

Aus dem Bereich Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Auswirkungen von chronischer Hypoxie auf den Chromosomensatz und die ATP- und GTP- Konzentrationen primärer menschlicher Bronchialepithelzellen

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes*
2018

vorgelegt von Dorothea Sophie Kerner
Geb. am 23.08.1990 in Berlin

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	- 1 -
II.	Abkürzungsverzeichnis	- 3 -
1	Zusammenfassung.....	- 6 -
	Summary.....	- 7 -
2	Einleitung.....	- 8 -
2.1	Die Bedeutung und Biologie von Sauerstoff.....	- 8 -
2.1.1	Sauerstoffgehalt in verschiedenen Geweben und deren Anpassungsfähigkeit	- 8 -
2.2	Hypoxie und ihre Auswirkungen.....	- 10 -
2.2.1	Physiologisches und pathophysiologisches Vorkommen von Hypoxie im menschlichen Körper	- 14 -
2.2.2	Hypoxie und Aneuploidie	- 16 -
2.3	Zielsetzung der Arbeit	- 20 -
3	Material und Methoden.....	- 21 -
3.1	Material.....	- 21 -
3.1.1	Chemikalien und Puffer	- 21 -
3.1.2	Reaktions-Kits	- 22 -
3.1.3	Zubehör	- 22 -
3.1.4	Geräte	- 22 -
3.1.5	Software	- 23 -
3.1.6	Zellkulturmedien	- 23 -
3.1.7	Zellen.....	- 24 -
3.2	Methoden	- 25 -
3.2.1	Sauerstoffbestimmung.....	- 25 -
3.2.2	Zellkultur.....	- 26 -

3.2.3	Behandlung der Zellen	- 27 -
3.2.4	Chromosomenanalyse	- 30 -
3.2.5	CytoSelect™ 96-Well Cell Transformations-Assay	- 37 -
3.2.6	ATP und GTP Bestimmung mittels HPLC	- 40 -
4	Ergebnisse	- 43 -
4.1	Sauerstoffbestimmung	- 43 -
4.2	Primäre Bronchialepithelzellen von der Firma abm	- 44 -
4.2.1	Morphologie	- 44 -
4.2.2	Chromosomenanalyse	- 46 -
4.2.3	Transformation Assay	- 47 -
4.3	Primäre Bronchialepithelzellen von der Firma LifeLine	- 49 -
4.3.1	Morphologie	- 49 -
4.3.2	Chromosomenanalyse	- 52 -
4.3.3	Transformation Assay	- 59 -
4.3.4	ATP und GTP Bestimmung	- 59 -
5	Diskussion	- 64 -
5.1	Ergebnisse	- 64 -
5.1.1	Primäre Bronchialepithelzellen von der Firma abm	- 64 -
5.1.2	Primäre Bronchialepithelzellen von der Firma LifeLine	- 64 -
5.2	Aneuploidie	- 67 -
5.2.1	Entstehungsmechanismen von Aneuploidie	- 67 -
5.2.2	Aneuploidie - Entstehung und deren zeitliche Veränderung durch Hypoxie	- 69 -
5.2.3	Aneuploidie im Tumor	- 70 -
5.3	Schlussbemerkung	- 74 -
6	Literaturverzeichnis	- 75 -
7	Publikationen/Dank	- 88 -

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abm	Applied Biological Materials Inc.
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Protein Kinase
APC	Adenomatöse-Polyposis-Coli
ATM	ataxia teleangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-2	B-Zell-Lymphoma-2
ca.	circa
CIN	chromosome instability (chromosomale Instabilität)
CML	Chronisch myeloische Leukämie
dest.	destilliert
DFX	Desferroxamine
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMOG	Dimethyloxalylglycine
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
EPO	Erythropoetin
FBS	fetal bovine serum (fetales Kälberserum)
FIH-1	Fakor-Inhibitor-HIF-1
ges.	gesamt
GTP	Guanosintriphosphat

HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRE	hypoxia responsive element
Hrsg.	Herausgeber
K.-Nr.	Katalognummer
KCl	Kaliumchlorid
LDH	Lactatdehydrogenase
Lsg.	Lösung
min.	Minute
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHD 2	Prolin-Hydroxylase-Domain-Protein 2
PLOD 2	Procollagen-Lysin-2-Oxiglutarat-5-Dioxygenase 2
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	round per minute (Umdrehungen pro Minute)
SAC	spindle-assembly Checkpoint (Spindelapparat Checkpoint)
sec.	Sekunde
S.-Nr.	Seriennummer
TCA	2, 4, 6 – Trichloracetic acid (Trichloressigsäure)
TIC	Transkriptions-Initiations-Komplex
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor)

VHL

von-Hippel-Lindau Ligase

z. B.

zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Hypoxie verändert viele verschiedene Eigenschaften von Zellen, von denen einige die Sauerstoffversorgung wieder verbessern sollen, was jedoch nicht immer gelingt. Hypoxie ist aber auch mit vielen Krankheiten wie Krebs assoziiert: Hypoxie in Tumoren ist mit einer schlechteren Prognose verbunden. Ebenso verschlechtern früh in Tumoren auftretende Aneuploidien die Prognose des Patienten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Hypoxie und Aneuploidie untersucht. Dafür wurden zwei verschiedene primäre humane Bronchialepithelzellen zweier verschiedener Firmen (LifeLine und Applied Biological Materials Inc. (abm)) unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und mit Zellen unter normoxischen Bedingungen verglichen. Der Energiehaushalt der Zellen in Form von Adenosintriphosphat und Guanosintriphosphat sowie die Veränderungen des Chromosomensatzes wurden über einen Zeitraum von vier Wochen analysiert. Des Weiteren wurden die Zellen mittels Transformations-Assay untersucht.

Die Zellen von abm wiesen schon zu Beginn Aneuploidien auf – obwohl diese als primäre Bronchialepithelzellen erworben wurden. Diese wuchsen nach hypoxischer Kultivierung im Transformations-Assay als Sphäroide. Die weiteren Analysen wurden deshalb nur noch mit Zellen der Firma LifeLine durchgeführt. Diese Zellen zeigten unter hypoxischen Bedingungen einen irreversiblen Energieabfall auf fast die Hälfte der Ausgangskonzentration von Adenosintriphosphat und Guanosintriphosphat. Schon nach einer Woche Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen wiesen 60 % der Zellen Aneuploidien auf. Nach vier Wochen hypoxischer Kultivierung stieg dieser Anteil auf 85 %. Die aneuploiden Zellen waren nach einer Woche Hypoxie fast-diploid, nach zwei Wochen eher hypodiploid und nach drei und vier Wochen eher hyperdiploid. Der Transformations-Assay war negativ. Unbehandelte Zellen zeigten keine der oben genannten Veränderungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass chronische Hypoxie in menschlichen Bronchialepithelzellen Aneuploidie hervorruft, zusätzlich wurde zum ersten Mal der Verlauf der Aneuploidieentwicklung über einen Zeitraum von vier Wochen analysiert. Aneuploide ist charakteristisch für Krebs. Hypoxie führt zu Aneuploidie, dies zeigen die Befunde in der vorliegenden Arbeit, aber auch die Arbeiten von Kondoh et al. (2013) und Ueyama et al. (2011). Diese Ergebnisse zeigen, dass Hypoxie eine relevante Bedeutung bei der Kanzerogenese zu kommt.

Summary

Hypoxia changes many different characteristics of cells, some of which are supposed to improve the oxygen supply, but this is not always possible. Thus, hypoxia is associated with many diseases such as cancer. Hypoxia in tumors is associated with poor prognosis. Aneuploidia also occurs very early in tumors and worsen the patient's prognosis.

In this study, the relationship between hypoxia and aneuploidy has been investigated. Two different primary human bronchial cell from two different companies (Lifeline and abm) were cultured under hypoxic conditions and compared with cells under normoxic conditions. The energy balance of the cells in form of adenosine triphosphate and guanosine triphosphate as well as the changes in the chromosomes were analyzed over a period of four weeks. In addition, the cells were analyzed by transformation assay.

The cells of abm were aneuploid at delivery - although they were acquired as a primary bronchial cell. These cells grew as spheroids in the transformation assay after hypoxic cultivation. Further analyzes were therefore carried out only with cells of Lifeline. These cells showed an irreversible energy drop to almost half of the initial concentration of both adenosine triphosphate and guanosine triphosphate after hypoxic culture. After one week under hypoxic conditions, 60% of the cells showed aneuploidy, after four weeks 85% of the cells were aneuploid. The aneuploid cells were near-diploid after one week, hypodiploid after two weeks, and hyperdiploid after three and four weeks. The transformation assay was negative. Untreated cells were cultured as control and analyzed at the same time as the treated cells. These cells showed no such changes, as expected.

In this paper, it was demonstrated for the first time that chronic hypoxia causes aneuploidy in human bronchial epithelial cells. In addition, the course of the aneuploidy development was analyzed for the first time over a period of four weeks. Aneuploidy is characteristic of cancer. Hypoxia leads to aneuploidy, as is shown by the results in the present paper, but also by the results of Kondoh et al. (2013) and Ueyama et al. (2011). These results show that hypoxia has a relevant importance in carcinogenesis.

2 Einleitung

2.1 Die Bedeutung und Biologie von Sauerstoff

Mit der Entwicklung der Photosynthese von Einzellern kam es zu großen Veränderungen im Metabolismus dieser Lebewesen: Durch Sonnenlicht, CO_2 und H_2O wurde in der Photosynthese Glukose gebildet mit Sauerstoff als Nebenprodukt. Dies ermöglichte die Entwicklung von aeroben Organismen, die mithilfe von Sauerstoff in der oxidativen Phosphorylierung ihre Energie gewinnen. Dabei wird Glukose in der Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt, das in den Mitochondrien nach dem Zitronensäurezyklus in der oxidativen Phosphorylierung für die Produktion von ATP abgebaut wird. Dort ist Sauerstoff der Elektronenakzeptor. Neben der Energiegewinnung dient Sauerstoff z. B. auch als Quelle für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Beide – Sauerstoff und ROS – sind beteiligt an der Expression vieler Gene. Daher haben zu hohe, aber auch zu geringe Sauerstoffkonzentrationen Auswirkungen auf die Struktur und die Funktion der Zellen (Weissmann, 2008; Mason & Ratcliffe, 2014; Wagner, 2008; Gilany & Vafakhah, 2010; Semenza, 2014 und 2012).

2.1.1 Sauerstoffgehalt in verschiedenen Geweben und deren Anpassungsfähigkeit

In der Entwicklung von Mehrzellern musste eine ausreichende Sauerstoffkonzentration in allen Zellen erreicht werden. Dies gelang mit der Entwicklung eines Gefäßsystems, wodurch die Sauerstoffversorgung, aber auch die Nährstoffversorgung der Zellen sichergestellt wurde. Die Aufnahme des Sauerstoffs erfolgt dabei über die Lungen, im Blut wird Sauerstoff an Hämoglobin gebunden und von dort aus über das Gefäßsystem zu den Zellen transportiert (Semenza, 2014). Dabei unterscheidet sich die Sauerstoffkonzentration in den verschiedenen Geweben. Die eingeatmete Luft hat einen Sauerstoffpartialdruck von ca. 160 mmHg auf Meeresspiegel-Niveau (21% Sauerstoff) (Pflugrad, 2009). In den Alveolen diffundiert der Sauerstoff in die Kapillaren, sodass das Lungenparenchym eine Sauerstoffkonzentration von ca. 4 % - 14 % aufweist. Dies reicht aus um eine ausreichende Oxygenierung der Zellen in der Peripherie sicher zu stellen. Abhängig vom Gewebe

Gewebe- oder Organname	Sauerstoffkonzentration
Lungenparenchym	4 % - 14 %
Kreislaufsystem	4 % - 14 %
Leber	4 % - 14 %
Nieren	4 % - 14 %
Herz	4 % - 14 %
Gehirn	0,5 % - 8 %
Augen	1 % - 5 %
Knochenmark	1 % - 6 %
Fettgewebe	2 % - 8 %

Tabelle 2-1 Sauerstoffkonzentrationen verschiedenem Organe und Gewebe (Haque, Rahman, Kasim & Alabsi, 2013)

variiert die Sauerstoffkonzentration zwischen 0,5 % und 14 % O₂. Tabelle 2-1 zeigt eine Übersicht über die jeweiligen Sauerstoffkonzentrationen in den unterschiedlichen Geweben und Organen (Haque, Rahman, Kasim & Alabsi, 2013). Jedes Organ hat dabei eine andere Anpassungsfähigkeit an die Sauerstoffkonzentrationen, so können Herz und Leberzellen ihren Sauerstoffbedarf auf bis zu 50 % senken, wenn ein Sauerstoffmangel vorliegt. Gehirnzellen hingegen besitzen eine viel geingere, Muskelzellen eine größere Anpassungsfähigkeit (Gilany & Vafakhah, 2010; Boutilier, 2001).

2.2 Hypoxie und ihre Auswirkungen

Ein Absinken der Sauerstoffkonzentration unterhalb der jeweiligen physiologischen Konzentrationen wird als Hypoxie bezeichnet. Da eine ausreichende Sauerstoffkonzentration für den Organismus essenziell ist, gibt es mehrere Mechanismen, um einer Hypoxie entgegen zu wirken. Dafür muss der Organismus eine verringerte Sauerstoffkonzentration wahrnehmen. Ein Sauerstoffsensor ist bisher nicht bekannt, es gibt jedoch einige Hypothesen wie die Sauerstoffkonzentration gemessen werden kann: Zum einen über eine Konzentrationssteigerung von deoxygeniertem Hämoglobin, zum anderen über Veränderungen von O₂-sensiblen Ionenkanälen, die zu Elektrolytveränderungen führen, und zuletzt über eine Hemmung der Mitochondrienfunktion. Die Zellen haben dann verschiedene Möglichkeiten auf diese erniedrigte Sauerstoffkonzentration zu reagieren, dabei werden akute und chronische Effekte unterschieden. Chronische Effekte werden durch Transkriptionsänderung von Genen charakterisiert, wohingegen akute Effekte durch Membrandepolarisationen ausgelöst werden. Abbildung 2-1 gibt eine Übersicht (Gilany & Vafakhah, 2010).

Als akute Antwort auf Hypoxie kommt es zu Elektrolytveränderungen. Unter Normoxie wird bis zu 60 % des ATPs für die ATP-abhängigen Ionenkanäle, wie Ca²⁺-ATPase oder Na⁺/K⁺-ATPase, verwendet. Während der Hypoxie kommt es zu intrazellulärem ATP-Mangel und dadurch zu vermehrtem Kalium-Ausstrom und Natrium- und Calcium-Einstrom. Es folgt die Membrandepolarisation mit Ausschüttung von Calcium aus den intrazellulären Depots. In der Folge steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration deutlich an, was zur Aktivierung von Lipasen und Proteasen führt, die ihrerseits zu Membanschäden und zur Freisetzung von freien Fettsäuren und Proteinen führen. Zusätzlich führt dies zu Veränderungen im

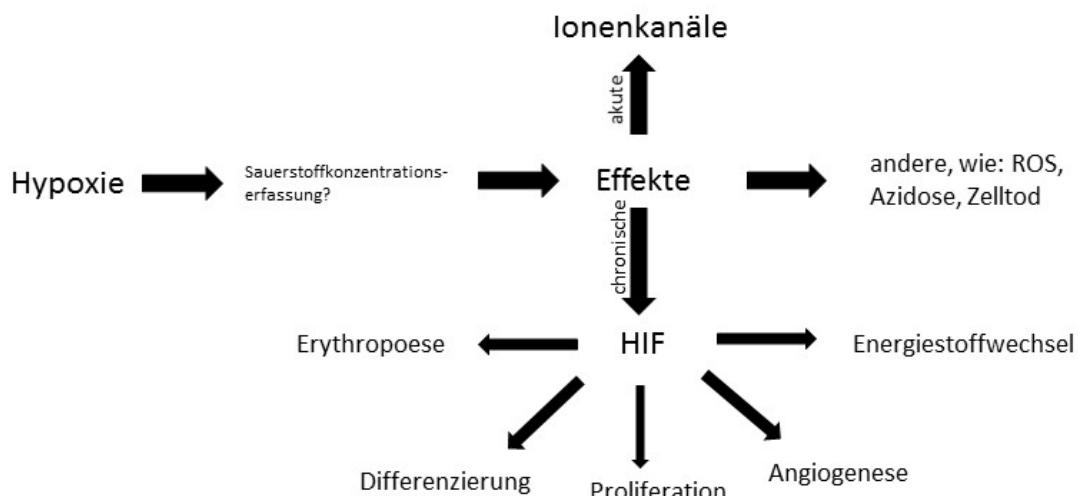


Abbildung 2-1: Wesentliche Auswirkungen von Hypoxie auf die Zellen (Gilany & Vafakhah, 2010)

Mitochondrienstoffwechsel, zur Aktivierung von Endonukleasen und zur Bildung von ROS (Gilany & Vafakhah, 2010).

Als chronische Antwort auf Hypoxie verändert sich die Transkription von Genen durch Stabilisierung und Aktivierung von Hypoxie-induzierte Faktoren (HIF). Zur HIF-Familie gehören drei Gruppen: HIF-1, HIF-2 und HIF-3. Dabei ist die Funktion von HIF-3 bisher nur wenig verstanden, HIF-2 wird nur in Nieren, Herz, Lunge und Dünndarm gebildet. Am besten verstanden ist momentan HIF-1, der in jeder Zelle gebildet wird. HIF-1 ist ein Heterodimer und besteht aus der O₂-regulierten HIF-1 α -Untereinheit und der HIF-1 β -Untereinheit, die immer in der Zelle vorhanden sind (Simon & Keith, 2008). Während Normoxie wird HIF-1 α posttranslational modifiziert. Dazu wird HIF-1 α hydroxyliert: Zum einen kann HIF-1 α am Prolin-Ende durch das sauerstoffsensible Prolin-Hydroxylase-Domain-Protein 2 (PHD2) hydroxyliert werden. Dies führt über die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase von-Hippel-Lindau (VHL) zu einem proteasomalen Abbau von HIF-1 α . Zum andern kann die Hydroxylierung von HIF-1 α am Asparagin-Ende mittels eines sauerstoffsensiblen Fakor-Inhibitor-HIF-1 (FIH-1) erfolgen. Dadurch wird die Interaktion mit dem Koaktivator CBP/p300 und somit die Transaktivierung von HIF-1 α gehemmt (siehe Abb. 2-2). Durch diese Mechanismen hat HIF-1 α bei Normoxie nur eine Halbwertszeit von unter fünf Minuten. Bei Hypoxie wird HIF-1 α nicht hydroxyliert, es wird angereichert und bildet einen Dimer mit HIF-1 β . Mit dem

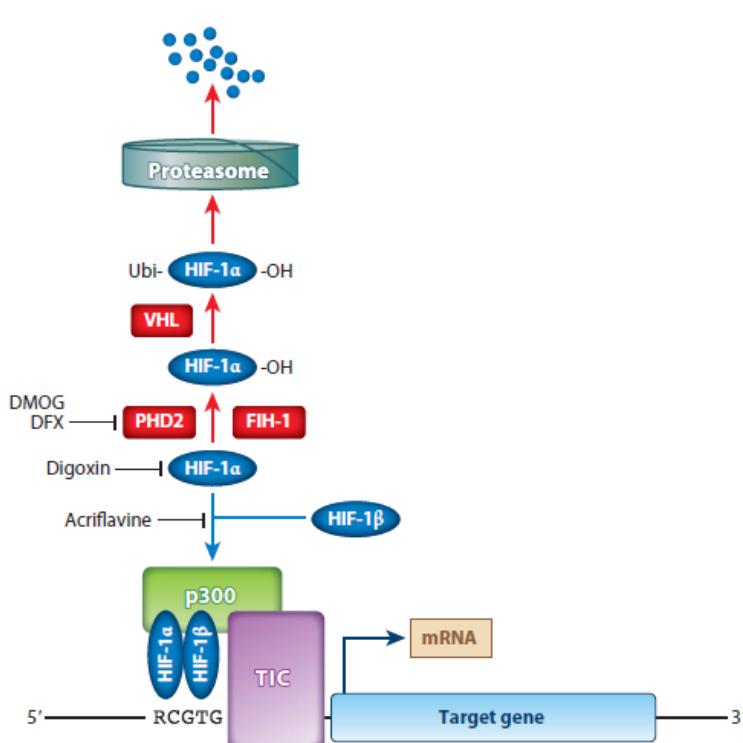


Abbildung 2-2: HIF-1 α wird unter normoxischen Bedingungen direkt durch Hydroxylierung (rote Pfeile) abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen (blaue Pfeile) wird die Hydroxylierung inhibiert und HIF-1 α stabilisiert. Es kann dann mit HIF-1 β ein Dimer bilden und bindet dann an p300 und aktiviert den Transkriptions-Initiations-Komplex. Es folgt die Transkription der ausgewählten DNA Sequenz in mRNA. Desferroxamine (DFX) und Dimethyloxalylglycine (DMOG) hemmen PHD2, dadurch kann sich ebenfalls HIF-1 α in der Zelle anreichern, dagegen hemmt Digoxin das Anhäufen von HIF-1 α und Acriflavin hemmt die Dimerbildung von HIF-1 α und HIF-1 β (Semenza G. L., 2014).

Koaktivator CBP/p300 bindet das HIF-1-Dimer an den Transkriptions-Initiations-Komplex (TIC), welches dann zur Transkription an einer ausgewählten DNA-Sequenz 5'RCGTG-3' (R = A oder G), dem so genannten Hypoxia Responsive Element (HRE), führt (Kumar & Choi, 2014). Es sind mehr als 200 Gene bekannt, die über diesen HIF-Komplex transkribiert werden, diese sind z. B. an Erythropoese, Angiogenese, Zell-Proliferation, Energiestoffwechsel oder Apoptose beteiligt (siehe Abb. 2-1) (Gilany & Vafakhah, 2010; Simon & Keith, 2008; Gaber, Dziurla, Tripmacher, Burmester & Buttgereit, 2005).

Daneben kann HIF-1 die Durchblutung im Gewebe verbessern, wie durch die Produktion von CO durch die Eisenoxygenase-1, von NO durch die NO-Synthase oder durch die Aktivierung des α_{1B} -Adrenorezeptors, welche alle zu Vasodilatation führen. Zusätzlich führt chronische Hypoxie zur Differenzierung verschiedener Zelltypen. Wie genau dies ausgelöst wird ist noch nicht vollends verstanden. Daneben wird aber auch die Proliferation gesteigert durch Expression von Wachstumsfaktoren. Dies geschieht zur Regeneration von Schäden durch Hypoxie. Durch HIF-1 wird hier z. B. der Insulin-like Wachstumsfaktor 2 (IGF-2) transkribiert, dies führt zum einen zur Expression von HIF-1 α selbst und zum anderen zur Zellproliferation (Gilany & Vafakhah, 2010; Semenza, 2014).

Durch den Sauerstoffmangel bei Hypoxie kann die oxidative Phosphorylierung nicht weiter ablaufen. Energie wird nun mittels anaerober Glykolyse gewonnen. Dort wird Pyruvat nicht in der oxidativen Phosphorylierung abgebaut, sondern zu Laktat mittels Lactatdehydrogenase (LDH) reduziert. Dadurch kann die Zelle pro Mol Glukose deutlich weniger ATP produzieren und es kommt zum Energiemangel in der Zelle. Alle nicht essentiellen Mechanismen, wie z. B. die Proteinsynthese, werden supprimiert, damit kritischere Funktionen wie das Membranpotenzial aufrecht erhalten werden können. Da die Zelle nun deutlich mehr Glukose zur Energiegewinnung benötigt, erhöht der HIF-Komplex die Expression von Glucosetransportern und Enzymen der Glykolyse, wie z. B. LDH. Dies wird über die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) gesteuert. Bei Energiemangel – ATP liegt dephosphoryliert als AMP vor – aber auch bei erhöhtem intracellulärem Calcium wird AMPK aktiviert. AMPK steigert den katabolen Stoffwechsel zur ATP-Produktion durch Phosphorylierung oder durch Genexpression. So steigert AMPK die Glukoseaufnahme, die Glykolyse, die Fettoxidation und die Mitochondrienbiogenese, AMPK hemmt gleichzeitig die Proteinsynthese, die Glykogensynthese, die Glukoneogenese und die Fettsäure- bzw. Cholesterinsynthese (Gilany & Vafakhah, 2010; Akram, 2013)

Neben akuten und chronischen Effekten auf die Zellen hat Hypoxie noch weitere Effekte, wie Azidose, Bildung von ROS und Zelltod (siehe Abb. 2-1). Durch Veränderung des Stoffwechsels zur anaeroben Glykolyse liegt zum einen Laktat vermehrt vor (Bellone et al., 2013), zum anderen sammeln sich H⁺-Ionen an, da weniger ATP über die oxidative Phosphorylierung gebildet und gleichzeitig ATP über die ATPase abgebaut wird ($H_2O + ATP \leftrightarrow H^+ + P_i + ADP$) (Gilany & Vafakhah, 2010). Dadurch kommt es sowohl zur intrazellulären als auch extrazellulären Azidose. Dies dient physiologisch zur Stabilisierung von HIF-1 α , denn durch Azidose wird das von-Hippel-Lindau-Protein vom Kerplasma in die Nukleoli transportiert und kann so nicht mehr zum proteasomalen Abbau von HIF-1 α beitragen. HIF-1 induziert im Verlauf Membran-assoziierte Transportproteine wie den H⁺/Laktat-Kotransporter, welcher H⁺ und Laktat nach extrazellulär transportiert. Dadurch wird der intrazelluläre pH-Wert ausgeglichen und es liegt nur noch eine extrazelluläre Azidose vor (Pflugrad, 2009). Durch Hypoxie kommt es ebenfalls zur vermehrten Bildung von ROS. ROS sind Sauerstoffmoleküle, die ein oder mehrere unpaare Elektronen besitzen. Dazu zählen z. B. Hydrogenperoxid, Peroxynitrate und Superoxid. Unter normoxischen Bedingungen werden ROS während des Elektronentransportes in den Mitochondrien im Zuge der oxidativen Phosphorylierung gebildet. Die Zellen schützen sich vor der toxischen Wirkung der ROS durch Antioxidanzien wie Glutathion. Wie genau ROS unter Hypoxie entsteht ist bisher noch nicht vollends verstanden, eine Möglichkeit von ROS-Bildung besteht während der Reoxygenierung, es besteht jedoch eine Korrelation zwischen dem Anstieg von ROS und der Aktivierung von HIF-1 (Gilany & Vafakhah, 2010; Mason & Ratcliffe, 2014; Cairns, Harris & Mak, 2011; Semenza, 2014).

