maligner Progression, verstärkter Invasion und Metastasierung, Ausbildung eines aggressiven Phänotyps sowie verminderter Therapierbarkeit (Generali *et al.*, 2009; Aebbersold *et al.*, 2001; Hockel und Vaupel, 2001; Brown *et al.*, 2006). In Hypoxie-adaptierten Subpopulationen kommt es zu einer genetischen Instabilität, d.h. es treten vermehrt Mutationen auf, die im Verlauf des Zellzyklus an Tochterzellen weitergegeben werden. Als Folge dessen setzt eine klonale Selektion ein, die eine maligne Progression bzw. das Wachstum und die Metastasierung bereits bestehender Tumoren fördern kann (Vaupel, 2004).

## **1.3 Wirkmechanismen der Radiotherapie**

### **1.3.1 Physikalische Mechanismen und zelluläre Wirkungsweise**

Radiotherapie zählt neben Chemotherapie und Resektion zu den klassischen "drei Pfeilern" der Krebstherapie. Je nach Form der Behandlung werden Teilchen oder Strahlen unterschiedlicher Wellenlänge zur therapeutischen oder palliativen Bestrahlung verwendet. Die Strahlendosis wird in Gray (Gy) gemessen. Als Dosis bezeichnet man die durch ionisierende Strahlung pro Masse eingestrahelte Energie ( $[D] = J / kg = 1 \text{ Gy}$ ). Abhängig von dem Tumorgrading werden in den heutigen Bestrahlungsregimen Herddosen von 30-80 Gy appliziert. Die tägliche Gesamtdosis wird jedoch auf kleine Einzeldosen von 1,8–2,5 Gy (Fraktionierung) verteilt, damit die maximal tolerierte Gesamtdosis des Normalgewebes von ca. 10 Gy nicht überschritten wird. Je nach Art und Lokalisation des Gewebes wählt man zwischen Strahlenarten bestehend aus Photonen, Elektronen, Protonen oder Neutronen (Hall and Giaccia, 2011). Zur Untersuchung von Zellkulturmodellen werden meist Röntgenstrahlen (Photonen), die durch eine Röntgenröhre erzeugt werden, verwendet.

Der direkte Wirkmechanismus beruht auf der Energieabsorption durch Ionisation im biologischen Molekül selbst, wodurch in der DNA Strangbrüche, Basenschäden und DNA-Protein-Vernetzungen entstehen. Für die meisten Schäden an Biomolekülen ist jedoch eine indirekte Wirkung, infolge der Radiolyse des Wassers und der Ionisierung des Sauerstoffs, verantwortlich. Hierbei kommt es zur Bildung freier (Hydroxyl-) Radikale und von Peroxiden, die die DNA schädigen (Riley, 1994). Schon Anfang des 20. Jahrhunderts wurde beschrieben, dass hypoxische Tumorzellen besonders resistent gegenüber einer Radiotherapie sind. Später wurde dieses Phänomen als „Sauerstoffeffekt“ definiert. Dieser besagt, dass die Dosis, die benötigt wird um hypoxische Zellen zu töten, 2-3-mal so hoch im Vergleich zu der letalen Dosis bei oxischen Zellen ist (Harrison *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 1953). Dieser Zusammenhang wird auch mithilfe des Sauerstoffverstärkungsfaktors (*Oxygen Enhancement Ratio*,  $OER = \text{Strahlendosis unter anoxischen Bedingungen} / \text{Strahlendosis unter oxischen Bedingungen}$ ) ausgedrückt. Ursache ist das hoch

positive Redoxpotential des molekularen Sauerstoffs, das es ihm ermöglicht, schnell und irreversibel Reaktionen mit anderen (Bio-)Molekülen einzugehen. Auf diese Weise kann Sauerstoff auch mit den gebrochenen Enden der DNA reagieren und stabile organische Peroxide erzeugen (Katz *et al.*, 2009).

Als Reaktion auf die Beschädigung der DNA kann sich eine Zelle zwischen zwei Hauptstrategien entscheiden, nämlich 1) Programmierter Zelltod, d.h. Apoptose (bei hohen Dosen auch Nekrose und bei manchen Zelltypen wie z.B. Fibroblasten auch Seneszenz), 2) Zellzyklus-Arrest und Reparatur. Strahleninduzierte DNA-Schäden können in Reparatur-kompetenten Zellen innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden repariert werden (Belka, 2006). Basenschäden und Einzelstrangbrüche werden durch Excisionsreparatur-Mechanismen (u. a. Basenexcisionsreparatur (BER), Nukleotidexcisionsreparatur (NER) und Mismatch-Reparatur (MMR)) fehlerfrei innerhalb von wenigen Minuten repariert. Für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen stehen im Allgemeinen zwei Hauptreparaturmechanismen zur Verfügung: Die Nicht-Homologe Verbindung von DNA-Enden (*non-homologous end joining*, NHEJ) führt eine einfache End-zu-End Verknüpfung der Bruchenden durch; es ist somit schnell, jedoch nicht fehlerfrei und kann zum Verlust einiger Basenpaare (Mikrodeletionen) führen. Sie findet im gesamten Zellzyklus, bevorzugt jedoch in der G0/G1-Phase und in der frühen S-Phase des Zellzyklus statt. Die Homologe Rekombination (HR) führt eine fehlerfreie Reparatur mittels rekombinatorischer Prozesse, und zwar mithilfe des homologen Schwesterchromatids durch. Sie findet deshalb erst in der späteren S-Phase oder in der G2-Phase des Zellzyklus statt. Gesunde, ausdifferenzierte Zellen sind in der Lage, DNA-Reparaturmechanismen, den sogenannten „DNA *damage response*“ (DDR) einzuschalten (s. Abb. 17) (Martin *et al.*, 2010; Ljungman, 2010). Als wichtige Transduktoren dieser Reaktion sind die Kinasen ATM (*ataxia teleangiectasia-mutated*) und ATR (*ATM- and Rad3-related*) zu nennen (Li *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate ist die Fähigkeit von malignen Zellen, DNA-Schäden zu reparieren, eingeschränkt. Fehlerhafte DNA-Reparatur führt primär zu Mutationen oder strukturellen Chromosomenaberrationen. Die verbleibenden Schäden in der DNA werden dann bei Teilung weitergegeben, was zum Phänomen der genetischen Instabilität führt.

### 1.3.2 Biologische Mechanismen und Strahlenresistenz

Shrieve und Harris vermuteten bereits 1985, dass die Strahlenresistenz in Hypoxie nicht nur durch physikalisch-chemische Effekte (Sauerstoffeffekt) verursacht wird, sondern zusätzlich die biologischen Mechanismen eine enorm wichtige Rolle spielen (Shrieve und Harris, 1985). HIF-1 $\alpha$  ist als der zentrale Transkriptionsfaktor in hypoxischen Zellen für die Regulation wichtiger Proteine, die eine Strahlenresistenz vermitteln können, wie zum Beispiel Survivin, verantwortlich (Moeller *et al.*, 2007; Sah *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2004).

Aufgrund des Absterbens von sauerstoffverbrauchenden Tumorzellen kommt es bereits kurze Zeit nach Bestrahlung zu einer teilweisen Reoxygenierung, da die absterbenden Zellen keinen Sauerstoff verbrauchen und Platz freigeben. Die plötzliche Reoxygenierung führt jedoch nicht, wie zu vermuten wäre, zu einer überwiegenden Abnahme von HIF-1 $\alpha$ . Paradoxerweise steigen HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel 24 h nach einer Bestrahlung in Normoxie an (Dewhirst *et al.*, 2009). Als mögliche Erklärung dafür wurde die Depolymerisierung von „Stress-Granula“ diskutiert. In diesen Gebilden werden mRNA und ribosomale Untereinheiten von wichtigen Proteinen für den Fall einer Stresssituation gespeichert. Sobald eine Stress-Situation eintritt, depolymerisieren diese Granula und geben den Inhalt frei. In Hypoxie werden solche Stress-Granula auch generiert, die dann nach Bestrahlung während der resultierenden Reoxygenierung zerfallen und so die Translation HIF-assoziiierter Proteine steigern (Moeller *et al.*, 2004). Die erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Expression wirkt als Stimulus für die vermehrte Sekretion von VEGF, wodurch eine schnelle Ausbildung eines neuen Gefäßnetzwerks gewährleistet wird. Die Qualität dieser Gefäße ist jedoch unzureichend, sodass es zu Rupturen und Durchlässigkeit kommt. Aus diesem Grund entstehen wiederum vermehrt intratumorale hypoxische Bereiche, die die Strahlenresistenz des Tumors im Falle einer weiteren Bestrahlung erhöhen. In diesem Zusammenhang haben Gorski *et al.* gezeigt, dass die erhöhten Level an VEGF nach Bestrahlung zu einer verstärkten Resistenz von Endothelzellen führen, die eine zusätzliche Strahlenresistenz vermitteln (Gorski *et al.*, 1999). Weiterhin führt die exzessive Anhäufung freier Radikale nach Bestrahlung zur Hochregulation von HIF sowie zur Schädigung von Gefäßen (Dewhirst *et al.*, 2007). Ebenfalls

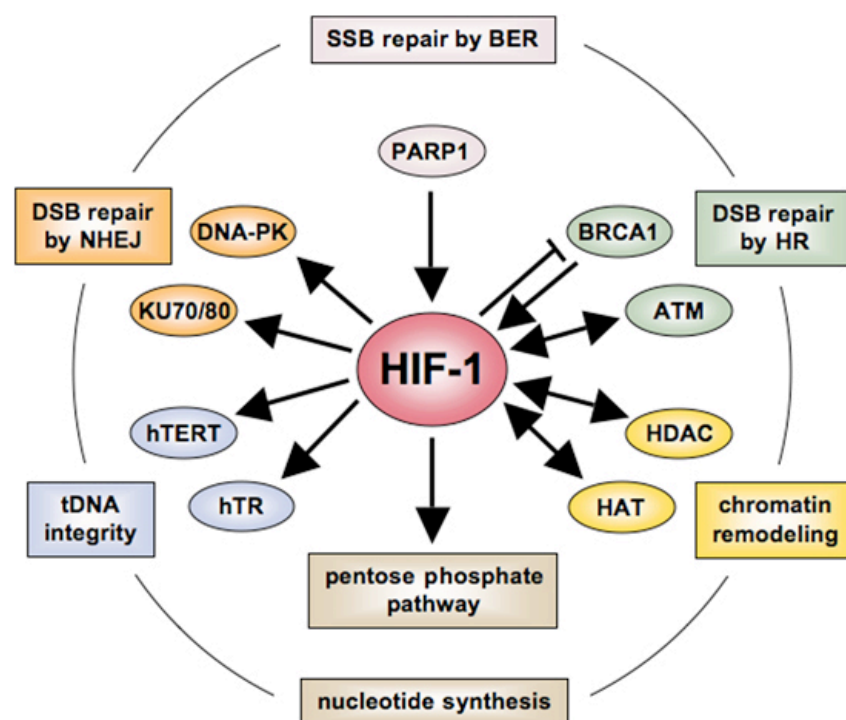
entstehende reaktive Stickstoff-Spezies inhibieren zelluläre Mechanismen wie die Aktivität der HIF-Prolylhydroxylasen, die normalerweise zum Abbau von HIF unter Normoxie führen (Metzen *et al.*, 2003). Die Überexpression und Aktivierung von Onkogenen wie *EGF* (*epidermal growth factor*) (Schmidt-Ullrich, 2003) und *Ras* (Gupta *et al.*, 2001), oder die Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens *PTEN* (Kao *et al.*, 2007) ist ein zentrales Merkmal vieler solider Tumore. Diese Mutationen führen zur Aktivierung des PI3K-Akt-mTOR Signaltransduktionswegs, der Proliferation, Wachstum und Überleben unter anderem dadurch fördert, dass er auch sauerstoffunabhängig HIF-1 $\alpha$  induziert (Harada *et al.*, 2009).

### 1.3.3 Die Rolle von HIF-1 $\alpha$ für die Strahlentherapie

Für HIF-1 $\alpha$  wird in der Literatur ein divergierender Einfluss auf die Strahlensensitivität von Tumoren beschrieben (Moeller und Dewhirst, 2006). Eine Vielzahl von *in vitro* Studien belegen eine Verminderung der Radioresistenz nach HIF-Aktivierung (Moeller *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2005; Brown, 2000). In *in vivo* Studien mit Tumor-Xenograft waren Tumor-Zellen, die kein funktionelles HIF-1 $\alpha$  besitzen, radiosensitiver als die entsprechenden HIF-1 $\alpha$  exprimierenden Zellen (Unruh *et al.*, 2003). Zudem führten Ansätze einer Inhibition von HIF-1 $\alpha$  bzw. VEGF in vorklinischen Studien zur einer Radiosensitivierung der Tumor-Blutgefäße (Gorski *et al.*, 1999). Andererseits wurden einige HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Effekte auch als radioprotektiv beschrieben, wie beispielsweise die Unterstützung von Proliferation, Angiogenese und Apoptose durch die Aktivierung von p53 (Moeller *et al.*, 2005). In Tumorregionen mit einer Unterversorgung sowohl an Sauerstoff als auch an Nährstoffen erhält HIF-1 $\alpha$  die Teilungsfähigkeit dieser Zellen. Durch die HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Aktivierung der Glykolyse wird die Verfügbarkeit von ATP für das Überleben der Zellen sichergestellt. In Bereichen, in denen allein ein Sauerstoffmangel vorherrscht, wird vornehmlich eine Zellzyklus-Blockade durch HIF-1 $\alpha$  bewirkt, vermittelt u.a. durch p21 und p27 (Goda *et al.*, 2003). HIF-1 $\alpha$  kann zudem sowohl proapoptotisch als auch antiapoptotisch wirken. In bestrahlten Zellen wurde eine eher proapoptotische Wirkung des Proteins durch Interaktion von HIF-1 $\alpha$  mit

p53 vermutet. HIF-1 $\alpha$ -vermittelt die Phosphorylierung und somit Aktivierung von p53 und dem nachgeschaltet die Apoptose (Moeller *et al.*, 2005).

In den letzten Jahren hat sich mehr und mehr herausgestellt, dass HIF-1 $\alpha$  auch an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) beteiligt ist (Unruh *et al.*, 2003). Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, scheint HIF-1 $\alpha$  mit allen wichtigen Regulatoren des DDR zu interagieren und so in die Mechanismen der DNA-Reparatur einzugreifen, was wiederum in einer erhöhten Chemo- bzw. Radioresistenz der Zellen resultiert (Wirthner *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang wurde eine direkte Interaktion von HIF-1 $\alpha$  mit DNA-PKcs (*DNA-dependent Protein Kinase, Catalytic Subunit*), ATM und BRCA1 beschrieben. Die genaue Rolle von HIF-1 in dem DNA Reparatur-Komplex ist jedoch noch nicht vollständig definiert.



**Abbildung 4: Darstellung der Interaktion von HIF-1 $\alpha$  mit wichtigen DNA-Reparatur-Proteinen.**

Abkürzungen: ATM (*ataxia teleangiectasia-mutated gene*); BER (*base excision repair*); HAT (*histone acetyl transferase*); HDAC (*histone deacetylase*); HR (*homologous recombination*); NHEJ (*non-homologous end joining*); SSB (*single strand break*); DSB (*double strand break*).

(aus Rohwer *et al.*, 2013).



## 2. Zielsetzung der Arbeit

Der Erfolg einer Tumorthherapie ist entscheidend für die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten. Die therapeutische Bestrahlung ist ein wichtiges Instrument zur Behandlung maligner Tumore. Die erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in hypoxischen Tumoren steht in direkter Verbindung mit der Ausbildung von Therapieresistenzen. In einer Vielzahl von klinischen Studien und *in vitro*-Experimenten konnte für HIF-1 $\alpha$  eine zentrale Bedeutung für Wachstum, Progression und insbesondere Strahlenresistenz von soliden Tumoren dargestellt werden. Die hierbei zugrunde liegenden molekularen und zellbiologischen Mechanismen sind dennoch unvollständig verstanden und werden in der Literatur äußerst kontrovers dargestellt. Eine umfassende Analyse der resistenzfördernden Charakteristika von HIF-1 $\alpha$  ist daher das Ziel der vorliegenden Arbeit. Es soll sowohl *in vitro* als auch in einem Maustumormodell untersucht werden, ob die Hemmung dieses Faktors zu einer Verbesserung der Therapierbarkeit von soliden Tumoren führt und so der Erfolg der Strahlentherapie im Rahmen der Behandlung maligner Tumore gesteigert werden kann. Für die detaillierte Analyse sollte zuerst eine stabile, induzierbare Inaktivierung von HIF mittels viral-vermittelter shRNA-Vektoren etabliert werden. Um den HIF-1 $\alpha$  abhängigen Effekt zu charakterisieren, wurde eine murine LLC (*Lewis lung carcinoma*)-Zelllinie verwendet. Die Auswirkungen einer spezifischen HIF-1 $\alpha$ -Inhibition wurden anschließend hinsichtlich des strahleninduzierten Proliferations- und Apoptoseverhaltens *in vitro* untersucht. Darüber hinaus sollte im Besonderen der Einfluss einer HIF-1 $\alpha$ -Inhibition auf die Überlebensrate und das zelluläre Reparaturverhalten bei Doppelstrangbrüchen studiert werden. Die *in vitro* Ergebnisse sollen abschließend *in vivo* in einem Allograft-Tumormodell in Black6-Mäusen, die ein funktionsfähiges Immunsystem aufweisen, verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde mit einem induzierbaren short hairpin-Vektor eine Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  in subkutan applizierten Lewis Lung Carcinoma Zellen herbeigeführt. Die Auswirkungen der Manipulation der HIF-1 $\alpha$ -Expression auf die Radiosensitivität solider Tumore, wurden anhand der Wachstumskinetiken in zwei unterschiedlichen Bestrahlungsmodellen analysiert.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

**Tabelle 1: Verwendete Enzyme und Reagenzien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Antibiotika	Sigma (München)
Matrigel	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Doxycyclin	Ratiopharm (Ulm)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Oligonukleotide	Sigma (München)

#### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien und Geräte, die nicht aufgeführt sind, entsprechen den Laborstandards.

#### 3.1.3 Geräte

**Tabelle 2: Verwendete Geräte und Hersteller**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung und Hersteller</b>
Fluoreszenz- und Chemilumineszenzsystem	Fusion-FX7 (Peqlab)
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse 90i (Nikon)
Konfokales Laserscanning-Mikroskop	LSM780 (Zeiss)
Lichtmikroskop ScanScope®	Aperio (Leica)

Mikrotom	Thermo Scientific
Realttime PCR-Gerät	IQ5 iCycler (Bio-Rad)
Hypoxie-Kammer	Sonderanfertigung (Toepffer Lab System )
Spektrometer	EPOCH (Biotek)
Durchflusszytometer	FACS Canto II (BD)

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer**

1x TAE-Puffer:	40 mM 20 mM 1 mM	Tris (pH 7,4) Essigsäure EDTA
Agarosegel (0,5 bzw. 2%)	2 % 60 ml	Agarose TAE (1 %)
RIPA-Lysepuffer:	50mM 150 mM 1 % (v/v) 0,5 % (w/v) 0,1 % (w/v) 2 mM	Tris HCL (pH 7,4) NaCl NP-40 Natriumdesoxycholat SDS EDTA
SDS-Probenpuffer:	62,5 mM 2 % (w/v) 3 % (v/v) 10 % (v/v) 0,25 mg/ml 25 mM	Tris (pH 7,4) SDS β-Mercaptoethanol Glycerol Bromphenolblau DTT
Trenngel (7,5 %):	7,5 % (w/v) 375 mM 0,1 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,05 (v/v)	Polyacrylamid Tris (pH 8,8) SDS APS TEMED
Sammelgel (5 %):	5 % (w/v) 125 mM 0,1 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,1 (v/v)	Polyacrylamid Tris (pH 8,8) SDS APS TEMED

---

Laufpuffer (SDS-PAGE):	25 mM 0,192 M 0,1 % (w/v)	Tris (pH 7,4) Glycin SDS
Transferpuffer (Western Blot):	25 mM 0,192 M	Tris (pH 7,4) Glycin
TBS:	10 mM 150 mM	Tris (pH 7,4) NaCl
TBS-T	1x 0,1 % (v/v)	TBS Tween 20
PBS:	138 mM 8,1 mM 2,7 mM 1,5 mM	Tris (pH 7,4) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Comet-Lysepuffer (pH 10,5):	2,5 M 10 mM 100 mM 10 M	NaCl Tris EDTA NaOH
Comet-Neutralisationspuffer:	500 mM	Tris-HCl (pH 8)
Comet-Elektrophoresepuffer (pH>13):	300 mM 1 % 1 mM	NaOH DMSO EDTA

---

### 3.1.5 Antikörper

**Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.** IF: Immunfluoreszenz; IHC: Immunhistochemie; WB: Western Blot.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Spezies/Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
mHIF-1 $\alpha$	Kaninchen/Cayman	1:1000 (WB) 1:10000 (IHC)
mHIF-2 $\alpha$	Kaninchen/Novus	1:1000 (WB)
$\beta$ -Actin	Kaninchen/Sigma	1:2000 (WB)
Mab-1	Maus/HPI	1:50 (IHC)
p53	Kaninchen/Bethyl	1:1000 (WB)
pP53-S15	Kaninchen/Cell Signaling	1:1000 (WB)
RAD51	Kaninchen/Calbiochem	1:1000 (WB)
H2AX	Kaninchen/Calbiochem	1:2500 (WB)
$\gamma$ H2AX-ser139	Kaninchen/Abcam	1:5000 (WB)
53BP1	Kaninchen/Novus	1500 (IF)
pKAP1-S894	Kaninchen/Bethyl	1:1000 (WB)

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Antigen/Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege IgG/Invitrogen	1:500 (IF)
anti-Kaninchen (HRP)	Ziege IgG/DAKO	1:100000 (WB)
anti-Maus	Ziege IgG/Life technologies	1:250 (IHC)

### 3.1.6 Kommerzielle Kits

**Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten kommerziellen Kits.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
ECL Advance Western Blotting Detection System	Thermo Fischer Scientific
Avidin/Biotin Blocking Solution	Vector Labs
iScript cDNA Reverse Transcription Kit	BioRad
SYBR <sup>®</sup> Green I qPCR Mastermix	Eurogentec
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche
ChemMate <sup>™</sup> Detection Kit (mouse and rabbit)	Dako

### 3.1.7 Plasmide, sh-RNA Sequenzen und eingesetzte qPCR und PCR-Primer

**Tabelle 6: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Charakteristika/Insert	Referenz
pLKO-Tet-On-shmHIF-1 $\alpha$	Doxycyclin-induzierbarer Expressionsvektor kodierend für murine HIF-1 $\alpha$ shRNA Sequenz	Addgene; #21915
pLKO-Tet-On-shscrambled	Doxycyclin-induzierbares Kontrollplasmid kodierend für unspezifische shRNA Sequenz	Addgene; #21915
pLKO.1-shmHIF-1 $\alpha$	Konstitutiver Expressionsvektor kodierend für murine HIF-1 $\alpha$ shRNA Sequenz	Addgene; #10879
pLKO.1 shscrambled	Kontrollplasmid kodierend für unspezifische shRNA Sequenz	Addgene; #1864
psPAX2	Humaner Expressionsvektor kodierend für lentivirale Hüllproteine	Addgene; #12260
pMD2.G	Humaner Expressionsvektor kodierend für lentivirale Verpackungsproteine	Addgene; #12259
pCMV-sport6-mHIF-2 $\alpha$	Konstitutiver Expressionsvektor kodierend für murine HIF-2 $\alpha$ Sequenz	GenomeCube

**Tabelle 7: Verwendete sh-RNA Sequenzen**

shRNA	Sequenz	Referenz
shHIF-1 $\alpha$	TGGATAGCGATATGGTCAATG homolog zu den Nukleotiden 2030-2050 der mHIF-1 $\alpha$ mRNA (GenBank acc. no. NM_010431)	Sigma (München, Deutschland)

**Tabelle 8: Die zur Amplifikation der entsprechenden Gensequenz eingesetzten murinen Primer**

Gen	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge (bp)
S16 forward	AGATGATCGAGCCGCG	163
S16 reverse	GCTACCAGGGCCTTTGAGATGGA	
TBP forward	GCAGTGCCCAGCATCACTAT	227
TBP reverse	TGCCGTAAGGCATCATTGGA	
HIF-1 $\alpha$ forward	GAATGGCCCAGTGAGAAA	118
HIF-1 $\alpha$ reverse	CTTCCACGTTGCTGACTTGA	
HIF-2 $\alpha$ forward	AGGTCTCGAAAGGACTTCGG	315
HIF-2 $\alpha$ reverse	AATTCATCGGGGGCCATGTT	
PDK1 forward	TGCTACTCAACCAGCACTCC	357
PDK1 revers	CCCCGGTCACTCATCTTCAC	
BNIP3 forward	GCCATTGGCTTGGGGATCTA	156
BNIP3 revers	TGCAAACACCCAAGGACCAT	
VEGF forward	AATGCTTTCTCCGCTCTGAA	143
VEGF revers	GATCATGCGGATCAAACCTC	
Arg1 forward	AACACGGCAGTGGCTTTAACC	116
Arg1 revers	GGTTTTTCATGTGGCGCATTC	
INOS forward	ACATCGACCCGTCCACAG	198
INOS revers	CAGAGGGGTAGGCTTGTCTC	
F4/80 forward	TCTGGGGAGCTTACGATGGA	237
F4/80 revers	GAATCCCGCAATGATGGCAC	

### 3.1.8 Eingesetzte Zelllinien und Ursprung der Zellkulturen

**Tabelle 9: Liste der verwendeten Zelllinien**

Zelllinie	Ursprung	Medium	Selektion (Puromycin)	Quelle
LLC1 (Lewis Lung Carcinoma)	murines Lungen-Karzinom	DMEM high glucose	3 $\mu$ g/ml	ATCC #CRL-1642
HEK293T	humane renale Embryonalzellen	DMEM high glucose	2 $\mu$ g/ml	DSMZ #ACC-635



## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Gewebe**

Die Isolierung von RNA aus den Zellen erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits (50) genau nach den Anweisungen des Herstellers. Die Isolierung aus dem Tumorgewebe erfolgte mit der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode nach Chomczynski & Sacchi (1987). Dafür wurde das entnommene Tumorgewebe in GTC (10 ml pro g Gewebe) homogenisiert und für 30 min bei 14549 x g und 4 °C zentrifugiert. 700 µl des Homogenisats wurden mit 70 µl Natriumacetat (2 M, pH = 4.0) angesäuert und mit 500 µl Phenol sowie 350 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol versetzt. Nach 60minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben erneut für 30 min bei 14549 x g und 4 °C zentrifugiert und die obere Phase (ohne die Interphase zu berühren) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol mindestens über Nacht (max. bis zu einer Woche). Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert für 30 min bei 14549 x g und 4 °C. Das so entstandene RNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, ca. 20 min bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und anschließend in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H<sub>2</sub>O bei 60 °C für 10 min gelöst. Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer (Epoch). Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **3.2.2 Reverse Transkription zur Herstellung der cDNA**

Für die cDNA-Synthese wurde iScript von BioRad verwendet. Pro Ansatz wurde 1 µg RNA eingesetzt mit 2 µl Oligo-dT Primer, 4 µl 5x Reaktionsmix, 1 µl Reverse Transkriptase und RNase freies H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Umschreibung der RNA erfolgte im Thermocycler bei 37 °C für 120 min und 85 °C für 5 min. Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3 Amplifizierung und Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Die PCR-Ansätze wurden dabei in einem Gesamtvolumen von 30  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Ein Standard Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: DNA Template (20  $\text{pg}/\mu\text{l}$  oder 1 ng), Primer (forward and reverse, 1  $\mu\text{M}$  oder 50 pmol), dNTP (200  $\mu\text{M}$ ), DMSO (5% (v/v)) und Taq-Polymerase (0,05 U/ $\mu\text{l}$  oder 1,5 U).  $\text{MgCl}_2$  oder  $\text{MgSO}_4$  Puffer wurden nach der Empfehlung des Polymerase-Herstellers hinzugefügt. Ein exemplarisches PCR-Programm, nach dem die DNA amplifiziert wurde, enthielt folgende Schritte: 1 x (3 min 95 °C); 35 x (30 sec 95 °C; 30 sec 58 °C; 30 sec – 3 min 72 °C); 1 x (10 min 72 °C) und wurde in dem TRIO thermal cycler (Biometra, Göttingen, Germany) durchgeführt. Die entsprechenden Parameter wurden abhängig von der Transkriptlänge angepasst. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1-2%-igen Agarosegelen bei 100 V für 30 min in einem MINI GEL II System (VWR, Darmstadt). Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1xTAE-Puffer aufgekocht und mit 2  $\mu\text{l}$  SYBR Green (Life Technologies, Darmstadt) versetzt. Nach erfolgreicher Auftrennung wurden die Gele mittels Fusion-FX7 Dokumentationssystem von Peqlab (Erlangen, Germany) visualisiert und dokumentiert. Zur Überprüfung der richtigen DNA-Fragmentlänge wurde ein Größenstandard (GeneRuler 100 bp ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet.

### 3.2.6 Quantitative Realtime-PCR

Für den quantitativen Nachweis der Genexpression wurden 2 x 20  $\mu\text{l}$  je Probe als Doppelbestimmung in 96-well-Reaktionsplatten pipettiert. Parallel hierzu wurde zur Berechnung der CT-Werte und der PCR-Effizienz für das entsprechende Gen und das housekeeping Gen eine Standardreihe (1  $\text{pg}/\mu\text{l}$  - 0,1  $\text{fg}/\mu\text{l}$ , Verdünnungsfaktor 1:10) aufgetragen. Die PCR-Reaktion erfolgte anhand der Fluoreszenzmessung des SYBR Green in einem Zwei-Schritt Programm mithilfe des iCycler Detektionssystems von Bio-Rad. Die ermittelten CT-Werte der einzelnen Proben wurden dann entweder auf die CT-Werte des housekeeping Gens *ribosomal protein S16* normalisiert und die

Unterschiede der Genexpression als n-fache Änderung berechnet, oder es wurden die  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ -Werte nach der folgenden Formel:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Zielgen}_{\text{behandelt}} - S16_{\text{behandelt}}) - \Delta Ct(\text{Zielgen}_{\text{kontrolle}} - S16_{\text{kontrolle}})$$

berechnet. Die Spezifität des PCR-Produkts wurde anhand von Schmelzkurven überprüft. Hierfür wurden die Proben in 0,5 °C-Schritten von 50 °C auf 95 °C erhitzt, wobei in jedem Schritt die Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Bei einem reinen Produkt ergibt sich so beim entsprechenden Schmelzpunkt des DNA-Fragments ein einheitlicher Peak.

