

Aus der Universitätsklinik für
Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen

**Hyperthermie zur Radiosensibilisierung hypoxischer
Brust- und Darmtumoren**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

an der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Grünheid, Patricia Christine Theresa

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. M. Huber

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Ullrich

Tag der Disputation: 08.05.2019

Im Gedenken an meinen Vater

Vorwort

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: Die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

Max Planck

INHALTSÜBERSICHT

<u>1 Einleitung</u>	1
1.1 Mammakarzinom	2
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Stadieneinteilung	2
1.1.3 Therapieoptionen	3
1.2 Kolorektalkarzinom	5
1.2.1 Epidemiologie	6
1.2.2 Stadieneinteilung	6
1.2.3 Therapieoptionen	7
1.3 Hyperthermie	8
1.2.1 Hitzeschockprotein HSP 90	8
1.4 Hypoxie	9
1.3.1 Hypoxieinduzierter Faktor HIF-1 α	9
1.5 Apoptose	9
1.6 Nekrose	10
1.7. Tumor-Mikroumgebung	11
1.8 Fragestellung	12
<u>2 Material und Methoden</u>	13
2.1. Material	13
2.1.1 Zelllinien	13
2.1.1.1 MCF 7	13
2.1.1.2 HCT 116	14
2.1.2 Antikörper	15
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Pufferlösungen	16
2.1.4 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Hilfsmittel	19
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellkulturen	21
2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen	21
2.2.3 Zellzahlbestimmung	22

2.2.4	Hyperthermiebehandlung der Zellen	22
2.2.5	Hypoxiebehandlung der Zellen	22
2.2.6	Bestrahlung der Zellen	23
2.2.7	Fixieren und Anfärben der Zellen	23
2.2.8	Koloniebildungstest	23
2.2.9	Western Blot	25
2.2.9.1	Herstellung der Zellysate	26
2.2.9.2	SDS-Gelelektrophorese	27
2.2.9.3	Blotting	28
2.2.9.4	Immunologische Markierung spezifischer Proteine	29
2.2.10	Durchflusszytometrie (FACS)	29
2.2.10.1	Durchflusszytometrische Messung der DNA-Fragmentierung: Nicoletti-Färbung zur Apoptose- und Zellzyklus-Bestimmung	30
2.2.10.2	Durchflusszytometrische Messung der Nekrose- und Apoptoseinduktion: Annexin V – und Propidiumiodid-Färbung	32
2.2.11	Statistik	33
3	<u>Ergebnisse</u>	34
3.1	Vorversuch unter Hyperthermie	34
3.2	Effekt von Hyperthermie und Hypoxie auf zellulärer Ebene	35
3.2.1	HIF-1 α	35
3.2.2	HSP 90	36
3.2.3	Auswirkung auf das klonogene Überleben	37
3.3	Auswirkung auf den Zelltod	39
3.4	Auswirkung auf den Zellzyklus	47
4	<u>Diskussion</u>	53
4.1	Fragestellung und Umsetzung	53
4.2	Vorversuch unter Hyperthermie	54
4.3	Effekt von Hyperthermie und Hypoxie auf zellulärer Ebene	54

4.4 Auswirkung auf den Zelltod	56
4.5 Auswirkung auf den Zellzyklus	57
4.6 Ausblick und noch offene Fragen	58
<u>5 Zusammenfassung</u>	59
<u>6 Abkürzungsverzeichnis</u>	60
<u>7 Abbildungsquellenverzeichnis</u>	62
<u>8 Literaturverzeichnis</u>	65
<u>9 Erklärung zum Eigenanteil</u>	71
<u>10 Danksagung</u>	72

1 Einleitung

Obwohl Krebs heutzutage gerne als die Krankheit der Moderne ¹ bezeichnet wird, gibt es bereits aus dem alten Ägypten vor fünftausend Jahren Berichte über Krebserkrankungen ². Seither hat sich glücklicherweise einiges getan. Wir wissen immer mehr über Pathophysiologie und Wirkmechanismen dieser heimtückischen Erkrankung und es gibt ausgeklügelte Therapieschemata, die je nach Entität und Art des Tumors den betroffenen Patienten sogar heilen können. Trotz all unserer Bemühungen der vergangenen fünftausend Jahre ist es uns bis heute jedoch nicht gelungen, gegen jede einzelne Krebserkrankung wirksame Heilmethoden zu finden und zu etablieren. In der folgenden Arbeit geht es um zwei der häufigsten Krebserkrankungen und Krebstodesursachen weltweit: das Mammakarzinom und das Kolorektalkarzinom. Besonderes Augenmerk gilt hier den prognostisch äußerst ungünstigen hypoxischen Tumoren. Eine Methode, die möglicherweise Abhilfe verschaffen könnte, ist die sehr kostengünstige Hyperthermie. Bereits bei anderen Tumorarten konnte gezeigt werden, dass es unter Hyperthermie allein oder in Kombination mit anderen Therapieformen zumindest unter normoxischen Bedingungen zu einer deutlichen Verminderung des Tumorwachstums kommen kann. Dies zeigten zum Beispiel Murata et al. bezüglich Rektalkarzinomen ³, Byun et al. in Bezug auf cerebrale Metastasen ⁴ und Amaya et al. zeigte dies bei Mammakarzinomen (unter anderem für MCF 7 Zellen) auf ⁵. Schon in den sechziger Jahren berichtete Manfred Ardenne von Spontanremissionen von Tumoren nach Hyperthermie ⁶ und entwickelte bereits in den achtziger Jahren mit seiner Arbeitsgruppe Thesen zur manipulierten selektiven Hemmung der Mikrozirkulation im Krebsgewebe ⁷. Damit legte er einen der Grundsteine für die heutige Diskussion über Mikroumgebungen (Microenvironment) von Tumoren.

Es folgt eine Einführung in die beiden Tumorarten, welche Gegenstand dieser Arbeit sind sowie eine Übersicht über die für diese Arbeit wichtigsten Begriffe Hyperthermie, Hypoxie und die verschiedenen Zelltodarten. Die Einleitung endet schließlich nach einer kurzen Einführung in das zukunftssträchtige Gebiet der Tumor-Mikroumgebung mit der Fragestellung.

1.1 Mammakarzinom

Unter dem Mammakarzinom versteht man die häufigste maligne Erkrankung der Brustdrüse und trotz Früherkennung die häufigste Todesursache von an Tumoren erkrankten Frauen ⁸. Im Folgenden wird auf die Häufigkeitsverteilung, die Einteilung der Erkrankung und die möglichen Therapieoptionen eingegangen.

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist nicht nur in Deutschland, sondern weltweit die häufigste tumorbedingte Todesursache der Frau. Hier liegt der Anteil weltweit bei mehr als 25% aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen ⁹. Alleine in Deutschland beträgt das Lebenszeitrisko einer Frau an Brustkrebs zu erkranken 12,8%, d.h. jede 8. Frau ist betroffen - bei deutschen Männern liegt das Lebenszeitrisko bei etwa 0,1% ¹⁰. Das mittlere Erkrankungsalter der Frau liegt bei etwa 64 Jahren, jedoch steigt das Risiko ab dem 50. Lebensjahr deutlich an, weshalb seit 2005 für Frauen von 50 bis 69 Jahren ein Mammographie-Screening alle zwei Jahre empfohlen wird ^{10,11}.

1.1.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der internationalen TNM-Klassifikation und ist von wesentlicher Bedeutung, weil sie über Therapie, Verlauf und Prognose maßgeblich bestimmt. Hierbei unterscheidet man die Kategorien T (Tumor - Ausdehnung des Primärtumors), N (node, engl. = Knoten - Lymphknotenbefall) und M (Metastasen - Vorhandensein von Fernmetastasen). Je nach Befall und Ausbreitung ergeben sich dadurch entsprechend der UICC (Union internationale contre le cancer) insgesamt 8 Stadien: ¹²

UICC-Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	T (in situ)	N0	M0
I	T1 (mikroskopisch)	N0	M0
	T1a (1 - 5 mm)	N0	M0
	T1b (6 - 10 mm)	N0	M0
	T1c (11 - 20 mm)	N0	M0
IIA	T0, T1 (mikroskopisch), T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0, T1 (mikroskopisch), T1, T2	N2	M0
	T3	N1	M0
IIIB	T4	N0 – 2	M0
IIIC	alle T	N3	M0
IV	alle T	alle N	M1

1.1.3 Therapieoptionen

Je nach Stadieneinteilung, Klinik und Wunsch des Patienten bestehen mehrere Therapieoptionen: chirurgisches Vorgehen, je nach Hormonrezeptorstatus antihormonelle Therapie, Chemotherapie, Bestrahlung.

Chirurgisches Vorgehen

Allem voran sei der sogenannte Wächterlymphknoten (engl. = Sentinel Lymph Node) erwähnt, welcher zur Evaluation axillärer Lymphknoten während einer SLNB (Sentinel Lymph Node Biopsy) entfernt wird. Dabei handelt es sich in der Regel um 1 bis 3 Lymphknoten, welche histologisch untersucht werden und

damit wesentlich zur Diagnostik beitragen: Ist der Lymphknoten befallen, so muss weiter nach Metastasen in der Umgebung gesucht werden. Ist der Lymphknoten jedoch negativ, dann ist die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen anderer befallener Lymphknoten sehr niedrig ¹³.

Beim lokal begrenzten Mammakarzinom steht immer im Vordergrund, brusterhaltend zu operieren. D.h. man rät zur BET (=brusterhaltende Therapie). Hierbei wird lediglich ein Segment reseziert. Der BET kann eine primäre neoadjuvante medikamentöse Therapie vorausgehen. Je nach histologischem Befund des Sentinel-Lymphknotens kann eine adjuvante medikamentöse Therapie und eine Bestrahlung des Tumorgebietes notwendig sein.

Falls eine BET nicht mehr möglich ist, wird eine Mastektomie vorgenommen und im Anschluss mit dem oben erläuterten Algorithmus fortgefahren. Je nach weiterem Vorgehen entschließt man sich hier zur SSM (engl. Skin sparing mastectomy), NSM (engl. Nippel sparing mastectomy) oder der modifizierten radikalen Mastektomie (MRM). Bei allen drei Methoden ist nach Abschluss der Folgebehandlungen (Chemotherapie, Bestrahlung) eine Rekonstruktion der Brust mit Implantaten (bei SSM+NSM) oder Eigengewebe möglich (bei radikaler Mastektomie mittels Lappenplastiken, DIEP-, FCI-Flap, etc.).

Bei fernmetastasierten Mammakarzinomen wird in der Regel mit einer systemischen medikamentösen Therapie begonnen. Hier steht die Lebensqualität des Patienten im Vordergrund. Gegebenenfalls kann dies auch eine Entfernung des Primärtumors oder weitere lokale Therapiemaßnahmen erforderlich machen. Mit dem Konzept der Best supportive Care wird versucht, den Patienten bestmöglich zu unterstützen ¹⁴.

Antihormonelle Therapie

Für eine adjuvante endokrine Therapie ist der Hormonrezeptorstatus von Bedeutung: Dabei unterscheidet man Östrogen- und Progesteronrezeptoren. Sind im Gewebe des OP-Präparates keine der beiden Rezeptoren vorhanden, macht eine antihormonelle Therapie keinen Sinn. Sind jedoch einer der beiden Rezeptoren oder sogar beide vorhanden, ist zu beachten, ob sich die Patientin

in der Prämenopause oder in der Postmenopause befindet. Ist sie prämenopausal, gilt die Gabe von Tamoxifen als Mittel der 1. Wahl. Zudem sollte über das Ausschalten der Ovarialfunktion nachgedacht werden. Dazu gibt es drei Methoden: GnRH Analoga, Ovariectomie, Radiomenolyse¹⁵. Ob die Ovarialfunktion überhaupt ausgeschaltet werden muss, hat die Wissenschaft bisher nicht eindeutig geklärt¹⁶. Ist die Patientin postmenopausal, sind Tamoxifen und Aromataseinhibitoren Mittel der 1. Wahl. Die Rezidivwahrscheinlichkeit wird durch Tamoxifen halbiert (relatives Risiko 0.53) und führt zu einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit verglichen mit Patientinnen ohne adjuvante endokrine Systemtherapie¹⁷. Aromataseinhibitoren senken das Rezidivrisiko um weitere 3%^{18, 19}.

Chemotherapie

Durch eine adjuvante Chemotherapie kann das Rezidivrisiko ebenfalls gesenkt werden²⁰. Ob eine Chemotherapie als sinnvoll angesehen wird, ist eine individuelle Fallentscheidung, die in der Regel interdisziplinär in Tumorkonferenzen entschieden wird. Hierbei ist ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren zu beachten. "Der individuelle Nutzen ist abhängig von biologischen Charakteristika des Tumors, dem Tumorstadium, von Art und Intensität der Chemotherapie und von der Komorbidität"¹⁹. Als Substanzen kommen Anthrazykline und Taxane in Frage.

Bestrahlung

Die Bestrahlung ist insofern von besonderer Bedeutung, weil sie die lokoregionäre Rezidivrate halbiert und damit das Überleben des Patienten verlängern kann²¹. Üblicherweise beginnt die Bestrahlung vier bis sechs Wochen postoperativ nach Abheilung der Wunden oder nach Abschluss einer adjuvanten Chemotherapie. Bestrahlt werden können die Brust selbst, nach Mastektomie die Brustwand sowie regionale Lymphabflusswege.

1.2 Kolorektalkarzinom

Unter dem Kolorektalkarzinom versteht man die weltweit häufigste maligne Erkrankung des Dick- und Enddarmes.

1.2.1 Epidemiologie

In Deutschland ist das Kolorektalkarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache bei beiden Geschlechtern. Davon befinden sich über zwei Drittel aller Tumoren im Kolon. Das Lebenszeitrisiko, daran zu erkranken beträgt bei Männern 6.9% und bei Frauen 5.5%. Das Durchschnittsalter liegt bei Männern bei 72 Jahren, bei Frauen bei 75 Jahren. Ab dem 50. Lebensjahr können Männer und Frauen im Rahmen der gesetzlichen Krebsfrüherkennung eine Testung auf okkultes Blut im Stuhl durchführen lassen sowie ab dem 55. Lebensjahr eine Koloskopie. ¹⁰

1.2.2 Stadieneinteilung

UICC-Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	T (in situ)	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1 - 2	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
	T1	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
IIIB	T3 - 4	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
	T2-3	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T1-2	N2b (>7 betroffene LK)	M0
IIIC	T4a	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T3-T4a	N2b (>7 betroffene LK)	M0
	T4b	N1-2	M0
IVA	jedes T	jedes N	M1a (Fernmetastasen in einem Organ)

IVB	jedes T	jedes N	M1b (Fernmetastasen in einem Organ oder im Peritoneum)
-----	---------	---------	--

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der UICC ¹².

1.2.3 Therapieoptionen

Je nach Stadieneinteilung, Klinik und Wunsch des Patienten bestehen mehrere Therapieoptionen: chirurgisches Vorgehen, Chemotherapie, Bestrahlung.

Chirurgisches Vorgehen

Das Ausmaß der Resektion hängt maßgeblich von der Gefäßversorgung ab. Um eine intraoperative Tumorzellverbreitung zu vermeiden, kommt die sogenannte "No-touch-Technik" zur Anwendung. Dabei wird eine En-bloc-Resektion des tumorenhaltenden Darmabschnitts angestrebt. Zudem erfolgt stets eine Lymphadenektomie, in der die Lymphknoten aus dem Lymphabflussgebiet des Tumors reseziert werden. Der UICC zufolge ist die histologische Untersuchung von mindestens 12 Lymphknoten nötig, um den Lymphknotenstatus sicher beurteilen zu können.²²

Chemotherapie

Je nach Indikation kommt eine neoadjuvante, adjuvante oder palliative Chemotherapie in Frage. Es handelt sich in der Regel um Kombinationstherapien. Die häufigsten sind besser bekannt als FOLFOX (5-Floururacil (5-FU) + Folinsäure + Oxaliplatin), FOLFIRI (5-FU + Folinsäure + Irinotecan) oder XELOX (Capecitabin + Oxaliplatin). Je nach Fall werden diese Kombinationen um VEGF-Antikörper (z.B. Bevacizumab) oder EGF-Antikörper (z.B. Cetuximab) ergänzt.

Bestrahlung

Insbesondere das Rektumkarzinom kann von einer Radiotherapie profitieren. Diese kann neoadjuvant präoperativ im UICC-Stadium II und III erfolgen und

senkt die Lokalrezidivrate um bis zu 50%. Wenn keine neoadjuvante Radiochemotherapie erfolgt ist, kann zudem als adjuvante Therapie ab dem UICC-Stadium II eine kombinierte Radiochemotherapie circa 4-6 Wochen nach der Operation erfolgen.

1.3 Hyperthermie

Die Hyperthermie ergänzt bereits seit Jahren Strahlen- und Chemotherapie. Sie wirkt zytotoxisch, induziert die Expression von Hitzeschockproteinen und senkt zelleigene Reparaturraten von Strahlenschäden. Sie ist ein Sensibilisator (Sensitizer) von Zelltod durch ionisierende Strahlung und verbessert durch Vasodilatation die Oxygenierung hypoxischer Tumoren ²³. Eine gute Übersicht über die generelle Praxis mit Hyperthermie von früher und heute gibt George Hahn in seinem Buch „Hyperthermia and Cancer“ ²⁴. Laut Franken et al. ist zudem die Reihenfolge der kombinierten Bestrahlung und Hyperthermiebehandlung wichtig. Optimale Sensibilisierung wird erreicht, wenn Strahlung und Hyperthermie gleichzeitig oder innerhalb eines kurzen Zeitintervalls angewendet werden ²⁵.

In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen wurden die Zellkulturen je nach Bedingung vor der Bestrahlung mit 2 Gy auf 42°C erhitzt.

1.3.1 Hitzeschockprotein HSP 90

Hitzeschockproteine werden unter bestimmten Bedingungen wie z.B. erhöhter Temperatur vermehrt exprimiert. Bei dem HSP 90 handelt es sich um eines der am besten erforschten Hitzeschockproteine. Die 90 bezeichnet das Molekulargewicht von 90 kDa. Vor allem bei der Faltung, Stabilisierung, Aktivierung und Funktion von Proteinen in zellulären Stresssituationen spielen Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle, da sie in der Lage sind, Proteine unter anderem vor Denaturierung und Aggregation zu schützen. ²⁶ In den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien MCF 7 und HCT 116 wird das HSP 90 vermehrt exprimiert ^{27,28}.

1.4 Hypoxie

Die Hypoxie spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Tumoren und ungünstigen Prognosen. Sie entsteht oft durch unkontrolliertes Zellwachstum und insuffiziente Vaskularisation; sie induziert u.a. VEGF (vascular endothelial growth factor) mit Einsprossung neuer Blutgefäße in den Tumor²⁹. Die Hypoxie erhöht die maligne Potenz von Tumoren durch Veränderungen auf zellulärer Ebene wie zum Beispiel durch Hemmung der Mitochondrienfunktion³⁰. Es kann zu einer erhöhten intrinsischen Chemotherapie- bzw. Strahlenresistenz kommen. Zudem ist die Strahlentherapie unter Hypoxie in Bezug auf die Induktion von DNS-Doppelstrangbrüchen circa um den Faktor 2-3 ineffizienter³¹.

Um die hypoxische Umgebung in den für diese Arbeit verwendeten Zellkulturen zu simulieren, wurden die Zellen 24 Stunden vor Bestrahlung in sogenannte Hypoxiebeutel gepackt.

1.4.1 Hypoxieinduzierter Faktor HIF-1 α

Hierbei handelt es sich um einen wichtigen Transkriptionsfaktor bei Tumorzellen unter Hypoxie und deren Reaktion hierauf (s.o.). HIF-1 α induziert die Expression einer Vielzahl von Genen, die die Zellen bei der Anpassung an die hypoxische Umgebung unterstützen. Der Faktor koordiniert die Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle, die die Tumorgenese beeinflussen³². So vermittelt HIF-1 α zum Beispiel durch Hypoxie induzierte proangiogene Faktoren wie VEGF und PDGF (platelet-derived growth factor), welche die Extravasation und Chemotaxis fördern³³.

1.5 Apoptose

Hierunter versteht man den programmierten Selbstmord einer Zelle. Ein wichtiger Unterschied zur Nekrose ist das Ausbleiben der Entzündungsreaktion, da das Cytoplasma nicht freigesetzt wird. Wesentliche Eckpunkte der Apoptose sind unter anderem das Schrumpfen der Zelle, die Kondensation und

Degradation der DNA sowie der Zerfall in Vesikel, welche samt Inhalt durch Makrophagen entsorgt werden. Letztere erkennen das Phosphatidylserin, welches normalerweise auf der Innenseite der Plasmamembran zu finden ist, sich aber im Rahmen der Apoptose und dem Verlust der Phospholipid-Asymmetrie an der Zelloberfläche präsentiert. Vor allem in der Strahlentherapie spielen die Apoptose und ihre Mechanismen eine große Rolle: Hier kommt es zu DNA-Doppelstrangbrüchen, welche den konsekutiven Zelltod hervorrufen. Dabei gibt es Tumore, welche durch sogenannte antiapoptotische Proteine wie z.B. das bcl-2 eine Apoptoseresistenz induzieren können ³⁴. Auch die in dieser Arbeit verwendete MCF 7 Zelllinie gilt als apoptoseresistent ³⁵.

1.6 Nekrose

Anders als bei der Apoptose kommt es bei der Nekrose auf Grund von Membrandefekten zu einer Entzündungsreaktion. Die Zelle schwillt an, es kommt zu einer Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies und des cytoplasmatischen Calciums, einer Abnahme des ATP, Aktivierung bestimmter Proteasen und schließlich zur Ruptur der Zelle ³⁶.