Wenn nun die oben genannten Schutzmechanismen der Zelle nicht ausreichen, geht die Zelle durch Nekrose, Apoptose oder Autophagie in den Zelltod. Alle Mechanismen sind als Auslöser beim Zelltod infolge von Hypoxie beschrieben. So ist auch die Auslösung des Zelltodes über HIF-1 möglich. Dabei wird durch HIF-1 die Apoptose durch Expression von pro-apoptotischen Proteinen wie z. B. Bad, Bax, Bak aus der BCL-2-Familie (B-Zell-Lymphoma-2) ausgelöst. Daneben führt Hypoxie zur Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53. Unter Normoxie hat p53 eine sehr kurze Halbwertszeit, p53 wird bei DNA-Schäden, aber auch bei chronischer Hypoxie stabilisiert und steuert dann als Transkriptionsfaktor die Regulation des Zellzyklus und kann die Apoptose initiieren. Wann nun die Mechanismen der Zelle unter Hypoxie zur Anpassung ausreichen oder die Zelle in den Zelltod geht ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Eine alleinige Überexpression von pro-apoptotischen Proteinen reicht wohl nicht aus, es werden zum Zelltod noch weitere Faktoren wie dauerhafte Hypoxie oder Azidose benötigt.

(Gaber, Dziurla, Tripmacher, Burmester & Buttgereit, 2005; Gilany & Vafakhah, 2010; Brahimi-Horn, Chiche & Pouysségur, 2007; Pflugrad, 2009).

2.2.1 Physiologisches und pathophysiologisches Vorkommen von Hypoxie im menschlichen Körper

Physiologisch tritt in der frühen Embryogenese Hypoxie auf: Durch Zellteilung einer befruchteten Eizelle wächst der Embryo und wird bis zur Ausbildung des Kreislaufsystems ab der 8. Woche nur durch Diffusion ernährt. Diese reicht dann aber zunehmend nicht mehr aus um eine Normoxie aufrecht zu erhalten (Semenza, 2014).

Pathophysiologisch führt Hypoxie zu vielen Erkrankungen: So gibt es ischämische kardiovaskuläre Erkrankungen wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und die koronare Herzerkrankung (KHK), bei denen es aufgrund von Störungen in der Durchblutung zu Ischämien der nachfolgenden Gewebe kommt. Meist liegt eine Arteriosklerose zugrunde. Physiologisch wird bei Hypoxie HIF-1 stabilisiert und dieses steigert die Sauerstoffkonzentration über verschiedene Mechanismen, wie EPO oder VEGF. Diese Adaptationen benötigen jedoch einige Zeit und können deshalb bei akuten Ereignissen, wie einer Plaqueruptur mit nachfolgendem Myokardinfarkt, nicht wirken. Zusätzlich wird die Adaptation durch Alterung oder beispielsweise auch durch Diabetes mellitus gestört. Daneben gibt es auch ischämische zerebrale Erkrankungen, die bei akuter Hypoxie im Falle eines Gefäßverschlusses ebenfalls nicht kompensiert werden können und zu einem Schlaganfall führen. Auch bei der Wundheilung tritt Hypoxie auf, durch den Sauerstoffmangel wird mittels HIF-1 die Wundheilung initiiert, die bei Diabetikern und im hohen Alter durch Hemmung der Stabilisierung von HIF-1 ebenfalls inhibiert wird. Daneben gibt es noch weitere Erkrankungen die mit einer Hypoxie assoziiert sind, wie z. B. das chronische Schlafapnoe-Syndrom, die mesenteriale Ischämie, Vaskulitiden, Diabetes mellitus, Entzündungsprozesse, Psoriasis, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, Präeklampsie und Tumorerkrankungen (Pflugrad, 2009; Semenza, 2014; Gilany & Vafakhah, 2010).

Der hypoxische Tumorphänotyp

Hypoxie in Tumoren geht mit einer schlechten Prognose einher (Cairns, Harris & Mak, 2011; Lluis, Buricchi, Chiarugi, Morales & Fernandez-Checa, 2007). Solide Tumoren haben zum Teil große hypoxische Bereiche, diese entstehen durch ein Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Vaskularisation. Ab einem Abstand der Zellen von über 150 µm vom ernährenden Gefäß

tritt Hypoxie auf, da dann die Diffusion für Sauerstoff nicht mehr ausreicht. Mit weiterem Abstand vom Gefäß treten Nekrosen auf, da es dort zu Anoxie aber auch ab ca. 200 µm zur Einschränkung der Nährstoff-Diffusion kommt (Thomlinson & Gray, 1955). Der Sauerstoffgehalt in einem soliden Tumor liegt bei ca. 1-10 % (Rajendran et al., 2004). Durch die Hypoxie im Tumor wird HIF-1 α stabilisiert. HIF-1 führt wie oben bereits erwähnt zur Umstellung des Stoffwechsels auf die anaerobe Glykolyse. Dies ist für den Tumor essenziell, da der Tumor seine Energie vorwiegend über die anaerobe Glykolyse sichert. Dies wurde schon Anfang des 20. Jahrhunderts durch Warburg beschrieben und wird heute als Warburg-Effekt bezeichnet (Warburg, 1910; Warburg, 1930; Warburg, 1955; Warburg, 1956; Gatenby & Gillies, 2004). Ebenso entsteht durch Hypoxie eine Azidose, diese weisen auch Tumoren auf und sind mit ein Grund für Chemoterapieresistenz. Daneben ist jedoch oft auch die Vaskularisation nicht mehr ausreichend um das Chemotherapeutikum in ausreichender Dosis in den Tumor zu transportieren. Weiterhin sind manche Tumorzellen resistent gegen Radiotherapie, da dort weniger Sauerstoff für die Bildung von ROS durch Bestrahlung zur Verfügung steht (Krtolica & Ludlow, 1996; Merlo, Pepper, Reid & Maley, 2006). Die vermehrte Expression von VEGF im hypoxischen Tumor steigert die Angiogenese. Die so neu gebildeten Blutgefäße zeigen jedoch im Vergleich zu physiologischen Gefäßen deutliche strukturelle Defizite (Vaupel, 2004), zusätzlich führt VEGF zu einer erhöhten Permeabilität der Blutgefäße, wodurch es dann zur hämatogenen Metastasierung kommen kann. Daneben führt HIF-1 zu einem Remodeling der extrazellulären Matrix, indem z. B. die Procollagen-Lysin-2-Oxiglutarat-5-Dioxygenase 2 (PLOD 2) überexprimiert wird und so zu einer extensiven posttranslationalen Modifikation von Kollagen führt, welches die Zell-Zell-Verbindungen stört

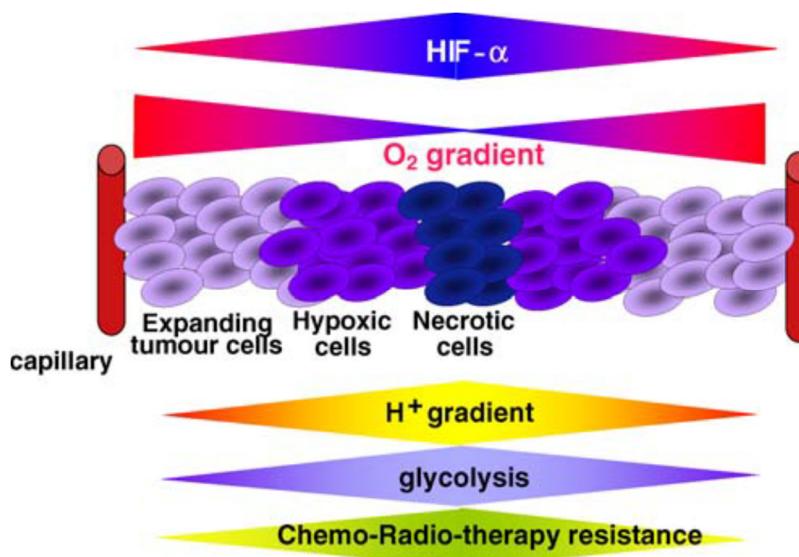


Abbildung 2-3: Der hypoxische Tumorphänotyp. Je weiter die Tumorzellen vom Gefäß entfernt sind, desto niedriger ist die Sauerstoffkonzentration und desto höher ist HIF-1 α . Dies führt zur Azidose und anaeroben Glykolyse. Dazu entwickeln hypoxische Tumore eine Resistenz gegen Chemo- und Radiotherapie (Brahimi-Horn, Chiche & Pouysségur, 2007).

(Semenza, 2014). Daneben steht die Stabilisierung von HIF-1 in Zusammenhang mit einem Funktionsverlust von E-Cadherinen, die zur Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Verbindungen beitragen (Pflugrad, 2009). Eine weitere Eigenschaft von Tumoren ist die Apoptoseresistenz, die durch Mutation von p53 entstehen kann: p53 ist in ca. 50 % aller Tumore mutiert. Durch diese Mutation haben Tumorzellen eine erhöhte Resistenz gegen durch Hypoxie ausgelösten Zelltod (Pflugrad, 2009).

Die durch Hypoxie ausgelösten und über HIF-1 gesteuerten Effekte auf die Zellen sind für Tumorzellen effektive Mechanismen um ihr Überleben zu sichern. Dies wurde von Brahimi-Horn, Chiche und Pouysségur als hypoxischer Tumorphänotyp bezeichnet (siehe Abb. 2-3) (Brahimi-Horn, Chiche & Pouysségur, 2007).

2.2.2 Hypoxie und Aneuploidie

Einige Studien zeigten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Hypoxie und Aneuploidie. Kondoh et al. zeigten, dass Endothel-Zellen unter hypoxischen Bedingungen im Wechsel mit Reoxygenierung Aneuploidien entwickelten (Kondoh et al., 2013). Ueyama et al. kultivierten mesenchymale Stammzellen bei 5 % Sauerstoffkonzentration und erzeugten so deutlich früher aneuploide Stammzellen als bei Normoxie (Ueyama et al., 2011). Aneuploidie bezeichnet dabei einen Chromosomensatz, der kein ganzes Vielfaches eines haploiden Chromosomensatzes besitzt (Schaffer, McGowan-Jordan & Schmid, 2013; Ricke & van Deursen, 2013). Dabei wird zwischen numerischer Aneuploidie und struktureller Aneuploidie unterschieden. Bei der numerischen Aneuploidie liegen ganze Chromosomen vermehrt oder verringert vor, bei der strukturellen Aneuploidie dagegen nur einzelne Chromosomenabschnitte (Storchova, 2012).

Vorkommen von Aneuploidie

Angeborenes Vorkommen

Angeborene Aneuploidien sind eine der häufigsten Abortursachen. Werden Kinder mit angeborenen Aneuploidien lebend geboren, so weisen sie vorwiegend die autosomalen Trisomien der Chromosomen 13, 18 oder 21 auf (Siegel & Amon, 2012; Hassold, Hall & Hunt, 2007 zitiert nach Storchova, 2012). Veränderungen der Geschlechtschromosomen führen zum Turner-Syndrom und Klinefelter(XXY)-Syndrom. Bei der gemischten Mosaik-Aneuploidie sind bis zu 25 % der Körperzellen aneuploid (Siegel & Amon, 2012; Ganmore, Smooha & Izraeli, 2009). Es gibt aber auch angeborene strukturelle Aneuploidien wie das Cri-du-Chat-Syndrom, das Williams-Beuren-Syndrom, das Rubinstein-Taybi-Syndrom, das

Mikrodeletions-Syndrom 22q11, das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom (Therman & Susman, 1993, S. 254-272; S. 238; Angulo, Butler & Cataletto, 2015; Duca et al., 2013; Hacihamdioglu, Hacihamdioglu & Delil, 2015; Theile, Draf & Heldt, 1978; Burn, 1986; Corcuera-Flores et al., 2015)

Erworbene Aneuploidien

Polyploide Zellen kommen natürlicherweise in Trophoblasten, Megakaryozyten und in Hepatozyten vor (Ducan et al., 2010; Davoli & de Lange, 2011). In den perizentralen Regionen der Leber wurden aneuploide Zellen nachgewiesen, die Anzahl steigt mit dem Alter (Ducan et al., 2012). Zusätzlich wurde Aneuploidie in Gliazellen und Lymphozyten gefunden, deren Anzahl ebenfalls mit dem Alter zu nahm (Kingsbury et al., 2005; Rehen et al., 2001; Rehen et al., 2005; Nowinski et al., 1990). Im Gehirn wurden zusätzlich vermehrt aneuploide Zellen bei Alzheimer-Patienten gefunden (Faggioli, Vijg & Montagna, 2011; Faggioli, Wang, Vijg & Montagna, 2012). Bei Patienten mit Ataxia teleangiectatica (Aguilar, Kamoshita, Landing, Boder & Sedgwick, 1968) und mit Schizophrenie (Yurov et al., 2008) wurden auch häufiger aneuploide Zellen gefunden.

Vorkommen in Neoplasien

Weaver und Cleveland geben an, dass 90 % der soliden Tumore und 75 % des Blutkrebses aneuploid sind (Weaver & Cleveland, 2006). Laut Negrini, Gorgoulis & Halazonetis und Ricke, van Ree & van Deursen ist in jedem Tumor chromosomale Instabilität zu finden (Negrini, Gorgoulis & Halazonetis, 2010; Ricke, van Ree & van Deursen, 2008). Chromosomale Instabilität (CIN) entsteht, wenn durch einen aneuploiden Chromosomensatz die Expression von Genen, die die Chromosomenteilung korrekt durchführen, verändert wurde. Dadurch nimmt die chromosomale Instabilität mit jeder Teilung weiter zu. Der Begriff der chromosomal Instabilität wird vor allem im Zusammenhang mit Tumoren benutzt (Ricke, van Ree & van Deursen, 2008; Thompson, Bakhoum & Compton, 2010). Abb. 2-4 zeigt verschiedene Tumorerkrankung mit den darin gefundenen Aneuploidien (Sandritter, 1965; Hansemann, 1890; Weaver, Silk, Montagna, Verdier-Pinard & Cleveland, 2007; Siegel & Amon, 2012).

Schon 1890 hat Hansemann beschrieben, dass es in Epitheltumoren asymmetrische Zellteilungen gibt, bei der Zellen mit unterschiedlichem Chromatingehalt entstehen (Hansemann, 1890; Hardy & Zacharias, 2005). Kother fand 1964 heraus, dass selbst ein Karzinoma *in situ* schon Aneuploidien aufweist (Kother & Sandritter, 1964). Auch Hung et al. untersuchten, ob Aneuploidie in Vorstufen eines Tumors auftritt. Sie fanden heraus, dass beim

Erkrankung	Betroffene Chromosomen	Häufigkeit
Kolorektales Karzinom	komplexe Karyotypen +7; -17, 18	bis 75 %
Lungenkrebs	Komplexe Karyotypen -Y, 22	bis 100 %
Brustkrebs	+7, 8, 20; -13, X	häufig
Ovarial-karzinom	+1, 2, 3, 6, 7, 9, 12, 20 -4, 8, 11, 13, 14, 15, 17, 22	häufig
Prostata-karzinom	+7; -Y	häufig
AML	komplexe Karyotypen +8; -7	bis 20 % 10–15 %
ALL	+4, 6, 10, 14, 18, 21	Kinder bis 30 % Erwachsene bis 5 %
CML	+8, 17, 19, 21; -7, 17, Y	besonders Blasenkrise
CLL	komplexe Karyotypen +12	bis 10 % bis 25 %
Non-Hodgkin-Lymphome	+3, 5, 7, 8, 11, 12, 18; -13, 14, 15	10–20 %
Multiples Myelom	komplexe Karyotypen +3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21	bis 90 % bis 66 %

AML=Akute myeloische Leukämie, ALL=Akute lymphatische Leukämie, CML=Chronisch myeloische Leukämie, CLL=Chronisch lymphatische Leukämie
Quellen: *Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology*. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/>
Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2006). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.). URL: <http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/mitelman>

Abbildung 2-4: Aneuploidien bei ausgewählten Tumorerkrankungen mit Angabe der Häufigkeiten (Schnerch, Hasskarl, Engelhardt & Wäsch, 2006, Tab. 1)

Bronchialkarzinom der Verlust des 3p-Armes schon im Stadium der Hyperplasien zu finden ist (Hibi et al., 1992; Hung et al., 1995). Des Weiteren wurden in Leberdysplasien als Vorstufe des hepatzellulären Karzinoms, in prostatischen intraepithelialen Neoplasien als Vorstufe des Prostatakarzinoms oder im Barrett-Syndrom, als Vorstufe des Ösophaguskarzinoms aneuploide Zellen beschrieben (Schnerch, Hasskarl, Engelhardt & Wäsch, 2006). Stoler et al. untersuchten kolorektale Karzinome auf genetische Veränderungen. Auch sie fanden Veränderungen des Genoms schon in Polypen der Darmwand, Aneuploidie ist bei der Adenom-Karzinom-Sequenz beteiligt (Stoler et al., 1999). Ein bekanntes Beispiel für Chromosomenaberrationen in Tumoren ist das Philadelphia-Chromosom bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML). Durch reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 entsteht das Philadelphia Chromosom 22q- mit einem BCR-abl Fusionsgen. Es wird eine abnormale mRNA transkribiert, welche wiederum über die Bildung eines abnormalen Proteins schließlich zur CML führt (Bennour, Saad & Sennana, 2015).

Aneuploidie und CIN sind mit schlechterer Prognose, Chemo- und Radiotherapieresistenz sowie Metastasierung assoziiert (Thompson & Compton, 2011). So wird z. B. der Grad der Aneuploidie beim Prostatakarzinom und bei oralen Leukoplakien zur Prognoseeinschätzung herangezogen, denn je größer die chromosomale Instabilität ist, desto schlechter ist die Prognose dieser Patienten (So et al., 2001; van Zyl, van Heerden, Langenegger & van Heerden, 2012).

Folgen von Aneuploidie

Aneuploidie führt physiologisch in den Zellen zu einem G1-Arrest. Dies wird über p53 gesteuert. DNA-Schäden führen zur Aktivierung der ATM(ataxia teleangiectatica mutated)-Kinase. Diese phosphoryliert p53 und verhindert so dessen Abbau (Siegel & Amon, 2012). p53

führt zum Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase, kann die Zellalterung initiieren oder die Zelle in Apoptose schicken (Aylon & Oren, 2011). Deshalb haben Tumorzellen häufig einen Defekt des p53-Gens (Tomasini, Mak & Melino, 2008). Proliferieren aneuploide Zellen dennoch, so ist die Proliferationsrate oft reduziert. Aneuploide Embryonen wachsen beispielsweise intrauterin deutlich langsamer und haben ein geringeres Geburtsgewicht (Storchova, 2012). Es wurde bisher vor allem die Auswirkungen eines Zugewinns von Chromosomen in aneuploiden Zellen untersucht, da Monosomien der autosomalen Chromosomen aufgrund der Haploinsuffizienz in normalen menschlichen Zellen praktisch nicht, jedoch in Tumorzellen vermehrt zu finden sind. Warum es zu einer verminderten Proliferationsrate kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Erklärung ist die veränderte Genexpression und die daraus resultierende vermehrte Proteinexpression mit Proteotoxizität. Proteotoxizität bedeutet dabei ein Anreichern von Proteinen aufgrund einer Störung des Proteingleichgewichts, welches für die Zelle schädlich ist (Storchova, 2012; Dürrbaum & Storchova, 2016). Die Genexpression korreliert dabei mit der Anzahl der Genkopien in aneuploiden Zellen, jedoch nicht immer mit dem mRNA-Level. Nur ca. 25 – 56 % der Gene auf dem Chromosom 21 waren bei einer Trisomie 21 im Vergleich zu diploiden Zelle überexprimiert (Torres, Williams & Amon, 2008). Die Protein-Anzahl nahm um das 1,3-fache in triploiden Säugetier-Zellen zu. Die genauen Mechanismen dazu sind noch nicht bekannt (Dürrbaum & Storchova, 2016). Es sind aber nicht nur die Gene auf dem zusätzlichen Chromosom überexprimiert, sondern auch viele Gene auf anderen Chromosomen. Das kann zum einen daran liegen, das auf dem triploiden Chromosom, Transkriptionsregulatoren für Gene auf anderen Chromosomen exprimiert werden, zum anderen kann Aneuploidie selbst zu veränderten Genexpression führen. So wurde in aneuploiden menschlichen Zellen eine Herabregulierung von verschiedenen RNA- und DNA-Abläufen gefunden wie DNA-Replikation und Reparatur, Zell-Zyklus, Chromosomen-Kondensation und Teilung, Ribosomen-Biogenese und RNA-Verarbeitung. Hochreguliert waren dagegen Lysosome und der Membranmetabolismus. Eine Ursache dafür könnte der chronische proteotoxische Stress in aneuploiden Zellen sein, vollständig ist dies jedoch nicht verstanden (Dürrbaum & Storchova, 2016).

Aneuploidie kann aber auch der Zelle Vorteile bringen, so bilden diese Zellen häufiger Resistenzen gegen Medikamente aus und können sich besser unter selektivem Druck entwickeln, dies wird besonders an aneuploiden Tumorzellen deutlich (Siegel & Amon, 2012).

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Hypoxie und Aneuploidie in Tumoren führt zu einer Verschlechterung der Prognose der Patienten. Beides wird in fast allen soliden Tumoren gefunden, doch der Zusammenhang zwischen Hypoxie und Aneuploidie ist noch wenig erforscht. Um die Prognose der Tumorpatienten verbessern zu können, müssen diese Zusammenhänge besser verstanden werden.

Aus diesem Grund wurden erstmals die Auswirkungen von chronischer Hypoxie auf den Energiehaushalt sowie chromosomale Veränderungen primärer menschlicher Bronchialepithelzellen erforscht.

Zu Beginn stand die Etablierung der hypoxischen Kultivierung und der Chromosomenanalyse von epithelialen Zellen im Vordergrund. Es wurden zwei verschiedene primäre Bronchialepithelzellen unterschiedlicher Spender analysiert. Es folgte die Kultivierung der verschiedenen primären Bronchialepithelzellen für vier Wochen in Hypoxie mit wöchentlicher Analyse der Chromosomen. Ebenso wurde der Transformationsassay etabliert, um Transformationseigenschaften bei den Zellen nachweisen zu können. Damit wurden die bei Hypoxie kultivierten primären Bronchialepithelzellen ebenfalls wöchentlich analysiert. Da Hypoxie einen unmittelbaren Einfluss auf den Energiehaushalt hat, wurden ATP- und auch GTP-Konzentrationen zu verschiedenen Zeiten mittels HPLC bestimmt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Puffer

Es wurden ausschließlich Chemikalien in der Qualität „zur Analyse“ verwendet.

- Destilliertes Wasser: Hergestellt durch Milli-Q Integral 15 Pure
- Natriumchlorid-Lösung (0,9 % NaCl in Aqua dest.) von AnalaR NormaPur: K.-Nr. 27810.295
- Kaliumchlorid (0,075 M KCl in Aqua dest.) von Grüssing GmbH Analytica: K.-Nr. 12009
- Sørensen-Puffer aus 233 ml einer Na₂HPO₄-Lösung mit 267 ml einer KH₂PO₄-Lösung
- Na₂HPO₄-Lösung (5,935 g Na₂HPO₄ in 500 ml Aqua dest.) von Carl Roth GmbH & Co.KG: K.-Nr. 4984.1
- KH₂PO₄-Lösung (4,536 g KH₂PO₄ in 500 ml Aqua dest.) von Grüssing GmbH Analytica: K.-Nr. 12032
- Trypsin-Lösung (1 ml (25 mg/ml) Trypsin in 80 ml 0,9 % NaCl-Lösung) von Becton, Dickinson and Company: K.-Nr. 215240, S.-Nr. 4028468
- Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung (5 ml Giemsa in 95 ml Sørensen-Puffer) von Merck KGaA: K.-Nr. 1.09204.0500
- Fixativ für die Chromosomenpräparation (Methanol/Eisessig im Verhältnis 3:1): Methanol von Carl Roth GmbH & Co.KG: K.-Nr. 4627.2, Eisessig von Merck KGaA: K.-Nr. 1.00063.2500
- KaryoMax® Colcemid® Lösung (10 µg/ml) von gibco® by life technologies™: K.-Nr. 15210-040
- Ethanol (absolut) von Merck KGaA: K.-Nr. 1.00983.2500
- Thymidine (≥99.0 % HPLC) von Sigma life Sience: K.-Nr.89270-1G, S.-Nr.BCBG3520V
- Nuklease Free Water von Ambion: K.-Nr. AM9937
- Roti®-Histokit von Carl Roth GmbH & Co.KG: K.-Nr. 6638.2
- Dulbecco's PBS (mit 2 % Kälberserum) von Stemcell Technologies: K.-Nr. 07905
- PBS (endotoxin free) von Promo Cell: K.-Nr. C-40240
- Glucoes-Stammlösung (45 % Lösung) von Sigma life Sience: K.-Nr. G8769, S.-Nr. RNBC7363
- Fixogum von Marabu GmbH & Co. KG: K.-Nr. 2901 10 000

- Immersionsöl von Merck KGaA: K.-Nr. 1.04699.0100
- Trypan blue stain (0,4 %) von Biosystems: K.-Nr. T13001
- K₂CO₃-Lösung (5 M, 69g K₂CO₃ in 100 ml Aqua dest.) von Sigma Aldrich: Katolognr. P 5833 – 500G, S.-Nr. BCB28334V
- 6 % 2-4-6-Trichloressig Säure (TCA)-Lösung von Sigma Aldrich: K.-Nr. T9159 – 100G, S.-Nr. BCBN0487V

3.1.2 Reaktions-Kits

- DetachKit 2 von PromoCell: K.-Nr. 41222
- CytoSelect™ 96-Well Cell Transformation Assay (Cell Recovery Compatible, Colorimetric) von Cell Biolabs, INC.: K.-Nr. CBA-135
- Cryo-SFM von PromoCell: K.-Nr. C-29910

3.1.3 Zubehör

- Serologische Rotilabo®-Pipetten, blau, steril, Schaft kurz, L 22cm, 5ml von Carl Roth GmbH & Co.KG: K.-Nr. ET26.1
- Gestopfte Glaspipetten von Carl Roth GmbH & Co.KG: K.-Nr. E326.1
- Sterile Filter von Minisart: K.-Nr. 16534, S.-Nr. 30320103
- Abgeschliffene Metallspitze von Edelstahlkanülen mit Luer-lock Verschluss mit abgeschliffener Spitze
- Deckgläser (24x60mm) von Carl Roth GmbH & Co.KG: K.-Nr. H878.2
- Objekträger (76x26mm) von Gerhard Menzel GmbH: K.-Nr. AA00000102E
- Zellkulturschale von Becton Dickinson Falcon: K.-Nr. 353003, S.-Nr. 2307820
- Pipettenspitzen von Sorenson: 200µl (K.-Nr. 35240), 1000µl (K.-Nr. 35260) und von PEQIAB: 20µl (K.-Nr. 81-1020)
- Sterile Zellkulturflasche (25cm² und 75cm²) von Greiner bio-one: K.-Nr. 690960 und 658175
- Luna™ Cell Counting Slides von Logos Biosystems, Inc.; bestellt bei Biozym, K.-Nr. 101303027

3.1.4 Geräte

- Mikroskop von Carl Zeiss Microscopy GmbH: Primo Vert: K.-Nr. 415510-1101-000, S.-Nr. 3842002814

- mit Kamera von AxioCamERC5s
- Begasungsbrutschrank: Normoxieschrank von Heraeus Typ B5061 EC-O2: K.-Nr. 26142001, S.-Nr. 8500135, Hypoxieschrank von Binder: K.-Nr. 9040-0044, S.-Nr. 13-00980
- Laborgasbrenner von Fuego SCS: Nummer 8200000
- Mikrobiologische Sicherheitswerkbank von Biohazard BN-EN 2000 S/D, hergestellt von Faster, geliefert von Sarossy Labortechnik; S.-Nr. 983
- Luna fl Automated Cell Counter von Biozym: K.-Nr. 872040
- Zentrifuge von Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 Centrifuge: K.-Nr. 75004230, S.-Nr. 41613929
- Wasserbad von GFL Typ 1003 Nummer: 11196801I
- Sauerstoffsonde: VisiFerm™ DO Arc Sensors 120 von Hamilton Bonaduz AG: K.-Nr. 242163
- Vortex von Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik und VF2: K.-Nr. 452778
- Gekühlte Zentrifuge von eppendorf Mini Spin Plus: K.-Nr. 5453 09985

3.1.5 Software

- Microsoft Office 2015
- Ikarus der 1. Generation
- Hamilton Device Manager 1.0
- Cyto Vision Leica Biosystems Image Analysis and Capture System 23MAN1220.A

3.1.6 Zellkulturmedien

- BronchiaLife Basal Medium von Lifeline Cell Technology: K.-Nr. LM-007 mit BronchiaLife™ B/T Life Factors Kit
- BronchiaLife™ B/T Life Factors Kit von Lifeline Cell Technology: K.-Nr. LS-1047
- PiGrow II mit L-Glutamine und NaHCO₃ von abm: K.-Nr. HC7852 mit 10 % FBS
- DMEM von Gibco® by life technologies™: K.-Nr. 41966-029, S.-Nr. 1322533 mit 10 % FBS
- FBS Performance Plus von Gibco® by life technologies™: K.-Nr. 16000-036, S.-Nr. 1314735

3.1.7 Zellen

Zellen von der Firma abm:

Human Primary Bronchial Epithelial Cells (K.-Nr. T4006, S.-Nr. HC1013) wurden von Applied Biological Materials Inc. (abm) bestellt. Die Zellen wurden kryokonserviert geliefert in Passage 2. Nach Angaben des Herstellers befinden sich die Zellen in Zellkultur nach 15 Verdopplungen in der Alterung. Sie wurden vom Oberflächenepithel eines gesunden menschlichen Bronchus entnommen. Die Verdopplungszeit betrug 27 Stunden. Sie sind negativ getestet worden auf HIV, Hepatitis B und C, Mykoplasmien, Bakterien, Hefen und Pilze. Die Zellen wurden im Medium PiGrow II ebenfalls von abm gezüchtet.