### **3.3 Biochemische Methoden**

#### **3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten**

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden  $1-2 \times 10^5$  Zellen in 60 mm Zellkulturschälchen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Für die hypoxische Behandlung wurden die Zellen bis zur Lyse unter 1-5% O<sub>2</sub> in der Hypoxiekammer belassen. Die Lyse fand ebenfalls in der Hypoxiekammer statt, dazu wurden alle benutzten Reagenzien vorher für mindestens 1 Stunde in der Kammer äquilibriert. Für den Vorgang der Lyse wurden die Zellen zuerst vorsichtig mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber von dem Schälchenboden abgeschabt, anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 17530 x g 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100-300 µl RIPA-Puffer (1:100 mit Proteinase/Phosphatase Inhibitor versetzt) homogenisiert und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Das Homogenisat wurde anschließend für 3 min bei 17530 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung der Lysate bis zur weiteren Verwendung fand bei -80 °C statt.

### 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt der Zelllysate wurde mit dem BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific bestimmt. Hierfür wurden 25 µl eines BSA-Standards (0,1 - 0,5 mg/ml BSA) bzw. 25 µl der Probe in Doppelbestimmung in 96-well-Reaktionsplatten pipettiert und mit 200 µl des Mixes aus Reagenz A plus Reagenz B (nach Empfehlung des Herstellers) versetzt und für 20 min bei 37° C inkubiert. Die Extinktion wurde anschließend bei 562 nm spektrophotometrisch (EPOCH) gemessen und die Proteinkonzentration der Proben anhand der Steigung der Standardgeraden der Standardreihe berechnet.

### 3.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen fand unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (1970) statt. Dabei wurden 7,5-10%-ige Trenngele sowie 5%-ige Sammelgele verwendet. Alle Proben wurden auf einen Proteingehalt von 10-20 µg normiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Denaturierung erfolgte für 6 min bei 95 °C. Die Proteine wurden bei 120 V für 1 h im Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Überprüfung der richtigen Proteingröße wurde parallel ein farbiger Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) mit aufgetragen.

### 3.3.4 Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen erfolgte auf eine mit Methanol aktivierte PVDF Membran. Der Protein-Transfer wurde hierfür in einer Transferkammer (Bio-Rad) mit Transferpuffer für 1,5 h bei 400 mA und 4 °C durchgeführt. Die unspezifischen Bindestellen wurden nach dem Transfer für 1 h mit 5%-igem Milchpulver in 1x TBS-T bei RT geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in der Regel über Nacht bei 4 °C. Vor der Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran 3-4-mal für 10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Die Detektion von Antigenen erfolgte indirekt über die Reaktion der an

den Zweitantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase mithilfe des ECL-Detektionssystems (Thermo Fischer Scientific). Hierzu wurde die Membran mit 300 µl des ECL-Reagenz für 1 min inkubiert und das Chemolumineszenz-Signal im Fusion FX7-Detektionssystem dokumentiert. Primäre und sekundäre Antikörper wurden in 1xTBS-T verdünnt (s. Tab 4.).

### 3.3.6 Immunhistochemie

Für den Nachweis von Antigenen im Tumorgewebe wurden 3 µm dünne Paraffinschnitte mit einem Mikrotom (Leica) hergestellt. Die Schnitte waren zum Zeitpunkt der Färbung nicht älter als eine Woche.

Vor dem Start der Färbung wurden die Paraffinschnitte zur Hitzefixierung für 15 min bei 50 °C und dann 30 min bei RT abgekühlt. Anschließend erfolgte die Deparaffinierung und Hydratation der Schnitte (2x Xylene für je 5 min; 100%, 70%, 70%, 50% ETOH für je 3 min; VE-H<sub>2</sub>O für 1 min), gefolgt von der Antigen-Demaskierung in „Antigen Unmasking Solution“ (0,1 M Citrat Puffer, pH 6) für 10 min in einem Schnellkochtopf bei 125 °C. Die Schnitte wurden 45 min bei 4 °C abgekühlt. Nach kurzem Waschen unter fließendem Leitungswasser erfolgte über 20 min bei RT das Quenchen der endogenen Peroxidase mit Hilfe einer 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (20 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 180 ml VE-H<sub>2</sub>O). Ab jetzt wurden die Schnitte nach jedem Schritt 2 x 5 min mit TBS gewaschen. Das so fixierte Gewebe wurde nun mit einem Wachsstift umrandet und mit Avidin Blockierungslösung (Avidin/Biotin Kit) für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Biotin für 15 min bei RT. Vor dem nächsten Schritt fand eine zusätzliche Inkubation des Gewebes mit anti-Maus IgG für 2 h bei RT statt. Ein zusätzlicher Blockierungsschritt erfolgte mit dem Block Serum (1:10 Ziegenserum und 3% BSA in TBS-Puffer). Das Gewebe wurde flächig damit bedeckt und für 20 min bei RT inkubiert. Zum Blocken wurde immer Serum von der Spezies benutzt, in der der Zweitantikörper hergestellt wurde. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (Monoklonaler Hypoxyprobe 1 (clone 4.3.11.3) 1:500 mit Antikörper-Diluent verdünnt, oder polyklonaler anti-Maus HIF-1α aus Kaninchen 1:10000 verdünnt) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte gewaschen und mit dem Zweitantikörper (biotinylierter Sekundärantikörper Lösung A

aus dem ChemMate™ Detection Kit) für 30 min bei RT inkubiert, gefolgt vom Waschen in TBS. Da die Aktivität der endogenen Peroxidase gequenchet wurde, war es für die Darstellung der mit Antikörpern markierten Antigene notwendig, den Zweitantikörper mit einer exogenen Peroxidase zu versehen. Dies geschah 30 min lang bei RT mit dem Streptavidin ABC Komplex (Reagenz B), gefolgt von Waschen in TBS. Als Substrat für die exogene Peroxidase diente DAB (3,3'- Diaminobenzidin) aus dem gleichen Kit (für 1 ml: 20 µl DAB Chromogen plus 980 µl „DAB Diluent“). Die Substratreaktion konnte je nach Art des behandelten Gewebes zwischen 30 sec und 5 min betragen. Das Ergebnis wurde in kurzen zeitlichen Abständen unter dem Mikroskop kontrolliert. Das Tumorgewebe wurde 1 min lang mit DAB inkubiert und anschließend 1 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung des Gewebes für 30 sec mit Hämatoxylin-Lösung nach Mayer. Die Farbe-Lösung wurde dann unter laufendem Leitungswasser solange abgespült, bis das ablaufende Wasser klar war. Die Färbung wurde mit der folgenden Reagenzreihe fixiert: 10x Eintauchen in Essigsäure (2 ml Eisessig plus 98 ml VE-H<sub>2</sub>O), gefolgt von 10x Eintauchen in Leitungswasser, 1 min in Bläuungslösung (1,5 ml NH<sub>4</sub>OH plus 98,5 ml 70% ETOH) und erneut 1 min in Leitungswasser. Die fertigen Schnitte wurden mit Aquatex© (Merck) eingedeckelt. Der komplette Objektträger mit zwei Gewebeschnitten wurde mit einem Lichtmikroskop, das mehrere Bildausschnitte zusammensetzen kann (ScanScope, Leica) eingescannt. Über die Software von Leica wurden die Bilder ausgewertet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei RT.

### **3.4 Zellbiologische Methoden**

#### **3.4.1 Kultivierung von Zellen**

Die Kulturen der Mauszelllinien, die in Tabelle 9 aufgeführt sind, wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen im Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> zu einer Dichte von 80-90% Konfluenz angezogen. Dann wurde das Medium (DMEM oder RPMI mit 10% FCS, 1% Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) aus den Kulturflaschen entnommen, und die Zellen kurz mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das

PBS abgesaugt und die Zellen mit 2 ml der Trypsin/EDTA -Lösung ((0,05%) Trypsin/EDTA (0,02%) in PBS) für 3 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde durch Zugabe von 8 ml FCS (Doxycyclin frei) die Trypsin-Aktivität inhibiert. Die Zellen wurden bei 280 x g für 3 min bei RT abzentrifugiert und in 5 ml DMEM oder RPMI resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte im Zellzähler Auto T4 von Peqlab (Erlangen). Anschließend wurden die Zellen in einem Verhältnis 1:4 bzw. je nach Bedarf für *in vitro*- oder *in vivo*-Studien gesplittet und in einer neuen 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät.

### 3.4.2 Kryokonservierung von Zellen

Für eine dauerhafte Lagerung wurden die Zellen entweder bei -80 °C, oder in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen zunächst wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben behandelt und durch Zentrifugation bei 280 x g für 3 min gesammelt. Das Zellpellet wurde anschließend in Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Nach Lagerung der Zellen bei -80 °C für min 24 h wurden die Kryoröhrchen zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff transferiert. Zum Auftauen wurden die Zellen auf Eis langsam erwärmt und zur Verdünnung des DMSO in 10 ml Zellmedium überführt. Nach Zentrifugation bei 280 x g für 3 min wurde das DMSO enthaltende Medium abgesaugt, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt.

### 3.4.3 Transfektion von Zellen

Transiente Transfektionen wurden mit dem HIF-2 $\alpha$  Überexpressionsvektor pCMV-Sport6 mit dem Reagenz „Turbofect“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) in einem Verhältnis von 2:1 ( $\mu$ l Reagenz: $\mu$ g DNA) wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Das Medium mit dem Transfektions-Reagenz wurde nach 5 h durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

### 3.4.4 Produktion von Lentiviren in HEK293T Zellen

Die Produktion von Lentiviren fand in HEK293T Zellen statt.  $7.5-8 \times 10^5$  Zellen wurden hierzu in  $25 \text{ cm}^2$  Flaschen ausgesät. Bei einer Konfluenz von 50-70% wurden die Zellen in einem Verhältnis 3:1 ( $\mu\text{l}$  Reagenz: $\mu\text{g}$  DNA) mit dem Transfektions-Reagenz „GeneJuice“ (Merck, Darmstadt) transfiziert. Dabei wurden gleichzeitig drei unterschiedliche Plasmide transfiziert, die für die Virusproduktion benötigt werden: 6  $\mu\text{g}$  von dem pLKO.1 Vektor für die Produktion der zielgen-spezifischen shRNA, 4  $\mu\text{g}$  von dem Verpackungsplasmid für virale Hüllenproteine „psPAX2“ und 2  $\mu\text{g}$  „pMD2.G“, kodierend für lentivirale Verpackungsproteine. Die so transfizierten Zellen wurden für 48-60 h vermehrt. Anschließend wurde der Überstand mit den infektiösen Virus-Partikeln mit einem Filter der Porengröße  $0,45 \mu\text{m}$  gereinigt. Die Virus-Lösung wurde anschließend entweder direkt auf die Zellen gegeben oder in 2 ml Aliquots bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Transduktion gelagert.

### 3.4.5 Transduktion von Zellen mit Lentiviren

Für die Transduktion wurden zunächst  $2 \times 10^5$  Zellen in eine  $25 \text{ cm}^2$  Zellkultur-Flasche ausgesät. Anschließend wurden  $2 \times 10^6$  Viruseinheiten in 2 ml DMEM direkt auf die Zellen gegeben. Die Adhäsion von Virus-Partikeln wurde zusätzlich durch Zugabe von 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Polybrene (Hexadimethrine Bromide, Sigma Aldrich) unterstützt. Nach einer 24 h Inkubation wurde das virusenthaltende Medium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt und die transduzierten Zellen für mindestens 3 Tage mit Puromycin selektiert. Die adäquaten Konzentrationen an Puromycin wurden vorher für jede einzelne Zelllinie durch eine Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt und sind in Tabelle 9 aufgeführt. Nach der Selektion wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, ohne Selektionsdruck kultiviert. Das Vorhandensein und die Stabilität der transienten Inaktivierung des Zielproteins wurden regelmäßig, parallel zu den Experimenten, durch Western Blot (Kap. 3.3.4) nachgewiesen.



### **3.4.6 Bestrahlung und hypoxische Behandlung von Zellkulturen**

Für die Bestrahlungsexperimente wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 50-60% kultiviert. Vor der Bestrahlung wurde das Zellkulturmedium durch frisches Medium ersetzt. Alle Bestrahlungsexperimente wurden an der Isovolt 320 (Pantak-Seifert, East Heaven, Connecticut, USA) X-ray Quelle ausgeführt. Die effektive Photonenenergie betrug dabei ca. 90 kV mit einer Dosis-Rate von 2.76 Gy/min. Alle Hypoxie-Behandlungen wurden in der Hypoxiekammer von Toepffer Lab System entsprechend dem experimentellen Design bei 1-5% O<sub>2</sub> durchgeführt. Die Zellen wurden dabei nur mit vorher äquilibrierten Lösungen behandelt und in der Hypoxiekammer lysiert. Für die Bestrahlung von hypoxischen Zellen wurden die Zellkulturgefäße in der Hypoxiebox luftdicht verpackt und außerhalb der Box bestrahlt. Nach der Bestrahlung erfolgte ein sofortiger Transport zurück in die Box.

### **3.4.7 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Apoptose (FACS)**

Die Apoptose wurde mithilfe der durchflusszytometrischen Quantifizierung der Annexin V/Propidium Iodid (PI) Färbung dargestellt. Für die Färbung wurden  $2 \times 10^5$  Zellen wie in Abbildung 12 angegeben behandelt und anschließend mit 80 µg/ml PI plus 9.6 µg/ml Annexin V konjugiert an PacificBlue (No. 640917, Biolegend, San Diego, CA, USA) in Annexin V Bindungspuffer (No. 422201, Biolegend) für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dann einmal mit dem Bindungspuffer gewaschen, in dem gleichen Puffer resuspendiert und sofort im FACS Canto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) quantifiziert. Mindestens 10000 Zellen pro Probe wurden auf diese Weise analysiert. Die Datenanalyse fand mit FCS Express 4 Flow Software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA) statt.

### **3.4.8 Zellzyklus Analyse**

Für die Zellzyklus Analyse wurden  $4 \times 10^5$  Zellen, wie in der Abbildung 13 dargestellt, bestrahlt. Nach jedem Zeitpunkt wurden die Zellen zur Fixierung unter ständigem Vortexen mit eiskaltem 70% Ethanol versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -

20 °C gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen zentrifugiert, um das Ethanol zu entfernen und einmal mit PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen fand in 400  $\mu$ l hypotonischem Citrat Puffer (0,1% Natriumcitrat, 0,1% TritonX-100), der 50  $\mu$ g/ml PI einhielt, für 30-60 min statt (Nicoletti *et al.*, 1991). Nach der Färbung wurden die noch intakten Zellkerne direkt im FACS Canto II auf den DNA Gehalt hin untersucht. Dabei wurde das Verhältnis der Zellzyklus-Phasen von 30000 intakten Zellkernen pro Probe mit der FCS Express 4 Flow Software analysiert.

#### **3.4.8 Proliferations-Assay (WST-1)**

Der Anteil der methabolisch aktiven Zellen wurde mit dem WST-1 cell viability assay (Roche, Basel, Schweiz) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 800 Zellen pro Testfeld in 200  $\mu$ l des entsprechenden Mediums (s. Kap. 3.1.8) in einer 96 Testfeld-Platte (0,32 cm<sup>2</sup>/well) ausgesät. Als Leerprobe wurde Medium ohne Zellen in entsprechenden Testfeldern hinzugefügt. Nach der Bestrahlung folgte eine weitere Inkubation für 24 h oder 48 h bei 1% O<sub>2</sub> und 37 °C wurde das WST-1 Reagenz in einer Verdünnung von 1:10 für 60 min auf die Zellen gegeben. Die Auswertung wurde spektrophotometrisch in einem Mikroplatten Reader (Epoch) im Bereich OD450/690 durchgeführt. Die Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet.

#### **3.4.9 Klonogener Assay**

Die Bestimmung der klonogenen Aktivität jeder einzelnen Zelle ist ein Maß für die langfristige Zellvitalität nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Dosen an Strahlung. Für die Analyse wurden exponentiell wachsende Zellen nach dem Aussäen für 24 h 1% O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit 0, 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt. 24 Stunden später wurden die Zellen trypsiniert, vereinzelt und in 60 mm Zellkulturschalen in verschiedenen Verdünnungen (200-1600 Zellen) in frischem Zellkulturmedium ausgesät. Nach einer Inkubationsphase von 10-14 Tagen wurden die Kolonien mit 4%-iger Paraformaldehydlösung (PFA) und 70%-igem Ethanol

fixiert. Die Färbung erfolgte mit 0,5% Kristallviolett für 20 min. In die Auswertung wurden nur Kolonien mit mehr als 50 Zellen einbezogen.

#### **3.4.10 pO<sub>2</sub>-Messung**

Die perizelluläre pO<sub>2</sub>-Messung erfolgte kontinuierlich mittels polographischer pO<sub>2</sub>-Sonden von OxyLab pO<sub>2</sub><sup>TM</sup> (Oxford OPTRONIX), die mit einer Temperatursonde verbunden sind. Dafür wurden 2x10<sup>5</sup> Zellen in einer 6 well Platte ausgesät und 24 h bei 1% O<sub>2</sub> inkubiert. Die erste Messung des Sauerstoffpartialdrucks erfolgte nach 24 h in Hypoxie. Zu diesem Zweck wurde ein Well in jeweils 4 Felder unterteilt und die Sonde solange in einem Feld belassen bis der Wert stabil war. Das gleiche Vorgehen erfolgte in allen Feldern und Wells. Aus den 4 Messwerten wurde dann ein Mittelwert gebildet, der den Sauerstoffpartialdruck in dem jeweiligen Well wiedergab. Die Bestrahlung von Platten erfolgte wie in Kap. 3.4.6 beschrieben mit einer Einzeldosis von 5 Gy. Nach der Bestrahlung wurden die Platten sofort wieder in die Hypoxiebox transportiert und der Sauerstoffpartialdruck, wie oben beschrieben, nach 0, 24 und 48 h gemessen.

#### **3.4.11 Immunfluoreszenz-53BP1 Foci Färbung an Zellen**

Zur Detektion der DNA-Reparaturkomplexe in Zellen nach Bestrahlung wurde die Methode der Immunfluoreszenz-Färbung von Foci des Reparaturproteins 53BP1 angewendet. Dafür wurden 5 x 10<sup>4</sup> Zellen für 48 h auf 18x18 mm sterile Deckgläschen ausgesät. Nach hypoxischer Behandlung und Bestrahlung erfolgte die Fixierung, Lyse und Färbung der Zellkerne nach 0, 1, 3, 6, 12 oder 24 h. Die Fixierung fand nach einem Waschschrift mit PBS statt, es wurde bei RT mit 500 µl/Gläschen Fixierungs-Puffer (4% PFA, 2 g/100 ml Saccharose) für 15 min inkubiert. Für die Lyse wurden die Deckgläschen erneut 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl/Gläschen für 10 min bei RT mit eiskaltem Lyse-Puffer (1% PBS-TritonX und 2% BSA in PBS-T 0,1%) behandelt. Zur Blockierung von unspezifischen Bindestellen wurden 0,5-1 ml 2% BSA (0,1% PBS-TritonX) benutzt

und für mindestens 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschritt mit eiskaltem 0,25%-igen PBS-T erfolgte die Inkubation mit 25-50  $\mu$ l/Gläschen des Erstantikörpers (s. Tab. 4) in 2% BSA-PBS-T 0,1% in PBS für 1,5 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Deckgläschen 3x mit eiskaltem 0,25%-igem PBS-T und 1x mit PBS gewaschen. Mit dem Zweitantikörper (Alexa A488 s. Tab. 4) wurde, wie oben für den Erstantikörper beschrieben, verfahren. Die Inkubation erfolgte jedoch für 1 h. Für den letzten Waschschritt wurde wieder 2-mal in 0,25%-igem PBS-T und 1x mit PBS gewaschen. Die so gefärbten Deckgläschen wurden unter Verwendung von Prolong Mounting Medium mit DAPI (DAKO) auf Objektträgern platziert und für 24 h im Dunkeln bei RT zum Aushärten belassen. Für eine längerfristige Lagerung wurden die Objektträger in Frischhaltefolie eingewickelt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Für die Auswertung wurden min 100 Zellen pro Versuchsbedingung mit mehr als 6 Foci/Zellkern ausgezählt. Die Visualisierung der Zellen fand am LSM780 Konfokalmikroskop statt.

#### **3.4.12 Alkalischer Comet Assay**

Für den alkalischen Comet Assay wurden  $1 \times 10^5$  Zellen, wie in Kap. 3.4.6 beschrieben, hypoxisch behandelt und bestrahlt. Nach zusätzlichen 24 h bei 1% O<sub>2</sub> wurden die Zellen in der Hypoxiebox trypsiniert und in 1%-iger LMP Agarose (Low melting point) auf Objektträgern eingebettet. Die Lyse der Zellen fand 5, 30, 60 oder 120 min nach der Bestrahlung mit 5 Gy statt. Der Versuch wurde in der Hypoxiebox bei einem konstanten Wert von 1% O<sub>2</sub> im Dunkeln, über die Dauer von einer Stunde, durchgeführt. Die Objektträger mit den eingebetteten Zellen wurden anschließend zunächst in kaltem Elektrophorese-Puffer für 30 min inkubiert. Anschließend wurde eine horizontale Elektrophorese mit 25 V, 300 mA für 25 min durchgeführt. Im letzten Schritt fand eine Neutralisierung mit 0,5 M Tris-HCL (pH 8,0) und die Färbung mit SYBR gold (1:10000 in d H<sub>2</sub>O, Invitrogen) statt. Die Auswertung wurde mithilfe der Software Komet 5.5 image analysis (Andor Technology, Belfast, UK) durchgeführt. Dazu wurden 50 Zellen pro Objektträger gezählt. Für jede Versuchsbedingung wurden jeweils 2 Objektträger ausgewertet.

### **3.5 Tierexperimentelle Methoden**

Die Tierversuche waren durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt worden (AZ: 87-51.042010.A343)

#### **3.5.1 Tierhaltung**

Alle Mäuse wurden im Zentralen Tierlaboratorium (ZTL) des Universitätsklinikums Essen unter kontrollierten Bedingungen gehalten. Bis zu fünf Tiere lebten zusammen in Makrolon®-Filterkäfigen Typ III bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C und einem 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere wurden durch die Tierpfleger mit pelletiertem Alleinfuttermittel und Trinkwasser *ad libitum* versorgt.

#### **3.5.2 Subkutane Injektion von Tumorzellen und Behandlung mit Doxycyclin**

In allen Experimenten wurde der durch Inzucht entstandene Mausstamm C57BL/6 benutzt. Zum Zeitpunkt der Injektion waren die Tiere 8-10 Wochen alt. Für die subkutane Injektion von Tumorzellen wurden Lewis Lung Carcinoma-Zellen, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, trypsiniert. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation (280 x g für 3 min) in DMEM suspendiert. Die Zellsuspension wurde so portioniert, dass die Aliquots jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen enthielten. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das Zellpellet in eiskaltem Matrigel (aliquotiertes Matrigel wurde 1 Std. vor dem Start auf Eis aufgetaut) resuspendiert. Pro Maus wurden für die Injektion am Bein 50 µl und für die Injektion an der Flanke 100 µl Matrigel vorsichtig dazupipettiert und das Matrigel-Zell-Gemisch in eine Insulinspritze aufgezogen. Bis zur Injektion wurden die Spritzen auf Eis gelagert. Vor der Zelinjektion bekam jede Maus eine Identifikationsnummer in Form einer Ohrmarkierung. Anschließend wurde die Injektionsstelle mit einem Rasierapparat (Braun) vollkommen von Haaren befreit. Um die Injektion für die Tiere stressfrei durchführen zu können, wurden diese mit Ketamin/Xylazin (2,5 ml NaCl, 0,5 ml

Ketamin 10%, 0,125 ml Xylazin 2%) narkotisiert. Für die Induktion des HIF-1 $\alpha$  Knockdowns in Tumoren *in vivo* wurde dem vorher autoklavierten Trinkwasser der Versuchstiere ab einer TumorgroÙe von 50-100 mm<sup>3</sup> 1 mg/ml Doxycyclin mit 5% Fruktose zugesetzt. Das Autoklavieren hatte den Zweck, die in Leitungswasser vorhandenen Antibiotikareste zu eliminieren (Wiederschain, 2008). Das Doxycyclin-haltige Trinkwasser wurde jeden zweiten Tag erneuert. Die Behandlung mit Doxycyclin wurde bis zum Ende des Versuchs fortgesetzt.

### 3.5.3 Bestimmung des Tumorwachstums

Die Überwachung des Tumorwachstums erfolgte alle zwei Tage. Dabei wurden Versuchstiere, bei denen die Tumore bereits vor Versuchsende ihre maximal zulässige Größe von 1000 mm<sup>2</sup> am Bein und 2000 mm<sup>2</sup> an der Flanke erreichten, oder ulzeriert waren, aus dem Versuch genommen. Die TumorgroÙe wurde mithilfe eines digitalen Messschiebers ermittelt. Die Tiere wurden hierzu fixiert und die Länge (A), Breite (B) und die Höhe (H) des Tumors vermessen und dokumentiert. Die Berechnung des Tumolvolumens erfolgte nach folgender Formel:

$$V = A \cdot B \cdot H / 2$$

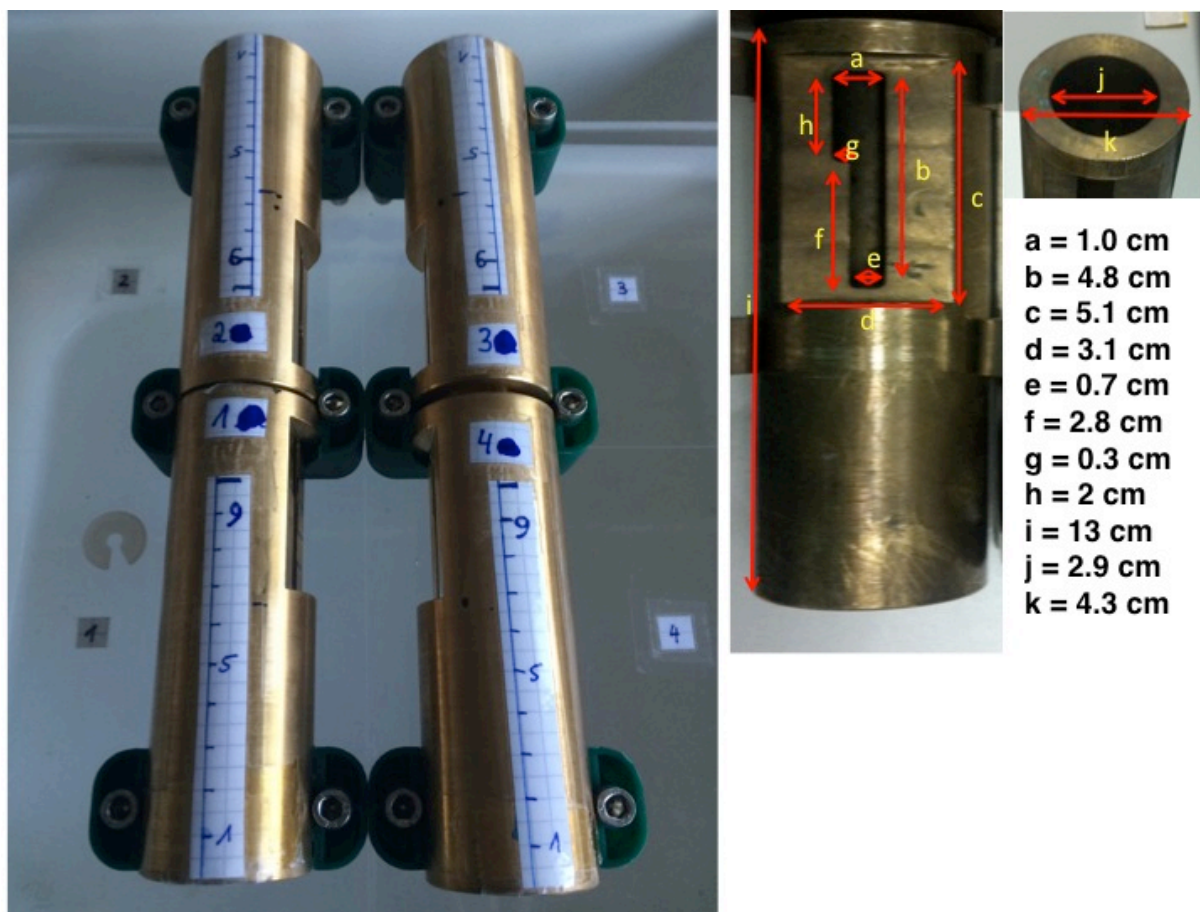
### 3.5.4 Bestrahlung von Tieren

Die Bestrahlungsexperimente an Tieren wurden in der Strahlenklinik des Universitätsklinikum Essen an einem Cobalt 60 (Philips) durchgeführt. Die Dosimetrie wurde im Vorfeld der Versuche durch die Strahlenphysiker des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Die Dosisleistung lag bei 1,4 min pro Gy.