1.7 Tumor-Mikroumgebung

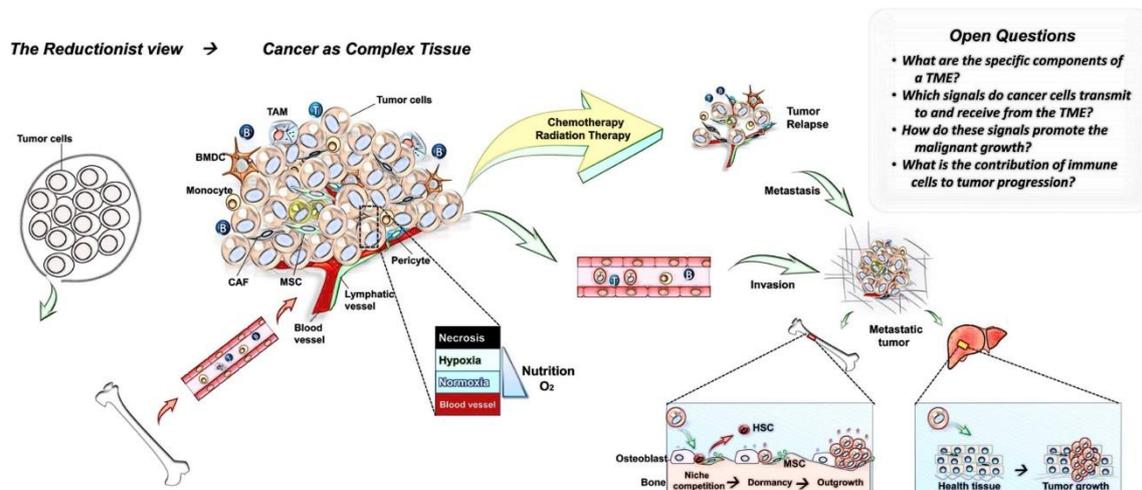


Abbildung 1: modifiziert nach Hui und Chen ³⁷: Schematische Darstellung der Tumor-Mikroumgebung (TMU) aus Sicht des Tumors. Tumorzellen können ihre eigene Expansion und Aggressivität durch Transformation normaler adulter Stammzellnischen fördern. CAF=Krebs-assoziierte Fibroblasten; TAM=Tumor-assoziiierter Makrophage; BMDC=vom Knochenmark abgeleitete dendritische Zellen; MSC=mesenchymale Stamm-/Stromazellen; ECM=extrazelluläre Matrix (Quellen für diese und alle weiteren Abbildungen siehe unter Punkt 7: Abbildungsquellenverzeichnis)

Um zu verstehen wie Krebserkrankungen behandelt werden können, ist es unumgänglich, vorher die Tumor-Mikroumgebung (TMU) zu verstehen. Diese bezeichnet das unmittelbare Umfeld des Tumors, welches grob gesagt aus einem komplexen Netzwerk aus den Tumor umgebenden Blutgefäßen, der extrazellulären Matrix, anderen nicht-malignen Zellen wie zum Beispiel Makrophagen, Stromazellen, Fibroblasten, Immunzellen (B-/T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen) sowie Signalmolekülen besteht ³⁷. Balkwill et al. ³⁸ und Lu et al. ³⁹ fanden heraus, dass die Zusammensetzung der extrazellulären TMU einen prognostischen Wert für die Klinik darstellt. Ein anschauliches Beispiel für die Komplexität der TMU ist das Tumorgefäßsystem ³⁷. Dieses ist in nahezu jeder Hinsicht abnormal (v.a. in Struktur und Funktion) ⁴⁰. Auf Grund des chaotischen Gefäßwachstums innerhalb des Tumors kommt es häufig zu hypoxischen Bedingungen. Sendet dieses hypoxische Areal dann nach außen Signale, kommt es zur Stimulation der Angiogenese und es kommt zur weiteren Gefäßeinsprossung in den Tumor mit chaotischer Struktur ⁴¹. Zudem weisen

diese Gefäße ein ungleiches Lumen auf und sind in der Regel undicht, was den Druck der interstitiellen Flüssigkeit erhöht ³⁷.

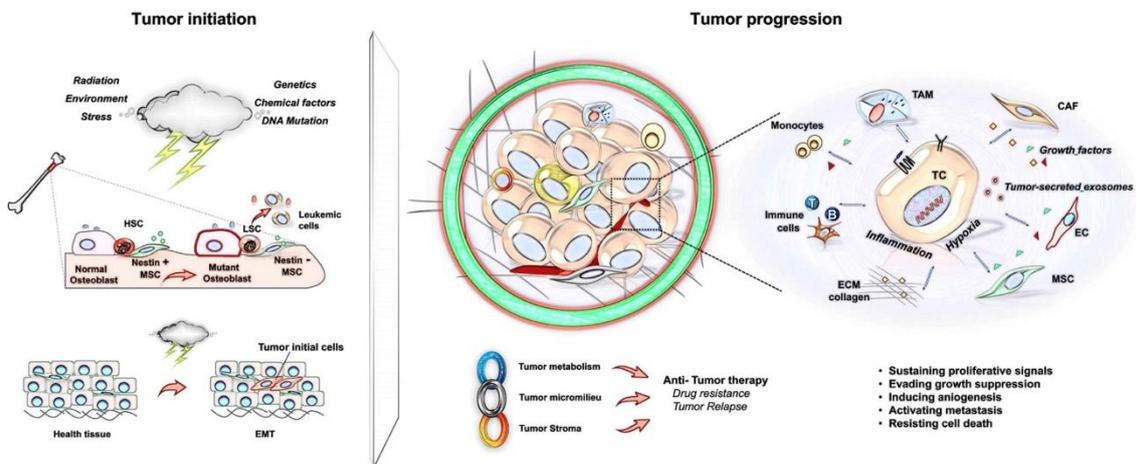


Abbildung 2: modifiziert nach Hui und Chen ³⁷: Schematische Darstellung vom Einfluss der TMU auf die Tumorinitiation und Progression bis hin zur Medikamentenresistenz

Innerhalb der TMU interagieren Tumorzellen und nicht-maligne Zellen aktiv miteinander. Könnte man in der Tumorthherapie diese TMU gezielt ansprechen, könnte man damit möglicherweise das Outcome der Patienten verbessern ³⁷.

1.8 Fragestellung

Wie bereits weiter oben erwähnt stellt die Hypoxie eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Tumoren und ungünstigen Prognosen vor allem bei Kopf-Hals-Tumoren, Brust- und Kolorektalkarzinomen dar. Die Hypoxie entsteht oft durch unkontrolliertes Zellwachstum und insuffiziente Vaskularisation; sie induziert unter anderem VEGF (vascular endothelial growth factor) mit Einsprossung neuer Blutgefäße in den Tumor ²⁹. Die Hypoxie erhöht die maligne Potenz von Tumoren durch Veränderungen auf zellulärer Ebene wie zum Beispiel die Hemmung der Mitochondrienfunktion ³⁰. Es kann zu einer erhöhten intrinsischen Chemotherapie- bzw. Strahlenresistenz kommen. Zudem ist die Strahlentherapie unter Hypoxie in Bezug auf die Induktion von DNS-Doppelstrangbrüchen circa um den Faktor 2-3 ineffizienter ³¹.

Demgegenüber ergänzt die Hyperthermie bereits seit Jahren Strahlen- und Chemotherapie. Sie wirkt zytotoxisch, induziert die Expression von Hitzeschockproteinen und senkt zelleigene Reparaturraten von Strahlenschäden. Sie ist ein Sensibilisator von Zelltod durch ionisierende Strahlung und verbessert durch Vasodilatation die Oxygenierung hypoxischer Tumoren.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob Hyperthermie einen Einfluss auf hypoxieinduzierte Strahlenresistenz hat. Reduziert Hyperthermie *in vitro* hypoxische Strahlenresistenz in MCF 7 und HCT 116? Kann Hyperthermie zukünftig *in vivo* die Antwort auf Strahlentherapie bei Patienten mit hypoxischem Mamma- oder lokal fortgeschrittenem Kolorektalkarzinom verbessern? Was ist der optimale Zeitplan für Hyperthermie und Strahlentherapie? Welche Rolle spielt das komplexe Netzwerk aus hypoxieinduzierten Faktoren wie zum Beispiel HIF-1 α und Hitzeschockproteinen wie zum Beispiel HSP 90? Und als Ausblick für die Zukunft: Könnte gezielt über HIF-1 α und HSP 90 Targeting das klinische Outcome der Patienten verbessert werden?

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Zelllinien

2.1.1.1 MCF 7

MCF 7 ist ein Akronym für Michigan Cancer Foundation 7 in Detroit, Michigan und ist der Name für eine Zelllinie, welche 1970 aus dem Pleuraerguss eines invasiv-duktales Mammakarzinoms einer damals 69-jährigen Frau kaukasischer Abstammung isoliert wurde. Diese Frau erlag 1970 ihrer Krebserkrankung. Sie war Ordensschwester im Konvent Immaculate Heart of Mary in Monroe, Michigan und ihr ziviler Name lautete Frances Mallon ⁴². Sie ist deswegen so besonders, weil aus ihrem Brustgewebe 1973 die erste Kultivierung einer Brustzelllinie gelungen ist ⁴³ – und zwar Herrn Herbert Soule und seinen

Mitarbeitern ⁴⁴. Die Michigan Cancer Foundation heißt heute Barbara Ann Karmanos Cancer Institute und ist eines von 41 National Cancer Institutes der USA ⁴⁵. Neben den beiden anderen Mammakarzinom-Zelllinien T-47D und MDA-MB-231 ist MCF 7 Grundlage für mehr als zwei Drittel ⁴⁶ aller Studien über Mammakarzinom-Zelllinien basierend auf Medline ⁴⁷. Die MCF 7 Zellen verfügen über einige herausragende Eigenschaften, weshalb sie gerne in der Forschung Verwendung finden ⁴⁸⁻⁵¹: Sie haben unter anderem morphologische Eigenschaften differenzierten Mammaepithels, wachsen adhärent, synthetisieren Östradiol, exprimieren Östrogen- wie Progesteronrezeptoren und reagieren auf eine Behandlung mit Östrogenen mit Zellproliferation. Die hormonellen Eigenschaften hatten für meine Arbeit allerdings keine Bedeutung. Die MCF 7 Zellen sind uns freundlicherweise von Prof. Peter Daniel aus Berlin überlassen worden.

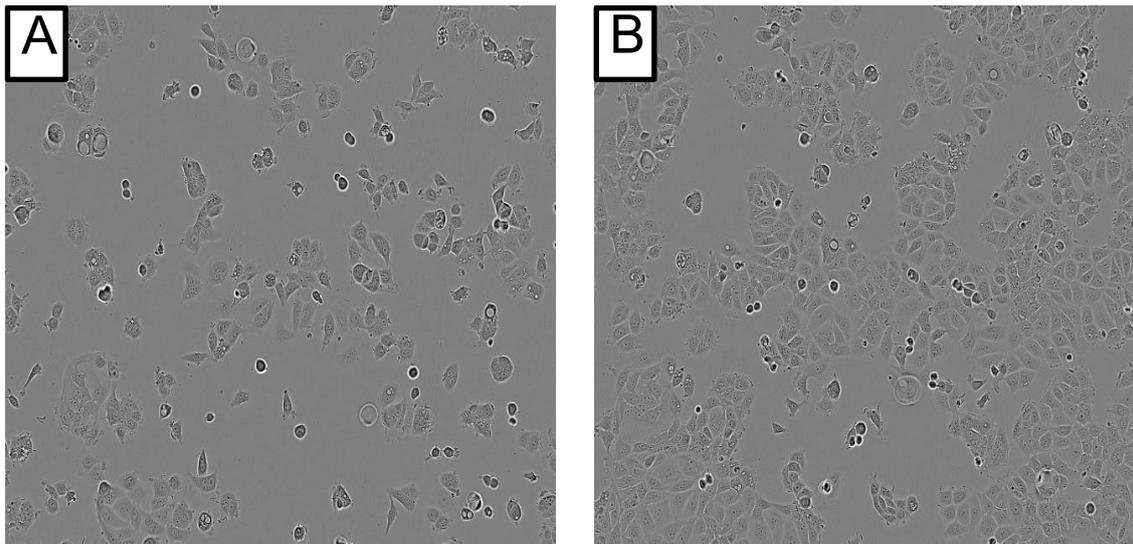


Abbildung 3: Links (A) MCF 7 Zellen in Zellkultur 24 Stunden nach der Aussaat; rechts (B) MCF 7 Zellen in Zellkultur 48 Stunden nach der Aussaat

2.1.1.2 HCT 116

HCT steht für human colon tumor. Die Zelllinie wurde 1980 im Department of Biochemistry der University of Alabama in Birmingham aus dem primären Kolorektalkarzinom eines erwachsenen Mannes kaukasischer Abstammung isoliert ⁵². Bis heute ist sie eine etablierte Zelllinie, die in der experimentellen

Forschung nicht mehr wegzudenken ist. Sie hat eine epithelzellähnliche Morphologie und verdoppelt sich innerhalb von 25 bis 48 Stunden. Wie die MCF 7 Zellen wachsen sie adhärent⁵³. Die Zellen wurden bei uns bei 37°C und 5% CO₂-Begasung inkubiert. Die HCT116-Tumorzellen stammen aus dem Leibniz-Institut DSMZ GmbH Braunschweig.

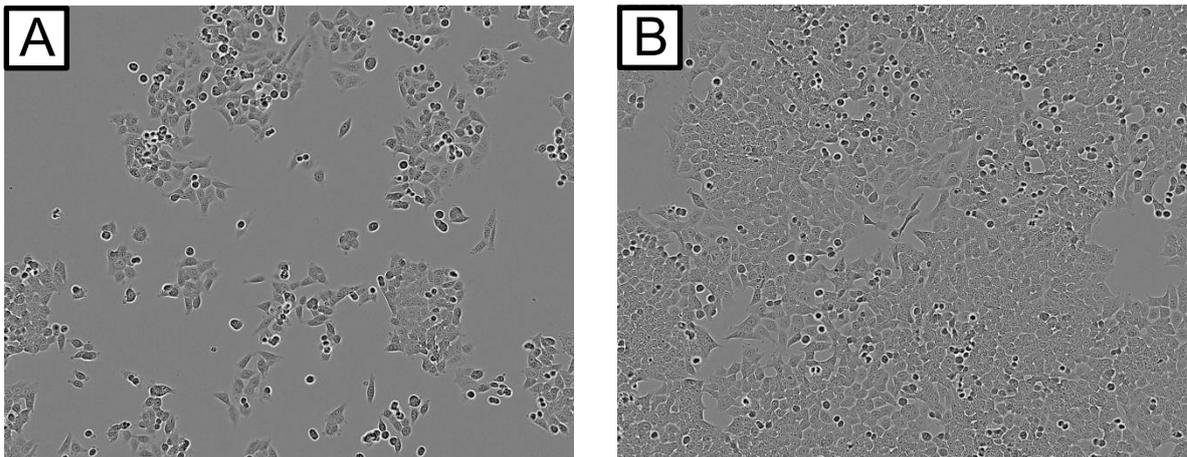


Abbildung 4: Links (A): HCT 116 Zellen in Zellkultur 24 Stunden nach der Aussaat; rechts (B): HCT 116 Zellen in Zellkultur 48 Stunden nach der Aussaat

2.1.2 Antikörper

	1. Antikörper	2. Antikörper
zur β -Actin – Bestimmung	1:20 000 β -Actin-Antikörper (Sigma Aldrich; St. Louis/ Steinheim) + 5 ml 5 % BSA/ TBS-Tween	1:2000 Horseradish Peroxidase-conjugated Antimouse IgG + 5 ml 5 % BSA/ TBS-Tween
zur HIF-1 α - Bestimmung	1:1000 HIF-1 α -Antikörper (Active Motif, Carlsbad USA) + 5 ml 5 % Milchpulver/ TBS-Tween	1:2000 Horseradish Peroxidase-conjugated Antimouse IgG +5 ml 5 % Milchpulver/ TBS-Tween
zur HSP 90- Bestimmung	1:4000 HSP 90-Antikörper + 5 ml 5 % Milchpulver/ TBS-Tween	1:2000 Horseradish Peroxidase-conjugated Antimouse IgG +5 ml 5 % Milchpulver/ TBS-Tween

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Pufferlösungen

Annexin-/PI-Farbstoff (für 200 µl):

196 µl Ringerlösung	Braun, Melsungen
2 µl Annexin-V-Fluos	Roche, Mannheim
2 µl Propidiumiodid (1 mg/ml Stammlösung)	Sigma Aldrich, St. Louis/ Steinheim
Aqua destillata	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Blottingpuffer:

15,5 g Trizma Base	Sigma Aldrich, St. Louis/ Steinheim
72 g Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
1000 ml Isopropanol (70%)	VWR Prolabo, Darmstadt
4000 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Coomassie (0,05%, 500 ml):

100 ml 20% Methanol	Merck, Darmstadt
37,5 ml 7,5% Essigsäure	Merck, Darmstadt
362,2 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
0,25 g Coomassie-Pulver	Sigma Aldrich, St. Louis/ Steinheim
Dithiothreitol	Sigma Aldrich, St. Louis/ Steinheim
FCS	Biochrom AG
Formaldehyd (3,7%)	Merck, Darmstadt
Isopropanol (70%)	VWR Prolabo, Darmstadt
Kulturmedium McCoy's 5A	PAA Laboratories GmbH
Kulturmedium RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH

Laufpuffer (für Western Blots):

(Rotiphorese 10x SDS Page 1:10 mit Aqua dest. verdünnt)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
--	-----------------------------------

Lysepuffer:

HEPES, pH 7,4 (50 mM)	PAA Laboratories GmbH
Triton X-100 (1%)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
NaCl (150 mM)	AppliChem GmbH
NaPP (10 mM)	Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim
NaF (10 mM)	Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim
EDTA (1 mM)	Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim
Na ₃ VO ₄ (2 mM)	Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim
H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Aprotinin (5 µg/ml)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Leupeptin (5 µg/ml)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Pepstatin (3 µg/ml)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
PMSF (1 mM)	Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Nicoletti-Färbung:

49 ml Natriumcitrat/ PBS (1 mg/ml Stammlsg.)	Sigma Aldrich, St.Louis/ Steinheim
500 µl Propidiumiodid (1 mg/ml Stammlösung)	Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim
500 µl Triton X-100 (10%ige Stammlösung)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4):

8 g NaCl	AppliChem GmbH
0,2 g KCl	Carl Roth GmbH + Co KG
1,15 g Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim
0,2 g KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim
1000 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co KG
Ponceau-S-Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim
Protein Ladder, Page Ruler	Thermo Fisher, Fermentas Int. Inc., Maryland

Reagenz 1 + 2

GE Healthcare UK Ltd., GB-
Buckinghamshire

Sammelgel (für 2 Gele):

1,75 ml Sammelgelpuffer

siehe unten

3,75 ml Aqua dest.

Carl Roth GmbH + Co KG

1,5 ml Gel 30

Carl Roth GmbH + Co KG

70 µl APS

Carl Roth GmbH + Co KG

7 µl Temed

Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim

Sammelgelpuffer (pH 6,8; für 100ml):

6 g Tris Base

Carl Roth GmbH + Co KG

4 ml SDS 10%

Merck, Darmstadt

TBS Tween (pH 8):

Tris-HCl (10 mM)

Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim

NaCl (150 mM)

AppliChem GmbH, Darmstadt

Tween 20

AppliChem GmbH, Darmstadt

Trenngel (für 2 Gele):

Trenngelpuffer

siehe unten

Aqua dest.