Die Zellen stammten von einer 55-jährigen Frau. Weitere Angaben zur Spenderin wurden nicht gemacht.

Zellen von der Firma LifeLine:

Lobar Bronchial Epithelial Cells wurden von LifeLine Cell Technology (K.-Nr. FC-0054, S.-Nr. 01933) bestellt. Diese Zellen wurde mit BronchiaLife Basal Medium ernährt und in Passage 1 kryokonserviert geliefert. Dies waren menschliche Bronchialepithelzellen vom sekundärem Lobär Bronchus. Die Verdopplungszeit betrug 29 Stunden. Die Anzahl der Verdopplungen war auf 15 beschränkt. Die Zellen sind negativ auf Bakterien, Hefen, Pilze, Mykoplasmien, Hepatitis B und C, sowie HIV-1 und HIV-2 getestet worden. Die Zellen wurden im April 2011 entnommen, geliefert wurden 500.000 Zellen pro Flasche.

Die Zellen stammten von einem 21-jährigen Mann, der Kaukasier war und an einem Schädel-Hirn-Trauma nach einem Verkehrsunfall verstorben war. Der Spender war Nichtraucher.

3.2 Methoden

3.2.1 Sauerstoffbestimmung

Die Messung der Sauerstoffkonzentration im Nährmedium in der Zellkulturflasche wurde bei 5 % und 3 % Sauerstoff im Brutschrank durchgeführt. Dabei wurde die Zeit gemessen, die benötigt wurde, bis die Sauerstoffkonzentration des Nährmediums sich der Sauerstoffkonzentration im Brutschrank angepasst hat.

Vorbereitung

In eine Zellkulturflasche (25 cm^2 von Greiner bio-one) wurde vom Leibniz Institut für Neue Materialien (INM) in Saarbrücken eine Öffnung in die Decke gebohrt. Diese Öffnung hatte die Größe von der Messelektrode (Abb. 3-1). In die Flasche wurden 4 ml DME-Medium gefüllt. Durch die Öffnung wurde die Sauerstoffmesssonde in das Medium eingebracht. Die Sauerstoffmesssonde wurde über eine Halterung so fixiert, dass die Spitze der Messsonde im Medium lag. Damit der Sauerstoffaustausch zwischen dem Inhalt der Zellkulturflasche und dem Brutschrank nur über den Filter im Deckel der Flasche stattfindet, wurde die Öffnung in der Decke der Zellkulturflasche um die Sauerstoffmesssonde mit Fixogum luftdicht verschlossen. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 3-2 dargestellt.

Durchführung

Der Versuchsaufbau wurde zuerst in den Brutschrank mit Normoxie gestellt, bis das Medium auf 37°C aufgewärmt war. Dies war wichtig, da die Sauerstoffmesssonde die Sauerstoffkonzentration temperaturabhängig

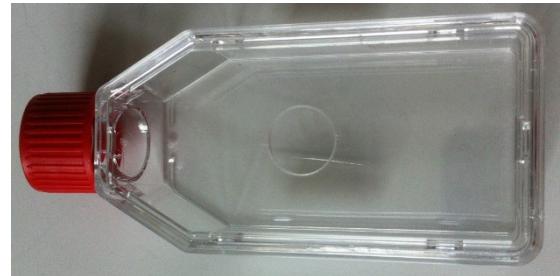


Abbildung 3-1: Zellkulturflasche mit einer Bohrung für die Sauerstoffsonde, der Deckel besitzt einen sterilen Filter.



Abbildung 3-2: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration im Medium: In einer Zellkulturflasche befinden sich 4ml DME-Medium, die Sauerstoffsonde wurde über das Loch in der Decke so in der Flasche positioniert, dass die Membran gerade mit Medium bedeckt ist. Die Sonde wurde in dem Ständer fixiert und das Loch luftdicht verschlossen.

misst. Der Versuchsaufbau mit dem angewärmten Medium wurde dann in den Brutschrank mit entweder 5 % oder 3 % Sauerstoff gestellt. Die Messung der Sauerstoffkonzentration wurde direkt am Computer gestartet. Alle zehn Minuten wurde die Sauerstoffkonzentration von der Messsonde gemessen. Die Werte wurden von der Software Hamilton Device Manager automatisch in eine Textdatei gespeichert, dabei wurde die Sauerstoffkonzentration in Prozent ausgegeben. Sobald die Sauerstoffkonzentration im Medium mehrere Stunden konstant geblieben war, wurde die Messung beendet.

Auswertung

Die gemessenen Daten wurden in eine Excel-Tabelle überführt. Daraus wurde ein Liniendiagramm erstellt, bei dem die Sauerstoffkonzentration in Prozent zur Hypoxie-Zeit aufgetragen wurde.

3.2.2 Zellkultur

Zellen von der Firma abm

Vorbereitung

Zur Herstellung des Mediums wurde zum PiGrowII Medium 10 % Kälberserum (FBS) hinzugefügt. Auf die Zugabe von Penicillin/Streptomycin wurde verzichtet, da Streptomycin als Aminoglykosidantibiotikum die Proteinsynthese von Prokaryonten beeinflusst, indem sie die 30S-Untereinheit der Ribosomen hemmt. Auch Mitochondrien und ihre Ribosomen sind gegen Streptomycin empfindlich (Alberts et al., 2011, S. 963-964), sodass die Gefahr bestand unabsichtlich den Zellstoffwechsel zu beeinflussen. Deshalb war besonders auf steriles arbeiten zu achten.

Auftauen der Zellen

Das Medium (PiGrow II mit 10 % FBS) wurde in einem Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt. Die Zellen von abm wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und kurz (60 sec.) ins Wasserbad gestellt. Dabei war darauf zu achten, dass die Zellen nicht zu schnell aufgetaut wurden, da das Konservierungsmittel DMSO zytotoxisch wirkt. Die aufgetauten Zellen wurden im Konservierungsmittel resuspendiert und dann in ein steriles Reagenzglas überführt, das schon 5 ml aufgewärmtes Medium enthielt. Das Gemisch wurde – nach dem Protokoll zum Auftauen der Zellen – für drei Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Überschüssiges Medium

wurde entfernt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Dies wurde in eine sterile Kulturflasche (25 cm^2) überführt und bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % Umgebungsluft inkubiert.

Mediumwechsel und Passagieren

Zweimal pro Woche wurde bei diesen Zellen das Medium gewechselt. Waren die Kulturflaschen über 70 % bewachsen, so wurden diese passagiert. Zum Passagieren wurde das DetachKit2 benutzt: Die Reagenzien wurden im Wasserbad erwärmt, das alte Medium aus der Zellkulturflasche entfernt, anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde Trypsin hinzugegeben und die Zellen in den Brutschrank gestellt. Nach zwei bis drei Minuten begannen sich die Zellen abzulösen, dies wurde mit dem Mikroskop überprüft. Waren alle Zellen gelöst, wurde Trypsininhibitor hinzugegeben und die Zellen in ein steriles Reagenzglas überführt. Dies wurde bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in neues Medium aufgenommen. Anhand der Größe des Zellpellets wurde dann entschieden, auf wie viele Kulturflaschen die Zellen aufgeteilt wurden, meist auf fünf bis sieben Kulturflaschen (25 cm^2) (Lindl, 2002).

Zellen von der Firma LifeLine

Vorbereitung

Dem BronchialLife Basal Medium mussten zuerst der BronchiaLife™ B/T Life Factors Kit hinzugefügt werden. Wie bei den Zellen von abm wurde auch hier kein Antibiotikum zugesetzt.

Auftauen der Zellen

Die Zellen von LifeLine wurden wie die Zellen von abm aufgetaut.

Mediumwechsel und Passagieren

Laut mitgeliefertem Protokoll mussten bei den Zellen von LifeLine alle zwei Tage das Medium gewechselt werden. Passagiert wurden diese Zellen, wenn eine Konfluenz von über 70% vorlag nach dem gleichen Protokoll wie die Zellen von abm.

3.2.3 Behandlung der Zellen

Hypoxie

Um die Zellen in einem hypoxischen Milieu zu kultivieren, wurde der Hypoxiebrutschrank auf die entsprechende Sauerstoffkonzentration eingestellt. Ein Hypoxiemilieu im Brutschrank erfolgte durch Zumischen von Stickstoff.

Zellen von der Firma abm

Die ersten Experimente unter Hypoxie wurden mit den Zellen von abm durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Versuchsanordnungen getestet. Die Zellen wurden zuerst bei 5 % Sauerstoff kultiviert, dort wuchsen die Zellen gut weiter. Aus diesem Grund wurden die Zellen bei Anoxie kultiviert.

Herstellung von Anoxie

Anoxie konnte in unserem Hypoxiebrutschrank nicht eingestellt werden. Deshalb wurde eine Methode entwickelt, um die Zellen steril nur mit Stickstoff zu begasen: Handelsübliche Luftballons wurden an einer Stickstoffgasflasche mit Stickstoff befüllt und luftdicht verschlossen. Mit einer sterilen 50 ml Spritze wurde wie in der Abb. 3-3 sichtbar ist, Stickstoff abgefüllt. Auf die Spritze wurde ein Drei-Wege-Hahn gesetzt. Auf den Drei-Wege-Hahn wurde dann ein steriler Filter (0,2 µm Porengröße) angebracht. Darauf wurde eine abgeschliffene Metallspitze gesetzt (Abb. 3-4), die zuvor in 80 % Ethanol sterilisiert wurde.

Die befüllten Zellkulturflaschen wurden senkrecht in die Lamina-Air-flow gestellt. Die Metallspitze wurde abgeflammt und dann, bis fast auf den Boden, in die Zellkulturflasche gehalten. 50 ml Stickstoff wurde langsam über die Spritze hinzugegeben. Da Stickstoff schwerer als Luft ist, sank dieser auf den Boden ab. Dies wurde noch einmal wiederholt, sodass die Flasche insgesamt mit 100 ml Stickstoff begast wurde. So sollte sichergestellt werden, dass sich kein Sauerstoff mehr in der Zellkulturflasche befand. Die Zellkulturflasche wurde mit einem luftdichten Deckel verschlossen und in den Brutschrank gestellt.

Nur die Zellen von abm wurden in Anoxie (0 % Sauerstoff) kultiviert. Die Zellen proliferierten zunächst gut, jedoch sind nach ersten Mediumwechsel mit normoxischen Medium alle Zellen abgestorben. Da es nicht möglich war ein anoxisches Medium herzustellen, wurden keine weiteren Zellen unter Anoxie kultiviert.

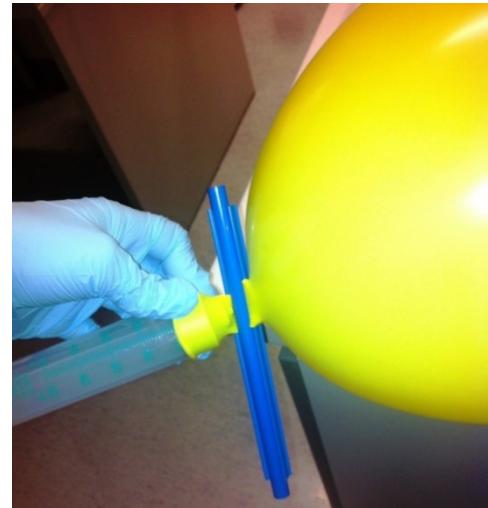


Abbildung 3-3: Befüllen einer 50 ml Spritze mit Stickstoff aus dem Ballon. Der Ballon ist durch eine Klemme luftdicht verschlossen. Die Klemme wurde entfernt und dabei die Spritze auf 50 ml aufgezogen, anschließend wird der Ballon wieder verschlossen.



Abbildung 3-4: Spritze mit Drei-Wege Hahn, steriles Filter und Metallspitze.

Aus diesem Grund wurden die Zellen der Firma abm zusätzlich noch bei 2% und 1% Sauerstoff kultiviert, aber auch dort starben die Zellen nach dem Mediumwechsel bzw. Passagieren ab. Deshalb sind die weiteren Versuche an den Zellen von der Firma abm im Brutschrank mit 5 % Sauerstoff durchgeführt worden.

Bei diesen Zellen wurde in den Vorversuchen die Chromosomenpräparation (siehe Kapitel 3.2.4.) etabliert.

Zellen von der Firma LifeLine

In den Experimenten mit den Zellen von abm wurde deutlich, dass die Zellen ein Mediumwechsel bzw. das Passagieren nicht überleben, wenn die Sauerstoffkonzentration zu niedrig ist. Bei 5 % Sauerstoff überstanden die Zellen den Mediumwechsel gut, jedoch publizierte Haque, Rahman, Kasim & Alabsi, 2013, dass sich im Lungengewebe physiologisch 4-19 % Sauerstoff befindet. Damit die Zellen wirklich in hypoxischer Umgebung wuchsen, wurden die Bronchialepithelzellen von der Firma LifeLine bei 3 % Sauerstoff kultiviert. Bei dieser Sauerstoffkonzentration haben die Zellen Mediumwechsel und Passagieren gut überlebt.

Die Zellen wurden aufgetaut, eine Woche später auf vier Zellkulturflaschen (25 cm^2) aufgeteilt. Weitere zwei Tage später wurden zwei Zellkulturflaschen (25 cm^2) in den Brutschrank mit 3 % Hypoxie gestellt, die anderen zwei Zellkulturflaschen (25 cm^2) wurden als Kontrolle im Brutschrank mit Normoxie angezüchtet. Die Zellen wurden alle gleich behandelt.

Glukose

Statistisch gesehen erkranken Patienten mit Diabetes mellitus häufiger an einer Krebserkrankung als Patienten ohne Diabetes mellitus (Giovannucci et al., 2010). Aus diesem Grund wurde bei den Zellen von abm zu einigen Zellkulturflaschen, die im Brutschrank in Hypoxie bzw. in Normoxie kultiviert wurden, 5 μl Glukose einer 45 % Stammlösung pro ml Medium hinzugegeben, was einer zusätzlichen Glukose-Menge von etwa 225 mg pro dl entspricht. Diese Glukosekonzentration würde bei einem Patienten zur Diagnose Diabetes mellitus führen.

Aufgrund der Ergebnisse der abm Zellen im Transformations-Assay (siehe 4.2.3), wurde keine zusätzliche Glukose dem Medium für die Zellen von LifeLine zugesetzt.

3.2.4 Chromosomenanalyse

Zum Nachweis einer Aneuploidie wurde eine Chromosomenanalyse mit Erstellung eines Karyogrammes durchgeführt.

Chromosomenpräparation

Vorbereitung

Um die Chromosomen der Zellen präparieren zu können, sollte eine 50-60% Konfluenz der Zellen vorhanden sein. Damit die Zellen in den Zellzyklus eintreten, war es wichtig, dass die Zellen ausreichend Nährstoffe hatten, deshalb wurde den Zellen am Vorabend frisches Medium zugegeben. Ebenfalls wurden die Objektträger am Vorabend in Ethanol bei -20 °C gestellt. Am nächsten Morgen wurde dem Medium in den Zellkulturflaschen 10µl Colcemid (Stammlösung 50 ng/ml) hinzugegeben. Die Zellen wurden für einige Stunden in den Brutschrank gestellt, bis diese ausreichend Mitosen zeigten. Dabei wurden die normoxischen und die hypoxischen Zellen in den Brutschrank gestellt, in dem sie auch kultiviert wurden. Währenddessen wurde eine 0,075 M KCl-Lösung bei 37 °C warmgestellt, sowie das DetachKit2, das zum Ablösen der Mitosen benötigt wurde. Frisch angesetztes Fixativ aus Methanol und Eisessig (3:1) wurde in den Gefrierschrank gestellt.

Durchführung

Sobald genügend Mitosen in der Zellkulturflasche sichtbar waren, konnten die Zellen abgeerntet werden. Dazu wurde der Überstand unter sterilen Bedingungen in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Ablösen der Mitosen wurde das DetachKit2 benutzt, jedoch musste darauf geachtet werden, dass vorwiegend Zellen in Mitosen abgeerntet werden. Da Zellen in Mitosen nicht so fest auf dem Boden der Kulturflasche haften wie die anderen Zellen, musste die Abreitung sofort gestoppt werden, wenn einige Zellen sich gelöst hatten. Der Überstand über den Zellen wurde in das Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde bei 1000 rpm 8 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Zellkulturflasche wurde verworfen, da Colcemid zu Chromosomenveränderungen führt (Yamamoto, Wakata, Aoki, Miyamae & Kodama, 2014).

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand nur so weit entfernt und verworfen, dass noch ein wenig Flüssigkeit zum Resuspendieren übrig war. Im restlichen Überstand wurden die Zellen resuspendiert. Diese wurden dann mit 8 ml warmer KCl-Lösung überschichtet. Dabei musste auf die Luftfeuchtigkeit geachtet werden, da davon die Einwirkzeiten abhängen (siehe Tabelle 3-1).

Temperatur	Luftfeuchtigkeit	Hypotonie (min)	Präparation
23 °C	30 %	2 min 10 sec	nass
23 °C	35 %	1 min 55 sec	nass
23 °C	40 %	1 min 20 sec	trocken
23 °C	45 %	1 min 15 sec	trocken
23 °C	50 %	1 min 10 sec	trocken

Tabelle 3-1: Hypotonie-Zeit abhängig von der Temperatur und Luftfeuchtigkeit

Ist die Hypotonie-Zeit erreicht, musste die Zentrifugation bei 1000 rpm direkt gestartet werden und für 8 min ohne Bremse durchlaufen.

Der Überstand wurde bis auf ein kleines Restvolumen entfernt und verworfen und die Zellen wurden im restlichen Überstand resuspendiert. Zu den Zellen wurde nun vorsichtig das Fixativ hinzugegeben. Zuerst wurde ein Tropfen Fixativ hinzugegeben, dann resuspendiert, dann zwei Tropfen und wieder resuspendiert. Nach und nach konnte die zugegebene Menge erhöht werden, dabei musste auf eine gute Resuspendierung geachtet werden. Insgesamt wurde 5 ml Fixans zu gegeben. Die Lösung wurde dann für 20 min bei 4 °C gelagert, danach wieder abzentrifugiert und erneut mit Fixativ gewaschen.

Tropfen auf den Objektträger:

Die Objektträger wurden aus dem Ethanol genommen und zum Antrocknen schräg gestellt. Dann wurde aus ca. 20 cm Entfernung die Zellsuspension auf den Objektträger getropft der schräg gestellt wurde, bis er getrocknet war. Danach wurde der Objektträger am Mikroskop optisch kontrolliert.

Verfeinerung der Methode

Nach 1 min. 55 sec. bei einer Luftfeuchtigkeit von 35 % waren wenig Mitosen auf dem Objektträger sichtbar. Die Chromosomen waren jedoch kaum aufgespreitet, sodass eine Auswertung nicht möglich war.

Da die Luftfeuchtigkeit im Labor nicht optimal einstellbar war, wurde die Chromosomenanalyse in einer Kammer (Abb. 3-5) wiederholt, die das Leibnitz Institut für Neue Materialien (INM) in Saarbrücken gebaut hatte. Darin war es möglich eine konstante Luftfeuchtigkeit von 42 % einzustellen.



Abbildung 3-5: Kammer für Chromosomenpräparation: mit Luftbefeuchter und Heizkabel. Die Luftfeuchtigkeit betrug 42 %, die Temperatur wurde der Raumtemperatur angeglichen.

In der Kammer wurde die Chromosomenanalyse wiederholt. Die Zellen wurden 1 min 20 sec. in KCl-Lösung inkubiert. Durch Verändern des Versuchsablaufs gelang es, einige Mitosen auf dem Objektträger zu finden, die für die weitere Präparation nicht optimal waren. Aus diesem Grund wurde die KCl-Zeit auf 1min 10sec. reduziert, dies lieferte optisch bessere Mitosen.

Die Luftfeuchtigkeit ist ebenso wichtig beim Tropfen der Suspension auf dem Objektträger. Deshalb wurden nun auch die Objektträger in der Kammer betropft. Diese Modifikationen lieferte optisch gute Mitosen.

Bebändern

Objektträger mit guten Mitosen wurden mit der Giemsa-Lösung bebändert (Bickmore, 2001).

Vorbereitung

Zum Bebändern mussten verschiedene Lösungen angesetzt werden: 0,9 % NaCl-Lösung und Sørensen-Puffer. Für die Giemsa-Lösung wurde 5 ml Giemsa in 95 ml Sørensen-Puffer gelöst und filtriert. Für die Trypsin-Lösung wurde 1 ml Trypsin (25 mg/ml) in 80 ml 0,9 % NaCl-Lösung gelöst.

Bevor die Chromosomen auf dem Objektträger bebändert werden konnten, mussten diese bei 80 °C für 1 Stunde gebacken werden.

Durchführung

Es wurde eine Färbereihe aus 5 Küvetten aufgebaut. In der ersten Küvette befand sich die Trypsin-Lösung, die bei 37 °C im Wasserbad stand. Dort wurden die Objektträger für 30-50 sec. eingetaucht. Anschließend kamen die Objektträger zum Reinigen in eine Küvette mit NaCl-Lösung. Danach wurden die Objektträger für 7 min in der Giemsa-Lösung eingetaucht. Anschließend wurden die Objektträger in zwei aufeinander folgenden Küvetten mit Aqua dest. gereinigt, zum Trocknen schräg gestellt und mit dem Roth-HistoKit eingedeckt.

Auswertung

Die Objektträger wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop analysiert. Dazu wurden die Mitosen mit der 16-facher Vergrößerung gesucht und mit der 64-fachen Vergrößerung fotografiert. Ausgewertet wurden die Mitosen mit dem Ikarus-System der ersten Generation und später mit dem Cyto Vision Leica Biosystem Image Analysis and Capture System (Schaffer, McGowan-Jordan & Schmid, 2013).

Zellen von der Firma abm

Nachdem die Zellen von abm eine bzw. zwei Wochen unter hypoxischen Bedingungen (5 % Sauerstoffkonzentration) kultiviert wurden, sind von diesen Chromosomenanalysen durchgeführt worden. Zum Vergleich wurden ebenfalls die Chromosomen von Zellen in der gleichen Passage analysiert, die jedoch unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Dazu wurde bei den Zellen, die mit zusätzlicher Glukose im Medium kultiviert wurden, ebenfalls die Chromosomen zu diesen Zeitpunkten analysiert. Die Objektträger wurden nach dem Bebändern und Eidecken gesammelt und am Ende der Versuchsreihen zusammen ausgewertet. Dabei fiel auf, dass selbst die Zellen unter normoxischen Bedingungen keinen diploiden Chromosomensatz besaßen (siehe Kapitel 4.2.2). Als Konsequenz wurden keine weiteren Versuchsreihen mit diesen Zellen gestartet.

Zellen von der Firma LifeLine

Bei den Zellen von LifeLine, die unter hypoxischen Bedingungen (3 % Sauerstoffkonzentration) kultiviert wurden, wurde nach einer, zwei, drei und vier Wochen eine Chromosomenanalyse durchgeführt. Parallel wurden auch die Chromosomen von Zellen unter normoxischen Bedingungen in gleicher Passage untersucht. Jedoch konnte bei diesen Zellen nach vier Wochen keine Chromosomen mehr analysiert werden, da die Proliferationsrate zu gering war.

