Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen und Normalzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Universitätsklinik für Radioonkologie
Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung
Eberhard Karls Universität Tübingen

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft
Fachgebiet Biochemie der Ernährung
Universität Hohenheim

vorgelegt von
Rena Ampferl, geb. Nagel
aus Karlsruhe

2018

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Uwe Beifuß
1. berichtende Person:	apl. Prof. Dr. rer. nat. Klaus Dittmann
2. berichtende Person:	Prof. Dr. rer. nat. Lutz Graeve

Eingereicht am:	12. März 2018
Mündliche Prüfung am:	9. Juli 2018

Die vorliegende Arbeit wurde am 14. Mai 2018 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Zusammenfassung

Die Strahlentherapie stellt neben der operativen Entfernung des Tumors, der Chemotherapie und der Immuntherapie eine der zentralen Säulen bei der Behandlung von Krebs dar. Die maximale Dosis, mit der ein Tumor bestrahlt werden kann, wird jedoch durch Nebenwirkungen des mitbestrahlten Normalgewebes begrenzt. Um den Behandlungserfolg zu verbessern, ist es somit von wesentlichem Interesse, neue Therapiestrategien zu entwickeln, die gezielt die zellschädigende Wirkung der Strahlung auf den Tumor verstärken, während das gesunde Gewebe geschont wird. Dabei gilt es, Unterschiede zwischen Tumorzellen und normalen Zellen zu nutzen. So ist es ein charakteristisches Merkmal von Tumorzellen, Glukose unabhängig von der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration überwiegend zu Laktat zu verstoffwechseln (Warburg-Effekt, aerobe Glykolyse), während normale Zellen bei Anwesenheit von Sauerstoff die meiste Glukose in den Mitochondrien oxidieren. Da der Warburg-Effekt im Vergleich zur mitochondrialen Glukoseoxidation jedoch mit einer geringen ATP-Ausbeute pro Molekül Glukose einhergeht, sind Tumorzellen auf eine hohe Glukosezufuhr angewiesen. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob ein Glukoseentzug im Rahmen der Strahlentherapie, die eine energieaufwendige Reparatur von DNA-Schäden erfordert, eine geeignete Strategie darstellt, um selektiv die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen, nicht jedoch von normalen Zellen, zu erhöhen. Diese Hypothese wurde anhand von *in vitro*-Untersuchungen mittels der humanen Tumorzelllinien A549 und FaDu sowie der normalen Fibroblasten HSF7 überprüft, indem die Strahlenantwort der Zellen infolge einer Glukosereduktion des Zellkulturmediums vergleichend betrachtet wurde.

Zunächst zeigte sich, dass die Durchführung eines Glukoseentzugs die Proliferation der Tumorzelllinien A549 und FaDu, nicht jedoch der normalen Fibroblasten HSF7, hemmte. Zudem führte der Entzug von Glukose selektiv bei den Tumorzellen zum Zelltod, wobei dieser hauptsächlich durch Nekrose erfolgte. Wurde der Glukoseentzug mit einer Strahlenbehandlung kombiniert, so konnte eine selektive Radiosensitivierung der beiden Tumorzelllinien erzielt werden, welche mit einer beeinträchtigten Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSBs) einherging. Dabei stellte sich heraus, dass die Glukose in Tumorzellen für die späte Phase der DNA-DSB-Reparatur, beginnend ab 13 h nach der Bestrahlung, essentiell ist. Des Weiteren konnte in den Tumorzellen eine Hemmung der strahleninduzierten Histonacetylierung sowie KAP1-Phosphorylierung infolge des Glukoseentzugs beobachtet werden, welche auf eine Beeinträchtigung der strahleninduzierten Chromatinrelaxation schließen ließ. Da die Öffnung der Chromatinstruktur besonders für die

Reparatur von DNA-DSBs innerhalb des Heterochromatins von Bedeutung ist und gerade diese DSBs zu späten Zeitpunkten nach der Bestrahlung repariert werden, ist zu vermuten, dass in Tumorzellen durch den Glukoseentzug vor allem die Reparatur heterochromatischer DNA-DSBs beeinträchtigt wird. Weitere Untersuchungen ergaben, dass ein Glukoseentzug in Tumorzellen keinen Mangel an nukleärem Acetyl-CoA, dem Substrat für die Acetylierung von Histonen, verursacht, weshalb dies als Grund für die beobachtete Hemmung der Histonacetylierung ausgeschlossen werden konnte. Es ist jedoch bekannt, dass die Histondeacetylase Sirt1 infolge eines Glukoseentzugs aktiviert wird. Die Sirt1-vermittelte Histondeacetylierung könnte der strahleninduzierten Histonacetylierung entgegenwirken und somit die Chromatinrelaxation und damit auch die Reparatur von DNA-DSBs nach der Bestrahlung beeinträchtigen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von Sirt1 mittels Sirtinol die unter glukosefreien Bedingungen in Tumorzellen auftretende Beeinträchtigung der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs teilweise aufheben kann. Der hemmende Effekt eines Glukoseentzugs auf die DNA-DSB-Reparatur konnte in Tumorzellen jedoch nicht nur unter glukosefreien Bedingungen beobachtet werden. So genügte eine Reduktion der Glukosekonzentration auf 0,5 g/l, um die DSB-Reparatur nach der Bestrahlung in gleichem Maße zu beeinträchtigen wie durch einen kompletten Entzug der Glukose. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Reparatur von DNA-DSBs in Tumorzellen unter glukosefreien Bedingungen bereits nach einer Bestrahlung mit 2 Gy durch die Autophagie begünstigt wird. Schließlich wurde gezeigt, dass neben der DNA-DSB-Reparatur auch der Stoffwechsel der Tumorzellen durch den Glukoseentzug beeinflusst wird. So beeinträchtigte der Entzug von Glukose die strahleninduzierte Umstellung des Glukosestoffwechsels, die mit einer Verstärkung der aeroben Glykolyse und einer Abnahme der mitochondrialen Glukoseoxidation einherging, was ebenfalls zur Radiosensitivierung der Zellen beitragen kann. Im Gegensatz zu den Tumorzellen führte der Glukoseentzug bei den normalen Fibroblasten weder zu einer Radiosensitivierung noch zu einer Beeinträchtigung der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs. Zudem hatte der Glukoseentzug hier keinen Einfluss auf die Histonacetylierung sowie KAP1-Phosphorylierung nach der Bestrahlung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Glukoseentzug *in vitro* eine geeignete Strategie darstellt, um selektiv Tumorzellen gegenüber einer Strahlenbehandlung zu sensitivieren, ohne die Strahlenempfindlichkeit normaler Zellen zu beeinflussen. Ein Glukoseentzug könnte somit ein vielversprechender Ansatz sein, um den Erfolg einer strahlentherapeutischen Krebsbehandlung zu verbessern. Daher ist es von wesentlicher Bedeutung, die Wirksamkeit dieser Behandlung auch anhand von *in vivo*-Untersuchungen sowie klinischen Studien zu überprüfen.

Summary

Radiotherapy is one of the major pillars of cancer treatment, alongside surgical resection of the tumor, chemotherapy and immunotherapy. However, the maximal dose that can be applied to a tumor is limited by side-effects of the irradiated normal tissue. Therefore, to improve treatment success, it is of significant interest to develop new treatment strategies that selectively enhance the cytotoxic effect of radiation in tumor cells while sparing healthy tissue. For this purpose, it is necessary to exploit differences between tumor cells and normal cells. Thus, tumor cells are characterized by metabolizing glucose preferentially to lactate regardless of the availability of oxygen (Warburg effect, aerobic glycolysis), while normal cells oxidize most of the glucose in the mitochondria if oxygen is present. Because the Warburg effect only produces low amounts of ATP per molecule of glucose when compared to mitochondrial glucose oxidation, tumor cells rely on high glucose supply. Hence, it was the aim of the present study to investigate whether a glucose starvation during radiotherapy, which requires energy-dependent repair of DNA damage, is an appropriate strategy to selectively enhance radiosensitivity of tumor cells, but not of normal cells. To test this hypothesis, *in vitro* investigations with the human tumor cell lines A549 and FaDu as well as the normal fibroblasts HSF7 were performed and radiation-induced cell responses after reducing the glucose concentration in cell culture medium were compared.

First, it was shown that glucose starvation inhibited proliferation of the tumor cell lines A549 and FaDu, but not that of the normal fibroblasts HSF7. Moreover, deprivation of glucose induced cell death selectively in tumor cells, which occurred mainly via necrosis. Combining glucose starvation with radiotherapy led to selective radiosensitization of both tumor cell lines, which was accompanied by impaired repair of radiation-induced DNA double-strand breaks (DNA DSBs). In this context, it turned out that in tumor cells glucose is essential for the late stage of DNA DSB repair starting from 13 h after irradiation. Furthermore, an inhibition of radiation-induced histone acetylation as well as KAP1 phosphorylation could be observed in tumor cells following glucose starvation, indicating an impairment of radiation-induced chromatin relaxation. Because opening of the chromatin structure is particularly important for the repair of DNA DSBs within heterochromatin and because these DSBs are the ones that are repaired at late time points after irradiation, it can be assumed that in tumor cells glucose starvation mainly impairs the repair of heterochromatic DNA DSBs. Further investigations revealed that in tumor cells glucose starvation does not cause lack of nuclear acetyl-CoA, which is the substrate for the acetylation of histones, and therefore this could be excluded as cause of

the observed inhibition of histone acetylation. However, it is known that the histone deacetylase Sirt1 is activated in response to glucose starvation. Histone deacetylation by Sirt1 could counteract radiation-induced histone acetylation, thus impairing chromatin relaxation as well as repair of DNA DSBs after irradiation. In fact, it was shown that inhibition of Sirt1 by sirtinol can partly abrogate the impaired repair of radiation-induced DNA DSBs that was observed in tumor cells under glucose-free conditions. However, the inhibitory effect of glucose starvation on DNA DSB repair in tumor cells could not only be observed under glucose-free conditions. Thus, reducing the glucose concentration to 0.5 g/l was enough to impair DSB repair following irradiation to the same degree as after total deprivation of glucose. Furthermore, it turned out that under glucose-free conditions DNA DSB repair in tumor cells was promoted by autophagy already after irradiation with 2 Gy. Finally, it was shown that, in addition to DNA DSB repair, also tumor metabolism is influenced by glucose starvation. Thus, deprivation of glucose impaired the radiation-induced switch of glucose metabolism that was characterized by increased aerobic glycolysis and decreased mitochondrial glucose oxidation, and this can also contribute to radiosensitization of the cells. In contrast to tumor cells, glucose starvation neither caused radiosensitization nor impaired the repair of radiation-induced DNA DSBs in normal fibroblasts. Moreover, in these cells, glucose starvation had no influence on histone acetylation and KAP1 phosphorylation after irradiation.

These results demonstrate that glucose starvation is an appropriate *in vitro* strategy to selectively sensitize tumor cells to radiotherapy without influencing the radiosensitivity of normal cells. Thus, glucose starvation could be a promising approach to improve the outcome of radiotherapy in cancer treatment. Therefore, it is of significant importance to test the efficacy of this treatment also in *in vivo* studies as well as in clinical trials.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung ..... **III**

Summary ..... **V**

Inhaltsverzeichnis ..... **VII**

1 Einleitung **1**

1.1 Epidemiologie und Therapie von Krebserkrankungen **1**

1.2 Zelluläre Strahlenwirkung **3**

1.2.1 Grundlagen ionisierender Strahlung 3

1.2.2 Wirkung ionisierender Strahlung auf die DNA 4

1.2.3 Bedeutung und Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs 4

1.2.4 Reparatur von DNA-DSBs im Kontext des Chromatins 7

1.2.5 Zelltod nach Bestrahlung 9

1.2.5.1 Apoptose 9

1.2.5.2 Nekrose 11

1.2.5.3 Klonogener Zelltod und mitotische Katastrophe 11

1.2.5.4 Autophagie 12

1.3 Glukosemetabolismus von Tumorzellen **13**

1.3.1 Warburg-Effekt 13

1.3.2 Vorteile des Warburg-Effekts 15

1.3.3 Glukoseentzug in der Therapie von Tumorerkrankungen 17

1.4 Zielsetzung **18**

2 Material und Methoden **20**

2.1 Material **20**

2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien 20

2.1.2 Geräte 20

2.1.3 Verbrauchsmaterial 21

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien 22

2.1.5 Puffer und Lösungen ... 23
2.1.6 Kits ... 24
2.1.7 Inhibitoren ... 24
2.1.8 Antikörper ... 25
2.1.8.1 Primäre Antikörper ... 25
2.1.8.2 Sekundäre Antikörper ... 25

2.2 Methoden ... 25
2.2.1 Zellkultur ... 25
2.2.2 Durchführung des Glukoseentzugs ... 26
2.2.3 Bestrahlung der Zellen ... 27
2.2.4 Proliferationsassay ... 27
2.2.5 Fotografie lebender Zellen ... 28
2.2.6 Messung von Apoptose ... 28
2.2.7 Messung von Nekrose ... 29
2.2.8 Bestimmung des Anteils vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen ... 31
2.2.9 Messung des Glukoseverbrauchs ... 32
2.2.10 γH2AX Focus Assay ... 33
2.2.11 Koloniebildungstest ... 34
2.2.12 Western Blot ... 36
2.2.13 Messung von Acetyl-CoA im Nukleus ... 39
2.2.14 Statistik ... 40

3 Ergebnisse ... 41

3.1 Proliferation, Überleben und Zelltod von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Glukoseentzug mit oder ohne Bestrahlung ... 41
3.1.1 Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Proliferation von Tumorzellen und normalen Fibroblasten ... 41
3.1.2 Fotografische Dokumentation des Einflusses eines Glukoseentzugs auf das Überleben von Tumorzellen und normalen Fibroblasten ... 43
3.1.3 Untersuchungen zum Zelltod durch Apoptose und Nekrose nach Durchführung eines Glukoseentzugs und einer Strahlenbehandlung in Tumorzellen ... 45

3.1.3.1 Messung von Apoptose nach Glukoseentzug und fraktionierter Bestrahlung in Tumorzellen 45
3.1.3.2 Messung von Nekrose nach Glukoseentzug und fraktionierter Bestrahlung in Tumorzellen 46
3.1.3.3 Bestimmung des Anteils vitaler, apoptotischer und nekrotischer Tumorzellen nach Glukoseentzug und Bestrahlung 48

3.2 Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen und normalen Fibroblasten 50

3.2.1 Einfluss einer Strahlenbehandlung auf den Glukoseverbrauch von Tumorzellen 51
3.2.2 Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs nach Glukoseentzug in Tumorzellen und normalen Fibroblasten 52
3.2.3 Einfluss eines Glukoseentzugs auf das klonogene Überleben von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Bestrahlung 56
3.2.4 Glukosebedarf während unterschiedlicher Phasen der DNA-DSB-Reparatur nach Bestrahlung in Tumorzellen 58
3.2.5 Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Chromatinstruktur von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Bestrahlung 60
3.2.6 Einfluss eines Glukoseentzugs auf den nukleären Acetyl-CoA-Gehalt von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Bestrahlung 64
3.2.7 Beeinflussung der strahleninduzierten DNA-DSB-Reparatur von Tumorzellen nach Glukoseentzug durch Hemmung der Histondeacetylase Sirt1 mittels Sirtinol 66
3.2.8 Bedeutung der Autophagie für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen nach Glukoseentzug 68
3.2.9 Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration des Zellkulturmediums 70

3.3 Einfluss der Strahlentherapie auf den Glukosestoffwechsel von Tumorzellen unter normalen und glukosefreien Bedingungen 71

3.3.1 Einfluss einer Strahlenbehandlung auf die aerobe Glykolyse in Tumorzellen unter normalen und glukosefreien Bedingungen 72

3.3.2 Einfluss einer Strahlenbehandlung auf die mitochondriale Glukoseoxidation in Tumorzellen unter normalen und glukosefreien Bedingungen 74

4 Diskussion 76

4.1 Ein Glukoseentzug hemmt selektiv die Proliferation von Tumorzellen und führt zu deren Zelltod durch Nekrose 76

4.2 Die selektive Radiosensitivierung von Tumorzellen durch einen Glukoseentzug ist durch eine Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparatur bedingt 82

4.3 Die Beeinträchtigung der langsamen Komponente der DNA-DSB-Reparatur durch einen Glukoseentzug in Tumorzellen ist auf eine Hemmung der Chromatinrelaxation zurückzuführen 86

4.4 Die Autophagie begünstigt die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen unter normalen und glukosefreien Bedingungen 92

4.5 Ein Glukoseentzug beeinträchtigt die strahleninduzierte Verstärkung des Warburg-Effekts in Tumorzellen 94

4.6 Schlussbetrachtung 95

5 Literaturverzeichnis 97

6 Abkürzungsverzeichnis 107

7 Publikationen und Konferenzbeiträge 110

8 Danksagung 111

9 Curriculum Vitae 112

10 Eidesstattliche Versicherung 114

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Therapie von Krebserkrankungen

Seit Anfang der 1970er Jahre konnte in Deutschland nahezu eine Verdopplung der absoluten Zahl der Krebsneuerkrankungen beobachtet werden, so dass im Jahr 2013 fast eine halbe Million Menschen an Krebs erkrankten. Dabei war Brustkrebs mit über 70 000 Neuerkrankungen die mit Abstand häufigste Tumorerkrankung bei Frauen, während Prostatakrebs mit ca. 60 000 Neuerkrankungen die vorherrschende Krebsart bei Männern darstellte. Eine wesentliche Ursache für die beobachtete Zunahme der Krebserkrankungen liegt im demografischen Wandel, der sich in den vergangenen Jahrzehnten in Deutschland ereignete und mit einer Alterung der Bevölkerung einherging. Da auch in den nächsten Jahren mit einer Zunahme der Anzahl älterer Menschen gerechnet wird, wird ein weiterer Anstieg der absoluten Zahl der Krebsneuerkrankungen prognostiziert (Robert Koch Institut 2016). Obwohl Krebs in Deutschland noch immer die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen darstellt und im Jahr 2015 etwa 226 000 Menschen an den Folgen eines Tumorleidens verstarben (Statistisches Bundesamt 2017b), ist vor allem seit Anfang der 1990er Jahre ein deutlicher Rückgang der altersstandardisierten Krebssterblichkeit zu verzeichnen (Robert Koch Institut 2016). Während 1980 noch weniger als ein Drittel der Tumorpatienten nicht an den Folgen der Erkrankung verstarben, ist heute bei mehr als der Hälfte der Erkrankten Krebs nicht mehr die Todesursache (Robert Koch Institut 2016). Dabei trägt der Rückgang der Krebssterblichkeit auch zu einer höheren Lebenserwartung in Deutschland bei. So wurden im Jahr 2015 Menschen, die an Krebs verstarben, im Mittel 73,5 Jahre alt und damit etwa 4 Jahre älter als noch 1980 (Statistisches Bundesamt 2017a). Diese Erfolge sind maßgeblich auf den medizinischen Fortschritt und die darin begründete verbesserte Therapie von Krebserkrankungen zurückzuführen (Robert Koch Institut 2016).

Eine der zentralen Säulen bei der Behandlung von Krebs stellt neben der operativen Entfernung des Tumors, der Chemotherapie und der Immuntherapie die Strahlentherapie dar (Chen H. H. W. & Kuo 2017). Sie wird bei etwa 50 % aller Tumorpatienten im Laufe ihrer Erkrankung angewandt (Delaney et al. 2005) und dient entweder der kurativen oder der palliativen Behandlung von Krebs. Dabei zielt die kurative Strahlentherapie auf die Heilung des Patienten ab, welche in manchen Fällen durch eine alleinige Strahlenbehandlung erreicht werden kann. Häufig wird die Bestrahlung jedoch in Kombination mit einer Operation oder einer

Chemotherapie (Radiochemotherapie) durchgeführt. Hierbei kann die Bestrahlung einerseits vor dem chirurgischen Eingriff (neoadjuvant) angewandt werden, um den Tumor zum Schrumpfen zu bringen und die Operation dadurch zu erleichtern bzw. überhaupt zu ermöglichen, andererseits kann die Strahlentherapie auch nach der Operation (adjuvant) erfolgen, um eventuell vorhandene Tumorreste zu zerstören und damit das Rückfallrisiko zu verringern (Deutsche Krebshilfe 2016). Die Chemotherapie kann ebenfalls neoadjuvant, adjuvant oder aber simultan zur Strahlenbehandlung durchgeführt werden, wobei die Radiochemotherapie das Ziel verfolgt, die lokale Tumorkontrolle, d. h. die Tumorvernichtung, zu verbessern sowie Fernmetastasen zu bekämpfen (Herrmann et al. 2006). Des Weiteren kann auch die Immuntherapie mit einer Strahlentherapie kombiniert werden (Chen H. H. W. & Kuo 2017). Ist eine Heilung der Tumorerkrankung nicht möglich, so kann eine palliative Strahlentherapie angewandt werden, um Beschwerden des Patienten zu lindern und damit seine Lebensqualität zu verbessern oder zu erhalten (Deutsche Krebshilfe 2016).

Bei der Behandlung von Krebs mittels Strahlentherapie kommt heutzutage am häufigsten die hochenergetische ultraharte Röntgenstrahlung (Photonenstrahlung) zum Einsatz (Deutsches Krebsforschungszentrum 2009). Hierbei handelt es sich um eine elektromagnetische Wellenstrahlung, die in modernen Bestrahlungsgeräten, den Linearbeschleunigern, erzeugt wird und perkutan appliziert wird. Im Gegensatz zur systemischen Chemotherapie stellt die Strahlentherapie eine lokale Behandlungsmethode dar, die nur auf das im Bestrahlungsfeld liegende Gewebe wirkt (Deutsche Krebshilfe 2016). Auf diese Weise soll der Tumor möglichst gezielt bekämpft und das gesunde Gewebe weitestgehend geschont werden. Dennoch lässt sich bei der Bestrahlung eine Schädigung des den Tumor umgebenden Normalgewebes nicht gänzlich vermeiden. Dies kann zu schweren Nebenwirkungen führen und begrenzt damit die maximale Dosis, die zur Behandlung des Tumors appliziert werden kann. Daher ist es üblich, die zur Therapie benötigte Gesamtdosis auf mehrere kleine Fraktionen aufzuteilen. Diese Fraktionierung ermöglicht dem gesunden Gewebe, subletale Strahlenschäden während der Bestrahlungspausen zu reparieren und sich somit zu erholen (Herrmann et al. 2006). Tumorzellen hingegen verfügen im Vergleich zu gesunden Zellen über eine geringere Reparaturkapazität subletaler Strahlenschäden, weshalb sie sich schlechter von diesen erholen und daher empfindlicher auf die Bestrahlung reagieren (Hubenak et al. 2014). Bei einer konventionellen Fraktionierung erfolgt die Bestrahlung täglich an 5 Tagen pro Woche mit einer Dosis von 1,8-2 Gy pro Fraktion (Herrmann et al. 2006). Die zur Vernichtung des Tumors benötigte Gesamtdosis ist dabei abhängig von der Tumorentität, der Tumorgröße sowie seiner Lokalisation (Herrmann et al. 2006) und liegt meist bei 40-70 Gy (Deutsche Krebshilfe 2016).

1.2 Zelluläre Strahlenwirkung

1.2.1 Grundlagen ionisierender Strahlung

Die Arten ionisierender Strahlung (IR), die in der Strahlentherapie zum Einsatz kommen, umfassen sowohl elektromagnetische Wellenstrahlungen, wie die Röntgenstrahlung oder die γ-Strahlung, als auch Teilchenstrahlungen, bei denen die Bestrahlung mittels Elektronen, Protonen, Schwerionen (z. B. Kohlenstoffionen) oder Neutronen erfolgt (Baskar et al. 2012). Die biologische Wirkung ionisierender Strahlung beruht auf ihrer Fähigkeit, Atome oder Moleküle zu ionisieren, indem in Abhängigkeit von der Strahlenart durch direkte oder indirekte Mechanismen Elektronen aus der Atomhülle herausgelöst werden, wodurch die Atome oder Moleküle zu positiv geladene Ionen werden (Herrmann et al. 2006). In einigen Fällen, z. B. nach Ionisation mittels Röntgenstrahlung, besitzen die so freigesetzten Elektronen selbst wiederum ausreichend Energie, um weitere Moleküle zu ionisieren (Joiner & van der Kogel 2009). Damit ionisierende Strahlung ihre Wirkung entfalten kann, muss sie jedoch mit biologischer Materie in Wechselwirkung treten. Somit wird nur der Anteil der Strahlung wirksam, der von der Materie absorbiert wird. Dabei wird die absorbierte Energie der ionisierenden Strahlung, bezogen auf die Masse der durchstrahlten Materie, durch die sogenannte Energiedosis beschrieben. Diese wird, nach dem britischen Physiker und Strahlenbiologen Louis Harold Gray, in der Einheit Gray (Gy; 1 Gy = 1 J/kg) angegeben (Herrmann et al. 2006). Ionisierende Strahlung kann entweder direkt oder indirekt auf biologische Zielmoleküle wirken. Während bei der direkten Strahlenwirkung die Absorption der Strahlenenergie sowie die daraus resultierende biologische Wirkung im kritischen Zielmolekül selbst erfolgen, finden diese beiden Prozesse bei der indirekten Strahlenwirkung getrennt voneinander in verschiedenen Molekülen statt (Herrmann et al. 2006). Da Säugerzellen zu 70-80 % aus Wasser bestehen, erfolgt die indirekte Wirkung ionisierender Strahlung vor allem durch die Radiolyse des Wassers. Hierbei kommt es infolge der Absorption der Strahlenenergie durch Wassermoleküle zur Bildung von Radikalen, wie den hochreaktiven Hydroxylradikalen, die über Radikalkettenreaktionen eine Schädigung biologisch kritischer Zielmoleküle herbeiführen (Herrmann et al. 2006, Joiner & van der Kogel 2009). Der Anteil der direkten und indirekten Strahlenwirkung wird durch die Art der eingesetzten Strahlung bestimmt. So kommt es beispielsweise bei der Verwendung von Röntgenstrahlen vor allem zu einer indirekten Schädigung der kritischen Zielmoleküle (Kavanagh et al. 2013).

1.2.2 Wirkung ionisierender Strahlung auf die DNA

Obwohl durch eine Bestrahlung alle in der Zelle vorkommenden Moleküle geschädigt werden können, gilt die im Zellkern vorliegende Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) als das wichtigste biologische Ziel (Target) ionisierender Strahlung (Joiner & van der Kogel 2009). Somit wird angenommen, dass die schädigende Wirkung ionisierender Strahlung maßgeblich auf eine Schädigung der DNA zurückzuführen ist. Diese kann, wie zuvor beschrieben (Kapitel 1.2.1), entweder durch direkte oder indirekte Mechanismen erfolgen. In beiden Fällen kommt es durch die Bestrahlung zur Bildung hochreaktiver Radikale, die durch Ionisationsprozesse innerhalb der DNA selbst entstehen (direkte Strahlenwirkung) oder aber infolge der Radiolyse des Wassers gebildet werden (indirekte Strahlenwirkung). Diese Radikale können zu chemischen Veränderungen der DNA führen und damit verschiedene Arten von DNA-Schäden hervorrufen (Herrmann et al. 2006, Joiner & van der Kogel 2009). So werden durch Röntgenstrahlen pro 1 Gy in einer einzigen Zelle etwa 3000-4000 Basenschäden, 1000 DNA-Einzelstrangbrüche und 40 DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSBs) induziert (Schmidt & Freyschmidt 2014). Daneben kommt es zu Modifikationen der Desoxyribose der DNA sowie zur Bildung kovalenter DNA-Protein- und DNA-DNA-Verbindungen, den sogenannten *crosslinks* (Kavanagh et al. 2013). Außerdem können gehäufte Läsionen entstehen, bei denen mehrere Schäden verschiedener Art nahe beieinanderliegen (Herrmann et al. 2006).

1.2.3 Bedeutung und Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs

Die zelluläre DNA ist in ständiger Gefahr, durch verschiedene Einflussfaktoren geschädigt zu werden. Dabei sind DNA-Schäden nicht nur das Resultat exogener Noxen wie ionisierender Strahlung, sondern entstehen auch infolge endogener Prozesse. So ist ein großer Teil der endogenen DNA-Schäden auf reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) zurückzuführen, die als Nebenprodukt des normalen oxidativen Stoffwechsels in den Mitochondrien gebildet werden (Kryston et al. 2011). Da DNA-Schäden eine Bedrohung für die genomische Stabilität darstellen (Kavanagh et al. 2013), haben Zellen im Laufe der Zeit effektive Reparaturmechanismen entwickelt, um die DNA in einem intakten, unveränderten Zustand zu erhalten. Somit kann ein Großteil der Schäden erfolgreich repariert werden und bleibt damit vollkommen ohne Folgen für die Zelle (Herrmann et al. 2006).

Allerdings sind bestimmte DNA-Schäden als besonders kritisch für Zellen zu betrachten. So gelten DNA-DSBs, trotz ihres im Vergleich zu anderen DNA-Läsionen eher seltenen

Vorkommens, als die gefährlichste Art der DNA-Schädigung. Werden sie nicht repariert, kann dies zum Tod der Zelle führen (Jeggo & Lobrich 2007, Kavanagh et al. 2013, Khanna & Jackson 2001). Bereits ein einziger DNA-DSB kann für die Zelle tödlich sein, wenn er zur Inaktivierung eines essentiellen Gens führt (Khanna & Jackson 2001). Genau diesen Effekt macht sich die Strahlentherapie zur Bekämpfung von Tumorzellen zunutze. So gelten nach heutigem Kenntnisstand nicht bzw. falsch reparierte strahleninduzierte DSBs als wichtigster biologischer Wirkmechanismus einer Bestrahlung (Herrmann et al. 2006).

Wie empfindlich eine Zelle auf Strahlung reagiert, hängt maßgeblich davon ab, wie effektiv sie die durch die Strahlung induzierten DNA-DSBs reparieren kann. So ist eine hohe Reparaturkapazität wesentlich für die Radioresistenz von Tumorzellen verantwortlich (Borrego-Soto et al. 2015, Mladenov et al. 2013). Kommt es infolge einer Bestrahlung zur Induktion von DNA-Schäden, wird der Zellzyklus an bestimmten Kontrollpunkten, den sogenannten Checkpoints, angehalten. Durch diesen Zellzyklusarrest hat die Zelle Zeit, die Reparatur der Schäden durchzuführen (Borrego-Soto et al. 2015, Sancar et al. 2004, Weterings & Chen 2008). Dabei stehen für die Reparatur von DNA-DSBs im Wesentlichen zwei Reparaturmechanismen zur Verfügung: die homologe Rekombination (HR) sowie die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ). Bei der homologen Rekombination wird die homologe DNA-Sequenz des intakten Schwesterchromatids als Matrize für die Reparatur des DSBs verwendet (Iliakis et al. 2004, Kavanagh et al. 2013, Weterings & Chen 2008). Auf diese Weise kann der Ursprungszustand der DNA wiederhergestellt werden, ohne dass es zum Verlust genetischer Informationen kommt. Somit erlaubt dieser Reparaturmechanismus eine weitestgehend fehlerfreie Reparatur des Schadens (Borrego-Soto et al. 2015). Da die homologe Rekombination auf das Vorhandensein des Schwesterchromatids angewiesen ist, kann sie jedoch nur in der späten S- und der G2-Phase des Zellzyklus erfolgen (Hendrickson 1997). Im Unterschied hierzu kann die nicht-homologe Endverknüpfung in allen Phasen des Zellzyklus stattfinden, da sie keine homologe Matrize für die Reparatur von DNA-DSBs benötigt (Rothkamm et al. 2003). So werden bei der nicht-homologen Endverknüpfung die freien DNA-Enden zunächst prozessiert, um kompatible Enden zu erhalten, die anschließend miteinander verknüpft werden. Dabei kann es jedoch zur Deletion sowie zur Insertion von Nukleotiden und damit zu einem Verlust der genomischen Integrität kommen. Die nicht-homologe Endverknüpfung gilt somit als äußerst fehleranfällig (Kavanagh et al. 2013, Khanna & Jackson 2001, Weterings & Chen 2008). Dennoch scheint sie der vorherrschende Mechanismus zur Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Säugetierzellen zu sein (Burma et al. 2006, Iliakis et al. 2004, Lobrich & Jeggo 2005).

Die Reparatur von DNA-DSBs stellt einen energieaufwendigen Prozess dar. So wird infolge der Induktion eines DSBs ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden, die sogenannte *DNA damage response* (DDR), aktiviert (Khanna & Jackson 2001), für deren Aufrechterhaltung ATP (Adenosintriphosphat) benötigt wird. Im Rahmen der DDR wird der DNA-Schaden zunächst durch Sensorproteine erkannt, die das Signal über mehrere Proteinkinasen an Effektorproteine weiterleiten, die schließlich den Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur oder, im Falle eines irreparablen Schadens, die Apoptose als Antwort auf den DNA-Schaden initiieren (Khanna & Jackson 2001). Dabei wird die DDR durch eine Vielzahl von Proteinkinasen vermittelt (Matsuoka et al. 2007, McGowan & Russell 2004), die ATP für die Phosphorylierung von Proteinen benötigen. Eine zentrale Rolle im Rahmen der strahleninduzierten DDR nimmt die Proteinkinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) ein (Bakkenist & Kastan 2004, Matsuoka et al. 2007, Tichy et al. 2010), die infolge der DNA-DSB-Induktion aktiviert und zum Schaden rekrutiert wird (Bakkenist & Kastan 2004). ATM kann Hunderte von Proteinen phosphorylieren (Matsuoka et al. 2007), darunter auch das Histon H2AX, eine Variante des Histons H2A, das 10-15 % des gesamten Histons H2A einer Zelle umfasst und ein Bestandteil des Nukleosomenkerns ist (Stucki & Jackson 2006). Die an S139 stattfindende Phosphorylierung erstreckt sich über einen Bereich von Megabasen beidseits des DNA-DSBs (Rogakou et al. 1999, Rogakou et al. 1998), wobei das phosphorylierte H2AX, das als γH2AX bezeichnet wird, nötig ist, um weitere Proteine der DDR, wie z. B. DSB-Reparaturproteine, zum Schaden zu rekrutieren (Paull et al. 2000). Diese Vielzahl an Phosphorylierungen machen die DDR zu einem energieaufwendigen Prozess im Rahmen der Erkennung und Reparatur von DNA-DSBs. Ein weiteres energieverbrauchendes Ereignis stellt die Öffnung der Chromatinstruktur im Bereich von DSBs dar (Kruhlak et al. 2006), welche notwendig ist, um der DNA-Reparaturmaschinerie den Zugang zum Schaden zu erleichtern (Price & D'Andrea 2013). Hierbei kommen zum einen ATP-abhängige Chromatin-Remodeling-Komplexe zum Einsatz (Price & D'Andrea 2013, van Attikum & Gasser 2005), zum anderen wird ATP für die Phosphorylierung des Proteins KAP-1 gebraucht, das eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DSBs innerhalb des Heterochromatins spielt (Goodarzi et al. 2010). Daneben wird die Chromatinrelaxation durch die Acetylierung von Histonproteinen gefördert, wofür das energiereiche Moleküle Acetyl-CoA benötig wird (Bannister & Kouzarides 2011, Hunt et al. 2013). Diese Mechanismen, die durch die Öffnung der Chromatinstruktur zur Reparatur von DNA-DSBs beitragen, sollen nun nachfolgend näher erläutert werden.

1.2.4 Reparatur von DNA-DSBs im Kontext des Chromatins

Die DNA eukaryotischer Zellen liegt im Zellkern in einer hoch organisierten Struktur, dem Chromatin, vor. Hierbei handelt es sich um einen Komplex bestehend aus DNA und Proteinen, dessen Grundeinheit das Nukleosom darstellt. Im Bereich des Nukleosoms ist die DNA mit den Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 assoziiert, die einen oktameren Nukleosomenkern bilden, um den sich die DNA mit ca. 147 Basenpaaren windet. Die Nukleosomen sind in regelmäßigen Abständen, wie Perlen an einer Schnur, vorzufinden und bilden die Basis für höhere Organisationseinheiten des Chromatins bis hin zum Chromosom (Kruhlak et al. 2006, Price & D'Andrea 2013). Je nachdem, wie stark verdichtet die DNA im Zellkern vorliegt, wird zwischen Euchromatin und Heterochromatin unterschieden. In Säugetierzellen liegt der überwiegende Teil des Chromatins in Form des locker verpackten, transkriptionell aktiven Euchromatins vor. Das Heterochromatin hingegen umfasst nur etwa 10-25 % des gesamten Chromatins und bezeichnet Bereiche, in denen die DNA stark kondensiert ist, wodurch keine Transkription erfolgen kann (Goodarzi et al. 2010).

Die Verpackung der DNA in Form von Chromatin stellt jedoch eine Herausforderung für die Reparatur von DSBs dar. Der Einfluss der Chromatinstruktur auf die DNA-Reparatur wurde zuerst im sogenannten *access-repair-restore* Modell (Smerdon 1991) beschrieben. Dieses besagt, dass es infolge der Induktion eines DNA-Schadens zunächst zu einer lokalen Umstrukturierung des Chromatins kommen muss, um der Reparaturmaschinerie den Zugang zur Läsion zu ermöglichen. Erst dann kann die eigentliche Reparatur stattfinden. Ist diese abgeschlossen, gilt es, die ursprüngliche Struktur des Chromatins wiederherzustellen (Green & Almouzni 2002).

Um DNA-DSBs für die Reparaturproteine zugänglich zu machen, stehen der Zelle verschiedene Mechanismen zur Verfügung, die zu einer Auflockerung, d. h. zu einer Öffnung, der Chromatinstruktur im Bereich des Schadens führen (Xu et al. 2010). Einer dieser Mechanismen besteht in der Acetylierung der Histonproteine, die sich im Nukleosomenkern befinden. Hierbei katalysieren Histonacetyltransferasen (HATs) die Übertragung einer Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoA auf die ε-Aminogruppe spezifischer Lysinreste der Histone (Abb. 1.1). Dies bewirkt eine Neutralisierung der positiven Ladung des Lysins, wodurch die Wechselwirkung zwischen Histonen und der DNA geschwächt wird und es zur Relaxation des Chromatins kommt (Bannister & Kouzarides 2011, Hunt et al. 2013). Da sich die Acetylierung der Histone über Hunderte von Kilobasen beidseits des DNA-DSBs erstreckt, führt diese zu einer weitläufigen Öffnung der Chromatinstruktur im Bereich der Läsion (Price & D'Andrea

2013). Diese Prozesse können durch die Wirkung von Histondeacetylasen (HDACs) wieder rückgängig gemacht werden (Abb. 1.1). Sie entfernen die Acetyl-Gruppen der durch HATs acetylierten Histone, wodurch das Chromatin wieder in seine geschlossene Form übergeht (Bannister & Kouzarides 2011, Pons et al. 2009).

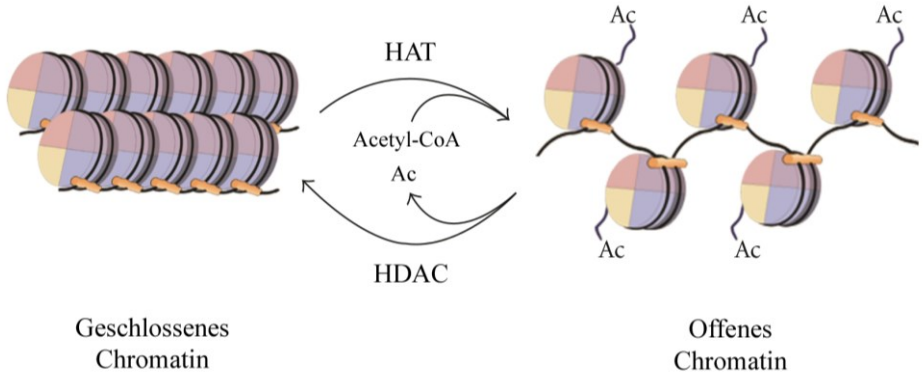


Abb. 1.1: Beeinflussung der Chromatinstruktur durch Acetylierung und Deacetylierung von Histonen des Nukleosomenkerns. Histonacetyltransferasen (HATs) katalysieren die Übertragung einer Acetylgruppe (Ac) von Acetyl-CoA auf die ε-Aminogruppe bestimmter Lysinreste der Histone, wodurch es zur Öffnung der Chromatinstruktur kommt. Durch die Entfernung dieser Acetylgruppen durch Histondeacetylasen (HDACs) geht das Chromatin wieder in seine geschlossene Form über (modifiziert nach Rodd et al. 2012).

Ein weiterer Mechanismus, um die Chromatinbarriere im Rahmen der DNA-DSB-Reparatur zu überwinden, stellt das Chromatin-Remodeling dar. Hierbei führen große Multiproteinkomplexe, die sogenannten Chromatin-Remodeling-Komplexe, zu Veränderungen im Chromatin, indem sie die Energie aus der Hydrolyse von ATP nutzen, um die Wechselwirkungen zwischen der DNA und den Kernhistonen der Nukleosomen zu stören (Torchy et al. 2015, van Attikum & Gasser 2005). Hierdurch kommt es (1) zu Verschiebungen der Nukleosomen entlang der DNA, wodurch bestimmte DNA-Sequenzen freigelegt werden, (2) zur Entfernung von Nukleosomen aus dem Chromatin, um offene DNA-Bereiche zu schaffen oder (3) zum Austausch von Histonen durch bestimmte Histonvarianten (Becker & Workman 2013, Price & D'Andrea 2013, Torchy et al. 2015). Auf diese Weise führen verschiedene Chromatin-Remodeling-Komplexe, die infolge der DNA-DSB-Induktion zum Schaden rekrutiert werden, zu lokalen Veränderungen der Chromatinstruktur, wodurch die Reparatur des DSBs erleichtert wird (Huang et al. 2005, van Attikum & Gasser 2005). So kann beispielsweise durch den ATP-abhängigen Austausch von Histonen durch bestimmte Histonvarianten die Öffnung der Chromatinstruktur im Bereich des DNA-DSBs gefördert

werden, wodurch der Schaden für die Reparaturproteine zugänglich wird (Price & D'Andrea 2013, van Attikum & Gasser 2005).