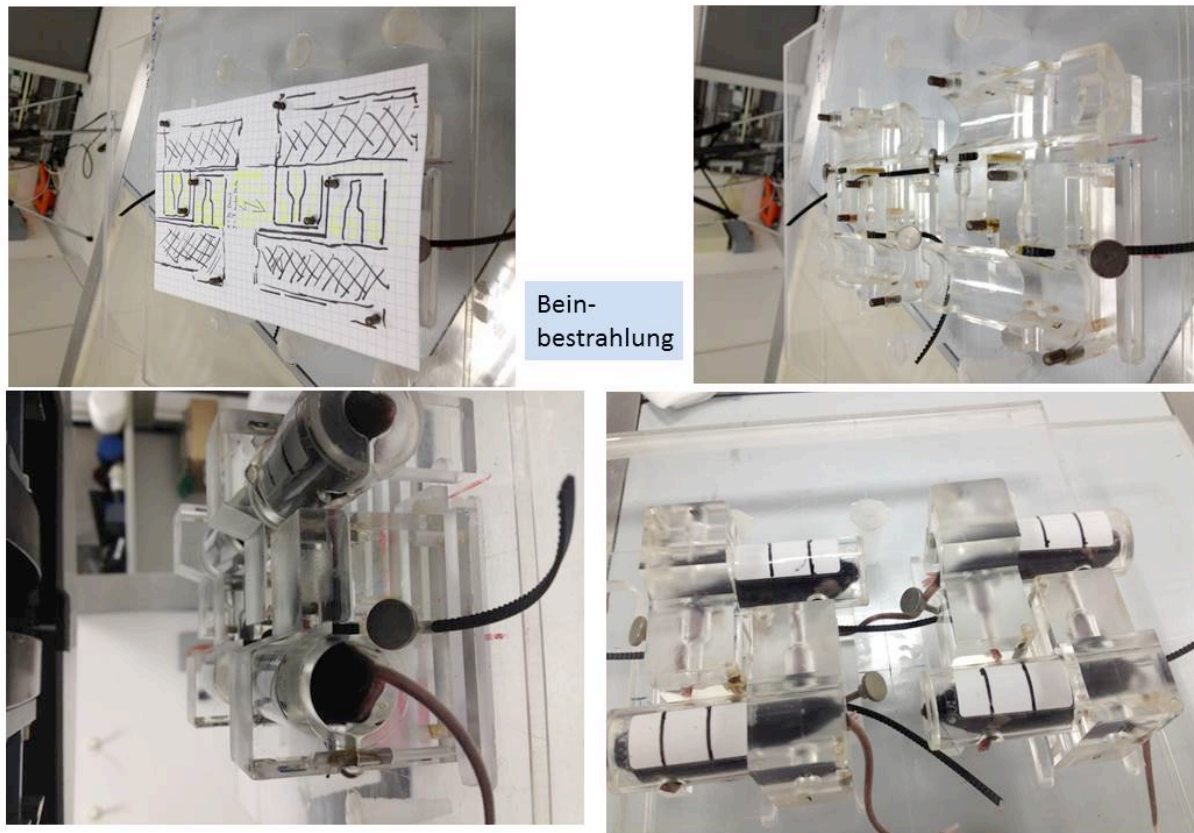
Am Vortag eines Bestrahlungsexperiments wurden die Tiere nach Messung der TumorgroÙe randomisiert. Für die Bestrahlung am Bein wurden Tiere verwendet, die ein Tumolvolumen von mindestens 50 mm<sup>3</sup> aufwiesen. Für die Flankenbestrahlung konnten die Tumoren ein Volumen von 200 mm<sup>3</sup> erreichen.

Für die Dauer der Bestrahlung wurden sowohl die Versuchs- als auch die

Kontrolltiere mit Ketamin/Xylazin betäubt. Es konnten in einem Durchgang maximal vier Tiere bestrahlt werden. Die Vorrichtung für die beiden Bestrahlungsarten (Flanke/Bein) ist den Abbildungen 5 bzw. 6 zu entnehmen. Während der gesamten Prozedur konnten die Tiere aus dem Nebenraum durch eine Kameraübertragung überwacht werden. Im Falle eines vorzeitigen Aufwachens wurde der Bestrahlungsvorgang abgebrochen und dem Tier eine zusätzliche Dosis Narkosemittel zur Ruhigstellung nachgespritzt.



**Abbildung 5: In vivo Apparatur zur Bestrahlung der Flanke.** Die abgebildete Apparatur wurde in der hauseigenen Werkstatt angefertigt und für die Flankenbestrahlung eingesetzt. Die Maus wurde im betäubten Zustand in dem Rohr (j) platziert. Der gesamte Tumor wurde zuerst durch die größeren Aussparung (a) geschoben, festgehalten und anschließend vorsichtig in die engere Öffnung (e) gezogen und so zum Bestrahlen fixiert. Auf diese Weise konnte gewährleistet werden, dass der komplette Mausekörper abgeschirmt wird und nur die Tumormasse im Bestrahlungsfeld liegt. Durch den Aufbau konnten in einem Durchgang vier Mäuse bestrahlt werden.



**Abbildung 6: Darstellung der *in vivo* Apparatur zur Bestrahlung am Bein.** Die Maus wurde im betäubten Zustand in der Plexiglasvorrichtung so fixiert, dass das rechte Bein vom Körper weg gespreizt wurde. Auf diese Weise konnten vier Mäuse so gelagert werden, dass nur die Beine im Bestrahlungsfeld platziert waren. Der komplette Maustorso wurde dadurch zu mindestens 85% abgeschirmt

### 3.5.5 Gewebeentnahme und –verarbeitung

Für die Detektion hypoxischer Tumorareale wurde den Tieren 50 min vor der Tumorentnahme Pimonidazol (60 mg/1000 g) i.p. verabreicht. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Für die spätere RNA-Isolierung wurde ein Teil des Tumors in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur immunhistochemischen Analyse wurde das restliche Tumorgewebe in 4% PFA eingelegt und später in Paraffin eingebettet. Die entsprechenden Gewebeschnitte wurden an einem Mikrotom (Leica) angefertigt.



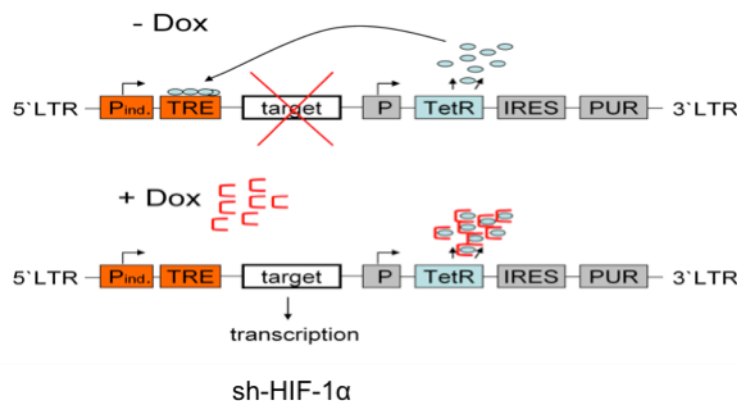
### 3.5.6 Statistik

Die Erhebung und Berechnung der Daten wurde mit Excel 2010 (Microsoft) durchgeführt. Statistisch aufgearbeitet wurden die Daten anschließend mit der Prism 5.0 Software der Firma GraphPad. Als Signifikanztest wurde beim Vergleich von zwei Gruppen ein t-Test, beim Vergleich von mehreren Gruppen ein Two-way-ANOVA durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in den Abbildungen als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SEM) dargestellt. Ergebnisse wurden ab  $*p < 0,05$  als signifikant betrachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Etablierung der induzierbaren HIF-1 $\alpha$ Inaktivierung in murinen LLC-Zellen

Um die Rolle von HIF in der strahlungsinduzierten Antwort von hypoxischen Tumorzellen untersuchen zu können, wurden Doxycyclin-induzierbare lentivirale Vektoren kloniert, die zu einer Integration der spezifischen shRNA (s. Tab. 7) in das Genom der Zellen führen. Dadurch war es möglich, Zellen zu generieren, die einen über mehrere Wochen stabilen Knockdown aufwiesen. Dieses Vorgehen erlaubte es, die HIF-Inaktivierung (s. Kap. 3.4.3-3.4.5) zu definierten Zeitpunkten ein- und wieder auszuschalten, ohne dass die Zellen sich an die Manipulation adaptieren konnten. Abbildung 7 zeigt schematisch das Prinzip des Vektors.

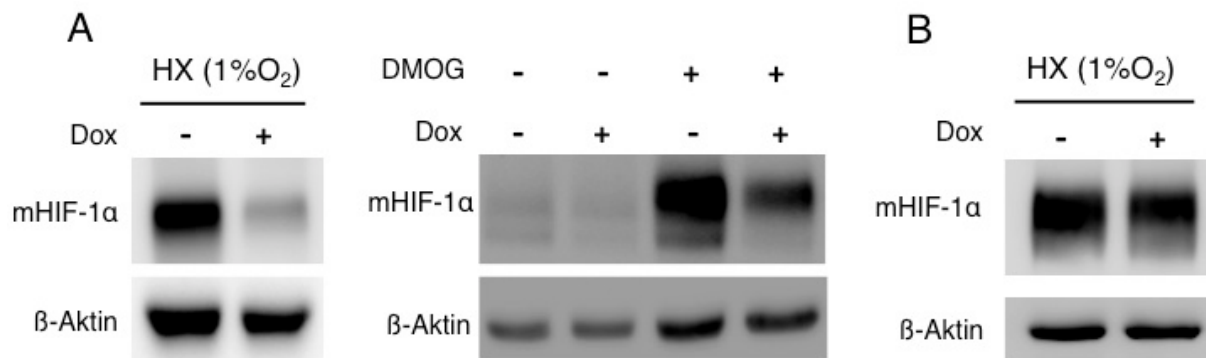


**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Doxycyclin-induzierbaren lentiviralen Vektors.**

Das Doxycyclin-induzierbare „single-vector“ knock down (KD) System wurde zur spezifischen Inhibition von HIF-1 $\alpha$  eingesetzt. Zur Induktion des KD's wurden 250 ng/ml Doxycyclin (Dox) zu dem Zellkulturmedium, oder 5 mg/ml zum Trinkwasser von Tieren hinzugefügt. In Abwesenheit von Dox wird ein Repressormolekül (TetR) produziert, das an die vor dem Zielgen positionierte TRE (*tetracycline responsible element*) bindet und die Transkription des Zielgens hemmt. In Anwesenheit von Dox, inaktiviert dieses die Repressormoleküle und das Zielgen kann transkribiert werden.

Lentiviren sind eine Gattung innerhalb der Retroviren, die in der Lage sind auch ruhende Zellen zu infizieren. Dadurch konnte eine 70-90%-ige Effizienz der HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierung auf Proteinebene erreicht werden (s. Abb. 8 A). Die Effizienz wurde sowohl nach Behandlung der Zellen mit moderater Hypoxie (1% O<sub>2</sub>), als auch nach dem Einsatz des Hydroxylaseinhibitors DMOG (Dimethyloxalyglycin) (Ayrapetov *et*

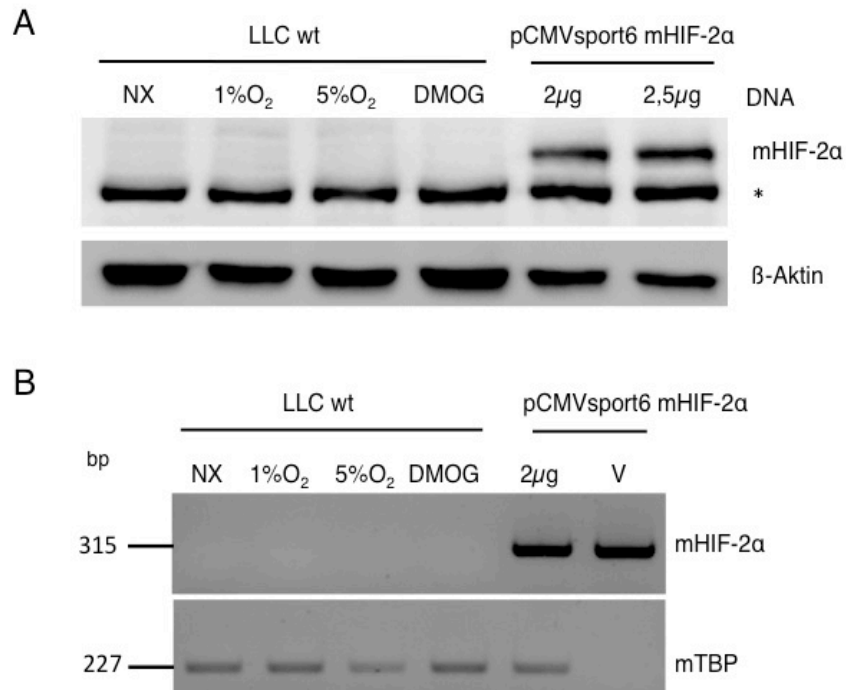
*al.*, 2011; Brökers, 2010) bestätigt. Um alle unspezifischen negativen Effekte von Doxycyclin (Dox) auf den Vektor ausschließen zu können, wurde zusätzlich als Kontrolle eine LLCpLKO-Tet-On scrambled Zelllinie etabliert, die mit einem unspezifischen shRNA (scrambled) kodierenden Vektor transduziert wurde. Diese Zelllinie wurde bei allen Experimenten als Kontrollzelllinie mitgeführt (s. Abb. 8 B).



**Abbildung 8: Repräsentativer Western Blot der HIF-1α Inhibition in LLCpLKO-Tet-On Zellen.**

LLCpLKO-Tet-On- shHIF-1α Zellen wurden nach dem Aussäen für 48 h mit Dox behandelt und anschließend entweder einer Hypoxie (1% O<sub>2</sub> für 6 h) oder DMOG (1 mM für 4 h) ausgesetzt und im Western Blot auf das Vorhandensein des HIF-1α Knockdowns untersucht. Es zeigte sich in allen Experimenten eine Effizienz von 70-90% (A). Als Negativ-Kontrolle dienten Zellen, die mit einem für nicht-spezifische „scrambled“ shRNA kodierenden Vektor transduziert worden waren. Eine unspezifische Wirkung von Dox konnte ausgeschlossen werden (B).

Desweiteren war zusätzlich die Etablierung einer induzierbaren HIF-2α-Inaktivierung vorgesehen. HIF-2α ist eine alternative α-Untereinheit des transkriptionell aktiven HIF-Komplexes (s. Kap. 1.2.1), die jedoch zum Teil eine andere Rolle in der zellulären Antwort auf die Hypoxie als HIF-1α durch Aktivierung unterschiedlicher Zielgene übernimmt (Carroll und Ashcroft, 2006). Aus diesem Grund war es auch Ziel der Arbeit, durch spezifische Inhibition einer der beiden Untereinheiten die jeweilige Rolle in der strahleninduzierten Antwort einer hypoxischen Tumorzelle zu definieren. Im Laufe der Experimente wurde jedoch die HIF-2α-Defizienz in den LLC nachgewiesen. Weder auf der mRNA Ebene (s. Abb. 9 A) mittels PCR noch auf der Proteinebene (s. Abb. 9 B) konnte mit kommerziell erhältlichen Antikörpern eine HIF-2α Bande detektiert werden. Dazu wurde als Positivkontrolle ein kommerzieller Überexpressionsvektor für murines HIF-2α benutzt, der nach Transfektion zu einer deutlichen Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht von 120 kDa führte.



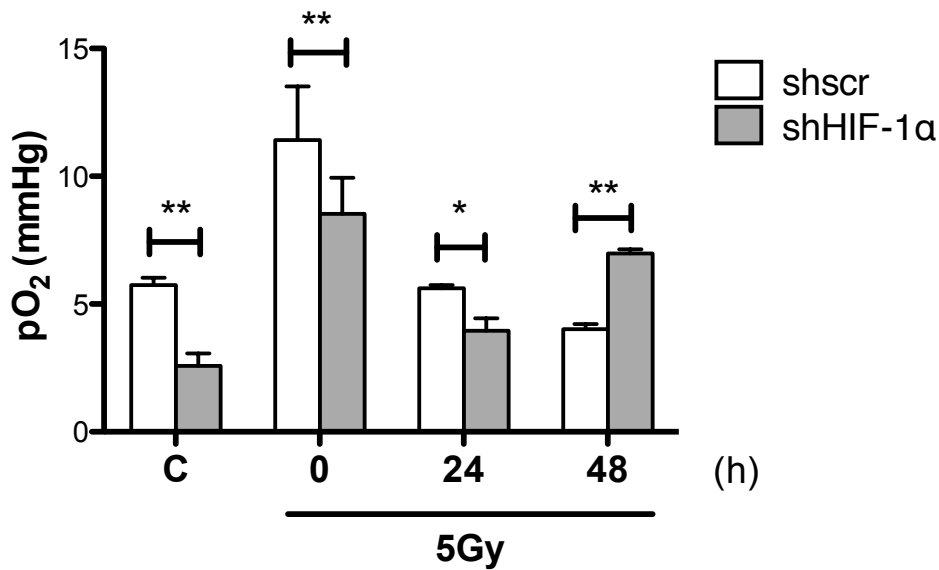
**Abbildung 9: LLC Zellen sind HIF-2α defizient. (A)** HIF-2α Western Blot und PCR **(B)**. Wildtyp LLC-Zellen wurden verschiedenen O<sub>2</sub> Konzentrationen (20%, 5% oder 1%) oder DMOG ausgesetzt und die HIF-2α-Expression untersucht. Als Positivkontrolle diente mHIF-2α Überexpressionsvektor (pCMVsport6). Als Ladekontrolle diente mTBP (*TATA-Box binding protein*). (\*unspezifische Proteinbande; V zeigt ein PCR Produkt der Vektor DNA)

Die Generierung der stabilen murinen LLCpLKO-Tet-On Zelllinie, mit einer induzierbaren, spezifischen HIF-1α-Inaktivierung in HIF-2α-defizienten Zellen, machte in allen folgenden Experimenten die Definition der HIF-1α-spezifischen Rolle bei der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung möglich. Zusätzlich erlaubte das System eine Analyse der Fragestellung in einem *in vivo* Allograft-Tumormodell in immunkompetenten Mäusen.

## **4.2 HIF-1 $\alpha$ Inhibition führt zu einer Radiosensitivierung von Tumorzellen**

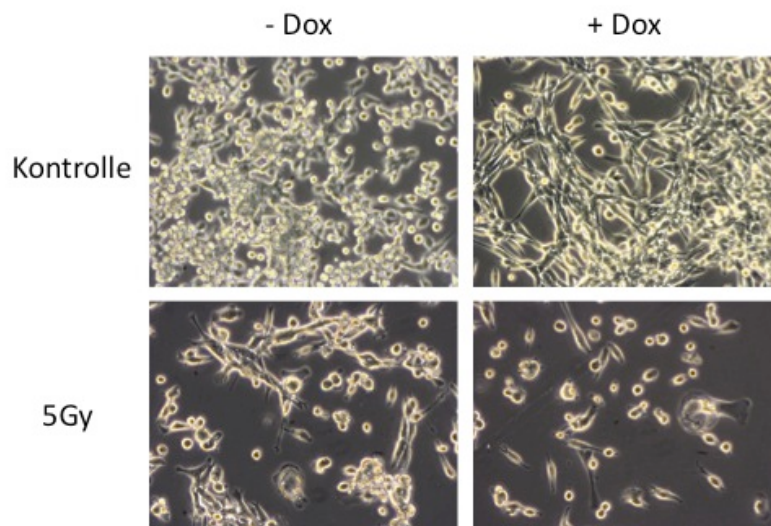
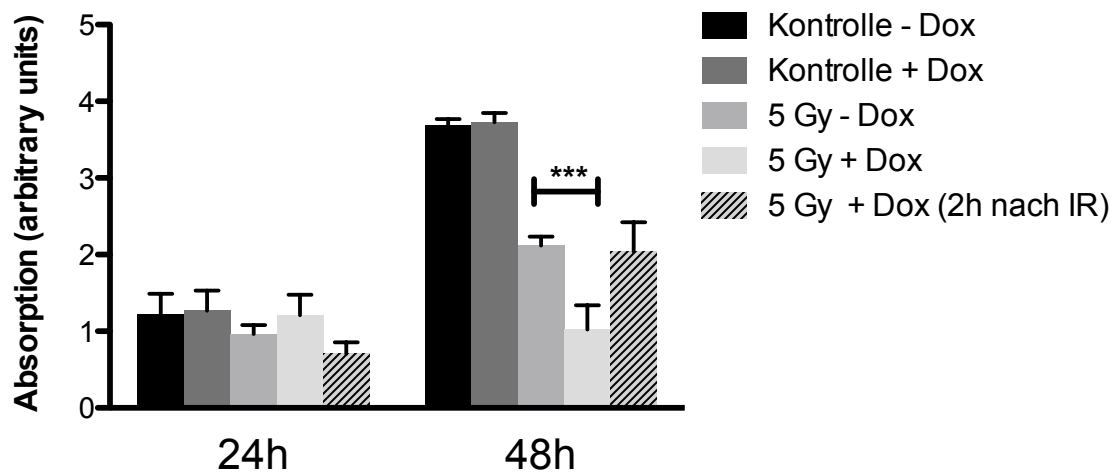
### **4.2.1 HIF-1 $\alpha$ Einfluss auf die Zellvitalität nach Bestrahlung**

Um den HIF-1 $\alpha$  abhängigen Effekt auf die Zellvitalität und die Sensitivität gegenüber Bestrahlung untersuchen zu können, wurden zunächst die Veränderungen des Sauerstoffpartialdrucks in der Zellkultur untersucht. Der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) ist ein physikalisches Maß für die Sauerstoffkonzentration in Blut, Gewebe und Zellen (Thews, 1980). Da HIF der zentrale Regulator der Homöostase von hypoxischen Zellen ist, wurde der Sauerstoffpartialdruck in den HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen im Vergleich zu hypoxischen Kontrollzellen vor und nach der Bestrahlung, wie in Kap. 3.4.10 beschrieben, gemessen und verglichen. Wie die Abb. 10 zeigt, betrug der  $pO_2$  von Kontrollzellen nach 24 h Hypoxie  $5,6 \pm 0,4$  mmHg und lag somit nur wenig unter dem  $pO_2$  der Atmosphäre in der Hypoxiebox. Im Vergleich dazu war der  $pO_2$  von HIF-1 $\alpha$ -inhibierten LLC-Zellen mit  $2,4$  mmHg signifikant (\*\* $p < 0,01$ ) niedriger, was auf einen höheren Sauerstoffverbrauch hinweist. Unmittelbar nach der Bestrahlung erhöhte sich der  $pO_2$ -Wert auf das Doppelte und zwar unabhängig von dem HIF-1 $\alpha$ -Status der Zellen, blieb jedoch mit  $8-12$  mmHg noch im Bereich der moderaten Hypoxie. Der Anstieg ist dadurch zu erklären, dass eine geringfügige Reoxygenierung der Zellen während der Bestrahlung nicht zu vermeiden war. Der Wert pendelte sich jedoch nach 24 h wieder auf den Ausgangswert ein. Dabei blieb der Unterschied im  $pO_2$ -zwischen HIF-1 $\alpha$ -inhibierten und -kompetenten Zellen signifikant. Das änderte sich 48 h nach Bestrahlung. Der  $pO_2$  der HIF-1 $\alpha$ -kompetente Zellen war jetzt mit einem Wert von ca.  $4 \pm 0,45$  mmHg signifikant (\*\* $p < 0,01$ ) niedriger, als der der HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen (ca.  $7 \pm 0,3$  mmHg), was ein Hinweis auf einen höheren Sauerstoffverbrauch ist.



**Abbildung 10: pO<sub>2</sub>-Messung *in vitro* an hypoxischen LLCpLKO.1 Zellen nach HIF-1α-Inhibition und Bestrahlung.** Für die pO<sub>2</sub>-Messung wurden mit einem konstitutiven lentiviralen HIF-1α Konstrukt transduzierte LLC-Zellen (LLCpLKO.1 shHIF-1α) benutzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem konstitutiven Konstrukt, das für eine unspezifische scrambled shRNA (shscr) kodiert, transduziert waren. Die erste Messung (c) erfolgte nach 24stündiger Inkubation der Zellen in Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) alle darauffolgenden wie aufgezeigt (0, 24, 48 h) nach Bestrahlung mit 5 Gy in der Hypoxiebox. \* = p<0,05, \*\* = p<0,001

Eine signifikante (\*\*p<0,001) Abnahme der Zellvitalität 48 h nach Bestrahlung, aufgrund der HIF-1α Inhibition, war im WST-1 Assay (s. Abb. 11) nachweisbar. WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) ist ein rosa-farbenes, wasserlösliches Tetrazolium-Salz, das durch mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase von vitalen Zellen in ein dunkelrotes, wasserunlösliches Tetrazolium-Formazan reduziert wird. Anhand der Farbintensität nach dem Farbumschlag wurde die Dichte der vitalen Zellen 24 und 48 h nach Bestrahlung und Inkubation in Hypoxie wie in Kap. 3.4.8 beschrieben gemessen. Der signifikante Effekt, der 48 h nach Bestrahlung in den HIF-1α-inhibierten, hypoxischen LLC Zellen demonstriert wurde, war aufgehoben, wenn die HIF-1α-Inaktivierung erst 2 h nach der Bestrahlung induziert worden war. Dieses Ergebnis zeigt, dass HIF-1α einen protektiven Effekt gegenüber ionisierender Strahlung besitzt.



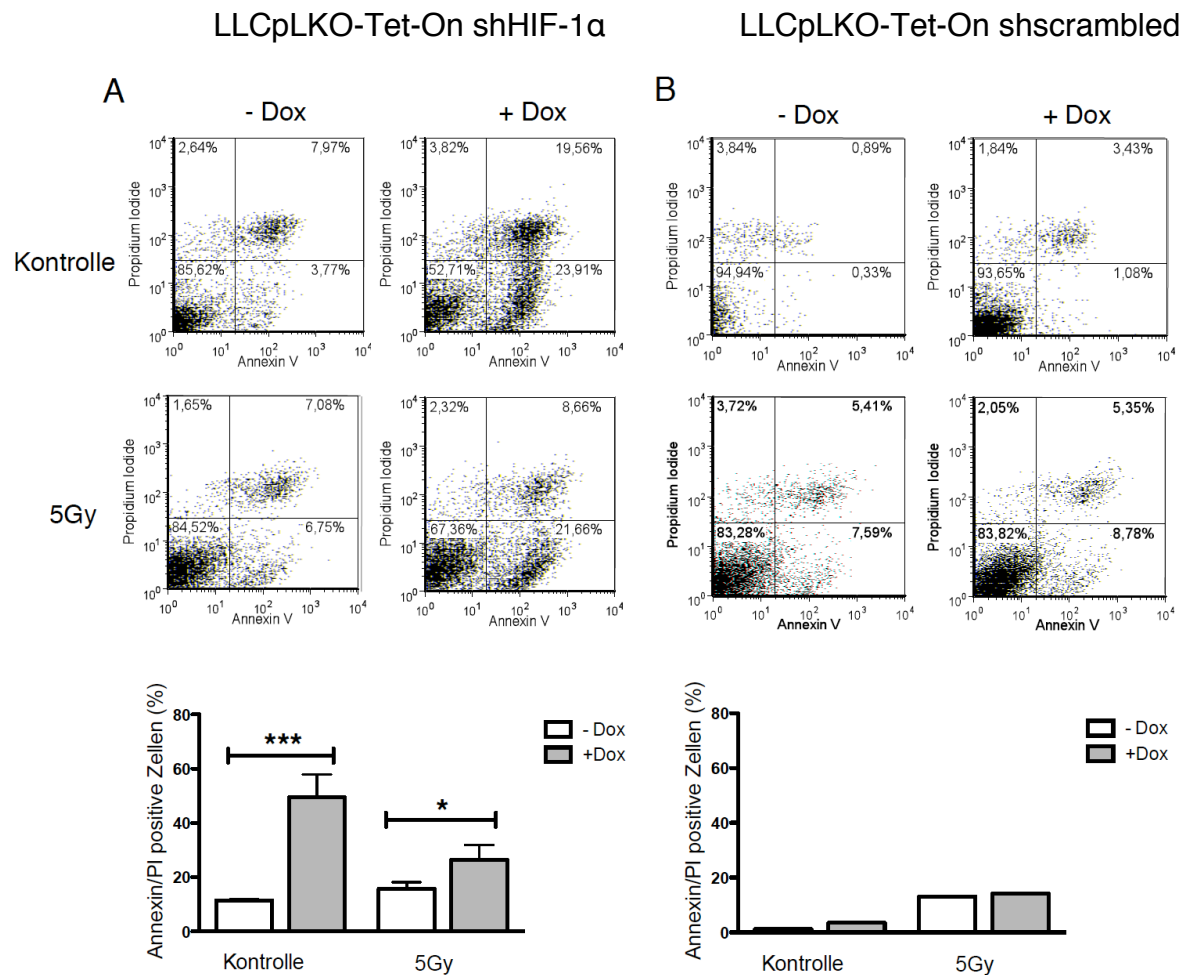
**Abbildung 11: HIF-1 $\alpha$ -Inhibition führt zur Radiosensitivierung von LLC-Zellen *in vitro*.** LLCpLKO-Tet-On Zellen wurden für 24 h mit Dox behandelt. Die Zellen wurden hierzu in 96-well Platten ausgesät, bei 1% O<sub>2</sub> über Nacht inkubiert und anschließend mit 5 Gy bestrahlt. Es folgte eine Inkubation für 24 und 48 h in Hypoxie. Zusätzlich wurde eine Charge von Zellen erst 2 h nach Bestrahlung mit Dox induziert. Das WST-1 Reagenz wurde den Zellen nach den angegebenen Zeitpunkten hinzugefügt und der Farbumschlag spektrophotometrisch gemessen. Jeder Balken stellt die Ergebnisse aus 3 verschiedenen Experimenten dar. Jeder wurde in 3facher Bestimmung durchgeführt. Unten sind die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen der Zellen nach der jeweiligen Behandlung gezeigt.

#### 4.2.2 Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf die apoptotische Antwort nach Bestrahlung

Aufgrund der signifikanten Verminderung der Zellvitalität bzw. der metabolischen Aktivität nach der Inhibition von HIF-1 $\alpha$  wurde der Einfluss dieser auf die Apoptose untersucht. Dafür wurde die Methode der AnnexinV/PI Färbung mit anschließender FACS Analyse durchgeführt (s. Kap. 3.4.7). Annexin V ist ein Protein der Annexin-Gruppe, das an die Oberflächenmarker Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) von apoptotischen Zellen bindet. Diese Färbung wird mit der Färbung von Zellkern-DNA mit PI (Propidiumiodid) kombiniert. Mit der Doppelfärbung kann man also lebende Zellen von apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden.

Die Ergebnisse bestätigten zunächst die in der Literatur beschriebene Resistenz der hypoxischen HIF-1 $\alpha$ -kompetenten Zellen gegenüber Bestrahlung (Fyles *et al.*, 1998; Sasabe *et al.*, 2007). Die Apoptose-Rate dieser Zellen erhöhte sich nur unwesentlich von 11,3% auf 13,8% in bestrahlten gegenüber nicht-bestrahlten Kontrollzellen. Im starken Kontrast dazu erhöhte sich die Anzahl apoptotischer Zellen in der HIF1 $\alpha$ -inhibierten, hypoxischen (72 h, 1% O<sub>2</sub>) Fraktion im Vergleich zu den Kontrollen um 32,1% enorm, auch ohne Bestrahlung (s. Abb. 12). Das Ergebnis war mit \*\*\* $p < 0,001$  (- Dox versus + Dox) hoch signifikant. Dieser Effekt wurde jedoch nach der Bestrahlung mit 5 Gy um 13,2% vermindert. Dennoch war die apoptotische Antwort der HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen immer noch signifikant höher als der HIF-1 $\alpha$ -kompetenten LLC-Zellen (\* $p < 0,05$  – Dox versus + Dox).