Die oben beschriebene Methodik der Chromosomenanalyse wurde mit den Zellen von abm modifiziert, die in der Kultur eine hohe Proliferationsrate zeigten. Die Zellen von LifeLine zeigten dagegen wenige Mitosen. Wurde die Methode zur Chromosomenanalyse so auf die Zellen von LifeLine angewendet, waren kaum Mitosen auf dem Objektträger vorhanden. Deshalb musste die Methode nochmals modifiziert werden.

Modifikationen der Methode

Die Chromosomenpräparation von Epithelzellen stellt sich allgemein als schwierig dar, da diese Zellen eine geringe Teilungsrate haben, als z. B. blutbildende Zellen, die zur Diagnostik von Chromosomenfehlverteilungen in der Medizin als Standard benutzt werden (Reiter, 2007; Stoeckenius, 1966). Auch die Zellen von LifeLine in Kultur zeigten kaum Mitosen, also wurde die Einwirkzeit von Colcemid erhöht. Auch nach 12 bzw. 24 Stunden Einwirkzeit waren nur vereinzelt Mitosen sichtbar.

Bei Recherchen wurden zwei weitere Protokolle zur Verbesserung der Chromosomenpräparation gefunden:

Deckgläser-Präparation (Reiter, 2007)

Für die Deckgläser-Präparation wurden die Zellen direkt auf einen Objektträger kultiviert. Dafür wurde der Objektträger mit Ethanol gereinigt und in eine sterile Petrischale gestellt. Die Zellen wurden dann direkt auf den Objektträger kultiviert. Wenn die Zellen dicht genug waren (ca. 50 % bedeckt) wurde für 15 Stunden Colcemid (50 ng/ml) dazu gegeben. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abpipettiert. Es wurden 10 ml einer vorgewärmten KCl-Lösung (0,075 M) hinzugeben und die Petrischale für 25 min in den Brutschrank gestellt. Danach wurde die Lösung entfernt. Nun wurden die Zellen vorsichtig mit dem Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1) überschichtet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies wurde einmal wiederholt. Danach wurde der Objektträger getrocknet, eine Stunde bei 80 °C gebacken und wie oben beschrieben bebändert.

Diese Methode lieferte gute Mitosen. Es passte jedoch nur ein Objektträger in eine sterile Petrischale, aber zwei Deckglässchen, sodass die Zellen auf Deckglässchen angezüchtet wurden (Abb. 3-6). Die Hypotoniezeit wurde variiert, da diese vom zugegebenen Volumen der KCl-Lösung und von der Zelldichte abhing. Deshalb wurde vor jeder Chromosomenanalyse ein Vorversuch mit Zellen gleicher Zellkonfluenz durchgeführt. Dabei wurde jeweils bei 10, 15, 20 und 25 Minuten Hypotoniezeit die Präparation durchgeführt, wobei für die späteren Versuche die Hypotoniezeit gewählt wurde, die dabei die besten Mitosen lieferte. Dies variierte meist zwischen 10 und 20 Minuten Einwirkzeit der Hypotonielösung.

Thymidin-Block

Durch das vermehrte Angebot von Thymidin können die Zellen in die S-Phase übergehen. Jedoch kann die DNA-Synthese nicht starten, solange die anderen Trinukleotide (Adenosin, Cytidin und Guanosin) nicht vermehrt vorliegen. Durch gesteigerte Thymidinkonzentration ist es also möglich, die Zellen im Anfangsstadium der S-Phase zu blockieren. Wird dann das Thymidin entfernt, durchlaufen die Zellen synchronisiert die Mitose. Damit alle Zellen zeitgleich in die Mitose übergehen, würde man den doppelten Thymidinblock benötigen: Dabei wird nach einer Erholung der Zellen nochmals Thymidin dazugegeben um auch wirklich sicher zu gehen, dass alle Zellen blockiert sind. Da aber keine komplette Synchronisation der Mitose benötigt wurde, wurde nur der einfache Thymidinblock durchgeführt.

Dafür wurde für 15 Stunden 300 µg Thymidin/ml zu den Zellen hinzugegeben (45 µl Thymidin-Stammlösung zu 5 ml Zellkulturmedium) (www.paralog.com, 2014). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS und einmal mit vorgewärmtem Medium gewaschen. Frisches Medium mit 50 ng/ml Colcemid wurde für 5 – 6 Stunden hinzugegeben. Das Abernten erfolgt nach dem oben genannten Protokoll. Beim darauffolgenden Abernten wurden jedoch kaum gute Mitosen gefunden.

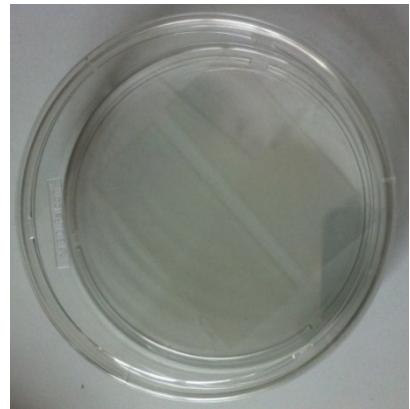


Abbildung 3-6: Petrischale mit zwei Deckglässern für die Chromosomenpräparation.

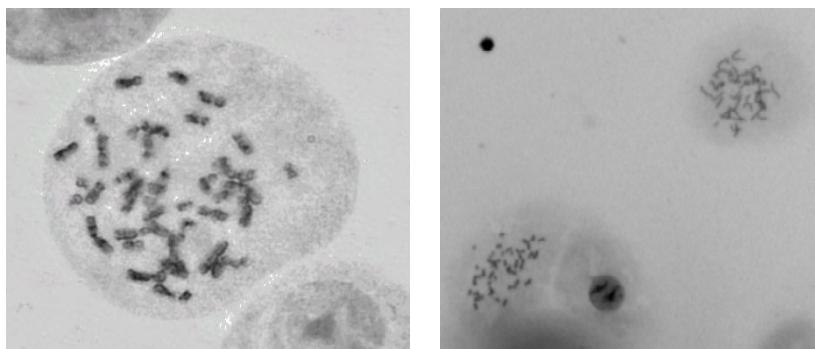


Abbildung 3-7: Mitose der Bronchialepithelzellen FC-0054, die zwei Wochen in Hypoxie waren (links) und die vier Wochen in Hypoxie waren (rechts): Hier ist noch eine Zellmembran um die Chromosomen deutlich sichtbar (links), so wurden weggesprengte Chromosomen ausgeschlossen. In der rechten Abbildung ist die Zellmembran noch schwach zu erkennen.

Beide Modifikationen wurden mit den Zellen von LifeLine ausgetestet. Die besten Mitosen gab es bei der Deckgläschen-Methode. Deshalb wurde im weiteren Verlauf nur noch diese Methode zur Chromosomenpräparation angewandt.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen in Petrischalen angezüchtet, nach zwei Tagen Colcemid dazugegeben. Am Folgetag wurde die KCl-Lösung zu den Deckglässchen hinzugegeben und die Zellen auf den Deckgläschen fixiert. Diese wurden dann direkt bebändert und ausgewertet. Nach diesem Protokoll wurden alle weiteren Analysen durchgeführt.

Diese Vorgehensweise lieferte die besten Mitosen (Abb. 3-7). In der Abb. 3-7 ist die Kernmembran um die Chromosomen noch deutlich sichtbar. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass durch die Präparation es zum Zugewinn bzw. Verlust von Chromosomen gekommen ist.

Vergleich der Methoden

Um Artefakte mit der angewendeten Methode ausschließen zu können, wurden die verschiedenen Methoden zur Chromosomenpräparation miteinander verglichen. Dabei wurden die Zellen, die vier Wochen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, zum einen nach der herkömmlichen Tropf-Methode analysiert (wie in 3.2.4 Chromosomenpräparation beschrieben) und zum anderen nach der Methode mit den Deckglässchen (wie in 3.2.4 Modifikation der Methode beschrieben) präpariert. Die Anzahl der Mitosen der Zellen von der Firma LifeLine war unter Normoxie nicht ausreichend für die Tropf-Methode. Die Zellen welche vier Wochen unter Hypoxie kultiviert wurden, wiesen jedoch eine erhöhte Mitose-Rate auf, sodass die Tropf-Methode zwar wenige, aber auswertbare Mitosen lieferte. Es wurden jeweils 20 Mitosen bei beiden Versuchsdurchführungen analysiert und miteinander verglichen.

3.2.5 CytoSelect™ 96-Well Cell Transformations-Assay

Der Assay weist nach, ob die Zellen verankerungsunabhängig wachsen, also ob die Zellen kein Kontakt zu Proteinen der extrazellulären Matrix mehr benötigen. Dies ist eine Eigenschaft von Tumorzellen, die die Metastasierung erst ermöglicht (Ke et al., 2004). Wachsen die Zellen als Sphäroide im Agar, so ist dies ein Zeichen für Transformation. Abb. 3-9 zeigt ein positives Ergebnis. Die Sphäroide sollen dabei einen größeren Durchmesser als 80 µm haben, um als positiv zu gelten (Yamamoto et al., 2012). Ob die Zellen noch lebten, konnte ebenfalls mit einer Lebendzellfärbung überprüft werden. Das Prinzip des Assays ist in Abb. 3-8 dargestellt.

Vorbereitung

Die Agar-Matrix-Lösung musste für 30 min bei 93 °C im Wasserbad aufgewärmt und danach für weitere 30 min bei 37 °C gestellt werden. Währenddessen wurde die 2X DMEM/20 % FBS Lösung hergestellt. Nach der Bedarfsberechnung wurden die benötigten Reagenzien steril zusammen pipettiert (siehe Tabelle 3-2). Die Lösung wurde gut gemischt und bei 37 °C ins Wasserbad gestellt.

Für jeden Versuchsdurchgang, bei dem die Anzahl der gegossenen Wells variiert wurde, mussten die Volumina der Reagenzien neu berechnet werden. Alle Versuche wurden mit einer 12-Well-Platte durchgeführt. Zur Berechnung wurden die Tabelle 3-2 bis Tabelle 3-5 genutzt.

5X DMEM	Steriles Wasser	FBS Medium	ges. Volumen berechnet aus den Volumina aus Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5
40 % des ges. Volumens	40 % des ges. Volumens	20 % des ges. Volumens	

Tabelle 3-2: Berechnung des benötigten 2X DMEM/20 % FBS Medium Volumens.

10X Matrix Solubilization Lösung	Steriles Wasser	Volumen der 1X Matrix Solubilization Lösung
10 % des ges. Volumens	90 % des ges. Volumens	1350 µl/well

Tabelle 3-3: Berechnung des benötigten 1X Matrix Solubilization Volumens.

2X DMEM/20% FBS Medium	Steriles Wasser	10X CytoSelect™ Agar Matrix Lsg.	Volumen des Basis Agar Matrix
50 % des ges. Volumens	40 % des ges. Volumens	10 % des ges. Volumens	600 µl/well

Tabelle 3-4: Berechnung des benötigten Agar Matrix Bodens.

2X DMEM/20% FBS Medium	CytoSelect™ Matrix Verdünner	10X Cyto-Select™ Agar Matrix Lösung	Zellsuspension	Volumen der Zellsuspensionslösung
46,67 % des ges. Volumens	36,67 % des ges. Volumens	10 % des ges. Volumens	6,67 % des ges. Volumens	750 µl/well

Tabelle 3-5: Berechnung der benötigten Zellsuspensionslösung.

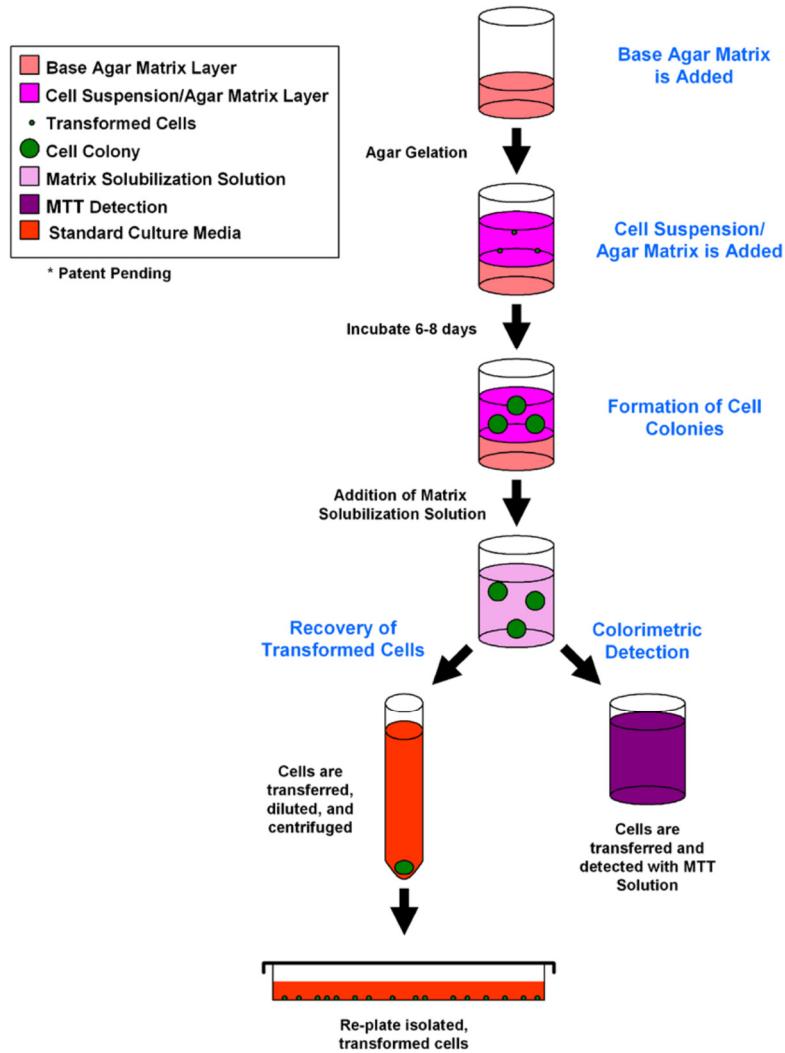


Abbildung 3-8: Prinzip des Cell Transformation Assay (CytoSelectTM, 2013): Zuerst wird ein Boden gegossen, der nur aus Agar besteht. Darüber kommt eine Schicht aus Agar, der resuspendierte Zellen enthält. Darauf kommt frisches Medium. Haben die Zellen Sphäroide gebildet, können diese über zwei Wege ausgewertet werden. Bei beiden wird der Agar aufgelöst. Zum einen wird eine Lebendfärbung der Zellen durchgeführt und zum andern werden die Zellen neu angezüchtet.

Durchführung

Gießen des Bodens

Die ausgerechneten Volumina wurden steril zusammen pipettiert. Dabei war auf sorgfältiges Pipettieren zu achten, da die Lösungen sehr viskös waren. Die Lösung wurde gut gemischt und 0,6 ml gleichmäßig auf jedes Well verteilt. Laut des mitgelieferten Protokolls sollten nur 0,5 ml auf jedes Well verteilt werden. Dies war jedoch so wenig, dass sich die Agarlösung nicht vollständig auf dem Boden im Well verteilen konnte, daher wurde das Volumen auf 0,6 ml erhöht. Danach wurde die 12-well-Platte für 30 min bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur wieder erwärmt.

Währenddessen wurde die Agar Matrix Lösung wie bereits beschrieben nochmals erhitzt und anschließend bei 37 °C belassen. Zusätzlich wurde auch die Matrix-Verdünnung auf 37 °C temperiert.

Hinzufügen der Zellsuspension

Für das Hinzufügen der Zellsuspension wurden die Zellen abgeerntet und im Kulturmedium in einer Konzentration von $0,1\text{--}1 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit dem Luna fl Automated Cell Counter überprüft.

Das gewünschte Volumen der Reagenzien für die Agar-Matrix wurde steril pipettiert. Pro Probe wurde 50 µl Zellsuspension (10^5 – 10^6 Zellen/ml) hinzugegeben, die dann für 5 min stehen gelassen wurde. Anschließend wurde pro Well 0,75 ml der Suspension hinzugefügt. Die 12er-Well-Platte wurde für 20 min bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt und dann 30 min bei Raumtemperatur wieder aufgewärmt. Anschließend wurden 0,5 ml DME-Medium zu jedem Well hinzugefügt. Die 12er-Well-Platte wurde für sechs bis acht Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Normoxie-Brutschrank kultiviert. In der Folge wurden die Sphäroide unter dem Lichtmikroskop beurteilt.

Herauslösen der Zellen

Die Zellen konnten mit der 10X Solubilization Lösung aus dem Agar gelöst werden. Im Originalprotokoll wurden die Zellen mit MTT gefärbt, da der Luna fl Automated Cell Counter nur Trypan-Blau-Färbungen auswerten konnte, wurden die Zellen jedoch mit Trypan-Blau angefärbt. Dazu wurde 10 µl Zelllösung mit 10 µl Trypan gemischt und auf einen Cell Counting Slid gegeben.

Auswertung

Für die Auswertung wurden die Sphäroide im Lichtmikroskop untersucht. Ein positives Ergebnis unter dem Lichtmikroskop ist in Abb. 3-9 dargestellt.

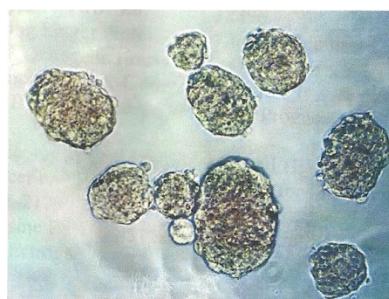


Abbildung 3-9: HeLa Sphäroide Formation: HeLa Zellen werden, gemäß des Assay Protokolls für 10 Tage kultiviert (aus dem Product Manual K.-Nr. CBA-135).

Zellen von der Firma abm

Die Zellen von abm wurden nach einer und zwei Wochen hypoxischer Kultivierung (5 % Sauerstoff) in den Transformations-Assay gesetzt. Parallel dazu wurden als Kontrolle Zellen in gleicher Passage eingesetzt, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Ebenso wurden dazu Zellen eingesetzt, die zusätzlich Glukose erhielten und entweder hypoxischen oder unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden.

Zellen von der Firma LifeLine

Die Zellen von LifeLine wurden nach einer, zwei und drei Wochen unter hypoxischen Bedingungen (3 % Sauerstoffkonzentration) in den Transformations-Assay gesetzt. Auch hier wurden Zellen als Kontrolle in den Assay gesetzt, die in der gleichen Passage waren und unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden.

3.2.6 ATP und GTP Bestimmung mittels HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine Möglichkeit, die verschiedenen Bestandteile in einem Zelllysat zu trennen. Dabei wird das Lysat mit einer mobilen Phase, unter hohem Druck durch eine Trennsäule gepresst, in der die stationäre Phase enthalten ist. Da in unserem Fall die verschiedenen Nukleotide unterschiedlich viel Zeit zum Durchlaufen der Trennsäule benötigen, könnten diese so unterschieden und ihre Menge in einem anschließenden Detektor mittels UV-Absorption bestimmt werden.

Die ATP- und GTP-Bestimmung wurde nur bei den Zellen von LifeLine durchgeführt. Dabei wurde die Konzentration von ATP und GTP nach 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und nach 7 Tagen bei den Zellen bestimmt, die unter hypoxischen Bedingungen (3 % Sauerstoff) kultiviert wurden. Diese Zellen wurden danach nochmals 7 Tage unter normoxischen Bedingungen kultiviert, um zu überprüfen, ob sich die Konzentration von ATP und GTP wieder normalisiert. Als Kontrolle wurden die ATP- und GTP-Konzentrationen bei Zellen bestimmt, die nur unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Aufgrund der Ergebnisse in der Sauerstoffbestimmung (siehe Kapitel 4.1) wurde die erste Messzeit auf acht Stunden festgelegt.

Vorbereitung

Für die ATP- und GTP-Bestimmung wurden die jeweiligen Zellen 48 Stunden vor dem Experiment in 75 cm² Kulturflaschen eingesetzt. Dabei wurden zwei Flaschen pro Analyse benötigt. Bei mehreren parallel durchgeführten Nachweisen wurden die Ausgangszellen

gepools und gleichmäßig verteilt. Die Zellmenge sollte bei Beginn der Isolation bei mehr als 90 % Monolayer liegen, bei den Bronchialepithelzellen entspricht dies etwa 5×10^6 Zellen pro 75 cm^2 Flasche. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis und im Kühlraum durchgeführt. Zu Beginn der Isolation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer (mindestens 3 ml) auf Eis gewaschen. Anschließend wurde 1 ml PBS zugegeben, die Zellen abgeschabt, jeweils in ein 1-2 ml Tube transferiert, gegebenenfalls mit einem weiteren Milliliter gespült und in ein weiteres Tube transferiert. Die Tubes wurden 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Zu dem Pellet wurden bei 5×10^6 Zellen pro 75 cm^2 Flasche 400 μl eiskaltes TCA 3 % zugegeben und mit der Pipette gut gemischt. Dieses Gemisch wurde mindestens 20 sec. in einem Vortex gemixt und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde dann wieder für mindestens 20 sec. mit dem Vortex gemixt und danach bei 14.000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände einer Phase wurden abpipettiert und in einem Tube mit Schraubverschluss gepools. Dieses wurde 60 sec. im Vortex gemischt und danach kurz zentrifugiert. Die Proben wurde bei -80°C gelagert.

Für die Messung musste die Probe zunächst mit 5 M K_2CO_3 (HPLC geeignet) neutralisiert werden. Zur Neutralisation von 5 ml TCA wurden 300 μl K_2CO_3 benötigt. Bei 400 μl TCA Isolat waren dies 24 μl K_2CO_3 .

Durchführung

Die Stoffmenge des ATP und GTP wurde von Mitarbeitern des Leibniz Institut für neue Materialien, Campus D2 2 in 66123 Saarbrücken mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt.

Alle Experimente wurden mit der HPLC Agilent Technologies 1200 Series (Karlsruhe, Germany), ausgerüstet mit einem Autosampler G1329A (Karlsruhe, Germany), durchgeführt. Die Säule C18, Partikel Größe 5 μm , Länge 46 x 150 mm (agilent Eclipse XDB, USA), wurde mit einer Vorsäule (3,9 x 20mm) verbunden, es wurde dasselbe Füllmaterial bei allen Experimenten benutzt. Die Trennsäule wurde bei 27°C gelagert. Zwischen den Messungen wurde die Säule mit 2 % Trifluoressigsäure gereinigt. Die mobile Phase A bestand aus 0,25 % MeOH, 10 mM NaH_2PO_4 und 10 mM Tetrabutylammoniumhydroxid, Phase B aus 30 5MeOH, 50 mM NaH_2PO_4 und 5,6 mM Tetrabutylammoniumhydroxid. Die Phasen liefen mit einer Geschwindigkeit von 0,8 mL/min mit einem Gradienten von 0-30 min 60/40 (A/B) oder 30-60 min 40/60 (A/B) durch die Säule. Die Säulen-Analyse-Zeit betrug 65 Minuten. Der pH-Wert wurde auf 7.0 mit 10N NaOH (Lösung A) und 10N HCl (Lösung B) titriert. Die Detektion der

Nukleotide wurde mit Hilfe der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 254 ± 6 nm durchgeführt (DAD detector 1260, Karlsruhe, Germany). Die chem. Station-32-Software wurde benutzt um die Daten zu verarbeiten (Areal Integration, Kalkulation und Zeichnen der Chromatogramme), die Methode zu validieren und um die Proben zu analysieren.

Es wurden jeweils 50 µl Nukleotid-Standards und Zell-Extrakte in die Trennsäule gefüllt.

Auswertung

Die Ergebnisse der Messungen wurden in einem Chromatogramm ausgegeben und anschließend in einem Balkendiagramm für ATP und einem für GTP eingetragen. Dabei entsprach jeder Balken einer Messzeit und die Höhe des Balkens der gemessenen Konzentration an ATP bzw. GTP.

Für jeden Zeitpunkt wurden 3 Messungen durchgeführt, das heißt, es wurden 3 Zellproben pro Zeitpunkt hergestellt und untersucht. Die Resultate wurden gemittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Sauerstoffbestimmung

Aus den Werten der Sauerstoffbestimmung im Zellkulturmedium wurde ein Liniendiagramm erstellt (Abb. 4-1). Dabei wurden die Werte bei 5 % und 3 % Sauerstoffkonzentration im Brutschrank in getrennten Graphen dargestellt. Ihr Verlauf ist jeweils eine Hyperbel.

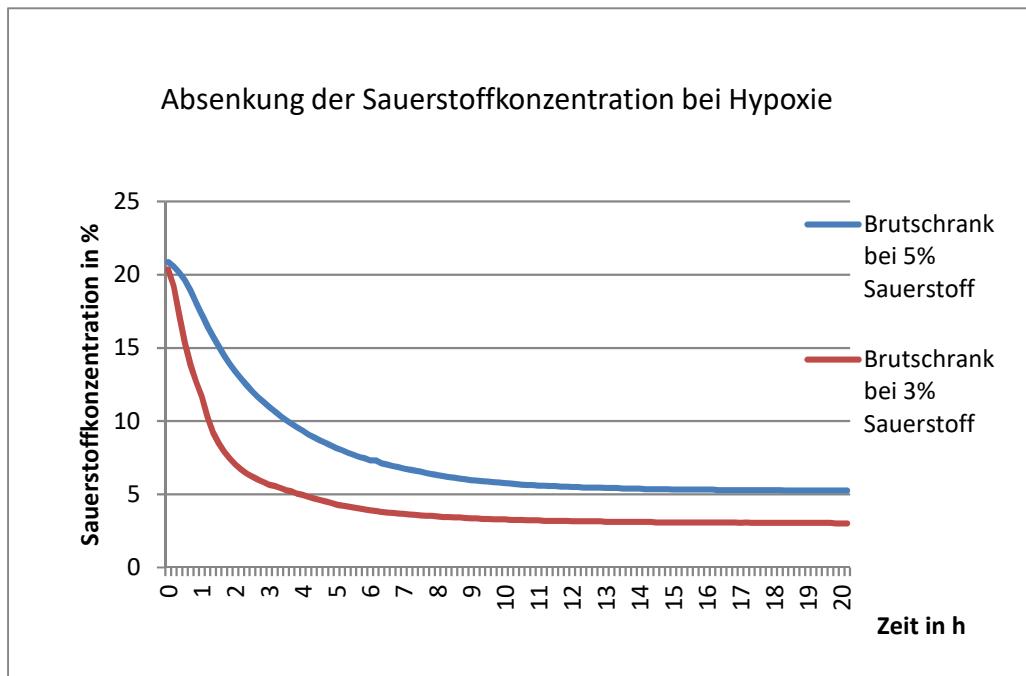


Abbildung 4-1: Absinken der Sauerstoffkonzentration in Hypoxie, abhängig von der jeweiligen Umgebungskonzentration: Bei beiden Sauerstoffkonzentrationen ist die Zeit bis zum Erreichen der Endkonzentration ungefähr gleich.