Eine besonders große Barriere für die Reparatur von DNA-DSBs stellt das Heterochromatin dar (Goodarzi et al. 2010, Soria et al. 2012), dessen starke Verdichtung spezielle Mechanismen erfordert, um das Chromatin im Rahmen der DSB-Reparatur zu dekondensieren. Wesentlich an der Aufrechterhaltung des Heterochromatins beteiligt ist das Protein KAP1 (*KRAB [Krüppel-associated box]-associated protein 1*) (Iyengar & Farnham 2011, Murray et al. 2012). Kommt es zur Induktion eines DNA-DSBs, so wird KAP1 im Bereich des Schadens durch die Proteinkinase ATM an S824 phosphoryliert (Ziv et al. 2006). Diese Phosphorylierung stört die Wechselwirkung zwischen KAP1 und dem ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Enzym CHD3 (*chromodomain helicase DNA binding protein 3*), sodass sich CHD3 im Bereich des DSBs vom Chromatin löst, woraufhin es zur Dekondensation des Heterochromatins kommt (Goodarzi et al. 2011). Auf diese Weise wird der Schaden für die DNA-Reparaturproteine zugänglich. Nach erfolgter Reparatur spaltet die Proteinphosphatase-1β (PP1β) den Phosphatrest an S824 von KAP1 ab, wodurch das Chromatin wieder in seinen kondensierten Zustand überführt wird (Iyengar & Farnham 2011).

1.2.5 Zelltod nach Bestrahlung

Können strahleninduzierte DNA-DSBs nicht repariert werden, so kommt es zum Zelltod, welcher neben dem Zellzyklusarrest und der DNA-Reparatur eine weitere wichtige zelluläre Antwort auf DSBs darstellt (Khanna & Jackson 2001). Es wird zwischen verschiedenen Arten des strahleninduzierten Zelltods unterschieden, zu denen die Apoptose, die Nekrose, die mitotische Katastrophe, die Autophagie sowie die Seneszenz gehören (Joiner & van der Kogel 2009).

1.2.5.1 Apoptose

Die Apoptose stellt eine Form des programmierten Zelltods dar und kann als eine Art „Selbstmordprogramm“ der Zelle angesehen werden (Okada & Mak 2004). Hierbei kommt es unter streng kontrollierten Bedingungen zum Untergang der Zelle, ohne dass eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird oder die benachbarten Zellen geschädigt werden (Elmore 2007, McIlwain et al. 2013). Die Apoptose kann über einen extrinsischen oder einen

intrinsischen Weg aktiviert werden, wobei beide Wege über bestimmte Proteasen, die sogenannten Caspasen, vermittelt werden. Diese werden als inaktive Procaspasen synthetisiert, die infolge externer oder interner Stimuli kaskadenartig aktiviert werden, wobei zunächst eine Aktivierung sogenannter Initiatorcaspasen erfolgt, die wiederum sogenannte Effektorcaspasen aktivieren (McIlwain et al. 2013, Okada & Mak 2004). Der extrinsische Weg der Apoptose beginnt mit der Bindung spezifischer extrazellulärer Liganden (z. B. FasL, TNF-α) an membranständige Todesrezeptoren (z. B. FasR, TNFR1), woraufhin es zur Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 10 kommt. Diese wiederum spalten und aktivieren die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 (Elmore 2007, Eriksson & Stigbrand 2010). Der intrinsische Weg der Apoptose, der auch als mitochondrialer Weg bezeichnet wird, wird durch verschiedene Stimuli innerhalb der Zelle aktiviert (Jin & El-Deiry 2005) und geht mit einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran einher, wodurch Proteine des Intermembranraums, darunter Cytochrom *c*, ins Cytoplasma freigesetzt werden (Eriksson & Stigbrand 2010, Okada & Mak 2004). Cytochrom *c* bildet daraufhin zusammen mit dem Protein Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und der Procaspase 9 das sogenannte Apoptosom, woraus eine Aktivierung der Caspase 9 resultiert (Elmore 2007, Eriksson & Stigbrand 2010). In ihrer Funktion als Initiatorcaspase spaltet und aktiviert die Caspase 9 sodann die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 (Eriksson & Stigbrand 2010). Somit führen der extrinsische und der intrinsische Weg der Apoptose zur Aktivierung der gleichen Effektorcaspasen, die sodann eine Reihe bestimmter zellulärer Substrate spalten (Okada & Mak 2004). Dadurch kommt es sowohl zum Abbau wichtiger struktureller und regulatorischer Proteine der Zelle als auch zur Aktivierung von Endonukleasen (Elmore 2007, Slee et al. 2001). Dies führt zu den für die Apoptose typischen morphologischen Veränderungen wie Zellschrumpfen, Blasenbildung der Plasmamembran (*blebbing*), Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung (Jin & El-Deiry 2005, Mills et al. 1998). Schließlich zerfällt die Zelle unter Bildung sogenannter apoptotischer Körper (*apoptotic bodies*), welche Cytoplasma, Organellen und zum Teil Kernfragmente enthalten und von einer intakten Plasmamembran umschlossen sind. Die apoptotischen Körper werden sodann von Phagozyten beseitigt (Elmore 2007).

Nach einer Bestrahlung ist vor allem die intrinsische Aktivierung der Apoptose von Bedeutung (Maier et al. 2016). Dabei kann die Apoptose direkt durch die *DNA damage response* ausgelöst werden (Joiner & van der Kogel 2009). So führen strahleninduzierte DNA-DSBs zu einer Aktivierung der ATM (Kapitel 1.2.3), die daraufhin, neben zahlreichen anderen Proteinen, den Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53 phosphoryliert (Maier et al. 2016, Saito et al. 2002). Dieser wird durch die Phosphorylierung sowohl stabilisiert als auch aktiviert (Saito et

al. 2002) und setzt sodann die Transkription proapoptotischer Gene (z. B. BAX, PUMA) in Gang (Fridman & Lowe 2003, Maier et al. 2016). Die auf diese Weise gebildeten proapoptotischen Proteine stimulieren die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien und induzieren somit die Apoptose (Fridman & Lowe 2003, Nakano & Vousden 2001). Die p53-abhängige Apoptose erfolgt bereits innerhalb weniger Stunden nach der Bestrahlung und findet noch vor der Mitose der Zellen statt (Eriksson & Stigbrand 2010).

1.2.5.2 Nekrose

Die Nekrose wird üblicherweise als eine passive und unkontrollierte Form des Zelltods angesehen, die meist nicht nur einzelne Zellen, sondern ganze Zellgruppen betrifft (Elmore 2007). Sie wird durch den Zusammenbruch physiologischer Prozesse ausgelöst, die für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase wesentlich sind, wie beispielsweise die Regulation des Ionentransports, der Energieproduktion oder des pH-Werts (Jin & El-Deiry 2005, Okada & Mak 2004). So kann die Nekrose Folge von Infektionen, Entzündungen oder Ischämien sein (Okada & Mak 2004). Sie kann jedoch auch durch eine Bestrahlung, v. a. bei der Verwendung hoher Energiedosen, induziert werden (Elmore 2007, Joiner & van der Kogel 2009). Im Rahmen der Nekrose kommt es zu morphologischen Veränderungen, die u. a. den Verlust der Integrität der Plasmamembran, das Anschwellen der Zellen sowie die Degeneration der Organellen umfassen (Elmore 2007, Okada & Mak 2004). Der Verlust der Membranintegrität geht mit der unkontrollierten Freisetzung von Zellbestandteilen in den Extrazellularraum einher, was eine Schädigung benachbarter Zellen sowie die Induktion einer lokalen Entzündungsreaktion zur Folge hat (Borges et al. 2008, Elmore 2007, Jin & El-Deiry 2005).

1.2.5.3 Klonogener Zelltod und mitotische Katastrophe

Klonogene Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, mehrere Zellteilungen zu durchlaufen, so dass aus einer einzelnen Zelle eine Kolonie von mindestens 50 Tochterzellen hervorgeht. Ein Verlust dieser Klonogenität, der z. B. nach einer Bestrahlung auftreten kann, wird als klonogener Zelltod bezeichnet. Dem klonogenen Zelltod können verschiedene Ursachen zugrunde liegen, wobei die mitotische Katastrophe als wichtigster Mechanismus des klonogenen Zelltods infolge einer Bestrahlung angesehen wird (Herrmann et al. 2006). Die mitotische Katastrophe wird durch eine aberrante Mitose verursacht, zu der es kommt, wenn Zellen mit nicht reparierten oder falsch reparierten DNA-Schäden in die Mitose eintreten (Jin

& El-Deiry 2005, Joiner & van der Kogel 2009). Meist können die Zellen noch eine, zwei oder mehrere Mitosen durchlaufen, bevor sie schließlich aufgrund von Chromosomenaberrationen eine Teilung nicht mehr vollenden können und ihre Klonogenität verlieren (Herrmann et al. 2006). Während die mitotische Katastrophe selbst einen Mechanismus des Zelltods darstellt, kann sie, unabhängig vom initialen DNA-Schaden, auch andere Formen des Zelltods, wie Apoptose, Nekrose, Autophagie oder Seneszenz, auslösen (Joiner & van der Kogel 2009).

1.2.5.4 Autophagie

Die Autophagie, genauer gesagt die Makroautophagie, stellt einen Mechanismus dar, der dem Abbau von Proteinen und Organellen in der Zelle dient. Während das Ubiquitin-Proteasom-System für den Abbau kurzlebiger Proteine sorgt, ist die Autophagie für die Degradation langlebiger Proteine verantwortlich und übernimmt zudem den Abbau cytoplasmatischer Organellen, beispielsweise der Mitochondrien (Apel et al. 2008, Yoshimori 2004). Im Rahmen der Autophagie werden die abzubauenden cytoplasmatischen Zellbestandteile zunächst von einer Doppelmembran, dem Phagophor, umgeben. Dieses expandiert bis es das für den Abbau bestimmte Zellmaterial komplett umschließt, wodurch das sogenannte Autophagosom gebildet wird. Im nächsten Schritt fusioniert die äußere Membran des Autophagosoms mit der Membran eines Lysosoms zum Autolysosom, woraufhin die lysosomalen Enzyme für den Abbau der inneren Membran und der darin eingeschlossenen Zellbestandteile sorgen (Apel et al. 2008, Hansen & Johansen 2011, Yoshimori 2004). Die Abbauprodukte werden ins Cytoplasma freigesetzt und können für die Synthese neuer Makromoleküle oder zur Energiegewinnung verwendet werden.

Unter normalen Bedingungen findet die Autophagie kontinuierlich, auf niedrigem Niveau statt (konstitutive Autophagie) und dient als Mechanismus der Qualitätssicherung, indem sie für den Abbau dysfunktionaler, beschädigter oder nicht mehr benötigter Zellbestandteile sorgt (Hansen & Johansen 2011, Jin & El-Deiry 2005, Randall-Demllo et al. 2013). Sie kann jedoch infolge verschiedener Stresssituationen, wie z. B. einer Bestrahlung oder einem Nährstoffmangel, stimuliert werden (Jin & El-Deiry 2005, Randall-Demllo et al. 2013). So sorgt die durch einen Nährstoffmangel induzierte Autophagie durch den Abbau von Proteinen und Organellen u. a. für die Bereitstellung von Aminosäuren, die sodann für die Glukoneogenese und die Synthese von Proteinen, die für das Überleben bei Nährstoffmangel benötigt werden, herangezogen werden können (Yoshimori 2004). Während die Autophagie in diesem Fall das Überleben der

Zellen fördert, kann sie jedoch unter bestimmten Umständen auch zum Zelltod führen (Borges et al. 2008). Dabei wird die Autophagie als ein weiterer Mechanismus des programmierten Zelltods angesehen, der von der Apoptose abzugrenzen ist (Assuncao Guimaraes & Linden 2004, Tsujimoto & Shimizu 2005). Welche Rolle die infolge einer Bestrahlung in vielen Tumorzellen induzierte Autophagie spielt, ist bisher noch unklar (Saleh T. et al. 2016). So lassen zahlreiche Studien eine cytoprotektive Funktion der Autophagie nach Bestrahlung vermuten (Gewirtz 2014, Saleh T. et al. 2016), andererseits kann die strahleninduzierte Autophagie jedoch auch cytotoxisch wirken und zum Zelltod führen (Chen Z. et al. 2016, Cui et al. 2016).

1.3 Glukosemetabolismus von Tumorzellen

1.3.1 Warburg-Effekt

Bereits im Jahr 1924 wies der Biochemiker Otto Warburg auf eine Besonderheit im Stoffwechsel von Krebszellen hin, als er postulierte, dass diese im Vergleich zu Normalgewebe eine hohe glykolytische Aktivität sowie Laktatproduktion aufweisen und auch unter aeroben Bedingungen den größten Teil des Zuckers zu Laktat verstoffwechseln (Warburg et al. 1924). Dieses für Tumorzellen charakteristische Phänomen, die Glukose unabhängig von der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration bevorzugt zu Laktat abzubauen, wird als Warburg-Effekt oder aerobe Glykolyse bezeichnet (Vander Heiden et al. 2009). Hierbei wird die Glukose zunächst im Rahmen der Glykolyse zu Pyruvat umgesetzt, welches sodann durch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert wird (Abb. 1.2). Diese Prozesse finden im Cytosol der Zellen statt (Ferreira 2010). Neben Tumorzellen wird die aerobe Glykolyse auch von normalen proliferierenden Geweben genutzt (Vander Heiden et al. 2009).

In normalen differenzierten, d. h. nicht proliferierenden, Geweben erfolgt der Abbau von Glukose zu Laktat nur dann, wenn nicht ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht (anaerobe Glykolyse). Unter aeroben Bedingungen hingegen wird nahezu die gesamte Glukose vollständig zu Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Wasser oxidiert (Abb. 1.2) (Vander Heiden et al. 2009). Hierzu wird das im Cytosol aus der Glykolyse gewonnene Pyruvat in den Mitochondrien durch den Pyruvatdehydrogenase (PDH)-Komplex oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert, welches daraufhin in den Citratzyklus eingeschleust wird, wo es enzymatisch zu CO_2 oxidiert wird. Dabei werden NADH (reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) und $FADH_2$

(reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid) gebildet, deren Elektronen über die Atmungskette schrittweise schließlich auf Sauerstoff übertragen werden. Die dabei freiwerdende Energie wird zum Aufbau eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran genutzt, der die Synthese von ATP aus ADP (Adenosindiphosphat) und anorganischem Phosphat antreibt (Löffler & Petrides 2003). Die Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien stellt dabei einen vergleichsweise effizienten Mechanismus dar. So werden durch die vollständige Oxidation von einem Molekül Glukose bis zu 36 Moleküle ATP generiert, wohingegen der Abbau von Glukose zu Laktat nur 2 ATP pro Molekül Glukose liefert (Pelicano et al. 2006, Vander Heiden et al. 2009).

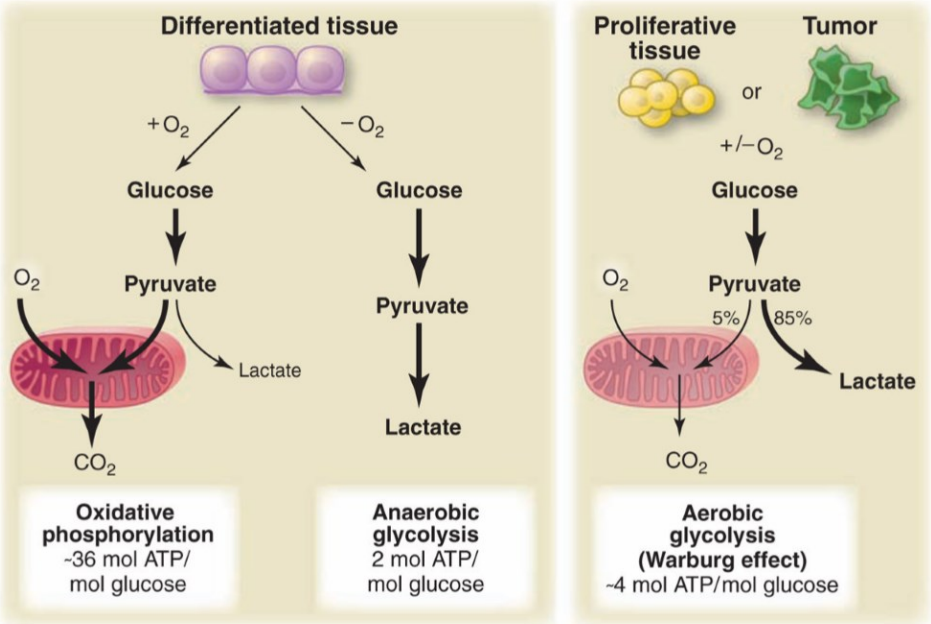


Abb. 1.2: Glukosestoffwechsel von normalen Zellen und Tumorzellen. In normalen differenzierten Geweben wird bei Anwesenheit von Sauerstoff der Großteil der Glukose in den Mitochondrien vollständig zu CO_2 und Wasser oxidiert. Unter anaeroben Bedingungen bauen differenzierte Gewebe die Glukose jedoch ausschließlich zu Laktat ab. Tumorzellen hingegen verstoffwechseln die Glukose unabhängig von der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration bevorzugt zu Laktat (aerobe Glykolyse, Warburg-Effekt). Dieses Phänomen ist auch in normalen proliferierenden Geweben zu beobachten. Sowohl in Tumorzellen als auch in normalen proliferierenden Zellen findet jedoch auch in geringem Maße oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien statt, zudem gehen etwa 10 % der Glukose noch vor der Bildung von Pyruvat in anabole Stoffwechselwege ein (Vander Heiden et al. 2009).

1.3.2 Vorteile des Warburg-Effekts

Es stellt sich die Frage, weshalb Tumorzellen, von denen anzunehmen ist, dass sie aufgrund ihrer uneingeschränkten Teilungsfähigkeit einen hohen Energiebedarf haben, einen Stoffwechselweg mit solch geringer ATP-Ausbeute pro Molekül Glukose bevorzugen. Während Otto Warburg annahm, dass Tumorzellen aufgrund eines Defekts im oxidativen Stoffwechsel der Mitochondrien auf die Glykolyse zur Energiegewinnung angewiesen sind (Warburg 1956), konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die Mitochondrienfunktion in den meisten Tumorzellen nicht beeinträchtigt ist (Frezza & Gottlieb 2009, Moreno-Sanchez et al. 2007).

Doch was ist dann der Grund für das Auftreten des Warburg-Effekts? Tatsächlich scheint die hohe glykolytische Aktivität einige Vorteile für proliferierende Zellen mit sich zu bringen. So kann im Rahmen der aeroben Glykolyse, trotz der geringen Energieausbeute pro Molekül Glukose, mehr ATP generiert werden als durch die oxidative Phosphorylierung, da die ATP-Produktion hier in einer höheren Geschwindigkeit erfolgt (Pfeiffer et al. 2001). Dies setzt jedoch voraus, dass Glukose im Überfluss vorhanden ist und der Fluss durch die Glykolyse hoch ist (Guppy et al. 1993). Die ineffiziente ATP-Produktion wird somit erst dann zum Problem, wenn nicht ausreichend Glukose zur Verfügung steht (Vander Heiden et al. 2009). Um eine hohe Glukoseaufnahme zu ermöglichen, werden in vielen Tumorzellen Glukosetransporter, wie z. B. GLUT1, überexprimiert (Medina & Owen 2002, Moreno-Sanchez et al. 2007), zudem sorgt in Tumorzellen die Überexpression einiger an der Glykolyse beteiligter Enzyme für eine hohe glykolytische Aktivität (Altenberg & Greulich 2004, Moreno-Sanchez et al. 2007).

Die Glykolyse stellt jedoch nicht nur Energie in Form von ATP bereit, sondern liefert auch wichtige Vorstufen für die Synthese von Aminosäuren, Lipiden und Nukleotiden, die für die Bildung neuer Zellen und damit für die Proliferation von Tumorzellen unerlässlich sind (Lunt & Vander Heiden 2011). So kann beispielsweise das im ersten Schritt der Glykolyse gebildete Glukose-6-Phosphat in den Pentosephosphatweg eingehen, der der Bildung von NADPH (reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) und Ribose-5-Phosphat dient. Während NADPH u. a. für die Herstellung von Fettsäuren benötigt wird, kommt Ribose-5-Phosphat bei der Synthese von Nukleotiden zum Einsatz (Jones & Thompson 2009). Zudem kann Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, nach Umwandlung zu Acetyl-CoA für die Fettsäurebiosynthese verwendet werden (Vander Heiden et al. 2009), daneben dient es jedoch auch als Ausgangssubstanz für die Bildung der Aminosäure Alanin (Moreno-Sanchez et al.

2007). Auch die Synthese der Aminosäuren Serin, Glycin und Cystein geht von einem Zwischenprodukt der Glykolyse aus (Moreno-Sanchez et al. 2007). Eine hohe glykolytische Aktivität erfüllt somit nicht nur die energetischen, sondern auch die biosynthetischen Anforderungen proliferierender Zellen (Jones & Thompson 2009). Die alleinige Oxidation der Glukose zu CO_2 in den Mitochondrien hingegen, die auf eine Maximierung der ATP-Produktion abzielt, kann den Bedürfnissen proliferierender Zellen nicht gerecht werden (Vander Heiden et al. 2009).

Ein weiterer Vorteil der aeroben Glykolyse besteht in der Bildung großer Mengen Laktat, welches für Tumorzellen von unterschiedlichem Nutzen sein kann. So weist Laktat eine antioxidative Wirkung auf (Groussard et al. 2000), wodurch es Tumorzellen vor den schädigenden Einflüssen freier Radikale schützen kann. Dies ist auch im Rahmen einer Strahlentherapie von Bedeutung, deren Wirkung maßgeblich auf einer Schädigung der DNA durch reaktive Sauerstoffspezies beruht (Holley et al. 2014). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die antioxidative Kapazität von Laktat zur Radioresistenz von Tumoren beiträgt (Sattler et al. 2010) und dass der Laktatgehalt von Tumoren positiv mit deren Radioresistenz korreliert (Quennet et al. 2006). Eine hohe Tumorlaktatkonzentration gilt zudem als schlechter prognostischer Faktor und geht mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung einher (Brizel et al. 2001, Walenta et al. 2000). Die Invasion und Metastasierung von Tumoren wird durch die Ansäuerung der Umgebung infolge der hohen Laktatproduktion begünstigt. So führt der niedrige extrazelluläre pH-Wert einerseits zum Untergang normaler Zellen (Gatenby & Gillies 2004), andererseits werden dadurch proteolytische Enzyme, die für den Abbau der extrazellulären Matrix sorgen, sowie proangiogenetische Faktoren hochreguliert (Rofstad et al. 2006). Laktat hemmt zudem die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort, indem es die Funktion cytotoxischer T-Lymphozyten beeinträchtigt (Fischer et al. 2007). Darüber hinaus stellt Laktat auch eine Energiequelle für Tumoren dar. So können Tumorzellen, die sich in der Nähe von Blutgefäßen befinden und somit gut mit Sauerstoff versorgt sind, das von Tumorzellen mit geringerer Sauerstoffversorgung gebildete Laktat aufnehmen und nach Umwandlung zu Pyruvat zur Energiegewinnung in den Mitochondrien nutzen (Feron 2009).

Letztendlich stellt die bevorzugte Verwendung der aeroben Glykolyse sicher, dass die Bildung freier Radikale im Rahmen der ATP-Produktion möglichst gering gehalten wird. Während beim oxidativen Stoffwechsel in den Mitochondrien freie Radikale als Nebenprodukt entstehen, bietet die aerobe Glykolyse die Möglichkeit, ATP zu generieren, ohne das Risiko der Bildung dieser schädlichen Substanzen einzugehen (Guppy et al. 1993).

1.3.3 Glukoseentzug in der Therapie von Tumorerkrankungen

Die Umprogrammierung des Energiestoffwechsels in Richtung aerobe Glykolyse wird heutzutage zu den Markenzeichen von Krebszellen (*hallmarks of cancer*) gezählt, die das Überleben, Wachstum und die Metastasierung von Tumoren ermöglichen (Hanahan & Weinberg 2011). Damit stellt der besondere Glukosestoffwechsel von Tumorzellen einen potenziellen Angriffspunkt für die Therapie von Krebserkrankungen dar. Da Krebszellen die geringe ATP-Ausbeute der aeroben Glykolyse durch eine verstärkte Aufnahme von Glukose kompensieren (DeBerardinis et al. 2008, Hsu & Sabatini 2008) und damit auf eine hohe Zufuhr dieses Nährstoffs angewiesen sind, besteht eine Strategie der Tumorbekämpfung darin, den Tumorzellen weniger Glukose zur Verfügung zu stellen. Dies kann *in vitro* z. B. durch eine Verringerung der Glukosekonzentration des Zellkulturmediums erfolgen, während mögliche *in vivo*-Ansätze im Fasten, der Kalorienrestriktion oder der Durchführung einer ketogenen Diät mit geringer Kohlenhydrataufnahme bestehen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Glukoseentzug *in vitro* die Proliferation verschiedener Krebszellen hemmen kann (Lee C. et al. 2012) und auch *in vivo* konnte durch Fasten oder eine Kalorienrestriktion ein verringertes Tumorwachstum gegenüber den Kontrollen erzielt werden (Lee C. et al. 2012, Safdie F. et al. 2012, Saleh A. D. et al. 2013). In manchen Untersuchungen wurde das Wachstum verschiedener Tumore durch mehrere Fastenzyklen sogar genauso effizient oder noch effizienter gehemmt wie nach chemotherapeutischer Behandlung (Lee C. et al. 2012, Safdie F. et al. 2012). Der größte therapeutische Effekt konnte jedoch erzielt werden, wenn der Glukoseentzug mit einer Strahlentherapie oder einer Chemotherapie kombiniert wurde. So zeigten mehrere Studien, dass das Tumorwachstum durch die Kombination einer Strahlenbehandlung mit Fasten, einer Kalorienrestriktion oder einer ketogenen Diät noch stärker gehemmt wurde als durch die Bestrahlung oder die jeweilige Ernährungsmaßnahme allein (Abdelwahab et al. 2012, Allen et al. 2013, Safdie F. et al. 2012, Saleh A. D. et al. 2013). Gleichzeitig führte die Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen zu einem verbesserten Überleben der tumortragenden Versuchstiere, zum Teil konnte sogar eine Heilung beobachtet werden (Abdelwahab et al. 2012, Allen et al. 2013, Safdie F. et al. 2012). Auch die Effektivität einer Chemotherapie konnte *in vivo* durch Fasten verstärkt werden (Lee C. et al. 2012, Safdie F. et al. 2012), zudem zeigten *in vitro*-Untersuchungen, dass zahlreiche Tumorzelllinien durch einen Glukoseentzug gegenüber Chemotherapeutika sensitiviert werden können (Lee C. et al. 2012, Safdie F. et al. 2012). Daneben scheint ein Glukoseentzug *in vitro*

bzw. Fasten *in vivo* normale Zellen, nicht jedoch Krebszellen, vor den schädigenden Einflüssen chemotherapeutischer Agenzien zu schützen (Raffaghello et al. 2008). Die Mechanismen, durch die ein Glukoseentzug die Wirksamkeit einer strahlen- oder chemotherapeutischen Behandlung beeinflusst, sind bisher jedoch nur wenig erforscht.

1.4 Zielsetzung

Die Strahlentherapie gehört zu den wichtigsten und erfolgreichsten Behandlungsmethoden solider Tumore. Die maximale Dosis, mit der ein Tumor bestrahlt werden kann, wird jedoch durch Normalgewebsreaktionen des mitbestrahlten gesunden Gewebes und dem damit einhergehenden Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen und sekundären Tumoren begrenzt (Herrmann et al. 2006). Somit ist es von zentraler Bedeutung, neue Therapiestrategien zu entwickeln, die die zellabtötende Wirkung der Strahlung auf den Tumor maximieren, während gleichzeitig die Nebenwirkungen des Normalgewebes so gering wie möglich gehalten werden (Mladenov et al. 2013).

In Vorarbeiten der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung der Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen konnte gezeigt werden, dass es in Tumorzellen infolge der Bestrahlung zu einem Anstieg der Glukoseaufnahme, vermittelt durch Glukosetransporter der SGLT-Familie, kommt, deren Hemmung mit einer Radiosensitivierung der Zellen einhergeht. In normalen Fibroblasten hingegen konnte keine erhöhte Glukoseaufnahme nach der Bestrahlung beobachtet werden und so hatte auch die Hemmung der SGLT-Glukosetransporter keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der Zellen (Dittmann et al. 2013). Diese Ergebnisse, zusammen mit den von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Daten (Kapitel 1.3.3), ließen vermuten, dass die Zufuhr von Glukose für die zelluläre Strahlenantwort von großer Bedeutung ist, wobei von Unterschieden zwischen Tumorzellen und normalen Zellen auszugehen ist.

Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit zu überprüfen, ob ein Glukoseentzug eine geeignete Strategie darstellt, um selektiv die Wirkung einer Strahlentherapie auf Tumorzellen zu verstärken, ohne die Strahlenempfindlichkeit normaler Zellen zu erhöhen. Dabei war es von wesentlichem Interesse, die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären, wobei ein besonderes Augenmerk der Beeinflussung der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs durch einen Glukoseentzug gelten sollte.

Hierzu wurden *in vitro*-Untersuchungen unter Verwendung der humanen Tumorzelllinien A549 und FaDu sowie der normalen Fibroblasten HSF7 durchgeführt, wobei folgenden Fragestellungen nachgegangen werden sollte:

- Beeinflusst ein Glukoseentzug die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen und Normalzellen? Wie wirkt sich ein Glukoseentzug in Kombination mit einer Bestrahlung auf den Zelltod von Tumorzellen durch Apoptose oder Nekrose aus?
- Welchen Einfluss hat ein Glukoseentzug auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen und Normalzellen? Was sind die zugrunde liegenden Mechanismen?
    - Welche Rolle spielt die Verfügbarkeit von Glukose für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs?
    - Welche Auswirkungen hat ein Glukoseentzug auf die Chromatinstruktur nach Bestrahlung?
    - Welche Bedeutung hat die Autophagie für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs unter normalen und glukosefreien Bedingungen?
- Wird der Glukosestoffwechsel von Tumorzellen durch eine Bestrahlung verändert? Inwiefern wird dies durch einen Glukoseentzug beeinflusst?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Die Experimente wurden mit folgenden humanen Zelllinien durchgeführt:

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	p53-Status
A549	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)	ATCC CCL-185	Wildtyp
FaDu	Kopf-Hals-Platten-epithelkarzinom (HNSCC) des Hypopharynx	ATCC HTB-43	mutiert
HSF7	Hautfibroblasten	Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen	Wildtyp

Alle Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit einem Glukosegehalt von 4,5 g/l kultiviert. Das von *Gibco* als Pulver erworbene Medium wurde mit 3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) sowie 10 % fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) und 1 % Penicillin-Streptomycin versetzt und steril filtriert. Zur Durchführung einer Glukosereduktion wurde DMEM Flüssigmedium ohne Glukose (*Genaxxon bioscience*) verwendet, das ebenfalls mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin versehen wurde und dem bei Bedarf verschiedene Mengen D-Glukose zugegeben wurden.

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	KNF Neuberger
Analysenwaage	Sartorius
Autoklaven	Adolf Wolf SANOclav, Systec
Binokular	Carl Zeiss
Brutschränke	Binder
Detektionssystem (Odyssey Fc)	LI-COR Biosciences
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	BD Biosciences
Eismaschine	Scotsman Ice Systems
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss
Folienschweißgerät	TEW

Gefrierschrank (-20 °C)	Robert Bosch
Gefrierschrank (-80 °C)	Binder
Gelelektrophoresekammer	Hoefer
Heißluftsterilisator	Heraeus
Heizblock	Labnet International
Kühlschrank (4 °C)	Siemens
Laborschüttler	Heidolph Instruments, Edmund Bühler
Lichtmikroskop	Leitz
Magnetrührer	Heidolph Instruments
Mikroplattenleser	Labexim Products
Multipette	Eppendorf
Netzteile für Gelelektrophorese, Tank-Blot	Life Technologies, Pharmacia
pH-Meter	Hanna Instruments
Pipetten	Brand, Carl Roth
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Präzisionswaage	Kern & Sohn
Pumpe für Sterilfiltration	KNF Neuberger
Röntgenbestrahlungseinheit (Xstrahl RS225)	Gulmay Medical
Rotationsmischer	Life Technologies
Spiegelreflexkamera	Canon
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik
Tank-Blot-System	Peqlab Biotechnologie
Ultraschallgenerator und Sonde	Branson Sonic Power Company
Vortexmischer	UniEquip
Wasserbad	Julabo
Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal	Assistent
Zentrifugen	Andreas Hettich

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Combitips	Eppendorf
Culture Slides (4 Well)	BD Falcon
Deckgläser (24 x 50 mm)	R. Langenbrinck
Druckfiltrationseinheit (0,2 µm)	Sarstedt
Einfriergefäße (1,8 ml)	Nunc
Mikroliterspritze	Exmire
Multiwell-Platten (96 Well)	Greiner Bio-One, BD Falcon
Nitril-Handschuhe	Abena
Nitrocellulose Blotting Membran (0,2 µm)	GE Healthcare
Pasteurpipetten	Wilhelm Ulbrich
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter (20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Greiner Bio-One
Rundboden-Röhrchen	BD Falcon
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar

Skalpell	Feather
Vakuum-Filtrationssystem	Merck Millipore
Whatman CHR Papier (3 mm)	GE Healthcare
Zellkulturflaschen (T12,5, T25, T75)	BD Falcon
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm)	BD Falcon
Zellschaber	Costar

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1), 30 %	Carl Roth
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
Bromphenolblau	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
D-Glukose	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na_2HPO_4 x 2 H_2O)	AppliChem
Eisessig	VWR
Ethanol	SAV Liquid Production
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech
Glycerin	AppliChem
Glycin	Carl Roth
Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	VWR
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth
Methanol	VWR
Molekulargewichtsmarker	Bio-Rad Laboratories, LI-COR Biosciences
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, VWR
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Biochrom
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Nonidet P40 (NP40)	AppliChem
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl), 37 %	Carl Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris Base	Sigma-Aldrich
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	AppliChem
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich
Tween-20	Carl Roth
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories

2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Coomassie Blau-Färbelösung	0,5 g Coomassie Brilliant Blue G250 200 ml Methanol 75 ml Eisessig ad 1 l H_2O_{dest}
Ladepuffer (2 x)	20 ml Glycerin 2 g SDS 10 mg Bromphenolblau 25 ml Sammelgelpuffer (4 x) ad 95 ml H_2O_{dest} 5 % 2-Mercaptoethanol vor Gebrauch zugeben
Laufpuffer	30 g Tris Base 144 g Glycin 5 g SDS ad 5 l H_2O_{dest}
Lysepuffer, pH 8,0	1 ml NP40 0,87 g NaCl 0,6 g Tris Base ad 100 ml H_2O_{dest} Pro 10 ml Lysepuffer: Je 100 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 bzw. 3 und ½ Tablette Protease Inhibitor Cocktail vor Gebrauch zugeben
PBS, pH 7,4	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O 0,2 g KH_2PO_4 ad 1 l H_2O_{dest}
Puffer A	100 µl 1 M HEPES, pH 7,9 40 µl 2,5 M KCl 12 µl 0,5 M EDTA ad 10 ml H_2O_{dest} Je 100 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 bzw. 3 und ½ Tablette Protease Inhibitor Cocktail vor Gebrauch zugeben
Sammelgelpuffer (4 x), pH 6,8	30,3 g Tris Base 2 g SDS ad 500 ml H_2O_{dest}

Strippingpuffer, pH 2,2	4,5 g Glycin 0,3 g SDS 3 ml Tween-20 ad 300 ml H_2O_{dest}
Transferpuffer	46,4 g Tris Base 23,2 g Glycin 2,96 g SDS 1,6 l Methanol ad 8 l H_2O_{dest}
Trenngelpuffer (4 x), pH 8,8	36,34 g Tris Base 0,8 g SDS ad 200 ml H_2O_{dest}
Waschpuffer (TBST), pH 7,5	3,15 g Tris-HCl 11,69 g NaCl 2 ml Tween-20 ad 2 l H_2O_{dest}

2.1.6 Kits

Kit	Hersteller
Apoptosis and Necrosis Quantitation Kit	Biotium
Caspase-3 Colorimetric Assay	R&D Systems
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
EnzyChrom Glucose Assay Kit	BioAssay Systems
Human Acetyl Coenzyme A (ACA) ELISA Kit	MyBioSource
LDH Cytotoxicity Assay Kit	Cayman Chemical Company

2.1.7 Inhibitoren

Inhibitor	Spezifität	Hersteller
Chloroquin-Diphosphat	Autophagie	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Tyrosin-Phosphatasen	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Serin/Threonin-Phosphatasen	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail	Serin-, Cystein-, Metalloproteasen	Roche
Sirtinol	Klasse III Histondeacetylasen (Sirtuine)	Tocris Bioscience

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Klon	Herkunft	Typ	Konz.	Hersteller
Aktin	-	Kaninchen	pAb	1:1000	Sigma-Aldrich
P-H2AX (S139)	2F3	Maus	mAb	1:500	BioLegend
P-H2AX (S139)	-	Kaninchen	pAb	1:500	Active Motif
Histon H3	96C10	Maus	mAb	1:1000	Cell Signaling
Acetyl-Histon H3 (K9)	C5B11	Kaninchen	mAb	1:1000	Cell Signaling
Histon H4	L64C1	Maus	mAb	1:1000	Cell Signaling
Acetyl-Histon H4 (K12)	-	Kaninchen	pAb	1:1000	Cell Signaling
KAP1	20C1	Maus	mAb	1:1000	Abcam
P-KAP1 (S824)	-	Kaninchen	pAb	1:1000	Abcam
LDHA	-	Kaninchen	pAb	1:1000	Cell Signaling
P-LDHA (Y10)	-	Kaninchen	pAb	1:1000	Cell Signaling
PDH-E1α	9H9	Maus	mAb	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
P-PDH-E1α (S293)	-	Kaninchen	pAb	1:1000	Calbiochem

2.1.8.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugat	Herkunft	Typ	Konz.	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	pAb	1:500	Life Technologies
Anti-Kaninchen IgG	HRP	Esel	pAb	1:2000	GE Healthcare
Anti-Kaninchen IgG	IRDye 800CW	Ziege	pAb	1:10000	LI-COR Biosciences
Anti-Maus IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	pAb	1:500	Life Technologies
Anti-Maus IgG	HRP	Schaf	pAb	1:2000	GE Healthcare
Anti-Maus IgG	IRDye 680RD	Ziege	pAb	1:10000	LI-COR Biosciences

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und einer CO_2-Konzentration von 7 % in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Für die Arbeiten in der Zellkultur wurden ausschließlich sterile Geräte, Materialien und Lösungen verwendet, zudem erfolgten alle Zellkulturarbeiten in der Sterilbank unter Anwendung steriler Arbeitstechniken.

Um eine Infektion mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden die Zellen regelmäßig mittels 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop geprüft. Alle Versuche wurden ausschließlich mit konfluenten Zellen durchgeführt. Die normalen Fibroblasten HSF7 wurden bis zum Erreichen einer kumulativen Populationsverdopplung (*cumulative population doublings*, CPD) von 20 verwendet. Die kumulative Populationsverdopplung stellt ein Maß für das Alter der Zellen dar und wird aus der Summe aller Populationsverdopplungen (*population doublings*, PD) seit der primären Kultivierung der Zellen *in vitro* gebildet. Die Anzahl der Populationsverdopplungen pro Passage wurde dabei wie folgt bestimmt:

$$PD = \frac{lnN - lnN_0}{ln2}$$

wobei: N = Zellzahl bei Zellernte

N_0 = Zellzahl bei Zellaussaat

2.2.2 Durchführung des Glukoseentzugs

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen für die Experimente in dem auch für die Erhaltkulturen verwendeten Zellkulturmedium mit 4,5 g/l Glukose ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 90-100 % kultiviert. Zur Durchführung des Glukoseentzugs wurden die Zellen zunächst 1- bis 2-mal mit PBS gewaschen, wobei dieses jeweils für etwa 30-60 s auf den Zellen belassen wurde, anschließend wurde glukosefreies DMEM zugegeben, das 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin enthielt. Dieses im Folgenden als „glukosefreies Medium“ oder „DMEM ohne Glukose“ bezeichnete Medium war jedoch nicht vollkommen frei von Glukose, da diese in einer Konzentration von etwa 1 g/l im FCS vorhanden war. Somit enthielt das für den Glukoseentzug verwendete Medium einen Glukosegehalt von 0,1 g/l, der durch die Zugabe von 10 % FCS zustande kam. Als Referenz wurden bei jedem Experiment Kontrollzellen mitgeführt, die genau gleich behandelt wurden wie die Zellen mit Glukoseentzug, statt dem glukosefreien Medium jedoch glukosehaltiges Medium erhielten. Dieses wurde durch die Zugabe von 4,5 g/l Glukose zu glukosefreiem DMEM hergestellt und ebenfalls mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin versetzt. Auf die gleiche Weise wurde auch das für die Glukosereduktion verwendete Medium hergestellt, wobei hier eine Zugabe von 1,0 g/l, 0,5 g/l oder 0,2 g/l Glukose erfolgte. Die Dauer des Glukoseentzugs variierte in Abhängigkeit vom Experiment und wird daher bei jedem Versuch extra angegeben.

2.2.3 Bestrahlung der Zellen

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mittels der Röntgenbestrahlungseinheit Xstrahl RS225 mit einer Dosisleistung von 1,06 Gy/min bei 37 °C. Hierbei wurde eine Röhrenspannung von 200 kV sowie ein Röhrenstrom von 15 mA verwendet. Zur Absorption der niederenergetischen Anteile der Strahlung wurde ein 0,5 mm dicker Röntgenfilter aus Kupfer eingesetzt.