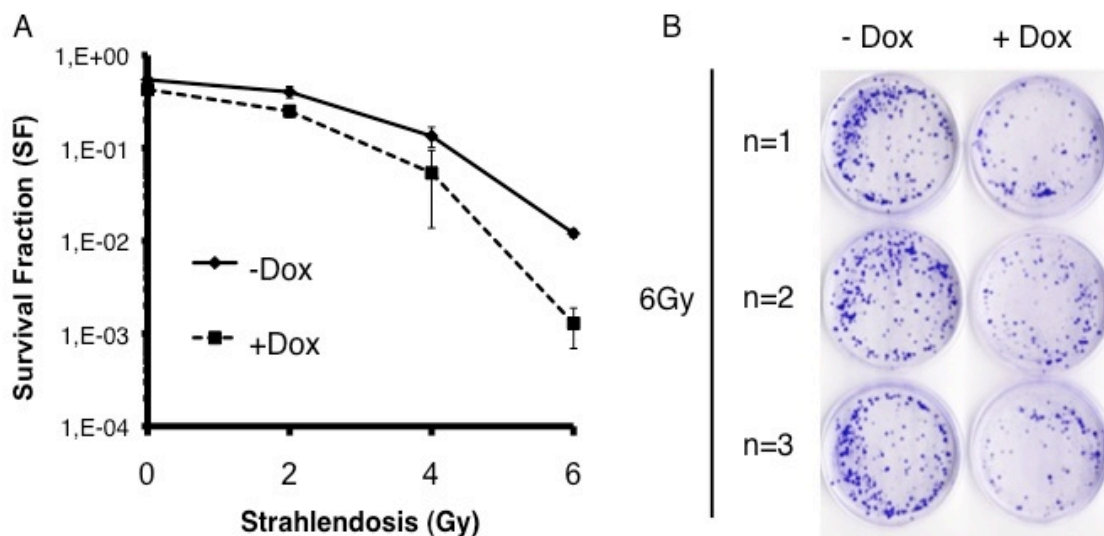
**Abbildung 12: HIF-1 $\alpha$ -Inhibition führt zu einer Erhöhung der strahleninduzierten Apoptose in LLCpLKO-Tet-On Zellen. (A)** Repräsentative Bilder der FACS Analyse der mit Annexin/PI gefärbten, hypoxischen LLCpLKO-Tet-on Zellen (12 h, 1% O<sub>2</sub>). Diese wurden zunächst für 24 h mit 250 ng/ml Dox induziert und anschließend mit 5 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für weitere 72 h bei 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Als Negativ-Kontrolle, für einen unspezifischen Effekt von Dox, dienten Zellen, die mit einem für nicht-spezifische „scrambled“ shRNA kodierenden Vektor, transduziert worden waren. Eine unspezifische Wirkung von Dox konnte ausgeschlossen werden **(B)**. Für die Auswertung wurde die Summe aus den prozentualen Anteilen früh- und spätapoptotischer Fraktion gebildet.

### **4.2.3 HIF-1 $\alpha$ -Inhibition führt zu G<sub>2</sub> Arrest und beeinflusst die Klonogenität der Tumorzellen negativ**

Um eine Erklärung für die Ergebnisse der Apoptose-Messung zu finden, wurde im nächsten Schritt eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt. Die zelluläre Antwort auf die Bestrahlung resultiert meist nicht sofort in einer Apoptose. Vielmehr stagnieren die Zellen zunächst im Zellzyklus um die entstandenen DNA-Schäden reparieren zu können (Aliouat-Denis *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Ravizza *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2002;). Zudem ist bekannt, dass HIF-1 $\alpha$  durch die Inhibition von c-Myc und der daraus resultierenden Hochregulation des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21 zu einem erhöhten G1 Arrest beiträgt (Koshiji *et al.*, 2004; Herold *et al.*, 2002). Nach der Bestrahlung wurden die hypoxischen Zellen deshalb auf die Zellzyklus-Phasen-Verteilung im FACS (s. Kap. 3.4.8) untersucht. Die Analyse bestätigte, dass die Verminderung in der apoptotischen Fraktion der bestrahlten HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Gruppe sich mit einer Erhöhung in der G2/M Population (41,7%  $\pm$  0,5% - Dox versus 53,4%  $\pm$  1,4% + Dox) dieser Zellen (6 h nach Bestrahlung) deckte (s. Abb. 13 A). Diese Verschiebung im Zellzyklus war auch 24 h nach Bestrahlung (22,4%  $\pm$  1,8% - Dox versus 31,5%  $\pm$  0,65 + Dox) präsent.



den bestrahlten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zu einer signifikanten ( $p < 0.001$ ) Verminderung der Überlebensrate (SF). HIF-1 $\alpha$ -Inhibition erhöhte damit die intrinsische Strahlenwirkung bei einer Dosis von 6 Gy um das 9,2-fache (Abb. 14 A).

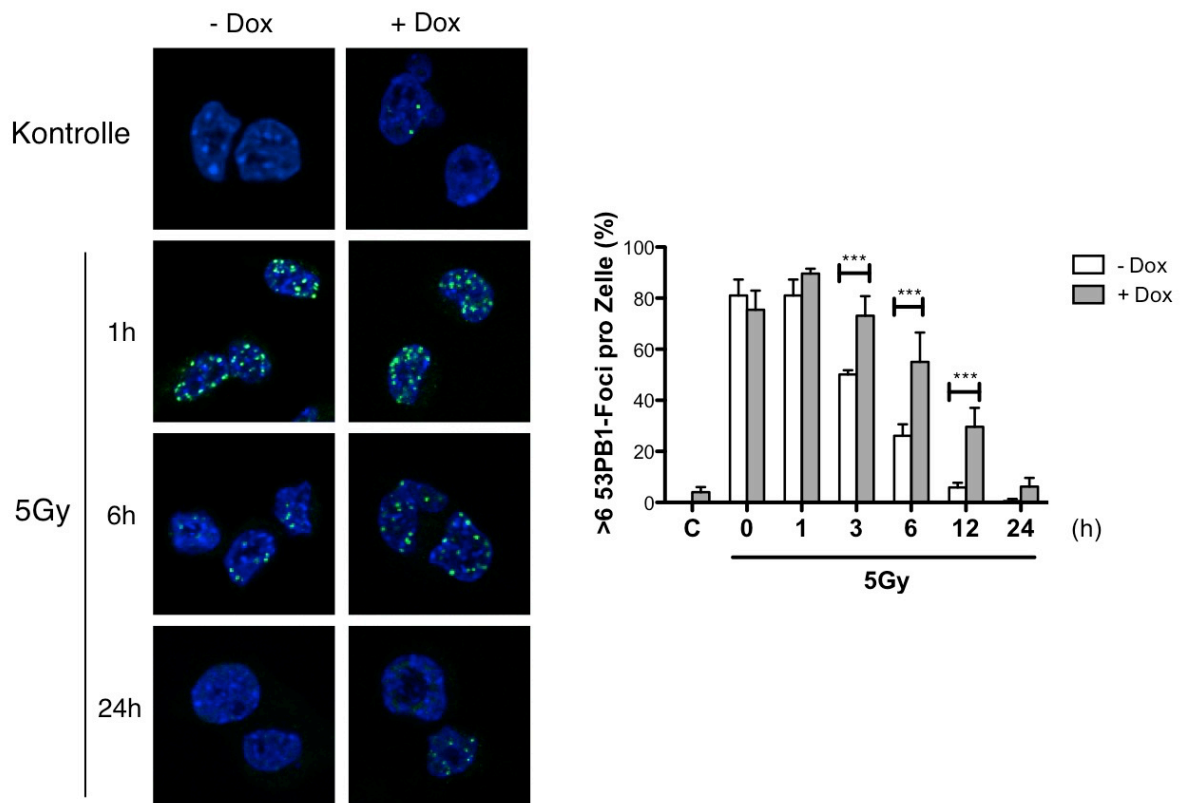


**Abbildung 14: HIF-1 $\alpha$ -Inhibition senkt signifikant das klonogene Potential der Tumor-Zellen nach Bestrahlung. (A)** LLCpLKO-Tet-On-shHIF-1 $\alpha$  Zellen wurden zunächst mit Dox induziert und in Hypoxie kultiviert. Anschließend wurden die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase mit verschiedenen Dosen (0, 2, 4 oder 6 Gy) Röntgenstrahlung bestrahlt. 24 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen (800-1600) ausgesät und für zusätzliche 10 Tage kultiviert. Die Abbildung **(B)** zeigt Aufnahmen der Kolonien (blau) auf den Platten, die mit 6 Gy bestrahlt wurden und anschließend 10 Tage kultiviert wurden.

### 4.3 HIF-1 $\alpha$ -abhängige Verzögerung der Reparaturprozesse von Doppelstrangbrüchen (DSB) nach Bestrahlung

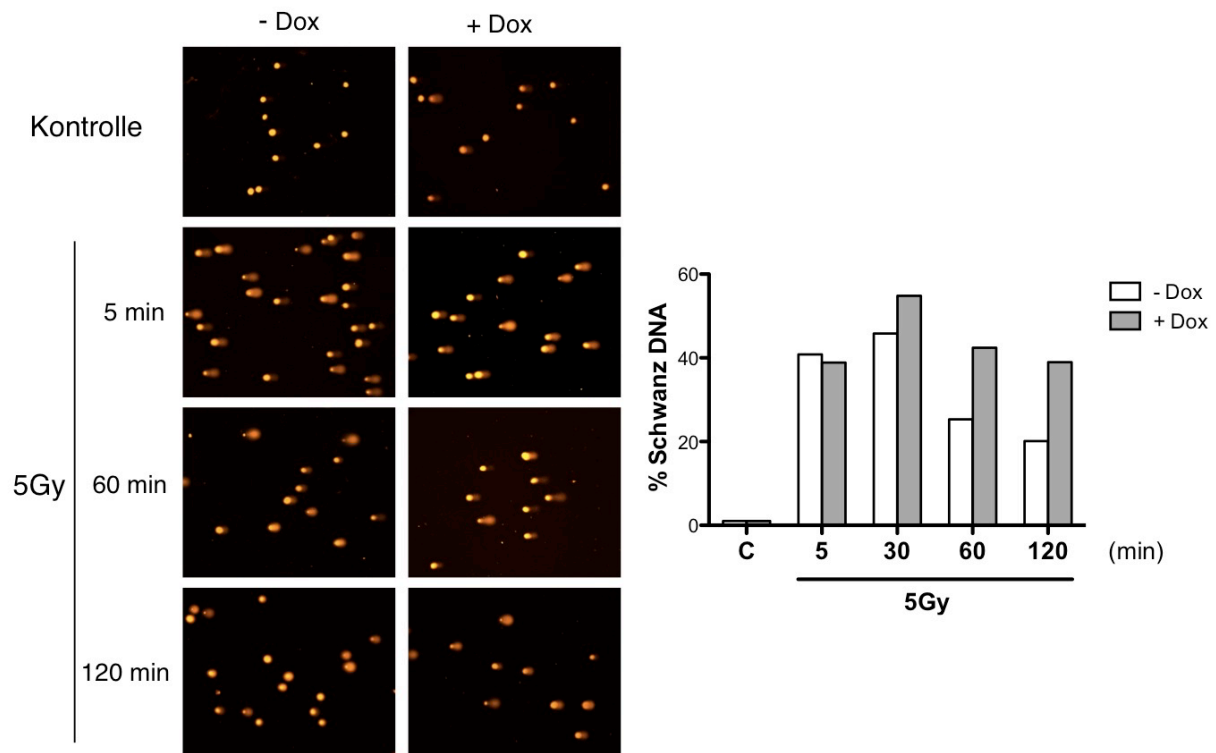
Durch die Einwirkung von ionisierender Strahlung entstehen Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche in der DNA. Besonders die Doppelstrangbrüche sind für die Zelle schwer zu reparieren. Als Konsequenz aktiviert die Zelle den „DNA-damage response (DDR)“ Signaltransduktionsweg. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass HIF-1 $\alpha$  mit essentiellen Faktoren des DDRs und den entsprechenden Kontrollpunkten interagiert (Rohwer *et al.*, 2013). Die genaue Rolle von HIF-1 $\alpha$  bei der DNA-Reparatur ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten die Reparaturfähigkeit von bestrahlten, hypoxischen LLCpLKO-Tet-On Zellen studiert. Dazu wurde zunächst die Methode des 53BP1-Assay angewendet, die in Kap. 3.4.11 beschrieben ist. 53BP1 ist ein Kontrollpunkt-Protein, das im Zellkern an den Stellen von DSB rekrutiert wird und den DDR aktiviert.

Die spezifische 53BP1-Färbung der bestrahlten Kerne zeigte dabei eine über die Zeit von 24 h signifikant ( $p < 0,001$ ) verzögerte Rückbildung von 53BP1-Foci in HIF-1 $\alpha$ -inhibierten, hypoxischen Zellen im Vergleich zu HIF-1 $\alpha$ -kompetenten Zellen (s. Abb. 15). Auch nach 24 h waren 6,2% der HIF-1 $\alpha$ -inhibierter Zellen (+ Dox) positiv gefärbt. In Zellkernen von HIF-1 $\alpha$ -kompetenten (- Dox) Zellen konnten keine Foci mehr detektiert werden, was auf eine signifikant schnellere Reparatur der DSB in diesen Zellen hindeutet. Auch in der Kontrollgruppe (ohne Bestrahlung) der HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellfraktion war bereits eine höhere Anzahl an Foci vorhanden.



**Abbildung 15: Repräsentative Immunofluoreszenz-Aufnahmen von den 53BP1-Foci in Zellkernen.** Nach der Inhibition von HIF-1 $\alpha$  mit Dox und hypoxischer Behandlung (12 h, 1% O<sub>2</sub>) wurden die LLCpLKO-Tet-On Zellen mit 5Gy bestrahlt. Der zeitliche Verlauf der Reparaturprozesse wurde anhand der 53BP1-Foci (grün) Färbung dargestellt (links). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Für die Quantifizierung wurde der prozentuale Anteil aller positiven Zellkerne pro Gruppen berechnet. Ein positiver Zellkern wies mehr als 6 53BP1-Foci auf. Die Verzögerung der DSB-Reparatur (Graphik rechts) in HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen war hoch signifikant (\*\*p<0,001). Jeder Balken stellt die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

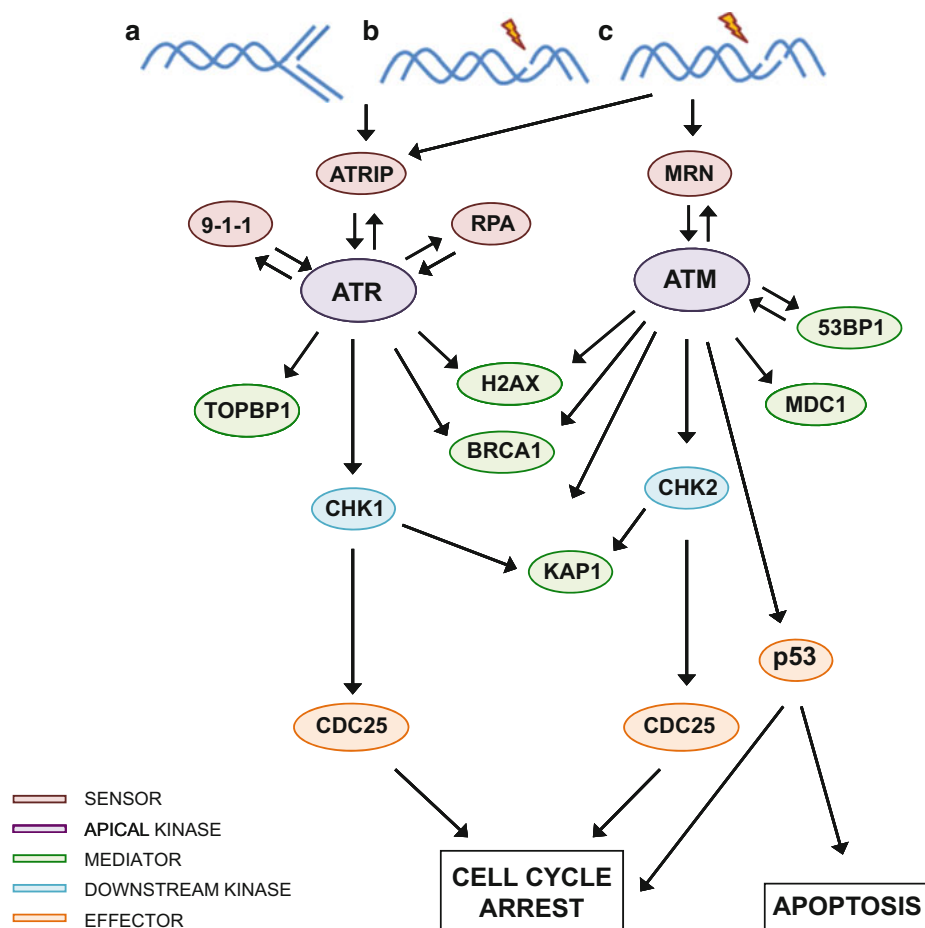
Um das Ergebnis zusätzlich bestätigen zu können, wurde im Weiteren eine noch sensiblere Methode zur Detektion der Level von geschädigter DNA in einer einzelnen Zelle durchgeführt (Olive und Banath, 2006). Aufgrund der vermehrten Entstehung von DSB nach Bestrahlung wird die DNA fragmentiert. Die Methode macht es möglich, die fragmentierte DNA mithilfe der Elektrophorese durch die Zellkernporen heraus zu bewegen. Dadurch entstehen der so genannte Kometen-Kopf und -Schwanz. Somit stellt der Kopf den Zellkern und der Schwanz die geschädigte DNA einer einzelnen Zelle dar (Nossoni, 2008). Anhand der Länge des Schwanzes (*tail moment*) wird der prozentuale Anteil der geschädigten DNA analysiert. Die Analyse ergab auch hier einen um das 1,6-1,9-fach höheren Anteil an geschädigter DNA nach HIF-1 $\alpha$ -Inhibition und Bestrahlung (s. Abb. 16).



**Abbildung 16: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen des Alkalischen Comet Assay.** Die LLCpLKO-Tet-On Zellen wurden auf gleiche Weise behandelt wie beim 53BP1 Assay. Zellen wurden anschließend auf Objektträgern in Agarose eingebettet und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Elektrophorese wurde für 30 min durchgeführt und die Zellkerne danach mit SYBR gold angefärbt. Die so entstandenen Kometen weisen einen Kopf, der den Zellkern einer einzelnen Zelle darstellt und einen Schwanz, der die fragmentierte DNA beinhaltet auf (links). Der prozentuale Anteil an unreparierter DNA wurde anhand der Länge des Schwanzes (tail moment) mit der Software Comet 5.5 analysiert. Die HIF-1 $\alpha$ -inhibierten LLC Zellen zeigten auch hier eine Verzögerung der Reparatur von DSB im Vergleich zu HIF-1 $\alpha$ -kompetenten Zellen (Graphik rechts). Dargestellt ist ein Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten.

Gleichermaßen waren die Proteinlevels des phosphorylierten Reparaturproteins „*histone variant*“ H2AX ( $\gamma$ H2AX) infolge der HIF-1 $\alpha$ -Inhibition (+ Dox) 3 und 6 h nach Bestrahlung im Western Blot erhöht (s. Abb. 18). Das deckte sich mit dem Ergebnis des 53BP1-Assay. ATM („*ataxia teleangiectasia mutated gene*“) ist ein essentielles Sensorprotein, das die DNA-Läsionen markiert und so die evolutionär konservierte Kaskade ATM/Chk2 („*ataxia teleangiectasia mutated gene/checkpoint kinase-2*“) aktiviert. Diese stellt einen wichtigen Teil des DDR dar, im Rahmen dessen auch die beiden Proteine 53BP1 und  $\gamma$ H2AX phosphoryliert und aktiviert (Medema und Macurek, 2012) werden. Aus diesem Grund war es weiterhin wichtig zu untersuchen, ob HIF-1 $\alpha$  in dieser Kaskade involviert ist und welche Komponenten beeinflusst werden. Der mögliche Einfluss auf den ATM Signaltransduktionsweg (s. Abb. 17)

wurde indirekt über die Levels von pS15-p53 und pKAP-1 im Western Blot untersucht. Der Tumorsuppressor p53 fungiert als Transkriptionsfaktor, der wichtige Gene reguliert, die nach DNA-Schädigung an der apoptotischen Antwort beteiligt sind, dieser wird direkt durch ATM aktiviert. Auf der anderen Seite konnte über die Aktivierung von *KRAB-associated protein* pKAP-1 der Status der Aktivierung von CHK2 analysiert werden (s. Abb. 17). Dieser ist ein wichtiger Kontrollpunkt in der Regulation des Zellzyklus. In unbestrahlten Zellen waren die Level an pP53 durch den HIF-1 $\alpha$ -Status nicht beeinflusst, wohingegen nach Bestrahlung die Levels beider Proteine (pP53 und pKAP-1) in HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen erhöht waren (s. Abb. 18).



**Abbildung 17: Schematische Darstellung des DDR (DNA damage response).** DNA-Läsionen wie Einzelstrangbrüche (b) und Doppelstrangbrüche (c), die durch ionisierende Strahlung verursacht sein können, werden durch spezifische Sensoren detektiert. Anschließend werden Kinasen wie ATR und ATM aktiviert und übertragen das Signal über die Mediatoren zu den „downstream“ Kinasen und Effektor-Proteinen (aus Melillo, 2014).



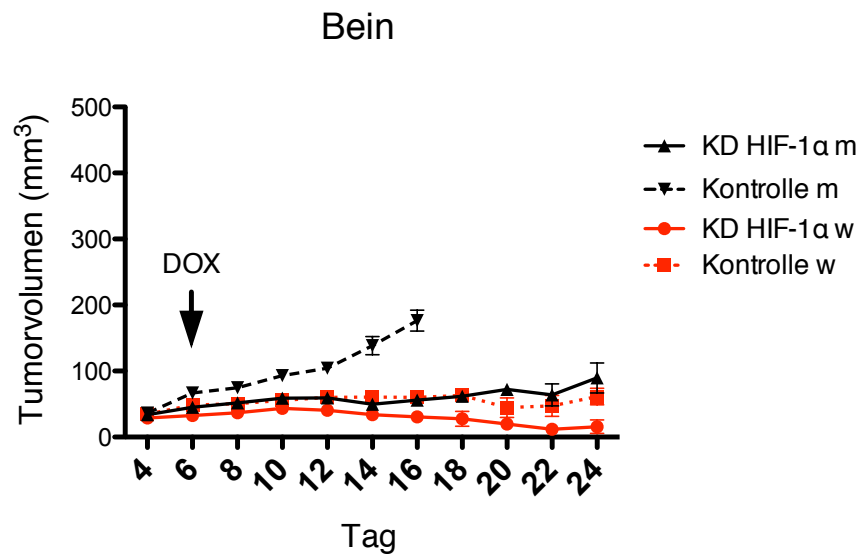


#### **4.4 Etablierung des HIF-1 $\alpha$ Inaktivierung-Systems *in vivo*.**

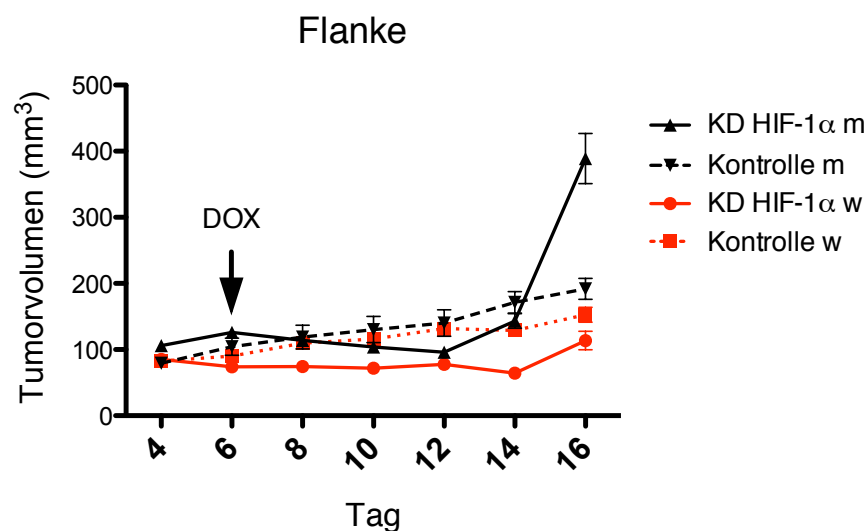
Um die *in vitro* Ergebnisse *in vivo* zu verifizieren, wurde zunächst das oben beschriebene Dox-induzierbare System in einem Allograft-Maus-Tumormodell etabliert. Für die durchgeführten Tumorstudien wurde das in anderen publizierten Studien angewandte Modell der subkutanen Tumorzell-Injektion gewählt, das zugleich einen Vergleich mit Ergebnissen dieser Studien erlaubt. Aufgrund des neuen Tierschutzgesetzes von 2014, das keine nicht wissenschaftlich begründete Tötung von Versuchstieren mehr erlaubt, konnten hier abweichend von den meisten publizierten Maustumor-Studien keine homogenen (nur Männchen bzw. nur Weibchen) Mausgruppen eingesetzt werden. Zusätzlich wurden in den initialen Versuchen, zum Zweck der späteren Bestrahlungs-Experimente, Tumoren sowohl am Bein als auch an der Flanke platziert und die Wachstumskinetiken verglichen.

Die HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierung in den subkutan injizierten LLCpLKO-Tet-On-Tumoren wurde jeden zweiten Tag mit Gabe von Doxycyclin in das Trinkwasser der Tiere induziert. Die Behandlung erfolgte bis zum Ende des Versuchs. Die Endpunkte des Versuchs wurden durch die maximal zulässige TumorgroÙe, eine vorzeitige Ulzeration oder einer Remission der Tumore bestimmt. Die Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Studie.

A



B

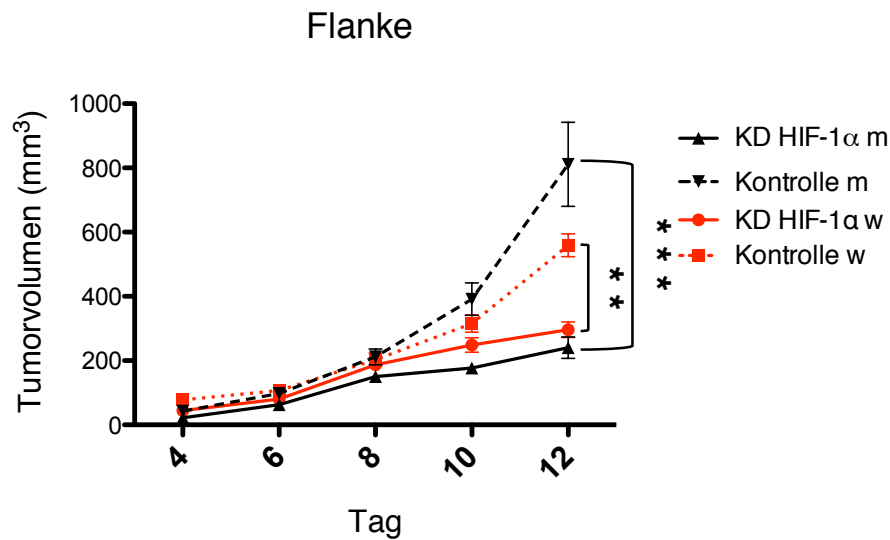


**Abbildung 19: Wachstumskinetiken von LLCpLKO-Tet-On Tumoren nach Induktion mit Doxycyclin *in vivo*.** (A)  $5 \times 10^5$  Zellen wurden 8-10 Wochen alten männlichen und weiblichen C57BL/6 Mäusen injiziert. Die Injektion erfolgte subkutan am rechten Bein. Die Induktion der HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierung in Tumorzellen fand an Tag 6 nach der Injektion statt. Diese erfolgte mit Gabe von 1 mg/ml Doxycyclin und 5% Glukose in das Trinkwasser der Tiere. (B)  $1 \times 10^7$  wurden wie unter A beschrieben subkutan an der linken Flanke der Tiere injiziert und auf gleiche Weise behandelt. Das Tumorstadium änderte sich nach Dox-Gabe im Laufe des Versuchs in allen Gruppen nur wenig. Teilweise erfolgte zum Versuchsende eine komplette Remission. n = 15 in jeder Gruppe. m = Männchen, w = Weibchen. Kontrolle = shscrambled. KD = Knockdown.

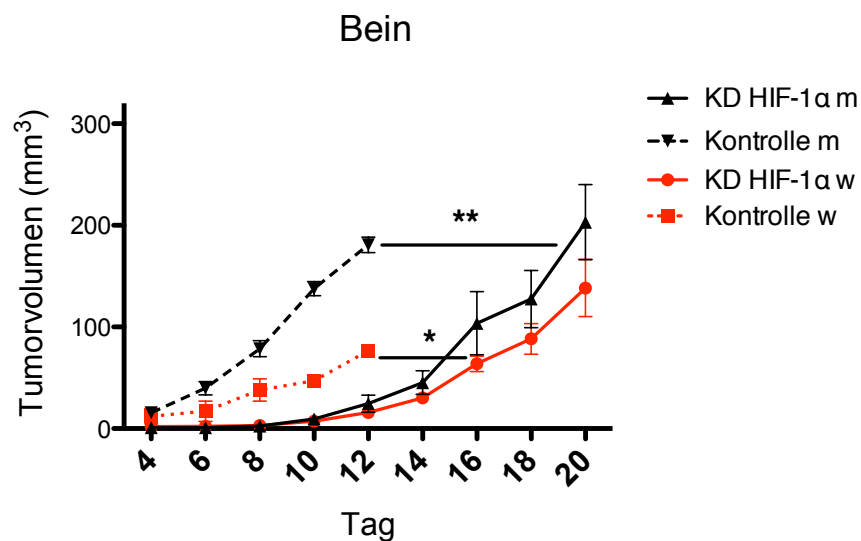
Die initialen Versuche dieser Studie erfolgten am Bein. Dabei zeigte sich ab dem Zeitpunkt der Dox-Induktion ein ungleichmäßiges Wachstum der Tumore in den beiden Geschlechtergruppen, wobei die Tumoren in weiblichen Tieren zum Teil signifikant kleiner waren ( $60,2 \text{ mm}^3$  Kontrolle w Versus  $109,4 \text{ mm}^3$  Kontrolle m, am Tag 12). Das Tumolvolumen änderte sich, abgesehen von einigen Ausreißern (s. Abb. 19 A, Kontrolle m), über die Zeit nur sehr geringfügig. Es konnte zum größten Teil eine komplette Tumorremission am Ende des Versuchs festgestellt werden. Die entnommenen Dox-behandelten Tumoren zeigten einen hämorrhagischen Phänotyp (s. Abb. 22), was aus einer früheren Studie mit dieser Zelllinie bis dato nicht bekannt war (Stockmann *et al.*, 2008). Ein weiteres Problem dieser Versuchsreihe stellte die frühzeitige Ulzeration der Tumore dar. Aus diesem Grund musste ein Teil der Mäuse bei einer teilweise geringen TumorgroÙe aus dem Versuch genommen werden, wodurch es zu deutlichen Unterschieden in der TumorgroÙe innerhalb einer Gruppe kam. Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen wurde zunächst die Injektionsstelle betrachtet. Die C57BL/6 Mäuse sind mit einer Größe von 20-40 g und 10-12 cm Körperlänge (ohne Schwanz) bei Männchen und 18-30 g und 8-10 cm bei Weibchen im Vergleich zu anderen Mausstämmen relativ klein. Demensprechend bietet der Oberschenkel nicht viel Fläche für ein hohes Tumolvolumen und eine schnelle Tumorentwicklung. Zudem steht die Haut an dieser Stelle aufgrund des darunter liegenden Muskels und der fehlenden Fettschicht unter ständiger Spannung, was ein Grund für die vermehrte vorzeitige Ulzeration sein könnte.