Die Konzentrationen fielen zunächst schnell ab und näherten sich dann langsam dem Endwert an. Hier wurde deutlich, dass die Konzentrationen nach ca. acht Stunden schon stark abgesunken waren. Danach näherte sich die Sauerstoffkonzentration im Medium immer mehr der Konzentration im Brutschrank an. Nach 20 Stunden waren die Konzentrationen im Medium noch gering höher als im Brutschrank, jedoch waren die Sauerstoffkonzentrationen im Medium über mehrere Stunden konstant bei 5,26 % im Brutschrank mit 5 % Sauerstoff und bei 3,02 % im Brutschrank bei 3 % Sauerstoff. Die Zeitspanne bis sich die Sauerstoffkonzentration im Medium, den Sauerstoffkonzentrationen im Brutschrank angepasst hat, war sowohl für 3 % Sauerstoffkonzentration als auch für 5 % Sauerstoffkonzentration annährend gleich.

4.2 Primäre Bronchialepithelzellen von der Firma abm

4.2.1 Morphologie

Abb. 4-2 zeigt Bronchialepithelzellen in Passage 6, bevor sie in den Brutschrank mit 5 % Sauerstoff gestellt wurden. Es gab hier Zellen mit mehreren Zellkernen und breitem Zytoplasma (Abb. 4-3), die Nukleoli waren rundlich und homogen schwarz. Abb. 4-3 zeigt alle typischen Zellformen, die diese Bronchialepithelzellen von abm in Normoxie hatten. Zum einen mehrere Zellkerne in Zellen mit breitem Zytoplasma, aber auch Zellen mit wenig Zytoplasma und nur einem Kern, dazu war ihre Zellform eher länglich.

Bei der morphologischen Betrachtung der Zellen, die in Hypoxie (5 % Sauerstoffsättigung) kultiviert wurden, fielen verschiedene Zelltypen auf (Abb. 4-4): Einerseits langgestreckte Zellen, andererseits aber auch Zellen, die über eine Zytoplasma-Brücke miteinander verbunden waren. Auch waren bei den hypoxischen Zellen große Zellen mit mehreren Zellkernen und breitem Zytoplasma sichtbar, wie sie sich auch schon unter normoxischen Bedingungen darstellten. Zusätzlich ist eine Mitose in Metaphase dargestellt. Hier wird deutlich, dass es morphologisch keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Zellen gibt, egal ob sie genug Sauerstoff hatten oder nicht (siehe Abb. 4-5). Auffällig waren bei allen die vielen Nukleoli. Dies spricht für sehr aktive Zellen, die viele Proteine synthetisieren.

Eine Kultur in Normoxie und Hypoxie wurde nicht passagiert, als diese zugewachsen war, sondern nur das Medium gewechselt. So sollte überprüft werden, ob die Zellen nun auch übereinander wachsen können. Dies war aber nicht der Fall. Abb. 4-6 zeigt ein Bild der Zellen in Hypoxie. Die Zellen zeigten immer noch vermehrte Mitosen, wuchsen aber weiterhin als Monolayer.

Zellen, die zusätzlich Glukose im Medium erhalten hatten, zeigten keine morphologischen Unterschiede zu Zellen ohne zusätzliche Glukose, hatten jedoch eine höhere Teilungsrate.

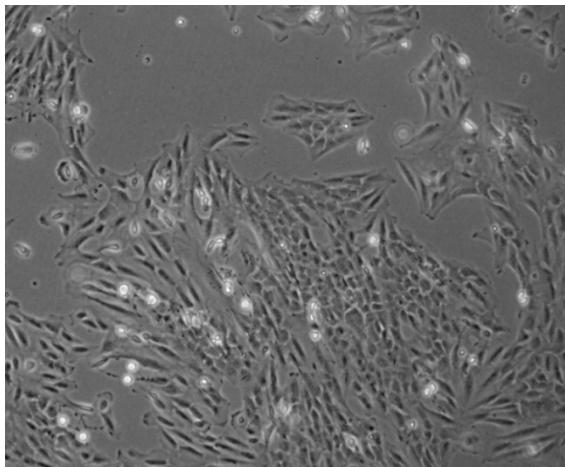


Abbildung 4-2: Bronchialepithelzellen von abm in Passage 6 bei 4-facher Vergrößerung: Die Zellen sind eher länglich und lagern sich in Gruppen zusammen. Es sind viele Mitosen zu sehen.

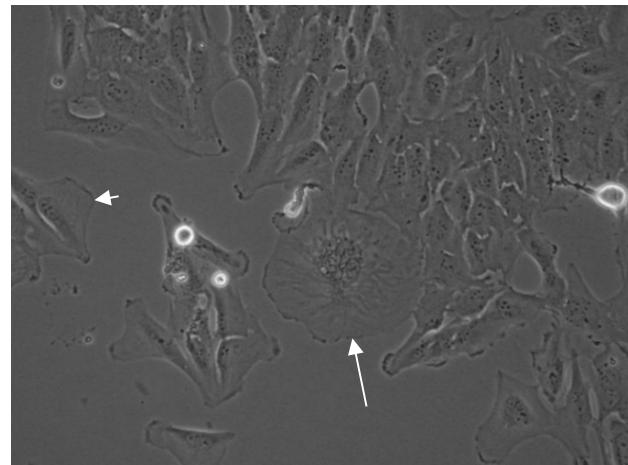


Abbildung 4-3: Bronchialepithelzellen von abm in der 6. Passage bei 10-facher Vergrößerung in Normoxie: Diese Bronchialepithelzellen bestehen aus mehreren verschiedenen Zelltypen: Zum einen als länglichen Zellen mit relativ großem Zellkern und gut sichtbaren Nukleoli (*kurzer Pfeil*), dann aber auch aus Zellen mit breitem Zytoplasma und segmentiertem Zellkern (*langer Pfeil*).

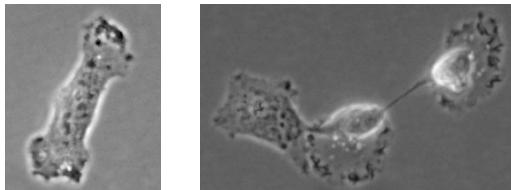


Abbildung 4-4: Bronchialepithelzellen von abm in der 8. Passage nach 8 Tagen in Hypoxie (5 % Sauerstoff) bei 40-facher Vergrößerung: Links ist eine langgestreckte Zelle mit vielen Nukleoli im Zellkern dargestellt, rechts daneben zwei Zellen, die über eine Zytoplasma-Brücke verbunden sind. Weiter rechts befindet sich eine Zelle in der Mitose, die Chromosomen sind in der Metaphase angeordnet. Ganz rechts ist eine Zelle mit einem großen Zytoplasma-Saum und mehreren Zellkernen sichtbar.

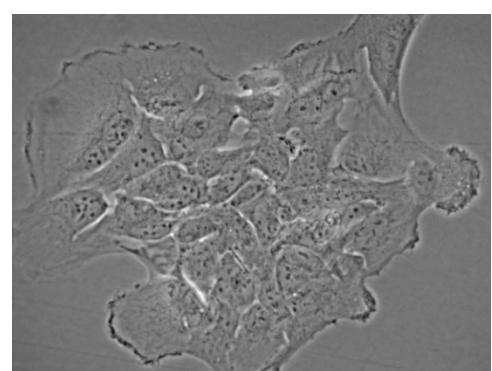
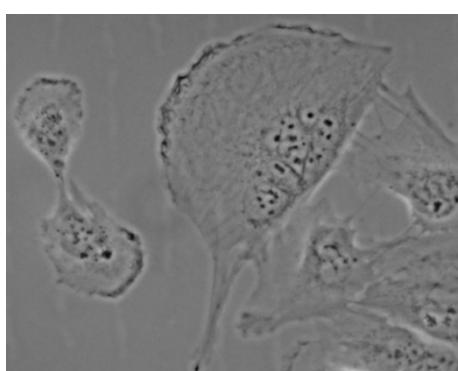
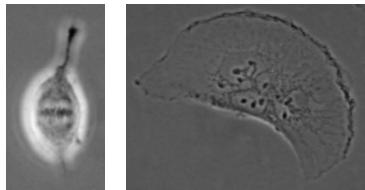


Abbildung 4-5: Bronchialepithelzellen von abm in der 8. Passage nach 8 Tagen in Hypoxie (rechtes Bild) und Normoxie (linkes Bild) bei 40-facher Vergrößerung: Hier sind im linken Bild (Normoxie) links zwei Zellen über eine Zytoplasma-Brücke miteinander verbunden, dies entspricht am ehesten einer Zelle in der Cytokinese. Daneben befindet sich eine große Zelle mit mehreren Zellkernen. Insgesamt sind viele Nukleoli mit zum Teil unterschiedlicher Morphologie sichtbar. Im rechten Bild (Hypoxie) ist eine riesige Zelle mit vielen Zellkernen dargestellt. Die Zellen unterscheiden sich trotz unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen morphologisch kaum voneinander.

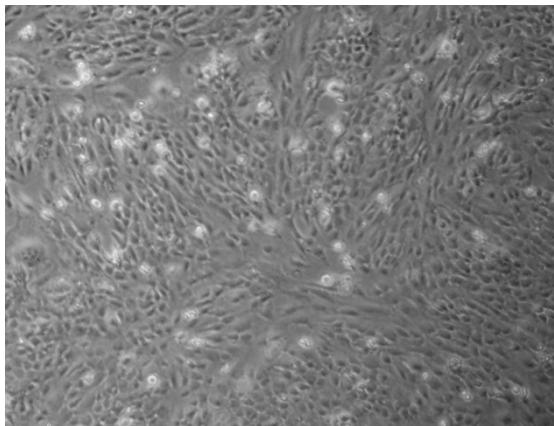


Abbildung 4-6: Bronchialepithelzellen von abm in der 7. Passage seit 8 Tagen in Hypoxie bei 4-facher Vergrößerung: Dichter Zellrasen als Monolayer mit vielen Mitosen und viele langgestreckte Zellen sind sichtbar, dazwischen liegen jedoch auch Zellen mit breiterem Zytoplasma.

4.2.2 Chromosomenanalyse

Bei der Analyse der Chromosomen von Zellen, die eine Woche unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden zeigten sich aneuploide Chromosomensätze, wie das Karyogramm in Abb. 4-7 zeigt.

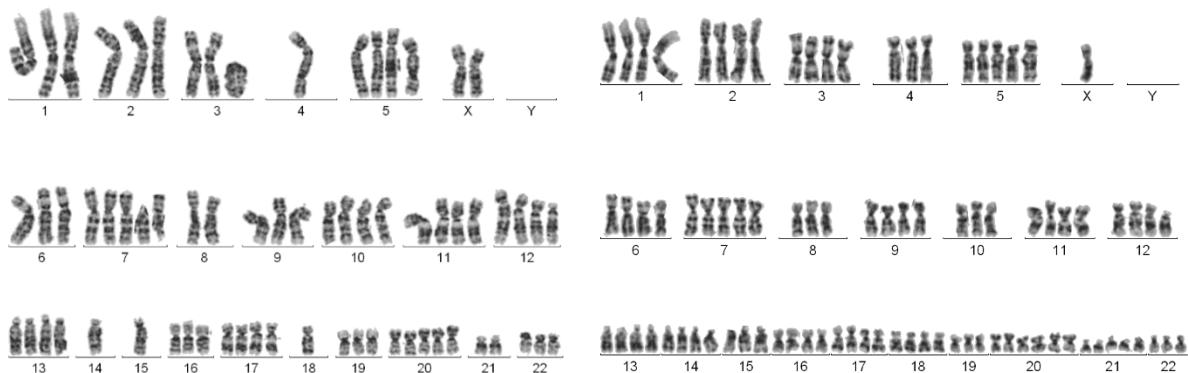


Abbildung 4-7: Linkes Bild: Karyogramm von Zellen von abm, nach einer Woche Hypoxie: Die Chromosomen zeigen deutliche numerische und strukturelle Veränderungen. Rechts ein Karyogramm einer unbehandelten Zelle von abm in Passage 3: Auch die frisch aufgetauten Zellen zeigten chromosomale Veränderungen.

Die Chromosomenanalyse wurde dreimal wiederholt mit ähnlichen Ergebnissen, sowohl bei den Zellen, die mit zusätzlicher Glukose behandelt worden waren als auch bei denen, die keine zusätzliche Glukose erhalten hatten. Jedoch zeigten auch die Zellen, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden solche Veränderungen. Um sicher zu gehen, dass dies nicht aufgrund falschen Umgangs mit den Zellen entstanden war, wurde von frisch aufgetauten Zellen in Passage 3 ebenfalls eine Chromosomenanalyse durchgeführt. Die Zellen von abm hatten von Anfang an einen aneuploiden Chromosomensatz. Es wurden jeweils 20 Mitosen der frisch aufgetauten Zellen in Passage 3 sowie der Zellen, die eine und zwei Wochen unter

hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden analysiert, alle Zellen zeigten einen aneuploiden Chromosomensatz.

Da die Zellen von abm bereits unter normoxischen Bedingungen einen veränderten Chromosomensatz hatten waren sie nicht für die Fragestellung geeignet, ob Hypoxie Chromosomenaberrationen verursachen kann.

4.2.3 Transformation Assay

Im Transformation Assay sind die Zellen, die sieben Tage unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, als Sphäroide gewachsen (Abb. 4-8). Bei den Zellen, die nur in Normoxie kultiviert wurden bzw. den Zellen, die zusätzlich zum Medium noch Glukose zugesetzt bekommen haben und sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, sind keine Sphäroide im Assay gewachsen (Abb. 4-9). Die Sphäroide der Hypoxiezellen hatten zum größten Teil einen Durchmesser von mehr als 85 μm , von denen einige in Abb. 4-8 zu sehen sind. Auch nach zwei Wochen in Hypoxie zeigten Kontrollen und Zellen aus der Hypoxie mit zusätzlicher Glukose keine Sphäroide, jedoch waren die Sphäroide bei Zellen in Hypoxie ohne zusätzliche Glukose mit 133 μm Durchmesser umso größer (Abb. 4-10).

Die Versuche mit den Zellen von abm zeigten, dass diese sich nicht für die Fragestellung eigneten, ob durch Hypoxie Aneuploidie entsteht. Es wurde allerdings klar, dass die Zellen durch Hypoxie Eigenschaften von transformierten Zellen ausbildeten. Da die Zellen hierfür keine zusätzliche Glukose benötigten, wurde Glukose in den weiteren Experimenten nicht mehr zugesetzt.

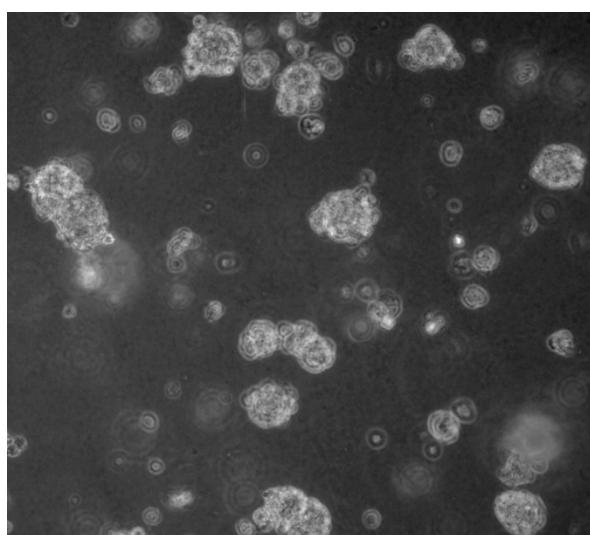


Abbildung 4-8: Bronchialepithelzellen von abm die in der 7. Passage in den Transformation-Assay gesetzt wurden, dort seit 11 Tagen. Davor wurden die Zellen 7 Tage in Hypoxie kultiviert - bei 10-facher Vergrößerung: Die Zellen könnten ohne Kontakt zur extrazellulären Matrix wachsen. Der Transformation-Assay war positiv, die Zellen hatten Transformationseigenschaften entwickelt.

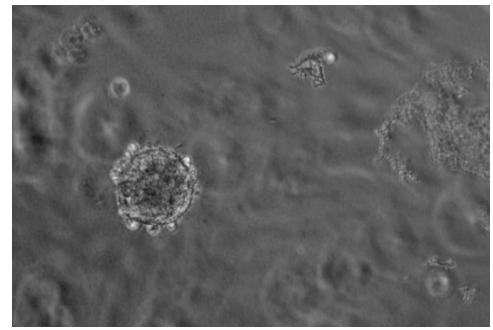
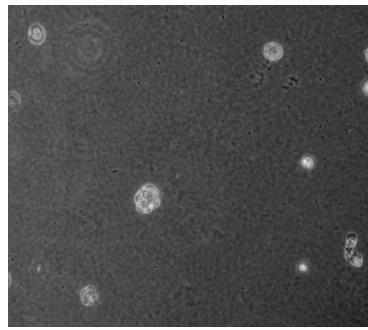
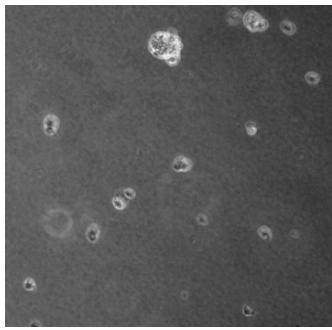


Abbildung 4-9: Bronchialepithelzellen von abm in der 7. Passage, nur in Normoxie (links) bzw. 7 Tage Hypoxie mit zusätzlicher Glukose (rechts), im Transformation Assay seit 11 Tagen - bei 10-facher Vergrößerung: Es sind keine großen Sphäroide sichtbar. Die Zellen ohne Hypoxie bzw. mit zusätzlicher Glukose benötigen also noch Kontakt zur extrazellulären Matrix um waschen zu können.

Abbildung 4-10: Bronchialepithelzellen von abm seit 16 Tagen in Hypoxie kultiviert, im Transformation-Assay in Passage 9 gesetzt, dort seit 12 Tagen - bei 10-facher Vergrößerung: Hier ist eine große Sphäroide, mit einem Durchmesser von 133 μ m, sichtbar. Daneben befinden sich einige abgestorbenen Zellen.

4.3 Primäre Bronchialepithelzellen von der Firma LifeLine

4.3.1 Morphologie

Zellen in Normoxie

Die Zellen von LifeLine hatten eine vorwiegend rundliche Form und lagen einzeln verteilt vor (Abb. 4-11). Bei höherer Vergrößerung (Abb. 4-12) sah man einzelne rundliche Zellen mit zentralem Zellkern und zum Teil mehreren Nukleoli, aber auch Zellen mit zwei Zellkernen sowie Zellen, die eher oval und langgestreckt waren und einen breiten Zytoplasma besaßen. Es waren ebenfalls einige Mitosen sichtbar. Im weiteren Verlauf der Experimente (Abb. 4-13), hatte sich die Morphologie der Zellen nicht wesentlich verändert. Jedoch stieg die Verdopplungszeit bei höherer Passage an.

Zellen in Hypoxie

Die Abb. 4-14 zeigt Bronchialepithelzellen nach einer Woche Hypoxie. Im Vergleich zu Zellen, die nur in Normoxie kultiviert wurden, waren keine nennenswerten Unterschiede sichtbar, auch nach zwei, drei und vier Wochen Hypoxie nicht. Jedoch zeigten sich mehr Mitosen. Zwischen den kleineren Zellen fanden sich aber auch große Zellen mit breitem Zytoplasma. Ab der dritten Woche stieg in Hypoxie die Verdopplungszeit der Zellen langsam an. In Abb. 4-15 sind einige große Zellen mit breiten Zytoplasma dargestellt. Die Zellen hatten meist nur einen Zellkern. Vereinzelt waren auch Zellen mit mehreren Zellkernen sichtbar, sowohl bei den Zellen in Normoxie als auch in Hypoxie.

Morphologische Veränderung

Auch bei den Zellen von LifeLine wurden Zellkulturflaschen in Normoxie und Hypoxie nicht passagiert, als diese zugewachsen waren, sondern nur das Medium gewechselt, um zu überprüfen, ob die Zellen nun auch übereinander wachsen konnten. Dies war bei Zellen möglich, die zwei bzw. drei Wochen in Hypoxie kultiviert wurden (Abb. 4-16). Dagegen wuchsen Zellen, die nur in Normoxie kultiviert wurden weiterhin als Monolayer (Abb. 4-17). In der Zellkultur gilt es als Transformationszeichen, wenn Epithelzellen ohne Kontakt zum Boden der Zellkulturflasche übereinander wachsen können (Hirohashi & Kanai, 2003; Jiang et al., 2010).

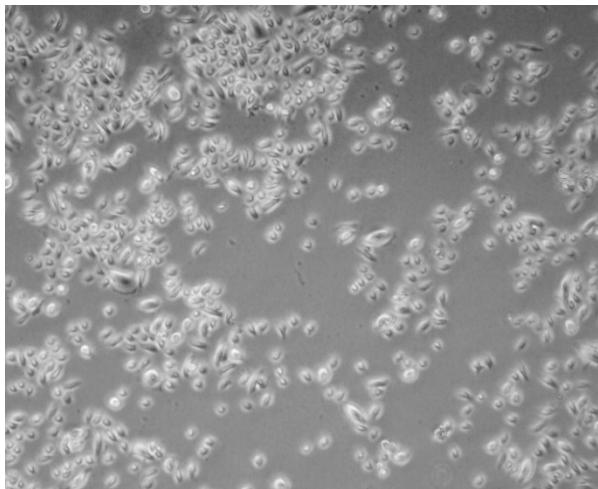


Abbildung 4-11: Bronchialepithelzellen von LifeLine in der 2. Passage in 4-facher Vergrößerung: Die Zellen sind rundlich bis oval und liegen eher einzeln vor.

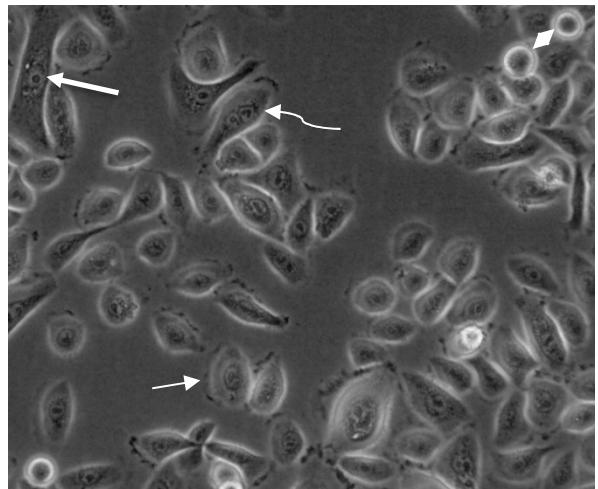


Abbildung 4-12: Bronchialepithelzellen von LifeLine in der 2. Passage in 20-facher Vergrößerung: Die meisten Zellen sind rundlich oval und haben einen mittigen Zellkern mit sichtbaren Nukleoli (dünner Pfeil). Es gibt aber auch langgestreckte Zellen (breiter Pfeil). Es sind einige Mitosen (Raute) und auch eine Zelle mit zwei Zellkernen sichtbar (gebogener Pfeil).

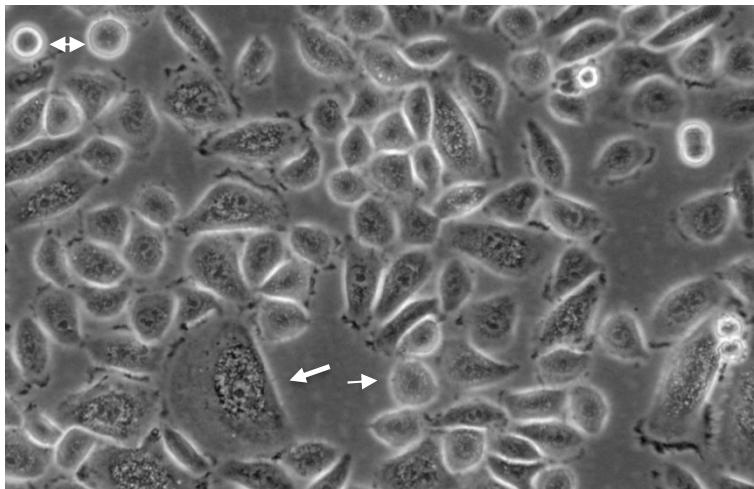


Abbildung 4-13: Bronchialepithelzellen von LifeLine in der 7. Passage nur in Normoxie kultiviert in 20-facher Vergrößerung: Die Zellen sind dicht gewachsen. Es befinden sich kleine rundlich-ovalen Zellen (dünner Pfeil) neben großen Zellen mit großem Zellkern und Zytoplasma (breiter Pfeil). Es sind einige Mitosen sichtbar (Doppelpfeil).