2.2.4 Proliferationsassay

Zur Untersuchung des Zellwachstums unter normalen Glukosebedingungen und dessen Beeinflussung durch einen Glukoseentzug wurden Proliferationsassays mit A549, FaDu und HSF7 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden 300 000 Zellen jeder Zelllinie in T12,5-Zellkulturflaschen entweder in DMEM mit 4,5 g/l Glukose oder in DMEM ohne Glukose ausgesät. 1-4 Tage nach der Zellaussaat wurde die Anzahl der Zellen täglich mithilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt, bei den HSF7 Zellen erfolgte die Zellzahlbestimmung zusätzlich auch an den Tagen 7, 8 und 9 nach Aussaat der Zellen. Der Versuch wurde für A549, FaDu und HSF7 jeweils in 3 unabhängigen Experimenten mit je einem Ansatz pro Bedingung wiederholt und die Mittelwerte der Zellzahlen ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) wurden grafisch dargestellt. Mittels der Software GraphPad Prism (*GraphPad Software*) wurden die Daten der Zellen mit und ohne Glukose für A549 und FaDu jeweils exponentiell und für HSF7 jeweils sigmoidal gefittet. Die entsprechenden Kurven wurden ebenfalls grafisch abgebildet. Anhand dieser Kurven wurden mithilfe von GraphPad Prism die Verdopplungszeiten der Zellen mit und ohne Glukose berechnet. Hierbei diente bei den A549 und FaDu Zellen der gesamte Untersuchungszeitraum von 4 Tagen als Berechnungsgrundlage, während bei den HSF7 Zellen nur die Phase des exponentiellen Wachstums bis Tag 3 nach der Zellaussaat für die Berechnung der Verdopplungszeit herangezogen wurde. Das exponentielle Wachstum der Zellen wurde durch folgendes Modell beschrieben:

$$\boldsymbol{y(x) = y(0) \cdot e^{kx}}$$

wobei: y(x) = Zellzahl zum Zeitpunkt x
y(0) = Zellzahl zum Zeitpunkt x = 0
k = Wachstumskonstante

Hieraus errechnete sich die Verdopplungszeit wie folgt:

$$Verdopplungszeit = \frac{\ln(2)}{k}$$

Der Quotient aus der Verdopplungszeit der Zellen ohne Glukose und der Verdopplungszeit der Zellen mit Glukose wurde als Maß für die antiproliferative Wirkung des Glukoseentzugs herangezogen.

2.2.5 Fotografie lebender Zellen

Um das Überleben der Zellen in glukosehaltigem und glukosefreiem Medium zu dokumentieren, wurden Fotografien lebender Zellen erstellt. Hierzu wurden zunächst jeweils 150 000 Zellen A549, 200 000 Zellen FaDu und 300 000 Zellen HSF7 in T12,5-Zellkulturflaschen in normalem Zellkulturmedium ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz erfolgte der Wechsel zu glukosefreiem Medium, die Kontrollen erhielten DMEM mit 4,5 g/l Glukose. Direkt vor dem Mediumwechsel sowie 24 h, 48 h, 72 h und 96 h danach wurden Fotos der lebenden Zellen aufgenommen. Dabei wurden für jede Bedingung jeweils Zellen der gleichen Kultur über den Verlauf von 5 Tagen fotografiert. Die Aufnahmen erfolgten bei 10-facher Vergrößerung an einem Mikroskop mit angeschlossenem Fotografiesystem. Pro Bedingung und Tag wurde jeweils ein repräsentatives Foto ausgewählt und abgebildet.

2.2.6 Messung von Apoptose

Die Messung der Apoptose erfolgte durch die kolorimetrische Bestimmung der Caspase 3-Aktivität unter Verwendung eines Kits der Firma *R&D Systems*. Die Caspase 3 gehört zu den Effektorcaspasen, die als inaktive Procaspasen in der Zelle vorliegen und im Rahmen apoptoseassoziierter Signalkaskaden von sogenannten Initiatorcaspasen gespalten und damit aktiviert werden. Nach ihrer Aktivierung spalten die Effektorcaspasen wiederum eine Vielzahl zellulärer Proteine, wodurch verschiedene Prozesse in der Zelle ausgelöst werden, die schließlich zum Zelltod durch Apoptose führen (McIlwain et al. 2013). Dabei nimmt die Caspase 3 eine Schlüsselrolle im Rahmen der Apoptose ein (Nicholson et al. 1995), weshalb eine Erhöhung ihrer enzymatischen Aktivität als Marker für den apoptotischen Zelltod verwendet werden kann. Das Prinzip des eingesetzten Tests beruht auf der Verwendung eines Caspase 3 spezifischen Peptidsubstrats, an das das Chromophor p-Nitroanilin (pNA) gekoppelt

ist. Nach Aktivierung der Caspase 3 im Rahmen apoptotischer Prozesse kommt es zur Hydrolyse des Substrats, was zu einer Freisetzung des p-Nitroanilins führt. Die Enzymaktivität der Caspase 3 ist dabei proportional zur Menge des freigesetzten p-Nitroanilins, welche bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Zur Durchführung des Experiments wurden A549 und FaDu Zellen in definierter Zellzahl in 6 cm-Zellkulturschalen ausgesät und nahezu bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel zu glukosefreiem Medium bzw. bei den Kontrollen zu Medium mit 4,5 g/l Glukose. 24 h, 48 h und 72 h nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen jeweils mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt und jeweils 24 h nach der ersten, der zweiten und der dritten Fraktion wurden Zellen für den Assay geerntet. Hierzu wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers im Medium vom Boden der Zellkulturschale abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde in 50 µl (A549) bzw. 100 µl (FaDu) Lysepuffer (aus dem Kit) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (3500 rpm, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur Durchführung des Caspase 3 Assays bei -80 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurde jeder Ansatz je nach Versuch durch Zugabe von 20 µl bzw. 50 µl Lysepuffer verdünnt, um ein ausreichendes Probenvolumen zu erhalten, dann wurden je 50 µl der Probe in den Assay eingesetzt, wobei eine Doppelbestimmung erfolgte. Der Assay wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Parallel wurde die Proteinkonzentration jeder Probe bestimmt (Kapitel 2.2.12 Western Blot, Proteinbestimmung). Zur Auswertung des Experiments wurde die am Mikroplattenleser bei 405 nm gemessene optische Dichte durch die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe dividiert, anschließend wurden die Daten auf den Wert der unbestrahlten Kontrolle mit 4,5 g/l Glukose, der 48 h nach dem Mediumwechsel gemessen wurde, normalisiert, wobei dieser Wert gleich 1 gesetzt wurde. Die Mittelwerte ± SEM der normalisierten Daten aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2 technischen Replikaten wurden grafisch dargestellt.

2.2.7 Messung von Nekrose

Die Messung der Nekrose erfolgte mittels des LDH Zytotoxizitätsassays unter Verwendung eines Kits der Firma *Cayman Chemical Company*. Im Rahmen der Nekrose kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Plasmamembran, wodurch intrazelluläre Substanzen in die

Umgebung freigesetzt werden, darunter auch das cytoplasmatische Enzym LDH. Eine Messung deren Aktivität im Zellkulturmedium erlaubt Rückschlüsse über die Integrität der Zellmembran und somit über den Grad der Zellschädigung. Im LDH Zytotoxizitätsassay erfolgt die Bestimmung der LDH-Aktivität in zwei Schritten (Abb. 2.1). Im ersten Schritt katalysiert die LDH die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wobei NAD^+ (oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) zu $NADH/H^+$ reduziert wird. Im zweiten Schritt nutzt der im Testreagenz enthaltene Katalysator Diaphorase das gebildete $NADH/H^+$, um das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zum roten Formazansalz zu reduzieren, wobei $NADH/H^+$ zu NAD^+ umgesetzt wird. Die Menge des gebildeten Formazansalzes kann photometrisch bestimmt werden und ist proportional zur Menge der LDH im Zellkulturmedium. Diese wiederum korreliert mit dem Ausmaß der Zellschädigung.

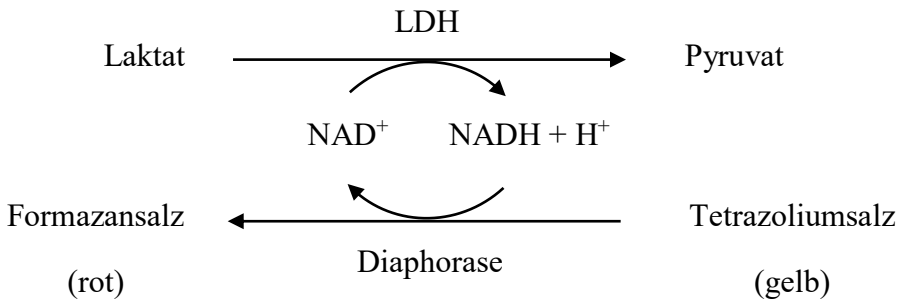


Abb. 2.1: Reaktionsmechanismus des LDH Zytotoxizitätsassays. Im ersten Schritt katalysiert die LDH die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wobei NAD^+ zu $NADH/H^+$ reduziert wird. Im zweiten Schritt nutzt der Katalysator Diaphorase das gebildete $NADH/H^+$, um das gelbe Tetrazoliumsalz zum roten Formazansalz zu reduzieren.

Für den Assay wurden A549 und FaDu Zellen in definierter Zahl in 6 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Als die Zellen nahezu konfluent waren, erfolgte ein Mediumwechsel zu glukosefreiem Medium, die Kontrollen erhielten DMEM mit 4,5 g/l Glukose. Anschließend wurden die Zellen fraktioniert bestrahlt, wobei die 3 Fraktionen à 2 Gy 24 h, 48 h und 72 h nach dem Mediumwechsel erteilt wurden. Jeweils 24 h nach der ersten, der zweiten und der dritten Fraktion wurden Proben für den Assay genommen. Hierzu wurde das Medium von den Zellen abgenommen, zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, 4 °C) und der Überstand bis zur Durchführung des Assays bei -80 °C eingefroren. Zugleich wurden Lysate der Zellen hergestellt, bei -20 °C eingefroren und parallel zur Durchführung des LDH Zytotoxizitätsassays für die Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen (Kapitel 2.2.12 Western Blot, Proteinbestimmung). Der LDH Zytotoxizitätsassay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei von

jeder Probe 100 µl pro Well in einer Doppelbestimmung eingesetzt wurden. Bei Bedarf wurden die Proben 1:2 oder 1:4 verdünnt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte am Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von 492 nm. Die LDH-Aktivität jeder Probe wurde aus der gemessenen optischen Dichte unter Verwendung der Standardkurve berechnet und gegebenenfalls mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Anschließend wurde die LDH-Aktivität durch die Proteinkonzentration der Probe dividiert. Zur relativen Darstellung wurde der Wert der unbestrahlten Kontrolle mit 4,5 g/l Glukose, der 48 h nach dem Mediumwechsel gemessen wurde, gleich 1 gesetzt und alle Daten wurden auf diese Kontrolle normalisiert. Schließlich wurden die Mittelwerte ± SEM von 6 Datenpunkten aus 3 unabhängigen Experimenten für A549 und FaDu berechnet und jeweils in einer Grafik abgebildet.

2.2.8 Bestimmung des Anteils vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen

Zur Ermittlung des prozentualen Anteils vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Durchführung eines Glukoseentzugs sowie einer Strahlenbehandlung wurde ein Kit der Firma *Biotium* verwendet. Dieses nutzt morphologische Veränderungen der Zellen, die im Rahmen der Apoptose oder Nekrose auftreten, um entsprechende Zellen spezifisch anzufärben und mittels Durchflusszytometrie zu detektieren. Zu den frühen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen zählt der Verlust der Asymmetrie der Plasmamembran, wobei deren Integrität zunächst erhalten bleibt. Hierbei kommt es zu einer Translokation von Phosphatidylserin, einem Phospholipid, das normalerweise nur auf der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran vorzufinden ist, auf die Außenseite der Membran (Martin et al. 1995). Dies ermöglicht die Bindung des phospholipidbindenden Proteins Annexin V, welches eine hohe Affinität für Phosphatidylserin besitzt. Durch die Konjugation von Annexin V mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) können apoptotische Zellen mittels Durchflusszytometrie detektiert werden. Ein charakteristisches morphologisches Merkmal nekrotischer Zellen ist der frühe Verlust der Membranintegrität (Rock & Kono 2008). Dies ermöglicht es dem nicht-membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff Ethidium Homodimer III (EthD-III) in die Zelle einzudringen und mit hoher Affinität an die DNA zu binden. Durch die erhöhte Durchlässigkeit der Membran kann jedoch auch FITC-konjugiertes Annexin V in die Zelle gelangen und an Phosphatidylserin, das sich in der Innenseite der Plasmamembran befindet, binden. Somit sind nekrotische Zellen im Falle einer Annexin V-FITC/EthD-III-Doppelfärbung positiv für beide Farbstoffe, während apoptotische Zellen mit bestehender Membranintegrität unter diesen Bedingungen ausschließlich positiv für Annexin V-FITC sind.

Eine solche Doppelfärbung erlaubt schließlich auch die Bestimmung des Anteils vitaler Zellen in einer Probe, denn diese weisen aufgrund ihrer intakten Plasmamembran mit ihrem asymmetrischen Aufbau und der vorhandenen Membranintegrität weder eine Färbung für Annexin V-FITC noch für EthD-III auf.

Zur Durchführung des Versuchs wurden A549 und FaDu Zellen in definierter Zellzahl in T12,5-Zellkulturflaschen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz einem 72-stündigen Glukoseentzug unterzogen. Die Kontrollen erhielten während dieser Zeit Medium mit 4,5 g/l Glukose. Anschließend wurden die Zellen mit einer Einzeldosis von 2 Gy bestrahlt und 24 h später für den Assay geerntet. Um auch die Zellen aus dem Überstand in den Assay einzubeziehen, wurde bei der Ernte das Zellkulturmedium aufgefangen und zum Stoppen der Trypsinreaktion verwendet. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4 °C) und das Zellpellet einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen nach dem Protokoll des Herstellers mit Annexin V-FITC und EthD-III gefärbt und sodann durchflusszytometrisch analysiert, wobei jede Probe auf die Messung von 10 000 Zellen innerhalb des festgelegten Gates standardisiert wurde. Die Einstufung der Zellen als vital, apoptotisch oder nekrotisch sowie die Bestimmung deren prozentualer Anteile in jeder Probe erfolgte schließlich anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Annexin V-FITC und EthD-III. Der Versuch wurde sowohl für A549 als auch für FaDu Zellen in zwei unabhängigen Experimenten wiederholt und die Mittelwerte ± SEM der prozentualen Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen wurden grafisch dargestellt.

2.2.9 Messung des Glukoseverbrauchs

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Zellkulturmedium erfolgte unter Verwendung eines Kits der Firma *BioAssay Systems*. Hierbei kommt ein Testreagenz zum Einsatz, das die Oxidation der Glukose durch das Enzym Glukoseoxidase an eine Farbreaktion koppelt. Die Farbintensität des gebildeten Reaktionsprodukts kann bei 570 nm photometrisch bestimmt werden und ist direkt proportional zur Glukosekonzentration der Probe.

Für den Versuch wurden A549 und FaDu Zellen in definierter Zellzahl in T12,5-Zellkulturflaschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Es folgte ein Wechsel zu frischem Medium mit 4,5 g/l Glukose, das auf der Basis des glukosefreien DMEM hergestellt wurde. Direkt nach Erhalt des frischen Mediums wurden die Zellen mit 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt und 48 h später erfolgte die Probennahme zur Bestimmung der Glukosekonzentration im

Zellkulturmedium. Hierfür wurde das gesamte Medium von den Zellen abgenommen und zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, 4 °C), danach wurde 1 ml des Überstands bis zur Durchführung des Assays bei -80 °C eingefroren. Parallel wurden die Zellen jeder Flasche geerntet und deren Zellzahl wurde bestimmt. Zur Durchführung des Assays wurden alle Proben zunächst 1:100 in glukosefreiem DMEM, das weder FCS noch Penicillin-Streptomycin enthielt, verdünnt, dann wurden je 20 µl der verdünnten Proben in einer Doppelbestimmung in den Assay eingesetzt und deren Glukosegehalt wurde nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Zusätzlich wurde auch das kurz vor der Bestrahlung auf die Zellen gegebene Medium mit 4,5 g/l Glukose nach 1:100-Verdünnung in den Assay eingesetzt, um dessen exakten Glukosegehalt zu ermitteln. Dieser stellte die Glukosekonzentration zum Zeitpunkt der Bestrahlung dar.

Der Glukoseverbrauch (g/l), normalisiert auf die Zellzahl, wurde anhand der im Zellkulturmedium gemessenen Glukosekonzentrationen wie folgt berechnet:

$$Glukoseverbrauch = \frac{c\ (IR) - c\ (48\ h\ post\ IR)}{Zellzahl\ (48\ h\ post\ IR)}$$

wobei: c (IR) = Glukosekonzentration (g/l) im Zellkulturmedium zum Zeitpunkt der IR
c (48 h post IR) = Glukosekonzentration (g/l) im Zellkulturmedium 48 h nach IR

Der Versuch wurde für A549 und FaDu Zellen in 3 unabhängigen Experimenten mit je 2 parallelen Ansätzen pro Bedingung wiederholt und die Mittelwerte des Glukoseverbrauchs pro 10^6 Zellen ± SEM wurden grafisch dargestellt.

2.2.10 γH2AX Focus Assay

Einer der am besten charakterisierten Marker für DNA-DSBs stellt das sogenannte γH2AX dar. Werden infolge einer Bestrahlung DNA-DSBs induziert, so führt dies innerhalb von Sekunden zu einer Phosphorylierung des Histons H2AX an S139, welches sodann als γH2AX bezeichnet wird (Rogakou et al. 1998). Die Bildung von γH2AX findet dabei in Nachbarschaft zum DSB statt und erstreckt sich über einen DNA-Bereich von mehreren Megabasen. Durch eine Fluoreszenzfärbung mittels spezifischer Antikörper können diese Bereiche sichtbar gemacht werden und sind unter dem Mikroskop als γH2AX-Foci im Zellkern zu erkennen, wobei jeder Focus einen DNA-DSB repräsentiert (Rogakou et al. 1999). Die Anzahl der γH2AX-Foci wird 30-60 min nach der Bestrahlung maximal und nimmt anschließend über die Zeit ab, da die nun

stattfindende Reparatur der DSBs mit einer Dephosphorylierung von γH2AX einhergeht. Die 24 h nach der Bestrahlung verbleibenden residuellen γH2AX-Foci sind von besonderer Bedeutung, da sie Schäden markieren, die nicht repariert werden konnten und somit potenziell letal für die Zelle sind (Banath et al. 2010).

Da es in Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, während der DNA-Replikation zur Bildung sogenannter endogener DSBs kommen kann, die ohne das Vorhandensein exogener Noxen auftreten (Vilenchik & Knudson 2003), wurden ausschließlich konfluente Zellen in den γH2AX Focus Assay eingesetzt, um den Anteil replikationsbedingter γH2AX-Foci möglichst gering zu halten. Die in Culture Slides kultivierten Zellen wurden wie im Ergebnisteil des jeweiligen Versuchs beschrieben behandelt. Zu bestimmten Zeitpunkten (1 h, 6 h, 24 h) nach der Bestrahlung mit 2 Gy wurden die Zellen mit eiskaltem 70 % Ethanol fixiert und bei -20 °C aufbewahrt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde zunächst das Ethanol durch Waschen mit PBS entfernt, anschließend wurden die Zellen mit 0,1 % Triton X-100/PBS für 10 min permeabilisiert. Nach einem Waschschritt mit PBS erfolgte das Blocken unspezifischer Proteinbindungen durch Inkubation der Zellen in 3 % BSA/PBS für 30 min. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und für 1 h mit dem primären, spezifisch gegen γH2AX gerichteten Antikörper (P-H2AX (S139)) inkubiert, wobei dieser in einer 1:500-Verdünnung in 1 % BSA/PBS eingesetzt wurde. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 konjugierte Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben. Dieser wurde 1:500 in 1 % BSA/PBS verdünnt und für 1 h im Dunkeln auf den Zellen belassen. Anschließend wurde der Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen wurden in *Vectashield Mounting Medium* eingebettet. Da dieses DAPI enthielt, fand somit auch eine Markierung der DNA statt. Die Auswertung erfolgte durch die Aufnahme repräsentativer Bilder am Fluoreszenzmikroskop und anschließendes Auszählen der γH2AX-Foci pro Zellkern, wobei in Abhängigkeit vom Experiment pro Versuch und Bedingung zwischen 77 und 485 Zellkerne ausgewertet wurden. Die mittlere Anzahl an γH2AX-Foci pro Zellkern ± SEM wurde grafisch dargestellt.

2.2.11 Koloniebildungstest

Der im Jahr 1956 von Puck und Marcus (Puck & Marcus 1956) entwickelte Koloniebildungstest gilt heute als eine der wichtigsten Methoden der Strahlenbiologie, um die Strahlenempfindlichkeit von Zellen zu untersuchen. Dabei misst der Test das Überleben

einzelner Zellen nach Bestrahlung anhand ihrer Fähigkeit, sich mehrfach zu teilen und dadurch Kolonien zu bilden, die mindestens 50 Tochterzellen umfassen. Neben diesen sogenannten klonogenen Zellen gibt es jedoch auch Zellen, die ihre Koloniebildungsfähigkeit infolge der Bestrahlung verlieren und somit dem klonogenen Zelltod unterliegen (Herrmann et al. 2006). Daher kann durch die Bestimmung des Anteils überlebender klonogener Zellen nach Bestrahlung eine Aussage über die zelluläre Strahlenempfindlichkeit getroffen werden.

Um den Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen im Vergleich zu normalen Fibroblasten zu untersuchen, wurden Koloniebildungstests mit konfluenten A549, FaDu und HSF7 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst in T12,5-Zellkulturflaschen kultiviert und nach 72-stündiger Inkubation in DMEM ohne Glukose bzw. DMEM mit 4,5 g/l Glukose mit einer Dosis von 1 Gy, 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt. Zusätzlich wurden unbestrahlte Kontrollen mitgeführt. 24 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen geerntet und es wurden je 500 Zellen A549, 1000 Zellen FaDu und 1300 Zellen HSF7 in 10 cm-Zellkulturschalen in Medium mit 4,5 g/l Glukose, 20 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin ausgesät. Hierbei wurden pro Bedingung 3 technische Replikate angesetzt. Nach 10-14 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die entstandenen Zellklone mittels 70 % Ethanol fixiert und anschließend durch Färbung mit Coomassie Blau-Lösung sichtbar gemacht. Mithilfe eines Binokulars wurden die Kolonien gezählt, die aus mindestens 50 Zellen bestanden und somit einen Hinweis auf die überlebenden klonogenen Zellen gaben.

Da auch in den unbestrahlten Kontrollen üblicherweise nicht alle ausgesäten Zellen zu einer Kolonie heranwachsen, wurde für diese die Koloniebildungseffizienz (*plating efficiency,* PE) berechnet. Diese gibt den Anteil der ausgesäten Zellen an, die eine Kolonie mit mindestens 50 Tochterzellen bilden. Die PE wurde anhand folgender Formel ermittelt (Franken et al. 2006):

$$PE = \frac{Anzahl\ gezählter\ Kolonien}{Anzahl\ ausgesäter\ Zellen}$$

Der Anteil klonogener Zellen nach Bestrahlung relativ zur unbestrahlten Kontrolle wird durch die Überlebensfraktion, die sogenannte *surviving fraction* (SF), abgebildet. Diese wurde wie folgt berechnet (Franken et al. 2006):

$$SF = \frac{Anzahl\ gezählter\ Kolonien\ nach\ IR}{Anzahl\ ausgesäter\ Zellen\ x\ PE\ der\ unbestrahlten\ Kontrolle}$$

Die Mittelwerte ± SEM der Überlebensfraktionen aus 3 (A549, HSF7) bzw. 2 (FaDu) unabhängigen Experimenten, mit jeweils 3 technischen Replikaten pro Versuch, wurden anhand von Zellüberlebenskurven grafisch dargestellt. Hierbei wurde unter Verwendung des linear-quadratischen Modells (reviewed von Franken et al. 2013) die Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Energiedosis abgebildet, wobei die Überlebensfraktion logarithmisch und die Dosis linear aufgetragen wurde. Zudem wurde für jede Zelllinie die mittlere PE ± SEM der unbestrahlten Kontrolle unter normalen und glukosefreien Bedingungen angegeben.

Als quantitatives Maß zur Beschreibung der zellulären Strahlenempfindlichkeit wurde der D_{37}-Wert herangezogen, der die Energiedosis angibt, die benötig wird, um die Überlebensfraktion auf 37 % zu reduzieren. Der Quotient aus dem D_{37}-Wert der unbehandelten Zellen und dem D_{37}-Wert der behandelten Zellen gibt den Dosis-modifizierenden Faktor (*dose-modifying factor*, DMF) an. Dabei weist ein DMF < 1 bzw. ein DMF > 1 auf einen protektiven bzw. sensitivierenden Effekt der Behandlung hin.

2.2.12 Western Blot

Herstellung von Gesamtzelllysaten

Die in 6 cm-Zellkulturschalen kultivierten und wie im entsprechenden Ergebnisteil beschrieben behandelten Zellen wurden nach Waschen mit eiskaltem PBS mit einem adäquaten Volumen Lysepuffer überschichtet und mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst. Die Zellen wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Durchführung des Versuchs für maximal einen Tag bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben bei allen weiteren Schritten auf Eis gehalten. Zur vollständigen Lyse der Zellen erfolgte eine Ultraschallbehandlung, anschließend wurden die Proben zentrifugiert (14000 rpm, 15 min, 4 °C), um die Gesamtzelllysate von den festen Zellbestandteilen zu trennen und im Überstand anzureichern. Der Überstand wurde sodann sowohl für die Proteinbestimmung als auch für die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) verwendet.

Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Gesamtzelllysate wurde kolorimetrisch mittels des DC Protein Assays der Firma *Bio-Rad Laboratories* bestimmt, wobei es sich um einen modifizierten Lowry Assay handelte. Zur Erstellung einer Eichgerade wurde BSA in definierten Konzentrationen in

Lysepuffer gelöst und als Standard verwendet. Die Durchführung erfolgte in einer 96-Well-Platte nach den Angaben des Herstellers, wobei pro Well je 5 µl Probe bzw. Standard in einer Doppelbestimmung eingesetzt wurden. Die optische Dichte wurde am Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Mithilfe der aus den Standards gewonnenen Eichgerade wurde die Proteinkonzentration der Proben anhand ihrer optischen Dichte ermittelt.

SDS-PAGE und Tank-Blotting

Die im Gesamtzelllysat enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE nach ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld aufgetrennt. Hierzu wurden je nach Versuch 80-150 µg Protein jeder Probe mit zweifachem Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen, wo sie zunächst das Sammelgel passierten, bevor die eigentliche Auftrennung des Proteingemisches im Trenngel erfolgte. Die Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel ist in Tab. 2.1 beschrieben. Neben den Proben wurde auch ein Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer unter Kühlung, wobei pro Gel eine Stromstärke von 30-35 mA angelegt wurde. Dies bewirkte eine Wanderung der Proteine von der Kathode in Richtung Anode in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse, wodurch eine Auftrennung des Proteingemisches im Gel erfolgte.

Tab. 2.1: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel für die SDS-PAGE.

	Sammelgel	Trenngel (12 %)
H_2O_{dest}	3 ml	7 ml
Sammelgelpuffer (4 x)	1,25 ml	-
Trenngelpuffer (4 x)	-	5 ml
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 30 %	0,75 ml	8 ml
APS, 10 %	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine mittels des Tank-Blot-Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dies erfolgte unter Verwendung des Transferpuffers und wurde über Nacht bei 4 °C mit einer Spannung von 24 V durchgeführt. Am nächsten Morgen wurde die Spannung für 1 h auf 36 V erhöht, bevor der Transfer beendet wurde. Um die Effizienz des Proteintransfers auf die Membran zu überprüfen, wurde diese mittels

Ponceau S-Lösung behandelt, welche Proteine reversibel anfärbt und die Proteinbanden damit sichtbar macht. Sollten Proteine unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper detektiert werden (Kapitel 2.2.12 Western Blot, Immundetektion), so wurde auf eine Ponceau S-Färbung der Membran verzichtet, da diese hier einen störenden Einfluss haben kann.

Immundetektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1-5 h bei Raumtemperatur unter Schütteln in 5 % BSA/TBST inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der zu untersuchenden Proteine mittels indirekter Antikörperfärbung. Hierzu wurde zuerst ein spezifischer Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 10 min, das dem Entfernen nicht gebundener Antikörper diente, wurde die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken durchgeführt. Nicht an das Fc-Fragment des Primärantikörpers gebundene Sekundärantikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit TBST für jeweils 10 min entfernt. Um die spezifische Antikörper-Protein-Bindung sichtbar zu machen, wurden Sekundärantikörper verwendet, die entweder mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) oder einem Fluoreszenzfarbstoff (IRDye) konjugiert waren. Im Falle der HRP-Konjugation wurden die ECL Western Blotting Detection Reagents verwendet, um die Proteinbanden durch eine Chemilumineszenzreaktion mithilfe des Detektionssystems Odyssey Fc zu visualisieren. Bei Verwendung der fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper war keine weitere Behandlung der Membran erforderlich, um die Proteine mittels Odyssey Fc zu detektieren. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte mittels der Software Image Studio (*LI-COR Biosciences*).

Strippen

Um die Primär- und Sekundärantikörper bei Bedarf von der Membran zu entfernen, wurde diese zweimal für je 15 min bei Raumtemperatur unter Schütteln in Strippingpuffer inkubiert. Nach Waschen mit TBST und Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % BSA/TBST konnte die Membran für eine weitere Antikörperfärbung verwendet werden.

2.2.13 Messung von Acetyl-CoA im Nukleus

Die Messung des Acetyl-CoA-Gehalts im Nukleus der Zellen erfolgte mittels eines quantitativen Sandwich-ELISA (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, *enzyme-linked immunosorbent assay*) unter Verwendung eines Kits der Firma *MyBioSource*. Das Prinzip des Tests beruht auf dem Einsatz von Mikrotiterstreifen, die mit einem spezifischen Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen, in diesem Fall Acetyl-CoA, beschichtet sind. Nach Zugabe der Probe bindet das Antigen an den Antikörper. Anschließend wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der ebenfalls spezifisch an das nachzuweisende Antigen bindet und mit dem Enzym HRP konjugiert ist. Dieses bildet nach Hinzufügen des Substrats ein farbiges Reaktionsprodukt, das photometrisch bei 450 nm gemessen werden kann. Dabei korreliert die optische Dichte mit der Enzymaktivität der HRP, welche wiederum proportional zur Menge des gebundenen Antigens ist.

Die Messung von nukleärem Acetyl-CoA wurde sowohl in den Tumorzellen A549 als auch in den normalen Fibroblasten HSF7 durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert, woraufhin sie einen Wechsel zu glukosefreiem Medium oder Medium mit 4,5 g/l Glukose erhielten. 24 h nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt und 6 h, 13 h und 24 h danach einer Kernpräparation unterzogen, bei der die Kernfraktion von der Cytoplasmafraktion getrennt wurde. Zudem wurden unbestrahlte Kontrollen mitgeführt, bei denen die Kernpräparation zum Zeitpunkt der Bestrahlung oder 24 h danach durchgeführt wurde. Parallel zur Kernpräparation erfolgte die Bestimmung der Zellzahl anhand von extra dafür angesetzten Zellkulturen, die die gleiche Behandlung erhielten wie die eigentlichen Proben.

Für die Kernpräparation, deren Durchführung auf Eis erfolgte, wurden die Zellen nach Waschen mit PBS mit 600 µl Puffer A überschichtet, mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Es folgte die Zugabe von 60 µl 10 % NP40/H_2O_{dest}, woraufhin die Proben für 10 s gevortext und sofort danach zentrifugiert (14000 rpm, 2 min, 4 °C) wurden. Das Zellpellet, das die Kernfraktion enthielt, wurde nach Waschen mit PBS in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Bestimmung des Acetyl-CoA-Gehalts wurde das Zellpellet zunächst in 120 µl PBS aufgenommen, anschließend wurden die Kerne mittels Ultraschallbehandlung lysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 5 min, 4 °C) wurden 50 µl des Überstands jeder Probe in einer Doppelbestimmung in den ELISA eingesetzt, welcher nach den Angaben des

Herstellers durchgeführt wurde. Neben den Proben wurden auch Standards mit definierter Acetyl-CoA-Konzentration mitgeführt, anhand deren optischer Dichte eine Eichkurve erstellt wurde, die zur Bestimmung der Acetyl-CoA-Konzentration der Proben herangezogen werden sollte. Da die Messwerte der Proben jedoch unterhalb der optischen Dichte des Standards mit der geringsten Acetyl-CoA-Konzentration lagen, wurde die optische Dichte, normalisiert auf die Zellzahl, als Indiz für den Acetyl-CoA-Gehalt der Proben verwendet. Die Mittelwerte ± SEM von 4 Datenpunkten aus je 2 unabhängigen Experimenten für A549 und HSF7 wurden grafisch dargestellt.

2.2.14 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM der aus mehreren unabhängigen Experimenten gewonnenen Werte dargestellt. Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten aufzudecken, wurde der Student's *t*-Test angewandt, wobei die Analyse mittels der Software SigmaPlot (*Systat Software*) erfolgte. Wurden mehr als zwei Mittelwerte verglichen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA), gefolgt von post hoc *t*-Tests, mittels der Software SPSS Statistics (*IBM*) durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau der post hoc Vergleiche nach Bonferroni korrigiert wurde. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Proliferation, Überleben und Zelltod von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Glukoseentzug mit oder ohne Bestrahlung

Glukose stellt für normale Zellen wie auch für Tumorzellen eine wichtige Energiequelle dar. Da Tumorzellen jedoch aufgrund des Warburg-Effekts nur wenig Energie in Form von ATP aus einem Molekül Glukose gewinnen können, sind sie auf eine hohe Zufuhr dieses Nährstoffs angewiesen, um ausreichend mit Energie versorgt zu werden. Normale Zellen dagegen verstoffwechseln die Glukose unter aeroben Bedingungen mit deutlich größerer Energieausbeute durch Oxidation in den Mitochondrien (Vander Heiden et al. 2009) und weisen im Vergleich zu Tumorzellen eine sehr viel geringere Glukoseaufnahme auf (Dittmann et al. 2013). Zusätzlich zu ihrer Funktion als Energielieferant dient die Glukose jedoch auch als wichtige Vorstufe für die Synthese von Makromolekülen, welche für die Zellproliferation benötigt werden (Vander Heiden et al. 2009). Ein Entzug der Glukose könnte somit sowohl den Energiehaushalt der Zellen als auch die Syntheseleistung von Makromolekülen beeinflussen, was sich wiederum auf die Proliferationsfähigkeit sowie das Überleben der Zellen auswirken könnte. Diese Hypothese wurde nachfolgend überprüft, wobei der Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen im Vergleich zu normalen Fibroblasten untersucht wurde. In Tumorzellen wurde zudem der Zelltod durch Apoptose und Nekrose infolge eines Glukoseentzugs, einer Bestrahlung sowie einer Kombination beider Behandlungen analysiert.

3.1.1 Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Proliferation von Tumorzellen und normalen Fibroblasten

Um zu untersuchen, ob das Wachstum von Tumorzellen und normalen Fibroblasten durch einen Glukoseentzug beeinflusst wird, wurden A549, FaDu und HSF7 Zellen in einer definierten Zellzahl in DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose ausgesät. In den darauffolgenden 4 Tagen wurde bei jeder Zelllinie täglich die Zellzahl bestimmt, bei den HSF7 Zellen erfolgte die Zellzahlbestimmung zusätzlich auch an den Tagen 7-9 nach der Zellaussaat. Basierend auf diesen Daten wurde für jede Zelllinie die Verdopplungszeit in glukosehaltigem und glukosefreiem Medium ermittelt.

In Abb. 3.1 ist zu erkennen, dass sich die Tumorzellen A549 und FaDu unter normalen Glukosebedingungen bis 4 Tage nach der Zellaussaat in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Hierbei zeigte sich, dass die A549 Zellen im Vergleich zu den FaDu Zellen etwas schneller wuchsen, was auch anhand der Verdopplungszeiten (Tab. 3.1) ersichtlich wird. Die Proliferationskurven der A549 und FaDu Zellen unterschieden sich hierbei signifikant. Wurde ein Glukoseentzug durchgeführt, so beeinträchtigte dies die Proliferation beider Tumorzelllinien signifikant gegenüber den Zellen, die glukosehaltiges Medium erhalten hatten. Dieser zytostatische Effekt war bei FaDu stärker ausgeprägt als bei A549. Somit erhöhte sich die Verdopplungszeit bei den FaDu Zellen unter Glukoseentzug auf mehr als das 8-Fache gegenüber den Zellen mit Glukose, während bei den A549 Zellen nur ein Anstieg auf weniger als das 3-Fache zu beobachten war (Tab. 3.1). Betrachtet man die Proliferationskurven der normalen Fibroblasten HSF7 (Abb. 3.1), so ist zu sehen, dass deren Wachstum zunächst durch eine exponentielle Wachstumsphase bis Tag 3 nach der Zellaussaat gekennzeichnet war, welche anschließend in ein Plateau mit konstanter Zellzahl überging. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Proliferationskurven der Zellen mit und ohne Glukose festgestellt werden und auch die Verdopplungszeiten waren unter beiden Bedingungen nahezu identisch (Tab. 3.1). Dies zeigt, dass die Proliferation der normalen Fibroblasten nicht durch einen Glukoseentzug beeinträchtigt wurde. Daneben wird aus Abb. 3.1 beim Vergleich der Proliferationskurven ersichtlich, dass die normalen Fibroblasten HSF7 signifikant langsamer wuchsen als die A549 und FaDu Tumorzellen unter normalen Glukosebedingungen, was auch anhand der höheren Verdopplungszeit der HSF7 Zellen im Vergleich zu den Verdopplungszeiten der Tumorzellen deutlich wird (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Verdopplungszeiten von A549, FaDu und HSF7 Zellen in DMEM mit und ohne Glukose. Gezeigt sind die von der Software GraphPad Prism ermittelten Verdopplungszeiten, die anhand der in Abb. 3.1 dargestellten Proliferationskurven berechnet wurden. Hierbei diente bei A549 und FaDu das Zellwachstum über 4 Tage als Berechnungsgrundlage, bei HSF7 wurde nur das exponentielle Zellwachstum bis Tag 3 für die Berechnung berücksichtigt. Der Quotient gibt die Verdopplungszeit der Zellen ohne Glukose dividiert durch die Verdopplungszeit der Zellen mit Glukose an.

	Verdopplungszeit [d]	Quotient
A549, DMEM 4,5 g/l Glukose	1,114	2,73
A549, DMEM ohne Glukose	3,044	
FaDu, DMEM 4,5 g/l Glukose	1,310	8,31
FaDu, DMEM ohne Glukose	10,890	
HSF7, DMEM 4,5 g/l Glukose	2,070	0,95
HSF7, DMEM ohne Glukose	1,959	

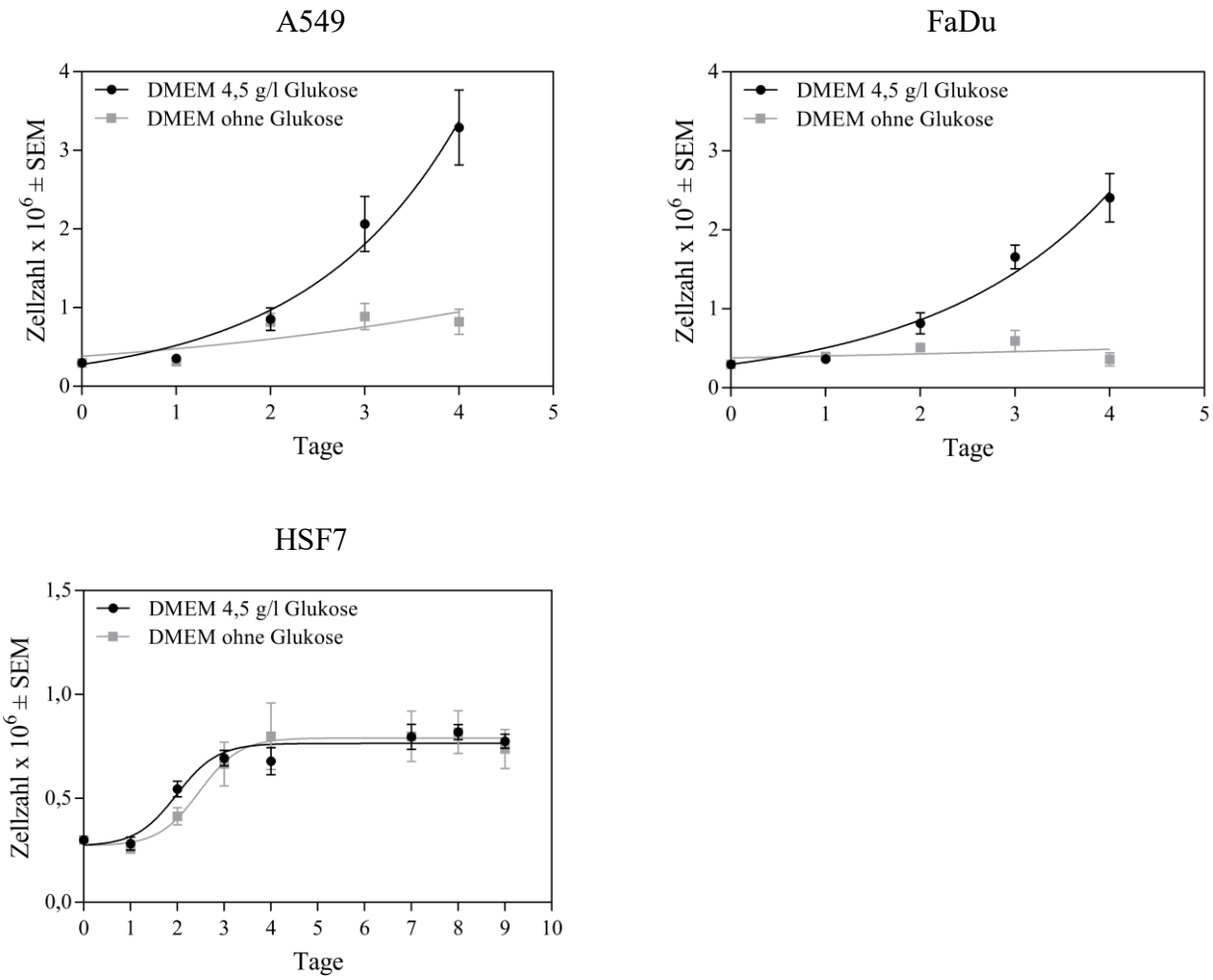


Abb. 3.1: Proliferationskurven von A549, FaDu und HSF7 Zellen in DMEM mit und ohne Glukose. Von jeder Zelllinie wurden je 300 000 Zellen in DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose ausgesät. Bis 4 Tage nach der Zellaussaat wurde täglich die Zellzahl bestimmt, bei HSF7 erfolgte die Zellzahlbestimmung zusätzlich auch an den Tagen 7-9 nach der Aussaat. Die Datenpunkte zeigen die mittlere Zellzahl x 10^6 ± SEM von je 3 unabhängigen Experimenten. Die Kurven wurden mittels der Software GraphPad Prism durch exponentielle (A549 und FaDu) bzw. sigmoidale (HSF7) Kurvenanpassung erzeugt.