Vor diesem Hintergrund wurden die nächsten Versuche an der linken Flanke der Tiere durchgeführt, wo die Tumoren ein größeres Volumen erreichten. Nichtsdestotrotz änderten sich die Wachstumskinetiken der Dox-induzierten Tumore auch in diesen Versuchen nicht (s. Abb. 19 B) wesentlich. Teilweise wurde erneut eine Tumorremission und der bereits oben beschriebene hämorrhagische Phänotyp der Tumore in den behandelten Gruppen verzeichnet. Angesichts der Ergebnisse der durchgeführten Experimente lag die Vermutung nahe, dass die beobachteten Resultate Dox-abhängig waren. Um das verifizieren zu können, wurde in darauffolgenden Studien ein lentiviral generiertes, konstitutives System, das nicht mit Dox induziert werden musste, benutzt.

A



B

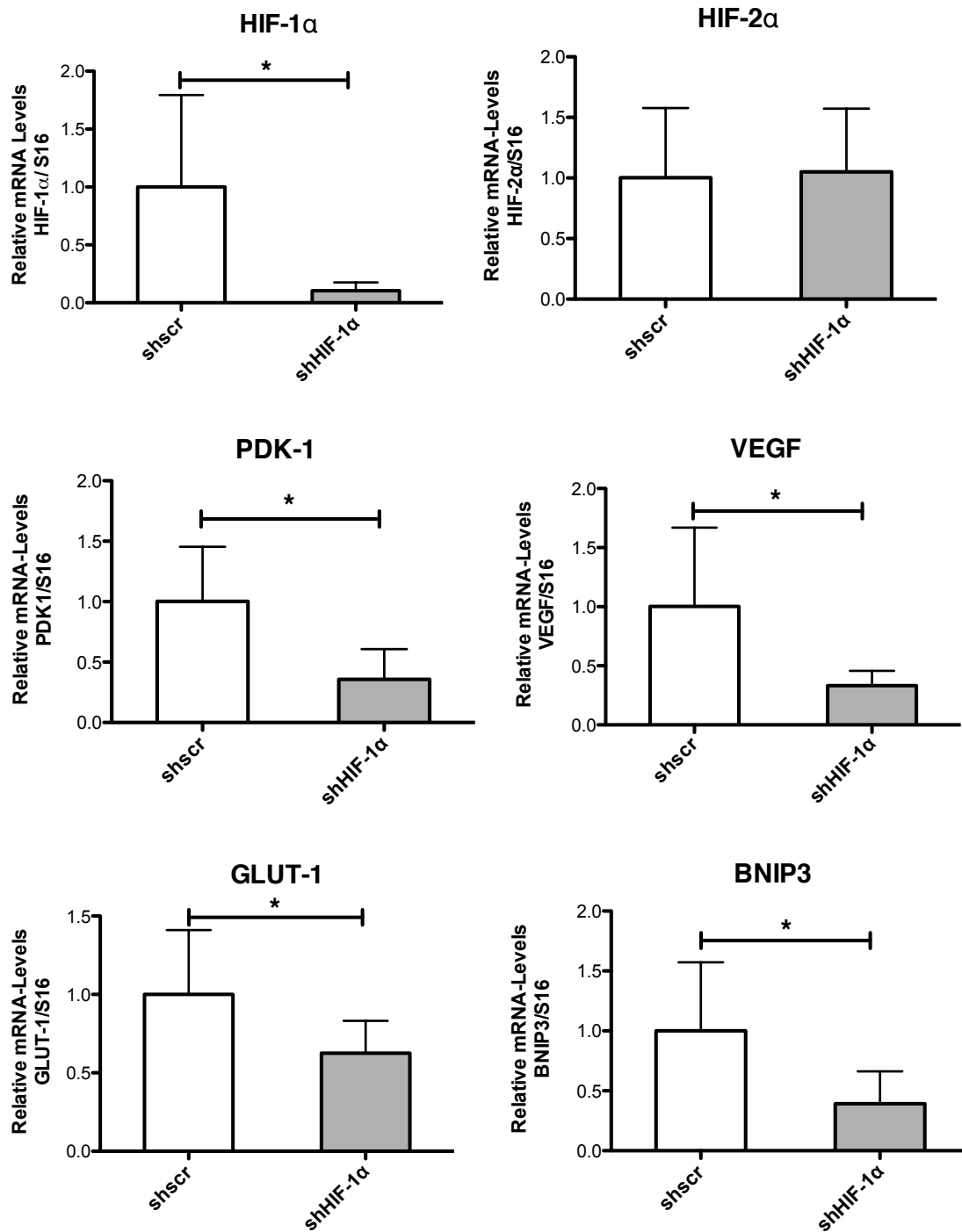


**Abbildung 20: Konstitutive HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierung führt zur signifikanten Wachstumsverzögerung von LLCpLKO.1-shHIF-1 $\alpha$ -Tumoren. (A)** Das Tumorzellen nach Versuchsende war in den Kontrollen, sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen, signifikant höher als in HIF-inhibierten Gruppen. **(B)** In beiden Geschlechtergruppen war das Wachstum von HIF-inhibierten Tumoren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant verzögert. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).  $n = 5$  in jeder Gruppe. m = Männchen, w = Weibchen. Kontrolle = shscrambled. KD = Knockdown.

Wie die Abb. 20 zeigt, konnten mit diesem konstitutiven System letztendlich die aus der Literatur (Stockmann *et al.*, 2008) bekannten Wachstumskinetiken der WT LLC Zellen in den Kontrollgruppen, sowohl am Bein als auch an Flanke, gezeigt werden. Es konnten jedoch auch in diesem System teilweise signifikante Unterschiede in der TumorgroÙe zwischen den beiden Geschlechtergruppen festgestellt werden. Bis heute wurde diese Beobachtung nicht in der Literatur beschrieben. Eine Aufklärung des Effekts war jedoch nicht Teil dieser Arbeit.

Durch die Inhibition von HIF-1 $\alpha$  in den Tumoren kam es zu einer hoch signifikanten Verzögerung im Wachstum (\*\* $p < 0,01$  Männchen versus \* $p < 0,05$  Weibchen, Abb. 20 B) und Unterschieden in den Tumolvolumina (\*\* $p < 0,001$  Männchen versus \*\* $p < 0,01$  Weibchen, Abb. 20 A) von HIF-1 $\alpha$ -inhibierten im direkten Vergleich zu den Kontroll-HIF-1 $\alpha$ -kompetenten Tumoren. Dieses Ergebnis steht somit in Übereinstimmung mit der bereits *in vitro* gezeigten, signifikanten Verminderung der Zellproliferation (s. Kap. 4.2.1) und erhöhten Apoptoserate nach HIF-1 $\alpha$ -Inhibition. (s. Kap. 4.2.2).

Zusätzlich konnte auch die Hemmung der Expression der HIF-1 $\alpha$  Untereinheit und von wichtigen HIF-1 $\alpha$  Zielgenen in dem entnommenen Tumorgewebe auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (s. Kap. 3.2.6). Dabei waren das pro-apoptotische *BNIP3* (*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein3*) (Ray, 2000), das pro-proliferative *PDK-1* (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*) und der Angiogenese-fördernde Faktor *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) signifikant verringert (s. Abb. 21). Die Expression von HIF-2 $\alpha$  blieb dabei unverändert, wobei davon auszugehen ist, dass die HIF-2 $\alpha$  mRNA aus dem Tumorstroma stammt, da dieser Faktor in den LLC-Zellen nicht nachweisbar war.



**Abbildung 21: Darstellung des Expressionsmusters von HIF-1α Zielgenen im Maus-Tumorgewebe.** Die mRNA Levels wurden nach dem Ende des Versuchs in dem isolierten Tumorgewebe gemessen. Es wurde eine signifikante Verringerung von HIF-1α-Untereinheit und HIF-1α Zielgenen in HIF-inhibierten Tumoren nachgewiesen. Die Levels von HIF-2α waren nicht beeinflusst. shscr (scrambled), n = 6. shHIF-1α, n = 9., \*p<0,05.

Besonders vermerkt werden muss die Tatsache, dass die gezeigten Effekte in den männlichen Mausgruppen deutlich größer waren. Aus diesem Grund wurden für die späteren Bestrahlungsexperimente nur Männchen benutzt.

Nach den durchgeführten Studien standen nun auch die Phänotypen der Tumore von dem Dox-induzierbaren und dem konstitutiven HIF-Inaktivierung-System im direkten Vergleich. Anhand der Bilder in Abb. 22 sind die deutlichen Unterschiede im Tumolvolumen und der Vaskularisierung der Tumoren zu erkennen. Der einzige variable Faktor in diesen Versuchen war Doxycyclin, demnach konnte der dargestellte Effekt Doxycyclin-abhängig sein.

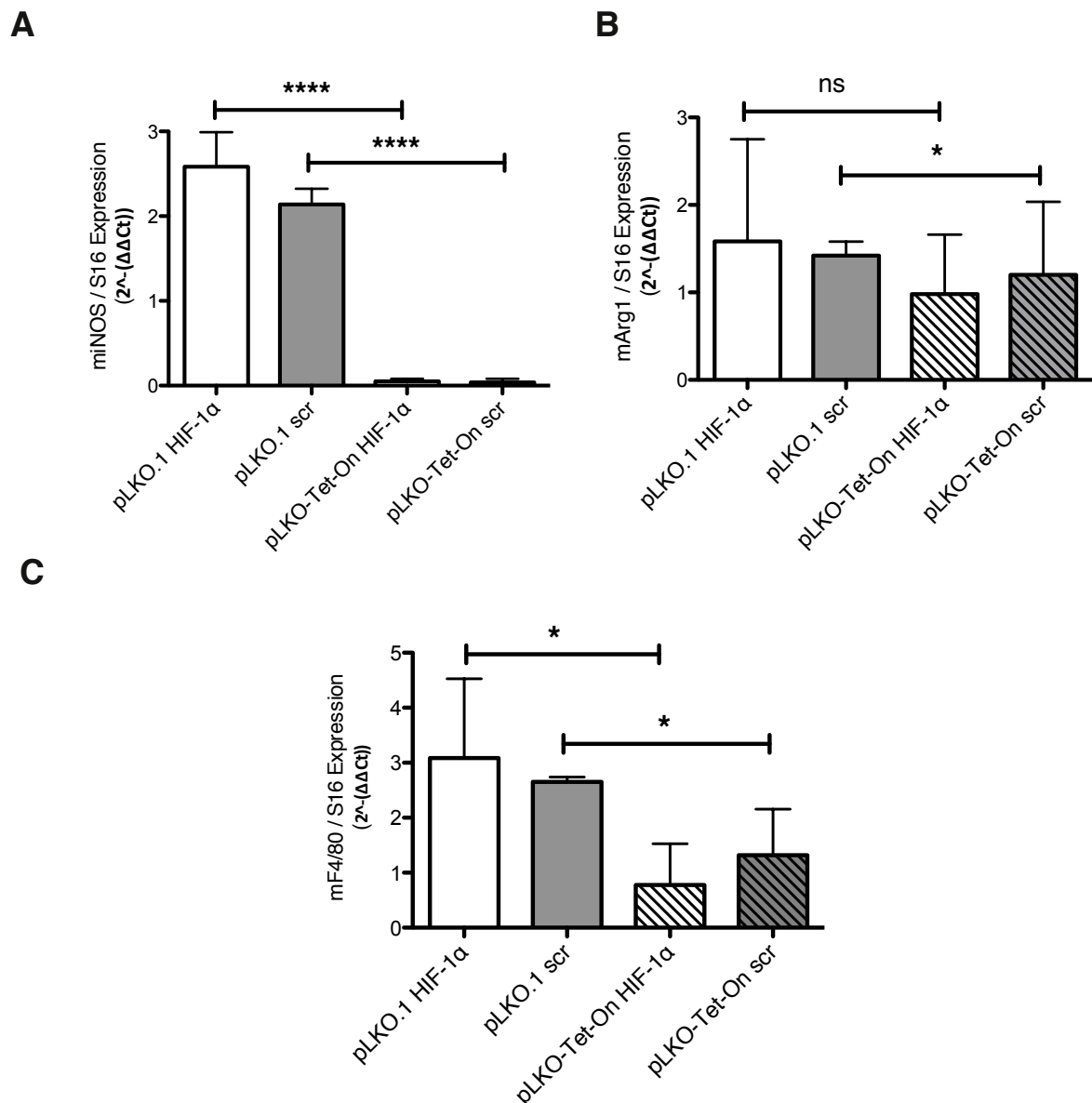


**Abbildung 22: Doxycyclin führt zu einem hämorrhagischen Phänotyp von LLC Tumoren in immunkompetenten Mäusen. (A)** Gezeigt ist ein kompletter dox-behandelter LLCpLKO-Tet-On-shHIF-1 $\alpha$  Tumor mit einer Größe von 60 mm<sup>3</sup> nach 16 Tagen im Experiment (links) und im Querschnitt (rechts). **(B)** Ein Tumor mit dem konstitutiven System mit einer Größe von 200 mm<sup>3</sup> nach 16 Tagen im Experiment. Es wurde ein deutlicher Unterschied im Tumolvolumen und der Vaskularisation festgestellt.



Zu Anfang dieses Projektes war über den Einfluss von Doxycyclin auf das Immunsystem nichts bekannt. Zudem wurde das Dox-induzierbare System bereits in einigen *in vivo* Studien beschrieben (Laurenti *et al.*, 2010; Wiederschain *et al.*, 2009). Die meisten dieser Studien wurden jedoch an immundefizienten Nacktmäusen durchgeführt. Erst 2014 wurde in der Publikation von He und Marneros beschrieben, dass Doxycyclin die Makrophagen-Polarisation und als Konsequenz die Neovaskularisation beeinflusst.

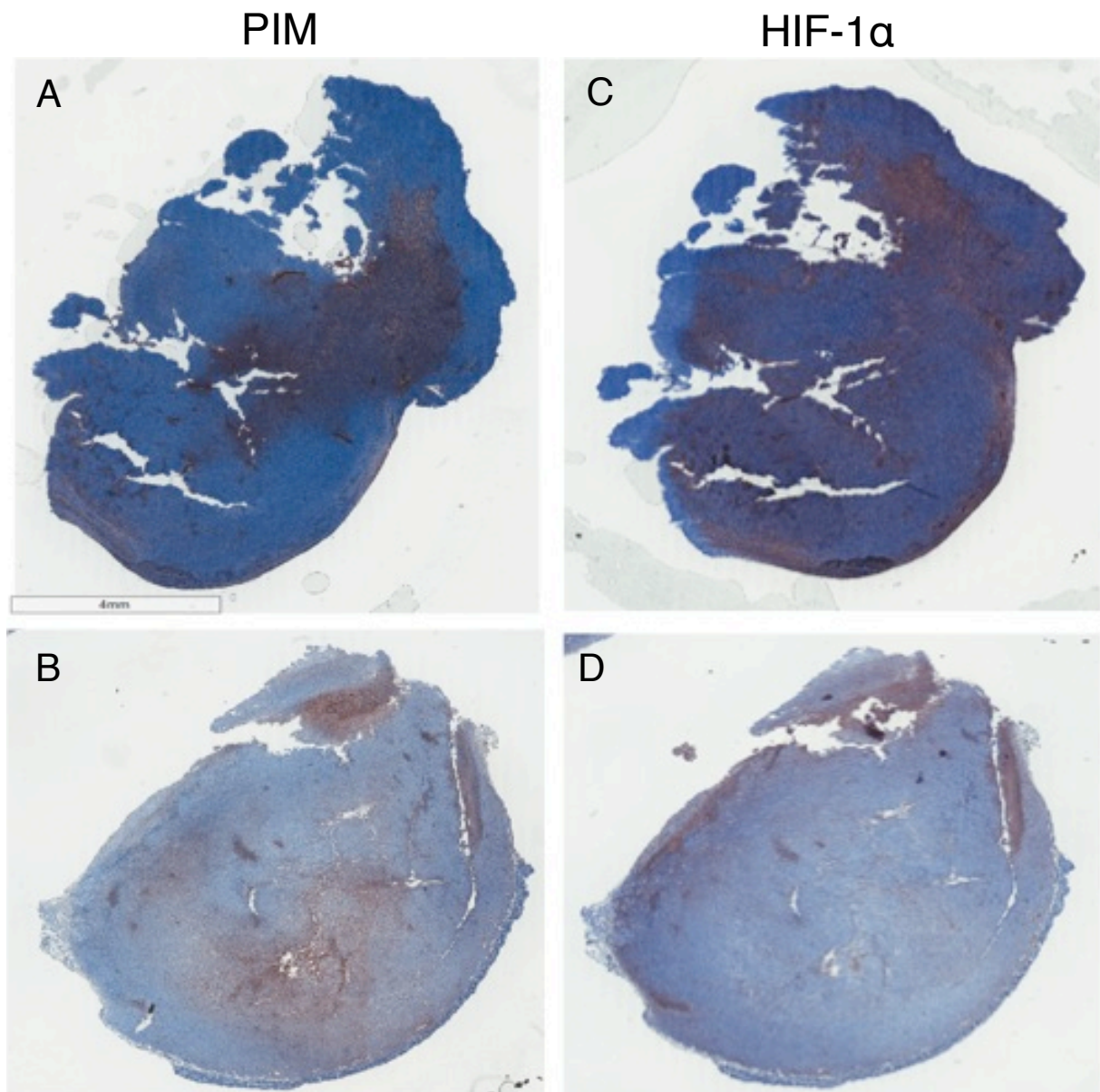
Vor diesem Hintergrund wurden im Weiteren die Expressionslevels von Makrophagenmarkern in dem isolierten Tumorgewebe sowohl in der Dox-induzierten Gruppe als auch in der Gruppe mit der konstitutiven HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierung gemessen. Die Messung zeigte eine hoch signifikante Verringerung (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) des Markers von anti-angiogenen Makrophagen von Typ I (M1) iNOS und des Arg1 der pro-angiogenen M2-Makrophagen in den Dox-behandelten Tumoren (s. Abb. 23 A+B).



**Abbildung 23: Doxycyclin beeinflusst die intratumoralen Makrophagenlevel negativ.** Die mRNA-Levels wurden nach dem Ende des Versuchs in isoliertem Tumorgewebe gemessen (**A**). Der M1 Makrophagenmarker ist in Dox-behandelten Tumoren hoch signifikant verringert. (**B+C**). Die Levels des M2 Makrophagenmarkers und die des generellen Markers F4/80 sind ebenfalls signifikant erniedrigt. pLKO.1 = konstitutiver shHIF-1 $\alpha$  Vektor. pLKO-Tet-On = Dox-induzierbare shHIF-1 $\alpha$  Vektor. scr =scrambled unspezifische shRNA Kontrolle. n = 6 in jeder Gruppe (\*\*\*\*p<0,0001, \*p<0,05).

Auch die Spiegel des generellen Makrophagenmarkers F4/80 waren durch die Behandlung der Tumore mit Dox signifikant vermindert (s. Abb. 23 C). Vor dem Hintergrund der negativen und unerwünschten Effekte, die mit dem Dox-induzierbaren System in den immunkompetenten C57BL/6 Mäusen aufgekommen waren, wurden alle nachfolgenden Bestrahlungsexperimente auf das konstitutive System umgestellt.

Einen weiteren Punkt, der für das Design der Bestrahlungsexperimente mit einem HIF-Inaktivierungs-System wichtig war, stellte der Nachweis von hypoxischen Bereichen im Tumorgewebe dar. Besonders bei dem nur geringen Tumolvolumen, das bei der Injektion am Bein erreicht wurde, konnte nicht sicher davon ausgegangen werden, dass sich eine ausreichende Tumorphoxie entwickelte. Zu diesem Zweck wurden immunhistochemische Färbungen zur Markierung von hypoxischen Arealen mit Pimonidazol (PIM) an Tumorgewebe durchgeführt (s. Kap. 3.3.6). PIM gehört zu der Gruppe der 2-Nitroimidazole und wurde ursprünglich als Verstärker für die Strahlentherapie hergestellt (Franko und Chapman, 1982). Bei einem  $O_2$ -Partialdruck  $<10\text{mmHg}$  wird es durch das Enzym 2-Nitro-Reduktase reduziert und bindet an freie Thiol-Gruppen (Raleigh *et al.*, 1985). Diese PIM-Verbindungen lassen sich mit Hilfe von spezifischen anti-PIM-Antikörpern immunhistochemisch nachweisen. Anhand der Färbung konnte gezeigt werden, dass sowohl in Flanken Tumoren, die eine Größe von  $500\text{-}700\text{ mm}^3$  erreichten, als auch in kleineren Bein Tumoren, schon bei einer Größe von  $50\text{-}100\text{ mm}^3$ , hypoxische Bereiche nachzuweisen waren (s. Abb. 24 A+B), wobei die Hypoxie in den Flanken-Tumoren durch ausgedehntere DAB-Färbung deutlicher ausgeprägt war. Somit konnten auch Bein-Tumoren zur Untersuchung der HIF-abhängigen Strahlensensitivierung in Bestrahlungsexperimenten *in vivo* eingesetzt werden. Die gleichzeitig durchgeführte HIF-1 $\alpha$  Färbung deckte sich nur teilweise mit den PIM gefärbten Bereichen. Die Expression von HIF-1 $\alpha$  konnte im Vergleich dazu im nahezu kompletten Tumorgewebe der Kontrolle detektiert werden (s. Abb. 24 C). Im Weiteren wurde in den HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Tumoren eine deutlich erkennbare Reduktion der HIF-1 $\alpha$  Protein Expression dargestellt (s. Abb. 24 D). Dieses Ergebnis unterstreicht die Funktionalität des konstitutiven HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierungs-Systems *in vivo*.



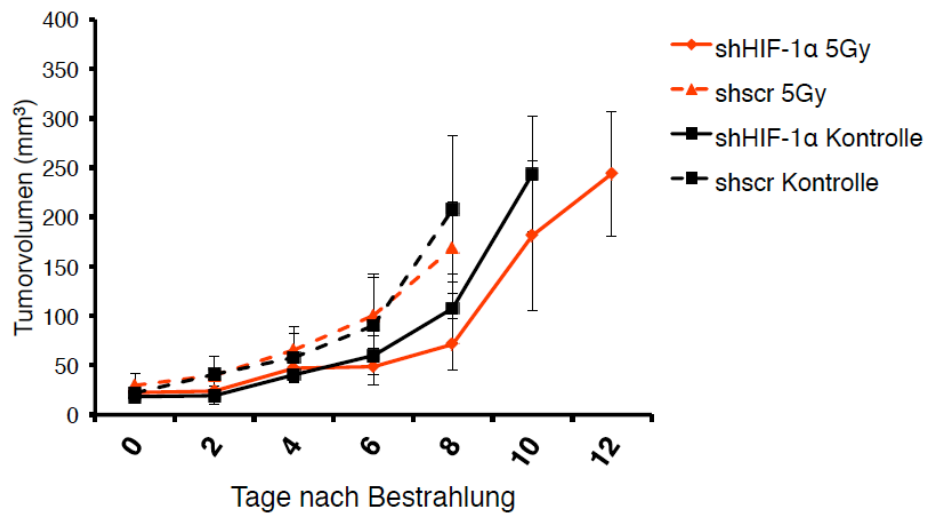
**Abbildung 24: Immunhistologische Darstellung von hypoxischen Bereichen und HIF-1 $\alpha$ -Expression im Maus-Tumorgewebe. (A)** Pimonidazol-Färbung mit DAB (Braun) an einem Flankentumor. Die Tumorzellen waren transduziert mit einer Kontroll-Sequenz (shscr). Zu erkennen ist eine ausgeprägte zentral lokalisierte Hypoxie. **(B)** Pimonidazol-Färbung in einem kleineren Bein-Tumor (60 mm<sup>3</sup>). Die Tumorzellen waren mit einem shHIF-1 $\alpha$ -Vektor transduziert. Hypoxische Bereiche sind zentral vorhanden. **(C)** HIF-1 $\alpha$ -DAB-Färbung an einem seriellen Schnitt des Tumors aus (A). Die HIF-Expression deckt sich nur teilweise mit der Pimonidazol-Färbung und ist über den Tumor verteilt. **(D)** HIF-1 $\alpha$ -Färbung in einem seriellen Schnitt des Tumors aus (B). HIF-Inhibition (shHIF-1 $\alpha$ ) im Tumor. In den Aufnahmen sind komplette Tumoren dargestellt. Die Maßstabskala entspricht 4 mm.

#### **4.5 HIF-1 $\alpha$ -abhängige Strahlensensitivität *in vivo*.**

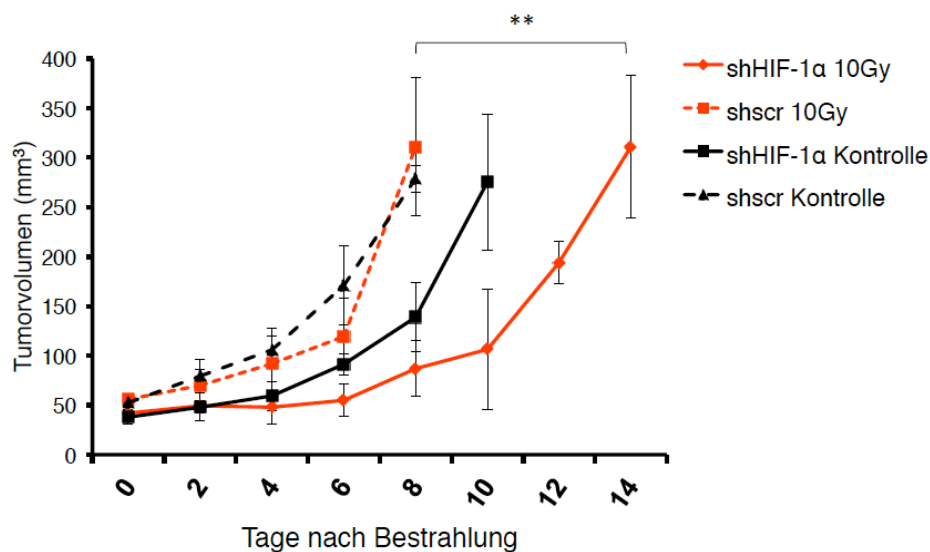
Im Hinblick auf die strahlentherapeutische Bedeutung von HIF wurden in weiteren Versuchsreihen *in vivo* Bestrahlungsexperimente durchgeführt. Die Charakterisierung der Strahlenantwort von HIF-1 $\alpha$  manipulierten versus nicht manipulierten Tumoren, erfolgte über volumetrische Messung. Dabei wurden anhand von Wachstumskurven die Volumenveränderungen des Tumors nach Bestrahlung über die Zeit analysiert und mit den Kontrollen verglichen.

Die initialen Bestrahlungsversuche erfolgten am Bein. Anhand der positiven Ergebnisse bezogen auf die Radiosensitivierung von HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen mit 5 Gy in *in vitro* Versuchen, wurde diese Dosis zunächst auch für das Tumormodell benutzt. In Abb. 25 A sind die Wachstumskinetiken der verschiedenen Tumorguppen nach einer Einzeldosis-Bestrahlung mit 5 Gy dargestellt. Unbestrahlte Tumore der Kontrollgruppe (shscr) erreichten innerhalb von 8 Tagen das 5-fache ihres Ausgangsvolumens. Aber auch die bestrahlten Kontrollen zeigten die gleiche Volumenzunahme in derselben Zeitspanne. In den HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Gruppen konnte eine geringe Wachstumsverzögerung von 2 Tagen in den Kontrollen gezeigt werden, die durch die Bestrahlung sich nur um weitere 2 Tage erhöhte. Diese Verzögerung war nicht signifikant. Aus diesem Grund wurde die Strahlendosis für die nächsten Bestrahlungsversuche verdoppelt. Bei der Einzeldosis-Bestrahlung mit 10 Gy zeigten die beiden Kontrollgruppen (shscr und shscr 10 Gy) erneut keine signifikante Wachstumsverzögerung. In der HIF1 $\alpha$ -inhibierten Gruppe verzögerte sich hingegen das Wachstum der bestrahlten Tumore im Vergleich zu den scr Kontrollen jetzt signifikant um 6 Tage. Das 5-fache des Ausgangsvolumens wurde nun erst nach 14 Tagen erreicht (s. Abb. 25 B).

A



B

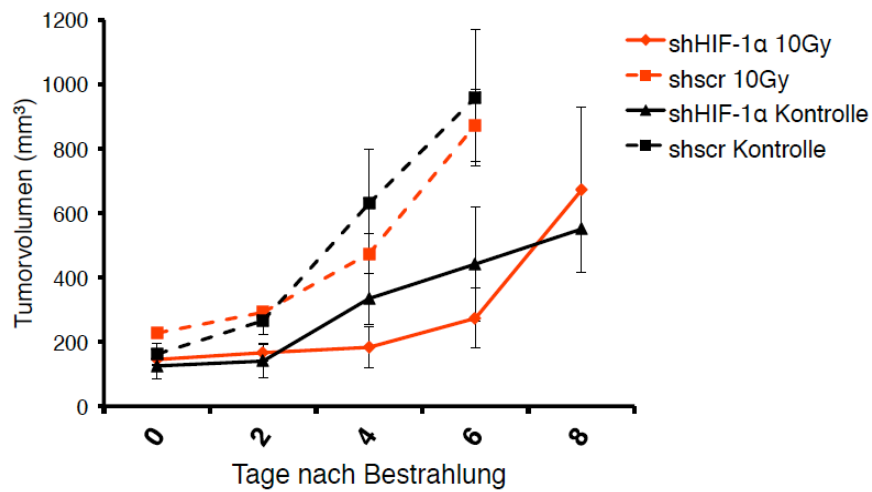


**Abbildung 25: Dosis und HIF-Status abhängige Sensitivierung von LLCpLKO.1-shHIF-1α-Zellen in einem Allograft-Tumor Modell am Bein.** (A) Tumoren wurden bei einer Größe von 50 mm<sup>3</sup> mit einer Einzeldosis von 5 Gy oder 10 Gy (B) am Bein bestrahlt. Die Kontrollen wurden demselben Protokoll unterworfen, allerdings nicht bestrahlt (sham). Die HIF-inhibierten Tumore zeigen eine signifikante strahleninduzierte Wachstumsverzögerung. n = 5 in jeder Gruppe. \*\*p<0,01.