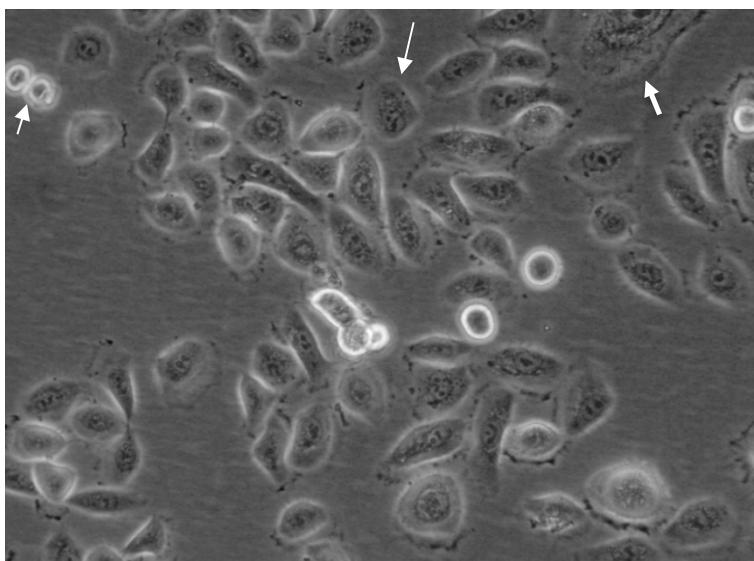


Abbildung 4-14: Bronchialepithelzellen von LifeLine in der 5. Passage, nach einer Woche in Hypoxie (3 %) in 20-facher Vergrößerung: Es sind einige Mitosen (kurzer Pfeil), sowie rundlich ovale Zellen sichtbar (langer Pfeil). Auch hier sind Zellen mit breitem Zytoplasma sichtbar (breiter Pfeil)

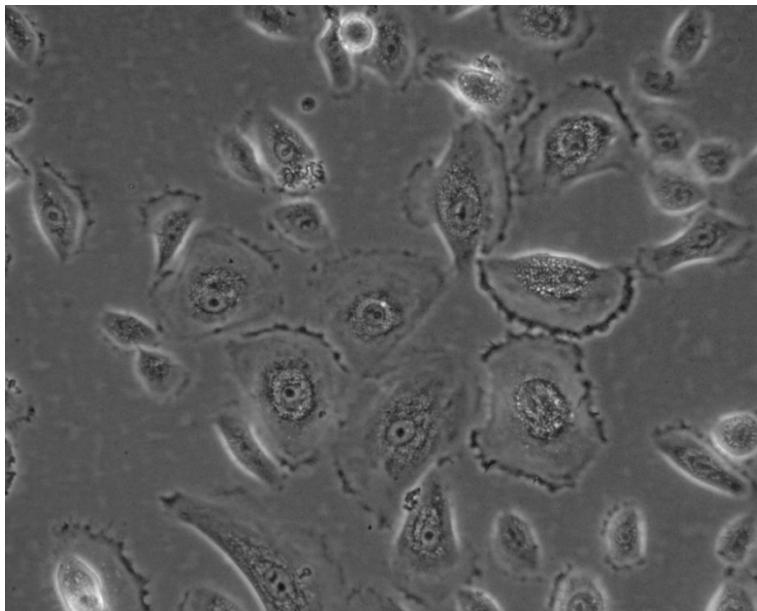


Abbildung 4-15:
Bronchialepithelzellen von LifeLine in der 9. Passage in Hypoxie seit 3 Wochen in 20-facher Vergrößerung: Es sind vermehrt Zellen mit breiten Zytoplasma sichtbar.

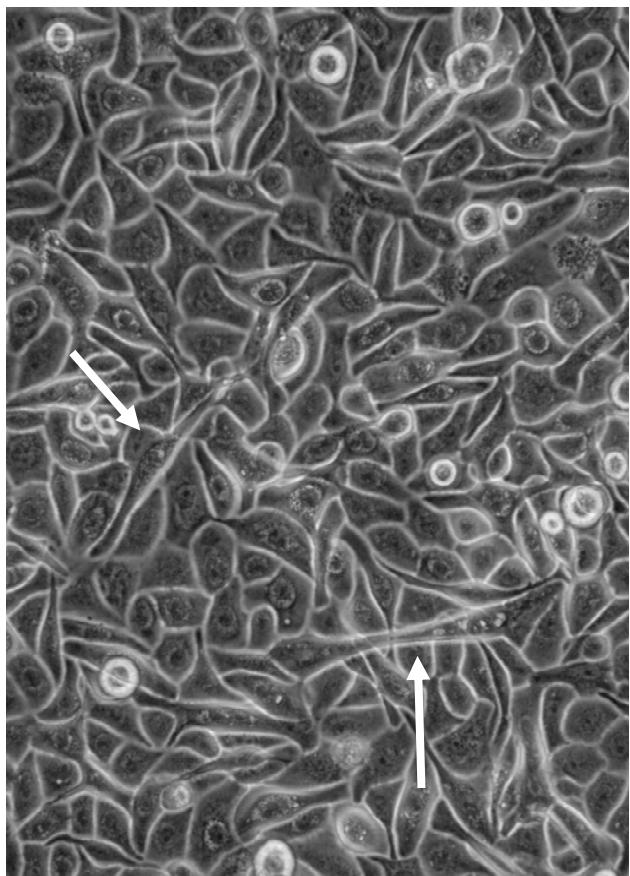


Abbildung 4-16: Bronchialepithelzellen von LifeLine in der 6. Passage nach 2 Wochen Hypoxie in 20-facher Vergrößerung: In diesem Ausschnitt sind mehrere langgestreckte Zellen sichtbar, die andere Zellen überwachsen (Pfeile). Die Zellkulturflasche ist komplett zugewachsen, dennoch sind Mitosen sichtbar.

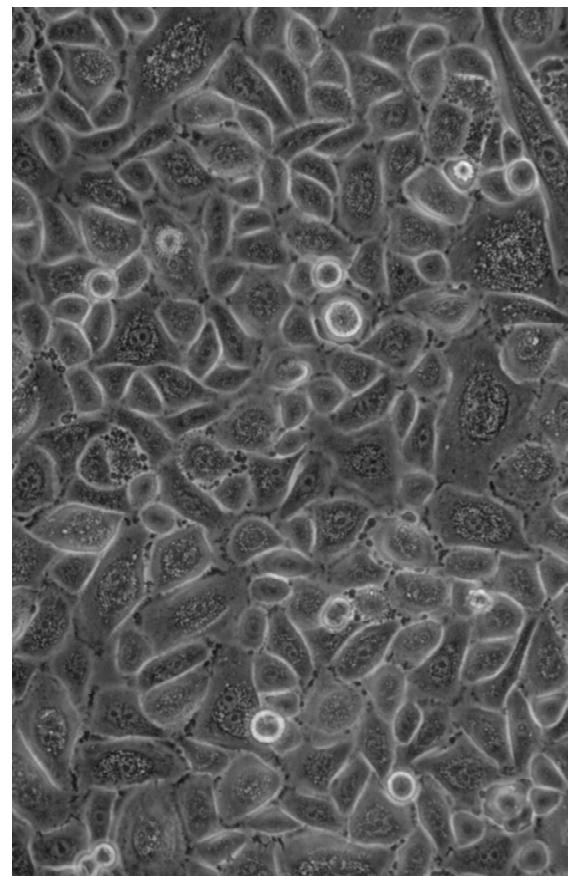


Abbildung 4-17: Bronchialepithelzellen von LifeLine in der 6. Passage, nur in Normoxie kultiviert, in 20-facher Vergrößerung: Die Zellen zeigen einige Mitosen, jedoch keine Zellen, die übereinander wachsen.

4.3.2 Chromosomenanalyse

Die Analyse der Chromosomen bei Zellen in niedriger Passage zeigte normale Chromosomensätze (Abb. 4-18). Somit eigneten sich diese Zellen für weitere Untersuchungen.

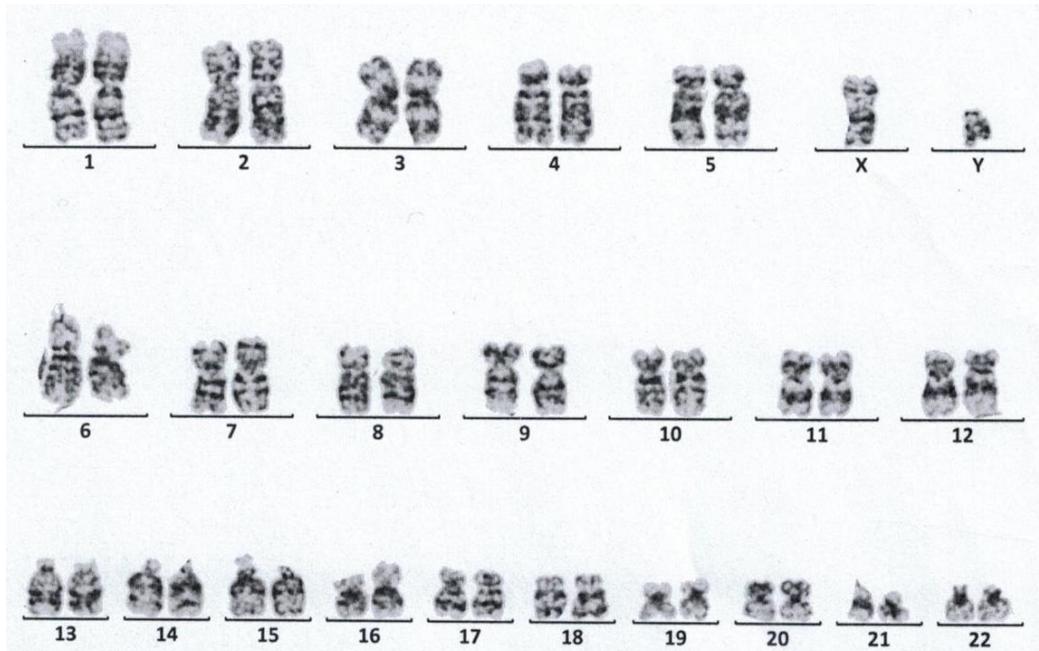


Abbildung 4-18: Karyogramm von Bronchialepithelzellen von LifeLine in Passage 4, die nur in Normoxie waren: Es handelt sich um einen normalen Chromosomensatz mit 46 Chromosomen.

Die Zellen in Normoxie blieben in ihrem Chromosomensatz unverändert. Pro Woche wurden 20 Mitosen analysiert. Wegen beginnender Alterung und damit einhergehender Abnahme der Proliferation war eine Chromosomenanalyse der Zellen, die vier Wochen in Normoxie kultiviert wurden, nicht mehr erfolgreich. Diese Versuchsdurchführung wurde noch zweimal wiederholt.

Nach einer Woche Hypoxie wurden insgesamt 60 Mitosen ausgezählt (Abb. 4-19). 18 Zellen hatten einen normalen diploiden Chromosomensatz mit 46 Chromosomen. 29 Zellen waren hypodiploid, dies entspricht fast der Hälfte der ausgewerteten Mitosen. Hypodiploid heißt, dass die Zellen weniger Chromosomen als ein diploider Chromosomensatz mit 46 Chromosomen besaßen. Davon hatten 8 Zellen nur 42 Chromosomen. Es gab aber auch 2 Zellen, die weniger als 40 Chromosomen besaßen, sie hatten 36 bzw. 38 Chromosomen. 13 Zellen hatten einen hyperdiploiden Chromosomensatz. Hyperdiploid bedeutet, dass die Zellen mehr Chromosomen als in einem diploiden Chromosomensatz besaßen. Dabei hatten 7 Zellen mehr als 50 Chromosomen. Die Zelle mit den meisten Chromosomen besaß 97 Chromosomen. Insgesamt waren die Zellen aber noch fast-diploid, nur 9 Zellen hatten mehr als 50 bzw. weniger als 40 Chromosomen.

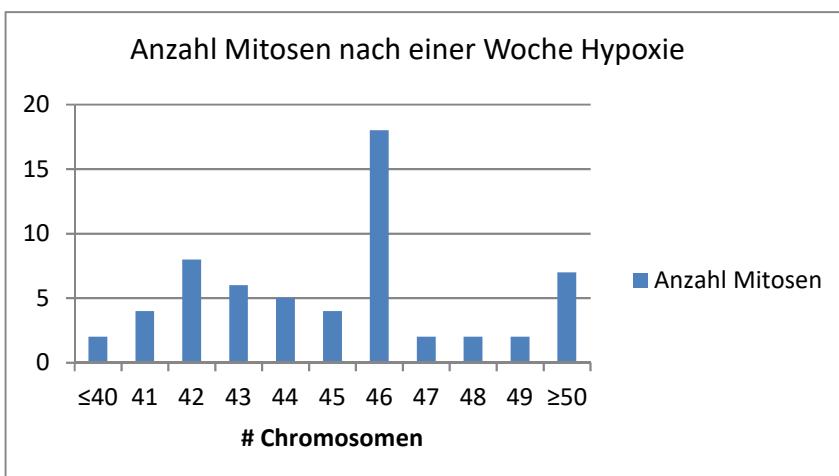


Abbildung 4-19:
Numerische Auswertung der Mitosen von Bronchial-epithelzellen von LifeLine, die sich eine Woche in Hypoxie befanden: Hier wird deutlich, dass die Zellen zuerst hypodiploid werden, einige sind jedoch auch schon hyperdiploid. Die meisten sind fast-diploid.

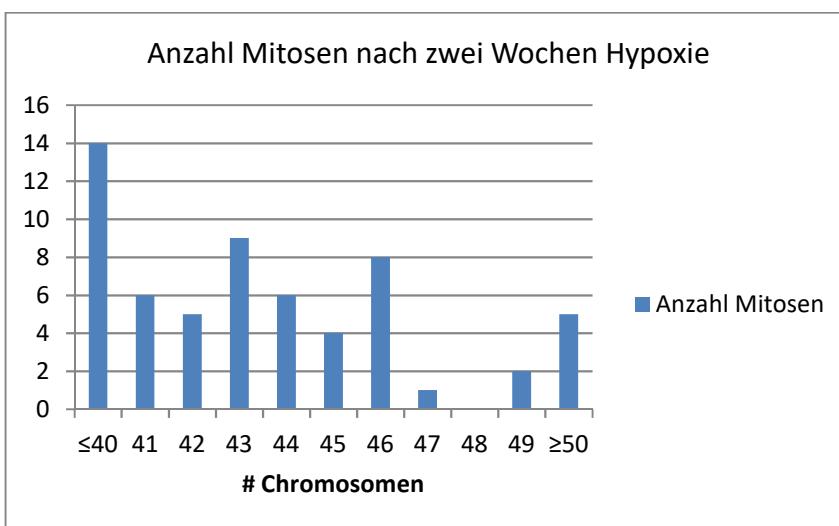


Abbildung 4-20:
Numerische Auswertung der Mitosen von Bronchial-epithelzellen von LifeLine, die sich zwei Wochen in Hypoxie befanden: Es sind nun noch mehr hypodiploide Zellen vorhanden, die weniger als 40 Chromosomen besaßen. Die hyperdiploiden Zellen haben abgenommen.

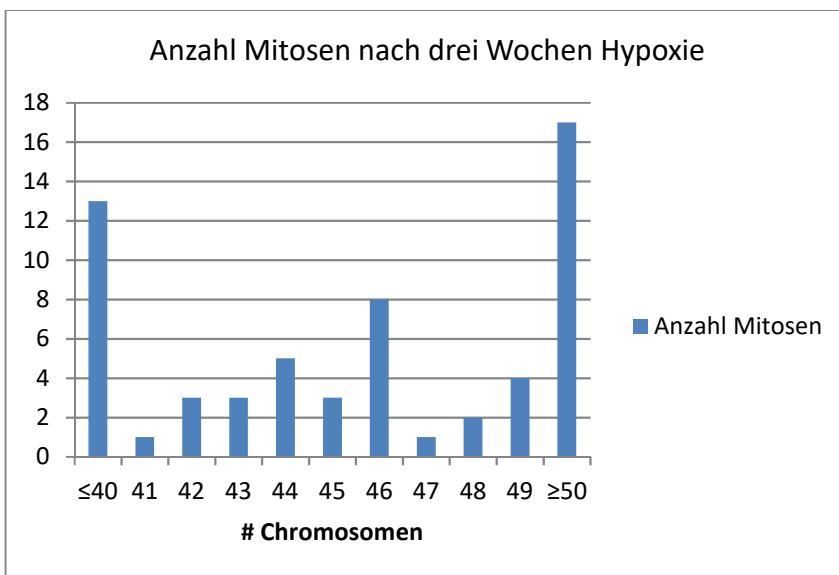


Abbildung 4-21:
Numerische Auswertung der Mitosen von Bronchial-epithelzellen von LifeLine, die sich drei Wochen in Hypoxie befanden: Der Chromosomensatz verschiebt sich hin zu den hyperdiploiden Zellen. Es sind immer noch hypodiploide Zellen vorhanden. Insgesamt nehmen die fast-diploiden Zellen ab.

Nach zwei Wochen wurden erneut insgesamt 60 Mitosen ausgezählt (Abb. 4-20). Dort waren 87 % der Zellen aneuploid, nur noch 8 Zellen hatten einen diploiden Chromosomensatz. Es wurde eine Verschiebung zu hypodiploiden Zellen hin deutlich, 44 Zellen hatten weniger als 46 Chromosomen und waren damit hypodiploid, dies entspricht über 70 % aller Zellen. Dabei hatten viele hypodiploide Zellen – nämlich 14 – einen Chromosomensatz mit weniger als 40 Chromosomen, das waren ca. 23 % der Zellen. Dabei hatte die Zelle mit dem kleinsten Chromosomensatz 37 Chromosomen. 8 Zellen hatten mehr als 46 Chromosomen, diese waren fast-diploid bzw. fast-tetraploid.

Nach der dritten Woche Hypoxie war die Anzahl der Zellen mit 46 Chromosomen gleichgeblieben im Vergleich zu den Zellen, die sich nur zwei Wochen in Hypoxie befunden hatten (Abb. 4-21). Die Anzahl der Mitosen mit weniger als 40 Chromosomen ist leicht gesunken, so hatten 13 Zellen (22 %) weniger als 40 Chromosomen, jedoch ist die Zahl der Mitosen mit mehr als 50 Chromosomen stark gestiegen. 17 Zellen (28 %) hatten mehr als 50 Chromosomen. Diese waren aber im Vergleich zu den Zellen, die eine Woche kürzer in Hypoxie waren, nicht fast-tetraploid. 9 Zellen davon besaßen zwischen 50 und 60 Chromosomen. 2 Zellen hatten über 100 Chromosomen. Nur 4 Zellen waren fast-tetraploid. Insgesamt waren 28 Zellen hypodiploid und 24 Zellen hyperdiploid. Die Anzahl der hypodiploiden Zellen war gesunken, die der hyperdiploiden Zellen gestiegen, dazu waren weniger fast-diploide Zellen zu finden. Die Zelle mit dem kleinsten Chromosomensatz ist in Abb. 4-22 dargestellt, sie besaß nur 29 Chromosomen. Die Zelle mit den meisten Chromosomen ist in Abb. 4-23 dargestellt, sie besaß über 150 Chromosomen. Zwei Chromosomensätze mit hypodiploiden Satz sind in Karyogrammen in den Abb. 4-24 und 4-26 sichtbar, in Abb. 4-24 ist ein Karyogramm einer Zelle mit nur 36 Chromosomen dargestellt, die Zelle in Abb. 4-26 besitzt 41 Chromosomen. Abb. 4-25 zeigt ein Karyogramm einer Zelle mit einem fast-diploiden Chromosomensatz mit 45 Chromosomen.



Abbildung 4-22: Mitose der Bronchial-epithelzellen von LifeLine die sich drei Wochen in Hypoxie befanden mit nur 29 Chromosomen.



Abbildung 4-23: Chromosomensatz der Bronchialepithelzellen von LifeLine die sich drei Wochen in Hypoxie befanden mit über 150 Chromosomen.



Abbildung 4-24:
Chromosomenanalyse
einer Bronchialepithel-
zelle von Life-Line nach
drei Wochen Hypoxie mit
nur 36 Chromosomen:
Hier fehlt das 2.
Chromosom von 2, 3, 4,
9, 10, 11, 18, und Y,
Chromosom 22 war nicht
vorhanden.



Abbildung 4-25:
Chromosomenanalyse
einer Bronchialepithel-
zelle von Life-Line nach
drei Wochen Hypoxie mit
45 Chromosomen, hier
fehlt nur ein Chromosom
1.



Abbildung 4-26:
Chromosomenanalyse einer Bronchialepithelzelle von LifeLine nach drei Wochen Hypoxie mit nur 41 Chromosomen. Hier fehlt ein 17, 20 und Y sowie beide 19 Chromosomen.

Nach vier Wochen Hypoxie wurden ebenfalls 60 Mitosen ausgewertet, es waren vermehrt hyperdiploide Zellen vorhanden. Die Anzahl der hypodiploiden Zellen hatte sich verringert (Abb. 4-27). Es waren 9 Zellen mit diploiden Satz und 15 Zellen mit einem hypodiploiden Chromosomensatz zu finden. 1 Zelle hatte weniger als 40 Chromosomen, die anderen hypodiploiden Zellen waren fast-diploid. Dahingegen waren 36 Zellen (60 %) hyperdiploid. Darunter waren auch fast-diploide Zellen zu finden. Die Mehrheit der Zellen – und zwar 19 – hatten jedoch mehr als 50 Chromosomen. 11 Zellen besaßen zwischen 50 und 60 Chromosomen, 2 Zellen hatten über 100 Chromosomen, 2 Zellen waren fast-tetraploid. Die Verteilung der Zellen mit mehr als 50 Chromosomen ist in Abb. 4-28 dargestellt. Insgesamt hat also die Anzahl von Zellen zugenommen, deren Chromosomensatz zwischen einem diploiden und tetraploiden Satz war, dies waren 32 Zellen und somit über 50 %.

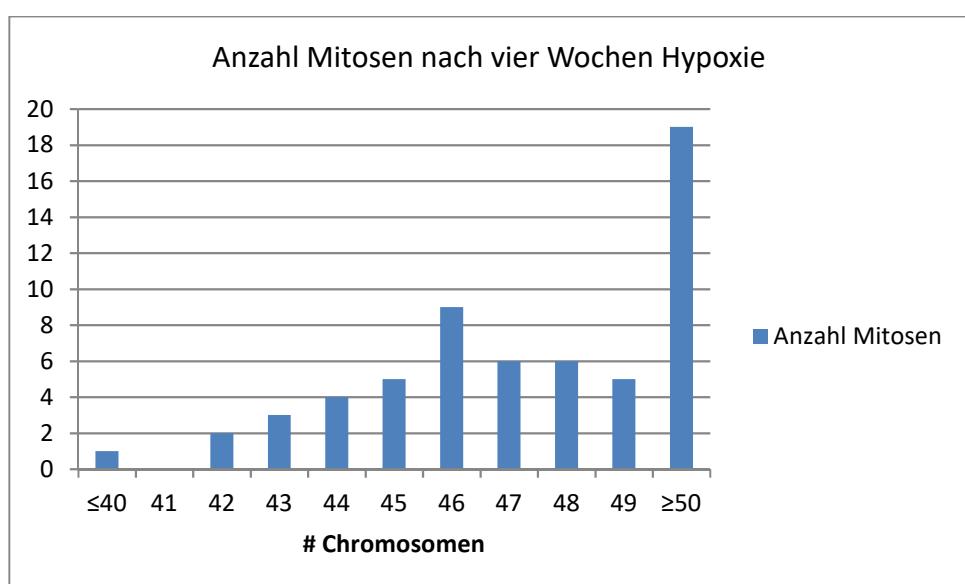


Abbildung 4-27: Numerische Auswertung der Mitosen der Bronchialepithelzellen von LifeLine, die sich vier Wochen in Hypoxie befanden: Es sind nun noch mehr hyperdiploide Zellen vorhanden, die mehr als 50 Chromosomen besitzen. Die Anzahl der hypodiploiden Zellen hatte sich verringert.

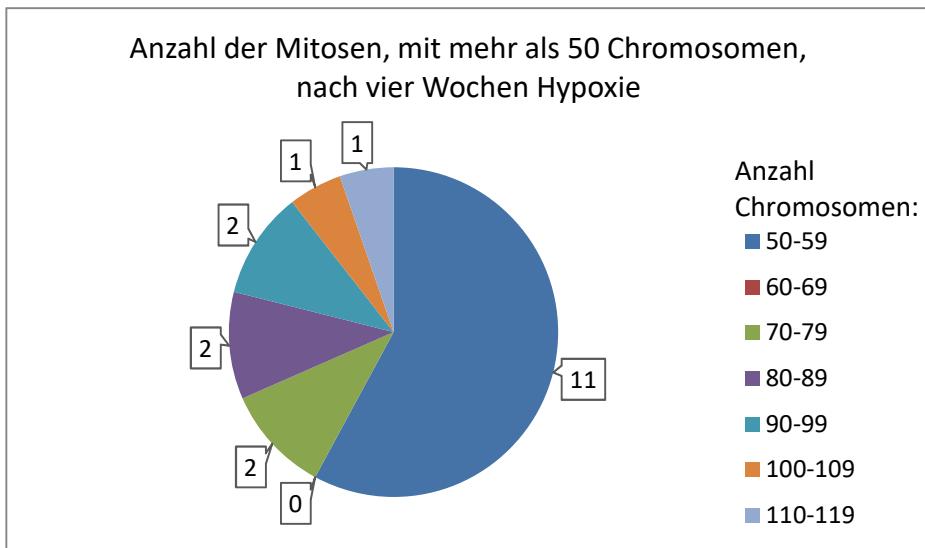


Abbildung 4-28: Anzahl der Mitosen mit mehr als 50 Chromosomen von Bronchialepithelzellen von LifeLine, die vier Wochen unter Hypoxie kultiviert wurden: Dabei hatten die meisten Zellen zwischen 50-59 Chromosomen und keine Zelle hatte zwischen 60 und 69 Chromosomen. Ungefähr gleich viele Zellen hatten 70 – 79, 80 – 89 und 90 – 99 Chromosomen. Nur 5% der Zellen hatten jeweils zwischen 100 – 109 und 110 – 119 Chromosomen.

Vergleich der Methoden

Es wurden jeweils 20 Mitosen nach der Tropf-Methode (Abb. 4-29, rote Balken) und 20 Mitosen nach der Deckgläschen-Methode (Abb. 4-29, blaue Balken) präpariert. Hier ist in der Verteilung der Chromosomen kein nennenswerter Unterschied sichtbar. Es wurden jedoch nur jeweils 20 Mitosen miteinander verglichen, da bei der Tropf-Methode nur sehr wenige Mitosen auf den Objektträger zu finden. Dagegen war bei der Deckgläschen-Methode die Ausbeute an auswertbaren Mitosen deutlich höher.

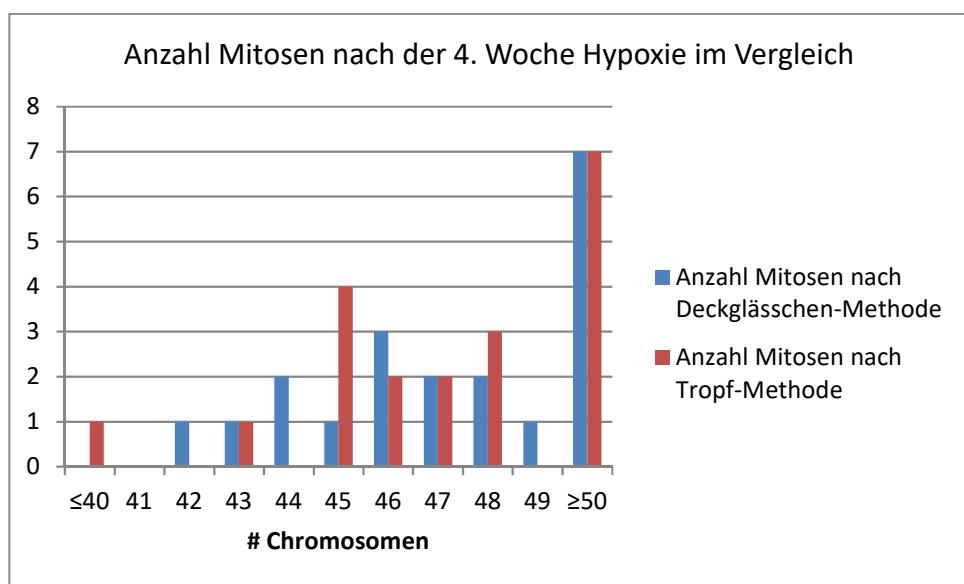


Abbildung 4-29: Anzahl der Mitosen nach der 4. Woche Hypoxie. Dargestellt ist die Anzahl der Mitosen aufgeteilt nach der Anzahl der Chromosomen. Dabei wurden die Deckgläschen-Methode (blau) mit der Tropf-Methode (rot) verglichen.