Carl Roth GmbH + Co KG

Gel 30

Carl Roth GmbH + Co KG

APS

Carl Roth GmbH + Co KG

Temed

Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim

SDS (20%)

Merck, Darmstadt

Trenngelpuffer (pH 8,8; für 100ml):

18,17 g Tris Base

Carl Roth GmbH + Co KG

4ml SDS (10%)

Merck, Darmstadt

Tryptan blue solution (0,4 %)

Sigma Aldrich, St. Louis/Steinheim

Trypsin

PAA Laboratories GmbH, A-Paching

2.1.4 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Hilfsmittel

Abstandsstreifen (für Gelelektrophorese)	Biometra GmbH, Göttingen
Antriebsgerät (für Western Blots), Biometra Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
Autoradiographie-Kassette, Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare UK Ltd., GB- Buckinghamshire
Blotkammer, Bio Rad Trans Blot Cell	Bio Rad Laboratories, München
Brutschrank (37°C, 42°C)	Hera cell 240 Heraeus; Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Entwickler, Curix 60 AGFA	Agfa HealthCare Corporation, Greenville, USA
Entwicklerpapier	GE Healthcare UK Ltd., GB- Buckinghamshire
Eppendorf-Cup	Sarstedt, Nürnberg
Falcon Tubes (15 ml, 50 ml, 100 ml)	Becton Dickinson, NJ/Heidelberg
FACSCalibur	Becton Dickinson, NJ/Heidelberg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, NJ/Heidelberg
Filterpapier (für Western Blots)	Bio Rad Laboratories, München
Glasplatte	Biometra GmbH, Göttingen
Hypoxie Pack	GasPak EZ Pouch System Sachets, BD Franklin Lakes, NJ USA

Kämme (für Western Blots)	Biometra GmbH, Göttingen
Kryo-Röhrchen	Eppendorf, Hamburg
Laufapparatur (für Western Blots)	Biometra GmbH, Göttingen
Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Neubauer Zählkammer "C-Chip"	Neubauer Improved, Korea
Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipet Boy	Integra Biosciences AG, Zizers Schweiz
Polivinyldendifluorid-Membran	Millipore Corporation, Billerica, USA
Scanner, Hewlett Packard Scan Jet	Hewlett Packard GmbH, Böblingen
Schwämme (für Western Blots)	Bio Rad Laboratories, München
Schüttler	Biometra GmbH, Göttingen
sterile Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Kulturplatten (6-Well und 96-Well)	Tissue Culture Plate, Becton Dickinson Company, NJ USA
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber	Sarstedt Inc., Newton
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg; Hettich AG, Bäch, Schweiz

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

Die MCF 7 Zellen erhielten als Medium RPMI 1640 mit zusätzlich 10% fötalem Kälberserum (FCS). Bei den HCT 116 Zellen verwendeten wir als Medium McCoy's 5A mit zusätzlich 10% FCS und 1% L-Glutamin. Inkubiert wurden die Zellen im Brutschrank in großen Zellkulturflaschen (175 cm²) bei 5%iger CO₂-Begasung und 37°C. Das Medium wurde alle 4 bis 5 Tage erneuert. Verwendet wurden die Zellen zwischen den Passagen 3 und 35. Passagiert wurden die Zellen, indem zunächst der Überstand vorsichtig entfernt wurde und dann zweimal mit je 10 ml steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS = phosphate buffered saline) gewaschen wurde. Daraufhin erfolgte die Inkubation im 37°C-Brutschrank nach Zugabe von 2 ml 37°C warmem Trypsin. Hierdurch kommt es zur Ablösung der adhären wachsenden Zellen vom Zellkulturflaschenboden. Abgestoppt wurde die Reaktion nach circa 10 Minuten mit 8 ml 4°C kaltem Medium. Das Gemisch wurde dann bei 1200 rpm (rounds per minute) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Damit die Zellen über ihre Passagezeit hinaus für länger gelagert werden können, müssen sie eingefroren werden. Dies geschieht mit Hilfe von flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C. Hierzu werden in ein Kryoröhrchen 1,5x10⁶ Zellen, 1,5 ml Medium sowie 10%iges DMSO (Dimethylsulfoxid) gegeben. Letzteres soll die Bildung von Kristallen verhindern, die sonst beim Gefrieren entstehen könnten.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 1200 rpm und schließlich das Absaugen des Überstandes. Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium und 0,5 ml FCS resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Der erste Wechsel des Mediums erfolgt nach dieser Prozedur bereits nach 2 Tagen.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und als Zellsuspension (100 µl) mit dem Farbstoff Trypanblau im Verhältnis 1:2 verdünnt. Das Trypanblau wurde zuvor 1:10 mit PBS verdünnt. Trypanblau dringt schnell in tote Zellen ein und lässt sie unter dem Mikroskop blau erscheinen. Lebende Zellen hingegen nehmen den Farbstoff nur extrem langsam auf, weshalb die Unterscheidung sehr einfach ist. Um die genaue Zellzahl zu ermitteln, wurde das Gemisch in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Dann wurden vier große Quadranten ausgezählt und entsprechend der folgenden Formel die Zellzahl pro Milliliter berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Zahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Zahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Kammerfaktor } 10^4$$

2.2.4 Hyperthermiebehandlung der Zellen

Hierzu wurden die Zellkulturflaschen in einen Brutschrank gelegt, welcher neben der üblichen 5%igen CO₂-Begasung auf 42°C temperiert war. Die HCT116 Zellen wurden je 60 Minuten bei 42°C inkubiert, die MCF 7 Zellen für je 120 Minuten.

2.2.5 Hypoxiebehandlung der Zellen

Zur Simulation einer für die Zellen hypoxischen Umgebung wurden sogenannte Hypoxiepacks (GasPak EZ Pouch System Sachets von BD) verwendet. Hierzu wurden die Zellkulturflaschen samt Indikatorstreifen und Hypoxiebeutel in einen Plastikbeutel gegeben, luftdicht verschlossen und bei der gewünschten Temperatur (37°C bzw. 42°C) für insgesamt 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Indikator zeigt hierbei durch Farbumschlag an, ob die Umgebung tatsächlich sauerstofffrei ist. Der Indikator ist hierbei mit einer Methylenblau-Lösung versetzt, welche in Gegenwart von Raumsauerstoff tiefblau gefärbt ist und unter anaeroben Bedingungen farblos wird.

2.2.6 Bestrahlung der Zellen

Bestrahlt wurden die Zellen bei Raumtemperatur im Linearbeschleuniger (Linac® der SL25 Philips) bei einer Dosisrate von 4 Gy/min. Die Dosis betrug 2 Gy 6 MV Photonen. Um bei den Versuchen einen Effekt der Temperaturunterschiede auszuschließen, wurden die auf 42°C erhitzten Zellen in einem isolierenden verschlossenen Styroporbehälter vom Brutschrank zum Beschleuniger getragen (circa 25 m Gehstrecke) und die nicht zu bestrahlenden Zellen zeitgleich aus dem Brutschrank genommen.

2.2.7 Fixieren und Anfärben der Zellen

Sobald die gewachsenen Kolonien mit dem Auge gut sichtbar sind, wurde zunächst das Medium abpipettiert. Zum Fixieren der Zellen wurden nun pro Zellkulturflasche je 5 ml 3,7% Formaldehyd für 10 Minuten hinzugegeben und im Anschluss wieder abpipettiert und verworfen. Dann wurden je 5 ml 70% Ethanol dazugegeben und weitere 10 Minuten lang fixiert. Anschließend wurde wieder alles abpipettiert und verworfen und schließlich mit Aqua destillata gespült. Zum Anfärben der Zellen wurden je 5 ml Coomassie-Blau für 20 Minuten hinzugegeben. Zum Schluss wurde erneut mit destilliertem Wasser gespült. Die Zellkulturflaschen wurden dann zum Trocknen aufgestellt.

2.2.8 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest, auch Clonogenic Assay genannt, bestimmt das klonogene Überleben von Zellen, die entweder unbehandelt waren oder einer bestimmten Behandlung ausgesetzt waren; hier also nach Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen in Kombination mit beziehungsweise ohne Hyperthermie. Dabei ist eine Beurteilung der Klonogenizität der Zellen möglich. Definiert wird eine Kolonie, wenn sie mindestens aus 50 Zellen besteht. Der Test wurde bereits vor über 60 Jahren etabliert und erstmals 1956 von Philip Marcus publiziert ⁵⁴. Inzwischen ist der Test in der Strahlenbiologie der Goldstandard zur Beurteilung der Strahlensensibilität unterschiedlicher Zelllinien ⁵⁵.

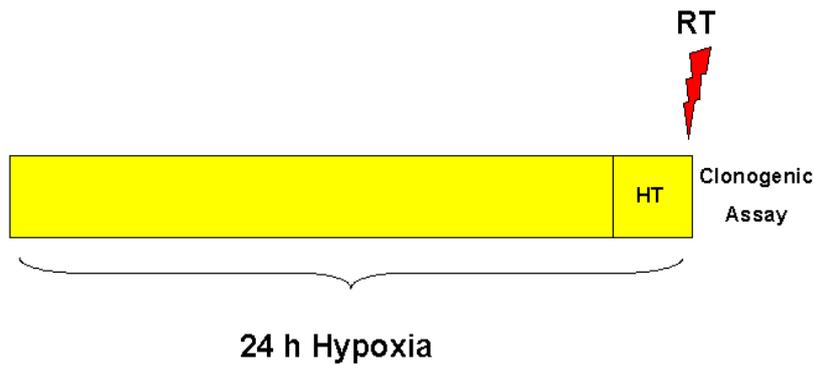


Abbildung 5: Versuchsablauf vor dem Koloniebildungstest (Clonogenic Assay), HT: Hyperthermie, RT: Bestrahlung

Es gab im Voraus 8 unterschiedliche Versuchsbedingungen gemäß 2.2.4, 2.2.5 und 2.2.6: unbehandelte Kontrolle, Kontrolle+Bestrahlung, Hypoxie, Hypoxie+Bestrahlung, Hyperthermie, Hyperthermie+Bestrahlung, Hypoxie+Hyperthermie sowie Hypoxie+Hyperthermie+Bestrahlung. Die Zellen wurden im Anschluss an die Behandlung zunächst wie in 2.2.1 beschrieben mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche vorsichtig abgelöst und gemäß 2.2.3 die Zellzahl bestimmt. Abhängig von diesem Ergebnis wurde das Gemisch entsprechend so mit Medium verdünnt, dass am Ende 10 Milliliter einer Suspension mit 10 000 Zellen pro Milliliter hergestellt werden konnte. Je nach Versuchsbedingung wurde diese Suspension dann noch um zwei weitere Stufen um je 1:10 mit Medium verdünnt, sodass letztlich eine Konzentration von 100 Zellen pro Milliliter erzielt werden konnte. Pro Versuchsbedingung wurden schließlich 3 kleine Zellkulturflaschen ausgesät (je 1 ml Suspension + 4 ml Medium):

Kontrolle: 100 Zellen/ml

Kontrolle+Bestrahlung: 1000 Zellen/ml

Hypoxie: 100 Zellen/ml

Hypoxie+Bestrahlung: 500 Zellen/ml

Hyperthermie: 100 Zellen/ml

Hyperthermie+Bestrahlung: 1000 Zellen/ml

Hypoxie+Hyperthermie: 100 Zellen/ml

Hypoxie+Hyperthermie+Bestrahlung: 1000 Zellen/ml

Nach einer zwei- bis dreiwöchigen Inkubation dieser kleinen Zellkulturflaschen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden die Zellen gemäß 2.2.7 fixiert und angefärbt, um die inzwischen sichtbar gewachsenen Kolonien zu zählen.

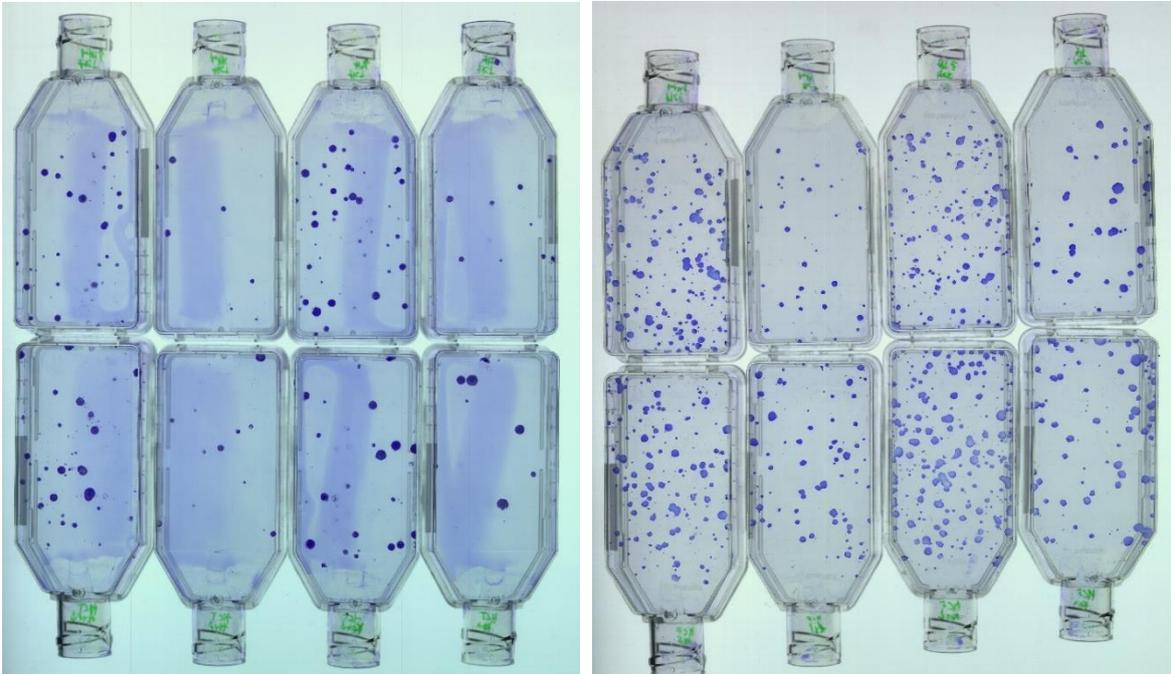


Abbildung 6: fixierte und angefärbte HCT 116 – (links) und MCF 7 Kolonien (rechts)

2.2.9 Western Blot

Bereits Ende der 1970-er Jahre wurde das Verfahren durch den Amerikaner W. Neal Burnette entwickelt, seine Veröffentlichung zunächst von den Fachzeitschriften abgelehnt und schließlich 1981 doch publiziert ⁵⁶. Durch den Western Blot ist es möglich, Proteine in einem Proteingemisch wie zum Beispiel einem Zelllysat - wie es in dieser Arbeit der Fall war - nachzuweisen. Die Reihenfolge war konkret folgende: Behandlung der Zellen (Hypoxie, Hyperthermie), Herstellung eines Zelllysates, Denaturierung und Auftrennung nach Molekülmasse mittels SDS-Gelelektrophorese, Blotting auf eine PVDF-Membran und schließlich der Nachweis ausgewählter Proteine (HSP 90, HIF-1 α , β -Actin) durch antikörpergebundene chemilumineszente Reaktionen.

2.2.9.1 Herstellung der Zelllysate

Im Anschluss an die Zellbehandlung mit Hypoxie, Hyperthermie und die Kombination aus beidem wurden die Lysate hergestellt. Dazu musste zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit in Eis gekühltem PBS gewaschen werden. Dieses wurde dann ebenfalls abgesaugt und pro Zellkulturflasche je 500 µl Lysepuffer, welcher gemäß 2.1.3 hergestellt wurde, hinzugegeben. Mit diesem Lysepuffer benetzt, wurden die Zellen nun vorsichtig mit einem Zellschaber gemäß 2.1.4 vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt. Das abgeschabte Material wurde schließlich mit Hilfe einer kleinen Stabpipette in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf Cup) überführt und 30 Minuten auf Eis gelegt. Anschließend erfolgte für 15 Minuten die Zentrifugation bei 1500 rpm und 3°C Temperatur. Das Zelllysate befand sich nun im Überstand, woraus je 400 µl abpipettiert und in neue Reaktionsgefäße gefüllt wurden, welche wiederum auf Eis gelegt wurden.

Die folgende Proteinbestimmung erfolgt nach der sogenannten Bradford-Methode; einer Methode, welche der US-amerikanische Wissenschaftler Marion McKinley Bradford entwickelt und 1976 publiziert hat ⁵⁷. Seine Arbeit ist die bis heute am häufigsten zitierte und ein Goldstandard, der aus heutigen Laboratorien nicht mehr wegzudenken ist ⁵⁸. Hier kommt es durch Bindung der Proteine an den 1:5 mit Aqua destillata verdünnten Coomassie-Farbstoff (CBBG) zur Bildung unlöslicher Komplexe. Hierdurch kommt es in Abhängigkeit der Proteinkonzentration zu einer Veränderung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm ⁵⁹. Sichtbar wird dies durch einen Farbumschlag von braunrot zu blau. Auf Grund der Abhängigkeit der Proteinkonzentration ist eine Kalibrierung notwendig. Diese wird mittels Verdünnungsreihen mit dem bovinen Serumalbumin (BSA) in der Konzentration 1mg/ml durchgeführt. Konkret wurde dafür eine 96-Well-Platte benutzt, in deren Vertiefungen jeweils 1 µl Lysat sowie der mit Aqua destillata 1:5 verdünnte Coomassie Farbstoff (40 µl CBBG + 160 µl A. dest.) gegeben wurde. Die Standardkurve bestand aus einer Verdünnungsreihe mit BSA (0 µl, 2 µl, 4µl, 6 µl, 8 µl) und dem verdünnten Coomassie-Farbstoff (1:5 je 200 µl). Mit Hilfe eines Spektralphotometers wurde nun der Farbumschlag bei 620 nm proportional zur Proteinkonzentration

gemessen. So war es möglich, mit Hilfe der Standardkurve die jeweils zugehörige Proteinmenge der einzelnen Proben zu ermitteln. Damit letztlich jedes Zellysate die gleiche Proteinkonzentration enthielt, wurde entsprechend jedes Reaktionsgefäß mit Probe- und Lysepuffer verdünnt. Zudem wurden 10 µl mit dem Probepuffer 1:100 verdünntes Dithiothreitol (DTT), Sodiumdodecylsulfat (SDS), Glycerol sowie ein Farbstoff zur Aufbrechung der Disulfidbrücken und damit Aufhebung der Proteinfaltung durch Aufbruch von Sekundär- und Tertiärstrukturen zur weiteren Solubilisierung zur Probenbeschwerung bzw. Farbmarkierung hinzugegeben, bevor das Lysat schüttelnderweise auf 95°C erhitzt wurde, um den denaturierenden Effekt noch zu intensivieren. Zuletzt wurden die Reaktionsgefäße gut verschlossen und beschriftet im -20°C Kühlschrank gelagert.

2.2.9.2 SDS-Gelelektrophorese

Hinter SDS-PAGE verbirgt sich das Akronym **sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis**. Entwickelt wurde dieses Verfahren bereits 1970 von dem schweizer Wissenschaftler Ulrich Karl Lämmli⁶⁰. Diese Methode ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse innerhalb eines elektrischen Feldes. Die dafür benötigten Gele wurden gemäß 2.1.3 gegossen. Dabei unterschieden sich der Acrylamidgehalt und der pH-Wert: 10% Acrylamid waren in den Trenngelen enthalten und 6% in den Sammelgelen. Die Gele befanden sich jeweils zwischen zwei Glasplatten. Der Geräteaufbau erfolgte entsprechend Abbildung 2. Dann wurden in der Reihenfolge der Vorbehandlung (Hypoxie, Hyperthermie, Hypoxie+Hyperthermie) je 30 µl der Probe samt 5 µl eines Größenmarkers (prestained protein ladder) in die Geltaschen pipettiert. Die Kammer wurde mit SDS-Laufpuffer (vgl. 2.1.3) gefüllt. Dann wurde ein elektrisches Feld angeschlossen, sodass die Proteine von der Kathode zur Anode laufen mussten; bei den Sammelgelen lag die Spannung bei 60 Volt, bei den Trenngelen bei 160 Volt. Innerhalb von etwas mehr als 1,5 Stunden wurden so die Proben entsprechend nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Der blaue

Farbstoff im Probenpuffer machte zudem das Ende der Elektrophorese sichtbar.

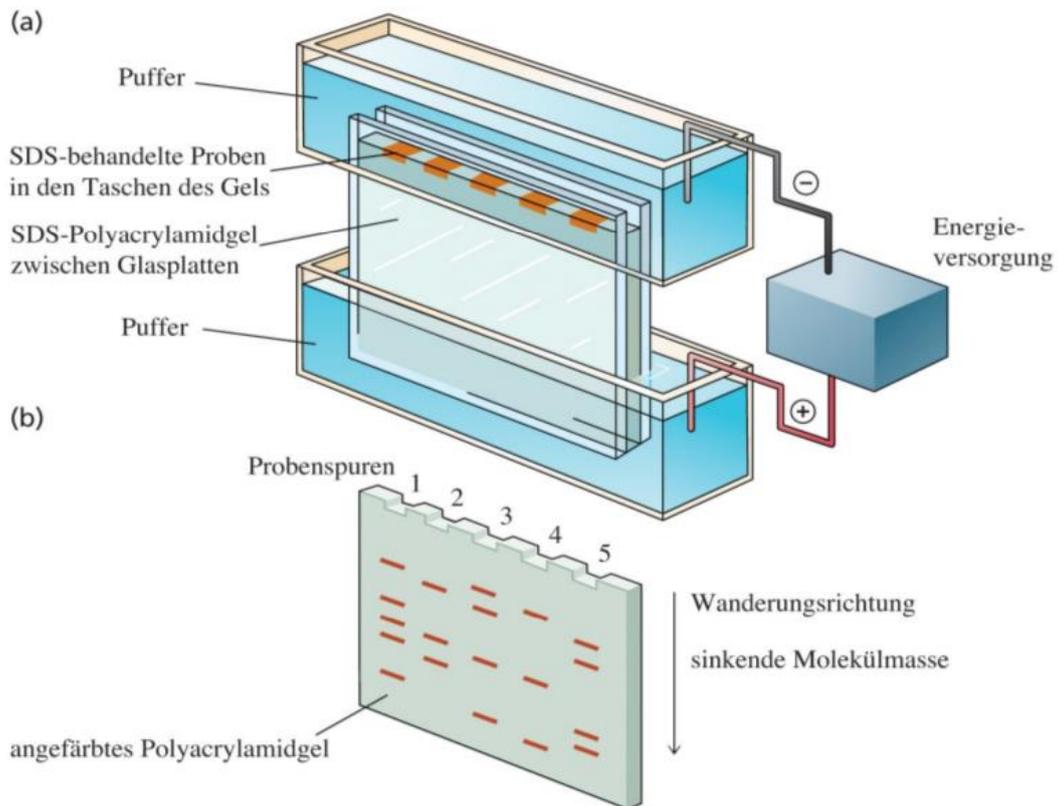


Abbildung 7: Geräteaufbau der SDS-PAGE, a: Gelelektrophorese-Kammer, b: entwickeltes gefärbtes Gel

2.2.9.3 Blotting

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Gele in eine Transferrkassette gelegt und folgendermaßen geschichtet:

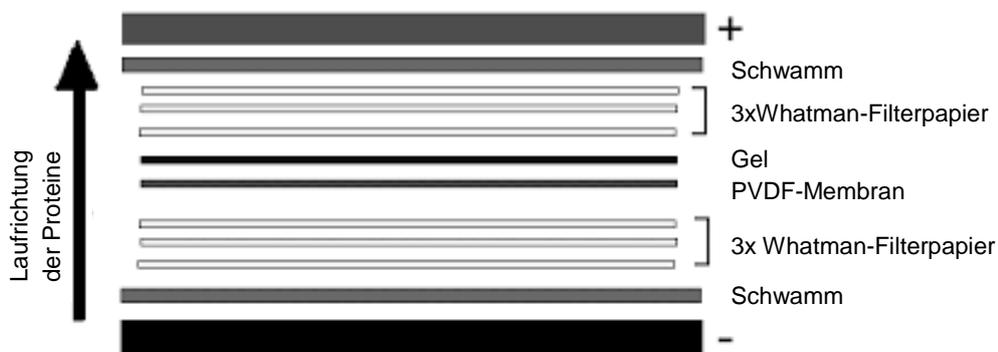


Abbildung 8: Schichtung Blot

Die Transferkassette wurde in die Haltevorrichtung einer mit 4°C gekühltem Blottingpuffer (vgl. 2.1.3) gefüllten Blotkammer gehängt und eine Spannung von 800 mA angelegt. Nach 90 Minuten war der Transfer der Proteine auf die Membran abgeschlossen. Um dies zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung angefärbt. Damit mögliche noch freie unspezifische Bindungsstellen abgesättigt (geblockt) wurden, erfolgte die Inkubation der Membran mit 5% Milchpulver in TBS-Tween für 45 Minuten bei Raumtemperatur.