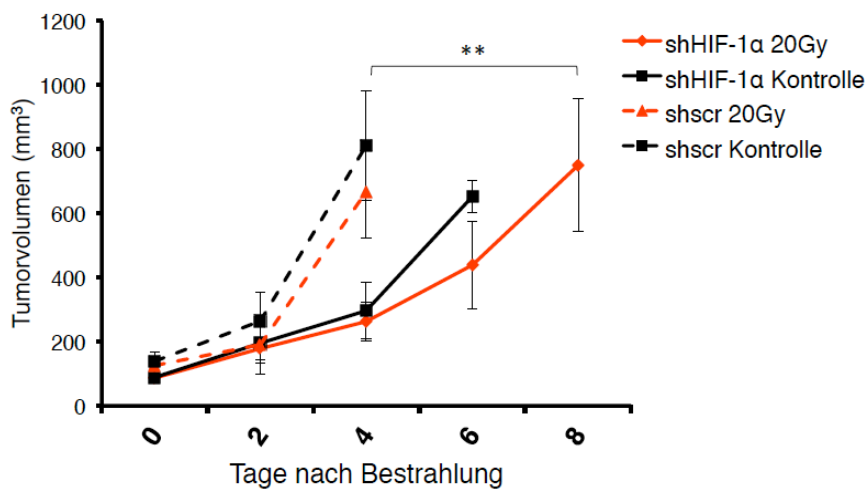
Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand zudem in der Etablierung einer Flanken-Bestrahlung. Wie in Kap. 4.3 gezeigt, konnten die Flankentumore innerhalb des gleichen Zeitintervalls teilweise das 4-fache des Volumens eines Beintumors erreichen. Somit war es möglich, diese Tumore bei einem signifikant größeren Volumen zu bestrahlen. Ein größeres Tumolvolumen bedeutet auch, dass mehr hypoxische Bereiche vorhanden sind. Wie bereits durch die Pimonidazol-Färbung gezeigt (s. Abb. 24), war zwar auch in den Beintumoren Hypoxie vorhanden, jedoch war die Fläche und die Ausprägung der Hypoxie in Flankentumoren größer. Bei einem System, das auf HIF Manipulation basiert, ist es demnach wichtig Tumore zu bestrahlen, die eine ausgeprägte Hypoxie aufweisen. In weiteren Experimenten wurden Flankentumore mit einer Einzeldosis von 10 Gy bestrahlt (s. Abb. 26 A). Die Ergebnisse zeigten in diesem Versuchsaufbau keinen strahlungsinduzierten Effekt. Es kam in keiner der beiden Gruppen (shscr und shHIF) zu einer Wachstumsverzögerung aufgrund der Bestrahlung. Da der Effekt wahrscheinlich aufgrund des signifikant erhöhten Tumolvolumens auftrat und somit das Tumolvolumen-Dosis-Verhältnis nicht mehr optimal war, wurde in den nächsten Versuchen mit der doppelten Dosis von 20 Gy bestrahlt.

In Abb. 26 B und C sind die Wachstumskinetiken der Tumore zwei aufeinander folgender Versuche dargestellt, die unter identischen Bedingungen durchgeführt worden waren. Bei der Strahlendosis von 20 Gy konnte jetzt erneut eine signifikante strahleninduzierte Wachstumsverzögerung von HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Tumoren im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden. Allerdings verringerte sich die Wachstumsverzögerung in diesem Versuchsaufbau, im Vergleich zu dem Bestrahlungsversuch mit 10 Gy am Bein, von sechs auf vier Tage. Das weist auf einen Dosis-Volumen-Zusammenhang hin. Anzumerken ist auch die Tatsache, dass die Kontroll-Tumore (shscr) in beiden Versuchen unterschiedlich reagierten. Im ersten Versuch konnte keine strahleninduzierte Antwort in den bestrahlten Kontrollen (shscr 20 Gy) beobachtet werden, wohingegen im zweiten Versuch sich das Wachstum der bestrahlten Gruppe um 2 Tage verzögerte.

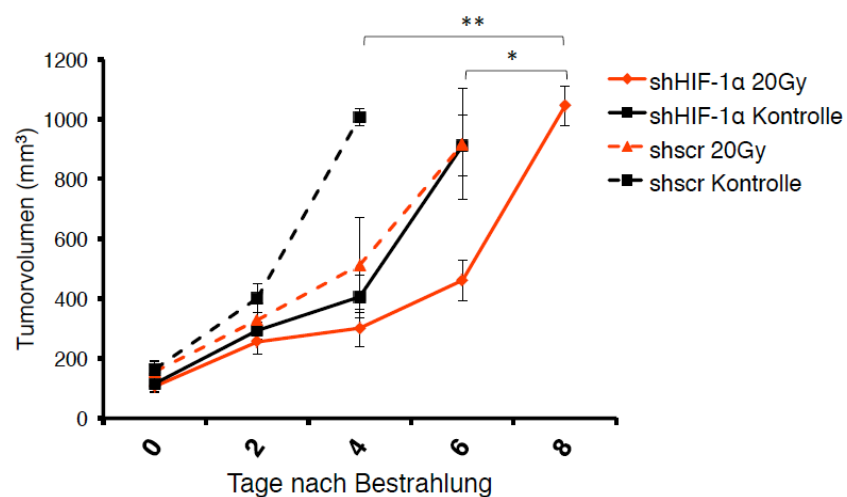
A



B

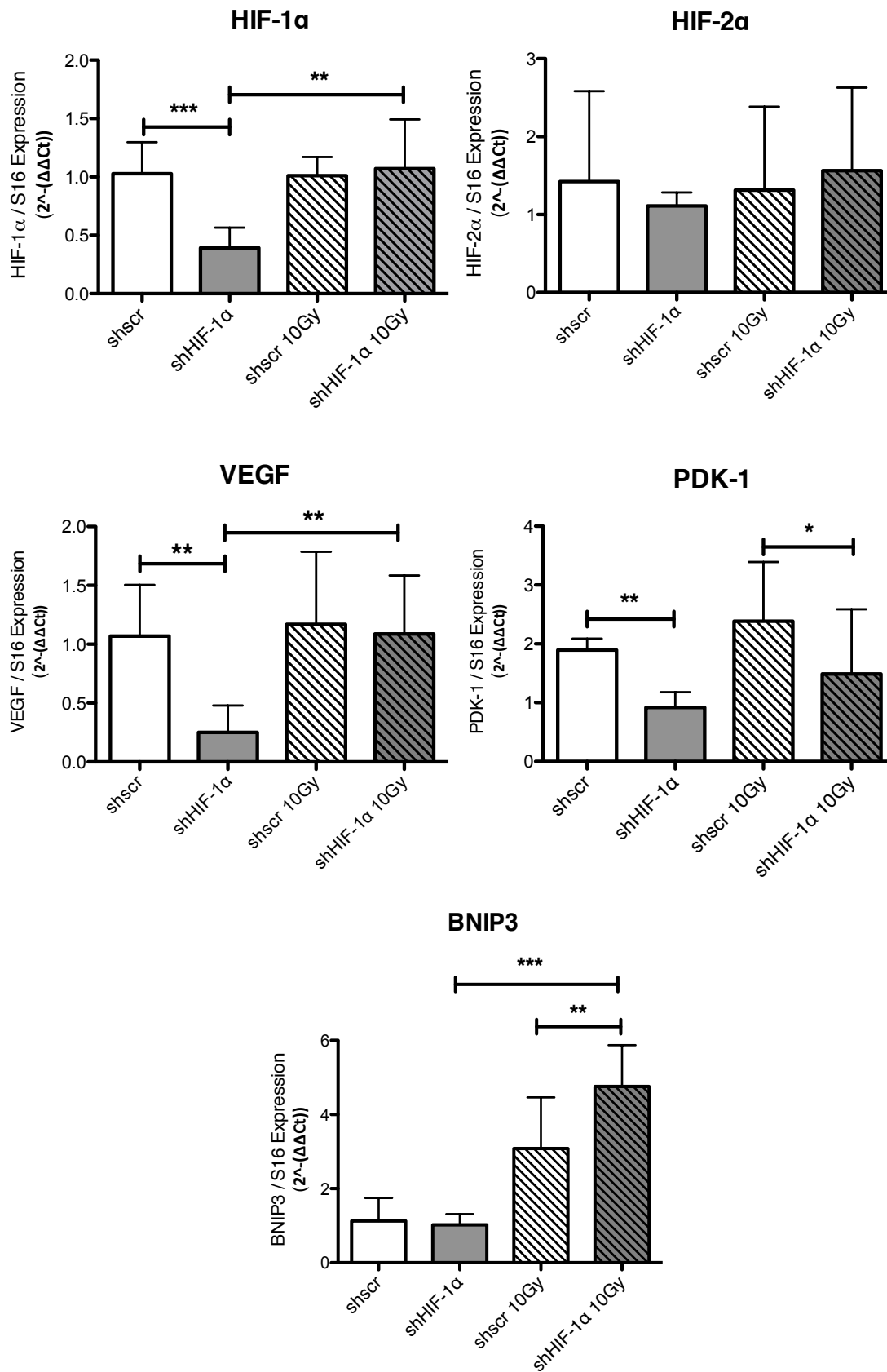


C



**Abbildung 26: Dosis und HIF-Status abhängige Sensitivierung von LLCpLKO.1-shHIF-1α-Zellen in einem Allograft-Tumor Modell an Flanke. (A)** Tumoren wurden bei einer Größe von 100-150 mm<sup>3</sup> mit einer Einzeldosis von 10 Gy oder 20 Gy **(B+C)** an Flanke bestrahlt. Die Kontrollen wurden „sham“ bestrahlt. n = 5 in jeder Gruppe. \*\*p<0,01, \*p<0,05.





**Abbildung 27: Expressionsmuster von wichtigen HIF-1α Zielgenen vor und nach Bestrahlung im Maus-Tumorgewebe.** scr = scrambled unspezifische shRNA Kontrolle. n = 5 in jeder Gruppe  
 \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01.

Als nächstes wurden die Expressionsmuster von den beiden HIF-Untereinheiten und der HIF-1 $\alpha$  Zielgene in bestrahlten Tumoren untersucht und mit den Kontrollen verglichen (s. Abb. 27). Zu diesem Zweck wurde RNA aus dem mit 10 Gy am Bein bestrahlten Tumorgewebe analysiert, weil hier die strahleninduzierte Antwort der Behandlungsgruppe am deutlichsten war. In den HIF-1 $\alpha$ -inhibierten unbestrahlten Tumoren konnte für HIF-1 $\alpha$  Zielgene (*VEGF* und *PDK-1*) erneut, wie schon in den Vorversuchen (s. Kap. 4.3, Abb. 21) dargestellt, eine signifikante Abnahme der mRNA Expression festgestellt werden. Nach Bestrahlung änderte sich das Expressionsmuster. Ein signifikanter Anstieg an *HIF-1 $\alpha$*  und besonders an *VEGF*-mRNA konnte in HIF-inhibierten Zellen, jedoch nicht in den Kontrollen (scr), nach Bestrahlung detektiert werden. Wohingegen die Levels des pro-proliferativen Faktors *PDK-1* infolge der HIF-1 $\alpha$ -Inhibition, sowohl in Kontrollen als auch in bestrahlten Tumoren, gesenkt waren. Der pro-apoptotische Faktor *BNIP3* schien in dieser Versuchsreihe in den nicht bestrahlten Tumoren nicht durch HIF-1 $\alpha$  reguliert zu sein. Durch Bestrahlung mit 10 Gy wurden die Levels an *BNIP3* in beiden Gruppen (shscr und shHIF-1 $\alpha$ ) im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen signifikant erhöht. In HIF-1 $\alpha$ -inhibierten, bestrahlten Tumoren war dieser Effekt signifikant höher (s. Abb. 27, shscr 10 Gy versus shHIF-1 $\alpha$  10 Gy). Die HIF-2 $\alpha$ -mRNA Expression blieb in allen Gruppen unbeeinflusst. Die gesteigerte Expression des pro-apoptotischen Faktors *BNIP3* in den HIF-inhibierten Tumoren, auf der einen Seite und die gesenkten Levels an *PDK-1*, unterstreichen den wachstumsverzögernden Effekt der nach Bestrahlung *in vivo* festgestellt werden konnte. Dieser korreliert auch mit den *in vitro* dargestellten Ergebnissen.

## 5. Diskussion

Die Behandlung von malignen Tumoren mit ionisierender Strahlung ist schon seit mehreren Jahrzehnten ein fester Bestandteil in der gezielten Krebstherapie und ist entscheidend für die Überlebenswahrscheinlichkeit vieler Patienten. Doch obwohl die physikalischen Methoden der Applikation weiter verbessert und präzisiert wurden, führen biologische Faktoren wie die Tumorphoxie zur erhöhten Resistenz vieler Tumorarten. Angesichts der in der Einleitung beschriebenen zentralen Bedeutung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  für die Vermittlung von Therapieresistenz in diversen Tumorentitäten ist die Entwicklung von Substanzen zur Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  daher ein aktuelles Ziel der Forschung. Diese Arbeit versucht, den Mechanismus der durch HIF-1 $\alpha$ -induzierten Strahlenresistenz in Malignomen zu erklären und könnte somit zur Verbesserung der klinischen Therapieansätze beitragen. Durch eine lentiviral vermittelte Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  konnten sowohl dessen Aktivierung als auch die HIF-vermittelten Signalwege effektiv inhibiert werden. Die funktionelle Inaktivierung steigerte signifikant die Sensitivität von LLC Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung *in vitro* und *in vivo*.

### **5.1 Die Auswirkungen der HIF-1 $\alpha$ Inaktivierung auf die Strahlensensitivität von Tumorzellen**

Eine Reihe von klinischen und experimentellen Studien lässt vermuten, dass HIF-1 $\alpha$  für Wachstum, Progression und Metastasierung solider Malignome mitverantwortlich ist. Diese Studien zeigen, dass die erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$  in einer Vielzahl maligner Tumoren mit einer ungünstigen klinischen Prognose korreliert, wie beispielsweise beim Pankreas-, Zervix- und Mamma-Karzinom (Semenza, 2002). Zudem führten Ansätze einer gentechnischen und pharmakologischen Inhibition von HIF-1 $\alpha$  in murinen Tumormodellen zur Reduktion des Tumorstwachstums, wobei eine erhöhte Apoptoserate, eine reduzierte Angiogenese und eine fehlende metabolische Adaptation als mögliche Mechanismen diskutiert werden (Sasabe *et al.*, 2007;

Moeller und Dewhirst, 2006; Brown *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2005; Stoeltzing *et al.*, 2003). Auf der anderen Seite wurde auch gezeigt, dass die durch HIF-1 $\alpha$ -Inhibition vermittelte Sensitivierung in erster Linie stark von dem lokalen Mikromilieu abhängt. Demnach würde die HIF-1 $\alpha$ -Inhibition bei hypoxischen Tumorzellen, die Zugang zu glykolytischen Energiereserven haben, eher zu einer Erhöhung der Proliferationsrate durch die Unterdrückung der G1 Blockade bei gleichzeitiger Senkung des apoptotischen Potentials durch Inhibition von p53 führen. Als Konsequenz würden diese Zellen nicht sensitiviert werden. Zusätzlich könnte die HIF-1 $\alpha$ -Inhibition in nahezu anoxischen und nährstoffunterversorgten „distalen“ Tumorzellen sogar zu einer signifikant gesteigerten Resistenz führen (Moeller *et al.*, 2005). Aufgrund der Gegensätzlichkeit der Ergebnisse wurden in dieser Arbeit initial die Auswirkungen einer spezifischen HIF-1 $\alpha$ -Inhibition im Hinblick auf die Zellvitalität, die Zellzyklus-Verteilung und das apoptotische Potential untersucht.

### **5.1.1 Einfluss der HIF-1 $\alpha$ Inaktivierung auf die Zellvitalität infolge der Bestrahlung**

Die Ergebnisse in diesem Projekt, basierend auf der induzierbaren shRNA-Interferenz bzw. HIF-Inaktivierung (s. Kap. 4.1, Abb. 7 und 8) in einem hypoxischen *in vitro* Modell mit vollem Nährstoffzugang, gehen konform mit der mehrfach dargestellten Korrelation zwischen HIF-1 $\alpha$ -Inhibition und Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung. Es konnte eindeutig dargestellt werden, dass eine selektive Unterdrückung von HIF-1 $\alpha$  vor der Bestrahlung in HIF-2 $\alpha$ -defizienten LLC-Zellen (s. Abb. 9) in einer signifikant verminderten metabolischen Aktivität infolge der Bestrahlung resultiert (s. Kap. 4.2, Abb. 11). Die Tatsache, dass dieser Effekt aufgehoben war, wenn HIF-1 $\alpha$  erst nach der Bestrahlung inaktiviert wurde, spricht einerseits für eine spezifische HIF-1 $\alpha$ -abhängige Wirkung, andererseits für die Bedeutung des zeitlichen Verlaufs der HIF-1 $\alpha$ -Expression hinsichtlich der Radiosensitivität. Demnach ist die Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  vor der Strahlentherapie am wirkungsvollsten. Die Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  resultierte in einem signifikant verminderten Überleben im klonogenen Assay und demzufolge in

einer Strahlensensibilisierung der HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Das verminderte klonogene Potential von HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen zeigt den bestimmenden Einfluss von HIF-1 $\alpha$  auf das Überleben von sauerstoff- und nährstoffunterversorgten (Tumor-) Zellen (s. Kap. 4.2.3, Abb. 14). Der Mechanismus der sensitivierenden Wirkung von HIF-1 $\alpha$  kann vielfältig sein. Als Reaktion auf die Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlung bleiben der Zelle verschiedene Möglichkeiten, nämlich a) zu sterben, b) einen Zellzyklus-Arrest einzuleiten oder c) DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren. Aus diesem Grund wurde als Nächstes das apoptotische Verhalten von HIF-1 $\alpha$ -kompetenten und –inhibierten hypoxischen Tumorzellen untersucht.

### 5.1.2 HIF-1 $\alpha$ : pro- oder anti-apoptotisch?

Die Rolle von HIF-1 $\alpha$  in der Regulation von Apoptose ist sehr komplex und vom Kontext abhängig. HIF-1 $\alpha$  kann sowohl proapoptotisch als auch antiapoptotisch wirken. In Primärzellen verursacht die Hypoxie in erster Linie Zellzyklus-Arrest und HIF-abhängige Apoptose (Greijer und van der Wall, 2004). Auch in bestrahlten Tumorzellen wirkt das Protein, anhand der Ergebnisse einiger Studien, eher proapoptotisch durch Interaktion mit p53. Potentielle Wechselwirkungen von p53 und HIF-1 $\alpha$  werden in der Literatur auch sehr widersprüchlich diskutiert (Hammond und Giaccia, 2006). Dabei zeigten An *et al.*, dass die Stabilisierung von p53 unter Hypoxie von HIF-1 $\alpha$  abhängt. HIF-1 $\alpha$  vermittelt die Phosphorylierung und somit eine direkte Stabilisierung und Aktivierung von p53 und, dem nachgeschaltet, die Apoptose (An *et al.*, 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Anhand der Annexin/PI Analysen stellte sich eine anti-apoptotische Wirkung von HIF-1 $\alpha$  in LLC Zellen dar. Die HIF-1 $\alpha$ -kompetenten, hypoxischen Zellen reagierten auch nach Bestrahlung nicht mit einer gesteigerten Apoptoserate. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der prozentuale Anteil der apoptotischen Fraktion nach HIF-1 $\alpha$ -Inhibition in unbestrahlten Tumorzellen signifikant um 30% (s. Kap. 4.2.2, Abb. 12). Dieser Effekt war jedoch p53 unabhängig, denn eine deutlich gesteigerte Phosphorylierung von p53 konnte in der Western Blot Analyse nicht detektiert

werden (s. Kap. 4.3, Abb. 18). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen von Wenger *et al.*, der ebenfalls keine Abhängigkeit zwischen HIF-1 $\alpha$  und der Stabilisierung von p53 beschrieb (Wenger *et al.*, 1998). Auf der anderen Seite konnte in Folge der Bestrahlung eine geringe Zunahme des phosphorylierten p53 in HIF-1 $\alpha$ -inhibierten im Vergleich zu den Kontroll-Zellen gezeigt werden, doch diese Veränderung resultierte nicht in einer gesteigerten Apoptose (s. Kap. 4.2.2, Abb. 12). Interessanterweise war die pro-apoptotische Wirkung der HIF-1 $\alpha$ -Inhibition nach der Bestrahlung signifikant vermindert. Diese Daten sprechen wiederum zunächst für eine eher protektive, p53 unabhängige Wirkung einer HIF-1 $\alpha$ -Inhibition im Kontext der strahleninduzierten Apoptose. Diese Vermutung steht jedoch nicht im Einklang mit dem signifikant gesenkten klonogenen Überleben, der für HIF-1 $\alpha$ -inhibierte, bestrahlte LLC-Zellen dargestellt wurde (s. Kap. 4.2.3, Abb. 14). Die Erklärung dafür könnte in dem Untersuchungszeitraum liegen. Die Apoptoserate wurde nach dem experimentellen Design 72 Stunden nach Bestrahlung durchgeführt, wohingegen das klonogene Assay das Überleben mindestens 10 Tage nach Bestrahlung widerspiegelt. Zudem, wie schon weiter oben im Text beschrieben, kann die zelluläre Antwort auf die DNA-Schädigung anstatt in Apoptose, zunächst auch in einem Zellzyklus-Arrest bestehen.

### 5.1.3 HIF-1 $\alpha$ und die Zellzyklus-Regulation

Koshiji *et al.* zeigten in ihrer Studie von 2004 eine bis dato unbekannte Rolle von HIF-1 $\alpha$  in der Zellzykluskontrolle. In unbestrahlten, hypoxischen Tumorzellen fungiert HIF-1 $\alpha$  als Antagonist von c-Myc und aktiviert auf diese Weise die Cyclin-abhängige Kinase p21<sup>CIP/WAF-1</sup>, ein Schlüsselprotein, das die Kontrollpunkt-Proteine des Zellzyklus inhibiert und einen Zellzyklus-Arrest einleitet, wobei als Konsequenz ein G1-Arrest und Zellwachstums-Inhibition genannt wurden (Koshiji *et al.*, 2004). Anhand der Analyse der Zellzyklus-Phasenverteilung in hypoxischen, unbestrahlten LLC Kontroll-Zellen konnte in dieser Arbeit kein erhöhter Anteil von Zellen in der G1 Phase dargestellt werden (s. Kap. 4.2.3, Abb. 13). Dies steht zum Teil den Ergebnissen von Koshiji entgegen und bestätigt die bereits dargestellte

proliferationsfördernde Wirkung von HIF-1 $\alpha$  in diesen Zellen. Der Bestrahlungs-Stimulus verursacht auf der anderen Seite durch die Hochregulierung von p21<sup>CIP/WAF-1</sup> einen G2/M Arrest in Tumorzellen. Auf diese Weise können Zellen die entstandenen DNA-Schäden reparieren und anschließend entweder im Zellzyklus fortfahren, oder die Apoptose einleiten (Belka, 2006). Nach Bestrahlung wurde auch in dieser Studie eine Änderung der Zellzyklusphasen-Verteilung in Richtung G2/M Arrest dargestellt. In einem Zeitraum von 6 Stunden nach Bestrahlung erhöhte sich der Anteil der G2/M Fraktion unabhängig vom HIF-1 $\alpha$ -Status der Zellen signifikant. Die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Wirkung zeigte sich 24 Stunden nach Bestrahlung. In HIF-1 $\alpha$ -inhibierten LLC-Tumorzellen war der Anteil an G2/M-Fraktion signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Kontrollen zeigten eine bereits wiederhergestellte Zellzyklus-Phasenverteilung, was auf einen Wiedereintritt dieser Zellen aus dem strahlungsinduzierten G2/M Arrest in den Zellzyklus schließen lässt (s. Kap. 4.2.3, Abb. 13). Mit anderen Worten: die Abwesenheit von HIF-1 $\alpha$  hält die bestrahlten Tumorzellen länger im G2/M Arrest. Zellen in G2- und M-Phase sind strahlensensibler, da der Zeitraum für die Reparatur von DNA-Schäden bis zur nächsten Mitose stark eingeschränkt ist (Belka, 2006). Würde man in diesem Zeitraum die HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen erneut bestrahlen, wäre die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass diese den Zelltod einleiten würden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit der HIF-1 $\alpha$ -Inhibition vor der Bestrahlungstherapie, ist aber auch zusätzlich ein Hinweis darauf, dass eine fraktionierte Bestrahlung den Behandlungserfolg der kombinierten Therapie zusätzlich steigern könnte. Um die Auswirkungen des markanten G2/M Arrestes auf das Langzeit-Überleben der HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen zu studieren, wurde zusätzlich das klonogene Assay durchgeführt. Das klonogene Potential, das durch diese Methode dargestellt werden kann, vermittelt die Fähigkeit einzelner Tumorzellen die subletalen DNA-Schäden zu reparieren, erneut in dem Zellzyklus einzutreten und zu proliferieren. Anhand der Analyse konnte gezeigt werden, dass der in HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen favorisierte G2/M Arrest letztendlich nicht in einem Wiedereintritt in den Zellzyklus und Proliferation resultierte, sondern im Zelltod. Das klonogene Potential der HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Fraktion war im Vergleich zu den Kontrollen signifikant gesenkt (s. Kap. 4.2.3, Abb. 14). Abschließend muss noch angemerkt werden, dass gleichzeitig mit der Erhöhung des G2/M Arrestes 6 Stunden nach Bestrahlung eine signifikante

Senkung in der G1 Fraktion in HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen stattgefunden hat. Dies spricht wiederum für die antagonistische Wirkung von HIF-1 $\alpha$  gegenüber c-Myc, die Koshiji *et al.* dargelegt haben. Demnach würde c-Myc in Abwesenheit von HIF-1 $\alpha$  die Cyclin-abhängige Kinase p21<sup>CIP/WAF-1</sup> deaktivieren und den G1 Arrest aufheben.

## **5. 2 Die Bedeutung von HIF-1 $\alpha$ bei den zellulären Reparaturprozessen von Doppelstrangbrüchen**

Ionisierende Strahlung verursacht durch eine unmittelbare Wechselwirkung mit Biomolekülen (direkter Effekt) und auf dem Umweg über die Radiolyseprodukte des Wassers (indirekter Effekt) die Freisetzung von Radikalen, die die DNA schädigen. Auf diese Weise entstehen Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche in der DNA-Helix. Besonders die Doppelstrangbrüche sind für die Zelle schwer zu reparieren. Der „DNA-damage response“ (DDR) Signaltransduktionsweg spielt dabei eine zentrale Rolle. Dieser repräsentiert ein sehr komplexes, evolutionär konserviertes System, das die Transmission der geschädigten DNA verhindert und die genetische Stabilität in gesunden Zellen sichert. Aus der neuesten Literatur ist bekannt, dass in hypoxischen Tumorzellen dieser Weg teilweise unterdrückt wird und dadurch auch die Reparaturprozesse anders als in normoxischen Zellen ablaufen. Dieses Phänomen wird zum Teil für die beschriebene genetische Instabilität und damit verbundene, erhöhte Strahlenresistenz von hypoxischen Tumorzellen verantwortlich gemacht (Bristow und Hill, 2008). Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass HIF-1 $\alpha$  mit essentiellen Faktoren des DDR und den entsprechenden Kontrollpunkten interagiert (Rohwer *et al.*, 2013). Die genaue Rolle von HIF-1 $\alpha$  in diesem Komplex ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Diese Arbeit charakterisiert den Zusammenhang zwischen HIF-1 $\alpha$ -Status und den Doppelstrangbruch-Reparaturwegen in Tumorzellen nach Bestrahlung und kann so zu neuen Therapieansätzen beitragen.

Wenn DSB akkumulieren, werden die hoch konservierten Signaltransduktionswege von ATM/ATR (*ataxia telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia and Rad3 related*)



und DNA-PKs Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert. Jede dieser Kinasen phosphoryliert wiederum spezifische Zielproteine, die zum Zellzyklusarrest durch Aktivierung von Kontrollpunkt-Kinasen (CHK1 und CHK2) beitragen und/oder die Rekrutierung von Reparaturproteinen an Doppelstrangbrüche (DSB)/Einzelstrangbrüche (SSB) fördern (Valerie und Povirk, 2003; D'Amours und Jackson, 2001; Lim *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000b; Yoo und Dynan, 1999). Da die gravierendste Einwirkung von ionisierender Strahlung in Doppelstrangbrüchen besteht, wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen der HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierung auf den ATM Signaltransduktionsweg studiert. Die durchgeführten Experimente zur Untersuchung der Reparaturkinetiken zeigten, dass die Reparaturprozesse in den HIF-1 $\alpha$ -inhibierten LLC-Zellen signifikant verzögert ablaufen. Das Reparaturprotein 53BP1 war in den Kontroll-Zellen nach 12 h zum größten Teil nicht mehr im Zellkern detektierbar. Demnach waren die Reparaturprozesse in diesen Zellen zu diesem Zeitpunkt schon abgeschlossen. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Foci in der HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Fraktion immer noch um das 3-fache höher und erst nach 24 h nicht mehr detektierbar (s. Kap. 4.3, Abb. 15). Das gleiche Ergebnis stellte sich auch im Comet-Assay dar. Der Anteil an Doppelstrangbrüchen in den einzelnen Zellen war in der HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Gruppe über die untersuchte Zeitspanne wesentlich höher (s. Kap. 4.3, Abb. 16). Zusätzlich waren die Proteinspiegel der wichtigen aktiven Mediatoren des ATM Signaltransduktionsweges (H2AX, KAP-1, 53BP1) nach 3 und 6 h erhöht (s. Kap. 4.3, Abb. 18). All diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass HIF-1 $\alpha$ -Inhibition eine Verzögerung in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen und eine Hochregulation des ATM Signaltransduktionsweg verursacht. Als mögliche Konsequenz könnte eine Dysregulation des DSB Reparatur-Signalwegs entstehen. Den gleichen Zusammenhang konnten auch Wirthner *et al.* in MEF Zellen darstellen (Wirthner *et al.*, 2008). Mithilfe eines Screenings von 17 Genen, die in die DSB Reparaturkaskaden involviert sind, konnte die Gruppe zusätzlich zeigen, dass es in HIF-1 $\alpha$ -inhibierten MEFs zu einer signifikanten Verringerung von Proteinen (Ku80 und Ku70) der DNA-PK Gruppe kommt. Diese Proteine sind wichtige Bestandteile der nicht-homologen Endverbindungs-Reparatur (NHEJ).