3.1.2 Fotografische Dokumentation des Einflusses eines Glukoseentzugs auf das Überleben von Tumorzellen und normalen Fibroblasten

Um das Überleben konfluenter A549, FaDu und HSF7 Zellen nach einem Glukoseentzug optisch festzuhalten, wurden bis 4 Tage nach dem Mediumwechsel zu glukosefreiem bzw. glukosehaltigem Medium täglich Bilder der Zellen unter dem Mikroskop aufgenommen. Anhand der Aufnahmen (Abb. 3.2) ist zu sehen, dass die Tumorzellen A549 und FaDu unter normalen Glukosebedingungen bis Tag 4 nach dem Mediumwechsel weiter proliferierten und der Zellrasen zunehmend dichter wurde. Bei der Durchführung eines Glukoseentzugs hingegen

waren bei A549 ab dem zweiten Tag und bei FaDu schon ab dem ersten Tag nach dem Mediumwechsel viele kugelig geformte Zellen zu sehen, die sich im Prozess des Ablösens vom Zellrasen befanden. Ab Tag 3 bei A549 und Tag 2 bei FaDu waren bereits deutliche Löcher im Zellrasen zu erkennen. Dieser Prozess des Zellablösens setzte sich bei beiden Tumorzelllinien fort, so dass am vierten Tag des Glukoseentzugs bei A549 ein stark aufgelockerter Zellrasen vorzufinden war, während bei FaDu nur noch wenige kleine Gruppen adhärenter Zellen vorlagen. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass beide Tumorzelllinien mit einem Zellsterben auf den Glukoseentzug reagierten, wobei sich die FaDu Zellen als besonders sensibel erwiesen. Im Gegensatz dazu wurde das Überleben der normalen Fibroblasten, anhand optischer Merkmale betrachtet, nicht durch einen Glukoseentzug beeinflusst. So wiesen die HSF7 Zellen hinsichtlich ihrer Form und Dichte während des gesamten Beobachtungszeitraums keine Unterschiede in glukosefreiem und glukosehaltigem Medium auf.

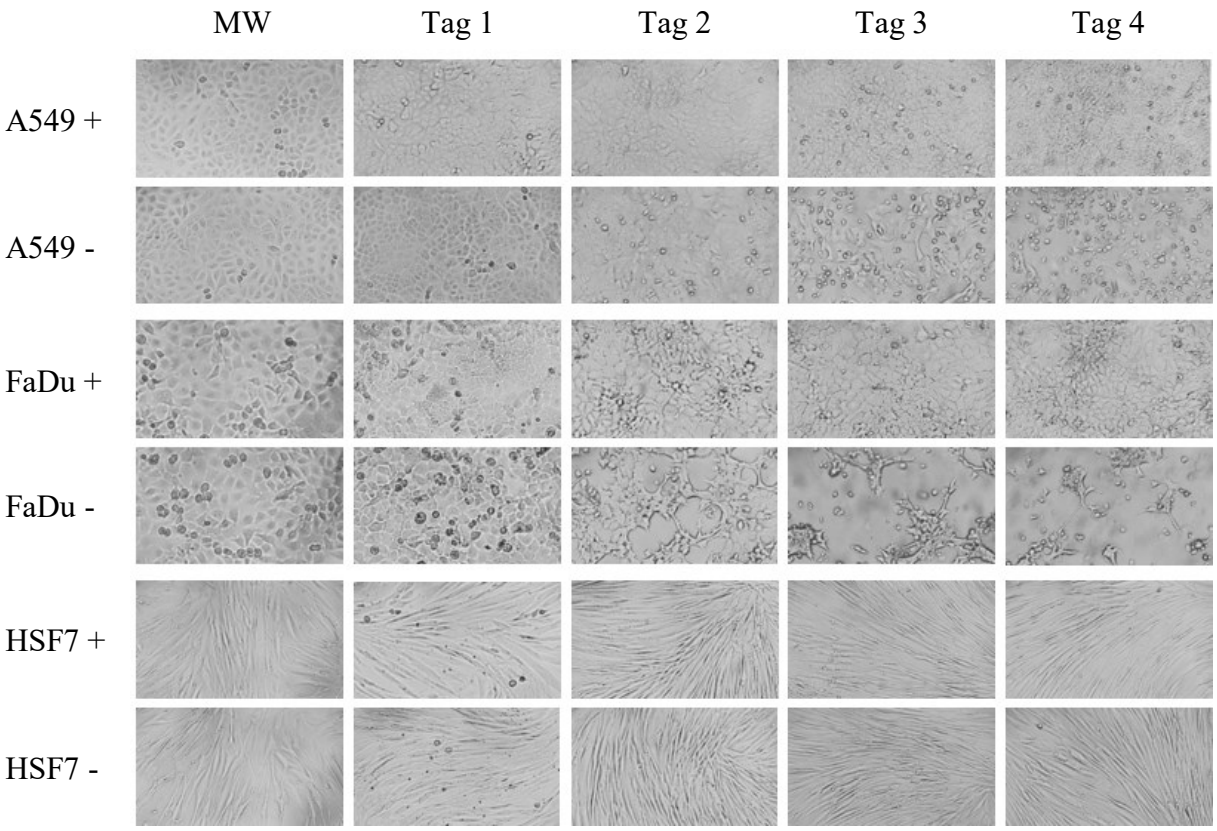


Abb. 3.2: Überleben konfluenter A549, FaDu und HSF7 Zellen nach 1-4 Tagen Glukoseentzug. Nach Kultivierung der Zellen bis zur Konfluenz erfolgte ein Mediumwechsel zu glukosefreiem Medium oder Medium mit 4,5 g/l Glukose. Direkt vor dem Mediumwechsel (MW) sowie 1 Tag, 2 Tage, 3 Tage und 4 Tage danach wurden die Zellen mit 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop fotografiert. Pro Zelllinie und Tag wird jeweils ein repräsentatives Bild der Zellen in glukosehaltigem (+) und glukosefreiem (-) Medium gezeigt.

3.1.3 Untersuchungen zum Zelltod durch Apoptose und Nekrose nach Durchführung eines Glukoseentzugs und einer Strahlenbehandlung in Tumorzellen

Nachdem anhand lichtmikroskopischer Untersuchungen gezeigt wurde, dass ein Glukoseentzug selektiv bei den Tumorzellen zum Zelltod führt (Kapitel 3.1.2), sollte nun die Art des Zelltods identifiziert werden. Hierbei wurde zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden, wobei die Messung der Apoptose durch die Bestimmung der Caspase 3-Aktivität erfolgte, während der LDH Zytotoxizitätsassay zur Messung der Nekrose verwendet wurde. Auf diese Weise wurde neben dem Einfluss eines Glukoseentzugs auch der Effekt einer fraktionierten Bestrahlung sowie einer Kombination beider Behandlungen auf die Apoptose- und Nekroseinduktion in Tumorzellen untersucht. Schließlich sollte der prozentuale Anteil apoptotischer und nekrotischer Tumorzellen nach Durchführung eines Glukoseentzugs und einer Bestrahlung ermittelt werden. Hierzu wurden A549 und FaDu Zellen, nach entsprechender Behandlung, mit Annexin V-FITC und EthD-III gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.1.3.1 Messung von Apoptose nach Glukoseentzug und fraktionierter Bestrahlung in Tumorzellen

Um die Apoptoseinduktion infolge eines Glukoseentzugs, einer fraktionierten Bestrahlung oder einer Kombination beider Behandlungen in Tumorzellen zu untersuchen, wurde die Caspase 3-Aktivität der Zellen nach entsprechender Behandlung bestimmt. Hierzu wurden A549 und FaDu Zellen nahezu bis zur Konfluenz kultiviert, woraufhin sie einen Mediumwechsel zu DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose erhielten. Jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach dem Mediumwechsel erfolgte eine Bestrahlung mit 2 Gy, wobei 24 h nach jeder Fraktion Zellen geerntet und in den Caspase 3 Assay eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse (Abb. 3.3) zeigen, dass durch einen Glukoseentzug sowohl bei A549 als auch bei FaDu Zellen Apoptose induziert wurde. Dabei war die Caspase 3-Aktivität unter glukosefreien Bedingungen zu jedem Messzeitpunkt signifikant höher als in den dazugehörigen Kontrollen mit normaler Glukosekonzentration. Die maximale Enzymaktivität wurde nach alleinigem Glukoseentzug bei beiden Zelllinien 72 h nach dem Mediumwechsel erreicht, wobei die Caspase 3-Aktivität hier gegenüber dem Wert der Kontrolle (DMEM 4,5 g/l Glukose, 0 Gy, 48 h nach dem Mediumwechsel) bei A549 im Mittel um das 1,8-Fache und bei FaDu im Mittel um das 2,9-Fache erhöht war. Die fraktionierte Bestrahlung hingegen führte unter normalen

Glukosebedingungen weder bei den A549 noch bei den FaDu Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Caspase 3-Aktivität und auch in Kombination mit einem Glukoseentzug konnte kein signifikanter Unterschied gegenüber den Zellen mit alleinigem Glukoseentzug identifiziert werden.

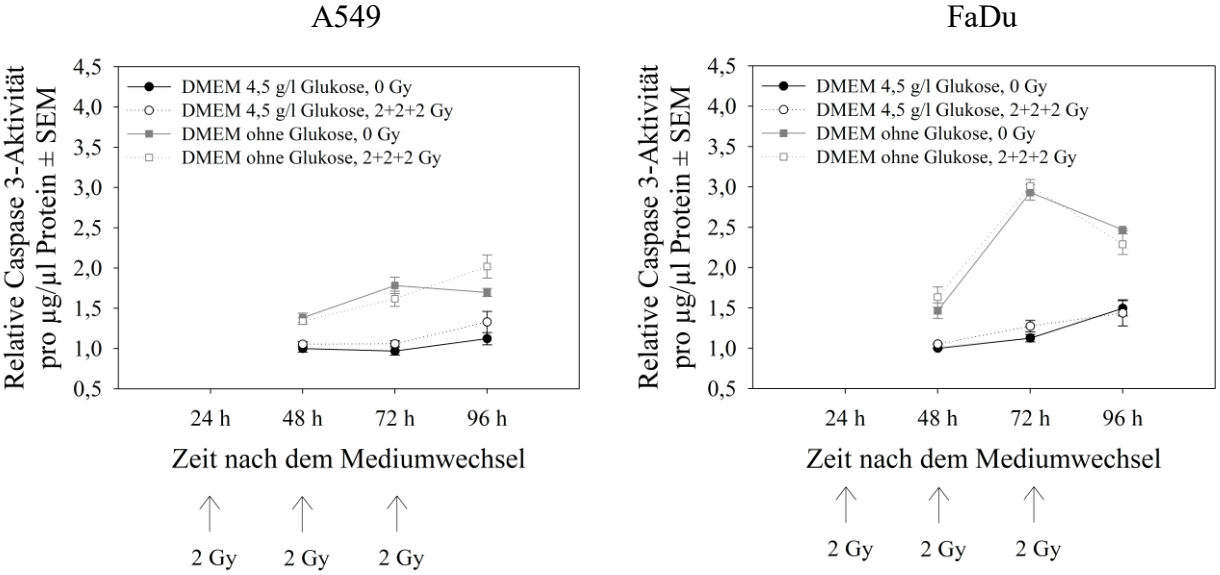


Abb. 3.3: Caspase 3-Aktivität in A549 und FaDu Zellen nach Glukoseentzug und fraktionierter Bestrahlung. Nahezu konfluente A549 und FaDu Zellen erhielten einen Mediumwechsel zu DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose. 24 h, 48 h und 72 h nach dem Mediumwechsel erfolgte jeweils eine Bestrahlung mit 2 Gy. 24 h nach jeder Fraktion wurden Zellen geerntet und deren Caspase 3-Aktivität pro µg/µl Protein wurde bestimmt. Zur relativen Darstellung wurden die Daten auf den Wert der unbestrahlten Kontrolle mit 4,5 g/l Glukose, der 48 h nach dem Mediumwechsel gemessen wurde, normalisiert. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit je 2 technischen Replikaten pro Bedingung.

3.1.3.2 Messung von Nekrose nach Glukoseentzug und fraktionierter Bestrahlung in Tumorzellen

Um den Einfluss eines Glukoseentzugs, einer fraktionierten Bestrahlung oder einer Kombination beider Behandlungen auf den Zelltod durch Nekrose in Tumorzellen zu untersuchen, wurde der LDH Zytotoxizitätsassay verwendet. Für den Versuch erhielten nahezu konfluente A549 und FaDu Zellen zunächst einen Wechsel zu DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose, bevor sie mit 3 Fraktionen à 2 Gy bestrahlt wurden. Die Bestrahlung erfolgte jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach dem Mediumwechsel und 24 h nach jeder Fraktion wurde die LDH-Aktivität im Zellkulturmedium bestimmt.

Abb. 3.4 zeigt, dass ein Glukoseentzug sowohl bei A549 als auch bei FaDu Zellen zu jedem Messzeitpunkt zu einer signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität im Zellkulturmedium führte und somit Nekrose induzierte. Dabei stieg die LDH-Aktivität mit der Dauer des Glukoseentzugs kontinuierlich an und erreichte 96 h nach dem Mediumwechsel im Vergleich zur Kontrolle (DMEM 4,5 g/l Glukose, 0 Gy, 48 h nach dem Mediumwechsel) im Mittel eine Erhöhung auf das 108-Fache bei A549 und das 95-Fache bei FaDu. Die fraktionierte Bestrahlung hingegen bewirkte bei A549 keine signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität und auch in Kombination mit einem Glukoseentzug ergab sich keine signifikante Veränderung gegenüber den Zellen mit alleinigem Glukoseentzug. Bei FaDu konnte 96 h nach dem Mediumwechsel eine signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität durch die fraktionierte Bestrahlung gemessen werden und 48 h nach dem Mediumwechsel war die Enzymaktivität nach der Kombinationsbehandlung gegenüber den Zellen mit alleinigem Glukoseentzug signifikant erhöht. Diese Effekte waren jedoch gegenüber den Effekten eines alleinigen Glukoseentzugs als klein einzustufen. Zu allen anderen Messzeitpunkten führte die fraktionierte Bestrahlung bei FaDu zu keiner signifikanten Nekroseinduktion und auch in Kombination mit einem Glukoseentzug konnte sonst durch die Bestrahlung kein signifikanter Effekt zusätzlich zum Effekt des Glukoseentzugs alleine beobachtet werden.

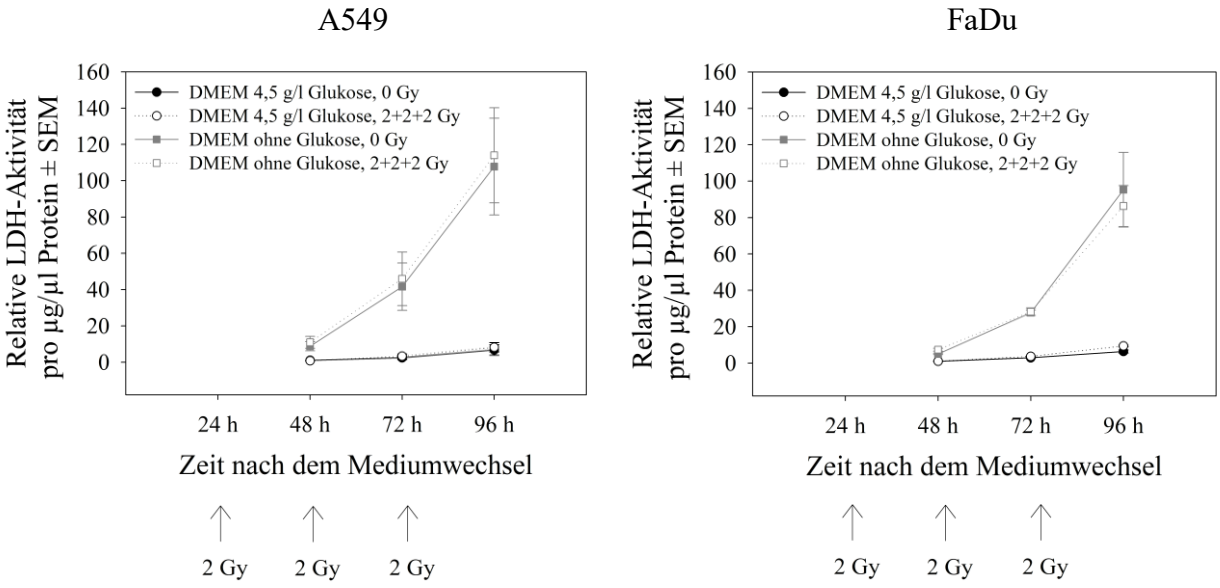
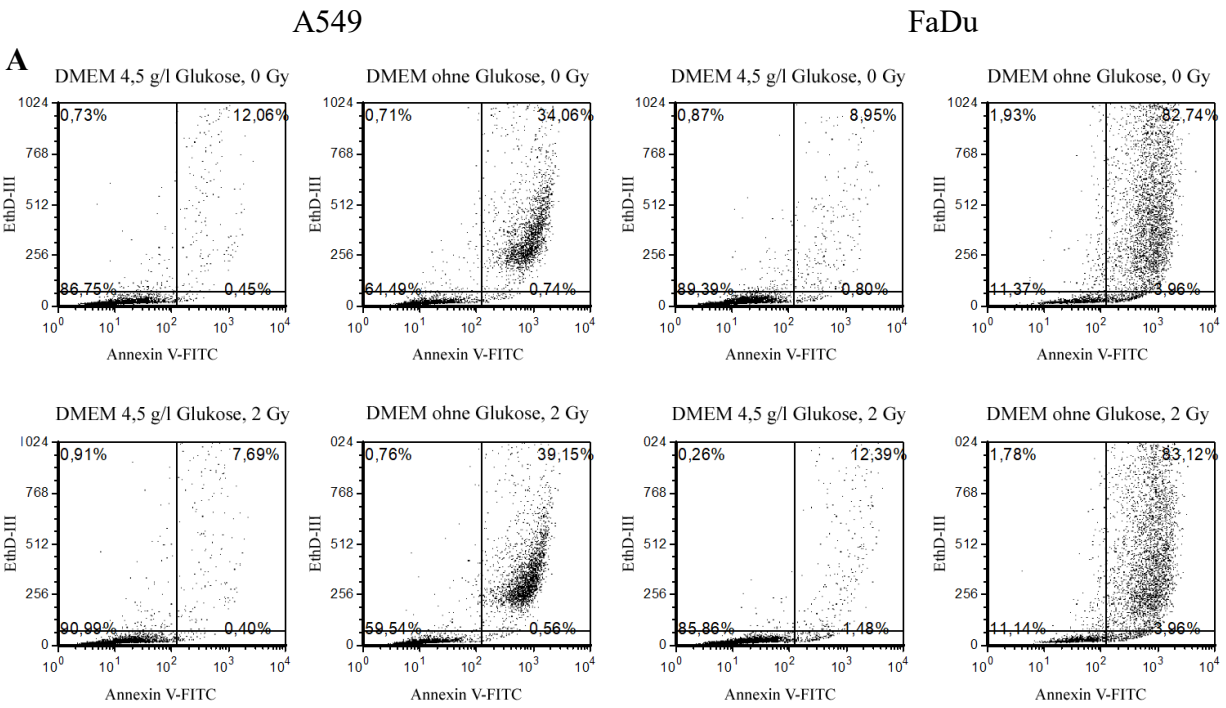


Abb. 3.4: Extrazelluläre LDH-Aktivität in A549 und FaDu Zellen nach Glukoseentzug und fraktionierter Bestrahlung. A549 und FaDu Zellen wurden nahezu bis zur Konfluenz kultiviert, erhielten einen Mediumwechsel zu DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 24 h, 48 h und 72 h nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen jeweils mit 2 Gy bestrahlt. 24 h nach jeder Fraktion wurde die LDH-Aktivität im Zellkulturmedium bestimmt und auf 1 µg/µl Protein bezogen. Zur relativen Darstellung wurden die Daten auf den Wert der unbestrahlten Kontrolle mit 4,5 g/l Glukose, der 48 h nach dem Mediumwechsel gemessen wurde, normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 6 Datenpunkten aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.1.3.3 Bestimmung des Anteils vitaler, apoptotischer und nekrotischer Tumorzellen nach Glukoseentzug und Bestrahlung

Nachdem die Messung der Caspase 3-Aktivität (Kapitel 3.1.3.1) sowie der LDH Zytotoxizitätsassay (Kapitel 3.1.3.2) bereits erste Aussagen bezüglich der Induktion von Apoptose und Nekrose nach Durchführung eines Glukoseentzugs und einer Bestrahlung der Tumorzellen erlaubten, sollte nun eine Quantifizierung erfolgen, um das Ausmaß und damit auch die Bedeutung des Zelltods nach entsprechender Behandlung der Zellen besser einschätzen zu können. Hierzu wurden A549 und FaDu Zellen für 72 h in glukosefreiem Medium oder in Medium mit 4,5 g/l Glukose inkubiert, einmalig mit 2 Gy bestrahlt und 24 h später mit Annexin V-FITC und EthD-III gefärbt. Nach durchflusszytometrischer Messung erfolgte die Bestimmung des prozentualen Anteils vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen jeder Probe. Abb. 3.5 A zeigt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung anhand repräsentativer Dotplots. In Abb. 3.5 B-D ist die Auswertung der Dotplots aus zwei unabhängigen Experimenten in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Es wird ersichtlich, dass der Glukoseentzug den Anteil vitaler Zellen stark verminderte (Abb. 3.5 B), wobei es bei A549 gegenüber den Kontrollzellen, die Medium mit 4,5 g/l Glukose erhielten, im Durchschnitt zu einer Abnahme um 24,4 Prozentpunkte kam, während die mittlere Abnahme bei FaDu 79,3 Prozentpunkte betrug. Durch die Bestrahlung hingegen kam es bei beiden Zelllinien zu keiner signifikanten Veränderung des Anteils vitaler Zellen gegenüber den unbestrahlten Kontrollen und auch in Kombination mit einem Glukoseentzug konnte durch die Strahlenbehandlung kein signifikanter Unterschied gegenüber den Zellen mit alleinigem Glukoseentzug erzielt werden. Betrachtet man nun die toten Zellen und unterscheidet diese in Annexin V-FITC positive apoptotische Zellen sowie EthD-III und Annexin V-FITC positive nekrotische Zellen, so sieht man, dass sowohl der geringe Zelltod unter normalen Glukosebedingungen (Abb. 3.5 C) als auch der starke Zelltod nach Glukoseentzug (Abb. 3.5 D) bei A549 wie auch bei FaDu, unabhängig von der Bestrahlung der Zellen, maßgeblich durch Nekrose bedingt war. Die Apoptose dagegen spielte hierbei nur eine äußerst untergeordnete Rolle.


A549
FaDu
A
DMEM 4,5 g/l Glukose, 0 Gy
DMEM ohne Glukose, 0 Gy
DMEM 4,5 g/l Glukose, 2 Gy
DMEM ohne Glukose, 2 Gy
EthD-III
Annexin V-FITC
0,73%
12,06%
86,75%
0,45%
0,71%
34,06%
64,49%
0,74%
0,87%
8,95%
89,39%
0,80%
1,93%
82,74%
11,37%
3,96%
0,91%
7,69%
90,99%
0,40%
0,76%
39,15%
59,54%
0,56%
0,26%
12,39%
85,86%
1,48%
1,78%
83,12%
11,14%
3,96%

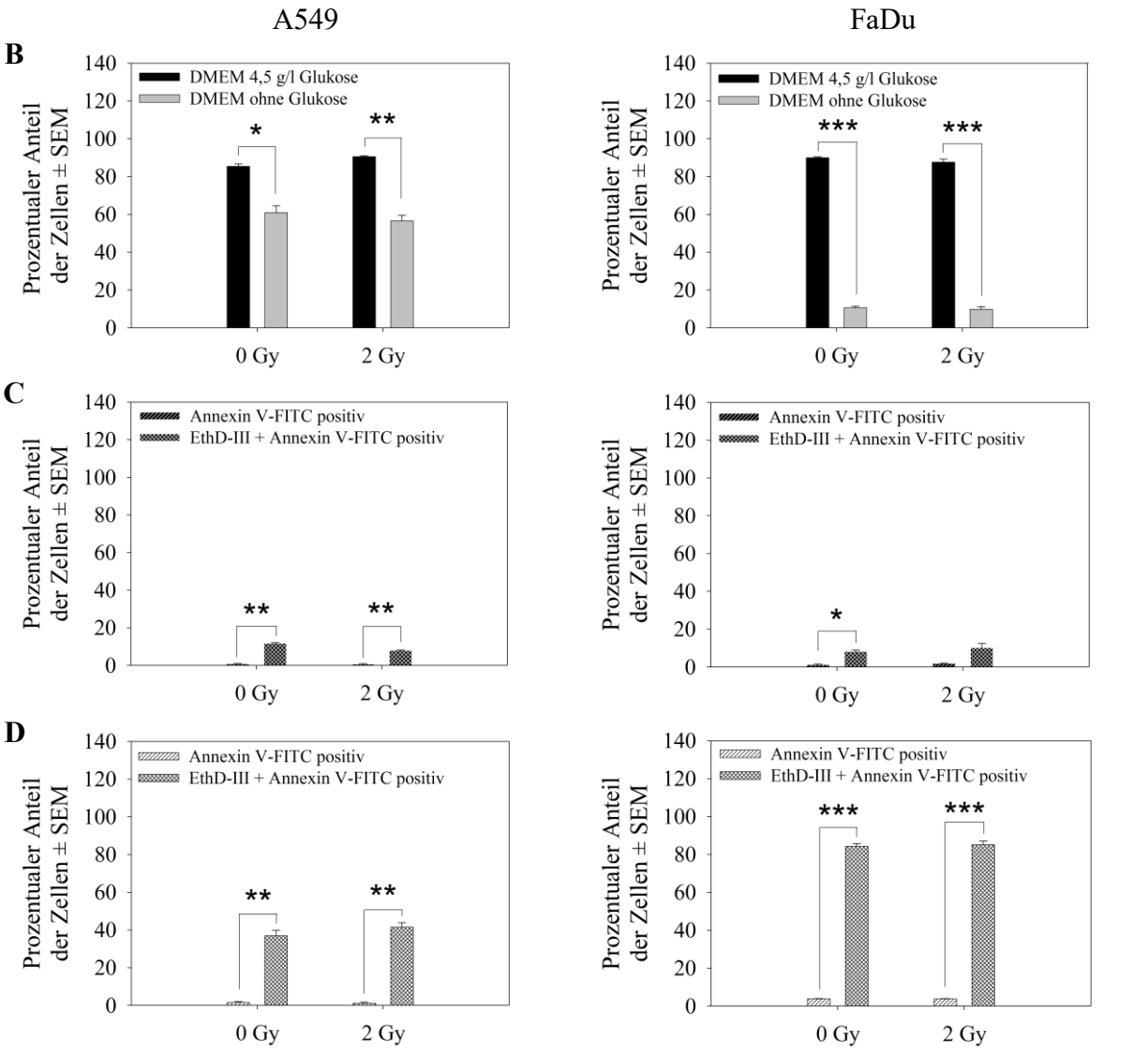

A549
FaDu
B
C
D
Prozentualer Anteil der Zellen ± SEM
DMEM 4,5 g/l Glukose
DMEM ohne Glukose
Annexin V-FITC positiv
EthD-III + Annexin V-FITC positiv
0 Gy
2 Gy
*
**
***

Abb. 3.5: Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Tumorzellen nach Glukoseentzug und Bestrahlung. A549 und FaDu Zellen wurden nach 72 h in DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose mit einer Einzeldosis von 2 Gy bestrahlt. 24 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit Annexin V-FITC und EthD-III gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **A** Repräsentative Dotplots der Annexin V-FITC/EthD-III-Färbung. **B** Prozentualer Anteil vitaler Zellen (Annexin V-FITC und EthD-III negativ). **C** Prozentualer Anteil apoptotischer (Annexin V-FITC positiv) und nekrotischer (EthD-III + Annexin V-FITC positiv) Zellen nach Inkubation in DMEM mit 4,5 g/l Glukose. **D** Prozentualer Anteil apoptotischer (Annexin V-FITC positiv) und nekrotischer (EthD-III + Annexin V-FITC positiv) Zellen nach Inkubation in DMEM ohne Glukose. In B-D sind die Mittelwerte ± SEM aus 2 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Student's *t*-Test (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

3.2 Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen und normalen Fibroblasten

Ein wesentlicher Wirkmechanismus der Strahlentherapie besteht in der Induktion von DNA-DSBs. Werden diese nicht repariert, kann dies zum Zelltod führen (Jeggo & Lobrich 2007). Da die Reparatur von DNA-DSBs einen hohen Energieaufwand erfordert, sollte nachfolgend untersucht werden, ob die Reparaturkapazität bestrahlter Zellen durch einen Entzug von Glukose, welche eine wichtige Energiequelle darstellt, beeinträchtigt wird und ob dies einen Einfluss auf das klonogene Überleben der Zellen nach Bestrahlung hat. Um eine mögliche selektive Wirkung des Glukoseentzugs zu überprüfen, sollten hierbei potenzielle Unterschiede zwischen Tumorzellen und normalen Zellen aufgedeckt werden.

Anschließend sollten die Ursachen für den beobachteten Effekt eines Glukoseentzugs auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs identifiziert werden. Hierzu wurde zunächst ermittelt, in welcher Phase der DSB-Reparatur Glukose benötigt wird. Danach wurde der Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Chromatinstruktur von Tumorzellen und normalen Zellen zu den Zeitpunkten nach der Bestrahlung untersucht, zu denen sich Glukose als essentiell für die DSB-Reparatur erwiesen hat. Zu diesen Zeitpunkten erfolgte auch eine Messung des nukleären Gehalts an Acetyl-CoA, welches das Substrat der zur Öffnung der Chromatinstruktur notwendigen Histonacetylierung darstellt. Zudem wurde der Einfluss einer Hemmung der Histondeacetylierung mittels des Inhibitors Sirtinol auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs bei An- und Abwesenheit von Glukose analysiert.

Schließlich wurde eine Hemmung der Autophagie mittels Chloroquin-Diphosphat durchgeführt, um den Beitrag der Autophagie zur DNA-DSB-Reparatur nach Bestrahlung unter normalen und glukosefreien Bedingungen abzuklären. Zur Überprüfung der möglichen

Wirksamkeit eines Glukoseentzugs im klinischen Kontext wurde letztendlich untersucht, ob die nach einem kompletten Entzug der Glukose beobachteten Effekte auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs auch durch eine Senkung der Glukosekonzentration auf Werte, die im menschlichen Blut erreichbar sind, erzielt werden können.

3.2.1 Einfluss einer Strahlenbehandlung auf den Glukoseverbrauch von Tumorzellen

Im Folgenden sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Strahlenbehandlung den Glukoseverbrauch von Tumorzellen beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurden konfluente A549 und FaDu Zellen unmittelbar nach der Zugabe von frischem Zellkulturmedium, das 4,5 g/l Glukose enthielt, mit 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt. 48 h nach der Bestrahlung wurde die Glukosekonzentration im Medium der Proben bestimmt und es wurde berechnet, wie viel Glukose innerhalb 48 h nach der Bestrahlung von den Zellen verbraucht wurde.

Sowohl bei den A549 als auch bei den FaDu Zellen manifestierte sich ein dosisabhängiger Anstieg des Glukoseverbrauchs infolge der Bestrahlung (Abb. 3.6), wobei dieser bei A549 signifikant stärker ausgeprägt war als bei FaDu. Somit konnte bei den A549 Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy eine Zunahme des Glukoseverbrauchs um 39 % gegenüber der unbestrahlten Kontrolle beobachtet werden, während dieser Anstieg bei den FaDu Zellen nur 20 % betrug. Nach der Bestrahlung mit 4 Gy stieg der Glukoseverbrauch beider Zelllinien weiter signifikant an und erreichte im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen eine Zunahme um 50 % bei A549 und um 32 % bei FaDu. Absolut betrachtet verbrauchten die FaDu Zellen jedoch sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach der Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy signifikant mehr Glukose als die A549 Zellen. So war beispielsweise der Glukoseverbrauch der unbestrahlten Zellen bei FaDu um 77 % höher als bei A549.

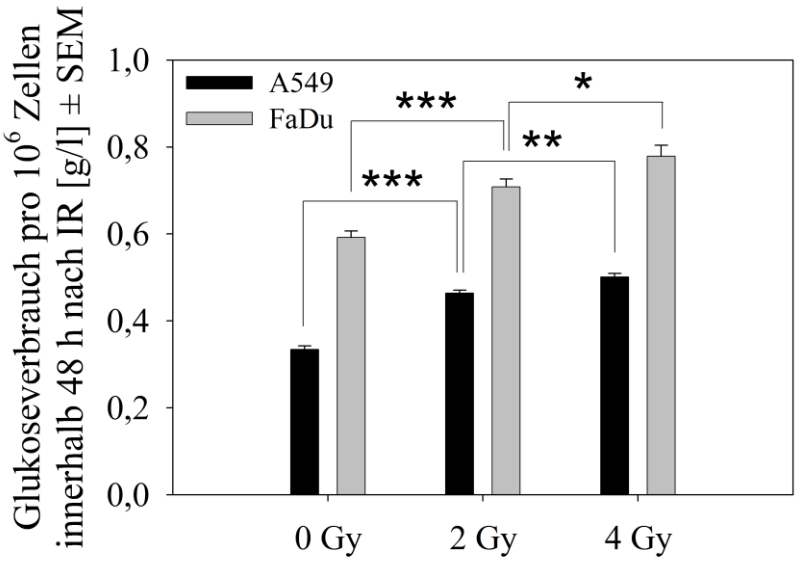


Abb. 3.6: Glukoseverbrauch von A549 und FaDu Zellen innerhalb 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy oder 4 Gy. Konfluente A549 und FaDu Zellen erhielten frisches Medium mit 4,5 g/l Glukose und wurden unmittelbar nach dem Mediumwechsel mit 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt. 48 h nach der Bestrahlung wurde die Glukosekonzentration im Zellkulturmedium der Proben bestimmt. Der Glukoseverbrauch wurde aus der Differenz der Glukosekonzentration des Mediums zum Zeitpunkt der Bestrahlung und der 48 h nach der Bestrahlung im Medium gemessenen Glukosekonzentration berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte ± SEM von 6 Datenpunkten aus 3 unabhängigen Experimenten für A549 und FaDu dar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Student's *t*-Test (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

3.2.2 Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs nach Glukoseentzug in Tumorzellen und normalen Fibroblasten

Nachdem gezeigt wurde, dass der Glukoseverbrauch der Tumorzellen infolge der Bestrahlung dosisabhängig ansteigt (Kapitel 3.2.1), sollte nun der glukoseverbrauchende Prozess nach der Bestrahlung identifiziert werden. Hierbei rückte die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in den Fokus des Interesses, da diese einen hohen Energieaufwand erfordert (Bakkenist & Kastan 2004, Hopfner et al. 2000, Paull & Gellert 1999). Um die Notwendigkeit der Glukose für den Reparaturprozess zu überprüfen, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Reparatur von DSBs nach einer Bestrahlung durch einen Glukoseentzug beeinträchtigt wird. Dabei sollten mögliche Unterschiede zwischen Tumorzellen und Normalzellen aufgedeckt werden.

Um dies zu untersuchen, wurden mit den Tumorzellen A549 und FaDu sowie den normalen Fibroblasten HSF7 γH2AX Focus Assays durchgeführt, wofür die Zellen in Culture Slides kultiviert wurden. 24 h nach einem Mediumwechsel zu DMEM ohne Glukose oder DMEM mit

4,5 g/l Glukose erfolgte die Bestrahlung der konfluenten Zellen mit 2 Gy und 1 h, 6 h und 24 h nach der Bestrahlung wurde die mittlere Anzahl an γH2AX-Foci pro Zellkern bestimmt, welche als Maß für die Menge an DNA-DSBs herangezogen wurde. Neben den bestrahlten Proben wurden auch unbestrahlte Kontrollen mitgeführt, deren Anzahl an γH2AX-Foci 1 h nach der Bestrahlung der Proben bestimmt wurde.

Abb. 3.7 A zeigt die Induktion der γH2AX-Foci 1 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy. Anhand der Abbildung wird deutlich, dass der Glukoseentzug weder bei den Tumorzellen noch bei den normalen Fibroblasten einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der durch die Bestrahlung induzierten γH2AX-Foci hatte. Allerdings unterschieden sich die drei Zelllinien hinsichtlich der Anzahl der induzierten Schäden. So wurden bei FaDu ungefähr doppelt so viele Schäden induziert als bei A549, während die Anzahl der γH2AX-Foci bei den HSF7 Zellen im Bereich dazwischen einzuordnen war.

Um die Effizienz der DSB-Reparatur der verschiedenen Zelllinien besser vergleichen zu können, wurde die Anzahl der γH2AX-Foci, die 6 h und 24 h nach der Bestrahlung gemessen wurde sowie die der unbestrahlten Kontrollen, jeweils auf die 1 h-Werte der Zellen mit und ohne Glukose normalisiert. Abb. 3.7 B zeigt somit für jede Zelllinie die Abnahme der γH2AX-Foci über die Zeit relativ zur Anzahl der unter normalen bzw. glukosefreien Bedingungen induzierten Schäden. Anhand der 24 h nach der Bestrahlung verbleibenden residuellen γH2AX-Foci wird ersichtlich, dass die DSB-Reparatur unter normalen Glukosebedingungen bei den HSF7 Zellen am effizientesten war, dicht gefolgt von den A549 Zellen, während die Reparatureffizienz der FaDu Zellen am geringsten war. So blieben im Mittel bei HSF7 7,2 %, bei A549 8,2 % und bei FaDu 13,6 % der induzierten Schäden zurück. Dies entsprach einer absoluten Anzahl an γH2AX-Foci von im Mittel 2,0 für HSF7, 1,6 für A549 und 5,7 für FaDu.

Infolge eines Glukoseentzugs kam es zu einer signifikanten Verschlechterung der Reparatureffizienz beider Tumorzelllinien (Abb. 3.7 B). So stieg die relative Menge an γH2AX-Foci 24 h nach der Bestrahlung durch den Glukoseentzug bei den A549 Zellen im Mittel um 71 % gegenüber den Zellen mit Glukose, bei FaDu im Mittel um 79 %. Die Beeinträchtigung der DSB-Reparatur durch den Glukoseentzug beschränkte sich bei den Tumorzellen jedoch auf die späte Reparaturphase, denn 6 h nach der Bestrahlung konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der relativen Menge an γH2AX-Foci der Zellen mit und der Zellen ohne Glukose festgestellt werden. Im Gegensatz zu den Tumorzellen wurde die Reparatureffizienz strahleninduzierter DNA-DSBs bei den normalen Fibroblasten HSF7 nicht durch einen Glukoseentzug beeinträchtigt (Abb. 3.7 B). Im Gegenteil: Hier konnte 24 h nach

der Bestrahlung infolge des Glukoseentzugs sogar eine kleine, aber dennoch signifikante Abnahme der relativen Menge an γH2AX-Foci um im Mittel 11 % gegenüber den Zellen mit Glukose beobachtet werden. Dies deutete auf eine leichte Verbesserung der Reparatureffizienz durch den Glukoseentzug hin. 6 h nach der Bestrahlung konnte auch bei den Fibroblasten kein signifikanter Einfluss des Glukoseentzugs auf die DSB-Reparatur beobachtet werden. Wurde ein Glukoseentzug alleine, ohne eine Bestrahlung der Zellen durchgeführt, so führte dies weder bei den Tumorzellen noch bei den Fibroblasten zu einer signifikanten Änderung der Anzahl an γH2AX-Foci im Vergleich zu den Zellen, die glukosehaltiges Medium erhalten hatten.