2.2.9.4 Immunologische Markierung spezifischer Proteine

Anschließend wurde die Membran mehrfach mit TBS-Tween gewaschen (3 x 10 min und 2 x 15 min) und über Nacht mit dem Erstantikörper gemäß 2.1.2 in 5% Milchpulver in TBS-Tween auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das mehrfache Waschen mit TBS-Tween, um mögliche nicht gebundene Antikörper abzuwaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper gemäß 2.1.2 für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Im Anschluss erfolgte erneut das mehrfache Waschen mit TBS-Tween (3 x 10 min und 2 x 15 min). Um die Proteine nun nachweisen zu können, wurde die Membran mit einer Peroxidase-Lösung gemäß 2.1.3 Reagenz 1+2 inkubiert und zusammen mit einem Röntgenfilm in einer Röntgenkassette fixiert. Die Belichtungszeiten variierten hier je nach Antikörper von Sekunden (β -Actin) bis Stunden (HIF-1 α , HSP 90). Die fertig entwickelten Filme wurden eingescannt und die sichtbaren Banden mit der Software ImageJ durch Mittelung der Grauwerte und anschließende Umrechnung mittels Excel analysiert. Dies ermöglichte die Semi-Quantifizierung der Proteinabundanz.

2.2.10 Durchflusszytometrie (FACS)

Hierunter versteht man ein Verfahren, mit dem die Lichtstreu- und Fluoreszenzeigenschaften von Zellen vermessen werden und nach unterschiedlichen Kriterien charakterisiert werden können. Dabei passieren die Zellen einzeln einen fokussierten Laserstrahl, durch dessen Licht sie angeregt werden. Im Prinzip geht es um die Lichtstreuung, welche je nach Quantität mit

der Größe und anderen Zelleigenschaften korrelieren. Dabei unterscheidet man zwischen Vorwärtstreulicht (FSC = forward scatter) und Seitwärtstreulicht (SSC = sideways scatter). Das Vorwärtstreulicht ist ein Maß für die Partikelgröße; das Seitwärtstreulicht ein Maß für die Zellgranularität. Zudem werden die Fluoreszenzemissionen gemessen. In dieser Arbeit wurde hierfür Propidiumiodid verwendet; ein Farbstoff, welcher sich zwischen die Basen der DNA setzt. Entwickelt wurde die Durchflusszytometrie bereits 1968 von dem deutschen Naturwissenschaftler Wolfgang Göhde ⁶¹.

2.2.10.1 Durchflusszytometrische Messung der DNA-Fragmentierung: Nicoletti-Färbung zur Apoptose- und Zellzyklus-Bestimmung

Entwickelt wurde diese Methode von dem italienischen Physiker Ildo Nicoletti. Seine Arbeit wurde erstmals 1991 publiziert ⁶². Zur Bestimmung der Apoptose wird die DNA der Zellen durch Propidiumiodid angefärbt. Propidiumiodid wirkt als sogenannter Nukleinsäureninterkalator, d.h. der Farbstoff lagert sich zwischen den Basen der doppelsträngigen DNA ein. Nach Permeabilisierung der Zellmembran durch Octoxinol 9 (Triton X-100 gemäß 2.1.3) kann der DNA-Gehalt einer Zelle entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Je nach Menge der DNA können unterschiedliche Phasen des Zellzyklusses differenziert werden: So besitzen zum Beispiel Zellen in der G₀/G₁-Phase nur halb so viel DNA wie Zellen in der G₂/M-Phase. Dazwischen liegt der DNA-Gehalt von Zellen in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase). Interessant zur Detektion apoptotischer Zellen ist die sogenannte sub-G₁-Population, welche sich im Histogramm links von den Zellen in der G₁-Phase befindet.

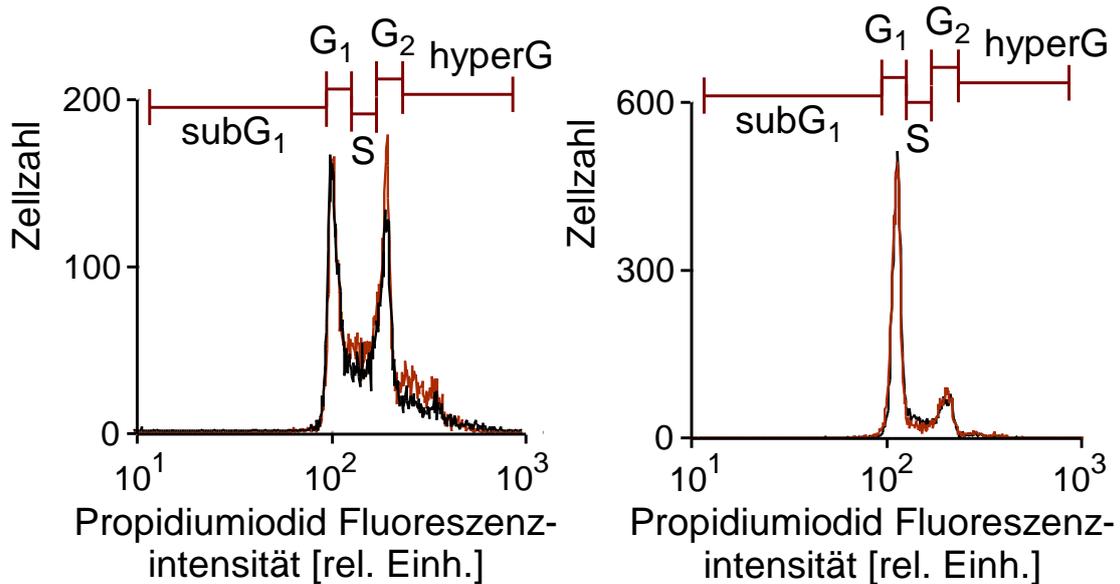


Abbildung 9: Zellzyklus-Histogramm: Links: HCT 116 Zellen; rechts: MCF 7 Zellen

Zum Versuchsablauf: Auf einer 6-Well-Platte wurden pro Well 1 ml Zellsuspension in 3 ml Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert. Diejenigen Zellen, welche gemäß 2.2.5 mit Hypoxie behandelt wurden, wurden so auf die 6-Well-Platten verteilt, dass sie gleich in Hypoxiebeutel verpackt werden konnten.

Nach 22 Stunden (MCF 7 Zellen) bzw. nach 23 Stunden (HCT 116 Zellen) Normoxie bzw. Hypoxie wurden die Zellen normotherm weiterkultiviert bzw. gemäß 2.2.5 in die Hyperthermie (42°C) gegeben. Nach insgesamt 24 Stunden Behandlung wurden die Zellen dann gemäß 2.2.6 mit 0 bzw. 2 Gy bestrahlt.

Im Anschluss wurde das alte Medium abgesaugt und jedes Well mit 1 ml PBS gewaschen, welches wiederum abgesaugt wurde, bevor die Zellen vom Boden der 6-Well-Platten mit je 0,5 ml Trypsin abgelöst wurden. Nach 10 Minuten Einwirkzeit des Trypsins wurde die Reaktion mit 3 ml kühl-schrankkaltem Medium (8°C) abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde aus den Röhrchen abgesaugt und verworfen. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde mit 500 µl Nicoletti-Puffer gemäß 2.1.3 resuspendiert und für 1 Stunde in einen dunklen Schrank gestellt (bei Raumtemperatur). Analysiert wurden die

durchflusszytometrischen Messungen mit dem FACSCalibur (BD Bioscience) im FL2-Detektor (Emissionswellenlänge 564-606 nm, Anregung bei 488 nm)⁶³. Ausgewertet wurden die Ergebnisse in einem Histogramm mit der Intensität der Propidiumiodid Fluoreszenz von 10^1 bis 10^3 auf der X-Achse und der Zellzahl auf der Y-Achse (siehe Abbildung 7).

2.2.10.2 Durchflusszytometrische Messung der Nekrose- und Apoptoseinduktion: Annexin V – und Propidiumiodid-Färbung

Wie bereits unter 1.5 erwähnt, kommt es zu Beginn der Apoptose unter anderem zur Translokation des Phosphatidylserins auf die Außenseite der Membran. Annexin-V-Fluos hat zu diesem Protein eine sehr hohe Affinität und kann sich calciumabhängig daran binden. Da auch nekrotische Zellen Annexin binden können, ist eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose sinnvoll⁶⁴. Dies geschieht mit Hilfe des in 2.2.10.1 erwähnten Propidiumiodids, welches die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen überwinden kann. Durch die zeitgleiche Anwendung von Annexin-V-Fluos und Propidiumiodid ist also „die Diskriminierung nekrotischer Zellen im Annexin-V positiv gefärbten Zellcluster“⁶⁵ möglich. Nach durchflusszytometrischer Messung zeigt sich in dem neu entstandenen Dotplot ein Cluster mit lebenden Zellen, welche Annexin-V und Propidiumiodid negativ sind, apoptotische Zellen, die Annexin-V positiv und Propidiumiodid negativ sind sowie nekrotische Zellen, die Annexin-V und Propidiumiodid positiv sind (siehe Abbildung 10).

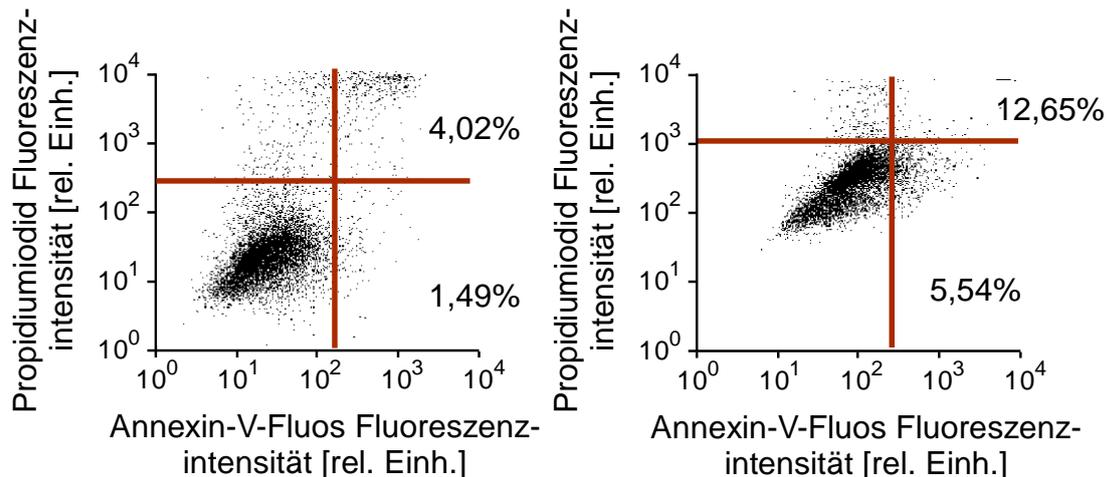


Abbildung 10: Dotplot mit der Intensität der Annexin-V-Fluos Fluoreszenz von 10^0 bis 10^4 auf der X-Achse und der Intensität der Propidiumiodid Fluoreszenz auf der Y-Achse: Links: HCT 116 Zellen; rechts: MCF 7 Zellen

Die Durchführung war identisch zur Durchführung der Nicoletti-Färbung, jedoch mit den Unterschieden, dass gemäß 2.1.3 anstelle der Nicoletti-Färbung 200 μ l des Annexin-/PI-Farbstoffes benutzt wurden, die Inkubation im Dunkeln nur 20 statt 60 Minuten dauerte und die Messung nicht im FL2-, sondern im FL1- (515-545 nm, Annexin) und FL3- (> 650 nm, Propidiumiodid) Detektor durchgeführt wurde.

2.2.11 Statistik

Die für diese Doktorarbeit verwendeten Messungen wurden alle an unterschiedlichen Probenansätzen durchgeführt, welche voneinander unabhängig waren. Angegeben wurden sie als arithmetisches Mittel samt Standardfehler und Anzahl der Probenansätze. Durchgeführt wurden ungepaarte zweiseitige bzw. bei unterschiedlichen Streuungen Welch-korrigierte t-Tests und Bonferroni-Korrektur bei multiplen Paarvergleichen. Der parametrische ANOVA-Test war wegen der häufig sich unterscheidenden Streuungen nicht möglich. Verwendet wurde das Programm INSTAT 3.06 (2003, GraphPad Software, USA). Ein p -Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen mit $n =$ Anzahl der Paarvergleiche.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuch unter Hyperthermie

Um herauszufinden, wie lange die unterschiedlichen Zelllinien jeweils mit Hyperthermie, also die Erhitzung auf 42°C, optimalerweise behandelt werden müssen, wurde der Koloniebildungstest gemäß 2.2.8 durchgeführt mit verschieden lange andauernder Hyperthermie gemäß 2.2.4 als Behandlung. Die sogenannte „Plating Efficiency“ (PE) gilt als Maß der Klonogenizität. Die PE berechnet sich aus der Anzahl der Kolonien bezogen auf die Anzahl der ausgesäten Zellen ⁶⁶. In unseren Experimenten konnte eindrücklich die zytotoxische Wirkung von Hyperthermie nachgewiesen werden. Als relevante Wirkung wurde eine Reduktion der Klonogenizität um > 20% erachtet. Dabei fielen die Ergebnisse je nach Zelllinie unterschiedlich aus: Während die HCT 116 Zellen nach 60 Minuten Hyperthermiebehandlung die niedrigste Plating Efficiency zeigte (vgl. Abb. 9 B), kam es bei den MCF 7 Zellen erst nach 90 und 120 Minuten zu der größten Differenz zur Kontrolle (vgl. Abb. 9 A). Aus diesem Grund entschieden wir uns, in den folgenden Experimenten die HCT 116 Zellen 60 Minuten lang der Hyperthermie auszusetzen und die MCF 7 Zellen 120 Minuten.

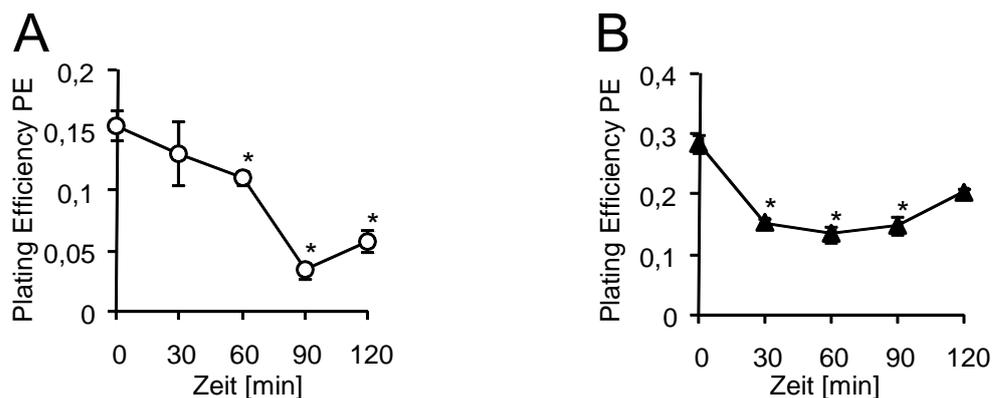


Abbildung 11: Vorversuch zur Evaluation der Hyperthermie-Zeiten nachfolgender Versuche; hier Clonogenic Assay mit Hyperthermie als einzige Behandlung. Links (A) MCF 7 Zellen, rechts (B) HCT 116 Zellen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus 3 Experimenten. Statistisch wurde der T-Test mit Bonferroni-Korrektur angewandt. *np < 0,05

3.2 Effekt von Hyperthermie und Hypoxie auf zellulärer Ebene

Um den Effekt von Hyperthermie und Hypoxie auf zellulärer Ebene zu bestätigen, wurde die Abundanz des Markerproteins der Hypoxie (HIF-1 α) und der Hyperthermie (HSP 90) in Abhängigkeit der verwendeten experimentellen Bedingungen mittels Westernblot bestimmt.

3.2.1 HIF-1 α

Durch den Western Blot ist es möglich, Proteine nachzuweisen. Hierzu wurden die Zellen zunächst nach dem oben genannten Protokoll – jedoch ohne Bestrahlung – vorbehandelt und gemäß 2.2.9 der Western Blot durchgeführt. So gelang es, die HIF-1 α -Proteinabundanz zu bestimmen und damit die Auswirkungen von Hypoxie, Hyperthermie und beidem in Kombination auf die Stressantwort der Tumorzelllinien HCT 116 und MCF 7 zu beurteilen. Als Ladungskontrolle diente jeweils β -Actin. In Abbildung 12 A sieht man gut, dass in der Zelllinie HCT 116 die HIF-1 α -Proteinabundanz unter der Kombination mit Hypoxie und Hyperthermie im Vergleich zur Kontrolle signifikant angestiegen ist ($p = 0,046$). Unter Hypoxie alleine war ein Trend zu erkennen, jedoch statistisch nicht signifikant. Bei den MCF 7 Zellen (vgl. Abb. 12 B) zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt: Unter Hypoxie kam es zu einem leichten Anstieg der HIF-1 α -Proteinabundanz; ebenso auch unter Hyperthermie und minimal unter der Kombination aus beidem. Untereinander jedoch zeigte sich in den Unterschieden keine statistische Signifikanz. Es zeigten sich außerdem keine additiven Effekte von Hypoxie und Hyperthermie.

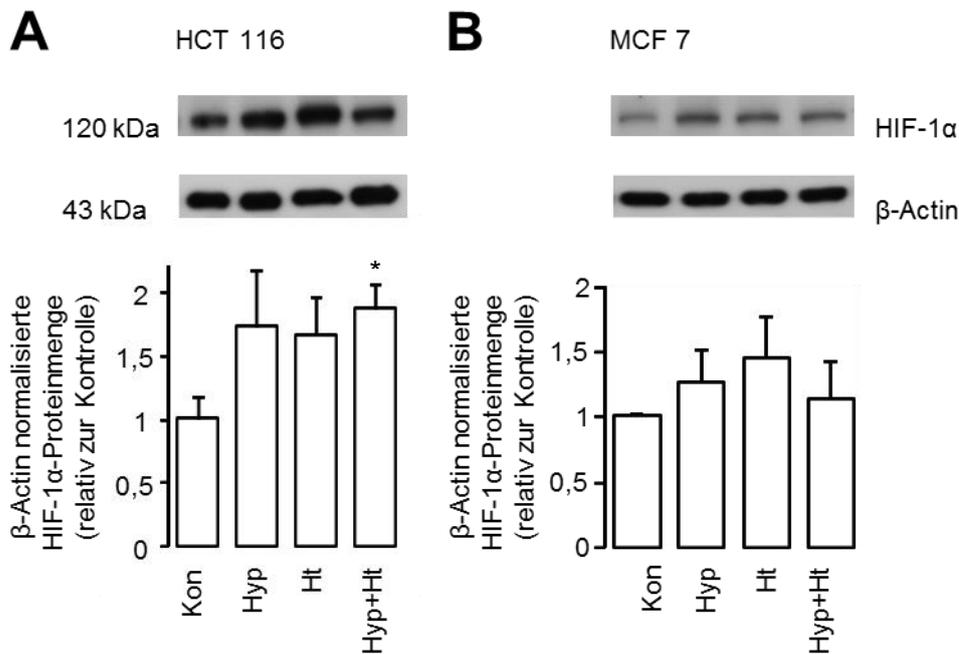


Abbildung 12: Veränderung der β -Actin-normalisierten HIF-1 α -Proteinmenge je nach Behandlung: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht) und die Kombination aus Hypoxie und Hyperthermie (Hyp+Ht) links (A) bei der HCT 116 Zelllinie (n = 6), rechts (B) bei der MCF 7 Zelllinie (n = 9). *np < 0,05

3.2.2 HSP-90

Wie in Abbildung 13 A zu sehen ist, sank bei der HCT 116 Zelllinie die HSP 90-Proteinabundanz unter der Behandlung mit Hyperthermie und in der Kombination mit Hypoxie ab. Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch nicht. Auch in der MCF 7 Zelllinie (vgl. Abb. 13 B) zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die HSP 90-Proteinabundanz. Jedoch zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen drei Behandlungsgruppen (Hypoxie, Hyperthermie, Hypoxie+Hyperthermie) leichte Anstiege der HSP 90-Proteinabundanz.