An der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen sind maßgeblich zwei zentrale Reparaturwege beteiligt: die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe

Endverbindungs-Reparatur. Im Prozess der NHEJ werden die beiden DNA-Enden, die beim Doppelstrangbruch entstanden sind, durch spezifische Ligasen wieder verbunden. Aus diesem Grund läuft die Reparatur schneller ab, jedoch mit höherer Fehlerwahrscheinlichkeit (Aparicio *et al.*, 2014; Schipler und Iliakis, 2013; Mladenov *et al.*, 2013; Jackson *et al.*, 2001; Takata *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1997). Durch homologe Rekombination wird der Schaden ausgebessert, indem die Informationen auf dem intakten Chromatid als Vorlage genutzt wird. Dieser Reparaturmechanismus läuft deshalb nur während der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus ab, ist fehlerfrei, benötigt jedoch viel Energie und Zeit (Karran, 2000; Haber, 1999). In diesem Zusammenhang hat Koshiji *et al.* zudem gezeigt, dass HIF-1 $\alpha$  indirekt, über die Interaktion mit c-Myc, die Aktivität von BRCA1 inhibiert. BRCA1 wurde als „Masterregulator“ der genomischen Stabilität beschrieben, da es eine essentielle Rolle im Prozess der homologen Rekombination übernimmt (s. Kap. 1.3.3, Abb. 4) (Huen *et al.*, 2010). Aufgrund der dargestellten Publikationen, wurde der Einfluss von HIF-1 $\alpha$ -Inhibition auf die oben aufgeführten Faktoren der beiden Reparaturwege, in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Wenn man jedoch die Ergebnisse der beiden Gruppen um Wirthner und Koshiji in Zusammenhang bringt, kann geschlossen werden, dass in hypoxischen Zellen mit HIF-1 $\alpha$ -Expression die homologe Rekombination aktiv unterdrückt und die nicht-homologe Rekombination favorisiert wird (Bindra *et al.*, 2004). Aufgrund der Fehleranfälligkeit dieses Reparaturwegs ist die logische Folge eine vermehrte genomische Instabilität. Diese wird für die Therapieresistenz der hypoxischen Zellen verantwortlich gemacht. Im Umkehrschluss würde die HIF-1 $\alpha$ -Inhibition wahrscheinlich teilweise zu der Wiederaktivierung der homologen Rekombination führen. Eine mögliche Erklärung für diese Behauptung könnte die zeitliche Verzögerung bzw. Verlangsamung der Reparaturprozesse und der markante G2 Arrest in den HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Zellen, die in dieser Arbeit dargestellt werden konnten, sein.

Basierend auf dem immer tieferen Verständnis des DDR und der Entwicklung neuartiger pharmakologischer Inhibitoren der DDR-Moleküle (PARP, CHK1, DNA-PK), konnte in den letzten Jahren eine Verbesserung der klinischen Strahlentherapie erreicht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung von HIF-1 $\alpha$  in der Regulation des DSB-Reparaturmechanismus und stehen im Konsens mit

anderen Studien (Cam *et al.*, 2010; Wirthner *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2006) die gezeigt haben, dass HIF-1 $\alpha$  mit vielen wichtigen Komponenten des DDR funktionell interagiert (s. Kap. 1.3.3). Für die klinischen Therapieansätze würde dies bedeuten, dass die Kombination aus spezifischen HIF-1 $\alpha$ -Inhibitoren und den Inhibitoren des DDRs die Effizienz der Strahlentherapie signifikant steigern könnte. Auf der anderen Seite muss auch die Möglichkeit betrachtet werden, dass in Tumorzellen mit DDR-Defekten wie z.B. BRCA1-Mutationen, die HIF-1 $\alpha$ -Inhibition möglicherweise zu unerwünschten Effekten führen könnte. Um diese Fragestellung klären zu können, müssen in der Zukunft noch weitere Studien durchgeführt werden.

### **5.3 HIF-1 $\alpha$ vermittelte Strahlensensitivität *in vivo*.**

Obwohl Vielfalt und Präzision der *in vitro* Studien maßgeblich zum mechanistischen Verständnis der Wirkungsweise von Strahlung auf zellulärer Ebene beigetragen haben, sind es dennoch die „intrinsischen“ Eigenschaften einzelner isolierter Tumorzellen, die dargestellt werden. Die strahleninduzierten Antworten und das Verhalten von Tumoren *in vivo* können sich dabei deutlich von denen *in vitro* unterscheiden (Jamal *et al.*, 2012; Jen *et al.*, 1991). Der Grund dafür liegt in dem komplexen Zusammenspiel zwischen Tumorzellen, Blutgefäßsystem und Immunsystem (Hannahan und Weinberg, 2011; Colotta *et al.*, 2009). Dieses Tumormikromilieu besteht vorwiegend aus verschiedenen nicht malignen Zellen, extrazellulärer Matrix sowie löslichen Molekülen, wie z.B. Zytokinen oder Wachstumsfaktoren, und angrenzenden Stromazellen, die Einfluss auf die maligne Progression und die strahleninduzierte Antwort von Tumorzellen nehmen können. Aus diesem Grund waren *in vivo* Bestrahlungsexperimente an einem Allograft-Tumormodell zur Untersuchung der HIF-1 $\alpha$ -abhängigen Strahlenantwort zusätzlich ein wesentlicher Teil dieser Arbeit.

### 5.3.1 Das Doxycyclin-induzierbare System im Tumormodell

Zum Zwecke der spezifischen und flexiblen Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  *in vivo* wurde zunächst das Dox-induzierbare System, das auch *in vitro* zum Einsatz kam, benutzt. Dazu wurden die lentiviral transduzierten LLCpLKO-Tet-On-shHIF-1 $\alpha$ -Zellen subkutan in die immunkompetente Maus (C56BL/6) injiziert und die HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierung durch die Gabe von Dox in das Trinkwasser der Tiere induziert. Die so durchgeführten Untersuchungen lieferten jedoch wenig konsistente Ergebnisse. Das Tumorstadium entsprach nicht dem aus früheren Studien bekannten tumorigenen Phänotypen der LLC-Tumore (Stockmann *et al.*, 2008). Die Dox-Behandlung führte zur Inhibition der Tumorprogression und einem hämorrhagischen Tumorphänotypen (s. Kap. 4.4, Abb. 19 und 22). Während der initialen *in vivo* Studien dieser Arbeit wurde die mögliche negative Wirkung von Doxycyclin in Mausmodellen nicht in Betracht gezogen. Es wurden bis dahin nur wenige Studien mit einem induzierbaren System in Maus-Modellen durchgeführt (Laurenti *et al.*, 2010; Wiederschain *et al.*, 2009; Moeller *et al.*, 2005). In diesen Studien wurde kein negativer Dox-abhängiger Effekt beschrieben. Ein möglicher Ansatzpunkt für die unerwünschte Wirkung konnte erst nach der Publikation von He und Marneros im letzten Jahr dieser Doktorarbeit (2014) gefunden werden. Die Gruppe zeigte einen Dox-abhängigen Einfluss auf die Polarisation der Makrophagen (He und Marneros, 2014). Es existieren zwei Arten von Makrophagen: die anti-angiogenen M1-Typ (überwiegend aktiviert) und die pro-angiogenen M2-Typ Makrophagen. Demnach spielen die M2-Makrophagen eine unterstützende Rolle in der pathologischen Angiogenese (He und Marneros, 2014; Sica *et al.*, 2006). Die Gruppe beschrieb dabei eine inhibierende Wirkung von Doxycyclin auf die Polarisation von anti-angiogenen M1- zu den pro-angiogenen M2-Makrophagen und als Konsequenz eine gesenkte Neovaskularisation. Anhand der quantitativen Messungen der Expression von intratumoralen Makrophagen-Markern, konnte in dieser Arbeit jedoch ein anderer Zusammenhang zwischen der Dox-Behandlung und der Alteration in den Expressions-Levels der beiden Makrophagen-Typen hergestellt werden. In den Dox-behandelten Tumoren waren die anti-angiogenen M1-Makrophagen Level hoch signifikant verringert. Zusätzlich konnte auch eine Senkung des M2-Makrophagen Markers und den generellen Markers

F4/80 dargestellt werden (s. Kap. 4.3, Abb. 23). Dieses Ergebnis spricht für eine grundsätzliche Dysregulation der Makrophagen in diesen Tumoren. Diese Dysregulation könnte als Konsequenz zu einer Störung in der Angiogenese führen und die zum Teil nicht-funktionellen Tumorgefäße zusätzlich negativ beeinflussen, z.B. indem die Permeabilität erhöht wird. Die erhöhte Durchlässigkeit der Gefäßwände könnte das hämorrhagische Erscheinungsbild der Tumoren erklären. Der Grund für die Gegensätzlichkeit der Ergebnisse aus der Studie von He und Marneros und dieser Arbeit könnte zum einen in den unterschiedlichen Erkrankungsmodellen liegen. Diese Autoren untersuchten den Zusammenhang, obwohl in dem gleichen Mausstamm, anhand eines Wundheilungs-Modells der Haut nach einer Laserbehandlung und nicht wie hier an einem Tumormodell. Zum anderen wurde das Dox-induzierbare System zuvor nur in sehr wenigen *in vivo* Studien eingesetzt (Laurenti *et al.*, 2010; Wiederschain *et al.*, 2009). Die meisten dieser Studien wurden an immundefizienten Nacktmäusen durchgeführt, wo ein negativer Doxycyclin Einfluss auf Immunzellen vernachlässigt werden kann. Die Aufklärung der möglichen Wirkmechanismen war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

### **5.3.2 Darstellung der HIF-vermittelten Radiosensitivierung von Tumoren anhand eines konstitutiven HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierungs-Systems**

Aufgrund der in Kap. 5.3.1 dargestellten Schwierigkeiten, die mit dem Dox-induzierbaren System *in vivo* aufgetreten waren, wurde für die Bestrahlungsversuche auf das konstitutive HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierungs-System umgestellt. Die Funktionalität dieses Systems wurde initial durch mRNA-Analysen und immunhistochemische HIF-1 $\alpha$ -Färbungen an Tumorgewebe bestätigt. Es konnte sowohl eine signifikante Verringerung der HIF-1 $\alpha$ -Expression als auch einiger HIF-1 $\alpha$  spezifischer Zielgene (*VEGF*, *PDK-1*, *BNIP3*) nachgewiesen werden (s. Kap. 4.4, Abb. 21). Gleichzeitig wurde keine Veränderung des Expressionslevels von HIF-2 $\alpha$  beobachtet. Immunhistochemisch war eine deutliche Reduktion des HIF-1 $\alpha$  Proteins in Tumorgewebe vorhanden (s. Kap. 4.4, Abb. 24 D). Die funktionelle HIF-1 $\alpha$ -Inhibition in den LLC-Tumoren resultierte in einer signifikanten Verzögerung des

Tumorwachstums im Vergleich zu den Kontrollen. Zusätzlich konnten signifikante Unterschiede auch in den Tumorumfängen der beiden Gruppen detektiert werden (s. Kap. 4.4, Abb. 20). Die HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Tumore waren am Ende der Versuchsreihe teilweise um das 4-fache kleiner als die Kontrollen. Angesichts der dargestellten Ergebnisse wäre HIF-1 $\alpha$  ein vielversprechender Angriffspunkt für eine effiziente antiproliferative Krebstherapie. Die Kombination mit einer Bestrahlungstherapie könnte die Effizienz zusätzlich steigern und war deshalb ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt dieser Arbeit.

Für die Bestrahlungsexperimente kamen in dieser Arbeit zwei Bestrahlungsapparaturen zum Einsatz. Beintumoren wurden bei einer Größe von 50 mm<sup>3</sup> und Flankentumoren bei einer durchschnittlichen Größe von 150-200 mm<sup>3</sup> bestrahlt. Sowohl die kleineren Bein- als auch die Flankentumore enthielten bereits nachweislich ausgeprägte hypoxische Areale (s. Kap. 4.4, Abb. 24 A und B). Anhand dieser Bestrahlungsexperimente konnte eine Volumen-Dosis-Abhängigkeit dargestellt werden. Beintumoren reagierten bei einer Einzeldosis von 10 Gy, wohingegen bei Flankentumoren erst die doppelte Dosis (20 Gy) zu einem signifikanten Effekt führte (s. Kap. 4.5, Abb. 25 und Abb. 26). Der Grund dafür liegt in dem Vorhandensein von größeren Hypoxie- und zusätzlich Nekrose-Arealen in Flankentumoren. Tumorzellen unter fast anoxischen Milieu benötigen, aufgrund des Sauerstoffeffekts, 2-3-fach höhere Dosen an Strahlung um den gleichen Effekt zu erreichen (Palcic and Skarsgard, 1984). Zusätzlich ist die Expression von HIF-1 $\alpha$ , die eine phänotypische Strahlenresistenz vermittelt, bei einer ausgeprägten Hypoxie wesentlich höher (Graeber *et al.*, 1996). Durch die funktionelle Inhibition von HIF-1 $\alpha$  erhöhte sich die Strahlensensitivität signifikant, wiederum in Abhängigkeit von dem Tumorumfang. Die Wachstumsverzögerung von Tumoren an der Flanke, die mit 20 Gy bestrahlt worden waren, verringerte sich im Vergleich zu dem Bestrahlungsversuch mit 10 Gy am Bein von sechs auf vier Tage. Ein höheres Tumorumfang erhöht die Komplexität der Tumorstruktur. Besonders in hypoxischen Bereichen bilden sich Nischen mit unterschiedlichen Tumorzellpopulationen, deren Strahlenresistenz erhöht sein kann. In diesem Kontext wurden auch die sogenannten multipotent neoplastischen Tumor-Stammzellen (CSCs), die besonders in hypoxischen Nischen nachgewiesen wurden, genannt. Aufgrund der Fähigkeit zur

Selbsterneuerung und der Differenzierungskapazität werden diese Zellen für erhöhte Resistenz gegenüber Bestrahlungs- und Chemotherapie einiger Tumorarten verantwortlich gemacht (Eyler und Rich, 2008; Visvader und Lindeman, 2008; Scadden, 2006). Ein Bestrahlungsregime mit einer hohen Einzeldosis (20 Gy) würde höchstwahrscheinlich nicht alle Bereiche einer soliden Tumormasse letal schädigen. Es ist sogar denkbar, dass die Malignität der resistenten Tumorstammzellen durch die Bestrahlung erhöht wird. Aus diesem Grund würde eine fraktionierte Bestrahlung in kurzen Abständen wahrscheinlich die Effizienz der Kombinationstherapie steigern. Ergänzend dazu müssen auch technische Schwierigkeiten, die während des Etablierungs-Prozesses von der Flanken-Bestrahlung aufkamen, genannt werden. Aufgrund der gegebenen Konstruktion der Bestrahlungsapparatur wurde vermutet, dass beim Platzieren des Tumors im Bestrahlungsfeld nicht die komplette Tumormasse erfasst werden konnte (s. Kap. 3.5.4, Abb. 5). Durch die phänotypische Eigenschaft von LLC-Zellen, schnell invasiv in das umliegende Gewebe zu wachsen, hatten einige Tumore bei dieser Größe (150-200 mm<sup>3</sup>) die Thoraxwand bereits infiltriert, was das komplette „Herausziehen“ des Tumors erschwerte. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass der Wachstumsschub zusätzlich von diesen nicht bestrahlten Zellen ausging. Für zukünftige Bestrahlungsexperimente ist eine weitere Optimierung dieser Apparatur daher notwendig.

Ein weiterer Punkt, der zu erhöhter Strahlungsresistenz in soliden (Flanken-) Tumoren beigetragen haben könnte, ist die ausgeprägte Interaktion mit den Stromazellen (Hwang *et al.*, 2008). Für den Nährstoffaustausch, mechanische Stabilität und Wachstum interagieren Tumorzellen mit dem benachbarten Stroma. Dieses beinhaltet: Endothelzellen, Fibroblasten, Adipozyten, glatte Muskelzellen, und Zellen des Immunsystems. All diese Zellarten können aufgrund der Strahleneinwirkung durch Freisetzung von Signalmolekülen das Ansprechen der Tumorzellen auf die Therapie modulieren. Es wurde z. B. gezeigt, dass Bestrahlung durch die Alteration von stromalen HGF (*hepatocyte growth factor*)-Spiegeln das invasive Wachstum von Ösophagus-Karzinomen fördert (Patel *et al.*, 2012). Papadopoulou und Kletsas stellten zudem einen direkten Zusammenhang zwischen strahlungsinduzierter Fibroblasten-Seneszenz und erhöhtem Tumorwachstum dar (Papadopoulou und Kletsas, 2011). Zusätzlich können Stromazellen selbst HIF-1 $\alpha$

exprimieren und HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Resistenzen aufweisen. Vor diesem Hintergrund wäre der Ansatz der funktionellen Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  in Stromazellen eine wichtige Ergänzung zu der in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihe.

Einen zusätzlichen Anhaltspunkt für die gesenkte Strahlensensitivität der HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Tumoren *in vivo*, lieferte die Tumor-mRNA Analyse. Es wurde ein signifikanter Anstieg der Expression von HIF-1 $\alpha$  und dessen Zielgen *VEGF* in HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Tumoren nach Bestrahlung detektiert (s. Kap. 4.5, Abb. 27). Eine erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$ -regulierter Proteine unmittelbar nach Bestrahlung wurden von Dewhist *et al.* 2009 beschrieben. Zwei Mechanismen wurden in diesem Zusammenhang genannt: 1. Die erhöhten Level an freien Radikalen (ROS), die aufgrund des Reoxygenierungsprozesses während der Bestrahlung entstehen. 2. Disaggregation von Stress-Granula, die HIF-1 $\alpha$ -regulierte Transkripte beherbergen. Stress-Granula sind Protein-mRNA-Komplexe, die in Zellen während der Stress-Perioden entstehen. Diese bewahren die Zelle vor einem unnötigen Einsatz von Energie für die Proteintranslation (Kedersha *et al.*, 1999). Da die zuvor *in vitro* generierten LLCpLKO.1-shHIF-1 $\alpha$ -Tumorzellen aufgrund des konstitutiven shHIF-1 $\alpha$ -Vektors nur sehr geringe Mengen (15-20%) an HIF-1 $\alpha$  exprimieren können und eine zusätzliche Expression unterbinden würden, müssen die erhöhten HIF-1 $\alpha$ -Spiegel von anderen Zellen kommen. Zudem wurde die erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$ , erst nach Tumorentnahme an Tag 8-10 detektiert und nicht unmittelbar nach Bestrahlung. Li *et al.* beschrieben einen weiteren Mechanismus für die HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung nach Bestrahlung *in vivo*. Einen zusätzlichen Peak der HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung gibt es demnach an Tag 6-8 nach Bestrahlung. Zu diesem Zeitpunkt infiltrieren verstärkt Makrophagen in das Tumorgewebe. Diese produzieren und sezernieren NO, das wiederum die Steigerung der Expression von HIF-1 $\alpha$  bewirkt (Li *et al.*, 2007). Die genannten Faktoren führen letztendlich erneut zu dem beobachteten HIF-vermittelten Wachstumsschub.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Reihe von unterschiedlichen extrinsischen Faktoren und das Tumormikromilieu die Strahlensensitivität der Tumorzellen *in vivo* maßgeblich beeinflusst. Dennoch konnte in dieser Arbeit auch unter der Einbindung aller beeinflussenden Faktoren eine signifikante Sensitivierung



und Wachstumsverzögerung von Tumorzellen durch die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  erreicht werden. Dies unterstreicht die zentrale pathophysiologische Rolle von HIF-1 $\alpha$  in der Entwicklung einer Strahlenresistenz in soliden Tumoren. Es kann daher vermutet werden, dass HIF-1 $\alpha$ -hemmende Strategien in Kombination mit der aktuellen klinischen Strahlentherapie die Patientenprognose wesentlich verbessern würden.

#### **5.4 Resümee und Problemdiskussion**

Die vorliegende Arbeit trägt zum Verständnis der Wirkung von HIF-1 $\alpha$  in soliden Tumoren bei und belegt, dass HIF-1 $\alpha$  ein aussichtsreicher Angriffspunkt für die klinische Therapie von soliden Tumoren darstellt, da HIF-1 $\alpha$  als Transkriptionsfaktor das Überleben von Zellen, deren Proliferation, Invasion, Metastasierung und Strahlenresistenz begünstigt (Vaupel, 2004; Semenza, 2003). Die hier erlangten Ergebnisse liefern zudem ergänzende Belege, dass sich eine Kombinations-Therapie mit spezifischen HIF-1 $\alpha$ -Modulatoren, DNA-Reparatur-Inhibitoren und fraktionierter Strahlentherapie im Rahmen der Krebsbehandlung positiv auswirken kann.

Bei allen in dieser Arbeit gezeigten Effekten muss jedoch bedacht werden, dass diese zelltypspezifisch sein können. Der hier an murinen Tumorzellen dargestellte Phänotyp könnte nicht mit dem der humanen Tumorzellen übereinstimmen. Zum Beispiel führte die Inhibition von HIF-1 $\alpha$  in HCT116 Tumoren zu einer Senkung der Apoptoserate durch die Inhibition von p53 Phosphorylierung und als Konsequenz zu einer signifikant höheren klonogenen Überlebensrate. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit gezeigtem Effekt (s. Abb. 14). Zusammenfassend resultierte die HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierung in einer Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung (Moeller *et al.*, 2005). Weiterhin muss man jedoch beachten, dass in vielen Zellen auch HIF-2 $\alpha$  bei der HIF-vermittelten Antwort eine Rolle spielen kann. Zur Bedeutung von HIF-2 $\alpha$  in Bezug auf Strahlenresistenz ist bisher wenig bekannt im Vergleich zu HIF-1 $\alpha$ . Es wurde in einigen Studien dargestellt, dass HIF-2 $\alpha$  aufgrund seiner ähnlichen Proteinstruktur und Regulation einen Verlust an HIF-1 $\alpha$  teilweise

kompensiert (Keith *et al.*, 2011). So konnten auch Bertou *et al.* durch eine spezifische Inaktivierung von HIF-2 $\alpha$  mit siRNA in HIF-1 $\alpha$ -defizienten ccRCC-Zellen (*Clear Cell Renal Cell Carcinoma*) eine signifikante Sensitivierung gegenüber ionisierender Strahlung herbeiführen. Diese erfolgte teilweise über die gleichen Mechanismen, wie sie in dieser Arbeit für HIF-1 $\alpha$  (in HIF-2 $\alpha$ -defizienten LLC-Zellen) beschrieben wurden (Bertout *et al.*, 2009). Um die richtige Schlussfolgerung bezüglich der strahleninduzierten HIF-vermittelten Antwort ziehen zu können, ist es demzufolge wichtig, den Status der beiden HIF-Untereinheiten in der jeweiligen Tumorart zu kennen. In vielen publizierten Studien wurde dieser Aspekt nicht beachtet. Im Hinblick auf die klinischen Therapieansätze müssen demzufolge auch die entsprechenden Patienten-Gruppen bestimmt werden.

Anhand der Gegensätzlichkeit der Wirkung, die für HIF-1 $\alpha$  in der Literatur dargestellt wird, müssen im Weiteren auch methodische Unterschiede in den einzelnen Studien betrachtet werden. Wie Arbeiten an humanen Zellen gezeigt haben, ist der Expressionsverlauf von HIF-1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen gewebespezifisch und zeigt meistens einen periodischen Verlauf, bei dem die Expression erst ansteigt, dann ein Maximum erreicht und danach wieder abnimmt (Stroka *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 1996). Demnach würde der Zeitpunkt der HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierung wahrscheinlich maßgeblich über das Resultat bestimmen. Zudem könnte es in experimentellen Studien mit konstitutiven HIF-Knockdown Ansätzen zum Zeitpunkt der eigentlichen Analysen bereits zu Adaptationen in den Zellkulturen kommen, dies würde die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Wirkung reduzieren. Ein Hinweis darauf könnte die gesenkte Sensitivierung sein, die sich in dieser Arbeit anhand der *in vivo* Experimente mit dem konstitutiven System gezeigt hat. Zusätzlich konnte dargestellt werden, dass die Wirkung der HIF-Modulation *in vivo* maßgeblich von der Interaktion der Tumorzellen mit dem Mikromilieu bestimmt wird, sodass die alleinige Inaktivierung in den Tumorzellen möglicherweise die Strahlensensitivität nicht wesentlich steigern würde.

Klar herausgestellt werden muss dennoch die Tatsache, dass die in dieser Arbeit mit einem flexibel-induzierbaren System durchgeführten Zellkultur-Analysen zu zellulären Signalkaskaden wie Proliferation, Apoptose, DSB-Reparatur, die zentrale Bedeutung von HIF-1 $\alpha$  bei der Regulation dieser Prozesse unterstreichen. Ferner wurden

wichtige Erkenntnisse gewonnen, welche belegen, dass nicht nur eine Hemmung von HIF-1 $\alpha$  selbst, sondern auch die Modulation von Faktoren, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind als aussichtsreich bewertet werden und zur Verbesserung einer Strahlentherapie beitragen können.

## 6. Zusammenfassung

Die Überexpression des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) stellt ein zentrales Merkmal vieler solider Tumoren dar. Dabei kommt HIF-1 $\alpha$  eine funktionelle Bedeutung für die Progression, Metastasierung und Vermittlung von Strahlen- und Chemoresistenz vieler Tumorentitäten zu. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  scheint insbesondere auch an der Regulation verschiedener DNA-Reparaturmechanismen beteiligt zu sein, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch weitgehend unklar sind. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  für die Vermittlung von Strahlenresistenz *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren und potentielle Wirkmechanismen zu identifizieren. Für diese Untersuchungen wurde eine funktionelle Inaktivierung der regulatorischen  $\alpha$ -Untereinheit von HIF-1 (HIF-1 $\alpha$ ), in der HIF-2 $\alpha$ -defizienten murinen Zelllinie LLC mittels shRNA-Interferenz etabliert. Die *in vitro*-Analysen verschiedener tumorrelevanter Parameter bestätigten die resistenzvermittelnde Wirkung von HIF-1 $\alpha$ : Die Inhibition von HIF-1 $\alpha$  vor der Bestrahlung führte zur einer signifikanten Senkung der Proliferationsrate und besonders des klonogenen Potentials von LLC-Tumorzellen. Dieser Effekt konnte mit einem erhöhten G2/M Arrest und HIF-1 $\alpha$ -vermittelter signifikanter Verzögerung in der Reparatur von strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüchen in Verbindung gebracht werden. HIF-1 $\alpha$  scheint mit vielen wichtigen Komponenten des „DNA damage response“ (DDR)-Signaltransduktionswegs funktionell zu interagieren. Zusätzlich konnte auch in einem Allograft-Tumormodell bei intaktem Immunsystem die signifikante Sensitivierung gegenüber ionisierender Strahlung von HIF-1 $\alpha$ -inhibierten Tumoren erreicht werden. Zusammengefasst zeigten funktionelle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass HIF-1 $\alpha$  die Therapiesensitivität von soliden Malignomen maßgeblich beeinflussen kann. In Anbetracht dieser Ergebnisse würde daher die Kombination aus spezifischen HIF-1 $\alpha$ -Inhibitoren und Inhibitoren des DNA-Reparatursignaltransduktionswegs die Effizienz der Strahlentherapie signifikant steigern und die Patientenprognosen wesentlich verbessern.

## 7. Summary

Overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is a common characteristic trait of almost all solid tumors. HIF-1 $\alpha$  has been identified as a driving force for tumor progression, metastatic spread and the occurrence of therapy resistance in a variety of tumors. HIF-1 $\alpha$  appears to play a central role in the regulation of several DNA-repair pathways; however, the underlying molecular mechanisms are not fully understood so far. Therefore, the aim of the present study was the *in vitro* and *in vivo* characterization of HIF-1 $\alpha$ 's role in mediating radioresistance as well as the identification of potential underlying mechanisms. For this purpose, a functional inactivation of the regulatory  $\alpha$ -subunit of HIF-1 (HIF-1 $\alpha$ ) in the HIF-2 $\alpha$  deficient murine LLC cell line was established via lentiviral transduction with shRNA vectors. The assumed radioresistance promoting function of HIF-1 $\alpha$  was supported by the analysis of different tumor-relevant aspects *in vitro*: the inactivation of HIF-1 $\alpha$  significantly reduced proliferation, and eliminated most of the clonogenic potential of LLC cells. This effect was mainly due to a marked cell cycle arrest in G2/M after irradiation and a significantly impaired repair ability of DNA double strand breaks. In line with this, HIF-1 $\alpha$  seems to functionally interact with several components of the DNA damage response pathway. Furthermore, the specific inactivation of HIF-1 $\alpha$  significantly postponed tumor regrowth after irradiation in an allograft tumor model with a functional immune system. Taken together, the present study revealed that HIF-1 $\alpha$  holds the potential of a therapeutic target since it influences therapy sensitivity of solid tumors. In consideration of these results, HIF-1 $\alpha$ -inhibiting treatment strategies in combination with DNA-repair pathway inhibitors may significantly increase treatment efficiency and improve patients' prognosis.

## 8. Literaturverzeichnis

Abend M. (2003). Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int J Radiat Biol.* **79(12)**:927-41.

Aebersold D.M., Burri P., Beer K.T., Laissue J., Djonov V., Greiner R.H., Semenza G.L. (2001). Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* **61**, 2911-2916.

Aliouat-Denis C.M., Dendouga N., Van den Wyngaert I., Goehlmann H., Steller U., van de Weyer I., Van Slycken N., Andries L., Kass S., Luyten W., Janicot M., Vialard J.E. (2005). p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res.* **3(11)**:627-34.

An W.G., Kanekal M., Simon M.C., Maltepe E., Blagosklonny M.V., and Neckers L.M. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . *Nature.* **392**: 405-408.

Aparicio T., Baer R., Gautier J. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst).* **19**:169-75.