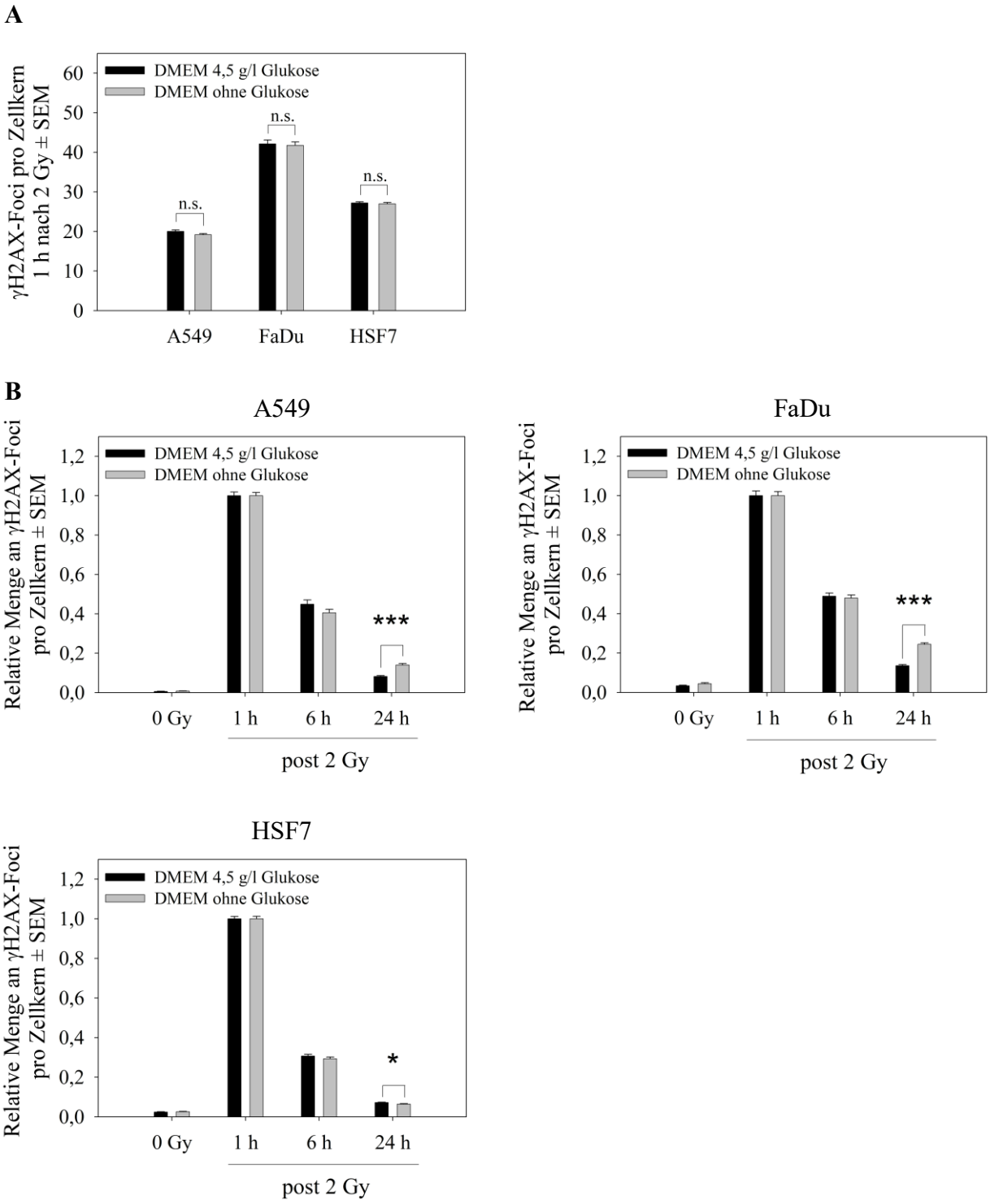


Abb. 3.7: Reparaturkinetik strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Glukoseentzug. Nach 24-stündiger Inkubation in DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose wurden konfluente A549 und FaDu Tumorzellen sowie normale Fibroblasten HSF7 mit 2 Gy bestrahlt. Jeweils 1 h, 6 h und 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Bestimmung der Anzahl an γH2AX-Foci pro Zellkern. **A** Absolute Anzahl der 1 h nach der Bestrahlung induzierten γH2AX-Foci pro Zellkern. **B** Relative Menge an γH2AX-Foci pro Zellkern nach Normalisierung auf die jeweils 1 h nach der Bestrahlung ermittelte Anzahl an γH2AX-Foci der Zellen mit oder ohne Glukose. A und B zeigen die Mittelwerte ± SEM von je 3 unabhängigen Experimenten, wobei pro Bedingung und Versuch mindestens 77 Zellkerne ausgewertet wurden. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's *t*-Test (*p < 0,05; ***p < 0,001; n.s.: nicht signifikant).

3.2.3 Einfluss eines Glukoseentzugs auf das klonogene Überleben von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Bestrahlung

Da ein Zusammenhang zwischen der Anzahl residueller γH2AX-Foci und der zellulären Strahlenempfindlichkeit vermutet wird (Klokov et al. 2006, Menegakis et al. 2009), sollte im Folgenden überprüft werden, ob sich die in Kapitel 3.2.2 beobachteten Effekte eines Glukoseentzugs auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs im klonogenen Überleben der Zellen nach Bestrahlung widerspiegeln. Hierfür wurden mit den Tumorzelllinien A549 und FaDu sowie den normalen Fibroblasten HSF7 Koloniebildungstests durchgeführt, bei denen die Zellen nach 72-stündiger Inkubation in glukosefreiem Medium bzw. in Medium mit 4,5 g/l Glukose mit einer Dosis von 1 Gy, 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt wurden. 24 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen in geringer Zahl ausgesät, um innerhalb von 10-14 Tagen Kolonien bilden zu können. Dabei wurden neben den bestrahlten Proben auch unbestrahlte Kontrollen mitgeführt. Nach Fixieren, Färben und Auszählen der Kolonien wurden die Überlebensfraktionen nach 1 Gy, 2 Gy und 4 Gy unter normalen und glukosefreien Bedingungen bestimmt und anhand von Zellüberlebenskurven grafisch dargestellt. Zusätzlich wurde die Koloniebildungseffizienz der unbestrahlten Zellen ermittelt.

Wie die in Abb. 3.8 gezeigten Überlebenskurven erkennen lassen, führte der Glukoseentzug sowohl bei den A549 als auch bei den FaDu Zellen zu einer signifikanten Radiosensitivierung gegenüber den Zellen, die glukosehaltiges Medium erhalten hatten. Dies wird auch durch die verringerten D_{37}-Werte von A549 und FaDu infolge des Glukoseentzugs deutlich, welche in einem Dosis-modifizierenden Faktor von 2,0 bei A549 und 1,7 bei FaDu resultierten (Tab. 3.2). Zudem zeigte sich, dass der Glukoseentzug bei beiden Tumorzelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Koloniebildungseffizienz der unbestrahlten Kontrollen führte. Somit verringerte sich die PE der A549 Zellen durch den Glukoseentzug im Mittel um 28 %, während bei den FaDu Zellen sogar eine mittlere Abnahme um 77 % gegenüber den Zellen mit Glukose zu beobachten war (Tab. 3.2). Im Gegensatz zu den Tumorzellen zeigten die normalen Fibroblasten keinerlei Reaktion auf den Glukoseentzug. So wiesen die Überlebenskurven der HSF7 Zellen mit und ohne Glukose keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 3.8), was sich in identischen D_{37}-Werten und damit einem DMF von 1 widerspiegelte (Tab. 3.2). Auch die Koloniebildungseffizienz der unbestrahlten HSF7 Zellen wurde nicht durch den Glukoseentzug beeinflusst (Tab. 3.2). Des Weiteren werden aus Tab. 3.2 auch basale Unterschiede und Gemeinsamkeiten der drei Zelllinien ersichtlich. So unterschieden sich A549, FaDu und HSF7 Zellen unter normalen Glukosebedingungen zwar hinsichtlich ihrer Koloniebildungseffizienz,

ihre intrinsische Strahlensensitivität, die durch den D_{37}-Wert verdeutlicht wird, war jedoch nahezu identisch.

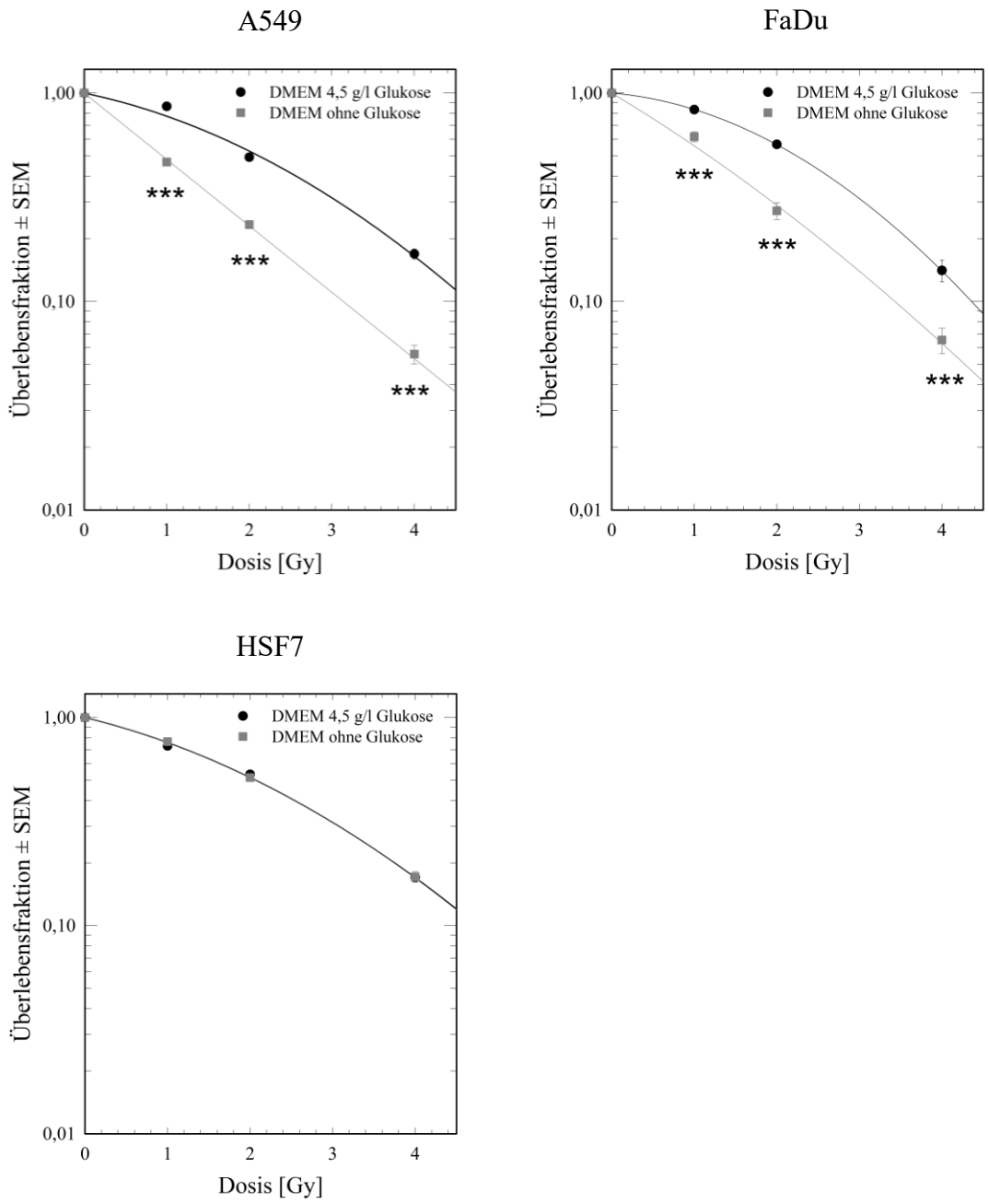


Abb. 3.8: Klonogenes Überleben von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Bestrahlung in Kombination mit einem Glukoseentzug. Nach 72-stündiger Inkubation in glukosefreiem Medium oder Medium mit 4,5 g/l Glukose wurden A549, FaDu und HSF7 Zellen mit 1 Gy, 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt. 24 h später wurden die Zellen in geringer Zahl ausgesät, um während einer Inkubationszeit von 10-14 Tagen Kolonien bilden zu können. Die Daten zeigen die mittlere Überlebensfraktion ± SEM von 9 Datenpunkten aus 3 unabhängigen Experimenten für A549 und HSF7 und von 6 Datenpunkten aus 2 unabhängigen Experimenten für FaDu. Signifikante Unterschiede zwischen den Zellen mit und ohne Glukose wurden mithilfe des Student's *t*-Test ermittelt (***$p < 0{,}001$).

Tab. 3.2: Koloniebildungseffizienz, D_{37}-Wert und Dosis-modifizierender Faktor von Tumorzellen und normalen Fibroblasten unter normalen Glukosebedingungen und nach Glukoseentzug. Die Daten zeigen die mittlere Koloniebildungseffizienz (PE) ± SEM der unbestrahlten Zellen, den D_{37}-Wert und den Dosis-modifizierenden Faktor (DMF) basierend auf 9 Datenpunkten aus 3 unabhängigen Experimenten für A549 und HSF7 und 6 Datenpunkten aus 2 unabhängigen Experimenten für FaDu.

	PE ± SEM	D_{37} [Gy]	DMF
A549, DMEM 4,5 g/l Glukose	0,57 ± 0,02	2,7	2,0
A549, DMEM ohne Glukose	0,41 ± 0,01	1,35	
FaDu, DMEM 4,5 g/l Glukose	0,30 ± 0,04	2,75	1,7
FaDu, DMEM ohne Glukose	0,07 ± 0,02	1,65	
HSF7, DMEM 4,5 g/l Glukose	0,05 ± 0,00	2,7	1
HSF7, DMEM ohne Glukose	0,05 ± 0,00	2,7	

3.2.4 Glukosebedarf während unterschiedlicher Phasen der DNA-DSB-Reparatur nach Bestrahlung in Tumorzellen

Nachdem gezeigt wurde, dass ein Glukoseentzug die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs selektiv in Tumorzellen beeinträchtigt (Kapitel 3.2.2), sollte nun ermittelt werden, in welcher Phase der DSB-Reparatur Glukose benötigt wird. Zudem sollte untersucht werden, wie sich ein ausschließlich vor der Bestrahlung durchgeführter Glukoseentzug auf die Reparaturkapazität der Zellen auswirkt. Hierzu wurden konfluente A549 Tumorzellen zunächst für 24 h in glukosefreiem Medium inkubiert und anschließend mit 2 Gy bestrahlt. Entweder direkt vor der Bestrahlung oder zu verschiedenen Zeitpunkten (30 min bis 21 h) danach wurde der Glukoseentzug durch einen Wechsel zu Medium mit 4,5 g/l Glukose gestoppt. Zusätzlich wurden Kontrollen mitgeführt, die während des gesamten Untersuchungszeitraums entweder in Medium mit 4,5 g/l Glukose oder in glukosefreiem Medium kultiviert wurden. 1 h, 6 h und/oder 24 h nach der Bestrahlung wurde die Anzahl der γH2AX-Foci pro Zellkern bestimmt.

Aus Abb. 3.9 wird ersichtlich, dass die Durchführung eines Glukoseentzugs ausschließlich vor der Bestrahlung keinen Einfluss auf die Induktion sowie Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs bei A549 Zellen hatte. So unterschied sich die Anzahl der γH2AX-Foci unter diesen Bedingungen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach der Bestrahlung signifikant gegenüber den Zellen, die während des gesamten Experiments Glukose zur Verfügung hatten. Erfolgte der Glukoseentzug sowohl vor als auch nach der Bestrahlung, erhöhte sich die Anzahl residueller γH2AX-Foci 24 h nach der Bestrahlung signifikant gegenüber den Zellen, die durchgehend glukosehaltiges Medium erhalten hatten, wie auch gegenüber den Zellen, bei

denen der Glukoseentzug nur vor der Bestrahlung durchgeführt wurde. Ohne Bestrahlung sowie 1 h und 6 h nach der Bestrahlung waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl an γH2AX-Foci zwischen den unterschiedlich behandelten Zellen zu beobachten.

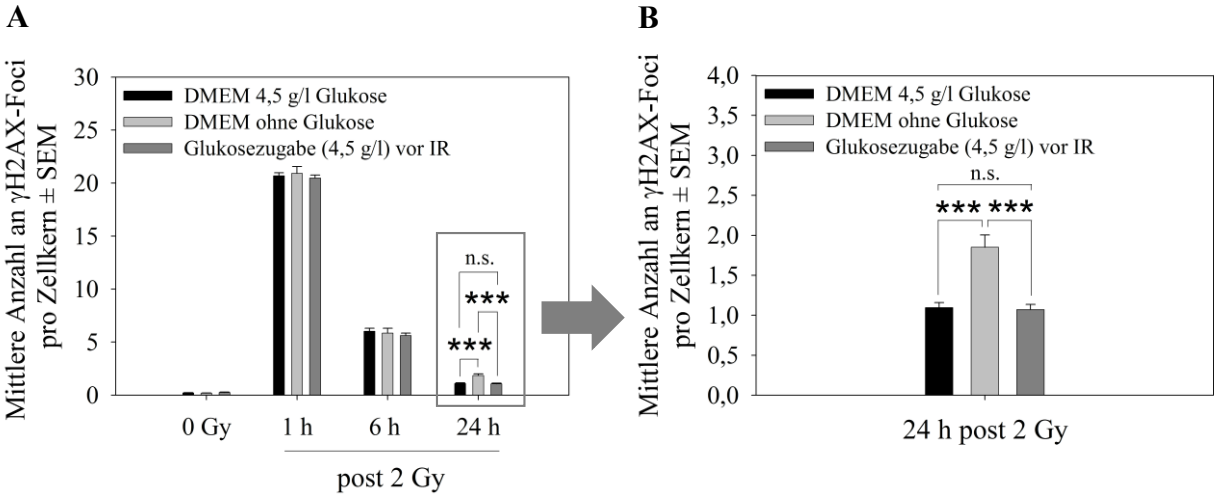


Abb. 3.9: Einfluss eines ausschließlich vor der Bestrahlung durchgeführten Glukoseentzugs auf die DNA-DSB-Reparatur von Tumorzellen. Konfluente A549 Zellen wurden für 24 h in glukosefreiem Medium inkubiert und mit 2 Gy bestrahlt. Unmittelbar vor der Bestrahlung erfolgte die Glukosezugabe durch einen Wechsel zu Medium mit 4,5 g/l Glukose. Die Kontrollen wurden während des gesamten Experiments in DMEM mit 4,5 g/l Glukose bzw. in DMEM ohne Glukose belassen. 1 h, 6 h und 24 h nach der Bestrahlung wurde die Anzahl an γH2AX-Foci pro Zellkern bestimmt. **A** Anzahl an γH2AX-Foci pro Zellkern 1 h, 6 h und 24 h nach IR. **B** Vergrößerte Darstellung der Anzahl an γH2AX-Foci pro Zellkern 24 h nach IR aus A. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten, wobei pro Bedingung und Versuch mindestens 100 Zellkerne ausgewertet wurden. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's *t*-Test (***p < 0,001; n.s.: nicht signifikant).

Da diese Ergebnisse vermuten ließen, dass nicht das Vorhandensein von Glukose vor, sondern nach der Bestrahlung wesentlich für die Reparatur von DNA-DSBs ist, sollte nachfolgend bei A549 Zellen untersucht werden, ab welchem Zeitpunkt nach der Bestrahlung Glukose im Rahmen der DSB-Reparatur benötigt wird. Es zeigte sich, dass ein Glukoseentzug bis zu 11 h nach der Bestrahlung keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl residueller γH2AX-Foci im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle mit Glukose hatte (Abb. 3.10 A, Abb. 3.10 B). Erfolgte der Glukoseentzug jedoch für mindestens 13 h nach der Bestrahlung, kam es zu einer signifikanten Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparatur, und zwar in gleichem Maße wie nach der Durchführung eines Glukoseentzugs über die gesamte Dauer des Experiments (Abb. 3.10 B, Abb. 3.10 C). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Glukose in Tumorzellen für die späte Phase der DNA-DSB-Reparatur, beginnend ab 13 h nach der Bestrahlung, essentiell ist.

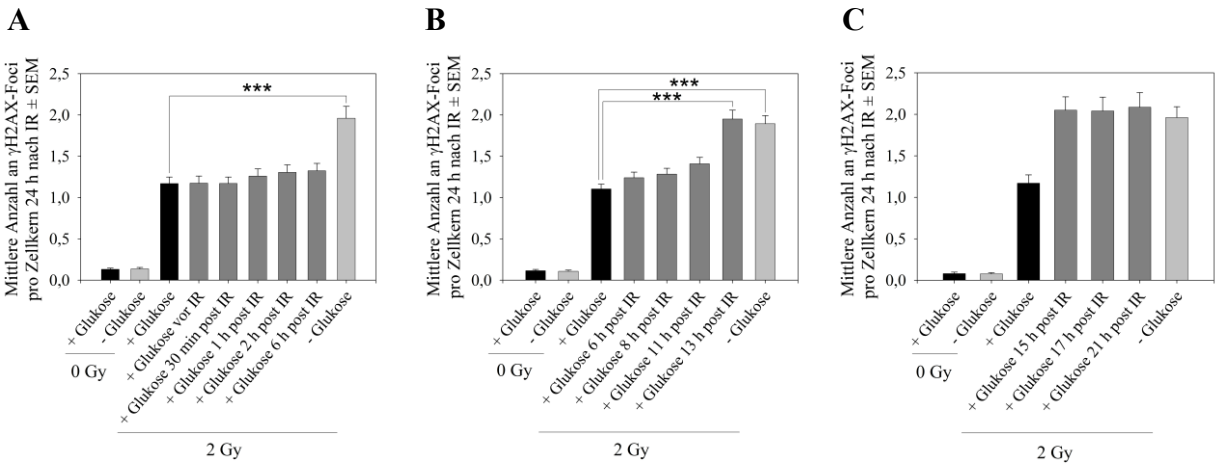


Abb. 3.10: Residuelle γH2AX-Foci in Tumorzellen nach Stoppen des Glukoseentzugs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach IR. Konfluente A549 Zellen wurden nach 24 h Glukoseentzug mit 2 Gy bestrahlt. Unmittelbar vor der Bestrahlung oder 30 min bis 6 h nach der Bestrahlung (**A**), 6 h bis 13 h nach der Bestrahlung (**B**) oder 15 h bis 21 h nach der Bestrahlung (**C**) erfolgte ein Wechsel zu Medium mit 4,5 g/l Glukose. Die Kontrollen (+ Glukose bzw. - Glukose) wurden während des gesamten Experiments in Medium mit 4,5 g/l Glukose bzw. in glukosefreiem Medium belassen. 24 h nach der Bestrahlung wurde die Anzahl residueller γH2AX-Foci pro Zellkern bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SEM von 2 (A), 3 (B) bzw. 1 (C) unabhängigen Experimenten, wobei pro Bedingung und Versuch mindestens 300 Zellkerne ausgewertet wurden. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle mit 4,5 g/l Glukose sind gezeigt. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bei den post hoc *t*-Tests wurde die Bonferroni-Korrektur angewandt (***$p < 0{,}001$).

3.2.5 Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Chromatinstruktur von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Bestrahlung

Da die Chromatinstruktur eine Barriere für die Reparatur von DNA-DSBs darstellt, kommt der Öffnung des Chromatins nach der Bestrahlung eine wesentliche Bedeutung zu, denn sie ermöglicht der DNA-Reparaturmaschinerie den Zugang zum Schaden und erleichtert somit dessen Reparatur (Price & D'Andrea 2013). Da es sich bei der Chromatinrelaxation infolge der DSB-Induktion um einen energieaufwendigen Prozess handelt (Kruhlak et al. 2006), sollte im Folgenden überprüft werden, ob diese durch einen Glukoseentzug beeinflusst wird. Hierbei wurden die Acetylierung von Histon H3 (K9) und Histon H4 (K12) sowie die Phosphorylierung von KAP1 (S824) als Marker für eine offene Chromatinstruktur herangezogen (Goodarzi et al. 2009, Price & D'Andrea 2013, Ziv et al. 2006).

In einem ersten Experiment wurden A549 und FaDu Tumorzellen für 72 h in glukosefreiem Medium oder in Medium mit 4,5 g/l Glukose inkubiert und anschließend mit 2 Gy bestrahlt. Die Kontrollen blieben unbestrahlt. 0,5 h, 5 h und 24 h nach der Bestrahlung wurden

Gesamtzelllysate hergestellt und mittels Western Blot analysiert, wobei eine Detektion von Acetyl-Histon H3 (K9) und Histon H3 mittels spezifischer Antikörper erfolgte. Wie in Abb. 3.11 zu sehen, kam es unter normalen Glukosebedingungen sowohl bei den A549 als auch bei den FaDu Zellen nach der Bestrahlung zu einer erhöhten Acetylierung von Histon H3, welche auf eine Öffnung der Chromatinstruktur hinwies. Während der Anstieg der Histonacetylierung bei A549 im Mittel erst 24 h nach der Bestrahlung deutlich wurde, nahm die Acetylierung von Histon H3 bei FaDu bereits 30 min nach der Bestrahlung zu und stieg sodann über die Zeit weiter an. Die Durchführung eines Glukoseentzugs führte bei beiden Zelllinien zu jedem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Hemmung der Histonacetylierung gegenüber den Zellen, die glukosehaltiges Medium erhalten hatten. Dies deutete darauf hin, dass der Glukoseentzug bei den Tumorzellen unter den vorliegenden Bedingungen sowohl basal als auch nach der Bestrahlung die Öffnung der Chromatinstruktur beeinträchtigte.

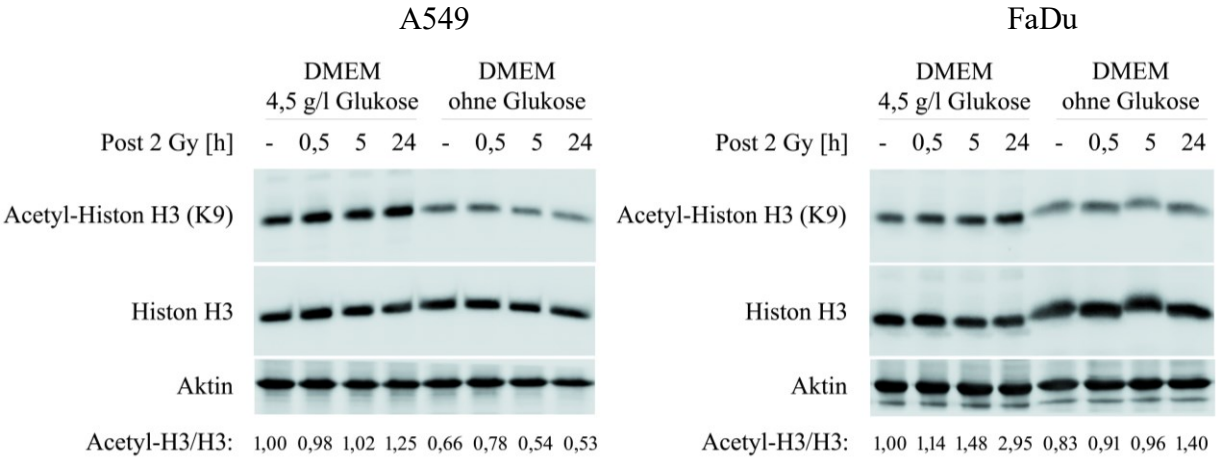


Abb. 3.11: Acetylierung von Histon H3 in Tumorzellen nach 72-stündigem Glukoseentzug vor der Bestrahlung mit 2 Gy. A549 und FaDu Tumorzellen wurden für 72 h in glukosefreiem Medium oder in Medium mit 4,5 g/l Glukose inkubiert und anschließend mit 2 Gy bestrahlt. 0,5 h, 5 h und 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Herstellung der Gesamtzelllysate, um mittels Western Blot Acetyl-Histon H3 (K9) und Histon H3 nachzuweisen. Aktin diente als Ladekontrolle. Repräsentative Western Blots für A549 und FaDu sind gezeigt. Der Quotient aus Acetyl-Histon H3 und Histon H3 wurde nach densitometrischer Auswertung bestimmt und auf die unbestrahlte Kontrolle mit Glukose normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 3 unabhängigen Experimenten für A549 und FaDu.

Um den Effekt eines Glukoseentzugs auf die Chromatinstruktur zu den Zeitpunkten nach der Bestrahlung zu untersuchen, zu denen Glukose in Tumorzellen für die DNA-DSB-Reparatur essentiell wird (Kapitel 3.2.4, Abb. 3.10), und um diesbezüglich mögliche Unterschiede zwischen Tumorzellen und normalen Fibroblasten aufzudecken, wurden entsprechende

Western Blot Analysen mit A549 und HSF7 Zellen durchgeführt. Zur Angleichung der Versuchsbedingungen an das in Abb. 3.10 gezeigte Experiment wurden die Zellen für 24 h in glukosefreiem Medium oder in Medium mit 4,5 g/l Glukose inkubiert, mit 2 Gy bestrahlt und 6 h, 8 h, 11 h oder 13 h nach der Bestrahlung lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden mittels Western Blot analysiert und neben der Detektion von Acetyl-Histon H3 (K9) und Histon H3 wurden nun auch Acetyl-Histon H4 (K12) und Histon H4 sowie P-KAP1 (S824) und KAP1 mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Unter normalen Glukosebedingungen konnte bei den A549 Tumorzellen ein kontinuierlicher Anstieg der Acetylierung sowohl von Histon H3 als auch von Histon H4 zwischen 6 h und 13 h nach der Bestrahlung beobachtet werden (Abb. 3.12). Zudem kam es zu diesen Zeitpunkten zu einer strahleninduzierten Phosphorylierung von KAP1 (Abb. 3.13). Diese Ergebnisse deuteten auf eine Öffnung der Chromatinstruktur infolge der Bestrahlung hin. Wurde ein Glukoseentzug durchgeführt, so blieb der strahleninduzierte Anstieg der Acetylierung von Histon H3 sowie von Histon H4 aus (Abb. 3.12). Daneben wiesen die A549 Zellen ohne Glukose zwischen 8 h und 13 h nach der Bestrahlung eine geringere Phosphorylierung von KAP1 auf als die entsprechenden Zellen mit Glukose (Abb. 3.13). Diese Daten ließen vermuten, dass ein Glukoseentzug in Tumorzellen die strahleninduzierte Chromatinrelaxation hemmt.

Bei den normalen Fibroblasten HSF7 deuteten unter normalen Glukosebedingungen sowohl ein tendenzieller Anstieg der Acetylierung von Histon H4 (Abb. 3.12) als auch eine erhöhte KAP1-Phosphorylierung (Abb. 3.13) auf eine strahleninduzierte Öffnung des Chromatins hin. Im Gegensatz zu den Tumorzellen wurde die Chromatinstruktur nach der Bestrahlung hier jedoch nicht durch einen Glukoseentzug beeinflusst. So konnte bei den HSF7 Zellen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach der Bestrahlung ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen mit und ohne Glukose hinsichtlich der Acetylierung von Histon H3 und Histon H4 (Abb. 3.12) sowie der Phosphorylierung von KAP1 (Abb. 3.13) festgestellt werden.

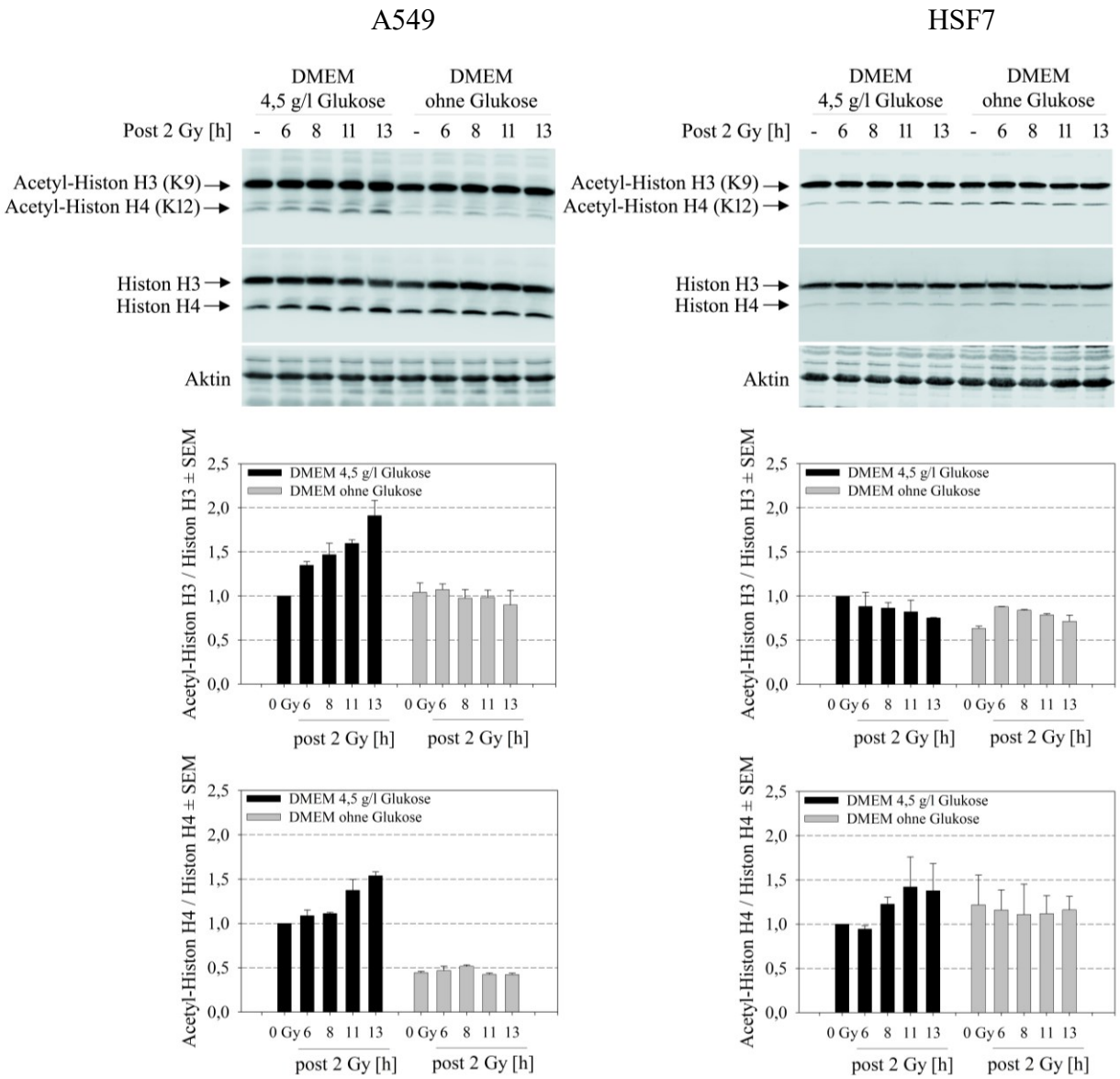


Abb. 3.12: Acetylierung von Histon H3 und Histon H4 in Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach 24-stündigem Glukoseentzug vor der Bestrahlung mit 2 Gy. Nach 24 h Inkubation in glukosefreiem Medium oder Medium mit 4,5 g/l Glukose wurden A549 und HSF7 Zellen mit 2 Gy bestrahlt. 6 h, 8 h, 11 h und 13 h nach der Bestrahlung wurden Gesamtzelllysate hergestellt, um mittels Western Blot Acetyl-Histon H3 (K9), Histon H3, Acetyl-Histon H4 (K12) und Histon H4 nachzuweisen. Aktin diente als Ladekontrolle. Repräsentative Western Blots für A549 und HSF7 sind gezeigt. Der Quotient aus Acetyl-Histon H3 und Histon H3 sowie aus Acetyl-Histon H4 und Histon H4 wurde nach densitometrischer Auswertung bestimmt und auf die unbestrahlte Kontrolle mit Glukose normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus je 2 unabhängigen Experimenten für A549 und HSF7.

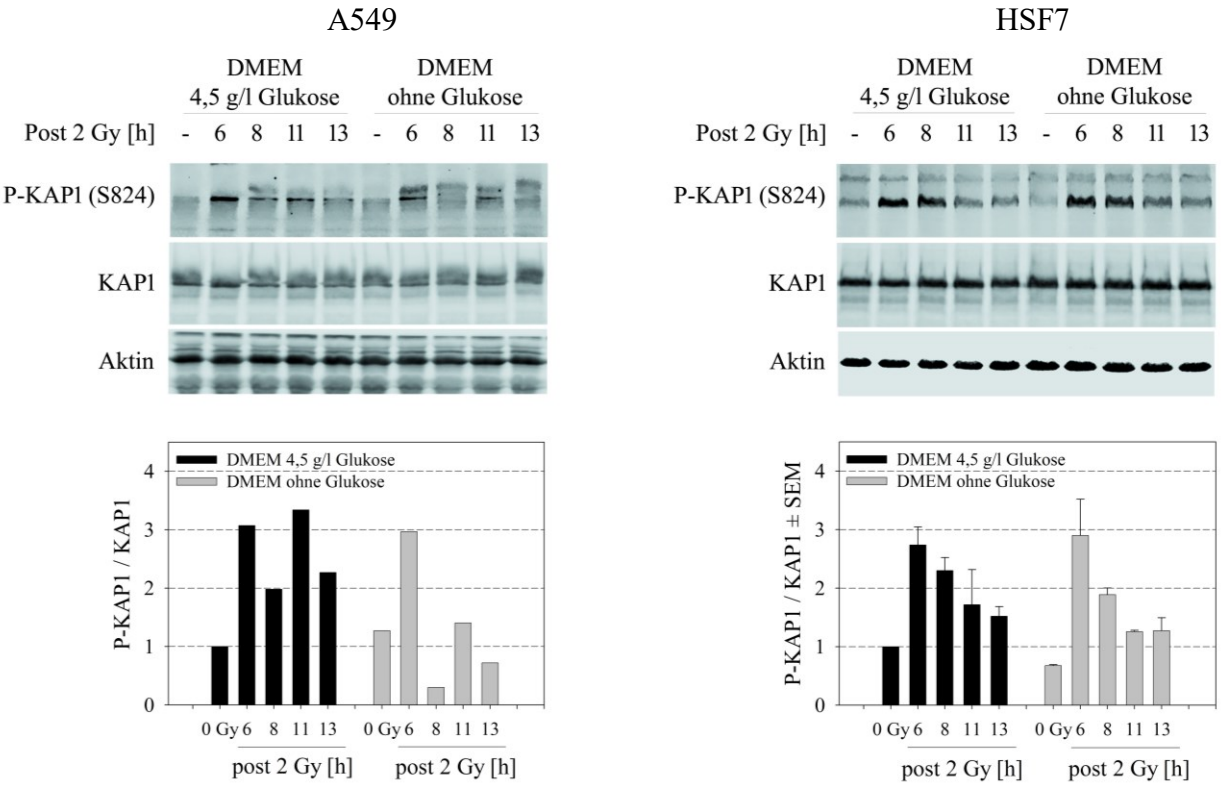


Abb. 3.13: Phosphorylierung von KAP1 in Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach 24-stündigem Glukoseentzug vor der Bestrahlung mit 2 Gy. A549 und HSF7 Zellen wurden für 24 h in glukosefreiem Medium oder Medium mit 4,5 g/l Glukose inkubiert und anschließend mit 2 Gy bestrahlt. 6 h, 8 h, 11 h und 13 h nach der Bestrahlung erfolgte die Herstellung der Gesamtzelllysate, um P-KAP1 (S824) und KAP1 mittels Western Blot nachzuweisen. Aktin diente als Ladekontrolle. Repräsentative Western Blots für A549 und HSF7 sind gezeigt. Der Quotient aus P-KAP1 und KAP1 wurde nach densitometrischer Auswertung bestimmt und auf die unbestrahlte Kontrolle mit Glukose normalisiert. Die Daten zeigen das Ergebnis von 1 Experiment für A549 und die Mittelwerte ± SEM aus 2 unabhängigen Experimenten für HSF7.

3.2.6 Einfluss eines Glukoseentzugs auf den nukleären Acetyl-CoA-Gehalt von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Bestrahlung

Glukose stellt eine wichtige Ausgangssubstanz für die Synthese von Acetyl-CoA dar, welches wiederum eine essentielle Rolle im Rahmen der Histonacetylierung spielt. So dient Acetyl-CoA im Zellkern als Donor für die Acetyl-Gruppen, die von den Histonacetyltransferasen auf spezielle Lysinreste der Histone übertragen werden. Vor diesem Hintergrund lag es nahe zu untersuchen, ob die in Tumorzellen nach Durchführung eines Glukoseentzugs beobachtete Hemmung der strahleninduzierten Acetylierung von Histon H3 und Histon H4 (Kapitel 3.2.5) auf einen Mangel an nukleärem Acetyl-CoA zurückzuführen war. Parallel hierzu sollte auch der Einfluss eines Glukoseentzugs auf den Acetyl-CoA-Gehalt im Zellkern von normalen

Fibroblasten untersucht werden, bei denen der Glukoseentzug keinen Einfluss auf die Histonacetylierung nach der Bestrahlung hatte (Kapitel 3.2.5).

Für den Versuch wurden konfluente A549 und HSF7 Zellen für 24 h in glukosefreiem Medium oder in Medium mit 4,5 g/l Glukose inkubiert und mit 2 Gy bestrahlt. 6 h, 13 h und 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Bestimmung des Acetyl-CoA-Gehalts im Nukleus der Zellen. Zusätzlich wurden auch unbestrahlte Kontrollen mitgeführt, deren nukleärer Acetyl-CoA-Gehalt zum Zeitpunkt der Bestrahlung sowie 24 h danach bestimmt wurde. Wie in Abb. 3.14 zu sehen, führte der Glukoseentzug bei den A549 Tumorzellen zu keinem Mangel an Acetyl-CoA im Zellkern. Im Gegenteil: Unabhängig von der Bestrahlung war der nukleäre Acetyl-CoA-Gehalt in den Zellen ohne Glukose zu jedem der untersuchten Zeitpunkte höher, zum Teil sogar signifikant, als in den Zellen, die glukosehaltiges Medium erhalten hatten. Somit schien ein Mangel an nukleärem Acetyl-CoA nicht die Ursache für die Hemmung der strahleninduzierten Histonacetylierung nach einem Glukoseentzug in Tumorzellen zu sein. Im Vergleich zu den normalen Fibroblasten fiel jedoch auf, dass die A549 Zellen generell einen sehr niedrigen Acetyl-CoA-Gehalt im Zellkern aufwiesen. So konnte z. B. zum Zeitpunkt der Bestrahlung bei den unbestrahlten HSF7 Zellen unter normalen Glukosebedingungen ein gegenüber den entsprechenden A549 Zellen um das 9,5-Fache erhöhter Acetyl-CoA-Gehalt gemessen werden. Bei den HSF7 Zellen zeigte sich zudem, dass deren nukleärer Acetyl-CoA-Gehalt nicht durch einen Glukoseentzug beeinflusst wurde, denn unabhängig von der Bestrahlung konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied bezüglich des Acetyl-CoA-Gehalts der Zellen mit und der Zellen ohne Glukose nachgewiesen werden.