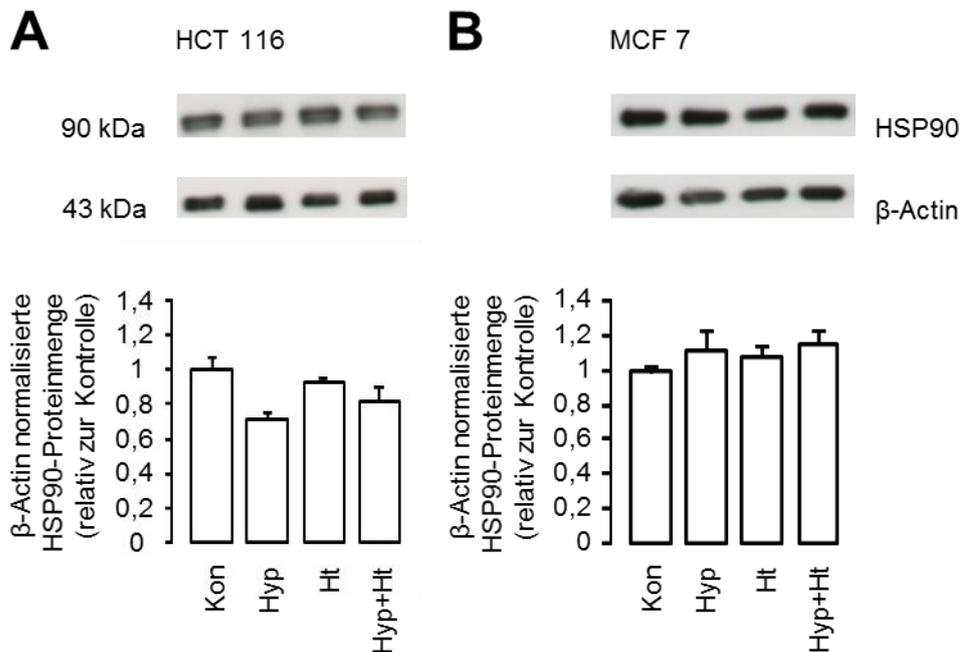


Abbildung 13: Veränderung der β -Actin-normalisierten HSP90-Proteinabundanz je nach Behandlung: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht) und die Kombination aus Hypoxie und Hyperthermie (Hyp+Ht) links (A) bei der HCT 116 Zelllinie (n = 6), rechts (B) bei der MCF 7 Zelllinie (n = 4)

3.2.3 Auswirkung auf das klonogene Überleben

Wie in der Einleitung erwähnt, stellt sich die Frage, ob Hyperthermie die hypoxieinduzierte Strahlenresistenz vermindern kann. Hierzu ist es wichtig, das klonogene Überleben der Zellen nach Abschluss der Behandlung zu kennen. Um diese und damit insbesondere die Strahlensensibilität besser beurteilen zu können, haben wir uns für die Durchführung des Koloniebildungstests entschieden. Der Koloniebildungstest bestimmt das klonogene Überleben der Zelllinien. Im Folgenden wurde das Experiment gemäß 2.2.8 unter allen acht Versuchsbedingungen durchgeführt: Mit/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie (vgl. Abb. 14 A). Wie an der Plating Efficiency in Abbildung 14 A eindrücklich abzulesen ist, konnte der Effekt der Klonogenizität durch die Kombination aus Hypoxie und Bestrahlung ($np = 0,048$) und insbesondere durch die Kombination aus Hyperthermie, Hypoxie und Bestrahlung in Relation zur unbehandelten Kontrolle statistisch signifikant inhibiert werden ($np = 0,029$).

Auch durch die Kombination aus Hyperthermie und Bestrahlung konnte die Klonogenizität inhibiert werden, jedoch nicht statistisch signifikant ($n_p = 0,058$). In Abbildung 14 B wird das klonogene Überleben der bestrahlten Zellen durch die sogenannte Survival Fraction dargestellt. Die Survival Fraction bezeichnet das Verhältnis der Plating Efficiency (PE) bestrahlter Zellen zu der der jeweiligen 0 Gy-Kontrolle (also $PE\text{-Kon}_{2\text{Gy}}/PE\text{-Kon}_{0\text{Gy}}$ oder $PE\text{-Hyp}_{2\text{Gy}}/PE\text{-Hyp}_{0\text{Gy}}$, etc.). In der HCT Zelllinie konnte kein Effekt der Hyperthermie alleine gegenüber der Radiosensibilität gezeigt werden. Die Hypoxie dagegen erhöhte die Radioresistenz ($n_p = 0,039$). Diese wurde durch zusätzliche Hyperthermie abgeschwächt. Der Hyperthermie-Effekt erreichte aber keine statistische Signifikanz ($n_p = 0,077$).

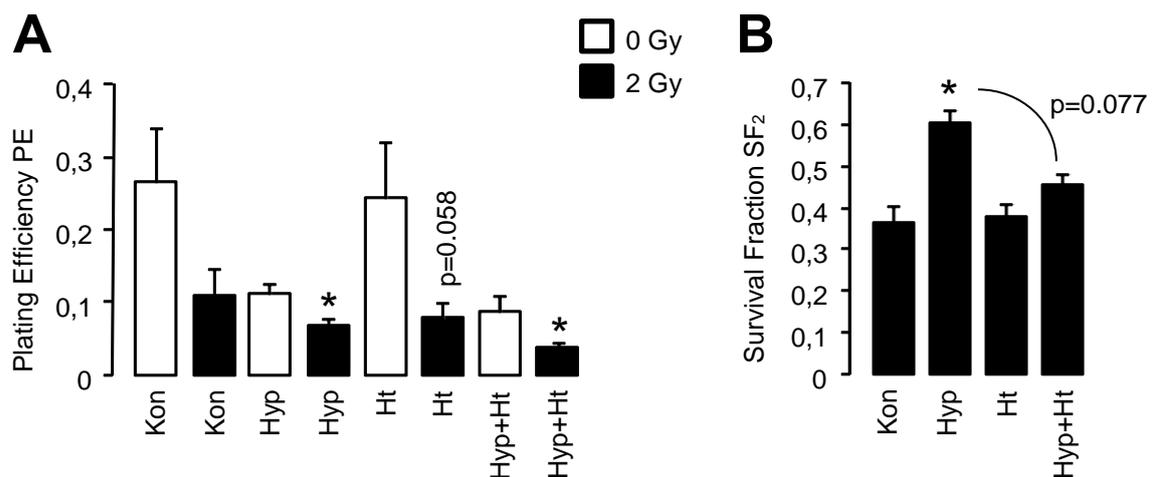


Abbildung 14: Der Koloniebildungstest bestimmt das Überleben der Zelllinien – hier HCT 116 Zellen – nach/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht), Hypoxie+Hyperthermie (Hyp+Ht). Links (A) ist die Plating Efficiency (PE), auch Klonogenizität genannt, aufgetragen und rechts (B) die Survival fraction (SF) der bestrahlten Zellen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus 6 Experimenten samt Standardfehler. * $n_p < 0,05$

Die Behandlung der MCF 7 Zellen erfolgte analog zu der der HCT 116 Zellen. Mit Blick auf die Plating Efficiency konnte in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle ein statistisch signifikanter inhibierender Effekt auf die Klonogenizität durch die Kombination aus Bestrahlung und Hypoxie ($n_p = 0,0018$), Bestrahlung und Hyperthermie ($n_p = 0,0007$) sowie Hypoxie, Hyperthermie und

Bestrahlung

($n_p = 0,0008$) gezeigt werden (vgl. Abb. 15 A). Bezüglich der Survival Fraction fallen die Ergebnisse jedoch ähnlich aus wie bei den HCT 116 Zellen. Wie in Abbildung 15 B zu sehen, führt Hypoxie tendenziell zur Radioresistenz; ein Effekt, der durch zusätzliche Hyperthermie wieder tendenziell abgeschwächt wird. Ebenfalls ergab sich der Trend, dass die Hyperthermie alleine die Radiosensibilität erhöht ($n_p = 0,076$).

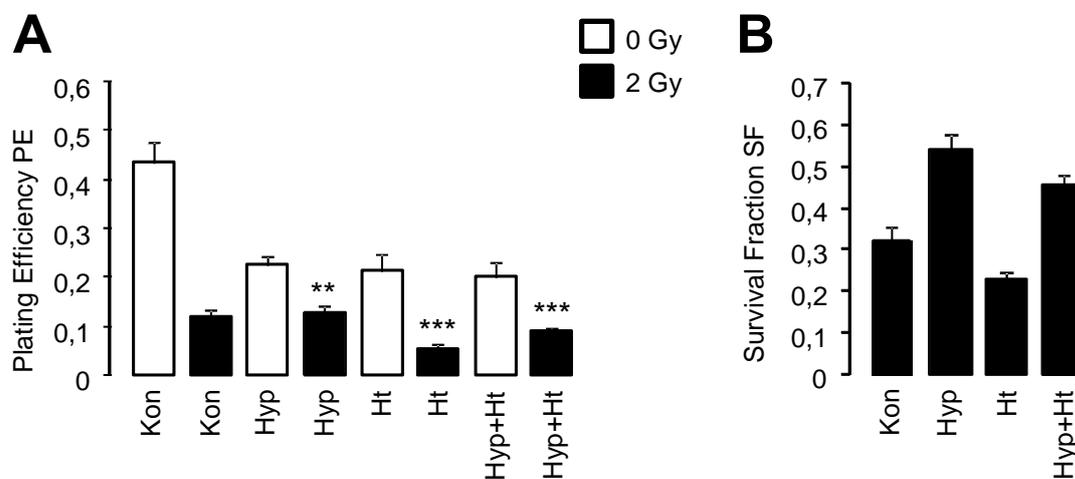


Abbildung 15: Der Koloniebildungstest bestimmt das Überleben der Zelllinien – hier MCF 7 Zellen – nach/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht), Hypoxie+Hyperthermie (Hyp+Ht). Links (A) ist die Plating Efficiency (PE), auch Klonogenizität genannt, aufgetragen und rechts (B) die Survival fraction (SF) der bestrahlten Zellen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus 6 Experimenten samt Standardfehler. ** $n_p < 0,01$, *** $n_p < 0,001$

Somit zeigte sich in beiden Linien zumindest in der Tendenz eine Hypoxie-assoziierte Radioresistenz, welche wiederum in der Tendenz durch zusätzliche Hyperthermie abgeschwächt wurde.

3.3 Auswirkung auf den Zelltod

Eine Möglichkeit der Strahlensensibilisierung liegt in einem erhöhten strahleninduzierten Zelltod. Diese Möglichkeit lässt sich einfach mittels

Durchflusszytometrie und Färbung des zellulären DNA-Gehaltes bzw. des mitochondrialen Membranpotentials ermitteln.

Die Nicoletti-Färbung dient der Apoptose/Nekrose- und Zellzyklus-Bestimmung. Beide Zelllinien wurden nach Vorbehandlung mit Hypoxie, Hyperthermie, Kombination aus Hypoxie und Hyperthermie mit und ohne Bestrahlung mit 2 Gy gemäß 2.2.10.1 per Durchflusszytometrie nach 2, 24 und 48 Stunden gemessen und der DNA-Gehalt der Zellen und somit die entsprechende Zellzyklusphase der Zellen bestimmt.

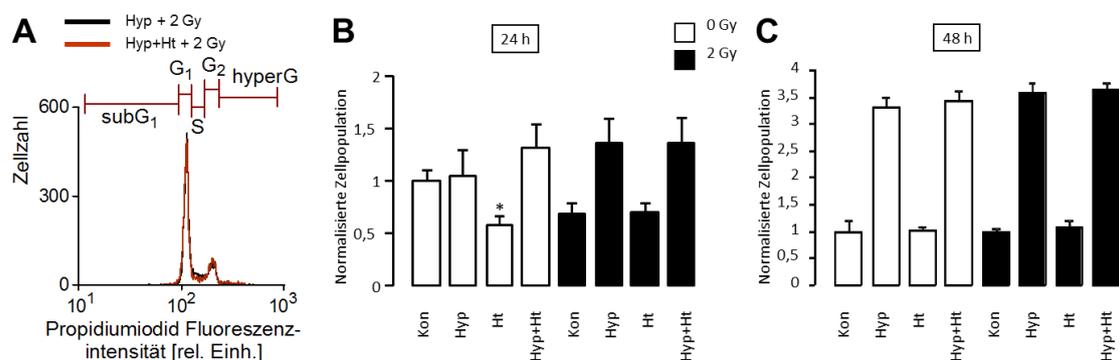


Abbildung 16: Apoptose- und Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter subG₁-Zellpopulationen der MCF 7 Zellen 24 Stunden (B) und 48 Stunden (C) nach/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht), Hypoxie+Hyperthermie (Hyp+Ht). A: Zellzyklus-Histogramm der MCF 7 Zellen nach 24 Stunden. Die Daten repräsentieren normalisierte Mittelwerte aus 6 Experimenten in Triplikaten (n = 18) samt Standardfehler. Die absolute Prozentzahl der Kontrollzellen lag nach 24 Stunden bei $3 \pm 0,6\%$ und nach 48 Stunden bei $0,33 \pm 0,07\%$.

In Abbildung 16 A ist zunächst das Histogramm des MCF 7 – Zellzyklusses zu sehen. Schwarz dargestellt ist diejenige Zellpopulation, welche mit Hypoxie behandelt und bestrahlt wurde. Braun dargestellt ist diejenige Zellpopulation, welche mit der Kombination aus Hypoxie, Hyperthermie und Bestrahlung behandelt wurde. Nach 24 Stunden (vgl. Abb 16 B) zeigte sich ein statistisch signifikanter protektiver Effekt von Hyperthermie auf unbestrahlte Zellen ($np = 0,049$) in der Abnahme der subG₁-Population. Dieser ist jedoch nach 48 Stunden (vgl. Abb. 16 C) wieder aufgehoben. Demgegenüber steht die deutliche Erhöhung des Zelltodes in allen mit Hypoxie behandelten Gruppen,

insbesondere statistisch hochsignifikant nach 48 Stunden Reoxygenierung nach Abschluss der Behandlung (np < 0,0002).

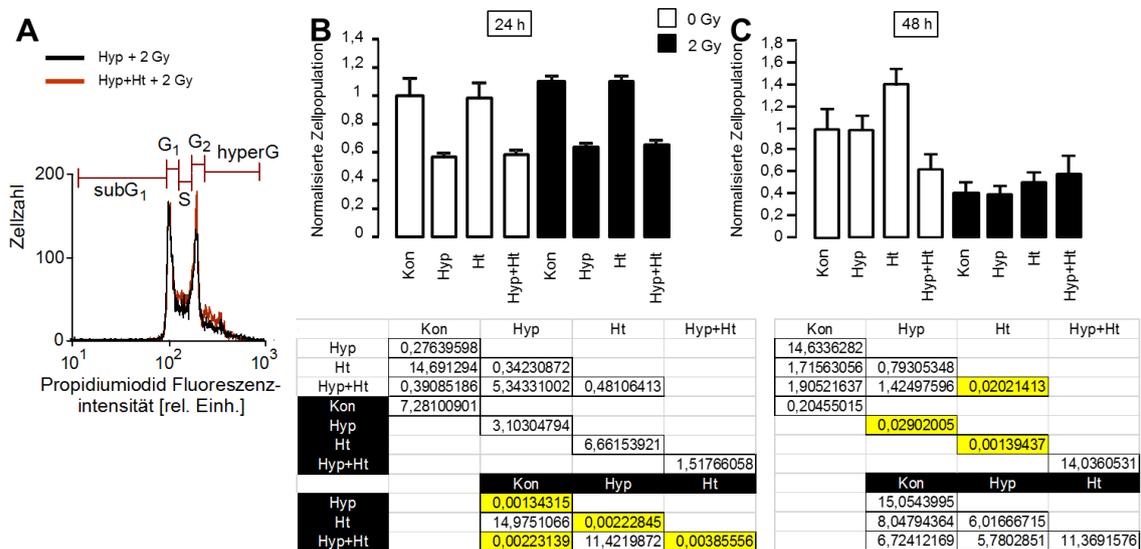
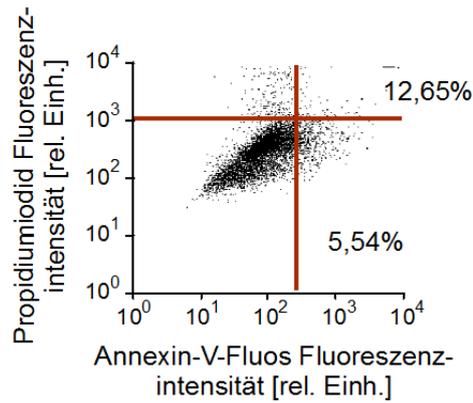


Abbildung 17: Apoptose- und Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter subG₁-Zellpopulationen der HCT 116 Zellen 24 Stunden (B) und 48 Stunden (C) nach/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht), Hypoxie+Hyperthermie (Hyp+Ht). A: Zellzyklus-Histogramm der MCF 7 Zellen nach 24 Stunden. Mitte unten und rechts unten: np-Wert-Tabelle der behandelten Zellen nach 24 und 48 Stunden. Die Daten repräsentieren normalisierte Mittelwerte aus 6 Experimenten in Triplikaten (n = 18) samt Standardfehler. Die absolute Prozentzahl der Kontrollzellen lag nach 24 Stunden bei 1,24 ± 0,2% und nach 48 Stunden bei 5,4 ± 1,4%. Die p-Werte sind jeweils unterhalb der dazugehörigen Balkendiagramme dargestellt. Gelb markiert \triangleq np ≤ 0,05.

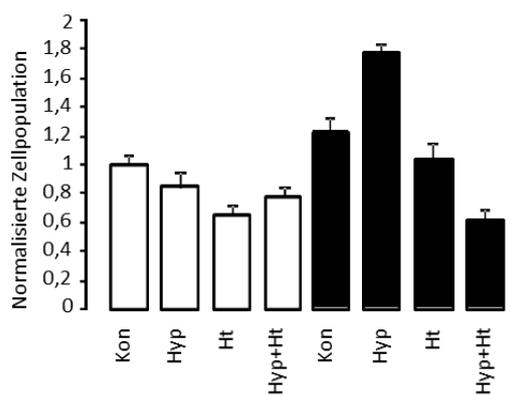
Anders als bei der MCF 7 Zelllinie lässt sich bei den HCT 116 Zellen 24 Stunden nach Behandlung ein statistisch signifikanter protektiver Effekt durch Hypoxie nachweisen (vgl. Abb. 17 B): Hier sieht man in allen mit Hypoxie behandelten Gruppen einen deutlich geringeren Zelltod. Dieser durch Hypoxie hervorgerufene Effekt wird jedoch nach 48 Stunden vollständig aufgehoben (vgl. Abb. 17 C). Auffällig ist zudem in der subG₁-Fraktion nach 48 Stunden die Kombination aus Hyperthermie und Hypoxie im Vergleich zur Zellgruppe, welche nur mit Hyperthermie behandelt wurde: Hier zeigt sich ein statistisch signifikanter geringerer Zelltod in der Kombinationsbehandlung (np = 0,02). Auch die Bestrahlung alleine hat nach Hyperthermiebehandlung (np = 0,001)

bzw. Hypoxiebehandlung ($p = 0,03$) einen statistisch signifikant verminderten Zelltod hervorgerufen.