Ayrapetov M.K., Xu C., Sun Y., Zhu K., Parmar K., D'Andrea A.D., Price B.D. (2011). Activation of Hif1 $\alpha$  by the prolylhydroxylase inhibitor dimethoxymethylglycine decreases radiosensitivity. *PLoS One.* **6(10)**:e26064.

Belka C. (2006). The fate of irradiated tumor cells. *Oncogene.* **25(7)**:969-71.

Bertout J.A., Majmundar A.J., Gordan J.D., Lam J.C., Ditsworth D., Keith B., Brown E.J., Nathanson K.L., Simon M.C. (2009). HIF2 $\alpha$  inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106(34)**:14391-6.

Bindra R.S., Schaffer P.J., Meng A., Woo J., Måseide K., Roth M.E., Lizardi P., Hedley D.W., Bristow R.G., Glazer P.M. (2004). Down-regulation of Rad51 and decreased homologous recombination in hypoxic cancer cells. *Mol Cell Biol.* **24(19)**:8504-18.

Bristow R.G., Hill R.P. (2008). Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer.* **8(3)**:180-92.

Brown J.M. (2000). Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol.Med.Today.* **6**,157-162.

Brown L.M., Cowen R.L., Debray C., Eustace A., Erler J.T., Sheppard F.C.D., Parker C.A., Stratford I.J., and Williams K.J. (2006). Reversing Hypoxic Cell Chemoresistance in Vitro Using Genetic and Small Molecule Approaches Targeting Hypoxia Inducible Factor-1. *Mol Pharmacol* **69**: 411-418.

Brökers N., Le-Huu S., Vogel S., Hagos Y., Katschinski D.M., Kleinschmidt M. (2010). Increased chemoresistance induced by inhibition of HIF-prolyl-hydroxylase domain enzymes. *Cancer Sci.* **101(1)**:129-36.

Cabuk D., Basaran G., Celikel C., Dane F., Yumuk P.F., Iyikesici M.S., Ekenel M., Turhal N.S. (2007). Vascular Endothelial Growth Factor, Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha and CD34 Expressions in Early-Stage Gastric Tumors: Relationship with Pathological Factors and Prognostic Impact on Survival. *Oncology.* **72**, 111–117

Cam H., Easton J.B., High A., Houghton P.J. (2010). mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 $\alpha$ . *Mol Cell.* **40(4)**:509-20.

Carroll V.A., Ashcroft M. (2006). Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res.* **66(12)**:6264-70.

Chandel N.S., Schumacker P.T. (2000). Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J.Appl.Physiol.* **88**,1880-1889.

Chang B.D., Swift M.E., Shen M., Fang J., Broude E.V., and Roninson I.B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**, 389–94.

Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162(1)**:156-9.

Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C., and Mantovani A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* **30**, 1073–81.

Cummins E.P., Taylor C.T. (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch.* **450(6)**:363-71.

D'Amours D., Jackson S.P. (2001). The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev.* **15(17)**:2238-49.

Denko N.C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer.* **8(9)**:705-13.

Dewhirst M.W., Cao Y., Li C.Y., Moeller B. (2007). Exploring the role of HIF-1 in early angiogenesis and response to radiotherapy. *Radiother Oncol.* **83(3)**:249-55.

Dewhirst M.W. (2009). Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiat Res.* **172(6)**:653-65.

Epstein A.C., Gleadle J.M., McNeill L.A., Hewitson K.S., O'Rourke J., Mole D.R., Mukherji M., Metzen E., Wilson M.I., Dhanda A., Tian Y.M., Masson N., Hamilton D.L., Jaakkola P., Barstead R., Hodgkin J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Schofield C.J., Ratcliffe P.J. (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* **107(1)**:43-54.

Eyler C.E., Rich J.N. (2008). Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol.* **26(17)**:2839-45.

Fandrey J. (2004). Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **286**: R977–R988.

Fandrey J. (2007). Regulation der Sauerstoffhomöostase durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-1. *BIOspektrum Wissenschaft, Springer.* p26

Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* **1(5)**:2315-9.

Franko A.J., Chapman J.D. (1982). Binding of <sup>14</sup>C-misonidazole to hypoxic cells in V79 spheroids. *Br J Cancer.* **45(5)**:694-9.

Fyles A.W., Milosevic M., Wong R., Kavanagh M.C., Pintilie M., Sun A., Chapman W., Levin W., Manchul L., Keane T.J., Hill R.P. (1998). Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol.* **48(2)**:149-56.

Generali D., Buffa F.M., Berruti A., Brizzi M.P., Campo L., Bonardi S., Bersiga A., Allevi G., Milani M., Aguggini S., Papotti M., Dogliotti L., Bottini A., Harris A.L., Fox S.B. (2009). Phosphorylated ERalpha, HIF-1alpha, and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *J.Clin.Oncol.* **27**, 227-234.

Goda N., Ryan H.E., Khadivi B., McNulty W., Rickert R.C., Johnson R.S. (2003). Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol.Cell Biol.* **23**, 359-369.

Gorski D.H., Beckett M.A., Jaskowiak N.T., Calvin D.P., Mauceri H.J., Salloum R.M., Seetharam S., Koons A., Hari D.M., Kufe D.W., Weichselbaum R.R. (1999). Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res.* **59(14)**:3374-8.

Graeber T.G., Osmanian C., Jacks T., Housman D.E., Koch C.J., Lowe S.W., Giaccia A.J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* **379(6560)**:88-91.



- Gray L.H., Conger A.D., Ebert M., Hornsey S., Scott O.C. (1953). The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br.J.Radiol.* **26**, 638-648.
- Greijer A.E., van der Wall E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol.* **57(10)**:1009-14.
- Gu Y.Z., Moran S.M., Hogenesch J.B., Wartman L., Bradfield C.A. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit HIF3alpha. *Gene Expr.* **7**, 205-213.
- Gupta A.K., Bakanauskas V.J., Cerniglia G.J., Cheng Y., Bernhard E.J., Muschel R.J., McKenna W.G. (2001). The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res.* **61(10)**:4278-82.
- Haber J.E. (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci.* **24(7)**:271-5.
- Hall E.J., Giaccia A. J. (2011). Radiobiology for the Radiologist. *Lipincott William&Wilkin*. 7th Edition
- Hammond E.M., Giaccia A.J. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 and p53: friends, acquaintances, or strangers? *Clin Cancer Res.* **12(17)**:5007-9.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**,646–74.
- Hao J., Song X., Song B., Liu Y., Wei L., Wang X., Yu J. (2008). Effects of lentivirus-mediated HIF-1alpha knockdown on hypoxia-related cisplatin resistance and their dependence on p53 status in fibrosarcoma cells. *Cancer Gene Ther.* **15(7)**:449-55.
- Harada H., Itasaka S., Kizaka-Kondoh S., Shibuya K., Morinibu A., Shinomiya K., Hiraoka M. (2009). The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1alpha protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. *J.Biol.Chem.* **284**, 5332-5342.
- Harris A.L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* **2**:38-47
- Harrison L.B., Chadha M., Hill R.J., Hu K., Shasha D. (2002). Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist.* **7**,492-508.
- He G., Siddik Z.H., Huang Z., Wang R., Koomen J., Kobayashi R., Khokhar A.R. and Kuang J. (2005). Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene.* **24**, 2929–43.
- He L., Marneros A.G. (2014). Doxycycline inhibits polarization of macrophages to the proangiogenic M2-type and subsequent neovascularization. *J Biol Chem.* **289(12)**:8019-28.

- Herold S., Wanzel M., Beuger V., Frohme C., Beul D., Hillukkala T., Syvaioja J., Saluz H.P., Haenel F., Eilers M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell*. **10(3)**:509-21.
- Hockel M., Vaupel P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J.Natl.Cancer Inst.* **93**, 266-276.
- Huen M.S., Sy S.M., Chen J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11(2)**:138-48.
- Hwang R.F., Moore T., Arumugam T., Ramachandran V., Amos K.D., Rivera A., Ji B., Evans D.B., Logsdon C.D. (2008). Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* **68(3)**:918-26.
- Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Wenger R.H., Gassmann M., Gearhart J.D., Lawler A.M., Yu A.Y., Semenza G.L. (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* **12**, 149-162.
- Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M, Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* **292**:468-72.
- Jackson S.P. (2001). Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 655-661.
- Jamal M., Rath B.H., Tsang P.S., Camphausen K., Tofilon P.J. (2012). The brain microenvironment preferentially enhances the radioresistance of CD133(+) glioblastoma stem-like cells. *Neoplasia.* **14(2)**:150-8.
- Jen Y.M., West C.M., Hendry J.H. (1991). The lower radiosensitivity of mouse kidney cells irradiated in vivo than in vitro: a cell contact effect phenomenon. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **20(6)**:1243-8.
- Jiang B.H., Semenza G.L., Bauer C., Marti H.H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol.* **271**:C1172-80.
- Kaelin W.G. (2008). The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O<sub>2</sub> sensing and cancer. *Nat Rev Cancer.* **8**:865-73.
- Kaelin W.G. Jr, Ratcliffe P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* **30(4)**:393-402.
- Kang H.J., Kim H.J., Rih J.K., Mattson T.L., Kim K.W., Cho C.H., Isaacs J.S., Bae I. (2006). BRCA1 plays a role in the hypoxic response by regulating HIF-1alpha stability and by modulating vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem.* **281(19)**:13047-56.

- Kao G.D., Jiang Z., Fernandes A.M., Gupta A.K., Maity A. (2007). Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation. *J Biol Chem.* **282(29)**:21206-12.
- Karran P. (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev.* **10(2)**:144-50.
- Katz D., Ito E., Liu F.F. (2009). On the path to seeking novel radiosensitizers. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* **73**,988-996.
- Kedersha N.L., Gupta M., Li W., Miller I., Anderson P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol.* **147(7)**:1431-42.
- Keith B., Johnson R.S., Simon M.C. (2011). HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.* **12(1)**:9-22
- Koshiji M., Kageyama Y., Pete E.A., Horikawa I., Barrett J.C., Huang L.E. (2004). HIF-1 $\alpha$  induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* **23(9)**:1949-56.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-5.
- Laurenti E., Barde I., Verp S., Offner S., Wilson A., Quenneville S., Wiznerowicz M., Macdonald H.R., Trono D., Trumpp A. (2010). Inducible gene and shRNA expression in resident hematopoietic stem cells in vivo. *Stem Cells.* **28(8)**:1390-8.
- Lee S.E., Mitchell R.A., Cheng A. und Hendrickson E.A. (1997). Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1425-1433.
- Li F., Sonveaux P., Rabbani Z.N., Liu S., Yan B., Huang Q., Vujaskovic Z., Dewhirst M.W., Li C.Y. (2007). Regulation of HIF-1 $\alpha$  stability through S-nitrosylation. *Mol Cell.* **26(1)**:63-74.
- Li L., Story M., Legerski R.J. (2001). Cellular responses to ionizing radiation damage. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* **49**, 1157-1162.
- Liao D., Corle C., Seagroves T.N., Johnson R.S. (2007). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res.* **67(2)**:563-72.
- Lim D.S., Kim S.T., Xu B., Maser R.S., and Lin J. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature.* **404**, 613-617.
- Ljungman M. The DNA damage response--repair or despair? (2010). *Environ Mol Mutagen.* **51(8-9)**:879-89. Review.

Loboda A., Jozkowicz A., Dulak J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol.Cells*. **29**, 435-442.

Makino Y., Cao R., Svensson K., Bertilsson G., Asman M., Tanaka H., Cao Y., Berkenstam A., Poellinger L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. **414**, 550-554.

Maltepe E., Saugstad O.D. (2009). Oxygen in health and disease: regulation of oxygen homeostasis--clinical implications. *Pediatr Res*. **65(3)**:261-8.

Manalo D. J., Rowan A., Lavoie T., Natarajan L., Kelly B. D., Ye S. Q., Garcia J. G. N., Semenza, G. L. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. **105**: 659–669.

Martin L.M, Marples B., Coffey M., Lawler M., Lynch T.H., Hollywood D., Marignol L. (2010). DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: making sense of apparently conflicting data. *Cancer Treat.Rev*. **36**, 518-527.

Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., Ratcliffe P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. **399**:271-5.

Medema R.H., Macûrek L. (2012). Checkpoint control and cancer. *Oncogene*. **31(21)**:2601-13.

Melillo G. (ed.). (2014). Hypoxia and Cancer, Cancer Drug Discovery and Development. doi 10.1007/978-1-4614-9167-5\_1

Metzen E., Berchner-Pfannschmidt U., Stengel P., Marxsen J.H., Stolze I., Klinger M., Huang W.Q., Wotzlaw C., Hellwig-Burgel T., Jelkmann W., Acker H., Fandrey J. (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J.Cell Sci*. **116**, 1319-1326.

Metzen E., Zhou J., Jelkmann W., Fandrey J., Brune B. (2003). Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol.Biol.Cell*. **14**, 3470-3481.

Mizokami K.E.N., Kakeji, Y., Oda, S., Irie, K., Yonemura, T. (2006). Clinicopathologic Significance of Hypoxia-Inducible Factor 1 a Overexpression in Gastric Carcinomas. *Journal of Surgical Oncology*. **94**, 149–154.

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

Moeller B.J., Cao Y., Li C.Y., Dewhirst M.W. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*. **5**, 429-441.

- Moeller B.J., Dreher M.R., Rabbani Z.N., Schroeder T., Cao Y., Li C.Y., Dewhirst M.W. (2005). Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell*. **8**, 99-110.
- Moeller B.J., Dewhirst M.W. (2006). HIF-1 and tumour radiosensitivity. *Br J Cancer*. **95(1)**:1-5.
- Moeller B.J., Richardson R.A., Dewhirst M.W. (2007). Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*. **26**, 241-248.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C.A. (1991). Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. **139(2)**:271-9.
- Nossoni F. (2008). Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay): Methodology, Potential Applications, and Limitations in Cancer Research. *MMG 445 Basic Biotechnology eJournal*. **4**:30-35.
- Ohh M., Park C.W., Ivan M., Hoffman M.A., Kim T.Y., Huang L.E., Pavletich N., Chau V., Kaelin W.G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*. **2(7)**:423-7.
- Olive P.L., Banáth J.P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*. **1(1)**:23-9.
- Osinsky S., Zavelevich M., Vaupel P. (2009). Tumor hypoxia and malignant progression. *Exp.Oncol*. **31**, 80-86.
- Palcic B., Skarsgard L.D. (1984). Reduced oxygen enhancement ratio at low doses of ionizing radiation. *Radiat Res*. **100(2)**:328-39.
- Papadopoulou A., Kleitsas D. (2011). Human lung fibroblasts prematurely senescent after exposure to ionizing radiation enhance the growth of malignant lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. **39(4)**:989-99.
- Patel Z.S., Grugan K.D., Rustgi A.K., Cucinotta F.A., Huff J.L. (2012). Ionizing radiation enhances esophageal epithelial cell migration and invasion through a paracrine mechanism involving stromal-derived hepatocyte growth factor. *Radiat Res*. **177(2)**:200-8.
- Raleigh J.A., Franko A.J., Koch C.J., Born J.L. (1985). Binding of misonidazole to hypoxic cells in monolayer and spheroid culture: evidence that a side-chain label is bound as efficiently as a ring label. *Br J Cancer*. **51(2)**:229-35.
- Rankin E.B., Giaccia A.J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death.Differ*. **15**, 678-685.

Ravizza R., Gariboldi M.B., Passarelli L., Monti E. (2004). Role of the p53/p21 system in the response of human colon carcinoma cells to Doxorubicin. *BMC Cancer*, **4**, 92.

Ray R., Chen G., Vande Velde C., Cizeau J., Park J.H., Reed J.C., Gietz R.D., Greenberg A.H. (2000). BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem*. **275(2)**:1439-48.

Riley P.A., (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int.J.Radiat.Biol.* **65**, 27-33.

Rohwer N., Zasada C., Kempa S., Cramer T. (2013). The growing complexity of HIF-1 $\alpha$ 's role in tumorigenesis: DNA repair and beyond. *Oncogene*. **32(31)**:3569-76.

Sah N.K., Khan Z., Khan G.J., Bisen P.S. (2006). Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett.* **244**, 164-171.

Sasabe E., Zhou X., Li D., Oku N., Yamamoto T., Osaki T. (2007). The involvement of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer* **120**: 268-277.

Scadden D.T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. **441**:1075-9. Review.

Schipler A., Iliakis G. (2013). DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res.* **41(16)**:7589-605.

Schmidt-Ullrich R.K. (2003). Molecular targets in radiation oncology. *Oncogene*. **22(37)**:5730-3.

Semenza G.L. (2001). Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trend Mol Med*. **7(8)**:345-50.

Semenza G.L. (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. **8**:S62-7.

Semenza G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer*. **3**, 721-732

Semenza G.L. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE*. (407):cm8.

Shrieve D.C., Harris J.W. (1985). The in vitro sensitivity of chronically hypoxic EMT6/SF cells to Xradiation and hypoxic cell radiosensitizers. *Int.J.Radiat.Biol.Relat.Stud.Phys.Chem.Med.* **48**, 127-138.

- Sica A., Schioppa T., Mantovani A., Allavena P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. **42(6)**:717-27.
- Stoeltzing O., Liu W., Reinmuth N., Fan F., Parikh A.A., Bucana C.D., Evans D.B., Semenza G.L., and Ellis L.M. (2003). Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer. *Am J Pathol*. **163**: 1001-1011.
- Stockmann C., Doedens A., Weidemann A., Zhang N., Takeda N., Greenberg J.I., Cheresh D.A. & Johnson R.S. (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*. **456**, 814–8.
- Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I., Wenger R.H., Neil D.A., Bauer C., Gassmann M., Candinas D. (2001). HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J*. **15(13)**:2445-53.
- Takata M., Sasaki M.S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A. and Takeda S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*, **17**, 5497-5508.
- Thews G. (1987). Atemgastransport und Säure-Base-status des Blutes. In: Physiologie des Menschen. Springer: 611-632
- Unruh A., Ressel A., Mohamed H.G., Johnson R.S., Nadrowitz R., Richter E., Katschinski D.M., Wenger R.H. (2003). The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene*. **22**, 3213-3220.
- Valerie K., Povirk L.F. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, **22**, 5792-5812.
- Vaupel P., Mayer A., Hockel M. (2004). Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol*. **381**, 335-354.
- Vaupel P., Harrison L. (2004). Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist*. **5**, 4-9.
- Vaupel P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist*. **5**, 10-17.
- Visvader J.E., Lindeman G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. **8(10)**:755-68.
- Wang G.L., Semenza G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. **270(3)**:1230-7.

Weiss C. (2004). [Normoxia ?]. *Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 39 Suppl 1, S32-S37.

Wenger R.H., Camenisch G., Desbaillets I., Chilov D., and Gassmann M. (1998). Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha is not sufficient for hypoxic/anoxic p53 induction. *Cancer Res.* **58**: 5678-5680.

Wenger R.H., Stiehl D.P., Camenisch G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus *HRE*. *Sci.STKE.* re12.

Wiederschain D., Wee S., Chen L., Loo A., Yang G., Huang A., Chen Y., Caponigro G., Yao Y.M., Lengauer C., Sellers W.R., Benson J.D. (2009). Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle.* **8(3)**:498-504.

Williams K.J., Telfer B.A., Xenaki D., Sheridan M.R., Desbaillets I., Peters H.J., Honess D., Harris A.L., Dachs G.U., van der KA, and Stratford I.J. (2005). Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiother Oncol.* **75**: 89-98.

Wirthner R., Wrann S., Balamurugan K., Wenger R.H., Stiehl D.P. (2008). Impaired DNA double-strand break repair contributes to chemoresistance in HIF-1 alpha-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis.* **29**, 2306-2316.

Wu X., Ranganathan V., Weisman D.S., Heine W.F., and Ciccone D.N. (2000b). ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature.* **405**, 477-482.

Yoo S., Dynan W.S. (1999). Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4679-4686.

Zhu Z.B., Makhija S.K., Lu B., Wang M., Kaliberova L., Liu B., Rivera A.A., Nettelbeck D.M., Mahasreshti P.J., Leath C.A., Barker S., Yamaoto M., Li F., Alvarez R.D., Curiel D.T. (2004). Transcriptional targeting of tumors with a novel tumor-specific survivin promoter. *Cancer Gene Ther.* **11**, 256-262.



## 9. Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

53PB1	<i>p53 binding protein 1</i>
Abb.	Abbildung
α-KG	α-Ketoglutarat
Aqua bidest	bidestilliertes Wasser
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (HIF-1β)</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BER	<i>base excision repair</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
BNIP3	<i>Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDA interacting protein 3</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
CA IX	Carbonische Anhydrase IX
Caspase	Cysteinyl-Aspartat-spezifische Protease
CBP	<i>CREB binding protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
Chk1/2	<i>checkpoint kinase 1/2</i>
CT	<i>Cycle treshold</i>
CTAD	C-terminale transaktivierende Domäne
cm	Zentimeter
CXCR4	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
DAB	3,3'- Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	<i>DNA damage response</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMOG	Dimethyloxaloylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i> , katalytische Untereinheit

Dox	Doxycyclin
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPAS1	<i>Endothelial PAS Domain-containing Protein 1</i>
EPO	Erythropoietin
ERBB2	HER2/neu ( <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
ETOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FIH-1	<i>Factor inhibiting HIF-1</i>
g	Gramm
G1/G2	Wachstumsphase G1/G2
GLUT 1-3	Glukosetransporter 1-3
GTC	Guanidinthiocyanat
Gy	Gray
H	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIF-1-3α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-3α</i>
HRE	<i>Hypoxia-responsive element</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KD	<i>KnockDown</i>
kDa	kiloDalton
LDHA	Laktat-Dehydrogenase A
LLC	<i>Lewis Lung Carcinoma</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mA	Milliampere
MEF	Embryonale Stammzellen der Maus
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule

MMR	Mismatch-Reparatur
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
NH <sub>4</sub> OH	Ammoniumhydroxid
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NTAD	N-terminale transaktivierende Domäne
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OER	<i>oxygen enhancement ratio</i>
ODD	<i>oxygen-dependent degradation domain</i>
p53	Tumorsuppressor-Protein p53
p21/27	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor
PAS	PER-ARNT-SIM
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PBS(-T)	Phosphate buffered saline (+ Tween)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDK1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1
PFA	Paraformaldehyd
Pg	Pikogramm
PGK1	Phosphoglyceratkinase1
PHD	Prolinhydroxylase
PI	Propidiumiodid
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PIM	Pimonidazol
pKAP1	<i>KRAB-associated protein (phosphorylated)</i>
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pVHL	<i>Von Hippel–Lindau tumor suppressor</i>
qPCR	<i>quantitative realtime PCR</i>
Ras	<i>Rat sarcoma virus oncogene cellular homolog</i>
RIPA	<i>radio-immune precipitation assay</i>

RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
RT(-PCR)	Reverse Transkriptase (-PCR)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SF	<i>survival fraction</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-acetate-EDTA
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS(-T)	Tris-buffered saline (+ Tween)
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
V	Volt
VE-H <sub>2</sub> O	voll entsalztes Wasser
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHL	Von Hippel–Lindau Gen
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat
μl	Mikroliter

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus und der Regulation von HIF-1 $\alpha$ .....	7
Abbildung 2: Regulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1 $\alpha$ unter Hypoxie und Normoxie.....	9
Abbildung 3: HIF-1 regulierte Genexpression.....	10
Abbildung 4: Darstellung der Interaktion von HIF-1 $\alpha$ mit wichtigen DNA-Reparatur-Proteinen.....	16
Abbildung 5: <i>In vivo</i> Apparatur zur Bestrahlung der Flanke.....	39
Abbildung 6: Darstellung der <i>in vivo</i> Apparatur zur Bestrahlung am Bein. ....	40
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Doxycyclin-induzierbaren lentiviralen Vektors.....	42
Abbildung 8: Repräsentativer Western Blot der HIF-1 $\alpha$ -Inhibition in LLCpLKO-Tet-On Zellen. ....	43
Abbildung 9: LLC Zellen sind HIF-2 $\alpha$ defizient. ....	44
Abbildung 10: pO <sub>2</sub> -Messung <i>in vitro</i> an hypoxischen LLCpLKO.1 Zellen nach HIF-1 $\alpha$ -Inhibition und Bestrahlung. ....	46
Abbildung 11: HIF-1 $\alpha$ -Inhibition führt zur Radiosensitivierung von LLC-Zellen <i>in vitro</i> .47	
Abbildung 12: HIF-1 $\alpha$ -Inhibition führt zu einer Erhöhung der strahleninduzierten Apoptose in LLCpLKO-Tet-On Zellen.....	49
Abbildung 13: Darstellung der FACS Analyse zur Zellzyklus-Phasen Verteilung in LLCpLKO-Tet-On Zellen. ....	51
Abbildung 14: HIF-1 $\alpha$ -Inhibition senkt signifikant das klonogene Potential der Tumor-Zellen.....	52
Abbildung 15: Repräsentative immunofluoreszenz Aufnahmen von den 53BP1-Foci in Zellkernen. ....	54
Abbildung 16: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen des Alkalischen Comet Assay.. ....	55
Abbildung 17: Schematische Darstellung des DDR (DNA <i>damage response</i> ). ....	56
Abbildung 18: HIF-1 $\alpha$ nimmt Einfluss auf die ATM Signaltransduktionskaskade nach Bestrahlung.....	57

Abbildung 19: Wachstumskinetiken von LLCpLKO-Tet-On Tumoren nach Induktion mit Doxycyclin <i>in vivo</i> .....	59
Abbildung 20: Konstitutive HIF-1 $\alpha$ -Inaktivierung führt zur signifikanten Wachstumsverzögerung von LLCpLKO.1-shHIF-1 $\alpha$ -Tumoren.....	61
Abbildung 21: Darstellung des Expressionsmusters von HIF-1 $\alpha$ Zielgenen im Maus-Tumorgewebe.....	63
Abbildung 22: Doxycyclin führt zu einem hämorrhagischen Phänotyp von LLC Tumoren .....	64
Abbildung 23: Doxycyclin beeinflusst negativ die intratumoralen Makrophagenlevel.. .....	66
Abbildung 24: Immunhistologische Darstellung von hypoxischen Bereichen und HIF-1 $\alpha$ .....	68
Abbildung 25: Dosis und HIF-Status abhängige Sensitivierung von LLCpLKO.1-shHIF-1 $\alpha$ -Zellen in einem Allograft-Tumor Modell am Bein.....	70
Abbildung 26: Dosis und HIF-Status abhängige Sensitivierung von LLCpLKO.1-shHIF-1 $\alpha$ -Zellen in einem Allograft-Tumor Modell an Flanke. ....	72
Abbildung 27: Expressionsmuster von wichtigen HIF-1 $\alpha$ Zielgenen vor und nach Bestrahlung im Maus-Tumorgewebe.....	73

### 9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Enzyme und Reagenzien .....	18
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Hersteller .....	18
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer .....	19
Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper .....	21
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten kommerziellen Kits. ....	22
Tabelle 6: Verwendete Plasmide .....	23
Tabelle 7: Verwendete sh-RNA Sequenzen .....	23
Tabelle 8: Die zur Amplifikation der entsprechenden Gensequenz eingesetzten murinen Primer .....	24
Tabelle 9: Liste der verwendeten Zelllinien.....	24

## 9.4 Publikationsliste

### Veröffentlichungen

**E. Mersch**, P. Kranz, F. Neumann, J. Senra, K. Janke, M. Baumann, K. Göpelt, E. Hammond, U. Brockmeier, E. Metzen (2015). Depletion of HIF-1 $\alpha$  leads to G2 cell cycle arrest and reduces DNA repair capability of Lewis Lung Carcinoma cells. (in Vorbereitung)

### Kongressbeiträge

EACR Conference on Radiation Biology and Cancer: From Molecular Responses to the Clinic: "Depletion of HIF-1 $\alpha$  sensitises Lewis Lung Carcinoma cells to ionizing radiation", Februar 2015 Essen (Poster)

Annual Meeting GRK1739: "HIF effects on radiation sensitivity in vitro and in a murine tumor model", März 2014 Xanten (Vortrag)

Der 12. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen: "Depletion of HIF-1 $\alpha$  sensitises Lewis Lung Carcinoma cells to ionizing radiation", November 2014 Essen (Poster)

Annual Meeting GRK1739: "Tuning the expression of hypoxia-inducible factors in mouse tumor cells: effects on radiation sensitivity *in vitro* and in a murine tumor model", Juli 2013 Raesfeld (Vortrag)

Symposium "From Cancer Defects To Novel Cancer Treatment Concepts": "Tuning the expression of hypoxia-inducible factors in lung carcinoma: effects on radiation sensitivity", Dezember 2012 Essen (Poster)



## **9.5 Lebenslauf**

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

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

## 9.6 Erklärung

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Die Bedeutung des Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in Tumorzellen für die strahlentherapeutische Behandlung maligner Tumore.*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Evgenija Mersch* befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

Prof. Dr. med. Eric Metzen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_ Unterschrift  
des/r Doktoranden/in (Evgenija Mersch)

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_ Unterschrift  
des/r Doktoranden/in (Evgenija Mersch)

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuerst gebührt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Eric Metzen, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Für seine Unterstützung bei der Bearbeitung des Projektes und besonders für die aufgewendete Zeit sowie seine enorme Geduld.

Bedanken möchte ich mich auch sehr bei Ester Hammond und dem gesamten Hammond Lab, für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der drei Monate in Oxford. Es war, sowohl wissenschaftlich als auch zwischenmenschlich, eine produktive und zugleich sehr schöne Erfahrung.

Auch Marie Schauries sei für ihren Einsatz und ihre Arbeit gedankt. Vielen Dank für deine unschätzbare moralische Unterstützung und für die tolle Zeit!

Mein Dank gilt natürlich auch Kirsten Janke und Ulf Brockmeier für die Hilfe bei der Umsetzung des Projektes, die vielen Diskussionen und Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein Dankeschön auch an die Medizinstudenten: Philip Kranz, Fabian Neumann und Melanie Hußmann für die interessanten, wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Konversationen. Zusätzlich möchte ich auch Helena Riffkin für ihre tatkräftige Unterstützung auf den letzten Metern sehr danken.

Für Rat und Tat im Laboralltag möchte ich mich ganz herzlich bei Kirsten Göpelt und besonders bei Melanie Baumann für Ihre Hilfe bei der Durchführung der Maus-Experimente bedanken. Weiterhin möchte ich natürlich allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Physiologie für die Hilfsbereitschaft, die freundliche Atmosphäre und die schöne Zeit danken.

Mein allergrößter Dank gilt jedoch meinen Eltern, weil sie mir das Potential geschenkt und es stets gefördert haben, auch meiner ganzen Familie - Ihr seid mein Anker. Diese Arbeit ist für Euch!