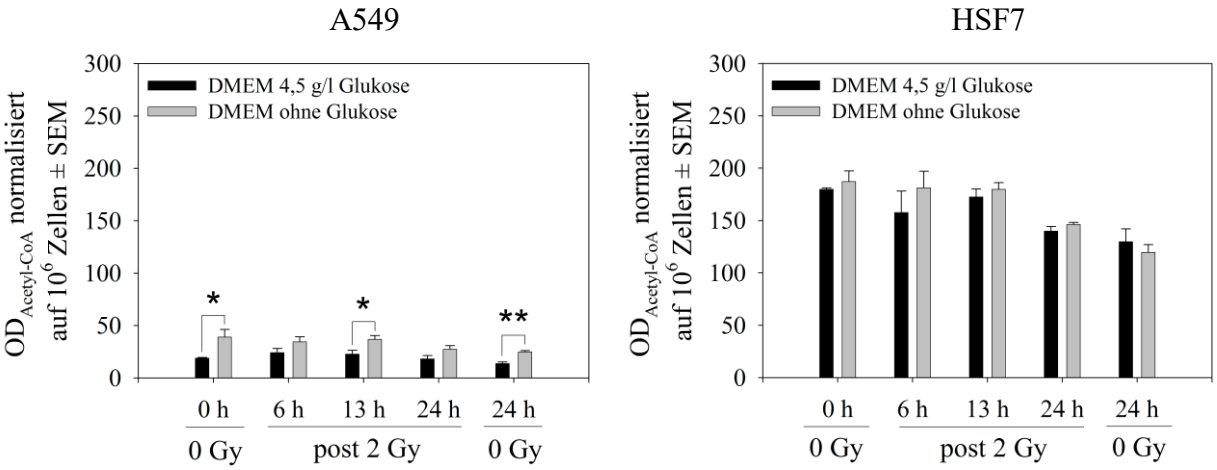


Abb. 3.14: Acetyl-CoA-Gehalt im Zellkern von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach Glukoseentzug und Bestrahlung mit 2 Gy. Konfluente A549 und HSF7 Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation in DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose mit 2 Gy bestrahlt. 6 h, 13 h und 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Bestimmung des Acetyl-CoA-Gehalts im Zellkern. In den unbestrahlten Kontrollen wurde der Gehalt an nukleärem Acetyl-CoA zum Zeitpunkt der Bestrahlung sowie 24 h danach bestimmt. Die Daten zeigen die optische Dichte (OD) der Proben normalisiert auf 10^6 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von jeweils 4 Datenpunkten aus 2 unabhängigen Experimenten für A549 und HSF7. Signifikante Unterschiede zwischen den Zellen mit und ohne Glukose wurden mittels des Student's *t*-Test ermittelt (*$p < 0,05$; **$p < 0,01$).

3.2.7 Beeinflussung der strahleninduzierten DNA-DSB-Reparatur von Tumorzellen nach Glukoseentzug durch Hemmung der Histondeacetylase Sirt1 mittels Sirtinol

In einer Arbeit von Chang et al. konnte gezeigt werden, dass es infolge eines Glukoseentzugs zu einer Aktivierung der Histondeacetylase Sirtuin-1 (Sirt1) kommt (Chang et al. 2015). Da die Histondeacetylierung bekanntermaßen die Kondensation des Chromatins fördert und die Chromatinstruktur wiederum die Reparatur von DNA-DSBs beeinflusst, sollte nachfolgend untersucht werden, wie sich eine Hemmung von Sirt1 mittels des Inhibitors Sirtinol auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs unter normalen und glukosefreien Bedingungen auswirkt. Hierdurch sollte geprüft werden, ob die Sirt1-stimulierte Histondeacetylierung für die unter glukosefreien Bedingungen beobachtete Hemmung der Reparatur strahleninduzierter DSBs in Tumorzellen (Kapitel 3.2.2) verantwortlich ist.

Um dies zu untersuchen, wurde bei konfluenten A549 Tumorzellen ein Wechsel zu glukosefreiem Medium oder Medium mit 4,5 g/l Glukose durchgeführt. 22 h später erfolgte die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 20 µM, 40 µM) an Sirtinol, die Kontrollen erhielten DMSO. 2 h nach der Behandlung wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt und 24 h nach der Bestrahlung wurde die Anzahl residueller γH2AX-Foci pro Zellkern

bestimmt. Aus Abb. 3.15 A wird ersichtlich, dass die Behandlung mit Sirtinol sowohl bei den Zellen mit als auch bei den Zellen ohne Glukose zu einer Zunahme der Anzahl residueller γH2AX-Foci nach der Bestrahlung führte. Wie bereits bei den bestrahlten Kontrollen beobachtet, waren auch nach der Behandlung mit den verschiedenen Sirtinol-Konzentrationen jeweils signifikant mehr γH2AX-Foci in den Zellen ohne Glukose als in den Zellen mit Glukose vorzufinden. Allerdings schwächte der Inhibitor den Effekt der infolge des Glukoseentzugs beeinträchtigten Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs ab. Dies wird aus Abb. 3.15 B deutlich, in der die relative Menge an γH2AX-Foci nach Normalisierung auf die jeweiligen Proben mit 4,5 g/l Glukose gezeigt wird. Hierbei ist zu sehen, dass die relative Menge an γH2AX-Foci der bestrahlten Zellen ohne Glukose nach der Sirtinol-Behandlung signifikant niedriger war als in der entsprechenden DMSO-behandelten Kontrolle, wobei die Größe des Effekts unabhängig von der Sirtinol-Konzentration war. So wurde die Anzahl residueller γH2AX-Foci nach der Bestrahlung bei der Kontrolle durch den Glukoseentzug im Mittel um das 1,9-Fache gegenüber den Zellen mit Glukose erhöht, während diese Erhöhung bei der Behandlung mit 10 µM, 20 µM und 40 µM Sirtinol nur noch jeweils das 1,4-, 1,4- und 1,5-Fache betrug. Somit konnte gezeigt werden, dass die nach einem Glukoseentzug in Tumorzellen beobachtete Beeinträchtigung der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs durch Sirtinol zum Teil aufgehoben wurde. Ohne eine Bestrahlung hatte die Sirtinol-Behandlung (20 µM) im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollen weder bei den Zellen mit noch bei den Zellen ohne Glukose einen Einfluss auf die Anzahl der γH2AX-Foci (Abb. 3.15 A).

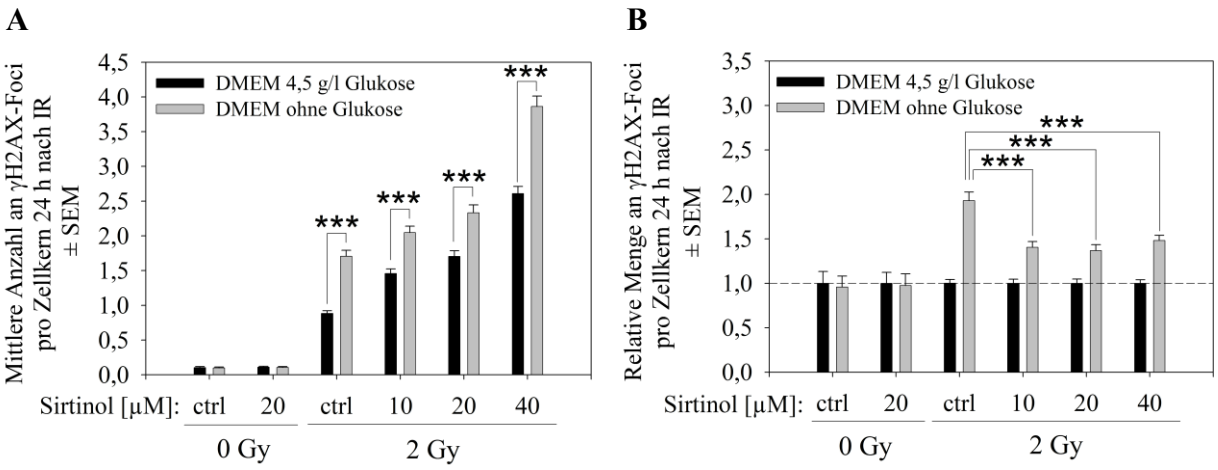


Abb. 3.15: Effekt einer Sirt1 Hemmung durch Sirtinol auf die Anzahl residueller γH2AX-Foci in Tumorzellen nach Glukoseentzug und Bestrahlung mit 2 Gy. Konfluente A549 Zellen erhielten einen Mediumwechsel zu DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose und wurden 22 h danach entweder mit DMSO (ctrl) oder Sirtinol (10 µM, 20 µM, 40 µM) behandelt. 2 h nach der Behandlung wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt und 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Bestimmung der Anzahl residueller γH2AX-Foci pro Zellkern. **A** Mittlere Anzahl an γH2AX-Foci pro Zellkern 24 h nach der Bestrahlung. **B** Relative Menge an γH2AX-Foci pro Zellkern 24 h nach der Bestrahlung. Die Anzahl der γH2AX-Foci der Zellen ohne Glukose wurde auf die Anzahl der γH2AX-Foci der korrespondierenden Zellen mit 4,5 g/l Glukose normalisiert. Die residuellen Schäden der Zellen mit Glukose wurden jeweils gleich 1 gesetzt. Pro Bedingung und Experiment wurden mindestens 300 Zellkerne ausgewertet. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Student's *t*-Test (***p < 0,001).

3.2.8 Bedeutung der Autophagie für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen nach Glukoseentzug

Zahlreiche Arbeiten belegen, dass es in Tumorzellen infolge einer Bestrahlung zur Aktivierung der Autophagie kommt (Apel et al. 2008, Bristol et al. 2012, Paglin et al. 2001). Zudem wird berichtet, dass auch ein Glukoseentzug Autophagie induziert (Chang et al. 2015, Chen Y. et al. 2012). Während gezeigt wurde, dass die strahleninduzierte Autophagie zur Resistenz von Tumorzellen gegenüber der Strahlung beitragen kann (Chaachouay et al. 2011, Lomonaco et al. 2009) und nachgewiesen wurde, dass die durch einen Nährstoffmangel aktivierte Autophagie cytoprotektiv wirkt (Boya et al. 2005), ist bisher noch unklar, wie sich die Autophagie nach Kombination eines Glukoseentzugs mit einer Bestrahlung auf die Strahlenantwort der Zellen auswirkt.

Um dies zu untersuchen, wurden konfluente A549 Tumorzellen 4 h nach einem Mediumwechsel zu DMEM ohne Glukose oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose mit dem Autophagie-Inhibitor Chloroquin-Diphosphat (5 µM) behandelt. Dieser bewirkt eine Erhöhung

des pH-Werts innerhalb der Lysosomen, wodurch deren Fusion mit den Autophagosomen sowie der lysosomale Proteinabbau gehemmt werden. 24 h nach dem Mediumwechsel erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy oder 4 Gy und wiederum 24 h danach wurde die Anzahl residueller γH2AX-Foci bestimmt. Wie in Abb. 3.16 zu sehen, hatte die Hemmung der Autophagie unter normalen Glukosebedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl residueller γH2AX-Foci, wenn die Zellen mit 2 Gy bestrahlt wurden. Erst nach einer Bestrahlung mit 4 Gy konnte in den Zellen mit Glukose ein signifikanter Anstieg der γH2AX-Foci nach der Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat verzeichnet werden. Dies zeigt, dass die Autophagie unter normalen Glukosebedingungen erst bei höheren Energiedosen einen Beitrag zur Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen leistet. Erfolgte jedoch ein Glukoseentzug, so konnte bei den A549 Zellen sowohl nach einer Bestrahlung mit 2 Gy als auch mit 4 Gy eine signifikante Zunahme der residuellen γH2AX-Foci durch die Hemmung der Autophagie beobachtet werden. Somit scheint die Autophagie bei der Durchführung eines Glukoseentzugs bereits nach der Bestrahlung mit niedrigeren Energiedosen zur Reparatur von DSBs in Tumorzellen beizutragen. Ohne Bestrahlung hatte die Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat gegenüber den unbehandelten Kontrollen weder bei den Zellen mit Glukose noch bei den Zellen ohne Glukose einen signifikanten Effekt auf die Anzahl der γH2AX-Foci.

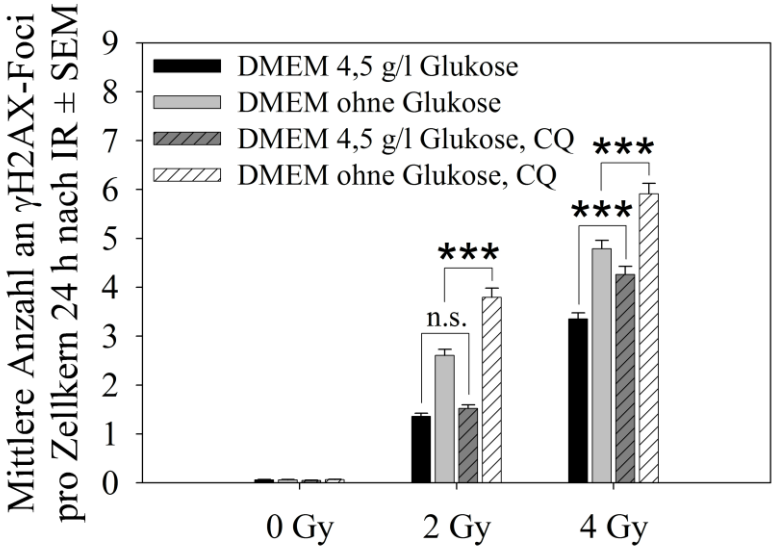


Abb. 3.16: Residuelle γH2AX-Foci in Tumorzellen unter normalen und glukosefreien Bedingungen nach Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat und Bestrahlung mit 2 Gy oder 4 Gy. Konfluente A549 Zellen erhielten einen Wechsel zu Medium ohne Glukose oder Medium mit 4,5 g/l Glukose und wurden 4 h später mit 5 µM Chloroquin-Diphosphat (CQ) behandelt. 24 h nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen mit 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt und 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Bestimmung der Anzahl residueller γH2AX-Foci pro Zellkern. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten, wobei pro Bedingung und Versuch mindestens 300 Zellkerne ausgewertet wurden. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's *t*-Test (***p < 0,001; n.s.: nicht signifikant).

3.2.9 Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration des Zellkulturmediums

Nachdem gezeigt wurde, dass ein vollständiger Glukoseentzug zu einer Beeinträchtigung der Reparatur strahleninduzierter DSBs in Tumorzellen führt (Kapitel 3.2.2), sollte nun untersucht werden, ob ein solcher Effekt auch durch eine Reduktion des Glukosegehalts im Zellkulturmedium auf Konzentrationen, die im menschlichen Blut erreichbar sind, erzielt werden kann. Hierdurch sollte überprüft werden, ob ein Glukoseentzug auch im klinischen Kontext das Potenzial besitzen könnte, die Wirkung einer strahlentherapeutischen Behandlung zu verbessern.

Um dies zu untersuchen, wurden konfluente A549 Zellen für 24 h in Medium mit 4,5 g/l, 1,0 g/l, 0,5 g/l, 0,2 g/l oder 0,0 g/l Glukose inkubiert und anschließend mit 2 Gy bestrahlt. 24 h nach der Bestrahlung wurde die Anzahl residueller γH2AX-Foci bestimmt. Aus Abb. 3.17 wird ersichtlich, dass eine Reduktion der Glukosekonzentration des Zellkulturmediums von 4,5 g/l auf 1,0 g/l keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl residueller γH2AX-Foci nach der Bestrahlung hatte. Wurde der Glukosegehalt jedoch auf 0,5 g/l oder 0,2 g/l gesenkt, kam es gegenüber den Zellen mit 4,5 g/l Glukose zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl residueller γH2AX-Foci nach Bestrahlung und zwar in gleichem Maße wie in den Zellen, die in glukosefreiem Medium inkubiert wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass kein vollständiger Glukoseentzug notwendig ist, um die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen zu beeinträchtigen, da der gleiche Effekt bereits durch eine Reduktion der Glukosekonzentration auf 0,5 g/l erzielt werden kann.

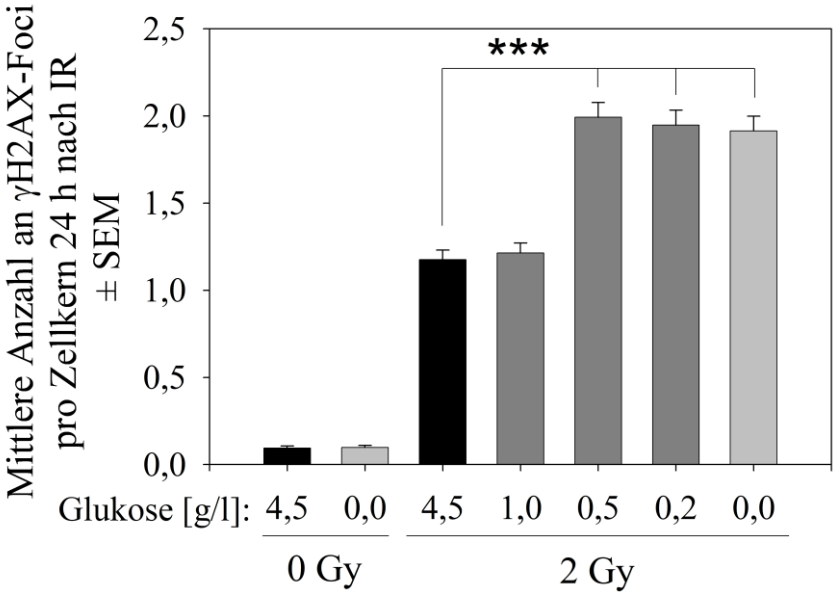


Abb. 3.17: Residuelle γH2AX-Foci in Tumorzellen nach Inkubation in Medium mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Bestrahlung mit 2 Gy. Konfluente A549 Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation in Medium mit 4,5 g/l, 1,0 g/l, 0,5 g/l, 0,2 g/l oder 0,0 g/l Glukose mit 2 Gy bestrahlt. 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Bestimmung der Anzahl residueller γH2AX-Foci pro Zellkern. Für jede Bedingung wurden pro Experiment mindestens 300 Zellkerne analysiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den bestrahlten Zellen mit 4,5 g/l Glukose sind gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bei den post hoc *t*-Tests wurde die Bonferroni-Korrektur angewandt (***$p < 0{,}001$).

3.3 Einfluss der Strahlentherapie auf den Glukosestoffwechsel von Tumorzellen unter normalen und glukosefreien Bedingungen

Ein charakteristisches Merkmal von Tumorzellen ist die bevorzugte Umsetzung von Glukose zu Laktat, unabhängig von der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration (Vander Heiden et al. 2009). Dieses als Warburg-Effekt oder aerobe Glykolyse bekannte Phänomen trägt zur Therapieresistenz bei der Behandlung von Krebs bei (Zhao Y. et al. 2013), weshalb es von großem Interesse ist, Behandlungsstrategien zu identifizieren, die zu einer Abschwächung des Warburg-Effekts führen. Da der besondere Metabolismus der Tumorzellen mit einer hohen Glukoseaufnahme einhergeht und der Glukoseverbrauch von Tumorzellen infolge einer Bestrahlung weiter ansteigt (Kapitel 3.2.1), sollte nachfolgend überprüft werden, ob ein Glukoseentzug im Rahmen einer Strahlenbehandlung die aerobe Glykolyse hemmen und damit die nach einem Glukoseentzug beobachtete Radiosensitivierung (Kapitel 3.2.3) der Tumorzellen begründen bzw. mitbegründen kann. Hierzu wurde der Glukoseabbau mittels

aerober Glykolyse bzw. Oxidation in den Mitochondrien nach einer Strahlenbehandlung unter normalen und glukosefreien Bedingungen untersucht, wobei die Bestimmung der Aktivität der LDH als Marker für das Ausmaß der aeroben Glykolyse herangezogen wurde, während die Messung der Aktivität des PDH-Komplexes als Maß für die mitochondriale Oxidation der Glukose diente.

3.3.1 Einfluss einer Strahlenbehandlung auf die aerobe Glykolyse in Tumorzellen unter normalen und glukosefreien Bedingungen

Die LDH ist ein Enzym, das die reversible Umsetzung von Pyruvat und NADH zu Laktat und NAD^+ katalysiert. Damit ist sie nicht nur für die anaerobe Glykolyse von Bedeutung, sondern spielt auch eine wesentliche Rolle bei der für Tumorzellen charakteristischen aeroben Glykolyse. Die LDH liegt als Tetramer vor, welches aus den beiden Untereinheiten LDHA und LDHB zusammengesetzt ist (Valvona et al. 2016). In zahlreichen Studien konnte eine erhöhte Expression der LDHA in Krebszellen nachgewiesen werden (Rong et al. 2013, Xian et al. 2015, Yao et al. 2013), wodurch, aufgrund der hohen Affinität der LDHA für Pyruvat, die Bildung von Laktat und damit auch der Warburg-Effekt verstärkt wird (Valvona et al. 2016). Zusätzlich zur Regulation auf Ebene der Genexpression erfolgt eine kurzfristige Regulation der LDHA-Aktivität durch eine Phosphorylierung an Y10, welche eine Erhöhung der Enzymaktivität bewirkt und somit ebenfalls den Warburg-Effekt begünstigt (Fan et al. 2011).

Um den Einfluss einer Strahlenbehandlung unter normalen und glukosefreien Bedingungen auf die Aktivität der LDHA und damit das Ausmaß der aeroben Glykolyse in Tumorzellen zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung des Enzyms an Y10 nach entsprechender Behandlung der Zellen bestimmt. Hierzu wurden die Tumorzellen A549 und FaDu zunächst für 72 h in DMEM mit 4,5 g/l Glukose oder DMEM ohne Glukose inkubiert und sodann mit 2 Gy bestrahlt. Jeweils 0,5 h, 5 h und 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Herstellung von Gesamtzelllysaten, welche mittels Western Blot analysiert wurden. Hierbei wurden die an Y10 phosphorylierte LDHA sowie das Gesamtprotein LDHA mittels spezifischer Antikörper detektiert. Unbestrahlte Zellen dienten als Kontrollen.

Abb. 3.18 zeigt, dass es sowohl bei den A549 als auch bei den FaDu Zellen unter normalen Glukosebedingungen zu einem strahleninduzierten Anstieg der LDHA-Phosphorylierung kam, wobei dieser bei FaDu im Vergleich zu A549 etwas stärker ausgeprägt war. Dies weist darauf hin, dass es bei beiden Tumorzelllinien unter normalen Glukosebedingungen infolge der

Bestrahlung zu einer erhöhten LDHA-Aktivität und damit zu einer Verstärkung des Warburg-Effekts kommt. Wurden die Zellen in glukosefreiem Medium kultiviert, so blieb die Phosphorylierung der LDHA bei den A549 Zellen infolge der Bestrahlung zunächst unverändert, ab 5 h nach der Bestrahlung konnte jedoch eine Abnahme der Phosphorylierung gegenüber der unbestrahlten Kontrolle beobachtet werden. Bei FaDu kam es unter diesen Bedingungen zunächst zu einem leichten strahleninduzierten Anstieg der LDHA-Phosphorylierung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, 24 h nach der Bestrahlung war jedoch auch hier eine verringerte Phosphorylierung zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass es unter glukosefreien Bedingungen spätestens 24 h nach der Bestrahlung bei beiden Tumorzelllinien zu einer Verminderung der LDHA-Aktivität gegenüber der unbestrahlten Kontrolle und damit zu einer strahleninduzierten Hemmung des Warburg-Effekts kommt. Sowohl bei den A549 als auch bei den FaDu Zellen war die LDHA-Phosphorylierung bei der Durchführung eines Glukoseentzugs zu jedem Zeitpunkt nach der Bestrahlung niedriger als in den Zellen, die glukosehaltiges Medium erhalten hatten. Dies verdeutlicht, dass die LDHA-Aktivität und damit die aerobe Glykolyse infolge der Bestrahlung generell geringer ist, wenn die Zellen einem Glukoseentzug unterzogen werden.

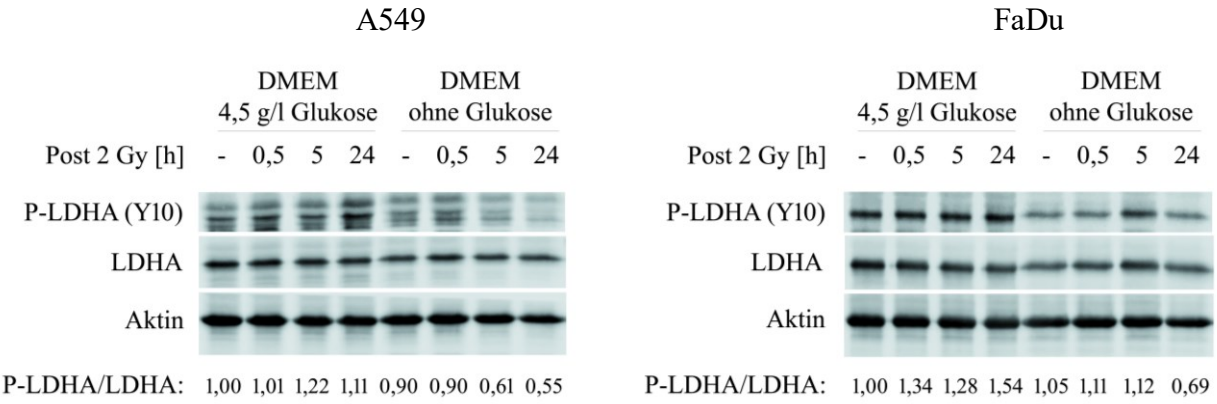


Abb. 3.18: Phosphorylierung der LDHA in Tumorzellen nach Bestrahlung mit 2 Gy unter normalen und glukosefreien Bedingungen. A549 und FaDu Zellen wurden für 72 h in Medium mit 4,5 g/l Glukose oder in glukosefreiem Medium inkubiert und anschließend mit 2 Gy bestrahlt. 0,5 h, 5 h und 24 h nach der Bestrahlung wurden Gesamtzelllysate hergestellt, um den Gehalt an P-LDHA (Y10) und LDHA mittels Western Blot zu untersuchen. Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind repräsentative Western Blots für A549 und FaDu. Der Quotient aus P-LDHA und LDHA wurde nach densitometrischer Auswertung bestimmt und auf die unbestrahlte Kontrolle mit Glukose normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus je 3 unabhängigen Experimenten für A549 und FaDu.

3.3.2 Einfluss einer Strahlenbehandlung auf die mitochondriale Glukoseoxidation in Tumorzellen unter normalen und glukosefreien Bedingungen

Der PDH-Komplex ist ein Multienzymkomplex, der in der Matrix der Mitochondrien vorzufinden ist. Dort katalysiert er die irreversible oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und stellt damit eine Verbindung zwischen der Glykolyse und dem Citratzyklus her. Der PDH-Komplex setzt sich aus den drei enzymatischen Komponenten E1, E2 und E3 zusammen, die in mehrfacher Ausfertigung im Komplex vorliegen. Bei der Komponente E1, der PDH, handelt es sich um ein Tetramer, das aus zwei α- und zwei β-Untereinheiten besteht, wobei die α-Untereinheit das aktive Zentrum von E1 enthält und eine Schlüsselrolle für die Funktion des PDH-Komplexes einnimmt (Maragos et al. 1989). So erfolgt auch die Regulation der Aktivität des PDH-Komplexes durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung der PDH-E1α-Untereinheiten. Hierbei führt u. a. die Phosphorylierung an S293 durch das Enzym Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK) zu einer Inaktivierung des PDH-Komplexes, während die Aktivität des Komplexes durch entsprechende Dephosphorylierung wiederhergestellt wird (Fan et al. 2014).

Da die Aktivität des PDH-Komplexes einen Hinweis darüber liefert, ob das aus der Glykolyse gewonnene Pyruvat zur Energiegewinnung in den Mitochondrien genutzt wird oder aber im Rahmen der aeroben Glykolyse zu Laktat verstoffwechselt wird (Fan et al. 2014), wurde im Folgenden der Phosphorylierungsstatus der PDH-E1α nach einer Bestrahlung unter normalen und glukosefreien Bedingungen bestimmt, um den Einfluss der Behandlung auf die Art der Energiegewinnung zu untersuchen. Hierzu wurden die Tumorzellen A549 und FaDu für 72 h in Medium mit 4,5 g/l Glukose oder in glukosefreiem Medium inkubiert und mit 2 Gy bestrahlt. 0,5 h, 5 h und 24 h nach der Bestrahlung erfolgte jeweils die Herstellung von Gesamtzelllysaten. Diese wurden mittels Western Blot analysiert, wobei die an S293 phosphorylierte PDH-E1α und das Gesamtprotein PDH-E1α mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen wurden. Unbestrahlte Zellen wurden als Kontrollen verwendet.

Wie in Abb. 3.19 zu sehen, kam es unter normalen Glukosebedingungen bei beiden Zelllinien 24 h nach der Bestrahlung zu einem Anstieg der PDH-E1α-Phosphorylierung, wobei dieser bei FaDu stärker ausgeprägt war als bei A549. Dies zeigt, dass die PDH-E1α und damit der gesamte PDH-Komplex bei normalen Glukosebedingungen 24 h nach der Bestrahlung gehemmt wird, was wiederum auf eine Abnahme der mitochondrialen Glukoseoxidation hinweist. Auch unter glukosefreien Bedingungen war 24 h nach der Bestrahlung bei beiden Tumorzelllinien eine Zunahme der PDH-E1α-Phosphorylierung gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle

zu beobachten. Allerdings war die Phosphorylierung der PDH-E1α nach dem Glukoseentzug zu jedem der untersuchten Zeitpunkte niedriger als in den Zellen, die glukosehaltiges Medium bekommen hatten. Dies deutet darauf hin, dass es unter glukosefreien Bedingungen insgesamt zu einer geringeren Hemmung des PDH-Komplexes und damit zu einer verstärkten Oxidation von Glukose in den Mitochondrien kommt, auch wenn diese 24 h nach der Bestrahlung auch hier gegenüber der unbestrahlten Kontrolle gehemmt wird.

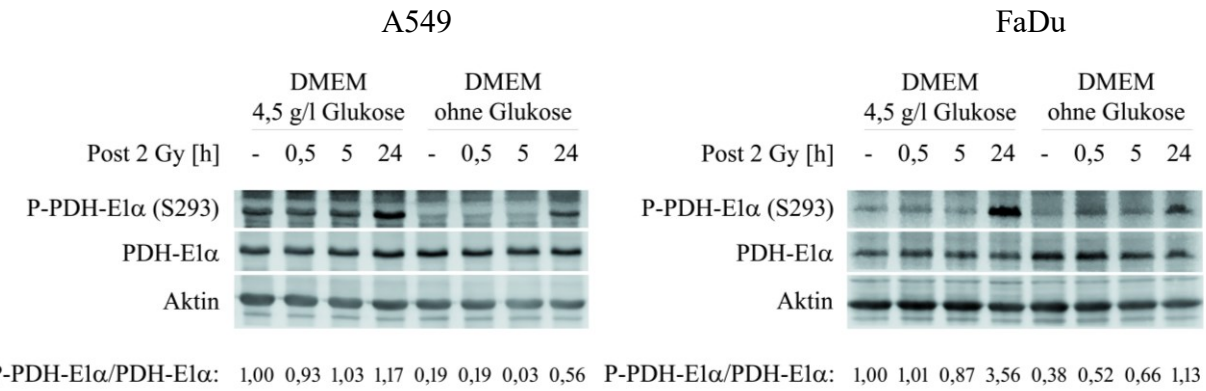


Abb. 3.19: Phosphorylierung der PDH-E1α in Tumorzellen nach Bestrahlung mit 2 Gy unter normalen und glukosefreien Bedingungen. Nach 72-stündiger Inkubation in Medium mit 4,5 g/l Glukose oder glukosefreiem Medium wurden A549 und FaDu Zellen mit 2 Gy bestrahlt. 0,5 h, 5 h und 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Herstellung der Gesamtzelllysate. Diese wurden mittels Western Blot hinsichtlich des Gehalts an P-PDH-E1α (S293) und PDH-E1α analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind repräsentative Western Blots für A549 und FaDu. Der Quotient aus P-PDH-E1α und PDH-E1α wurde nach densitometrischer Auswertung bestimmt und auf die unbestrahlte Kontrolle mit Glukose normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus je 2 unabhängigen Experimenten für A549 und FaDu.

4 Diskussion

Auch wenn die Strahlentherapie heutzutage bereits eine effektive Methode zur Behandlung von Tumoren darstellt, besteht das ständige Bestreben, neue Therapieansätze zu entwickeln, um den Erfolg einer strahlentherapeutischen Behandlung noch weiter zu verbessern. Dabei gilt es, Unterschiede zwischen Tumorzellen und Normalzellen zu nutzen, um die toxische Wirkung der Strahlung auf den Tumor zu verstärken und gleichzeitig Schäden am mitbestrahlten Normalgewebe zu minimieren. Da Tumorzellen aufgrund ihres besonderen Glukosestoffwechsels im Vergleich zu normalen Zellen eine starke Abhängigkeit von Glukose aufweisen und auf eine hohe Zufuhr dieses Nährstoffs angewiesen sind, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Durchführung eines Glukoseentzugs eine geeignete Strategie darstellt, um selektiv Tumorzellen gegenüber einer Bestrahlung zu sensitivieren.

4.1 Ein Glukoseentzug hemmt selektiv die Proliferation von Tumorzellen und führt zu deren Zelltod durch Nekrose

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Proliferation der beiden Tumorzelllinien A549 und FaDu durch einen Glukoseentzug stark beeinträchtigt wurde (Abb. 3.1) und dass diese Zellen auf die Zufuhr von Glukose angewiesen waren, um überleben zu können (Abb. 3.2). Dabei wurde deutlich, dass die FaDu Zellen im Vergleich zu den A549 Zellen empfindlicher auf den Glukoseentzug reagierten. Dies konnte auch durch die Messung der Zellvitalität nach Durchführung eines Glukoseentzugs für 96 h bestätigt werden (Abb. 3.5 B). Im Unterschied zu den Tumorzellen wurde bei den normalen Fibroblasten weder das Wachstum (Abb. 3.1) noch das Überleben (Abb. 3.2) durch einen Glukoseentzug beeinflusst. Diese Daten legen nahe, dass ein Glukoseentzug selektiv in Tumorzellen zu einer Beeinträchtigung des Wachstums sowie zum Zelltod führt. Dies konnte auch in einer Arbeit von Palorini et al. (Palorini et al. 2013) bestätigt werden, in der gezeigt wurde, dass transformierte Zellen in Medium mit geringer Glukosekonzentration (1 mM) langsamer proliferierten als in Medium mit hohem Glukosegehalt (25 mM). Nach 72-96-stündiger Inkubation im glukosearmen Medium kam es zum Zelltod der transformierten Zellen. Normale Zellen hingegen wiesen in Medium mit geringer und hoher Glukosekonzentration ein ähnliches Wachstum auf, welches nach 72-stündiger Inkubation aufgrund von Kontaktinhibition stagnierte. Sandulache et al. (Sandulache et al. 2011) konnten nachweisen, dass die Inkubation in glukosefreiem Medium

die Proliferation einer Reihe von HNSCC-Zelllinien, darunter auch FaDu, beeinträchtigte und zu deren Zelltod führte. Hierbei erwiesen sich die FaDu Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien als besonders empfindlich gegenüber dem Glukoseentzug. Auch Lee et al. (Lee C. et al. 2012) fanden einen antiproliferativen Effekt durch eine Reduktion der Glukosekonzentration des Zellkulturmediums auf 0,5 g/l in drei verschiedenen murinen Tumorzelllinien und zeigten, dass es durch die Behandlung verstärkt zum Zelltod kam. Zudem konnten sie *in vivo* beobachten, dass die Progression verschiedener Tumore durch Fasten verzögert wurde, wobei das Fasten zum Teil genauso effektiv war wie eine chemotherapeutische Behandlung. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Safdie et al. (Safdie F. et al. 2012) bei ihren Untersuchungen zum Einfluss des Fastens auf die Progression von Gliomen in Mäusen. Des Weiteren konnte in einer Arbeit von Saleh et al. (Saleh A. D. et al. 2013) anhand von Mausmodellen für Brustkrebs gezeigt werden, dass eine Kalorienrestriktion das Tumorwachstum um durchschnittlich 56 % gegenüber den *ad libitum* ernährten Kontrolltieren verzögern konnte. Dabei stellte sich heraus, dass die Tumore infolge der Kalorienrestriktion sowohl eine verminderte Proliferation als auch eine erhöhte Apoptose aufwiesen.

Die selektive Hemmung der Proliferation sowie die Induktion des Zelltods durch einen Glukoseentzug in Tumorzellen kann durch das Zusammenwirken verschiedener Mechanismen erklärt werden. So weisen Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen bereits basal einen sehr viel niedrigeren ATP-Gehalt auf. Wie in Vorarbeiten der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung der Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen gezeigt, ist der ATP-Gehalt der normalen Fibroblasten HSF7 60-mal höher als der von A549 Tumorzellen (Dittmann et al. 2013). Wird ein Glukoseentzug durchgeführt, kommt es in Tumorzellen zu einer weiteren Abnahme des ATP-Gehalts (Sandulache et al. 2011). Steigt das Verhältnis von AMP (Adenosinmonophosphat) zu ATP in der Zelle, wodurch ein Energiemangel signalisiert wird, kommt es zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) durch die Proteinkinase LKB1 (*liver kinase B1*). Die AMPK phosphoryliert daraufhin eine Reihe von Substraten und sorgt dadurch für die Hemmung ATP-verbrauchender anaboler Stoffwechselwege (z. B. Synthese von Fettsäuren), während ATP-generierende katabole Prozesse (z. B. Oxidation von Fettsäuren) stimuliert werden (Fay et al. 2009). Zusätzlich erfolgt eine AMPK-abhängige Aktivierung des Tumorsuppressors p53, wodurch es zum Zellzyklusarrest am G_1/S-Kontrollpunkt kommt (Jones et al. 2005). Des Weiteren führt die Aktivierung der AMPK zu einer Hemmung von mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), woraufhin die Proteinsynthese zum Erliegen kommt und das Zellwachstum eingestellt wird (El Mjiyad et al. 2011, Jones & Thompson 2009). All diese Prozesse stellen Mechanismen dar, die

das Überleben der Zellen unter Glukoseentzug begünstigen. Tumorzellen weisen jedoch häufig Mutationen auf, die zwar einerseits einen Proliferationsvorteil bewirken, andererseits aber durch eine Beeinträchtigung der genannten Regulationsmechanismen zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber einem Glukoseentzug führen (El Mjiyad et al. 2011). So sind bei nahezu der Hälfte der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome, darunter auch A549, inaktivierende homozygote LKB1-Mutationen vorzufinden (Sanchez-Cespedes 2007) und in etwa der Hälfte aller humaner Tumore, darunter auch FaDu, wird ein mutiertes p53-Protein exprimiert (Cheung & Vousden 2010, Somers et al. 1992). Tumorzellen, die diese Mutationen aufweisen, können nicht adäquat auf einen Energiemangel reagieren, weshalb es bei diesen Zellen infolge eines Glukoseentzugs zum Zelltod kommt (Fay et al. 2009, Shaw et al. 2004). Die cytotoxische Wirkung eines Glukoseentzugs auf Tumorzellen kann jedoch auch durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt werden. So konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen bereits unter basalen Bedingungen eine erhöhte Konzentration an ROS aufweisen und es wird vermutet, dass der erhöhte Glukosemetabolismus in Tumorzellen durch die Bereitstellung von NADPH und Pyruvat der Entgiftung dieser ROS dient (Aykin-Burns et al. 2009). Wird ein Glukoseentzug in Tumorzellen durchgeführt, so kommt es zu einer Abnahme der Konzentration an NADPH, welches für die Regeneration von Glutathion durch die Glutathion-Reduktase benötigt wird, und die Menge an ROS steigt an (Aykin-Burns et al. 2009, Graham et al. 2012). Schließlich führt der Glukoseentzug zum ROS-vermittelten Zelltod (Graham et al. 2012). In normalen Zellen dagegen konnte keine Erhöhung des oxidativen Stresses infolge eines Glukoseentzugs nachgewiesen werden (Spitz et al. 2000), zudem zeigte der Glukoseentzug hier, im Gegensatz zu den transformierten Zellen, keine oder nur eine sehr schwache cytotoxische Wirkung (Aykin-Burns et al. 2009, Spitz et al. 2000). Einen weiteren Mechanismus, der zum Zelltod von Tumorzellen nach einem Glukoseentzug beiträgt, stellt die sogenannte *unfolded protein response* (UPR) dar, die als Antwort auf Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) ausgelöst wird (El Mjiyad et al. 2011). So führt ein Glukoseentzug zu einer verminderten Glykosylierung von Proteinen, was die Akkumulation ungefalteter Proteine im endoplasmatischen Retikulum zur Folge hat und somit zum ER-Stress führt (Palorini et al. 2013). Die daraufhin ausgelöste UPR wirkt dem ER-Stress durch verschiedene Mechanismen entgegen. Kann der ER-Stress jedoch nicht kompensiert werden, z. B. weil der auslösende Stimulus lange anhält oder sehr stark ist, wird der Zelltod induziert (Kim et al. 2008). Dies konnte auch nach der Durchführung eines Glukoseentzugs in transformierten Zellen beobachtet werden, wo es durch eine anhaltende UPR-Aktivierung, die durch die Akkumulation ungefalteter Proteine verursacht wurde, zum Zelltod kam. Daneben

konnte auch in normalen Zellen eine Aktivierung der UPR infolge des Glukoseentzugs festgestellt werden. Diese war jedoch weniger stark ausgeprägt als bei den transformierten Zellen und führte nicht zum massiven Zelltod, weshalb anzunehmen ist, dass normale Zellen den Stress besser kompensieren können (Palorini et al. 2013).

Dass die FaDu Zellen in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer Proliferation und ihrem Überleben stärker durch den Glukoseentzug beeinträchtigt wurden als die A549 Zellen (Abb. 3.1, Abb. 3.2, Abb. 3.5 B), könnte auf den unterschiedlichen Genotyp der beiden Tumorzelllinien zurückzuführen sein. So wurde gezeigt, dass das Vorhandensein von Wildtyp-p53 eine gewisse Resistenz gegenüber einem Glukoseentzug bewirkt und einen Überlebensvorteil für die Zellen darstellt (Jones et al. 2005, Sandulache et al. 2011). Dabei konnte festgestellt werden, dass Zellen mit Wildtyp-p53 infolge eines Glukoseentzugs einen G_1-Arrest vollziehen, während ein Knockdown des Wildtyp-p53 dazu führt, dass die Zellen bereits zu einem früheren Zeitpunkt nach Beginn des Glukoseentzugs sterben, ohne zuvor in G_1 zu arretieren (Sandulache et al. 2011). Dies könnte prinzipiell erklären, weshalb FaDu Zellen, die ein mutiertes p53 aufweisen, empfindlicher auf einen Glukoseentzug reagieren als A549 Zellen mit Wildtyp-p53. Allerdings erfordert der p53-abhängige Zellzyklusarrest nach einem Glukoseentzug, wie bereits beschrieben, die Aktivierung der AMPK durch LKB1. Da LKB1 jedoch in A549 Zellen mutiert ist, kann es den überlebensfördernden Signalweg nicht aktivieren. Andererseits wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG), welche einen Glukoseentzug imitiert, bei A549 Zellen mit mutiertem LKB1 zu einer, wenn auch schwachen, Phosphorylierung der AMPK führt, weshalb vermutet wird, dass ein zusätzlicher, LKB1-unabhängiger Mechanismus zur Aktivierung der AMPK infolge eines Glukoseentzugs existiert (Mack & Munger 2013). Tatsächlich kann die AMPK-Aktivierung auch durch andere Kinasen als LKB1 erfolgen (Fay et al. 2009), inwiefern dies jedoch als Antwort auf einen Glukoseentzug von Bedeutung ist, ist noch unklar. Zudem wäre denkbar, dass die Aktivierung von p53 nach einem Glukoseentzug auch durch AMPK-unabhängige Mechanismen stattfindet kann.