Zur Unterscheidung zwischen apoptotischen und primär bzw. sekundär nekrotischen Zellen führten wir die Durchflusszytometrie mit der Annexin V/Propidiumiodid-Färbung durch mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der MCF 7 Zellen 2 und 48 Stunden (vgl. Abb. 18) bzw. der HCT 116 Zellen 2 und 48 Stunden (vgl. Abb. 19) nach Behandlung:

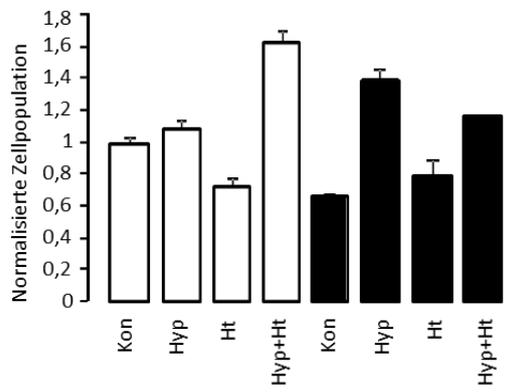


2h Annexin V positiv



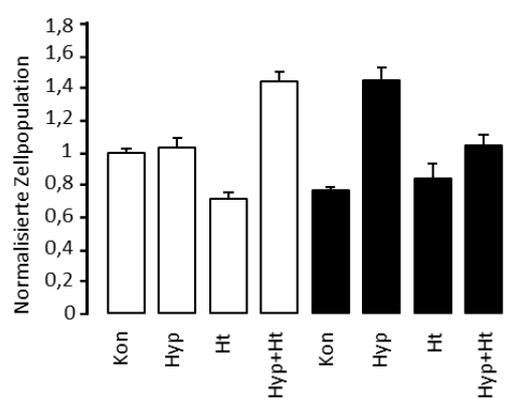
	Kon	Hyp	Ht	Hyp+Ht
Hyp	4,05948403			
Ht	0,08509711	2,45780462		
Hyp+Ht	0,08509711	9,285941	4,50857209	
Kon	3,12424936			
Hyp		0,00099785		
Ht			1,07519943	
Hyp+Ht				3,22935653
		Kon	Hyp	Ht
Hyp		0,14271313		
Ht		5,81636112	0,05180572	
Hyp+Ht		0,07597925	6,8341E-05	0,79107011

2h Annexin V/PI positiv

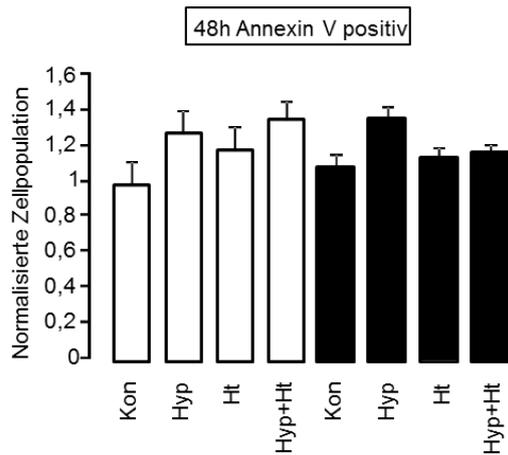


	Kon	Hyp	Ht	Hyp+Ht
Hyp	3,18573823			
Ht	0,00341202	0,00778449		
Hyp+Ht	0,00341202	0,00128678	3,0591E-05	
Kon	0,00011263			
Hyp		0,2138959		
Ht			9,79676704	
Hyp+Ht				0,00909787
		Kon	Hyp	Ht
Hyp		0,0022399		
Ht		3,58497595	0,01607576	
Hyp+Ht		0,00566838	1,07526565	0,18961475

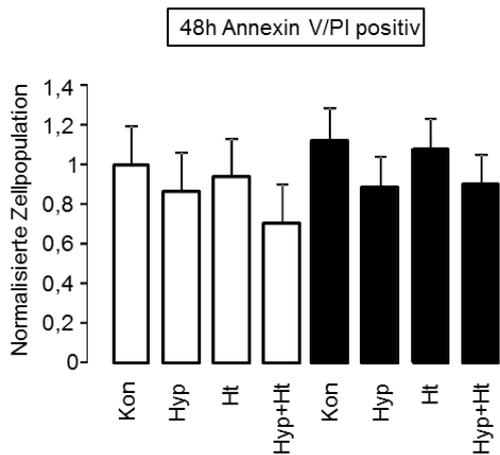
2h tote Zellen gesamt



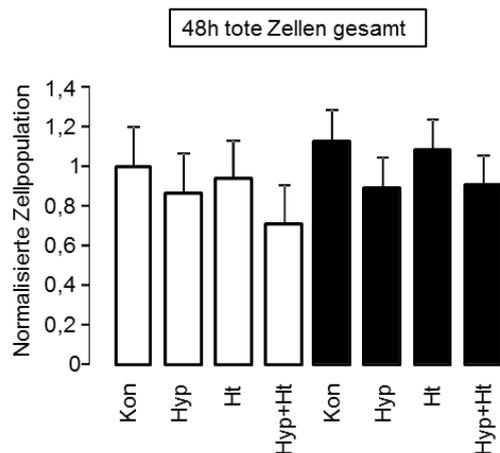
	Kon	Hyp	Ht	Hyp+Ht
Hyp	7,77453438			
Ht	0,00020564	0,00474155		
Hyp+Ht	0,00020564	0,00341216	7,729E-05	
Kon	0,00130665			
Hyp		0,0077273		
Ht			4,45427623	
Hyp+Ht				0,01611655
		Kon	Hyp	Ht
Hyp		0,00049293		
Ht		8,34407767	0,00864344	
Hyp+Ht		0,09267965	0,02033688	1,64864707



	Kon	Hyp	Ht	Hyp+Ht
Hyp	2,18345676			
Ht	5,27857148	9,87575672		
Hyp+Ht	0,78358498	11,2516722	5,83257139	
Kon	9,95614016			
Hyp		9,92973936		
Ht			12,830515	
Hyp+Ht				3,11589055
		Kon	Hyp	Ht
Hyp		0,83107546		
Ht		10,2778356	1,14650545	
Hyp+Ht		8,21737756	1,58699528	13,2134309



	Kon	Hyp	Ht	Hyp+Ht
Hyp	3,88596518			
Ht	8,92961367	7,44538198		
Hyp+Ht	0,21090317	1,82625419	0,25379328	
Kon	5,17423975			
Hyp		12,144753		
Ht			1,22381442	
Hyp+Ht				0,64799683
		Kon	Hyp	Ht
Hyp		0,31357646		
Ht		9,52570617	0,02737248	
Hyp+Ht		0,72007702	14,1640438	0,50374671



	Kon	Hyp	Ht	Hyp+Ht
Hyp	6,02202701			
Ht	8,3214345	8,46466601		
Hyp+Ht	1,69660799	1,09148639	0,1264716	
Kon	10,3495681			
Hyp		6,10656416		
Ht			1,07261467	
Hyp+Ht				0,17618874
		Kon	Hyp	Ht
Hyp		1,9305039		
Ht		15,1874223	2,01740636	
Hyp+Ht		0,66182487	8,20843004	0,65833225

Abbildung 18: Unterscheidung zwischen apoptotischen und primär bzw. sekundär nekrotischen Zellen mittels Annexin V-/Propidiumiodid-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der MCF 7 Zellen 2 Stunden und 48 Stunden nach/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht), Hypoxie+Hyperthermie (Hyp+Ht). PI = Propidiumiodid. Die Daten wurden normalisiert auf die jeweilige Kontrolle. Diese waren zum Zeitpunkt 2 Stunden nach Behandlung zu $3,4 \pm 0,2\%$ Annexin V positiv und zu 12,9

$\pm 0,4\%$ Annexin V/Propidiumiodid positiv. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Behandlung waren die Kontrollzellen zu $1,5 \pm 0,2\%$ Annexin V positiv und zu $10,7 \pm 0,6\%$ Annexin V/Propidiumiodid positiv sowie nach 48 Stunden Reoxygenierung nach Behandlung zu $2,7 \pm 0,4\%$ Annexin V positiv und zu $14,7 \pm 1,8\%$ Annexin V/Propidiumiodid positiv. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ($n = 12$) samt Standardfehler. Die np-Werte sind jeweils rechts neben den dazugehörigen Balkendiagrammen dargestellt. Gelb markiert $\triangleq np \leq 0,05$.

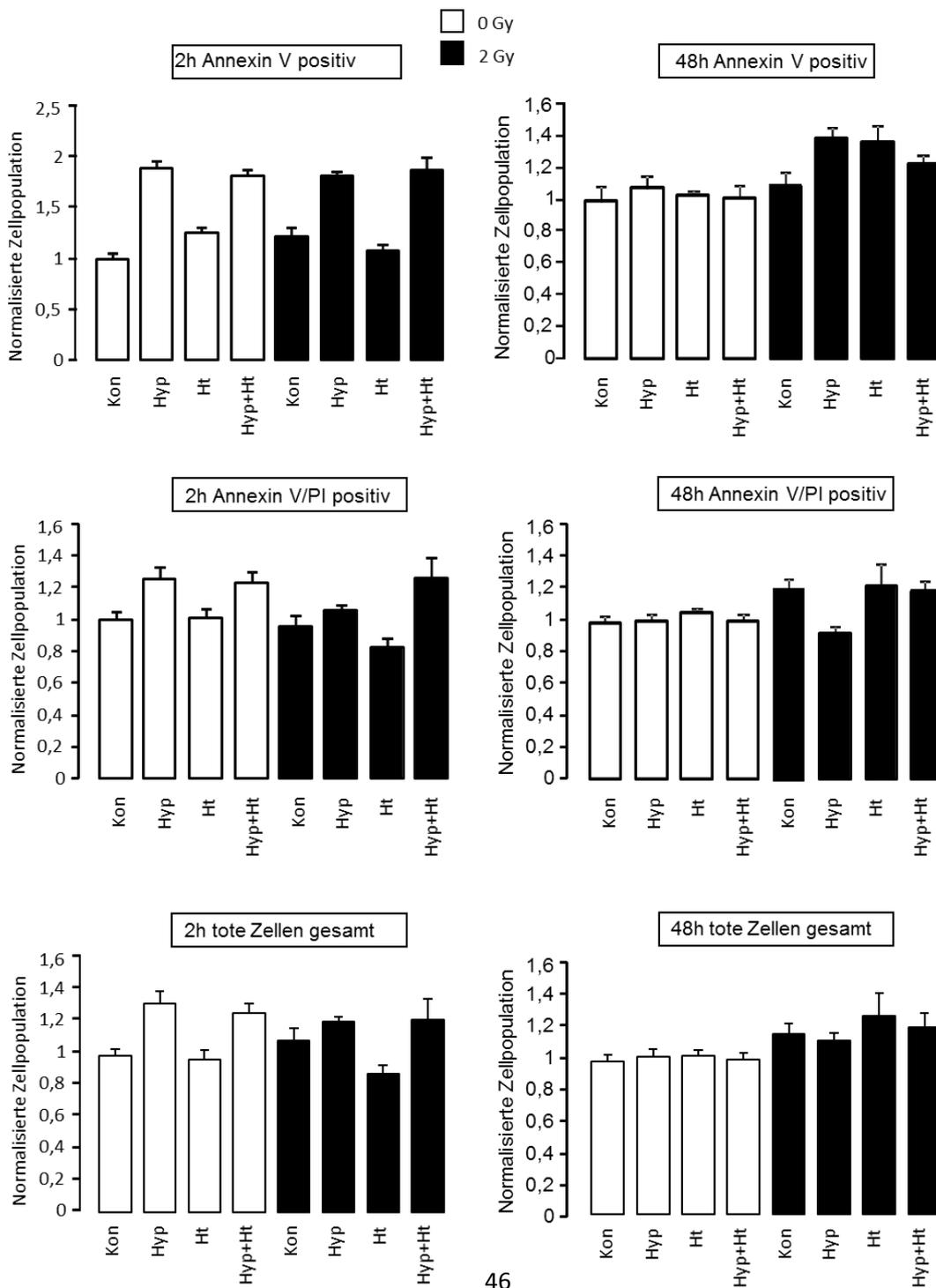
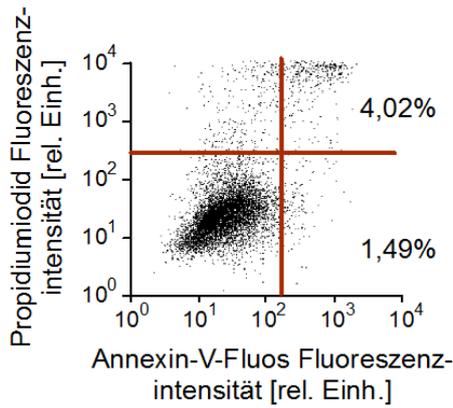


Abbildung 19: Unterscheidung zwischen apoptotischen und primär bzw. sekundär nekrotischen Zellen mittels Annexin V/Propidiumiodid-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der HCT 116 Zellen 2 Stunden und 48 Stunden nach/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht), Hypoxie+Hyperthermie (Hyp+Ht).

PI = Propidiumiodid. Die Daten wurden normalisiert auf die jeweilige Kontrolle. Diese waren zum Zeitpunkt 2 Stunden nach Behandlung zu $1,5 \pm 0,2\%$ Annexin V positiv und zu $3,9 \pm 0,6\%$ Annexin V/Propidiumiodid positiv. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Behandlung waren die Kontrollzellen zu $1,3 \pm 0,2\%$ Annexin V positiv und zu $2,9 \pm 0,3\%$ Annexin V/Propidiumiodid positiv sowie nach 48 Stunden Reoxygenierung nach Behandlung zu $2,0 \pm 0,2\%$ Annexin V positiv und zu $2,6 \pm 0,1\%$ Annexin V/Propidiumiodid positiv. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ($n = 12$) samt Standardfehler.

Die Hyperthermie- und Hypoxie-Effekte scheinen keine strahleninduzierten Effekte zu sein.

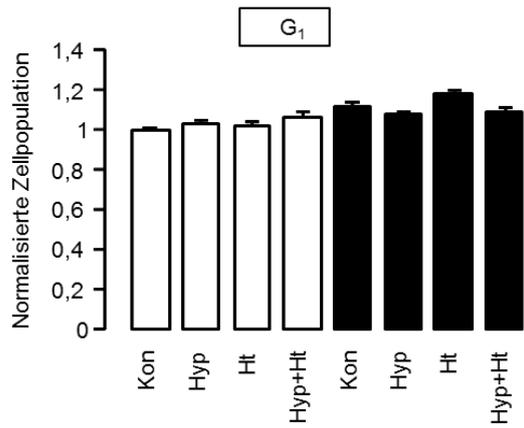
Die Daten deuten nicht darauf hin, dass sich die verminderte Klonogenizität nach Bestrahlung bzw. die erhöhte Survival Fraction nach Bestrahlung (SF_2) bei Hypoxie auf Veränderung des Zellsterbens zurückführen lässt. Daher wird im Folgenden der weitere Zellzyklus analysiert, da eine Störung des Zellzyklus-Arrestes und der Eintritt in die mitotische Katastrophe eine weitere Erklärung für die beobachteten Effekte auf das klonogene Überleben sein können.

3.4 Auswirkung auf den Zellzyklus

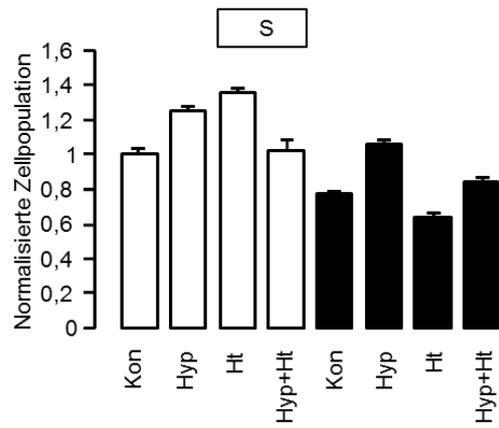
Wie bereits unter 2.2.10.1 erklärt, durchläuft jede proliferierende Zelle einen Teilungszyklus, den Zellzyklus. Um herauszufinden, welche Auswirkungen die einzelnen Behandlungsformen auf den Zellzyklus und seine einzelnen Phasen haben, beleuchten wir im Folgenden mittels Durchflusszytometrie und Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen den Zustand der MCF 7 Zelllinie 24 Stunden (vgl. Abb. 20) und 48 Stunden (vgl. Abb. 21) sowie der HCT 116 Zelllinie 24 Stunden (vgl. Abb. 22) und 48 Stunden (vgl. Abb. 23) nach Abschluss der Behandlung. Insgesamt kann gesagt werden, dass sich die Daten relativ wenig systematisieren lassen. Im Einzelnen zeigen sich teils hochsignifikante Veränderungen (vgl. gelb markierte np-Werte in den Tabellen unter den Balkendiagrammen): So zum Beispiel induzierte Bestrahlung in den

unbehandelten MCF 7 Zellen einen G₁-Arrest, der 48 Stunden anhielt (vgl. Abb. 20 und Abb. 21). In den HCT 116 Zellen hingegen induzierte Bestrahlung zunächst tendenziell einen G₂-Arrest (vgl. Abb. 22) und später einen signifikanten G₁-Arrest (vgl. Abb. 22). Hypoxie verursachte in bestrahlten MCF 7 Zellen einen signifikanten S-Arrest, der durch zusätzliche Hyperthermie wieder aufgehoben wurde (vgl. Abb. 20 und Abb. 21). Weiter signifikante Effekte der Hypoxie in bestrahlten Zellen konnten nicht beobachtet werden, so dass insbesondere die beobachtete hypoxieinduzierte Radioresistenz von HCT 116 Zellen (Koloniebildungstest) sich nicht auf hypoxievermittelte Störungen des strahlenbedingten Zellzyklusarrests zurückführen lässt.

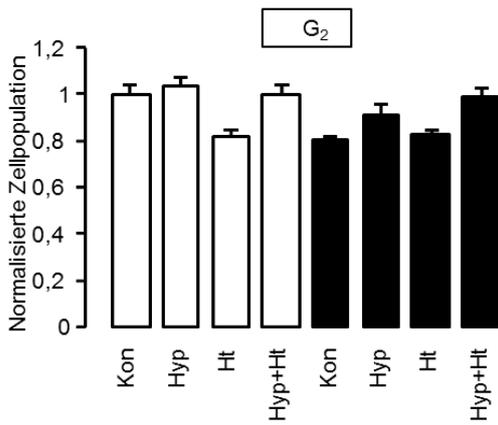
Die hyperG-Fraktion – als Folge einer fehlgeleitenden Mitose/Zytogenese mit nachfolgender Chromosomen-Aneuploidie und/oder mitotischer Katastrophe – war weder nach Bestrahlung in Normoxie noch nach Bestrahlung in Hypoxie erhöht (vgl. Abb. 20 bis 23), so dass eine durch Hypoxie hervorgerufene Induktion der mitotischen Katastrophe auch nicht als Ursache der hypoxieinduzierten Radioresistenz erachtet werden kann.



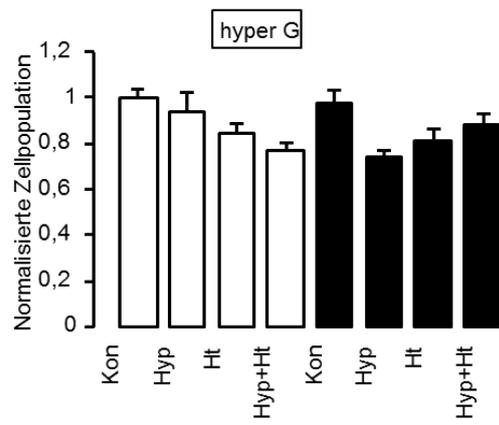
	Kon	Hyp	Ht	Hyp+Ht
Hyp	3,2832404			
Ht	8,55673597	9,25649749		
Hyp+Ht	0,74877321	5,40163764	2,58905084	
Kon	2,0037E-05			
Hyp		0,80562554		
Ht			9,497E-06	
Hyp+Ht				8,14083335
	Kon	Hyp	Ht	
Hyp		1,11554852		
Ht		0,51172169	0,00564797	
Hyp+Ht		4,2603711	13,5287017	0,16762055



	Kon	Hyp	Ht	Hyp+Ht
Hyp	0,00010459			
Ht	2,2348E-07	0,3017624		
Hyp+Ht	9,46127076	0,00703497	5,3669E-05	
Kon	0,0004556			
Hyp		0,00020345		
Ht			1,1156E-15	
Hyp+Ht				0,07059424
	Kon	Hyp	Ht	
Hyp		1,8793E-10		
Ht		0,03055366	6,1372E-10	
Hyp+Ht		1,59357629	0,00013667	0,00307736



	Kon	Hyp	Ht	Hyp+Ht
Hyp	9,41398379			
Ht	0,02964245	0,00544579		
Hyp+Ht	15,7009627	10,011664	0,05645447	
Kon	0,01060689			
Hyp		1,23164589		
Ht			11,2866738	
Hyp+Ht				15,5565408
	Kon	Hyp	Ht	
Hyp		0,49129945		
Ht		6,99633754	1,34839329	
Hyp+Ht		0,00353427	3,00493905	0,01445198



	Kon	Hyp	Ht	Hyp+Ht
Hyp	8,66697945			
Ht	0,2352211	4,88528795		
Hyp+Ht	0,00108342	1,00540048	3,37474568	
Kon	13,2989995			
Hyp		0,58037498		
Ht			10,8894862	
Hyp+Ht				1,23586567
	Kon	Hyp	Ht	
Hyp		0,02260507		
Ht		0,66307046	4,79413866	
Hyp+Ht		3,48500796	0,525977	5,73583218

Abbildung 20: Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der MCF 7 Zellen 24 Stunden nach/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht), Hypoxie+Hyperthermie (Hyp+Ht). Die Daten repräsentieren normalisierte Mittelwerte aus 6 Experimenten samt Standardfehler. Die np-Werte sind jeweils unterhalb der dazugehörigen Balkendiagramme dargestellt. Gelb markiert $\triangleq np \leq 0,05$.

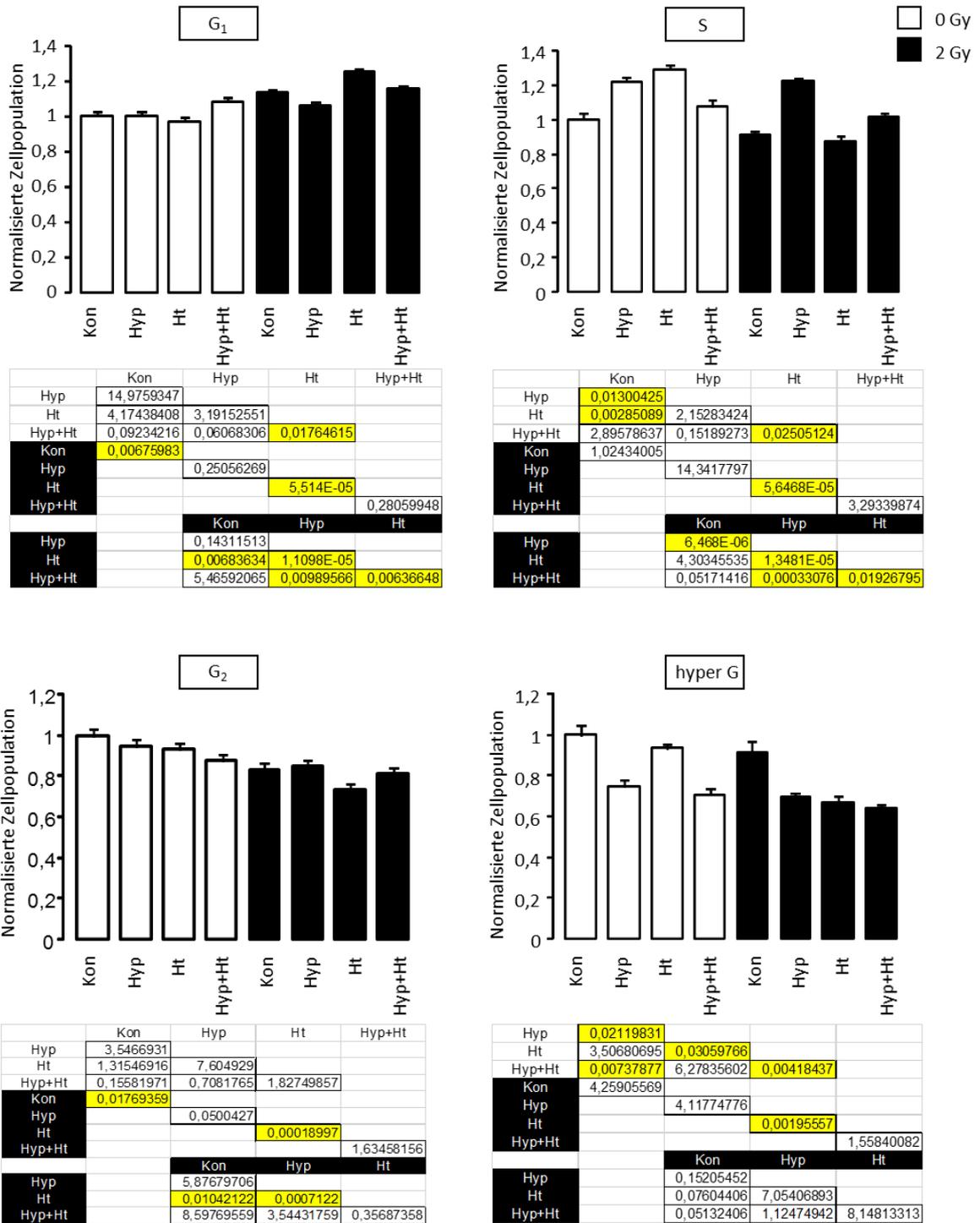


Abbildung 21: Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der MCF 7 Zellen 48 Stunden nach/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht), Hypoxie+Hyperthermie (Hyp+Ht). Die Daten repräsentieren normalisierte Mittelwerte aus 6 Experimenten samt Standardfehler. Die np-Werte sind jeweils unterhalb der dazugehörigen Balkendiagramme dargestellt. Gelb markiert $\hat{=} np \leq 0,05$.