4.3.3 Transformation Assay

Der Transformationsnachweis der Zellen, die eine Woche unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, waren im Transformations-Assay nach einer Woche negativ. Es wuchsen weder Sphäroide in der Kontrollkultur, noch bei den Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden (Abb. 4-30).

Auch nach zwei und drei Wochen Hypoxie blieb der Assay negativ. Bei Anfärbung der herausgelösten Zellen fanden sich keine lebenden Zellen.

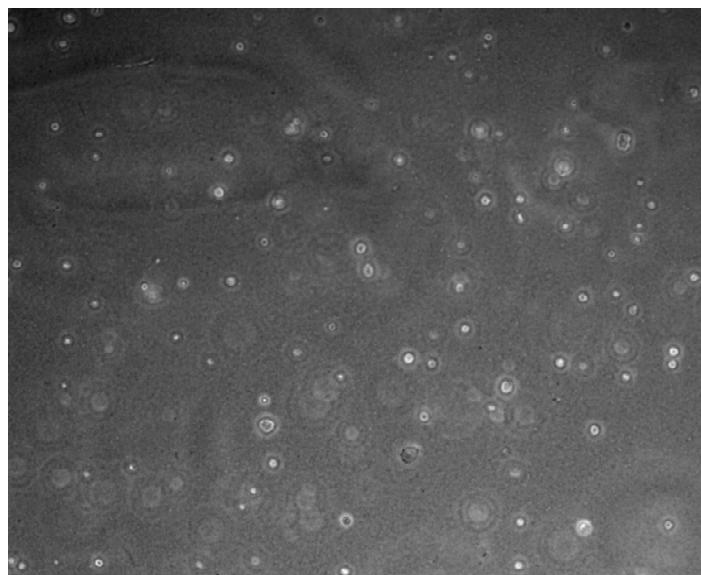


Abbildung 4-30: Bronchialepithelzellen von LifeLine in der 5. Passage in den Assay gesetzt, nach einer Woche Hypoxie. Auswertung nach einer Woche im Assay in 4-facher Vergrößerung: Keine Späroide sichtbar, Assay negativ.

4.3.4 ATP und GTP Bestimmung

Abb. 4-31 zeigt die HPLC einer Referenzprobe (schwarze Linie) mit den sechs Molekülen GMP, AMP, GDP, ADP, GTP und ATP. Die blaue Linie stellt eine Probe von Zellen dar, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Diese Referenzprobe ermöglicht es, die einzelnen Werte der Probe den einzelnen Molekülen zuzuordnen. Die Zellen beinhalten viel ATP, wenig GTP und fast kein ADP, GDP, AMP und GMP.

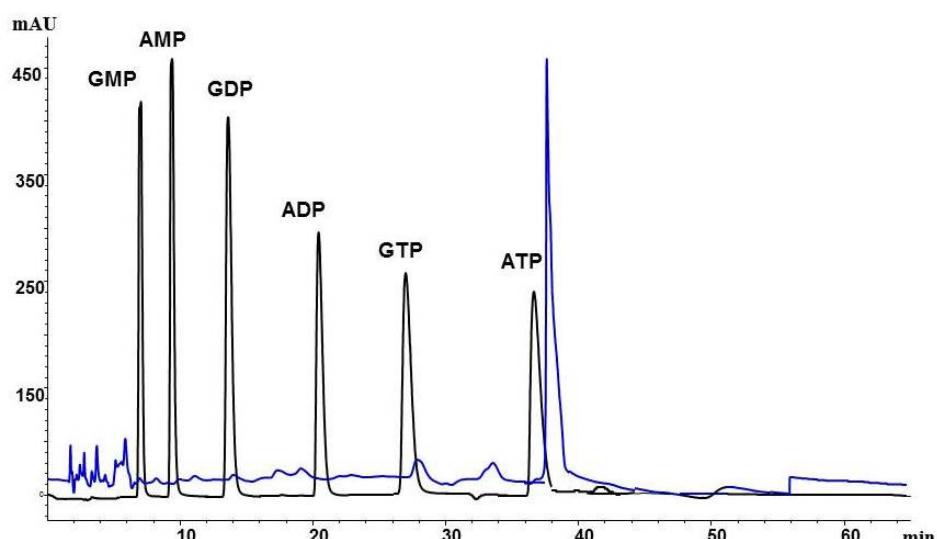


Abbildung 4-31: Chromatogramm der Probe in Normoxie (blau), diese wird mit den 6 Nukleotiden aus dem Gemisch (schwarz) verglichen.

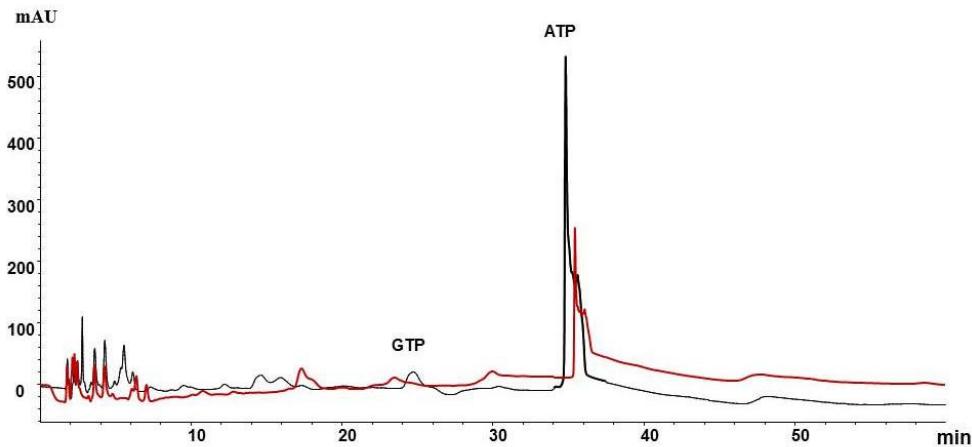


Abbildung 4-32: Chromatogramm: Hier werden die Zellen nach acht Tagen Hypoxie (rot) mit denen in Normoxie verglichen (schwarz).

In Abb. 4-32 wird der Gehalt an Nukleotiden von Zellen aus Normoxie (schwarze Linie) mit Zellen, nach acht Tage in Hypoxie verglichen. Dabei wird vor allem der Unterschied zwischen dem ATP- und GTP-Gehalt sichtbar. Sowohl die Menge an ATP als auch die Menge an GTP haben unter Hypoxie abgenommen. In Abb. 4-33 ist die ATP-Konzentration in Verhältnis zur Hypoxie-Zeit gesetzt (siehe Abb. 4-33 und Tabelle 4-1). Zur Kontrolle wurden Proben der Zellen unter Normoxie verwendet. Die ATP-Konzentration der Zellen, die in Hypoxie kultiviert wurden, sank auf die Hälfte ab. Nach 8 Stunden Hypoxie war die ATP-Konzentration auf 18,69 pmol abgefallen, dies entsprach ca. 60 % des Ausgangswertes. Nach 12 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 7 Tagen blieb die ATP-Konzentration relativ konstant zwischen 16,95 pmol und 16,02 pmol, dies entspricht 53 % der Anfangskonzentration. Der Stoffwechsel der Zelle hatte sich also relativ schnell – innerhalb von 12 Stunden – an die niedrige Sauerstoffkonzentration angepasst. Nachdem die Zellen eine Woche unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, wurden sie anschließend wieder für eine Woche unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Dabei stieg die ATP-Konzentration jedoch nicht wieder an. Dies zeigte, dass die Zellen ihren Stoffwechsel vermutlich irreversibel umgestellt haben.

Auch die Konzentration von GTP sank unter Hypoxie ab, nämlich auf 60 % nach 8 Stunden (Abb. 4-34 und Tabelle 4-2). Nach 12 Stunden sank die GTP-Konzentration auf 6,74 pmol ab, dies entsprach 49 % des Ausgangswertes unter Normoxie. Jedoch war bei 12 Stunden eine geringere Streuung der Werte als bei 8 Stunden zu finden. Nach 24 Stunden Hypoxie stieg die GTP-Konzentration wieder leicht auf 8,5 pmol an, dies entsprach 62 %, die einzelnen Werte streuten kaum noch.

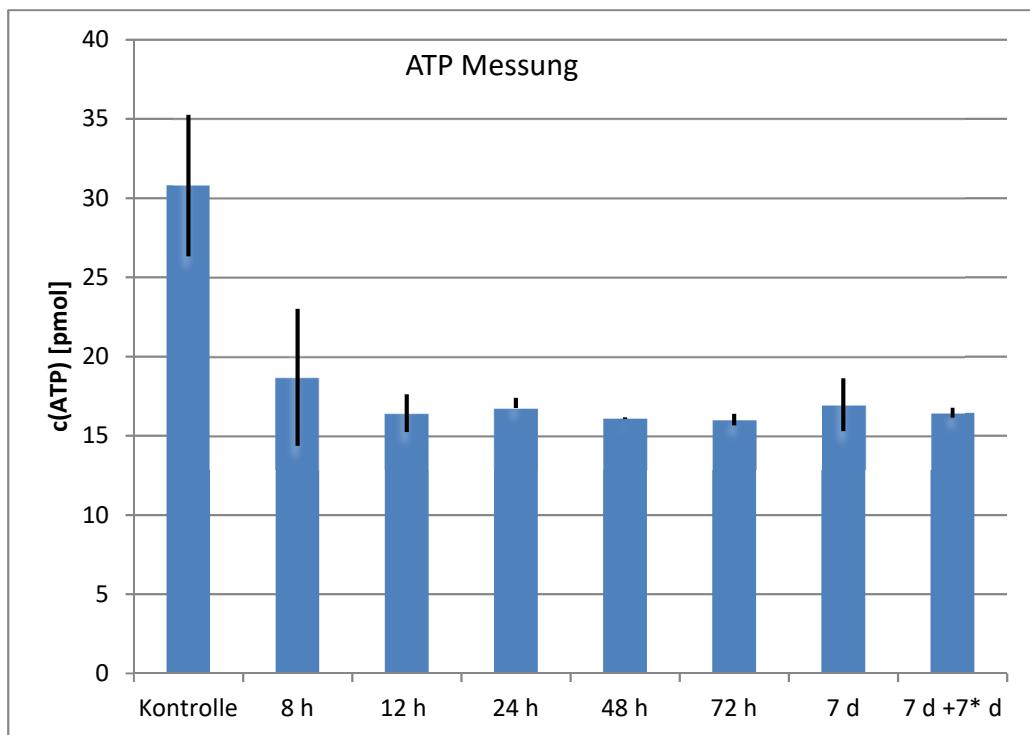


Abbildung 4-33: ATP Messung im zeitlichen Verlauf: Die ATP Menge nimmt mit Hypoxie ab und ist nach einer Woche Hypoxie konstant, sie steigt auch bei Normoxie nicht mehr an. Die Balken geben den Mittelwert der ATP-Mengen an, die schwarzen Linien zeigen die Standardabweichung (*Reoxygenierung (= 21% Sauerstoff)). Die Rohdaten zeigt Tabelle 4-1.

c(ATP) [pmol]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	4. Messung	Mittelwert	Standardabweichung
Normoxie	34,7	26,1	26,6	35,78	30,80	4,46
8 h Hypoxie	26,17	16,38	15,91	16,31	18,69	4,32
12 h Hypoxie	18,39	15,93	16,13	15,21	16,42	1,19
24 h Hypoxie	15,84	17,39	16,98		16,74	0,66
48 h Hypoxie	16,08	16,18	16,07		16,11	0,05
72 h Hypoxie	16,49	15,96	15,61		16,02	0,36
7 d Hypoxie	15,04	19,1	16,71		16,95	1,67
7 d Hypoxie + 7 d Normoxie	16,84	16,48	16,04		16,45	0,30

Tabelle 4-1: Rohdaten zur Abbildung 4-33: ATP-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf.

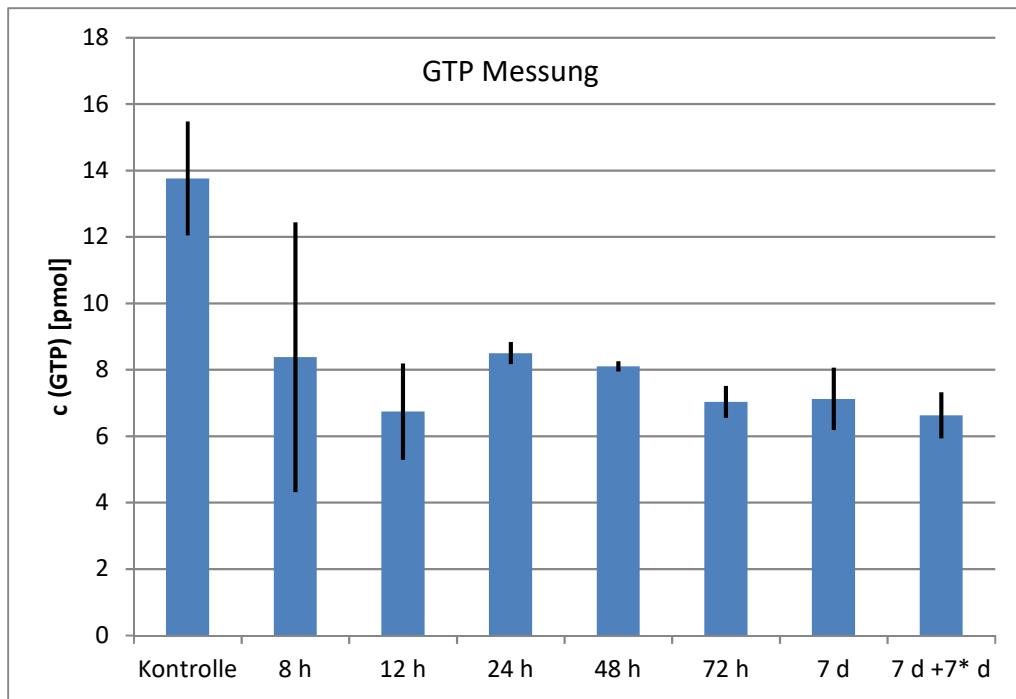


Abbildung 4-34: GTP Messung im zeitlichen Verlauf: Die GTP-Menge nimmt mit Hypoxie ab und ist nach einer Woche Hypoxie konstant, sie steigt auch bei Normoxie nicht mehr an. Die Balken geben den Mittelwert der GTP-Mengen an, die schwarzen Striche zeigen die Standardabweichung (*Reoxygenierung (= 21 % Sauerstoff)). Die Rohdaten zeigt Tabelle 4-2.

c(GTP) [pmol]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	4. Messung	Mittelwert	Standardabweichung
Normoxie	14,50	11,60	12,80	16,14	13,76	1,72
8 h Hypoxie	15,40	6,03	6,23	5,85	8,38	4,06
12 h Hypoxie	9,23	6,23	5,78	5,72	6,74	1,45
24 h Hypoxie	8,83	8,62	8,05		8,50	0,33
48 h Hypoxie	8,06	8,31	7,94		8,10	0,15
72 h Hypoxie	7,20	7,52	6,37		7,03	0,48
7 d Hypoxie	7,05	6,01	8,31		7,12	0,94
7 d Hypoxie + 7 d Normoxie	7,59	6,31	5,98		6,63	0,69

Tabelle 4-2: Rohdaten zur Abbildung 4-34: GTP-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf.

Ab dann sank die GTP-Konzentration wieder ab, nach 48 Stunden Hypoxie betrug sie nur noch 8,1 pmol (59 %) und nach 72 Stunden Hypoxie nur noch 7,03 pmol (51 %). Nach 7 Tagen Hypoxie stieg die GTP-Konzentration wieder leicht auf 7,12 pmol (52 %) an. Hier wird deutlich, dass sich die GTP-Konzentration durch den niedrigen Sauerstoffgehalt etwa halbiert hat. Nachdem die Zellen nach sieben Tagen Hypoxie wieder unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden, stieg auch dort die GTP-Konzentration nicht mehr an, sie betrug 6,63 pmol (48 %). Das zeigte, dass Sauerstoffmangel neben einem Mangel an ATP auch zu einem Mangel

an GTP führt und dass dieser Wert auch unter der anschließenden Normoxie nicht wieder anstieg.

Beim Vergleichen der Werte für die ATP-Konzentration und GTP-Konzentration fällt auf, dass unter Hypoxie beide Konzentrationen zunächst abfallen, nach 24 Stunden Hypoxie wieder leicht ansteigen, ab dann aber wieder abfallen um nach sieben Tagen wieder leicht anzusteigen. Bei beiden Werten ist die Konzentration nach sieben Tagen Reoxygenierung geringer als vor der Reoxygenierung. Die Standardabweichung der einzelnen Messergebnisse fällt jedoch während der Hypoxie bei den ATP-Konzentrationen geringer aus als bei der GTP-Konzentration. Beide Konzentrationen sanken ungefähr auf die Hälfte der Anfangskonzentration ab.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zellen ihren Stoffwechsel schon nach wenigen Stunden Hypoxie umgestellt hatten. Nach spätestens einer Woche Hypoxie war diese irreversibel. Nicht nur die ATP-Konzentration sank ab, sondern auch die GTP-Konzentration. Trotz des niedrigen Energieangebotes konnten die Zellen weiter wachsen, denn selbst nach vier Wochen Hypoxie war es noch möglich, ihre Chromosomen zu analysieren, was auf eine erhaltene Proliferationsfähigkeit schließen lässt.

5 Diskussion

5.1 Ergebnisse

5.1.1 Primäre Bronchialepithelzellen von der Firma abm

Die primären Bronchialepithelzellen von abm waren ab Passage 2 aneuploid. Aus diesem Grund eigneten sich die Zellen nicht, um zu untersuchen, ob chronische Hypoxie zu Aneuploidie führt. Jedoch sind diese Zellen nach zwei Wochen hypoxischer Kultivierung im Transformations-Assay als Sphäroide gewachsen. Dies war bei den unter Normoxie kultivierten Zellen nicht der Fall. Das zeigt, dass durch Hypoxie aneuploide Zellen ohne Kontakt zur extrazellulären Matrix proliferieren können. Leider war nicht bekannt, wie die Zellen von abm verändert wurden. Laut Lieferant handle es sich um „primäre“, nicht veränderte Bronchialepithelzellen. Aufgrund des Wachstumsverhalten und der Aneuploidie der Zellen legt dieses den Verdacht nahe, dass diese Zellen immortalisiert wurden.

5.1.2 Primäre Bronchialepithelzellen von der Firma LifeLine

Die primären Bronchialepithelzellen von LifeLine hatten zu Beginn einen physiologischen diploiden Chromosomensatz, sodass an diesen der Zusammenhang zwischen Hypoxie und Aneuploidie untersucht werden konnte. Dabei zeigten sich nach einer Woche Kultivierung unter Hypoxie schon 70 % der Zellen aneuploid, dabei waren ca. 48 % hypodiploid und ca. 22 % hyperdiploid. Insgesamt waren die Zellen aber noch fast-diploid, nur 15 % der Zellen hatten mehr als 50 bzw. weniger als 40 Chromosomen. Nach zwei Wochen hypoxischer Kultivierung waren 87 % der Zellen aneuploid, 70 % aller Zellen waren hypodiploid, 23 % aller Zellen hatten weniger als 40 Chromosomen. Nur ca. 13 % der Zellen waren hyperdiploid. Nach drei Wochen Kultivierung in Hypoxie waren ebenfalls 87 % der Zellen aneuploid, ca. 47 % der Zellen waren hypodiploid, davon hatten ca. 46 % weniger als 40 Chromosomen. 40% aller Zellen waren hyperdiploid, davon hatten ca. 71 % mehr als 50 Chromosomen. Nach vier Wochen hypoxischer Kultivierung stieg die Anzahl an hyperdiploiden Zellen weiter an: 60 % aller Zellen waren hyperdiploid und fast 1/3 aller Zellen besaß über 50 Chromosomen. Bei den meisten hyperdiploiden Zellen lag die Anzahl der Chromosomen zwischen 46 (diploid) und 92 (tetraploid). Es waren nur noch 25 % aller Zellen hypodiploid und diese waren fast-diploid (siehe Abb. 5-1 und Ergebnisse Chromosomenanalyse Kapitel 4.3.2).

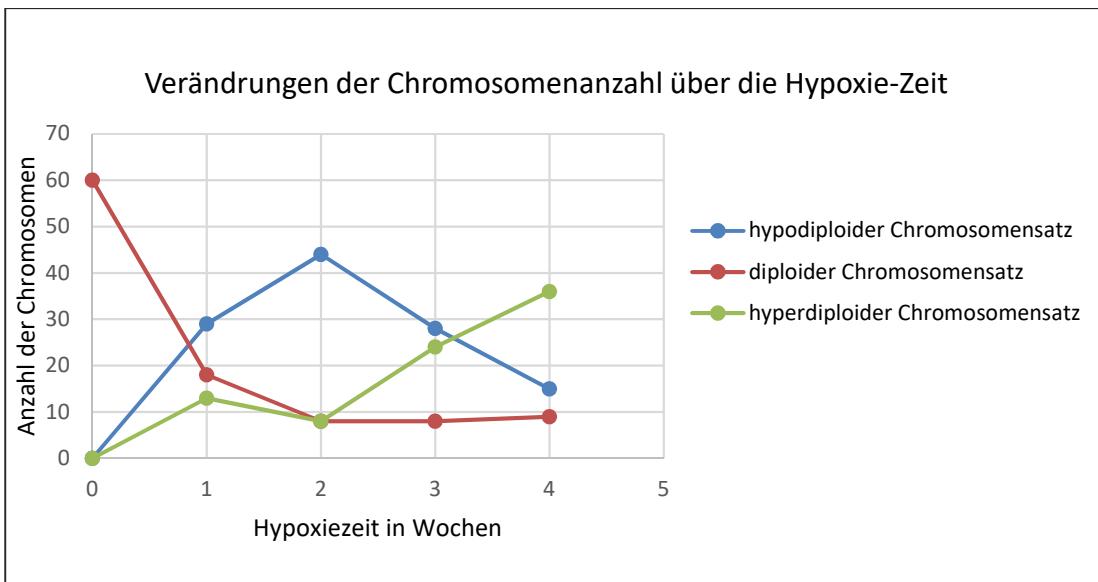


Abbildung 5-1: Veränderungen der Chromosomenanzahl über die Hypoxie-Zeit: Zu Beginn entstehen vor allem hypodiploide Zellen, die jedoch nach vier Wochen Hypoxie deutlich abgesunken sind. Dagegen steigt die Anzahl an hyperdiploiden Zellen mit der Hypoxie-Zeit an. Die Anzahl der diploiden Zellen sinkt zu Beginn stark ab und bleibt nahezu konstant.

Hier wurde deutlich, dass sich die Chromosomenanzahl von Zellen unter chronischer Hypoxie über die Zeit von fast-diploid über hypodiploid zu hyperdiploid verändert. Dennoch reichten die Veränderungen der Zellen nicht für eine Transformation aus.

Es gibt weitere Arbeitsgruppen, die sich mit dem Zusammenhang zwischen Hypoxie und Aneuploidie beschäftigten. Kondoh et al. untersuchten Endothel-Zellen, die zuerst 24 Stunden bei 1 % Hypoxie kultiviert worden waren, dann 24 Stunden in Normoxie, anschließend wieder in Hypoxie. Bei den Zellen wurde sieben Tage lang in einem Rhythmus von 24 Stunden die Sauerstoffkonzentration geändert, es fand also eine regelmäßige Reoxygenierung statt. Bei diesen Experimenten entstanden ebenfalls aneuploide Zellen. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass diese durch überexprimierte ROS entstanden sind (Kondoh et al., 2013).

Ueyama et al untersuchten Aneuploidien bei mesenchymalen Stammzellen unter hypoxischer Kultivierung. Eine Besonderheit mesenchymaler Stammzellen ist ihre Pluripotenz, ihre Proliferation ex vivo wird – wie auch bei nicht-Stammzellen – durch die Seneszenz limitiert. Sie fanden heraus, dass diese Zellen bei einer Sauerstoffkonzentration von 5% in einer signifikant früheren Passage Aneuploiden entwickeln als die gleichen Zellen bei 20% Sauerstoff. Zusätzlich zeigten die Stammzellen eine höhere Rate an veränderten Chromosomensätzen, wenn die Spender älter als 60 Jahre waren (Ueyama et al., 2011).

In beiden Arbeitsgruppen wurden die Zellen nur über kürzere Zeit in Hypoxie kultiviert, jedoch wurde keine zeitliche Abfolge der Chromosomenveränderungen untersucht. Außerdem wurde

bei Kondoh et al. keine kontinuierliche Hypoxie erzeugt, es wurden vor allem die Auswirkungen der Reoxygenierung auf die Zellen untersucht und weniger die Auswirkungen chronischer Hypoxie, wie dies in der hier vorliegenden Arbeit erfolgte. Darüber hinaus wurden in der hier vorliegenden Arbeit auch die Veränderungen des Energiehaushaltes analysiert. Dabei zeigte sich, dass die ATP- und GTP-Konzentration nach acht Stunden hypoxischer Kultivierung in den Zellen auf ungefähr 50 % des Ausgangswertes abgefallen war und dort nahezu konstant blieb. Diese Veränderungen des Stoffwechsels waren spätestens nach sieben Tagen irreversibel. Dass die ATP-Konzentration unter Hypoxie abgefallen ist, beruht darauf, dass der Zelle weniger Sauerstoff für die oxidative Phosphorylierung zu Verfügung steht, sodass die ATP-Gewinnung vermehrt über die anaerobe Glykolyse abläuft, die aber deutlich weniger ATP pro Glukose-Molekül erzeugen kann. Dahingegen wurden die Auswirkungen von Hypoxie auf den GTP-Haushalt bisher wenig untersucht. Die GTP-Konzentration sinkt jedoch im gleichen Maße wie die ATP-Konzentration ab. GTP wird bei Normoxie in den Mitochondrien im Zitronensäurezyklus gebildet, es kann jedoch auch direkt aus ATP mittels Nukleosiddiphosphatkinase synthetisiert werden (Alberts et al., 2011). Somit könnte die GTP-Konzentration gesunken sein, weil weniger ATP zur Synthese zur Verfügung steht, aber auch weil chronische Hypoxie Mitochondrien irreversibel schädigt (Webster & Ames, 1965; Hasper, 1964; McLennan, Carty, Sheppard & Sharp, 1975).