Neben der Kontrolle des Zellzyklus spielt p53 jedoch auch eine Rolle bei der Regulation des Glukosemetabolismus, indem es die mitochondriale Atmung fördert und die Glykolyse hemmt (Cheung & Vousden 2010, Madan et al. 2011). Die Regulation der oxidativen Phosphorylierung erfolgt dabei vor allem durch die transkriptionelle Aktivierung von SCO2 (*synthesis of cytochrome c oxidase 2*), einem Metallchaperon, das für den Transfer von Kupfer zum Cytochrom *c* Oxidase Komplex, d. h. dem Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette,

benötigt wird und das für die Synthese der Cytochrom *c* Oxidase Untereinheit II (COX II) essentiell ist (Leary et al. 2009, Madan et al. 2011, Matoba et al. 2006). Die Hemmung der Glykolyse wird unter anderem durch die p53-induzierte Transkription von TIGAR (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*) vermittelt, welches durch eine Reduktion der zellulären Fructose-2,6-Bisphosphat-Konzentration die Aktivität des glykolytischen Enzyms Phosphofructokinase 1 (PFK1) vermindert (Bensaad et al. 2006). Somit geht in Tumorzellen der Erhalt des Wildtyp-p53 mit der Aufrechterhaltung der oxidativen Phosphorylierung einher, während ein Verlust der p53-Funktion zu einer Verstärkung der aeroben Glykolyse führt. Dabei hat der p53-Status keinen Einfluss auf die Gesamtmenge an ATP (Cheung & Vousden 2010), insofern ausreichend Glukose zur Verfügung steht. Kommt es jedoch zu einem Mangel dieses Nährstoffs, so ist anzunehmen, dass Zellen mit Wildtyp-p53 gegenüber p53-mutierten Zellen einen Überlebensvorteil haben, da sie die Glukose mit größerer ATP-Ausbeute verstoffwechseln können. Dies würde eine zusätzliche Erklärung liefern, weshalb A549 Zellen im Vergleich zu FaDu Zellen weniger sensibel auf einen Glukoseentzug reagieren. Gestützt wird diese Hypothese durch Vorarbeiten der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung der Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen, in denen eine erhöhte Expression von SCO2 sowie COX II in A549 Zellen gegenüber FaDu Zellen nachgewiesen werden konnte (Dissertation von Angela Paasch 2014).

In weiteren Experimenten der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass der Zelltod infolge eines Glukoseentzugs bei den beiden Tumorzelllinien A549 und FaDu fast ausschließlich durch Nekrose erfolgte, während die Apoptose hierbei nur eine äußerst untergeordnete Rolle spielte (Abb. 3.3, Abb. 3.4, Abb. 3.5 D). Eine Bestrahlung der Zellen mit einmal 2 Gy oder dreimal 2 Gy induzierte insgesamt gesehen weder Apoptose noch Nekrose und auch in Kombination mit einem Glukoseentzug konnte durch die Strahlenbehandlung kein wesentlicher Effekt zusätzlich zum Effekt des Glukoseentzugs alleine beobachtet werden (Abb. 3.3, Abb. 3.4, Abb. 3.5 C, Abb. 3.5 D). In der Literatur ist beschrieben, dass der durch einen Glukoseentzug bei Tumorzellen induzierte Zelltod sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose erfolgen kann (El Mjiyad et al. 2011, Lee Y. J. et al. 1997, Suzuki et al. 2003). Allerdings handelt es sich bei der Apoptose, im Unterschied zur Nekrose, um einen energieabhängigen Prozess (Elmore 2007) und so ist die Ausführung der Apoptose nur möglich, wenn ausreichend ATP in der Zelle vorhanden ist (Eguchi et al. 1997, Leist et al. 1997). Liegt eine ATP-Mangelsituation vor, so führen selbst apoptoseinduzierende Stimuli zum Zelltod durch Nekrose (Leist et al. 1997). In Vorarbeiten der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung der Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen konnte bereits gezeigt werden, dass eine

72-stündige Inkubation von A549 Zellen in glukosefreiem Medium eine Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts um ca. 70 % gegenüber den Kontrollzellen in Medium mit 4,5 g/l Glukose bewirkt (unveröffentlichte Daten). Daher ist es nicht verwunderlich, dass der in der vorliegenden Arbeit bei Tumorzellen beobachtete Zelltod nach der Durchführung eines Glukoseentzugs von bis zu 96 h vor allem durch Nekrose erfolgte, während die Apoptose in einer solchen ATP-Mangelsituation nur in äußerst geringem Maße auftrat. Der bei A549 und FaDu Zellen zwischen 72 h und 96 h nach dem Wechsel zu glukosefreiem Medium zu beobachtende Rückgang der Caspase 3-Aktivität (Abb. 3.3) könnte zudem darauf hindeuten, dass der ATP-Gehalt der Zellen zu diesem Zeitpunkt so stark vermindert war, dass der für die Apoptose benötigte kritische Wert unterschritten wurde. Ein derart niedriger ATP-Gehalt würde auch die verstärkte Zunahme der extrazellulären LDH-Aktivität und damit der Nekrose erklären, die sowohl bei A549 als auch bei FaDu Zellen nach einem Glukoseentzug für 72-96 h vorzufinden war (Abb. 3.4).

Die bei A549 wie auch bei FaDu ausbleibende Apoptoseinduktion nach der Bestrahlung ist vermutlich auf den epithelialen Ursprung der Zellen zurückzuführen. Während die Apoptose in Zellen hämatopoetischer Abstammung die vorherrschende Form des strahleninduzierten Zelltods darstellt, spielt sie in der Strahlenantwort von Zellen epithelialen Ursprungs nur eine untergeordnete Rolle (Eriksson & Stigbrand 2010). Bei den meisten Tumoren kommt es im Laufe der Progression zum Verlust der apoptotischen Mechanismen, beispielsweise infolge der häufig auftretenden Mutation von p53 (Eriksson & Stigbrand 2010). Daneben kann u. a. eine erhöhte Expression antiapoptotischer Proteine oder die Inaktivierung proapoptotischer Gene zur Apoptoseresistenz führen (Igney & Krammer 2002). Der strahleninduzierte Zelltod durch Nekrose konnte in verschiedenen Arbeiten beobachtet werden, allerdings scheint dessen Auftreten unter anderem von der Stärke des Stimulus sowie vom Zelltyp abhängig zu sein (Elmore 2007, Panganiban et al. 2013). So kam es bei Neuronen erst nach der Bestrahlung mit hohen Energiedosen (> 32 Gy) zum Zelltod durch Nekrose, während niedrigere Energiedosen bei diesen Zellen zur Apoptoseinduktion führten (Gobbel & Chan 2001). Den wichtigsten Zelltodmechanismus solider Tumoren nach einer Bestrahlung stellt nach heutigem Kenntnisstand jedoch die mitotische Katastrophe dar (Eriksson & Stigbrand 2010).

4.2 Die selektive Radiosensitivierung von Tumorzellen durch einen Glukoseentzug ist durch eine Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparatur bedingt

Infolge der Bestrahlung konnte bei beiden Tumorzelllinien A549 und FaDu eine dosisabhängige Zunahme des Glukoseverbrauchs beobachtet werden (Abb. 3.6). Dabei wiesen die A549 Zellen im Vergleich zu den FaDu Zellen einen generell niedrigeren Glukoseverbrauch auf, was vermutlich auf den Erhalt von Wildtyp-p53 zurückzuführen ist. So wirkt p53 dem mit einem hohen Glukoseverbrauch einhergehenden Warburg-Effekt entgegen, indem es die Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien aufrechterhält und gleichzeitig die GLUT-vermittelte Glukoseaufnahme sowie den Fluss durch die Glykolyse einschränkt (Cheung & Vousden 2010). Die Vermutung, dass der Glukosebedarf von Tumorzellen infolge der Bestrahlung ansteigt, wird durch eine Arbeit von Zhao et al. gestützt, in der eine strahleninduzierte, dosisabhängige Zunahme der Glukoseaufnahme bei Brustkrebszellen nachgewiesen wurde, welche mit einer verstärkten Expression des Glukosetransporters GLUT1 einherging (Zhao F. et al. 2016). Zudem konnten Dittmann et al. einen über Glukosetransporter der SGLT-Familie vermittelten strahleninduzierten Anstieg der Glukoseaufnahme bei A549 Zellen beobachten, während sie gleichzeitig zeigten, dass die Glukoseaufnahme der normalen Fibroblasten HSF7 nicht durch die Bestrahlung beeinflusst wurde (Dittmann et al. 2013). Dies deutet darauf hin, dass sich der Glukosebedarf infolge der Bestrahlung selektiv in Tumorzellen erhöht. Da Glukose eine Hauptenergiequelle für Tumorzellen darstellt (Sandulache et al. 2011) und sich deren ohnehin im Vergleich zu normalen Fibroblasten schon niedriger basaler ATP-Gehalt infolge einer Bestrahlung weiter verringert (Dittmann et al. 2013), liegt die Vermutung nahe, dass der erhöhte Glukosebedarf auf einen gesteigerten ATP-Verbrauch nach der Bestrahlung zurückzuführen ist.

Einen wesentlichen energieverbrauchenden Prozess infolge einer Strahlenbehandlung stellt die Reparatur von DNA-DSBs dar (Kapitel 1.2.3). Um zu überprüfen, ob das Vorhandensein von Glukose für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs essentiell ist, wurde der Einfluss eines Glukoseentzugs auf die DSB-Reparatur nach Bestrahlung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Entzug von Glukose die DSB-Reparaturkapazität beider Tumorzelllinien A549 und FaDu verringerte, sodass es zu einer signifikanten Erhöhung der residuellen γH2AX-Foci 24 h nach der Bestrahlung kam. 1 h und 6 h nach der Bestrahlung konnte jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der γH2AX-Foci zwischen den Zellen mit und ohne Glukose festgestellt werden (Abb. 3.7 B). Dies deutet darauf hin, dass Tumorzellen die Glukose im Rahmen der

DNA-DSB-Reparatur für Prozesse benötigen, die zwischen 6 h und 24 h nach der Bestrahlung stattfinden. Bei den normalen Fibroblasten HSF7 konnte ebenfalls nur 24 h nach der Bestrahlung ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl an γH2AX-Foci zwischen den Zellen mit und ohne Glukose beobachtet werden, allerdings führte der Glukoseentzug hier zu einer verbesserten Reparaturkapazität, wobei der Effekt jedoch sehr klein war (Abb. 3.7 B). Die unterschiedliche Beeinflussung der DNA-DSB-Reparaturkapazität von Tumorzellen und normalen Fibroblasten durch einen Glukoseentzug könnte auf den unterschiedlichen ATP-Gehalt der Zellen zurückzuführen sein. Wie bereits erwähnt, ist die intrazelluläre ATP-Konzentration der normalen Fibroblasten HSF7 60-mal höher als die der Tumorzellen A549 (Dittmann et al. 2013). Somit scheinen normale Fibroblasten aufgrund ihrer hohen ATP-Reserven nicht auf die Zufuhr von Glukose angewiesen zu sein, um die energieaufwendige Reparatur von DNA-DSBs bewerkstelligen zu können. In Tumorzellen hingegen sind die geringen ATP-Reserven schnell erschöpft, wenn die Zufuhr von Glukose ausbleibt, was die Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparatur nach der Bestrahlung erklären könnte.

Der Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs ist bisher jedoch kaum erforscht und nur in wenigen Arbeiten beschrieben. So zeigten Yamamori et al. (Yamamori et al. 2013), dass ein 12-stündiger Glukoseentzug bei A549 Zellen zu einer Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparatur nach einer Bestrahlung mit 1 Gy führte, wobei die Anzahl der γH2AX-Foci infolge des Glukoseentzugs bereits 1 h, 2 h und 6 h nach der Bestrahlung signifikant gegenüber den Kontrollen mit Glukose erhöht war. Eine Normalisierung der Anzahl an γH2AX-Foci auf die nach 1 h jeweils in den Zellen mit und ohne Glukose erhaltenen Werte, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, würde den Effekt des Glukoseentzugs jedoch vermutlich weitestgehend aufheben und somit bestätigen, dass die DSB-Reparaturkapazität von A549 Zellen bis 6 h nach der Bestrahlung nicht durch einen Glukoseentzug beeinflusst wird. Eine Messung der Anzahl an γH2AX-Foci zu späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde in der genannten Arbeit nicht durchgeführt. Yamamori et al. zeigten zudem, dass es infolge eines Glukoseentzugs zur Induktion von ER-Stress und dadurch zu einem verstärkten proteasomalen Abbau des Proteins Rad51 kommt, welches eine wesentliche Rolle bei der DNA-DSB-Reparatur durch homologe Rekombination spielt (Baumann & West 1998). Dies könnte eine Beeinträchtigung der DSB-Reparatur nach einem Glukoseentzug erklären. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch ausschließlich konfluente Zellen für die Versuche verwendet wurden, spielt die homologe Rekombination im Rahmen der DSB-Reparatur hier nur eine untergeordnete Rolle. In einer anderen Arbeit, die ebenfalls die Beeinflussung der DNA-Reparaturmaschinerie durch einen Glukoseentzug untersuchte (Li

J. et al. 2009), führte ein Glukoseentzug für 4 h in humanen Kolon- und Prostatakrebszellen zu einer erhöhten Expression des DNA-Reparaturproteins Ku, welches an der DNA-DSB-Reparatur durch nicht-homologe Endverknüpfung beteiligt ist (Davis & Chen 2013). Ob dies jedoch tatsächlich in einer verbesserten Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs resultierte, wurde in der genannten Arbeit nicht gezeigt.

Abb. 3.7 A verdeutlicht, dass die Induktion der DNA-DSBs 1 h nach der Bestrahlung bei keiner der untersuchten Zelllinien durch einen Glukoseentzug beeinflusst wurde. Zudem wird ersichtlich, dass bei FaDu im Vergleich zu A549 und HSF7 deutlich mehr DSBs durch die Bestrahlung induziert wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der unterschiedliche p53-Status der Zellen liefern. So ist bekannt, dass p53 die Transkription von TIGAR aktiviert, welches die Glykolyse hemmt und den Abbau der Glukose über den Pentosephosphatweg stimuliert (Cheung & Vousden 2010, Madan et al. 2011). Dies führt über die erhöhte Bereitstellung von NADPH zu einem verbesserten antioxidativen Schutz und damit zu einer verstärkten Abwehr strahleninduzierter Radikale, was wiederum mit einer geringeren Induktion von DNA-DSBs einhergeht. FaDu Zellen, die kein funktionelles p53 aufweisen, entziehen sich diesem Schutzmechanismus. Ohne eine Bestrahlung der Zellen wurde die Anzahl der γH2AX-Foci in keiner der untersuchten Zelllinien signifikant durch den Glukoseentzug beeinflusst (Abb. 3.7 B). Hieraus wird ersichtlich, dass der Glukoseentzug per se keine Schädigung der DNA in Form von DSBs bewirkt. Dies konnte in einer Arbeit von Suzuki et al. bestätigt werden, in der eine 24-stündige Inkubation in glukosefreiem Medium keine DNA-DSBs in humanen HepG2-Leberkrebszellen induzierte (Suzuki et al. 2003). Auch Yamamori et al. fanden in A549 Zellen nach der Durchführung eines Glukoseentzugs für 12 h keine signifikante Veränderung der Anzahl an γH2AX-Foci gegenüber der Kontrolle, die Glukose erhalten hatte (Yamamori et al. 2013).

Da angenommen wird, dass die Anzahl der 24 h nach der Bestrahlung verbleibenden residuellen γH2AX-Foci mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit korreliert (Klokov et al. 2006, Menegakis et al. 2009), wurde überprüft, ob sich die beobachteten Effekte eines Glukoseentzugs auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs auch im klonogenen Überleben der Zellen widerspiegeln. Dabei wurde ersichtlich, dass die infolge eines Glukoseentzugs bei A549 und FaDu auftretende Beeinträchtigung der Reparatur strahleninduzierter DSBs (Abb. 3.7 B) mit einer Radiosensitivierung der beiden Tumorzelllinien einherging (Abb. 3.8). Bei den normalen Fibroblasten HSF7 hingegen führte der Glukoseentzug zu einer leichten Verbesserung der DSB-Reparaturkapazität (Abb. 3.7 B),

wobei dieser Effekt jedoch so klein war, dass er sich nicht auf das klonogene Zellüberleben nach der Bestrahlung auswirkte (Abb. 3.8).

Die Wirkung eines Glukoseentzugs auf die Strahlenempfindlichkeit von Zellen wurde bisher *in vitro* nur unzureichend untersucht. In der bereits zuvor erwähnten Arbeit von Li et al. (Li J. et al. 2009) führte ein Glukoseentzug in humanen Kolon- und Prostatakrebszellen zu einer erhöhten Radioresistenz, was im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht. Dies könnte auf Unterschiede in der Versuchsdurchführung zurückzuführen sein. So wurden die Zellen bei Li et al. vor der Bestrahlung nur vergleichsweise kurz, nämlich für 4 h, in glukosefreiem Medium inkubiert, zudem erhielten sie direkt nach der Bestrahlung frisches Medium mit Glukose. Aufgrund dieser Behandlung ist davon auszugehen, dass die Zellen während der DNA-Reparatur nach der Bestrahlung keinem Energiemangel ausgesetzt waren, weshalb zumindest keine Radiosensitivierung zu erwarten war. In anderen Arbeiten konnte die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber einer Bestrahlung durch eine Hemmung des Glukosetransporters GLUT1 (Zhao F. et al. 2016) oder eine Behandlung mit dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose (Lin et al. 2003) verstärkt werden. In normalen Zellen dagegen bewirkte 2-DG keine Erhöhung der Radiotoxizität (Swamy et al. 2005). Dies stützt die Hypothese, dass eine Hemmung des Glukosemetabolismus selektiv in Tumorzellen zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit führt. Zudem konnte in verschiedenen *in vivo*-Untersuchungen gezeigt werden, dass durch die Kombination einer Strahlenbehandlung mit einem Glukoseentzug in Form von Fasten, einer Kalorienrestriktion oder einer ketogenen Diät das Tumorwachstum stärker gehemmt wird als durch die jeweilige Ernährungsmaßnahme oder die Bestrahlung alleine (Abdelwahab et al. 2012, Allen et al. 2013, Safdie F. et al. 2012, Saleh A. D. et al. 2013).

Neben der radiosensitivierenden Wirkung konnte im Koloniebildungstest auch ein antiproliferativer Effekt des Glukoseentzugs bei den beiden Tumorzelllinien beobachtet werden, welcher sich in einer Abnahme der Koloniebildungseffizienz der unbestrahlten Zellen zeigte. Dieser war bei den FaDu Zellen deutlich stärker ausgeprägt als bei den A549 Zellen, während er bei den normalen Fibroblasten HSF7 überhaupt nicht vorzufinden war (Tab. 3.2). Dies bestätigte die Ergebnisse des Proliferationsassays (Abb. 3.1, Tab. 3.1), welche bereits in Kapitel 4.1 ausführlich diskutiert wurden. Zudem belegen auch andere Arbeiten, dass ein Glukoseentzug ohne eine Bestrahlung selektiv in Tumorzellen, nicht jedoch in normalen Zellen, zu einer Abnahme des klonogenen Überlebens führt (Aykin-Burns et al. 2009, Spitz et al. 2000).

Um zu überprüfen, ob die Wirkung einer strahlentherapeutischen Behandlung auch durch eine Reduktion der Glukosekonzentration auf Werte, die im menschlichen Blut erreichbar sind, verbessert werden kann, wurde die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs nach einer Inkubation der A549 Tumorzellen in Medium mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Reduktion der Glukose auf 0,5 g/l genügte, um die DSB-Reparatur in gleichem Maße zu beeinträchtigen wie durch einen vollständigen Glukoseentzug, während die Anzahl residueller DSBs bei einer Glukosekonzentration von 1 g/l genauso niedrig war wie in den Zellen, die 4,5 g/l Glukose erhalten hatten (Abb. 3.17). Aufgrund des maximalen Unterschieds der Anzahl an γH2AX-Foci zwischen den Zellen mit 0,5 g/l und 1 g/l Glukose ist jedoch davon auszugehen, dass auch bei Konzentrationen, die sich zwischen diesen Werten befinden, schon ein Effekt zu erzielen ist. Eine Senkung des Blutzuckerspiegels auf Werte innerhalb des genannten Bereichs könnte somit möglicherweise die Wirksamkeit einer Strahlenbehandlung verbessern. So liegt beim Menschen eine normale Nüchtern-Plasmaglukosekonzentration bereits unterhalb 1 g/l (Müller-Wieland et al. 2016) und dieser Wert kann durch eine Fastenperiode von 1 bzw. 2 Tagen durchschnittlich auf etwa 0,7 g/l bzw. 0,5 g/l gesenkt werden (Unger et al. 1963). Zwar ist ein langfristiges Fasten im Rahmen einer Tumortherapie nicht durchführbar, aber es konnte anhand von Mausmodellen gezeigt werden, dass schon die wiederholte Durchführung von zweitägigen Fastenperioden die Wirksamkeit einer Strahlentherapie wie auch einer Chemotherapie verbessern kann (Lee C. et al. 2012, Safdie F. et al. 2012). Auf diese Weise wären die positiven Effekte des Fastens möglicherweise auch bei Krebspatienten nutzbar.

4.3 Die Beeinträchtigung der langsamen Komponente der DNA-DSB-Reparatur durch einen Glukoseentzug in Tumorzellen ist auf eine Hemmung der Chromatinrelaxation zurückzuführen

Bereits die in Abb. 3.7 dargestellten Ergebnisse ließen vermuten, dass die Glukose von A549 und FaDu Zellen während der DNA-DSB-Reparatur für Prozesse gebraucht wird, die im Zeitraum zwischen 6 h und 24 h nach der Bestrahlung stattfinden. Weitere Untersuchungen mit A549 Zellen zeigten, dass ein Glukoseentzug für 24 h vor der Bestrahlung keinen Einfluss auf die Reparatur von DNA-DSBs hatte, wenn Glukose während der Reparaturzeit nach der Bestrahlung vorhanden war (Abb. 3.9). Stand den A549 Zellen jedoch für mindestens 13 h nach

der Bestrahlung keine Glukose zur Verfügung, so führte dies zu einer signifikanten Beeinträchtigung der DSB-Reparatur und zwar in gleichem Maße wie in den Zellen, bei denen der Glukoseentzug über die gesamte Dauer des Experiments und somit bis 24 h nach der Bestrahlung durchgeführt wurde (Abb. 3.10). Diese Daten verdeutlichen, dass Tumorzellen die Glukose erst für späte Reparaturprozesse, beginnend ab 13 h nach der Bestrahlung, benötigen. Die frühen Reparaturprozesse hingegen scheinen unabhängig vom Vorhandensein von Glukose zu sein.

Goodarzi et al. berichteten, dass die Reparatur von DNA-DSBs in eine schnelle und eine langsame Komponente unterteilt werden kann. So wird der Großteil der strahleninduzierten DNA-DSBs (75-90 %) mit einer schellen Kinetik innerhalb von 4-6 h nach der Induktion repariert, wobei es sich hierbei um DSBs handelt, die innerhalb des Euchromatins vorzufinden sind. 10-25 % der induzierten Läsionen liegen hingegen im Heterochromatin und werden mit einer langsamen Kinetik repariert. Sie stellen die Mehrheit der zu späteren Zeitpunkten (> 8 h) nach der Bestrahlung verbleibenden DNA-DSBs dar (Goodarzi et al. 2010). Die Reparatur heterochromatischer DSBs ist dabei abhängig von ATM (Goodarzi et al. 2008), welches über eine Phosphorylierung von KAP1 eine Chromatinrelaxation bewirkt und damit den Reparaturproteinen den Zugang zur Läsion erleichtert (Ziv et al. 2006). Aufgrund der Beobachtung, dass die Glukose in Tumorzellen erst ab 13 h nach der Bestrahlung für die DNA-DSB-Reparatur benötigt wird, ist davon auszugehen, dass ein Glukoseentzug vor allem die mit langsamer Kinetik erfolgende Reparatur heterochromatischer DSBs beeinträchtigt. Die Reparatur von DSBs innerhalb des Euchromatins hingegen sollte bis 13 h nach der Bestrahlung weitestgehend abgeschlossen sein und somit nicht wesentlich durch einen Glukoseentzug beeinflusst werden.

Auch wenn die Verpackung der DNA in Form von Chromatin allgemein ein Hindernis für die Reparatur von DSBs ist, stellt das stark kondensierte Heterochromatin hierbei eine besonders große Barriere dar (Goodarzi et al. 2010, Price & D'Andrea 2013). Die Dekondensation des Heterochromatins gilt daher als kritischer Schritt im Rahmen der Reparatur heterochromatischer DSBs (Goodarzi et al. 2008), da sie notwendig ist, um den Schaden für die Reparaturmaschinerie zugänglich zu machen (Price & D'Andrea 2013). Weil es sich bei der Öffnung der Chromatinstruktur im Bereich des DNA-DSBs um einen energieabhängigen Prozess handelt (Kruhlak et al. 2006), lag die Vermutung nahe, dass ein Glukoseentzug diesen Vorgang hemmen und damit auch die Reparatur vor allem heterochromatischer DSBs

beeinträchtigen könnte. Dies könnte insbesondere bei Tumorzellen von Bedeutung sein, da diese nur über geringe ATP-Reserven verfügen (Dittmann et al. 2013).

Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit anhand von Untersuchungen mittels der Tumorzelllinien A549 und FaDu bestätigt werden. Hierbei zeigte sich, dass die mit einer Chromatinrelaxation einhergehende Histonacetylierung, die nach einer Bestrahlung bei beiden Tumorzelllinien vorzufinden war, durch einen Glukoseentzug gehemmt wurde (Abb. 3.11, Abb. 3.12). Dieser Effekt konnte bereits zu frühen Zeitpunkten, nämlich zwischen 0,5 h und 5 h, nach der Bestrahlung beobachtet werden (Abb. 3.11). Da sich ein Glukoseentzug zu diesen Zeitpunkten jedoch nicht auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs auswirkt, kann angenommen werden, dass die frühe Reparaturphase unabhängig von der Histonacetylierung, zumindest von Histon H3 an K9, ist. Somit kann vermutet werden, dass die Chromatinrelaxation für die schnelle Komponente der DNA-DSB-Reparatur und somit für die Reparatur euchromatischer DSBs in Tumorzellen von untergeordneter Bedeutung ist. Die Hemmung der strahleninduzierten Histonacetylierung infolge eines Glukoseentzugs trat bei den A549 Zellen jedoch auch zwischen 6 h und 13 h nach der Bestrahlung auf (Abb. 3.12), also zu den Zeitpunkten, zu denen hauptsächlich heterochromatische DSBs repariert werden. Zusätzlich konnte bei den A549 Zellen zwischen 8 h und 13 h nach der Bestrahlung eine Hemmung der strahleninduzierten KAP1-Phosphorylierung nach der Durchführung eines Glukoseentzugs beobachtet werden (Abb. 3.13). Da die über ATM vermittelte Phosphorylierung von KAP1 und die damit einhergehende Chromatinrelaxation wesentlich für die Reparatur von DNA-DSBs im Heterochromatin sind (Goodarzi et al. 2008), ist davon auszugehen, dass die Hemmung der KAP1-Phosphorylierung durch den Glukoseentzug in einer Beeinträchtigung der Reparatur heterochromatischer DSBs resultiert. Zusammenfassend scheint ein Glukoseentzug in Tumorzellen somit über eine Hemmung der strahleninduzierten Chromatinrelaxation die langsame Komponente der DNA-DSB-Reparatur und damit die Reparatur heterochromatischer DSBs zu beeinträchtigen, während die Reparatur euchromatischer DSBs nicht durch diese Prozesse gestört wird. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen vermuten auch Goodarzi et al. (Goodarzi et al. 2008), dass die Reparatur von DNA-DSBs im Euchromatin keine lokale Öffnung der Chromatinstruktur erfordert, da die Reparaturproteine bereits freien Zugang zum DSB haben. DSBs im Heterochromatin hingegen sind für die Reparaturproteine kaum zugänglich, so dass eine über ATM und KAP1 vermittelte Chromatinrelaxation notwendig ist, um die Reparatur zu erleichtern.

Im Unterschied zu den Tumorzellen wurden bei den normalen Fibroblasten HSF7 die Histonacetylierung sowie die KAP1-Phosphorylierung zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach der Bestrahlung durch einen Glukoseentzug beeinflusst (Abb. 3.12, Abb. 3.13). Dies lässt vermuten, dass ein Glukoseentzug bei den HSF7 Zellen keinen Einfluss auf die Chromatinstruktur nach der Bestrahlung hat. Dieses Ergebnis passt zu der Beobachtung, dass der Entzug von Glukose bei den normalen Fibroblasten, im Gegensatz zu den Tumorzellen, zu keiner Beeinträchtigung der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs führte (Abb. 3.7). Die bei den HSF7 Zellen sowohl unter normalen als auch glukosefreien Bedingungen auftretende strahleninduzierte Phosphorylierung von KAP1 (Abb. 3.13) deutet auf eine Öffnung heterochromatischer DNA-Strukturen hin, welche für die Reparatur von DSBs innerhalb des Heterochromatins wesentlich ist (Iyengar & Farnham 2011). Der Einfluss der Bestrahlung auf die Acetylierung von Histon H3 und Histon H4 ist bei den HSF7 Zellen jedoch zum Teil widersprüchlich und nur schwer zu interpretieren (Abb. 3.12). Die Ergebnisse lassen allerdings vermuten, dass die strahleninduzierte Histonacetylierung und die damit verbundene Chromatinrelaxation bei den HSF7 Zellen im Vergleich zu den A549 Zellen von untergeordneter Bedeutung sind. Dies könnte möglicherweise auf Unterschiede bezüglich der Dichte des Chromatins in Tumorzellen und normalen Zellen zurückzuführen sein. So kommt es in Tumorzellen häufig zu einer verstärkten Bildung großer Heterochromatin-Aggregate, dem sogenannten *chromatin coarsening*, welches in normalen Zellen nur äußerst selten auftritt (Zink et al. 2004). Zudem könnte auch der unterschiedliche DNA-Gehalt von Tumorzellen und normalen Zellen einen Einfluss auf den Kondensationsgrad des Chromatins haben. Denn während normale humane Zellen einen diploiden Chromosomensatz aufweisen, konnte bei verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem auch bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, eine Chromosomenzahl im triploiden Bereich nachgewiesen werden (Petersen et al. 2009, Schulze & Petersen 2011). Dabei wäre denkbar, dass die Triploidie eine erhöhte Kondensation des Chromatins erforderlich macht, um die DNA im Zellkern unterzubringen. Eine stärkere Kondensation des Chromatins in Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen könnte mit einer gesteigerten Notwendigkeit der Histonacetylierung im Rahmen der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs einhergehen und so die unter normalen Glukosebedingungen zwischen A549 und HSF7 Zellen beobachteten Unterschiede bezüglich der Histonacetylierung (Abb. 3.12) erklären.

Da Glukose als wichtige Ausgangssubstanz für die Bereitstellung des für die Histonacetylierung benötigten Acetyl-CoAs gilt (Wellen et al. 2009), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die in Tumorzellen nach der Durchführung eines Glukoseentzugs

beobachtete Hemmung der strahleninduzierten Histonacetylierung auf einen Mangel an nukleärem Acetyl-CoA zurückzuführen ist. Entgegen den Erwartungen resultierte der Glukoseentzug bei den Tumorzellen A549 jedoch nicht in einer Abnahme, sondern in einer Zunahme der Acetyl-CoA-Konzentration im Zellkern, welche unabhängig von der Bestrahlung der Zellen auftrat (Abb. 3.14). Somit konnte bei den Tumorzellen ein Mangel an nukleärem Acetyl-CoA als Ursache für die Hemmung der strahleninduzierten Histonacetylierung durch einen Glukoseentzug ausgeschlossen werden. Fraglich bleibt jedoch, wie der nukleäre Pool an Acetyl-CoA nach einem Glukoseentzug aufrechterhalten bleibt. In diesem Zusammenhang konnte in einer Arbeit von McDonnell et al. gezeigt werden, dass neben Glukose auch die Oxidation von Lipiden zur Bereitstellung von Acetyl-CoA für die Histonacetylierung beitragen kann (McDonnell et al. 2016). Andererseits könnte bei den Tumorzellen auch ein unter glukosefreien Bedingungen allgemein verminderter Verbrauch von Acetyl-CoA, z. B. aufgrund der geringeren Histonacetylierung, die gegenüber den Zellen mit Glukose erhöhte nukleäre Acetyl-CoA-Konzentration erklären. Bei den normalen Fibroblasten HSF7 hatte der Glukoseentzug, unabhängig von der Bestrahlung, keinen signifikanten Einfluss auf die Menge an nukleärem Acetyl-CoA (Abb. 3.14), was ebenfalls durch den Gewinn von Acetyl-CoA durch die Oxidation von Lipiden bedingt sein könnte. Zudem könnte ein ähnlicher Acetyl-CoA-Verbrauch unter glukosehaltigen und glukosefreien Bedingungen zu diesem Ergebnis beitragen. Außerdem wiesen die normalen Fibroblasten gegenüber den A549 Zellen generell eine deutlich höhere Konzentration an nukleärem Acetyl-CoA auf (Abb. 3.14). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass normale Zellen, im Unterschied zu Tumorzellen, Glukose hauptsächlich unter Nutzung der Mitochondrien verstoffwechseln (Vander Heiden et al. 2009), was ihnen die Bildung größerer Mengen Acetyl-CoA ermöglicht. Damit das in den Mitochondrien gebildete Acetyl-CoA jedoch in den Zellkern gelangen kann und somit für die Histonacetylierung zur Verfügung steht, muss es zunächst zu Citrat umgewandelt werden. Dieses wird sodann über die innere Mitochondrienmembran transportiert, woraufhin es in den Zellkern diffundieren kann. Im Zellkern wird das Citrat schließlich durch das Enzym ATP Citrat Lyase (ACL) wieder zu Acetyl-CoA umgesetzt, welches nun zur Acetylierung von Histonen verwendet werden kann (Jeninga et al. 2010).

Um die Ursache der Hemmung der strahleninduzierten Histonacetylierung durch einen Glukoseentzug in Tumorzellen weiter zu erforschen, wurde die Bedeutung der NAD^+-abhängigen Histondeacetylase Sirt1 in diesem Kontext untersucht. Es ist bekannt, dass ein Glukoseentzug über eine Erhöhung des Verhältnisses von NAD^+ zu NADH zu einer Aktivierung von Sirt1 führt, woraufhin es zur Histondeacetylierung und damit zu einer

Verdichtung des Chromatins kommt (El Mjiyad et al. 2011). Da die Netto-Histonacetylierung das Verhältnis von Acetylierung und Deacetylierung widerspiegelt (Wellen et al. 2009), wäre denkbar, dass die infolge des Glukoseentzugs durch Sirt1 stimulierte Histondeacetylierung der strahleninduzierten Histonacetylierung entgegenwirkt, woraus schließlich die in Tumorzellen unter glukosefreien Bedingungen beobachtete Beeinträchtigung der Histonacetylierung nach der Bestrahlung resultieren könnte (Abb. 3.11, Abb. 3.12). Eine Überexpression von Sirt1, wie sie in vielen Tumoren zu beobachten ist (Li Kai & Luo 2011), würde zu einer Verstärkung des Effekts beitragen und könnte möglicherweise die unterschiedliche Histonacetylierung von Tumorzellen und normalen Fibroblasten nach einer Bestrahlung unter glukosefreien Bedingungen erklären.

Eine Hemmung von Sirt1 durch eine Behandlung mit Sirtinol führte bei den Tumorzellen A549 sowohl unter normalen als auch unter glukosefreien Bedingungen zu einer Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparatur nach Bestrahlung (Abb. 3.15 A). Auch in einer Arbeit von Jeong et al. konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Sirt1-Expression mit einer verminderten Reparatur strahleninduzierter DNA-Strangbrüche einhergeht (Jeong et al. 2007) und auch Munshi et al. beobachteten eine beeinträchtigte Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden sowie eine Radiosensitivierung nach der Behandlung von Tumorzellen mit verschiedenen Histondeacetylase-Inhibitoren (Munshi et al. 2005). Die verminderte DNA-Reparaturkapazität infolge der Sirt1-Inhibition lässt sich dadurch erklären, dass Sirt1 neben Histonen auch zahlreiche Nicht-Histon-Proteine deacetyliert, zu denen auch verschiedene DNA-Reparaturproteine, wie das an der NHEJ beteiligte Protein Ku70 oder die an der HR mitwirkenden Proteine NBS1 und Rad51, gehören (Chen G. et al. 2017, Jeong et al. 2007, Martínez-Redondo & Vaquero 2013). Auf diese Weise führt die Hemmung von Sirt1, trotz der Zunahme der Histonacetylierung und der daraus resultierenden Chromatinrelaxation, zu einer Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparatur nach der Bestrahlung. Obwohl die Anzahl residueller γH2AX-Foci in den bestrahlten Zellen ohne Glukose gegenüber den bestrahlten Zellen mit Glukose auch nach der Sirtinol-Behandlung signifikant erhöht blieb (Abb. 3.15 A), schwächte der Inhibitor in Relation zu den Zellen mit Glukose dennoch den hemmenden Effekt eines Glukoseentzugs auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs ab (Abb. 3.15 B). Eine denkbare Erklärung hierfür wäre, dass Sirtinol über eine Hemmung des unter Glukoseentzug aktivierten Sirt1 eine strahleninduzierte Öffnung des Chromatins stimuliert, welche unter glukosefreien Bedingungen sonst nicht auftritt. Dies ermöglicht die Reparatur von DNA-DSBs, auch wenn diese aufgrund der verminderten Deacetylierung reparaturrelevanter Proteine infolge der Sirt1-Hemmung eingeschränkt ist. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse

vermuten, dass die durch den Glukoseentzug hervorgerufene Aktivierung von Sirt1 und die daraus resultierende Histondeacetylierung, die mit einer Chromatinkondensation einhergeht, zur Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparatur nach Bestrahlung beitragen.

Daneben ist davon auszugehen, dass der aus einem Glukoseentzug in Tumorzellen resultierende ATP-Mangel (Sandulache et al. 2011) über eine Hemmung ATP-abhängiger Chromatin-Remodeling-Komplexe zu einer Beeinträchtigung der strahleninduzierten Chromatinrelaxation und damit zu einer verminderten DNA-DSB-Reparatur beiträgt. Bei den normalen Fibroblasten hingegen, die im Vergleich zu den Tumorzellen einen sehr viel höheren ATP-Gehalt aufweisen (Dittmann et al. 2013), ist anzunehmen, dass die Aktivität der Chromatin-Remodeling-Komplexe nicht durch einen Glukoseentzug eingeschränkt wird.

4.4 Die Autophagie begünstigt die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs in Tumorzellen unter normalen und glukosefreien Bedingungen

Ob die infolge einer Bestrahlung in vielen Tumorzellen aktivierte Autophagie das Zellüberleben fördert oder aber zum Tod der Zellen beiträgt, ist nach wie vor umstritten (Zhang et al. 2015). Allerdings spricht eine Vielzahl von Studien dafür, dass die strahleninduzierte Autophagie einen wesentlichen Beitrag zur Radioresistenz von Tumoren leistet. So wurde gezeigt, dass die Hemmung der Autophagie mittels verschiedener Inhibitoren, darunter auch Chloroquin-Diphosphat, in vielen Tumorzellen zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit führt (Bristol et al. 2012, Chaachouay et al. 2011, Lomonaco et al. 2009). Dies konnte in einer Arbeit von Toulany et al. auch für A549 Zellen bestätigt werden, bei denen eine Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat in einer Abnahme des klonogenen Zellüberlebens nach Bestrahlung resultierte (Toulany et al. 2014). In Übereinstimmung damit konnte in der vorliegenden Arbeit bei A549 Zellen gezeigt werden, dass die Chloroquin-Diphosphat-vermittelte Hemmung der Autophagie mit einer Beeinträchtigung der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs einherging (Abb. 3.16). Allerdings war dieser Effekt unter normalen Glukosebedingungen nur nach einer Bestrahlung mit 4 Gy, nicht jedoch nach einer Bestrahlung mit 2 Gy, zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass die Autophagie beim Vorhandensein von Glukose vor allem nach einer Bestrahlung mit höheren Energiedosen zur DSB-Reparatur in Tumorzellen beiträgt. Ein Zusammenhang zwischen der Autophagie und der DNA-Reparatur konnte auch in anderen Arbeiten nachgewiesen werden (Eliopoulos et al. 2016, Zhang et al. 2015).

Ein Glukoseentzug führt ebenfalls zur Induktion der Autophagie, wobei diese über eine Aktivierung von Sirt1 vermittelt wird (Chang et al. 2015, Chen Y. et al. 2012). Hierbei stellt die Autophagie einen cytoprotektiven Mechanismus dar, der zum Überleben der Zellen bei Nährstoffmangel beiträgt (Boya et al. 2005). Wurde die Autophagie bei A549 Zellen unter glukosefreien Bedingungen mittels Chloroquin-Diphosphat gehemmt, so konnte sowohl nach einer Bestrahlung mit 2 Gy als auch mit 4 Gy eine zusätzliche Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparatur gegenüber den Zellen mit alleinigem Glukoseentzug erzielt werden (Abb. 3.16). Dies verdeutlicht, dass die Autophagie unter glukosefreien Bedingungen bereits nach Bestrahlung mit niedrigeren Energiedosen die Reparatur von DNA-DSBs in Tumorzellen begünstigt.