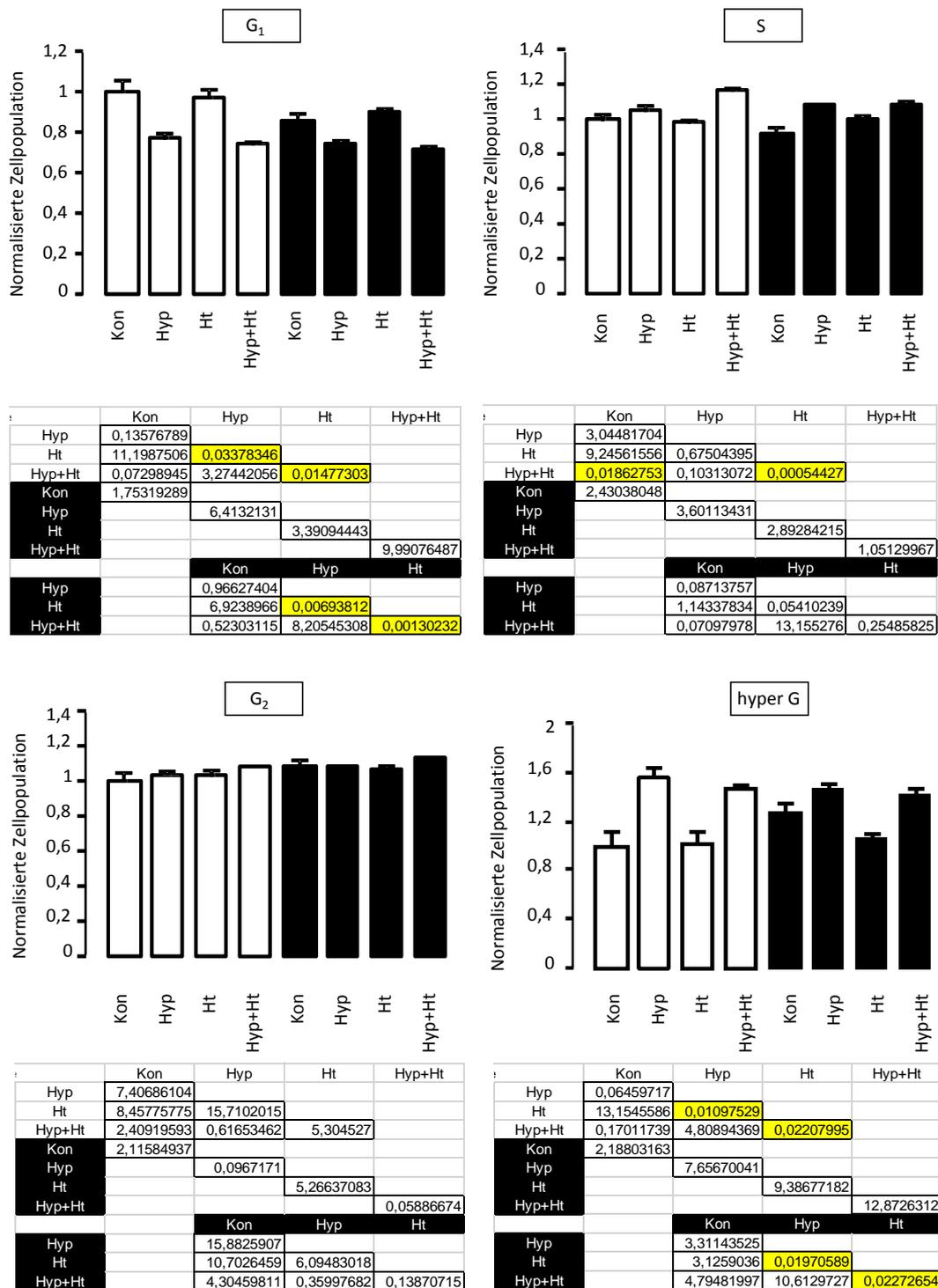


Abbildung 22: Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der HCT 116 Zellen 24 Stunden nach/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht), Hypoxie+Hyperthermie (Hyp+Ht). Die Daten repräsentieren normalisierte Mittelwerte aus 6 Experimenten samt Standardfehler. Die np-Werte sind jeweils unterhalb der dazugehörigen Balkendiagramme dargestellt. Gelb markiert $\triangleq np \leq 0,05$.

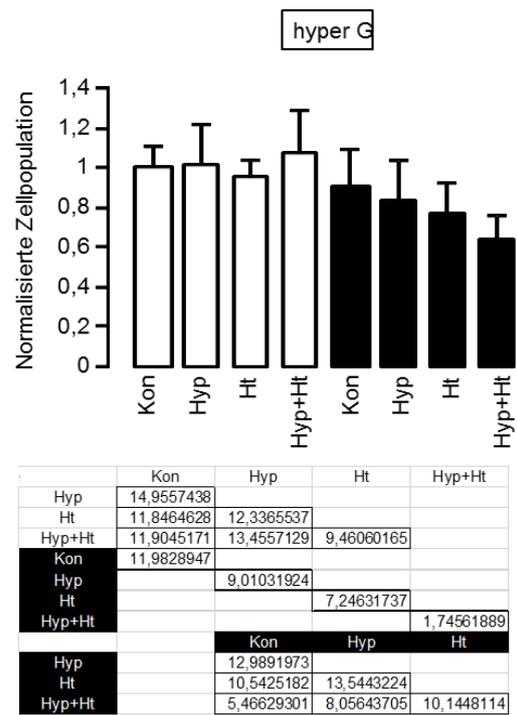
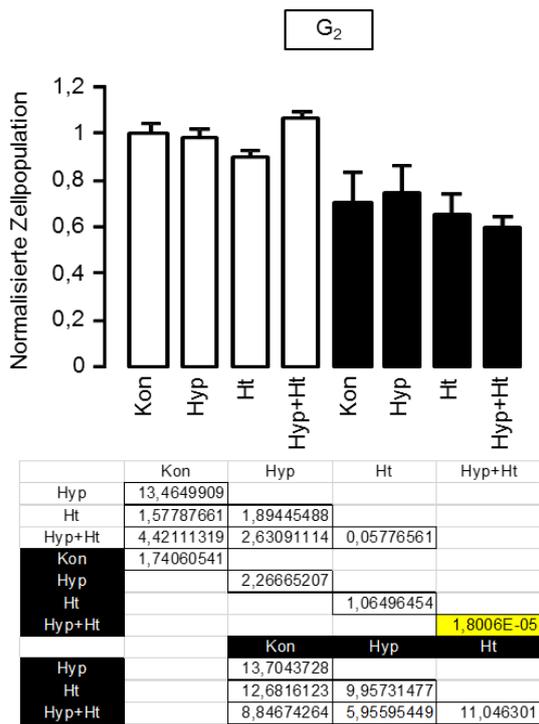
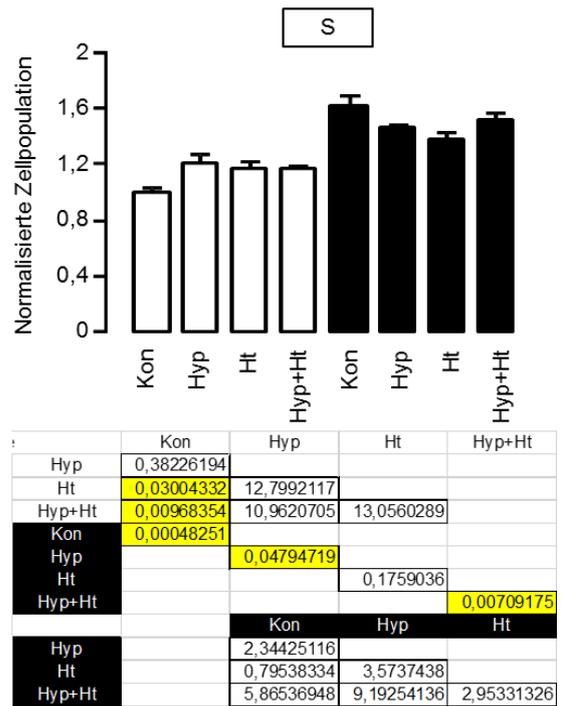
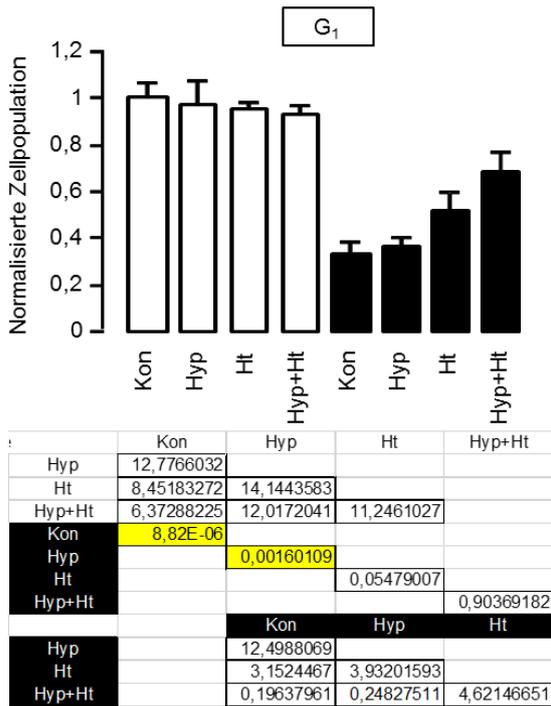


Abbildung 23: Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der HCT 116 Zellen 48 Stunden nach/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie: Kontrolle (Kon), Hypoxie (Hyp), Hyperthermie (Ht), Hypoxie+Hyperthermie (Hyp+Ht). Die Daten repräsentieren normalisierte Mittelwerte aus 6 Experimenten samt Standardfehler. Die np-Werte sind jeweils unterhalb der dazugehörigen Balkendiagramme dargestellt. Gelb markiert $\hat{=} np \leq 0,05$.

4 Diskussion

4.1 Fragestellung und Umsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob und inwiefern Hyperthermie einen Einfluss auf hypoxieinduzierte Strahlenresistenz hat. Zudem sollte die Rolle des komplexen Netzwerkes aus hypoxieinduzierten Faktoren wie dem HIF-1 α und Hitzeschockproteinen wie dem HSP 90 beleuchtet werden. Beobachtet wurde hierzu das Verhalten der Mammakarzinom-Zelllinie MCF 7 und der Kolorektalkarzinom-Zelllinie HCT 116. Es wurden hauptsächlich drei Methoden angewandt, um der Fragestellung auf den Grund zu gehen: der Koloniebildungstest (Clonogenic Assay), der Western Blot und die Durchflusszytometrie. Mit Hilfe der Koloniebildungstests sollte zunächst das klonogene Überleben der Zelllinien in Abhängigkeit der unterschiedlichen Untersuchungsbedingungen (d.h. mit/ohne Bestrahlung mit 2 Gy unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Kombination mit/ohne Hyperthermie) bestimmt werden. Dargestellt wurden die Ergebnisse mittels Plating Efficiency (Klonogenizität) und Survival Fraction (spezifischer Strahleneffekt auf die Klonogenizität). Mit den Western Blots haben wir bestimmte Proteine nachgewiesen. Im Fokus standen hierbei vor allem der hypoxieinduzierte Faktor HIF-1 α und das Hitzeschockprotein HSP 90. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgte die Analyse der beiden Zelllinien, um Aussagen über deren Charakteristika machen zu können. Dabei diente die Nicoletti-Färbung der Zellzyklus- und Apoptose-Bestimmung. Zur Messung der Nekrose- und Apoptoseinduktion dienten die Annexin V- und Propidiumiodid-Färbung.

Die unter 3.2 bis 3.4 genannten Ergebnisse sollen nun im Folgenden interpretiert und bewertet werden sowie mit bereits bestehender Literatur verknüpft werden.

4.2 Vorversuch unter Hyperthermie

Der Vorversuch zur Evaluation der Hyperthermie-Zeiten nachfolgender Versuche wurde an der unter 3.1 erläuterten Plating Efficiency gemessen. Dabei zeigte sich, dass die HCT 116 Zelllinie nach 60 Minuten Hyperthermiebehandlung die niedrigste Plating Efficiency erreichte (vgl. Abb. 9 B) und die MCF 7 Zelllinie nach 90 bzw. 120 Minuten (vgl. Abb. 11 A), weshalb in den folgenden Experimenten die HCT 116 Zellen 60 Minuten lang der Hyperthermie ausgesetzt wurden und die MCF 7 Zellen 120 Minuten lang. Bezüglich der Temperatur selbst orientierten wir uns mit den 42°C an den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen: So beschreibt Jacoba van der Zee in einem Review sämtliche Hyperthermie-Versuche seit den siebziger Jahren bis in die heutige Zeit ⁶⁷. Das Grundprinzip beruht auf einem direkt zelltötenden Effekt bei Temperaturen über 41-42°C ⁶⁸. In einem übersichtlichen Review über Phase I-III Studien begründen Falk und Issels die wissenschaftliche Grundlage für die gleichzeitige Anwendung von Hyperthermie in Kombination mit ionisierender Strahlung ⁶⁹.

4.3 Effekt von Hyperthermie und Hypoxie auf zellulärer Ebene

Das Hitzeschockprotein HSP 90 wurde in dieser Arbeit näher beleuchtet, da es in invasiv-duktalem Mammakarzinomen wie in unserer Zelllinie MCF 7 signifikant vermehrt exprimiert wird ²⁷. Auch bei der in dieser Arbeit verwendeten HCT 116 Zelllinie konnte bereits eine Verbindung zum HSP 90 hergestellt werden ²⁸. So zeigte zum Beispiel die Arbeitsgruppe um McNamara, dass die HSP 90-Inhibition einen Anstieg der Apoptose in HCT 116 Zellen hervorruft ²⁸.

Entgegen der Erwartungen kam es bei der HCT 116 Zelllinie unter Hyperthermie zu keinem Anstieg der HSP 90-Proteinabundanz. Bei den MCF 7 Zellen konnte zwar ein Anstieg der Proteinabundanz unter Hyperthermie verzeichnet werden, jedoch statistisch nicht signifikant. Ein Grund hierfür könnte möglicherweise sein, dass die Messmethode zu insensitiv war oder aber die

Hyperthermie-Zeiten zu lange, sodass der erwartete Effekt bereits wieder kompensiert war.

Bezüglich der Hypoxie entschieden wir uns für den hypoxieinduzierten Faktor HIF-1 α , da bei anderen Tumorentitäten wie zum Beispiel dem Oropharynxkarzinom bereits gezeigt werden konnte, dass der Grad der Expression von HIF-1 α prädiktive und prognostische Bedeutung hat ⁷⁰. Eine Anfang 2018 publizierte Studie sah HIF-1 α als zentralen Regulator von Therapie- und Hypoxieresistenz, Zellproliferation und Zelltod ⁷¹.

In unserer Arbeit konnte der auf die Tumorzellen wirkende Hypoxie-Stress bestätigt werden. Sowohl bei der HCT 116 als auch bei der MCF 7 Zelllinie stieg die HIF-1 α -Proteinabundanz unter Hypoxie zumindest tendenziell an. Entgegen der Erwartungen erhöhte *in vitro* jedoch auch die Hyperthermie die HIF-1 α -Proteinabundanz. Zudem zeigten sich keine additiven Effekte von Hypoxie und Hyperthermie. Diese Ergebnisse zeigen uns die Komplexität der Regulationsmechanismen durch HIF-1 α nach einer Behandlung mit Hyperthermie unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Dies unterstreicht auch eine Arbeit aus dem Jahr 2016, in der Wan et al. die Auswirkungen der Hyperthermie auf HIF-1 α Expression, Proliferation und Angiogenese der Lungenkarzinomzelllinien NSCLC-NCI-H1650 und SCLC-NCI-H446 untersuchten. Sie machten vor allem HIF-1 α für das Wiederaufflammen von erneutem Tumorwachstum verantwortlich, da sich nach einer Hyperthermiebehandlung, welche an sich schon sehr vielversprechende Resultate ergab, der Resttumor an die Wärmebehandlung angepasst hatte und das erneute Wachstum durch HIF-1 α Expression gefördert wurde ⁷².

Vor allem entscheidend für die Klinik ist das klonogene Überleben der Tumorzellen. Wie an der Plating Efficiency in den Abbildungen 14 A und 15 A eindrücklich abzulesen ist, konnte der Effekt der Klonogenizität durch die Kombinationstherapien aus Hypoxie + Bestrahlung, Hyperthermie + Bestrahlung sowie Hyperthermie + Hypoxie + Bestrahlung statistisch zum Teil hochsignifikant inhibiert werden. Bezüglich der Survival Fraction (vgl. Abb. 14 B und 14 B) konnte in der HCT Zelllinie kein Effekt der Hyperthermie alleine

gegenüber der Radiosensibilität gezeigt werden; in der MCF 7 Zelllinie zeigte sich demgegenüber ein deutlicher Trend. Die Hypoxie dagegen erhöhte die Radioresistenz in beiden Zelllinien signifikant, womit die vorbekannte hypoxieinduzierte Strahlenresistenz bestätigt wurde. Beide Gruppen, welche mit Hypoxie behandelt wurden (Hypoxie + Bestrahlung, Hypoxie + Hyperthermie + Bestrahlung), wiesen eine deutlich höhere Survival Fraction auf. Im direkten Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen zeigte sich zudem ein Trend. Auch wenn die Experimente bezüglich der Hyperthermie im zweiseitigen t-Test kein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ erreicht haben, so deuten sie dennoch darauf hin, dass durch Hyperthermie der radioresistenzvermittelnde Effekt der Hypoxie abgeschwächt werden kann. Übereinstimmend hiermit zeigten Pandita et al. gleich in mehreren Publikationen die Fähigkeit von Hyperthermie auf, ein potenter Radiosensibilisator zu sein ^{23,74,75}.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich auch auf zellulärer Ebene ein Effekt der Hyperthermie auf die intrinsische Strahlenresistenz unter Hypoxie beobachten ließ. Auf dieses Ergebnis kam auch die Arbeitsgruppe um Rezaie Mitte 2018: Sie zeigten an der Glioblastom-Zelllinie U87MG, welche jedoch normoxisch war, eine reduzierte Klonogenizität nach Hyperthermie (1 Stunde bei 43°C) - und Strahlenbehandlung (2 Gy) – ähnlich wie in unserem Protokoll. Allerdings verwendeten sie IUdR-beladene Nanopartikel als Radiosensitizer (IUdR = 5-iodo 2'-deoxyuridine) ⁷³.

4.4 Auswirkung auf den Zelltod

Die in den Ergebnissen dieser Arbeit gesehene Strahlensensibilisierung könnte möglicherweise ursächlich auch an einem erhöhten strahleninduzierten Zelltod liegen. Dies wurde per Durchflusszytometrie überprüft.

In beiden Zelllinien (vgl. Abb. 16 B und 17 B je 1. und 5. Balken) gingen beide Kontrollgruppen unter Bestrahlung nicht vermehrt in den Zelltod - bestimmt als subG₁-Population im Nicoletti-Histogramm (Abb. 16 A und 17 A). Auch führte

die Hypoxie in beiden Zelllinien während der Strahlung (vgl. Abb. 16 B und C sowie 17 B und C je 6. und 8. Balken) nicht zu einem erniedrigten Zelltod. Es kam zu einer deutlichen Verringerung der Klonogenizität, aber keinem vermehrten Zelltod. Dies deutet darauf hin, dass die erniedrigte Klonogenizität (siehe Abb. 14 A und 15 A) wahrscheinlich nicht auf erhöhten radiogenen Zelltod zurückzuführen ist.

Im Gegensatz hierzu berichteten Vertrees et al. an der Lungenkarzinom-Zelllinie BZR-T33 einen Defekt im thermoprotektiven Mechanismus, welcher *in vitro* einen erhöhten Zelltod verursachte ⁷⁶. Auch in Bezug auf die Hypoxie ist bereits einiges bekannt (vgl. 1.4 und 1.4.1). Gerweck et al. zeigten an Chinesischen Hamsterzellen, dass tumorähnliche Mikroumgebungsbedingungen wie zum Beispiel die Hypoxie die Empfindlichkeit der Zellen auf 42°C Hyperthermie wesentlich erhöhen und damit das Zellsterben um den Faktor 5 erhöht werden konnte ⁷⁷.

4.5 Auswirkung auf den Zellzyklus

Eine weitere Erklärung für die beobachteten Effekte auf das klonogene Überleben könnten Störungen des Zellzyklus-Arrestes und der konsekutive Eintritt in die mitotische Katastrophe sein. Daher wurde auch der weitere Zellzyklus analysiert. Hier mussten wir jedoch entgegen unserer Erwartungen feststellen, dass die Ergebnisse nicht systematisierbar waren. Es zeigten sich komplexe teils hochsignifikante Veränderungen (vgl. Abb. 20 bis 23), welche jedoch nicht interpretierbar waren. Bezüglich der mitotischen Katastrophe ⁷⁸ ist insbesondere die hyperG-Fraktion interessant, da diese Zellen einen überdurchschnittlich hohen DNA-Gehalt enthalten. Allerdings zeigte sich kein Hinweis auf eine strahlungsinduzierte mitotische Katastrophe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hyperthermie-Effekte auf das klonogene Überleben bestrahlter hypoxischer MCF 7 und HCT 116 Zellen *in vitro* sehr gering waren. Franken et al. ²⁵ berichten, dass Hyperthermie an verschiedenen Zelllinien (darunter SiHa-Zervixkarzinomzellen und RKO-

Kolonkarzinomzellen) eine unterschiedlich starke Radiosensibilisierung bewirkte. So war diese zum Beispiel in radioresistenten Zelllinien effektiver als in radiosensitiven Zelllinien. Zudem war das Zellzyklusstadium entscheidend.

Im Patienten hat Hyperthermie natürlich systemische Effekte wie Inflammation oder Durchblutungsveränderung zur Folge, welche die Oxygenierung des Tumors erhöhen und somit über Veränderung der Tumor-Mikroumgebung zur Radiosensibilisierung beitragen.

4.6 Ausblick und noch offene Fragen

Die Frage, ob Hyperthermie zukünftig die Antwort auf Strahlentherapie bei Patienten mit hypoxischem Mamma- oder lokal fortgeschrittenem Kolorektalkarzinom verbessern kann, kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Sie können jedoch Grundlage für Fragen wie diese als Hypothese für weitere Studien sein. Ebenso verhält es sich mit der initial gestellten Frage nach dem optimalen Zeitplan für Hyperthermie und Strahlentherapie sowie die gezielte Regulation von hypoxieinduzierten Faktoren wie dem HIF-1 α und Hitzeschockproteinen wie dem HSP 90, um das klinische Outcome der Patienten zu verbessern. Klar ist aber, dass zukünftig dem Thema Tumor-Mikroumgebung eine besondere Rolle zukommen wird. Sie wird in Zukunft zusätzlich zu den bis heute bekannten und etablierten Behandlungsmethoden gegen Tumorerkrankungen berücksichtigt und ergänzt werden müssen.

Ich möchte diese Arbeit mit den Worten beenden, mit denen ich sie auch begonnen habe: „Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: Die Begeisterung und die Ehrfurcht.“ (Max Planck). In der Hoffnung, dass uns diese Begeisterung und Ehrfurcht vor dem Unbekannten nie verlassen werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde an humanen Brustkrebs- und Darmkrebslinien mittels Westernblot, Durchflusszytometrie und Koloniebildungstests untersucht, inwieweit Hyperthermiebehandlung die Radioresistenz von hypoxischen Tumoren mindert. Wir konnten zeigen, dass Hyperthermie zunächst einen starken Einfluss auf die Klonogenizität unserer beiden beobachteten Tumorzelllinien MCF 7 und HCT 116 hat. So konnten wir im Vorversuch nach 60 Minuten (HCT 116) bzw. nach 120 Minuten (MCF 7) Hyperthermiebehandlung eine signifikante Reduktion der Plating Efficiency erzielen.

Zudem konnten wir den auf beide Tumorzelllinien wirkenden Hypoxie-Stress bestätigen, indem wir einen deutlichen Anstieg der HIF-1 α -Proteinabundanz verzeichneten. Darüber hinaus erhöhte die Hypoxie in beiden Zelllinien die Radioresistenz signifikant, womit wir die vorbekannte hypoxieinduzierte Strahlenresistenz bestätigt sahen. Wir konnten demonstrieren, dass durch Hyperthermie dieser radioresistenzvermittelnde Effekt der Hypoxie zumindest tendenziell abgeschwächt werden kann.

Diese Effekte konnten jedoch weder auf vermehrten Zelltod auf Induktion der mitotischen Katastrophe in den bestrahlten Zellen zurückgeführt werden. Zudem waren diese Effekte zu gering, um hieraus auf relevante Hyperthermie-Effekte in der Klinik zu schließen. Letztere beinhalten zudem systemische Effekte wie z. B. bessere Durchblutung und Oxygenierung des Tumors, die mit unseren *in vitro*-Experimenten nicht abgebildet werden können.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
Bcl-2	B-cell-lymphoma-Protein
BET	brusterhaltende Therapie
BSA	bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
CBBG	Coomassie Brilliant Blau G-250
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DTT	Dithiothreitol
DIEP-Flap	Deep Inferior Epigastric Perforator Lappen
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
FCI-Flap	fasciocutaner infraglutealer Lappen
FCS	10%iges fötales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
5-FU	5-Fluorouracil
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HCT116	Human Colon Cancer Cells 116
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HIF-1 α	hypoxieinduzierter Faktor 1 α
H ₂ O	Wasser
HSP 90	Hitzeschockprotein 90
kB	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Micromol
MCF 7	Michigan Cancer foundation - 7 (Zelllinie)
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol/l	Millimol pro Liter
MRM	modifizierte radikale Mastektomie
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaF	Natriumfluorid
NaPP	Natriumpolypropylen
Na_3VO_4	Natrium-Orthovanadat
Nm	Nanometer
nM	Nanomol
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
NSM	Nippel-Sparing Mastectomy
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PE	Plating Efficiency
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellmedium)
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Survival Fraction
SLNB	Sentinel Lymph Node Biopsy

s.o.	siehe oben
SSC	Sidewards Scatter
SSM	Skin-Sparing Mastectomy
s.u.	siehe unten
TAR	tiefe anteriore Rektumresektion
TBS	TRIS Buffered Saline
TME	totale mesorektale Exzision
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche

7 Abbildungsquellenverzeichnis

- Abbildung 1** **10**
Schematische Darstellung der Tumor-Mikroumgebung aus Sicht des Tumors, mit freundlicher Genehmigung von Lanlan Hui und Ye Chen, Institute of Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China
- Abbildung 2** **11**
Schematische Darstellung vom Einflusses der TMU auf die Tumorigenität und Progression bis hin zur Medikamentenresistenz, mit freundlicher Genehmigung von Lanlan Hui und Ye Chen, Institute of Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China
- Abbildung 3** **13**
Links (A): MCF 7 Zellen in Zellkultur 24 Stunden nach der Aussaat; rechts (B) MCF 7 Zellen in Zellkultur 48 Stunden nach der Aussaat; mit freundlicher Genehmigung der ECACC - European Collection of Authenticated Cell Cultures: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86012803&collection=ecacc_gc, zuletzt geprüft am 10.10.2018

Abbildung 4	14
Links (A) HCT 116 Zellen in Zellkultur 24 Stunden nach der Aussaat; rechts (B) HCT 116 Zellen in Zellkultur 48 Stunden nach der Aussaat; mit freundlicher Genehmigung der ECACC - European Collection of Authenticated Cell Cultures: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=91091005&collection=ecacc_gc , zuletzt geprüft am 21.06.2018	
Abbildung 5	23
Versuchsablauf vor Clonogenic Assay; mit Excel 2013 erstellt	
Abbildung 6	24
fixierte und angefärbte HCT 116 – und MCF 7 Kolonie; gescannt mit dem Hewlett Packard Scan Jet	
Abbildung 7	27
SDS-Page: Instrumental Analysis, Stephanie Negele, „Eine Zusammenfassung der Vorlesung von Dr. U. Ritgen aus dem 3. Semester der Naturwissenschaftlichen Forensik an der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg“, Sommer 2014	
Abbildung 8	28
Schichtung Blot; erstellt in Word 2013	
Abbildung 9	30
Zellzyklus-Histogramme von HCT 116 (links) – und MCF 7 Zellen (rechts); erstellt in Canvas 8	
Abbildung 10	32
Dotblot mit der Intensität der Annexin-V-Fluos-Floureszenz auf der X-Achse und der Intensität der Propidiumiodid Floureszenz auf der Y-Achse: Links: HCT 116 Zellen; rechts: MCF 7 Zellen; erstellt in Canvas 8	
Abbildung 11	33
Hyperthermie-Vergleich im Clonogenic Assay; erstellt in Excel 2013	

Abbildung 12	35
Veränderung der HIF-1 α -Proteinmenge; erstellt in Excel 2013	
Abbildung 13	36
Veränderung der HSP 90-Proteinabundanz; erstellt in Excel 2013	
Abbildung 14	37
Koloniebildungstest der HCT 116 Zelllinie; erstellt in Excel 2013	
Abbildung 15	38
Koloniebildungstest der MCF 7 Zelllinie; erstellt in Excel 2013	
Abbildung 16	39
Auswirkung auf den Zelltod; Apoptose- und Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter subG ₁ -Zellpopulationen der MCF 7 Zellen 24 h und 48 h nach Behandlung; erstellt in Excel 2013 und PowerPoint 2016	
Abbildung 17	40
Auswirkung auf den Zelltod; Apoptose- und Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter subG ₁ -Zellpopulationen der HCT 116 Zellen 24 h und 48 h nach Behandlung; erstellt in Excel 2013 und PowerPoint 2016	
Abbildung 18	42+43
Unterscheidung zwischen apoptotischen und primär und sekundär nekrotischen Zellen mittels Annexin V-/Propidiumiodid-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der MCF 7 Zellen nach 0 und 48 Stunden samt p-Wert-Tabellen; erstellt in GNU Octave 4.4.0 und PowerPoint 2016	
Abbildung 19	45
Unterscheidung zwischen apoptotischen und primär und sekundär nekrotischen Zellen mittels Annexin V-/Propidiumiodid-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der HCT 116 Zellen nach 0 und 48 Stunden; erstellt in GNU Octave 4.4.0 und PowerPoint 2016	

- Abbildung 20** **48**
 Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der MCF 7 Zellen 24 Stunden nach Behandlung; erstellt in GNU Octave 4.4.0 und PowerPoint 2016
- Abbildung 21** **49**
 Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der MCF 7 Zellen 48 Stunden nach Behandlung; erstellt in GNU Octave 4.4.0 und PowerPoint 2016
- Abbildung 22** **50**
 Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der HCT 116 Zellen 24 Stunden nach Behandlung; erstellt in GNU Octave 4.4.0 und PowerPoint 2016
- Abbildung 23** **51**
 Zellzyklus-Bestimmung mittels Nicoletti-Färbung mit Darstellung normalisierter Zellpopulationen der HCT 116 Zellen 48 Stunden nach Behandlung; erstellt in GNU Octave 4.4.0 und PowerPoint 2016

8 Literaturverzeichnis

1. David AR, Zimmerman MR. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nat Rev Cancer*. 2010;10(10):728-733.
2. Kolta KS, Schwarzmann-Schafhauser D. Die Heilkunde im alten Ägypten: Magie und Ratio in der Krankheitsvorstellung und therapeutischen Praxis. Vol 42: Franz Steiner Verlag; 2000.
3. Murata H, Okamoto M, Takahashi T, et al. SUVmax-based Parameters of FDG-PET/CT Reliably Predict Pathologic Complete Response After Preoperative Hyperthermo-chemoradiotherapy in Rectal Cancer. *Anticancer Res*. 2018;38(10):5909-5916.
4. Byun YH, Gwak HS, Kwon JW, et al. Local recurrence of brain metastasis reduced by intra-operative hyperthermia treatment. *Int J Hyperthermia*. 2018:1-8.
5. Amaya C, Kurisetty V, Stiles J, et al. A genomics approach to identify susceptibilities of breast cancer cells to "fever-range" hyperthermia. *BMC Cancer*. 2014;14:81.
6. Ardenne M. Spontanremission von Tumoren nach Hyperthermie—ein Rückkopplungsvorgang? *Naturwissenschaften*. 1965;52(23):645-645.

7. Ardenne M, Reitnauer P. Die manipulierte selektive Hemmung der Mikrozirkulation im Krebsgewebe. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1982;103(3):269-279.
8. Statistisches Bundesamt Deutschland. Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebs. 2015; https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Sterbefaelle_KrebsWeiblich.html Accessed 05.10.2018.
9. Stewart BW, Wild C. World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. 2014:630.
10. Zentrum für Krebsregisterdaten, Kaatsch P, Spix C, et al. Krebs in Deutschland für 2013/2014. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 11. Auflage ed. Berlin: Robert Koch-Institut; 2017:153.
11. Onkologie, Leitlinienprogramm, Wöckel A. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Zuckschwerdt; 2018.
12. Wittekind C. Union for international cancer control, TNM: Klassifikation maligner Tumoren. Vol 8. Auflage. Weinheim: John Wiley & Sons; 2017.
13. Kuehn T, Bembenek A, Decker T, et al. A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer*. 2005;103(3):451-461.
14. Zafar SY, Currow D, Abernethy AP. Defining best supportive care. *J Clin Oncol*. 2008;26(31):5139-5140.
15. Aebi S, Davidson T, Gruber G, Cardoso F, Group EGW. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2011;22 Suppl 6:vi12-24.
16. Cuzick J, Ambroisine L, Davidson N, et al. Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials. *Lancet*. 2007;369(9574):1711-1723.
17. Davies C, Godwin J, Gray R, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9793):771-784.
18. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, et al. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J Clin Oncol*. 2010;28(3):509-518.
19. Wörmann B, Aebi S, Balic M, et al. Mammakarzinom der Frau. 2013; 56. Available at: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@view/pdf/20180918-051944.pdf>. Accessed 05.10.2018.
20. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year

- survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-1717.
21. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Darby S, McGale P, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9804):1707-1716.
 22. Schmiegel W, Buchberger B, Follmann M, et al. S3-Leitlinie–Kolarektales Karzinom. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2017;55(12):1344-1498.
 23. Pandita TK, Pandita S, Bhaumik SR. Molecular parameters of hyperthermia for radiosensitization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009;19(3):235-251.
 24. Hahn GM. *Hyperthermia and cancer*. Springer Science & Business Media; 2012.
 25. Franken NA, Oei AL, Kok HP, et al. Cell survival and radiosensitisation: modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model (Review). *Int J Oncol*. 2013;42(5):1501-1515.
 26. Chatterjee S, Burns TF. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
 27. Oskay Halacli S, Halacli B, Altundag K. The significance of heat shock proteins in breast cancer therapy. *Med Oncol*. 2013;30(2):575.
 28. McNamara AV, Barclay M, Watson AJ, Jenkins JR. Hsp90 inhibitors sensitise human colon cancer cells to topoisomerase I poisons by depletion of key anti-apoptotic and cell cycle checkpoint proteins. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(3):355-367.
 29. Eales KL, Hollinshead KE, Tennant DA. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*. 2016;5:e190.
 30. Duan Y, Zhao X, Ren W, et al. Antitumor activity of dichloroacetate on C6 glioma cell: in vitro and in vivo evaluation. *Onco Targets Ther*. 2013;6:189-198.
 31. Huber SM, Butz L, Stegen B, et al. Ionizing radiation, ion transports, and radioresistance of cancer cells. *Front Physiol*. 2013;4:212.
 32. Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int J Cancer*. 2016;138(5):1058-1066.
 33. Unwith S, Zhao H, Hennah L, Ma D. The potential role of HIF on tumour progression and dissemination. *Int J Cancer*. 2015;136(11):2491-2503.
 34. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-1337.
 35. Liu J, Li C, Ahlborn TE, Spence MJ, Meng L, Boxer LM. The expression of p53 tumor suppressor gene in breast cancer cells is down-regulated by cytokine oncostatin M. *Cell Growth Differ*. 1999;10(10):677-683.
 36. McCall K. Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(6):882-888.
 37. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett*. 2015;368(1):7-13.
 38. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 23):5591-5596.

39. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012;196(4):395-406.
40. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(6):417-427.
41. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473(7347):298-307.
42. Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 1997;57(15):3071-3078.
43. Cass G. A history of the Michigan Cancer Foundation, the beginnings & growth of Detroit's anticancer movement. Detroit: Michigan Cancer Foundation. 1990.
44. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1409-1416.
45. National Cancer Institute. History of the National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-nci/overview/history>. Accessed 05.10.2018.
46. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;83(3):249-289.
47. Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information. Medline. <https://www.dimdi.de/static/de/db/dbinfo/me66.htm>. Accessed 29.11.2015.
48. Ross DT, Perou CM. A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. *Dis Markers.* 2001;17(2):99-109.
49. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene.* 2006;25(15):2273-2284.
50. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(2):293-325.
51. Abaan OD, Polley EC, Davis SR, et al. The exomes of the NCI-60 panel: a genomic resource for cancer biology and systems pharmacology. *Cancer Res.* 2013;73(14):4372-4382.
52. Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* 1981;41(5):1751-1756.
53. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH - Leibniz-Institut. HCT 116. https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-581.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192. Accessed 05.10.2018.
54. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 1956;103(5):653-666.
55. Rafahi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp.* 2011(49).

56. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
57. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
58. Garfield E. The most cited papers of all time, sci 1945-1988. 1a. The sci top 100 - Will the lowry method ever be obliterated? *Current Contents.* 1990;7:3-14.
59. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* 1985;151(2):369-374.
60. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
61. Spyropoulos B. 50 years LASERS: in vitro diagnostics, clinical applications and perspectives. *Clin Lab.* 2011;57(3-4):131-142.
62. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991;139(2):271-279.
63. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* 2013;23(12):620-633.
64. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp.* 2011(50).
65. Sigma Aldrich. Annexin-V-Fluos Staining Kit. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/roannv?lang=de®ion=CH>. Accessed 05.10.2018.
66. Mather JP, Roberts PE. Introduction to cell and tissue culture: theory and technique. Springer Science & Business Media; 1998.
67. van der Zee J. Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol.* 2002;13(8):1173-1184.
68. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 2002;3(8):487-497.
69. Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia.* 2001;17(1):1-18.
70. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 2001;61(7):2911-2916.
71. Li Q, Ma R, Zhang M. CoCl₂ increases the expression of hypoxic markers HIF-1alpha, VEGF and CXCR4 in breast cancer MCF-7 cells. *Oncol Lett.* 2018;15(1):1119-1124.
72. Wan J, Wu W. Hyperthermia induced HIF-1a expression of lung cancer through AKT and ERK signaling pathways. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):119.
73. Rezaie P, Khoei S, Khoee S, Shirvalilou S, Mahdavi SR. Evaluation of combined effect of hyperthermia and ionizing radiation on cytotoxic damages induced by IUdR-loaded PCL-PEG-coated magnetic

- nanoparticles in spheroid culture of U87MG glioblastoma cell line. *Int J Radiat Biol.* 2018;1-11.
74. Pandita TK. Role of HSPs and telomerase in radiotherapy. *Int J Hyperthermia.* 2005;21(8):689-694.
 75. Pandita TK, Roti Roti JL. Role of telomerase in radiocurability (review). *Oncol Rep.* 2003;10(2):263-270.
 76. Vertrees RA, Zwischenberger JB, Boor PJ, Pencil SD. Oncogenic ras results in increased cell kill due to defective thermoprotection in lung cancer cells. *Ann Thorac Surg.* 2000;69(6):1675-1680.
 77. Gerweck LE, Nygaard TG, Burlett M. Response of cells to hyperthermia under acute and chronic hypoxic conditions. *Cancer Res.* 1979;39(3):966-972.
 78. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.
 79. Frey B, Derer A, Scheithauer H, Wunderlich R, Fietkau R, Gaipl US. Cancer Cell Death-Inducing Radiotherapy: Impact on Local Tumour Control, Tumour Cell Proliferation and Induction of Systemic Anti-tumour Immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2016;930:151-172.

9 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Experimentellen Radioonkologie der Universitätsklinik für Radioonkologie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. rer. nat. Stephan Huber durchgeführt.

Die Idee und Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Adrian Staab, Facharzt für Strahlentherapie.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Ilka Müller und Dr. med. Adrian Staab von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Ausführung erfolgte nach Anleitung durch Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber durch mich. Die Abbildungen 7 und 8 hat Herr Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber mit den durch mich ermittelten Daten für mich in Canvas 8 erstellt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 19. Oktober 2018

Patricia Grünheid

10 Danksagung

Danken möchte ich an allererster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber für seine unendliche Geduld und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten sowie die nicht immer einfache Betreuung meiner Arbeit.

Dr. med. Adrian Staab danke ich für die Idee und die Konzeption der Arbeit sowie die Einarbeitung in die Versuche.

Dem Ärztlichen Direktor der Universitätsklinik für Radioonkologie, Herrn Prof. Dr. med. Daniel Zips möchte ich für die freundliche Bereitstellung seiner Arbeitsräume in der Abteilung der Experimentellen Radioonkologie danken.

Ein besonderer Dank gilt Heidi Faltin, die mir mit ihrer erfrischenden Art geholfen hat, mühsame Versuchsdurchführungen und etliche Tiefschläge mit dem nötigen Humor zu meistern.

Ich danke der Kongregation der Kreuzschwestern, die mir während der gesamten Zeit im Gebet zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich meinem Freund danken, der mich bei der Vollendung dieser Arbeit durch seine unerschütterlich geduldige und ruhige Art unterstützte und mich davor bewahrte, aufzugeben.