Sowohl durch eine Bestrahlung als auch durch einen Glukoseentzug kommt es in Tumorzellen zu einer Abnahme des intrazellulären ATP-Gehalts (Dittmann et al. 2013, Sandulache et al. 2011). Es ist bekannt, dass die infolge eines Nährstoffmangels induzierte Autophagie einem ATP-Verlust entgegenwirkt, indem sie durch den Abbau von Proteinen und Organellen Vorstufen für die Bildung von ATP liefert (Levine & Yuan 2005). Ob die strahleninduzierte Autophagie ebenfalls zur Produktion von ATP beiträgt, ist bisher ungeklärt. Es konnte jedoch in Gliomzellen gezeigt werden, dass die Autophagie, die nach einer Behandlung mit den DNA-DSB-induzierenden Substanzen Temozolomid und Etoposid auftritt, die ATP-Produktion begünstigt und somit zur Therapieresistenz beiträgt (Katayama et al. 2007). Eine verminderte Bereitstellung von ATP durch eine Hemmung der Autophagie würde somit die unter Chloroquin-Diphosphat-Behandlung beeinträchtigte Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs erklären. Während unter normalen Glukosebedingungen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy offenbar auch ohne die Autophagie ausreichend Energie für die DSB-Reparatur zur Verfügung steht, scheint das durch die Autophagie gewonnene ATP nach einer Bestrahlung mit 4 Gy für die DSB-Reparatur benötigt zu werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es mit zunehmender Energiedosis zu einer verstärkten Induktion von DNA-DSBs kommt (Rothkamm & Löbrich 2003), woraus ein erhöhter Reparaturaufwand und damit auch ein erhöhter Energiebedarf resultiert. Da die Energiemangelsituation nach einer Bestrahlung durch einen Glukoseentzug zusätzlich verschärft wird, trägt die Autophagie als energieliefernder Prozess unter diesen Bedingungen bereits nach einer Bestrahlung mit 2 Gy zur Reparatur von DNA-DSBs bei. Des Weiteren ist beschrieben, dass die Autophagie die Stabilität von DNA-Reparaturproteinen beeinflussen kann, wodurch ein weiterer Zusammenhang zwischen der Autophagie und der DNA-Reparatur gegeben ist (Zhang et al. 2015).

4.5 Ein Glukoseentzug beeinträchtigt die strahleninduzierte Verstärkung des Warburg-Effekts in Tumorzellen

Der nach einer Bestrahlung bei den Tumorzellen A549 und FaDu beobachtete Anstieg des Glukoseverbrauchs (Abb. 3.6) weist nicht nur auf einen gesteigerten Energiebedarf der Zellen hin, sondern lässt in Kombination mit anderen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auch eine Veränderung des Glukosestoffwechsels infolge der Bestrahlung vermuten. So kam es unter normalen Glukosebedingungen nach der Bestrahlung sowohl bei den A549 als auch bei den FaDu Zellen zu einer Zunahme der LDHA-Aktivität (Abb. 3.18) sowie zu einer Inaktivierung des PDH-Komplexes (Abb. 3.19). Zusammen mit dem Anstieg des Glukoseverbrauchs deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es in Tumorzellen infolge der Bestrahlung zu einer Verstärkung des Warburg-Effekts kommt, während die Glukoseoxidation in den Mitochondrien abnimmt. Eine solche strahleninduzierte Umstellung des Glukosestoffwechsels in Tumorzellen konnte auch in anderen Arbeiten beobachtet werden (Dittmann et al. 2015, Zhao F. et al. 2016), wobei gezeigt wurde, dass diese durch HIF1α (*hypoxia inducible factor 1 alpha*) vermittelt wird (Dittmann et al. 2015). Dabei trägt die mit einer Verstärkung des Warburg-Effekts einhergehende Zunahme der Laktatproduktion zur Radioresistenz der Tumorzellen bei (Quennet et al. 2006), was vermutlich auf die antioxidative Wirkung des Laktats zurückzuführen ist (Sattler et al. 2010).

Infolge eines Glukoseentzugs konnte nach der Bestrahlung bei beiden Tumorzelllinien A549 und FaDu eine verminderte LDHA-Aktivität (Abb. 3.18) sowie eine geringere Hemmung des PDH-Komplexes (Abb. 3.19) gegenüber den Zellen mit Glukose beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass der Glukoseentzug der strahleninduzierten Umstellung des Glukosestoffwechsels, wie sie unter normalen Glukosebedingungen zu beobachten war, entgegenwirkte. Die damit einhergehende Abnahme der Laktatproduktion könnte dabei zur radiosensitivierenden Wirkung des Glukoseentzugs in Tumorzellen beitragen. So zeigten auch Dittmann et al., dass eine Hemmung der strahleninduzierten Umstellung des Glukosestoffwechsels in Richtung aerobe Glykolyse, welche mit einer Abnahme der intrazellulären Laktatkonzentration einherging, zu einer Radiosensitivierung von A549 und FaDu Zellen führte (Dittmann et al. 2015).

24 h nach der Bestrahlung kam es in der vorliegenden Arbeit unter glukosefreien Bedingungen sowohl bei den A549 als auch bei den FaDu Zellen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle zu einer starken Abnahme der LDHA-Aktivität (Abb. 3.18) sowie zu einer starken Hemmung des

PDH-Komplexes (Abb. 3.19). Dies lässt vermuten, dass die aerobe Glykolyse sowie die mitochondriale Glukoseoxidation zu diesem Zeitpunkt durch den Glukoseentzug stark eingeschränkt waren. Ein Erliegen des Glukosemetabolismus könnte dabei zum Zelltod infolge des Glukoseentzugs beitragen.

4.6 Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein Glukoseentzug *in vitro* eine geeignete Strategie darstellt, um selektiv Tumorzellen gegenüber einer Bestrahlung zu sensitivieren, ohne die Strahlenempfindlichkeit normaler Zellen zu beeinflussen. Die radiosensitivierende Wirkung des Glukoseentzugs bei Tumorzellen ging dabei mit einer Beeinträchtigung der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSBs einher, welche auf eine Hemmung der strahleninduzierten Chromatinrelaxation zurückzuführen war. Des Weiteren beeinträchtigte der Glukoseentzug in Tumorzellen die strahleninduzierte Umstellung des Glukosemetabolismus, die durch einen Anstieg der aeroben Glykolyse und eine Abnahme der mitochondrialen Glukoseoxidation gekennzeichnet war, was einen weiteren Beitrag zur Radiosensitivierung der Zellen leisten könnte.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es von wesentlicher Bedeutung, die Wirksamkeit eines Glukoseentzugs im Rahmen der Strahlentherapie auch anhand von *in vivo*-Untersuchungen sowie klinischen Studien zu überprüfen. Dabei stehen verschiedene pharmakologische sowie nicht-pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung, um einen Glukoseentzug im lebenden Organismus zu realisieren. Eine vielversprechende pharmakologische Intervention stellt der Einsatz des nicht-metabolisierbaren Glukoseanalogons 2-Deoxy-D-Glukose dar, welches die Glykolyse hemmt (Zhang et al. 2014) und selektiv die Strahlenempfindlichkeit von Krebszellen, nicht jedoch von normalen Zellen, erhöht (Lin et al. 2003, Swamy et al. 2005). Die Verträglichkeit und Sicherheit einer Gabe von 2-DG im Rahmen einer Strahlenbehandlung wurde bereits in einer klinischen Studie mit Gliom-Patienten bestätigt (Singh et al. 2005). Bei den nicht-pharmakologischen Möglichkeiten eines Glukoseentzugs ist besonders das intermittierende Fasten hervorzuheben, welches die Wirksamkeit einer strahlentherapeutischen sowie einer chemotherapeutischen Behandlung *in vivo* verbessern kann (Lee C. et al. 2012, Safdie F. et al. 2012). Zudem wurde gezeigt, dass Kurzzeitfasten normale Zellen und Mäuse, nicht jedoch Krebszellen, vor der Toxizität hochdosierter Chemotherapeutika schützen kann

(Raffaghello et al. 2008). Kleinere Studien an Krebspatienten lassen vermuten, dass kurzzeitiges Fasten vor und/oder nach einer chemotherapeutischen Behandlung machbar und gut verträglich ist und zudem die Nebenwirkungen der Chemotherapie verringern kann (de Groot et al. 2015, Dorff et al. 2016, Safdie F. M. et al. 2009).

Auch wenn randomisierte kontrollierte Studien noch ausstehen, um verlässliche Aussagen treffen zu können, weisen diese Daten zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass ein Glukoseentzug die Wirksamkeit und möglicherweise auch Verträglichkeit einer strahlen- oder chemotherapeutischen Krebsbehandlung verbessern kann. Somit könnte ein Glukoseentzug den Therapieerfolg positiv beeinflussen und daher eine sinnvolle Ergänzung zur Strahlen- oder Chemotherapie darstellen.

5 Literaturverzeichnis

Abdelwahab MG, Fenton KE, Preul MC, Rho JM, Lynch A, Stafford P, Scheck AC. 2012. The ketogenic diet is an effective adjuvant to radiation therapy for the treatment of malignant glioma. PLoS One 7:e36197.

Allen BG, Bhatia SK, Buatti JM, Brandt KE, Lindholm KE, Button AM, Szweda LI, Smith BJ, Spitz DR, Fath MA. 2013. Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts. Clin Cancer Res 19:3905-3913.

Altenberg B, Greulich KO. 2004. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. Genomics 84:1014-1020.

Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A. 2008. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. Cancer Res 68:1485-1494.

Assuncao Guimaraes C, Linden R. 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur J Biochem 271:1638-1650.

Aykin-Burns N, Ahmad IM, Zhu Y, Oberley LW, Spitz DR. 2009. Increased levels of superoxide and H2O2 mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. Biochem J 418:29-37.

Bakkenist CJ, Kastan MB. 2004. Initiating cellular stress responses. Cell 118:9-17.

Banath JP, Klokov D, MacPhail SH, Banuelos CA, Olive PL. 2010. Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. BMC Cancer 10:4.

Bannister AJ, Kouzarides T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res 21:381-395.

Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. 2012. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. Int J Med Sci 9:193-199.

Baumann P, West SC. 1998. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. Trends Biochem Sci 23:247-251.

Becker PB, Workman JL. 2013. Nucleosome remodeling and epigenetics. Cold Spring Harb Perspect Biol 5.

Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH. 2006. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. Cell 126:107-120.

Borges HL, Linden R, Wang JYJ. 2008. DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system. Cell Res 18:17-26.

Borrego-Soto G, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A. 2015. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. Genet Mol Biol 38:420-432.

Boya P, et al. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. Mol Cell Biol 25:1025-1040.

Bristol ML, Di X, Beckman MJ, Wilson EN, Henderson SC, Maiti A, Fan Z, Gewirtz DA. 2012. Dual functions of autophagy in the response of breast tumor cells to radiation: cytoprotective autophagy with radiation alone and cytotoxic autophagy in radiosensitization by vitamin D 3. Autophagy 8:739-753.

Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW, Mueller-Klieser W. 2001. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 51:349-353.

Burma S, Chen BP, Chen DJ. 2006. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. DNA Repair (Amst) 5:1042-1048.

Chaachouay H, Ohneseit P, Toulany M, Kehlbach R, Multhoff G, Rodemann HP. 2011. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. Radiother Oncol 99:287-292.

Chang C, et al. 2015. AMPK-Dependent Phosphorylation of GAPDH Triggers Sirt1 Activation and Is Necessary for Autophagy upon Glucose Starvation. Mol Cell 60:930-940.

Chen G, Zhang B, Xu H, Sun Y, Shi Y, Luo Y, Jia H, Wang F. 2017. Suppression of Sirt1 sensitizes lung cancer cells to WEE1 inhibitor MK-1775-induced DNA damage and apoptosis. Oncogene 36:6863-6872.

Chen HHW, Kuo MT. 2017. Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. Oncotarget 8:62742-62758.

Chen Y, Liersch R, Detmar M. 2012. The miR-290-295 cluster suppresses autophagic cell death of melanoma cells. Scientific Reports 2:808.

Chen Z, Wang B, Yu F, Chen Q, Tian Y, Ma S, Liu X. 2016. The roles of mitochondria in radiation-induced autophagic cell death in cervical cancer cells. Tumour Biol 37:4083-4091.

Cheung EC, Vousden KH. 2010. The role of p53 in glucose metabolism. Curr Opin Cell Biol 22:186-191.

Cui L, Song Z, Liang B, Jia L, Ma S, Liu X. 2016. Radiation induces autophagic cell death via the p53/DRAM signaling pathway in breast cancer cells. Oncol Rep 35:3639-3647.

Davis AJ, Chen DJ. 2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. Translational cancer research 2:130-143.

de Groot S, et al. 2015. The effects of short-term fasting on tolerance to (neo) adjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients: a randomized pilot study. BMC Cancer 15:652.

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab 7:11-20.

Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. 2005. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. Cancer 104:1129-1137.

Deutsche Krebshilfe, ed. 2016. Die blauen Ratgeber: Strahlentherapie - Antworten. Hilfen. Perspektiven.

Deutsches Krebsforschungszentrum. 2009. Strahlentherapie, Nuklearmedizin. (www.krebsinformationsdienst.de, Stand: 25.08.2017)

Dittmann K, Mayer C, Paasch A, Huber S, Fehrenbacher B, Schaller M, Rodemann HP. 2015. Nuclear EGFR renders cells radio-resistant by binding mRNA species and triggering a metabolic switch to increase lactate production. Radiother Oncol 116:431-437.

Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP, Huber SM. 2013. EGFR cooperates with glucose transporter SGLT1 to enable chromatin remodeling in response to ionizing radiation. Radiother Oncol 107:247-251.

Dorff TB, et al. 2016. Safety and feasibility of fasting in combination with platinum-based chemotherapy. BMC Cancer 16:360.

Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. Cancer Res 57:1835-1840.

El Mjiyad N, Caro-Maldonado A, Ramirez-Peinado S, Munoz-Pinedo C. 2011. Sugar-free approaches to cancer cell killing. Oncogene 30:253-264.

Eliopoulos AG, Havaki S, Gorgoulis VG. 2016. DNA Damage Response and Autophagy: A Meaningful Partnership. Frontiers in Genetics 7:204.

Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 35:495-516.

Eriksson D, Stigbrand T. 2010. Radiation-induced cell death mechanisms. Tumour Biol 31:363-372.

Fan J, et al. 2011. Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells. Mol Cell Biol 31:4938-4950.

Fan J, et al. 2014. Tyr-301 phosphorylation inhibits pyruvate dehydrogenase by blocking substrate binding and promotes the Warburg effect. J Biol Chem 289:26533-26541.

Fay JR, Steele V, Crowell JA. 2009. Energy homeostasis and cancer prevention: the AMP-activated protein kinase. Cancer Prev Res (Phila) 2:301-309.

Feron O. 2009. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. Radiother Oncol 92:329-333.

Ferreira LM. 2010. Cancer metabolism: the Warburg effect today. Exp Mol Pathol 89:372-380.

Fischer K, et al. 2007. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. Blood 109:3812-3819.

Franken NA, Oei AL, Kok HP, Rodermond HM, Sminia P, Crezee J, Stalpers LJ, Barendsen GW. 2013. Cell survival and radiosensitisation: modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model (Review). Int J Oncol 42:1501-1515.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc 1:2315-2319.

Frezza C, Gottlieb E. 2009. Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. Semin Cancer Biol 19:4-11.

Fridman JS, Lowe SW. 2003. Control of apoptosis by p53. Oncogene 22:9030-9040.

Gatenby RA, Gillies RJ. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nat Rev Cancer 4:891-899.

Gewirtz DA. 2014. The autophagic response to radiation: relevance for radiation sensitization in cancer therapy. Radiat Res 182:363-367.

Gobbel GT, Chan PH. 2001. Neuronal death is an active, caspase-dependent process after moderate but not severe DNA damage. J Neurochem 76:520-531.

Goodarzi AA, Jeggo P, Lobrich M. 2010. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. DNA Repair (Amst) 9:1273-1282.

Goodarzi AA, Kurka T, Jeggo PA. 2011. KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. Nat Struct Mol Biol 18:831-839.

Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M, Jeggo PA. 2008. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. Mol Cell 31:167-177.

Goodarzi AA, Noon AT, Jeggo PA. 2009. The impact of heterochromatin on DSB repair. Biochem Soc Trans 37:569-576.

Graham NA, et al. 2012. Glucose deprivation activates a metabolic and signaling amplification loop leading to cell death. Mol Syst Biol 8:589.

Green CM, Almouzni G. 2002. When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. EMBO Rep 3:28-33.

Groussard C, Morel I, Chevanne M, Monnier M, Cillard J, Delamarche A. 2000. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. J Appl Physiol (1985) 89:169-175.

Guppy M, Greiner E, Brand K. 1993. The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. Eur J Biochem 212:95-99.

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144:646-674.

Hansen TE, Johansen T. 2011. Following autophagy step by step. BMC Biol 9:39.

Hendrickson EA. 1997. Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. Am J Hum Genet 61:795-800.

Herrmann T, Baumann M, Dörr W. 2006. Klinische Strahlenbiolgie: kurz und bündig. Elsevier.

Holley AK, Miao L, St. Clair DK, St. Clair WH. 2014. Redox-Modulated Phenomena and Radiation Therapy: The Central Role of Superoxide Dismutases. Antioxid Redox Signal 20:1567-1589.

Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA. 2000. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. Cell 101:789-800.

Hsu PP, Sabatini DM. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. Cell 134:703-707.

Huang J, Liang B, Qiu J, Laurent BC. 2005. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes in DNA double-strand break repair: remodeling, pairing and (re)pairing. Cell Cycle 4:1713-1715.

Hubenak JR, Zhang Q, Branch CD, Kronowitz SJ. 2014. Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. Plast Reconstr Surg 133:49e-56e.

Hunt CR, Ramnarain D, Horikoshi N, Iyengar P, Pandita RK, Shay JW, Pandita TK. 2013. Histone modifications and DNA double-strand break repair after exposure to ionizing radiations. Radiat Res 179:383-392.

Igney FH, Krammer PH. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer 2:277-288.

Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G. 2004. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. Cytogenet Genome Res 104:14-20.

Iyengar S, Farnham PJ. 2011. KAP1 Protein: An Enigmatic Master Regulator of the Genome. J Biol Chem 286:26267-26276.

Jeggo PA, Lobrich M. 2007. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? Oncogene 26:7717-7719.

Jeninga EH, Schoonjans K, Auwerx J. 2010. Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. Oncogene 29:4617-4624.

Jeong J, Juhn K, Lee H, Kim SH, Min BH, Lee KM, Cho MH, Park GH, Lee KH. 2007. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. Exp Mol Med 39:8-13.

Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. Cancer Biol Ther 4:139-163.

Joiner M, van der Kogel A, eds. 2009. Basic Clinical Radiobiology Hodder Education.

Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. 2005. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. Mol Cell 18:283-293.

Jones RG, Thompson CB. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. Genes Dev 23:537-548.

Katayama M, Kawaguchi T, Berger MS, Pieper RO. 2007. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. Cell Death Differ 14:548-558.

Kavanagh JN, Redmond KM, Schettino G, Prise KM. 2013. DNA double strand break repair: a radiation perspective. Antioxid Redox Signal 18:2458-2472.

Khanna KK, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet 27:247-254.

Kim I, Xu W, Reed JC. 2008. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov 7:1013-1030.

Klokov D, MacPhail SM, Banath JP, Byrne JP, Olive PL. 2006. Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays. Radiother Oncol 80:223-229.

Kruhlak MJ, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Muller WG, McNally JG, Bazett-Jones DP, Nussenzweig A. 2006. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. J Cell Biol 172:823-834.

Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. Mutat Res 711:193-201.

Leary SC, Sasarman F, Nishimura T, Shoubridge EA. 2009. Human SCO2 is required for the synthesis of CO II and as a thiol-disulphide oxidoreductase for SCO1. Hum Mol Genet 18:2230-2240.

Lee C, et al. 2012. Fasting Cycles Retard Growth of Tumors and Sensitize a Range of Cancer Cell Types to Chemotherapy. Science translational medicine 4:124ra127-124ra127.

Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Tong WP, Kim HR, Corry PM. 1997. Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death. J Cell Sci 110 (Pt 5):681-686.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. J Exp Med 185:1481-1486.

Levine B, Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? J Clin Invest 115:2679-2688.

Li J, Ayene R, Ward KM, Dayanandam E, Ayene IS. 2009. Glucose deprivation increases nuclear DNA repair protein Ku and resistance to radiation induced oxidative stress in human cancer cells. Cell Biochem Funct 27:93-101.

Li K, Luo J. 2011. The role of SIRT1 in tumorigenesis. North American journal of medicine & science 4:104-106.

Lin X, Zhang F, Bradbury CM, Kaushal A, Li L, Spitz DR, Aft RL, Gius D. 2003. 2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. Cancer Res 63:3413-3417.

Lobrich M, Jeggo PA. 2005. Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. DNA Repair (Amst) 4:749-759.

Löffler G, Petrides PE, eds. 2003. Biochemie & Pathobiochemie. Springer.

Lomonaco SL, Finniss S, Xiang C, Decarvalho A, Umansky F, Kalkanis SN, Mikkelsen T, Brodie C. 2009. The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. Int J Cancer 125:717-722.

Lunt SY, Vander Heiden MG. 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. Annu Rev Cell Dev Biol 27:441-464.

Mack HI, Munger K. 2013. The LKB1 tumor suppressor differentially affects anchorage independent growth of HPV positive cervical cancer cell lines. Virology 446:9-16.

Madan E, Gogna R, Bhatt M, Pati U, Kuppusamy P, Mahdi AA. 2011. Regulation of glucose metabolism by p53: emerging new roles for the tumor suppressor. Oncotarget 2:948-957.

Maier P, Hartmann L, Wenz F, Herskind C. 2016. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. Int J Mol Sci 17.

Maragos C, Hutchison WM, Hayasaka K, Brown GK, Dahl HH. 1989. Structural organization of the gene for the E1 alpha subunit of the human pyruvate dehydrogenase complex. J Biol Chem 264:12294-12298.

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med 182:1545-1556.

Martínez-Redondo P, Vaquero A. 2013. The Diversity of Histone Versus Nonhistone Sirtuin Substrates. Genes & Cancer 4:148-163.

Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM. 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. Science 312:1650-1653.

Matsuoka S, et al. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. Science 316:1160-1166.

McDonnell E, Crown SB, Fox DB, Kitir B, Ilkayeva OR, Olsen CA, Grimsrud PA, Hirschey MD. 2016. Lipids Reprogram Metabolism to Become a Major Carbon Source for Histone Acetylation. Cell Rep 17:1463-1472.

McGowan CH, Russell P. 2004. The DNA damage response: sensing and signaling. Curr Opin Cell Biol 16:629-633.

McIlwain DR, Berger T, Mak TW. 2013. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 5:a008656.

Medina RA, Owen GI. 2002. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. Biol Res 35:9-26.

Menegakis A, Yaromina A, Eicheler W, Dorfler A, Beuthien-Baumann B, Thames HD, Baumann M, Krause M. 2009. Prediction of clonogenic cell survival curves based on the number of residual DNA double strand breaks measured by gammaH2AX staining. Int J Radiat Biol 85:1032-1041.

Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. 1998. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. J Cell Biol 140:627-636.

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

Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. 2007. Energy metabolism in tumor cells. Febs j 274:1393-1418.

Müller-Wieland D, Petermann A, Nauck M, Heinemann L, Kerner W, Müller UA, Landgraf R. 2016. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Diabetologie 11(Suppl 2):78-81.

Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Ismail S, Stevens C, Meyn RE. 2005. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. Clin Cancer Res 11:4912-4922.

Murray JM, Stiff T, Jeggo PA. 2012. DNA double-strand break repair within heterochromatic regions. Biochem Soc Trans 40:173-178.

Nakano K, Vousden KH. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol Cell 7:683-694.

Nicholson DW, et al. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature 376:37-43.

Okada H, Mak TW. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. Nat Rev Cancer 4:592-603.

Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. 2001. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. Cancer Res 61:439-444.

Palorini R, Cammarata FP, Balestrieri C, Monestiroli A, Vasso M, Gelfi C, Alberghina L, Chiaradonna F. 2013. Glucose starvation induces cell death in K-ras-transformed cells by interfering with the hexosamine biosynthesis pathway and activating the unfolded protein response. Cell Death Dis 4:e732.

Panganiban R-AM, Snow AL, Day RM. 2013. Mechanisms of Radiation Toxicity in Transformed and Non-Transformed Cells. Int J Mol Sci 14:15931-15958.

Paull TT, Gellert M. 1999. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. Genes Dev 13:1276-1288.

Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. Curr Biol 10:886-895.

Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. 2006. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. Oncogene 25:4633-4646.

Petersen I, Kotb WF, Friedrich KH, Schluns K, Bocking A, Dietel M. 2009. Core classification of lung cancer: correlating nuclear size and mitoses with ploidy and clinicopathological parameters. Lung Cancer 65:312-318.

Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. 2001. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. Science 292:504-507.

Pons D, de Vries FR, van den Elsen PJ, Heijmans BT, Quax PH, Jukema JW. 2009. Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. Eur Heart J 30:266-277.

Price BD, D'Andrea AD. 2013. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. Cell 152:1344-1354.

Puck TT, Marcus PI. 1956. Action of x-rays on mammalian cells. J Exp Med 103:653-666.

Quennet V, Yaromina A, Zips D, Rosner A, Walenta S, Baumann M, Mueller-Klieser W. 2006. Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. Radiother Oncol 81:130-135.

Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, Longo VD. 2008. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A 105:8215-8220.

Randall-Demllo S, Chieppa M, Eri R. 2013. Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis. Front Immunol 4:301.

Robert Koch Institut, ed. 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.

Rock KL, Kono H. 2008. The inflammatory response to cell death. Annu Rev Pathol 3:99-126.

Rodd AL, Ververis K, Karagiannis TC. 2012. Current and Emerging Therapeutics for Cutaneous T-Cell Lymphoma: Histone Deacetylase Inhibitors. Lymphoma: Hindawi Publishing Corporation

Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. 2006. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. Cancer Res 66:6699-6707.

Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. J Cell Biol 146:905-916.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem 273:5858-5868.

Rong Y, Wu W, Ni X, Kuang T, Jin D, Wang D, Lou W. 2013. Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. Tumour Biol 34:1523-1530.

Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. 2003. Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. Mol Cell Biol 23:5706-5715.

Rothkamm K, Löbrich M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. Proc Natl Acad Sci U S A 100:5057-5062.

Safdie F, Brandhorst S, Wei M, Wang W, Lee C, Hwang S, Conti PS, Chen TC, Longo VD. 2012. Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy. PLoS One 7:e44603.

Safdie FM, Dorff T, Quinn D, Fontana L, Wei M, Lee C, Cohen P, Longo VD. 2009. Fasting and cancer treatment in humans: A case series report. Aging (Albany NY) 1:988-1007.

Saito S, Goodarzi AA, Higashimoto Y, Noda Y, Lees-Miller SP, Appella E, Anderson CW. 2002. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. J Biol Chem 277:12491-12494.

Saleh AD, et al. 2013. Caloric restriction augments radiation efficacy in breast cancer. Cell Cycle 12:1955-1963.

Saleh T, Cuttino L, Gewirtz DA. 2016. Autophagy is not uniformly cytoprotective: a personalized medicine approach for autophagy inhibition as a therapeutic strategy in non-small cell lung cancer. Biochim Biophys Acta 1860:2130-2136.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem 73:39-85.

Sanchez-Cespedes M. 2007. A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome. Oncogene 26:7825-7832.

Sandulache VC, Ow TJ, Pickering CR, Frederick MJ, Zhou G, Fokt I, Davis-Malesevich M, Priebe W, Myers JN. 2011. Glucose, not Glutamine is the Dominant Energy Source Required for Proliferation and Survival of Head and Neck Squamous Carcinoma Cells. Cancer 117:2926-2938.

Sattler UG, et al. 2010. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. Radiother Oncol 94:102-109.

Schmidt T, Freyschmidt J, eds. 2014. Handbuch diagnostische Radiologie: Strahlenphysik, Strahlenbiologie, Strahlenschutz.

Schulze S, Petersen I. 2011. Gender and ploidy in cancer survival. Cellular Oncology (Dordrecht) 34:199-208.

Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, Cantley LC. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. Proc Natl Acad Sci U S A 101:3329-3335.

Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, Tripathi RP, Gupta JP, Mathew TL, Ravindranath T, Jain V. 2005. Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. Strahlenther Onkol 181:507-514.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. J Biol Chem 276:7320-7326.

Smerdon MJ. 1991. DNA repair and the role of chromatin structure. Curr Opin Cell Biol 3:422-428.

Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G. 1992. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. Cancer Res 52:5997-6000.

Soria G, Polo SE, Almouzni G. 2012. Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. Mol Cell 46:722-734.

Spitz DR, Sim JE, Ridnour LA, Galoforo SS, Lee YJ. 2000. Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism? Ann N Y Acad Sci 899:349-362.

Statistisches Bundesamt. 2017a. Durchschnittliches Alter der Gestorbenen in Lebensjahren (ab 1980). (www.gbe-bund.de, Stand: 25.08.2017)

Statistisches Bundesamt. 2017b. Gesundheit: Todesursachen in Deutschland 2015.

Stucki M, Jackson SP. 2006. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. DNA Repair (Amst) 5:534-543.

Suzuki A, Kusakai G, Kishimoto A, Lu J, Ogura T, Esumi H. 2003. ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. Oncogene 22:6177-6182.

Swamy RK, Manickam J, Adhikari JS, Dwarakanath BS. 2005. Glycolytic inhibitor, 2-deoxy-D-glucose, does not enhance radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes and splenocytes in vitro. Indian J Exp Biol 43:686-692.

Tichy A, Vavrova J, Pejchal J, Rezacova M. 2010. Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) as a central regulator of radiation-induced DNA damage response. Acta Medica (Hradec Kralove) 53:13-17.

Torchy MP, Hamiche A, Klaholz BP. 2015. Structure and function insights into the NuRD chromatin remodeling complex. Cell Mol Life Sci 72:2491-2507.

Toulany M, Mihatsch J, Holler M, Chaachouay H, Rodemann HP. 2014. Cisplatin-mediated radiosensitization of non-small cell lung cancer cells is stimulated by ATM inhibition. Radiother Oncol 111:228-236.

Tsujimoto Y, Shimizu S. 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. Cell Death Differ 12 Suppl 2:1528-1534.

Unger RH, Eisentraut AM, Madison LL. 1963. The effects of total starvation upon the levels of circulating glucagon and insulin in man. J Clin Invest 42:1031-1039.

Valvona CJ, Fillmore HL, Nunn PB, Pilkington GJ. 2016. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. Brain Pathol 26:3-17.

van Attikum H, Gasser SM. 2005. ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. Cell Cycle 4:1011-1014.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 324:1029-1033.

Vilenchik MM, Knudson AG. 2003. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 100:12871-12876.

Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. 2000. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. Cancer Res 60:916-921.

Warburg O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. Science 124:269-270.

Warburg O, Posener K, Negelein E. 1924. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. Biochem Z 152:309-344.

Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. 2009. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. Science 324:1076-1080.

Weterings E, Chen DJ. 2008. The endless tale of non-homologous end-joining. Cell Res 18:114-124.

Xian ZY, Liu JM, Chen QK, Chen HZ, Ye CJ, Xue J, Yang HQ, Li JL, Liu XF, Kuang SJ. 2015. Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer. Tumour Biol 36:8093-8100.

Xu Y, Sun Y, Jiang X, Ayrapetov MK, Moskwa P, Yang S, Weinstock DM, Price BD. 2010. The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. J Cell Biol 191:31-43.

Yamamori T, Meike S, Nagane M, Yasui H, Inanami O. 2013. ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51. FEBS Lett 587:3348-3353.

Yao F, Zhao T, Zhong C, Zhu J, Zhao H. 2013. LDHA is necessary for the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma. Tumour Biol 34:25-31.

Yoshimori T. 2004. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. Biochem Biophys Res Commun 313:453-458.

Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y. 2014. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. Cancer Lett 355:176-183.

Zhang D, Tang B, Xie X, Xiao YF, Yang SM, Zhang JW. 2015. The interplay between DNA repair and autophagy in cancer therapy. Cancer Biol Ther 16:1005-1013.

Zhao F, Ming J, Zhou Y, Fan L. 2016. Inhibition of Glut1 by WZB117 sensitizes radioresistant breast cancer cells to irradiation. Cancer Chemother Pharmacol 77:963-972.

Zhao Y, Butler EB, Tan M. 2013. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. Cell Death Dis 4:e532.

Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. 2004. Nuclear structure in cancer cells. Nat Rev Cancer 4:677-687.

Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, Lukas J, Bekker-Jensen S, Bartek J, Shiloh Y. 2006. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. Nat Cell Biol 8:870-876.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACL	ATP Citrat Lyase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	Varianzanalyse, *analysis of variance*
Apaf-1	*apoptotic protease activating factor 1*
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	*ataxia telangiectasia mutated*
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	*BCL2 associated X*
BSA	Albumin Fraktion V, *bovine serum albumin*
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHD3	*chromodomain helicase DNA binding protein 3*
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COX II	Cytochrom *c* Oxidase Untereinheit II
CPD	kumulative Populationsverdopplung, *cumulative population doublings*
CQ	Chloroquin-Diphosphat
ctrl	Kontrolle, *control*
d	Tag
2-DG	2-Deoxy-D-Glukose
d. h.	das heißt
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	*DNA damage response*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMF	Dosis-modifizierender Faktor, *dose-modifying factor*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, *deoxyribonucleic acid*
DSB	Doppelstrangbruch
e	Eulersche Zahl
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, *enzyme-linked immunosorbent assay*
ER	endoplasmatisches Retikulum
EthD-III	Ethidium Homodimer III
$FADH_2$	reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FCS	fetales Kälberserum, *fetal calf serum*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GLUT	Glukosetransporter
Gy	Gray
h	Stunde
H_2O_{dest}	destilliertes Wasser
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HIF1α	*hypoxia inducible factor 1 alpha*
HNSCC	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom, *head and neck squamous cell carcinoma*
HR	homologe Rekombination
HRP	Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*
IgG	Immunglobulin G

INT	2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid
IR	ionisierende Strahlung
IRDye	*infrared fluorescent dye*
K	Lysin
KAP1	*KRAB [Krüppel-associated box]-associated protein 1*
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
kV	Kilovolt
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LKB1	*liver kinase B1*
ln	natürlicher Logarithmus
M	molar
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mTOR	*mechanistic target of rapamycin*
MW	Mediumwechsel
n. s.	nicht signifikant
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NAD^+	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung, *non-homologous end-joining*
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P40
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, *non-small cell lung cancer*
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P-	Phospho-
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, *phosphate buffered saline*
PD	Populationsverdopplungen, *population doublings*
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PE	Koloniebildungseffizienz, *plating efficiency*
PFK1	Phosphofructokinase 1
pNA	p-Nitroanilin
PP1β	Proteinphosphatase-1β
PUMA	*p53 upregulated modulator of apoptosis*
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, *reactive oxygen species*
rpm	Umdrehungen pro Minute*, revolutions per minute*
s	Sekunde
S	Serin
SCO2	*synthesis of cytochrome c oxidase 2*
SDS	Natriumdodecylsulfat, *sodium dodecyl sulfate*
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, *standard error of the mean*
SF	Überlebensfraktion, *surviving fraction*
SGLT	natriumabhängiger Glukosetransporter, *sodium dependent glucose transporter*
Sirt1	Sirtuin-1
Tab.	Tabelle
TBST	*Tris-buffered saline with Tween-20*
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TIGAR	*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
u. a.	unter anderem
UPR	*unfolded protein response*
V	Volt
v. a.	vor allem
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel
γH2AX	an Serin 139 phosphoryliertes Histon H2AX
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar

7 Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen

Glucose starvation impairs DNA repair in tumour cells selectively by blocking histone acetylation. Ampferl R, Rodemann HP, Mayer C, Höfling TTA, Dittmann K. Radiother Oncol. 2017 Oct 31;doi: 10.1016/j.radonc.2017.10.020.

Combination of PDT and inhibitor treatment affects melanoma cells and spares keratinocytes. Kästle M, Grimm S, Nagel R, Breusing N, Grune T. Free Radic Biol Med. 2011 Jan 15;50(2):305-12.

Konferenzbeiträge: Poster

Glucose starvation sensitizes tumor cells but not normal fibroblasts to irradiation. Ampferl R, Rodemann HP, Dittmann K. 19. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS). Erlangen, Sept 2016.

Glukoseentzug beeinträchtigt die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen. Ampferl R, Mayer C, Rodemann HP, Dittmann K. 25. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie. Dresden, Febr 2016.

Glucose starvation induces cell death and radiosensitization of cancer cells. Nagel R, Mayer C, Rodemann HP, Dittmann K. 18. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS). Dresden, Okt 2015.

Radiosensitization of cancer cells by glucose starvation. Nagel R, Mayer C, Rodemann HP, Dittmann K. 14th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology. Ermatingen (Schweiz), Juni 2015.

Radiosensitivierung von Tumorzellen durch Glukoseentzug. Nagel R, Mayer C, Rodemann HP, Dittmann K. 24. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie. Hamburg, Febr 2015.

Selective radiosensitization of cancer cells by glucose starvation. Nagel R, Mayer C, Rodemann HP, Dittmann K. 17. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS). Tübingen, Sept/Okt 2014.

Glukoseentzug – Eine neue therapeutische Behandlungsstrategie in der Radioonkologie? Nagel R, Mayer C, Huber S, Rodemann HP, Dittmann K. 23. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie. Tübingen, Febr/März 2014.

8 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn apl. Prof. Dr. Klaus Dittmann, für die Bereitstellung des spannenden Themas, seine hervorragende Betreuung und all seine Unterstützung. Sein unerschöpflicher Forscherdrang, seine innovativen Ideen sowie sein Bestreben, die Welt durch die Wissenschaft ein kleines bisschen zu verbessern, haben wesentlich zu meiner Motivation sowie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Zudem sorgten seine freundschaftliche Art, sein Optimismus und sein Humor stets für eine tolle Arbeitsatmosphäre.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. H. Peter Rodemann für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung der Universität Tübingen durchzuführen sowie für seine wissenschaftliche Unterstützung.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Lutz Graeve, der es mir durch die Übernahme des Zweitgutachtens ermöglichte, an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hohenheim zu promovieren. Dabei möchte ich mich besonders für den freundlichen und unkomplizierten Umgang sowie für das Interesse am Thema dieser Arbeit bedanken.

Herrn apl. Prof. Dr. Stephan Huber sowie Herrn Dr. Dominik Klumpp danke ich vielmals für die kompetente und geduldige Unterstützung am Durchflusszytometer.

Ein großes Dankeschön geht an all meine Kollegen der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung für das gute Arbeitsklima sowie die gute Zusammenarbeit. Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Claus Mayer, der mich mit viel Geduld, Humor und wertvollen Ratschlägen in die experimentellen Arbeitsmethoden einarbeitete und für jedes Problem eine Lösung bereithielt. Seine Hilfsbereitschaft und seine stets gute Laune schätzte ich sehr. Herrn apl. Prof. Dr. Mahmoud Toulany und Herrn Dr. Apostolos Menegakis möchte ich ebenfalls für ihre Hilfsbereitschaft sowie für ihre konstruktive Kritik und ihre guten Anregungen danken. Ein ganz lieber Dank geht an Katharina Mück und Franziska Hauth für ihre Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit.

Von Herzen danken möchte ich meinen Eltern, meinen Schwiegereltern, meiner Schwester und meinen Freunden, ganz besonders Katrin, für ihren Rückhalt, ihr Verständnis und dafür, dass sie immer für mich da waren.

Mein unendlicher Dank gilt meinem Ehemann Tobias. Danke, dass du diesen Weg mit mir gegangen bist und immer an mich geglaubt hast.

9 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Rena Ampferl, geb. Nagel
Geburtsdatum	07.03.1985
Geburtsort	Karlsruhe

Berufstätigkeit

10/2013 - 10/2016	**Wissenschaftliche Mitarbeiterin: Doktorandin** Klinik für Radioonkologie, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Eberhard Karls Universität Tübingen; Leitung: Prof. Dr. H. Peter Rodemann
10/2011 - 10/2013	**Wissenschaftliche Mitarbeiterin: Assistenz der Fachgebietsleitung** Institut für Ernährungsmedizin, Fachgebiet Molekulare und Angewandte Ernährungspsychologie, Universität Hohenheim, Stuttgart; Leitung: Prof. Dr. Nanette Ströbele-Benschop
04/2011 - 09/2011	**Nebentätigkeit** Deutsche Gesellschaft für Mukosale Immunologie und Mikrobiom e.V. (DGMIM), Stuttgart
01/2011 - 04/2012	**Wissenschaftliche Mitarbeiterin: Projektassistenz** Institut für Ernährungsmedizin, Fachgebiet Ernährungsmedizin, Prävention und Genderforschung, Universität Hohenheim, Stuttgart; Leitung: Prof. Dr. Stephan C. Bischoff
09/2007 - 03/2008	**Praktikum und Nebentätigkeit** Analytisches Institut Bostel GmbH & Co. KG, Stuttgart

Ausbildung

10/2013 - 07/2018	**Promotion (Dr. rer. nat.)** Klinik für Radioonkologie, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Eberhard Karls Universität Tübingen; apl. Prof. Dr. Klaus Dittmann Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Fachgebiet Biochemie der Ernährung, Universität Hohenheim, Stuttgart; Prof. Dr. Lutz Graeve Thema: Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen und Normalzellen
10/2004 - 09/2010	**Studium der Ernährungswissenschaft (Diplom)** Universität Hohenheim, Stuttgart Diplomarbeit: Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Fachgebiet Biofunktionalität und Sicherheit der Lebensmittel, Universität Hohenheim, Stuttgart; Prof. Dr. Tilman Grune Thema: Etablierung einer Keratinozyten-Melanomzell-Cokultur als Testsystem für die Photodynamische Therapie
09/1995 – 09/2004	**Allgemeine Hochschulreife** Gymnasium Neureut, Karlsruhe

10 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema „Einfluss eines Glukoseentzugs auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen und Normalzellen“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

_____ _____

Ort und Datum Unterschrift