5.2 Aneuploidie

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch Hypoxie aneuploide Zellen entstehen. Um zu verstehen, wie Hypoxie dazu führt, werden zunächst die allgemeinen Entstehungsmechanismen aneuploider Zellen erläutert.

5.2.1 Entstehungsmechanismen von Aneuploidie

Aneuploide Zellen können aus diploiden und tetraploiden Zellen entstehen. Dabei ist das Risiko für Chromosomenfehlverteilungen in tetraploiden Zellen bis zu 166-fach höher als in diploiden Zellen (Shi & King, 2005). Tetraploide Zellen können durch verschiedene Mechanismen wie Mitoseverzögerung, Cytokinese-Fehler oder Zellfusion durch Viren entstehen (Lv et al., 2012; Vitale et al., 2011). Es gibt keine permanente Proliferationsinhibition für tetraploide Zellen, sodass aus diesen bei abnormen Zellteilungen bevorzugt aneuploide Zellen entstehen können (Ganem, Storchova & Pellman, 2007).

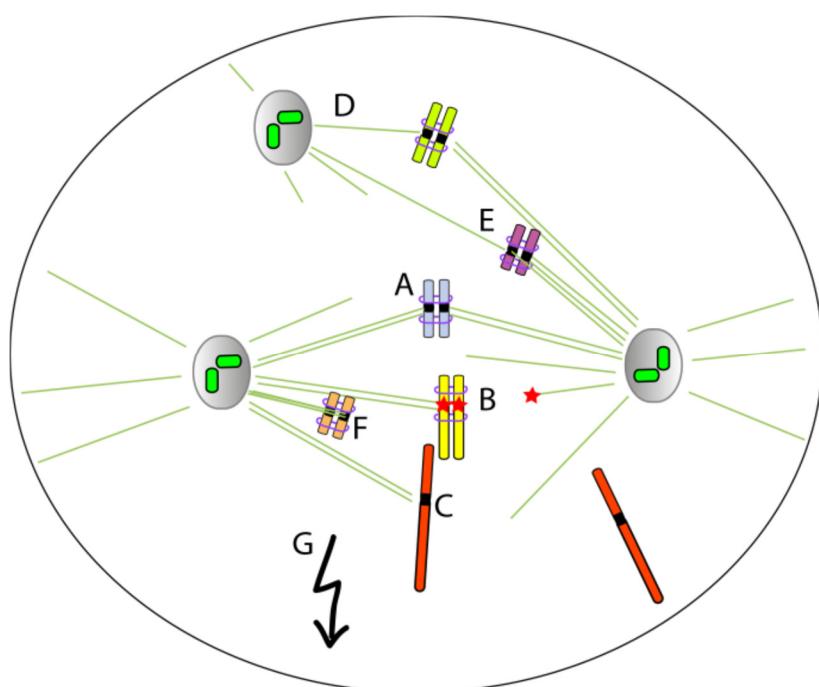


Abbildung 5-2: Schematische Darstellung von Mitose-Spindeldefekten, welche zu numerischen Aneuploidien führen (Storchova, 2012):

- A: normale amphitelische Befestigung
- B: Mikrotubuli oder Kinetochor-Defekt, der zu einer falschen Befestigung führt
- C: Inkorrekte Befestigung aufgrund eines Defekts des Schwester-Chromatid-Cohesins
- D: Multipolare Centrosome führen zu einer multipolaren Spindel, welche die normale Chromosomenverteilung behindert.
- E: merotelische Befestigung, welche nicht vom Spindelapparat-Checkpoint erkannt wurde, dadurch entstehen lagging Chromosomen und Aneuploidie
- F: syntetische Befestigung führt zu fehlerhaften Chromosomenteilung
- G: Spindelapparat-Checkpoint-Defekte

Numerische Aneuploidie entsteht vor allem durch Fehler im Zellzyklus bei der Chromosomenverteilung. Abbildung 5-2 zeigt schematisch die wesentlichen Mechanismen, aufgrund derer numerische Aneuploiden durch Spindeldefekte während der Mitose entstehen können (Storchova, 2012). Dabei kann es zu inkorrekten Bindung der Mitosespindel, die aus Mikrotubuli besteht, an die Kinetochore der Chromosomen kommen (siehe Abb. 5-2 B-F) sowie zu zusätzlichen Centrosomen (Ganem, Godinho & Pellman, 2009; Krajovic & Overholtzer, 2012; Ganem & Pellman, 2012). Die korrekte Chromosomenverteilung wird mittels Spindelapparat-Checkpoint (SAC) gesteuert (Musacchio & Salmon, 2007). Der SAC besteht aus verschiedenen Bestandteilen, darunter Bub1, Bub3, BubR1, Mad1, Mad2, Mad3, Mps1 und CENP-E. Der SAC wird aktiv, wenn nicht alle Mikrotubuli der Mitosespindel an ein Centromer gebunden haben, oder wenn nicht auf beide Schwesterchromatide ein entgegengesetzter Zug zu den Polen entsteht (Schnurch, Hasskarl, Engelhardt & Wäsch, 2006). Die Aktivierung des SAC wird über eine Hemmung des Anaphase-Promotor-Komplex-Cyclosom (APC/C) gesteuert. APC/C aktiviert normalerweise das Fortschreiten der Metaphase in die Anaphase, indem es Securin hemmt, welches seinerseits normalerweise die Separase hemmt. Durch die Hemmung von Securin wird die Separase aktiviert und initiiert die Chromosomenteilung durch Trennung des Cohesins (Siegel & Amon, 2012). Der SAC führt über die Hemmung von APC/C zu einer Verzögerung des Zellzyklus, bis die erkannten Fehler behoben wurden (Storchova, 2012; Schnurch, Hasskarl, Engelhardt & Wäsch, 2006). Kommt es nun zu Defekten des SAC bzw. der Mitosespindelgene oder zur Überaktivierung von APC/C oder Separase bzw. einer Inaktivierung von Securin können aneuploide Zellen entstehen (King, 2008; Storchova, 2012; Siegel & Amon, 2012). Zusätzlich kann es durch Modifikation der Histone zu Fehlern bei der Trennung von Schwester-Chromosomen und somit zu Chromosomenfehlverteilungen kommen (Cimini, Mattiuzzo, Torosantucci & Degrassi, 2003).

Strukturelle Aneuploidie wird häufig bei DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) oder DNA-Schäden beobachtet. Nicht ordentlich reparierte DSB können zu Insertionen, Translokationen, Deletionen und Amplifikationen von Chromosomen führen (Luoto, Kumareswaran & Bristow, 2013). Diese können durch verschiedene Mechanismen entstehen, wie z. B. zufällige DNA-Schäden durch ROS oder ionisierende Strahlung. Zusätzlich können Defekte im DNA-Reparatursystem auftreten. Aber auch lagging Chromosomen tragen dazu bei, indem sie – wie ihr Name schon sagt – der Chromosomenverteilung hinterherhinken, sodass sie sich bei der Zytokinese noch zwischen beiden Tochter-Zellkernen befinden können (Diaz-Rodriguez, Sotillo, Scvartzman & Benezra, 2008; Heald & Khodjakov, 2015). Diese können dann während der Zytokinese an nicht physiologischen Stellen geteilt werden, oder sie bilden ihren eigenen

Mikronukleolus. Dort ist die DNA-Replikation oft fehlerhaft und es kann zur Zerstörung solcher Chromosomen kommen (Chromothripsis). Bei der anschließenden Mitose teilen sich diese Chromosomen oder Fragmente davon wieder mit den anderen Chromosomen, es entsteht eine strukturelle Aneuploidie (Storchova, 2012; Siegel & Amon, 2012).

5.2.2 Aneuploidie - Entstehung und deren zeitliche Veränderung durch Hypoxie

Die allgemeinen Mechanismen der Aneuploide-Entstehung zeigen viele Möglichkeiten wie Aneuploidien entstehen können. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass auch Hypoxie zu Aneuploidie führt. Hypoxie muss also an den o.g. Punkten zu Veränderungen führen. Dabei sind folgende Dinge wesentlich: Hypoxie führt zu einer Verringerung von GTP, in einigen Studien zu erhöhten ROS (Kondoh et al., 2013) und zu einer verminderten DNA-Reparatur. Des Weiteren kann Hypoxie die Entstehung von aneuploiden Zellen begünstigen, indem vermehrt tetraploide Zellen durch Zellfusionen entstehen (Paltsyn et al., 2014; Mohr et al., 2015).

Die Dephosphorylierung von GTP wird in der Zelle als Energiequelle für die Bewegung der Mikrotubuli benötigt. Sinkt nun die GTP-Konzentration ab, kann es zu Störungen der Mikrotubuli kommen und folglich kann der Spindelapparat während der Mitose nicht richtig funktionieren, es können aneuploide Zellen entstehen (Alberts et al., 2011).

In Hypoxie kann vermehrt ROS gebildet werden, die zu DNA-Einzelstrang- und Doppelstrang-Schäden (DSB) führen können, Hypoxie wirkt also mutagen (Bristow & Hill, 2008; Dewhirst, Cao & Moeller, 2008). Hypoxie inhibiert zusätzlich die DSB-Reparatur (Kumareswaran et al., 2011; Luoto, Kumareswaran & Bristow, 2013). An der DSB-Reparatur sind viele Proteine beteiligt, wie z. B. RAD51, BRCA1/2 und der MRN-Komplex (MRE11, RAD50, NSBS1). Hypoxie kann über verschiedene Mechanismen die DSB-Reparatur hemmen, im Folgenden werden ein paar Beispiele genannt: Durch HIF-1 kommt es zur verminderten Transkription von BRCA1 und somit zur Ausschaltung eines Tumorsuppressorgenes. Eine weitere Möglichkeit ist die selektive Hemmung der mRNA-Translation von BRCA2 und RAD51. Es wurde auch eine Überexpression des Proteins EZH2 durch HIF-1 gefunden, welches die Transkription von RAD51 hemmt (Luoto, Kumareswaran & Bristow, 2013). Daneben führt Hypoxie zu einer Herabregulierung der Translation und Transkription von weiteren DNA-Reparatursystemen wie den DNA-Mismatch-Reparaturproteinen (z. B. MLH1 und MSH2) und dem Nukleotid-Exzisionsreparatur-System (Scanlon & Glazer, 2015; Bristow & Hill, 2008). Über diese Mechanismen entstehen DNA-Schäden, die sich in der Zelle über die Zeit ansammeln können,

vor allem wenn die G1- oder S-Checkpoints des Zellzyklus nicht aktiviert wurden und dadurch die Zelle trotz DNA-Schäden weiter proliferieren konnte (Bristow & Hill, 2008). Mutationen in den Genen, die für die Steuerung des Zellzyklus verantwortlich sind, können dadurch zur Entstehung von aneuploiden Zellen führen.

In den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass sich die Chromosomenverteilung über die Zeit veränderte. Nach einer Woche Hypoxie waren vor allem fast-diploide Zellen zu finden. Diese könnten durch Fehlverteilungen während des Zellzykluses aufgrund des GTP-Mangel entstanden sein (siehe oben). Nach zwei Wochen Hypoxie waren die Zellen vor allem hypodiploid. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen mit weniger Chromosomen zu Beginn einen Proliferationsvorteil gegenüber den hyperdiploiden Zellen hatten. Dies könnte durch proteotoxischen Stress in den hyperdiploiden Zellen erklärt werden. Durch das Mehr an Genen werden mehr Proteine synthetisiert, diese können sich anreichern und so zu einer Störung des Proteingleichgewichtes führen, welches für die Zelle schädlich ist (Storchova, 2012; Dürrbaum & Storchova, 2016). Die hypodiploiden Zellen müssen jedoch einen Weg gefunden haben, trotz der teilweisen Haploinsuffizienz proliferieren zu können. Diese Mechanismen waren jedoch nicht ausreichend, denn nach drei Wochen Hypoxie waren deutlich weniger hypodiploide Zellen zu finden, die Anzahl an hyperdiploiden Zellen nahm zu. Die Zellen müssen sich also mit der Zeit an den proteotoxischen Stress adaptiert haben. Des Weiteren waren die Zellen meist nicht mehr fast-diploid. Nach vier Wochen Hypoxie waren die meisten Zellen hyperdiploid und hatten meist zwischen 50-60 Chromosomen. Eine ähnliche Chromosomenverteilung findet sich auch in Tumorzellen, diese besitzen meist einen hyperdiploiden bzw. fast-tetraploiden Chromosomensatz (Storchova & Kuffer, 2008; Storchova, 2012). In dem Zusammenhang, dass Hypoxie zu Mutationen führt und das DNA-Reparatursystem hemmt wäre es nun noch interessant zu wissen, wie sich die DNA in dieser Zeit verändert hat, insbesondere ob Mutationen in den Bereichen aufgetreten sind, die für die Steuerung des Zellzyklus verantwortlich sind.

5.2.3 Aneuploidie im Tumor

Charakteristische Eigenschaften von Tumoren sind eine erhöhte Proliferation und eine Differenzierungsstörung. Als Folge hiervon kommt es zum invasivem Wachstum und Metastasierung. Die molekularen Grundlagen dieser Prozesse waren früher unbekannt. Mit der Entdeckung der Protoonkogene und der Tumorsuppressorgene konnten wichtige molekulare Grundlagen dieser Ereignisse gefunden werden. Die am meisten akzeptierte Theorie der

Tumorentstehung ist die somatische Mutationstheorie: 4 bis 12 Mutationen in solchen tumorrelevanten Genen werden als Auslöser der Tumorentstehung angenommen. Große Bedeutung in Tumoren haben zusätzlich Aneuploidie und Hypoxie. Beides ist mit einer schlechten Prognose und Resistenz gegen Chemo- und Radiotherapie verbunden (Thompson & Compton, 2011; Cairns, Harris & Mak, 2011; Lluis, Buricchi, Chiarugi, Morales & Fernandez-Checa, 2007). In fast jedem soliden Tumor werden Aneuploidien gefunden, aber auch schon in Tumorvorstufen wie Hyperplasien und Polypen und in Präkanzerosen treten Aneuploidien auf (Schnurch, Hasskarl, Engelhardt & Wäsch, 2006; Hibi et al., 1992; Hung et al., 1995; Kother & Sandritter, 1964; Stoler et al., 1999). Da in der Tumorentwicklung zu verschiedenen Stadien der Kanzerogenese Hypoxiezustände auftreten, kann als eine Erklärung angenommen werden, dass durch diese Hypoxiezustände einige der in Tumoren gefundenen Aneuploidien hierdurch entstanden sind. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde unterstützen diese Annahme. Aufgrund der Eigenschaft aneuploider Zellen sich schnell der Umgebung anzupassen, haben diese einen Selektionsvorteil, welcher für die Tumorzelle von großer Bedeutung ist (Siegel & Amon, 2012). Normalerweise müssten jedoch diese aneuploiden Zellen in die Alterung gehen bzw. ihre Proliferation gestoppt werden. Dies müsste z. B. über p53 oder den SAC bewirkt werden (Vitale et al., 2010). Doch Tumorzellen sind in der Lage, diese Prozesse zu umgehen. So findet man zum einen in vielen Tumoren ein inaktiviertes p53 (Fujiwara et al., 2005; Halazonetis, Gorgoulis & Bartek, 2008; Graeber et al., 1996). Zum anderen können Tumorzellen durch Inhibition der DNA-Reparatursysteme den Schutzmechanismen entgehen. So konnten die durch Hypoxie erzeugten aneuploiden Zellen in den oben beschriebenen Versuchen trotzdem weiter proliferieren. Aber nicht nur Mutationen können zu einer Adaptation führen, auch Aneuploidie selbst kann die Genexpression so verändern, dass die Zellen weiter proliferieren (Dürrbaum & Storchova, 2016).

Tumorzellen zeichnen sich durch eine genetische Instabilität aus (Tarek, Keaton & Dutta, 2013). Zur Entstehung dieser Instabilität gibt es zurzeit zwei gegensätzliche Theorien: Entweder entsteht diese durch Mutationen im DNA-Reparatursystem bzw. in den Genen für die Chromosomenverteilung oder durch Aneuploidie. Aneuploidie wird in der am meisten akzeptierten Theorie der Tumorentstehung als sekundäres Ereignis beschrieben. Dabei bringen aneuploide Zellen viele Eigenschaften mit, die charakteristisch für Tumore sind. So erklären diese die Heterogenität eines Tumors und auch dessen Resistenzentwicklung gegen verschiedene Therapeutika (Thompson & Compton, 2011). Aneuploidie könnte also eine primäre Bedeutung für die Tumorbildung haben, da besonders die Mutationstheorie nicht alle Eigenschaften von Tumorzellen und ihrer genetischen Instabilität erklären kann (Duesberg,

2007; Dürrbaum & Storchova, 2016). Folgende Eigenschaften nennen Duesberg, Fabarius & Hehlmann um genetische Instabilität in pre-Neoplasien und Neoplasien zu definieren und setzen diese in Verbindung mit der Mutations- und Aneuploidie-Theorie (Duesberg, Fabarius & Hehlmann, 2004):

1. Es gibt sowohl mutagene als auch nicht-mutagene Karzinogene, die zur genetischen Instabilität führen. Zu den mutagenen Kanzerogenen zählen z.B. ionisierende Strahlen, nicht-mutagen sind dagegen z. B. polyzyklische Kohlenwasserstoffe, Colzemid und Asbest. Diese können Tumore ohne Mutationen durch Aneuploidie erzeugen.
2. Aneuploidie ist schon früh in genomisch instabilen Zellen zu finden.
3. Der Phänotyp genetisch instabiler Zellen verändert sich viel schneller, als der von diploiden Zellen. So können Tumorzellen mit Mutationssraten von bis zu 10^{-3} zufällige Mutationen pro Mitose Medikamentenresistenzen erwerben, wenn zufällig das dafür wichtige Gen mutiert wird. Dahingegen haben haploide Zellen nur Mutationssraten von 10^{-6} bis 10^{-7} und diploide Zellen nur von 10^{-12} bis 10^{-14} , dies tritt also deutlich seltener auf, als Mutationen in Tumorzellen.
4. Immortalisierung, eine wichtige Eigenschaften von Krebszellen, wurden bisher nicht bei natürlich vorkommenden diploiden Zellen gefunden.
5. Phänotyp und chromosomal Instabilität sind proportional zum Grad der Aneuploidie, da diese durch die Aneuploidie selbst bedingt sind.
6. Genetische Instabilität und Aneuploidie sind in derselben Zelle zu finden.
7. Genmutationen sind häufig, jedoch weder klonal noch einheitlich in Tumorzellen, dies spricht gegen die Mutationstheorie.
8. Wenn die Aneuploidie in Tumorzellen fast diploid ist, so weist sie wenig genetische Instabilität auf. Mit dem 1,5-fachen Chromosomensatz zeigen die Zellen einen hohen Grad an Instabilität und mit dem 3-fachen Chromosomensatz einen sehr hohen Grad an Instabilität.
9. Der Phänotyp genetisch instabiler Zellen von Tumoren bzw. Präkanzerosen werden dominant vererbt.
10. Das Alter der Mutter beeinflusst kongenitale Aneuploidie-Syndrome wie das Down-Syndrom. So wurde bei älteren Frauen ein altersbedingter Defekt des Spindelapparats der Oozyten gefunden. Diese kongenitalen Aneuploidie-Syndrome haben gehäuft ein erhöhtes Risiko für Tumorerkrankungen, was für Aneuploidie als Auslöser für Tumorerkrankungen spricht (Ganmore, Smooha & Izraeli, 2009; Hasle, Mellemgaard, Nielsen & Hansen, 1995;

Hasle et al., 1996; Hasle, Clemmensen & Mikkelsen, 2000; Schoemaker et al., 2008; Geraedts, Mol, Briet, Hartgrink-Groeneveld & Ottolander, 1980).

11. In Tumorzellen entwickeln sich Eigenschaften ohne selektiven Vorteil. So sind viele Tumorzellen schon resistent gegen Medikamente, noch bevor die Zellen mit den Medikamenten in Kontakt getreten sind. Diese Eigenschaften könnten durch einen Zugewinn von Chromosomen entstanden sein, bei der diese Fähigkeit als Nebeneffekt erworben wurde.
12. Genetische Instabilität zu erzeugen, ist wahrscheinlicher als gezielte Genmutationen (Michor, Iwasa, Vogelstein, Lengauer & Nowak, 2005).

Alle diese Eigenschaften werden durch die Aneuploide-Therorie erklärt, jedoch nicht alle durch die Mutations-Theorie. So können lediglich die Punkte 1, 3, 6 und 9 zum Teil mit Hilfe der Mutations-Theorie erklärt werden (Duesberg, Fabarius & Hehlmann, 2004; Duesberg, 2007; Duesberg, Mandrioli, McCormack & Nicholson, 2011). Dagegen wird aber z. B. durch die Aneuploide-Theorie nicht erklärt, warum erbliche Erkrankungen mit Mutationen in bestimmten Genen das Risiko für Tumorerkrankungen deutlich erhöhen. Einige Beispiele hierfür: Bei Mutationen beider Allele des Retinoblastom-Gens kommt es zur Entstehung eines Retinoblastoms (McEvoy et al., 2014). Beim Verlust des Tumorsuppressorgens Adenomatöse-Polyposis-Coli (APC) besteht ein sehr hohes Risiko, an ein Kolonkarzinom im jungen Alter zu erkranken (Ishida et al., 2013). Auch die Inaktivierung der Tumorsupprssorgene BRCA1 und BRCA2 erhöhen das Risiko, an Mamma-Karzinom, Ovarial-Karzinom oder Prostata-Karzinom zu erkranken (Milner, Ponder, Hughes-Davies, Seltmann & Kouzarides, 1997; Yarden, Pardo-Reoyo, Sgagias, Cowan & Brody, 2002). So führt der Verlust von APC und BRCA1 zur Entwicklung von Aneuploiden Zellen, diese sind jedoch durch gezielte Mutationen entstanden. Daneben führen Defekte in DNA-Reparatursystemen ebenfalls zur Tumorentstehung. Dies ist beim hereditären nicht-polypösen Colonkarzinom (HNPCC) der Fall, bei dem meist die Gene MSH2 und MLH1 mutiert sind, wodurch es zu Defekten der Basen-Mismatch-Reparatur kommt. Diese Patienten haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken (Reeves et al., 2012).

Die bisher bekannten Eigenschaften von Tumorzellen und ihrer genetischen Instabilität lassen sich weder mit der Mutations-Theorie noch mit der Aneuploidie-Theorie alleine vollständig erklären. Jedoch würden beide Theorien zusammen die Eigenschaften von Tumorzellen erklären.

5.3 Schlussbemerkung

In Tumoren finden sich Hypoxie, Aneuploidie und Mutationen. Dabei sollen Mutationen in 4 bis 12 spezifischen Genen die somatische Kanzerogenese initiieren. Aneuploidie tritt schon früh in der somatischen Kanzerogenese auf. Welcher Schritt nun der erste ist, Aneuploidie oder Mutationen, ist bisher unbekannt. Beides tritt jedoch im Tumor auf und keine existierende Theorie kann alleine sämtliche Eigenschaften einer Tumorzelle erklären.

Auch Hypoxie ist schon in Vorstufen im Tumor zu finden. Viele Krankheiten, die mit einer Hypoxie assoziiert sind, sind Risikofaktoren für eine Tumorerkrankung, wie z. B. Diabetes mellitus (Giovannucci et al., 2010). Aber auch beim alten Menschen treten häufiger Hypoxien auf, da die Regulation der Sauerstoffkonzentrationen im Körper mit dem Alter schlechter wird (Ellsworth et al., 2009). Dafür werden unter anderem veränderte Endothelfunktionen verantwortlich gemacht (Brandes, Fleming & Busse, 2005). Dies würde erklären, warum die Wahrscheinlichkeit an einem Tumor zu erkranken mit dem Alter steigt (Weinstein & Ciszek, 2002; Breivik, 2005; Østergaard et al., 2013). Schon 1953 wurde von Goldblatt und Cameron gezeigt, dass alleine durch Hypoxie Tumore erzeugt werden können (Goldblatt & Cameron, 1953). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Hypoxie zu Aneuploidie führt. Diese können durch Mutationen – ausgelöst durch Hypoxie –, aber auch unabhängig davon entstehen. Dazu verändert Hypoxie den Stoffwechsel so, wie ihn auch die spätere Tumorzelle besitzt. Hypoxie kann die wesentlichsten Tumoreigenschaften auslösen: Tumorinvasivität und Metastasierung, gesteigerte Angiogenese, Apoptoseresistenz, anaerobe Glykolyse und Selbststeuerung der Wachstumssignale (Hanahan & Weinberg, 2000). Hypoxie könnte im menschlichen Körper über Mutationen und Aneuploidie als wichtiger initialer Schritt die Kanzerogenese initiieren.

6 Literaturverzeichnis

(21. März 2014). Abgerufen am 10. Dezember 2014 von www.paralog.com:
<http://www.paralog.com/wiki/?ChromosomeSpread>

Aguilar, M., Kamoshita, S., Landing, B., Boder, E. & Sedgwick, R. (1968). Pathological observations in ataxia-telangiectasia. A report of five cases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 27, S. 659-676.

Akram, M. (1. Juni 2013). Mini-review on Glycolysis and Cancer. *J Canc Educ.*

Alberts, B., Johnsen, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2011). Molekularbiologie der Zelle. Göttingen: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Anderson, M. W., Reynolds, S. H., You, M. & Maronpot, R. M. (1992). Role of Proto-oncogene Activation in Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 98, S. 13-24.

Angulo, M. A., Butler, M. G. & Cataletto, M. E. (2015). Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. *J Endocrinol Invest* 38, S. 1249-1263.

Aylon, Y. & Oren, M. (August 2011). p53: Guardian of Ploidy. *Mol Oncol.* 5(4), S. 315-323.

Bellone, M., Calcinotto, A., Filipazzi, P., De Milito, A., Fais, S. & Rivoltini, L. (Januar 2013). The acidity of the tumor microenvironment is a mechanism of immune escape that can be overcome by proton pump inhibitors. *OncoImmunology* 2:1, S. e22058-1 bis -3.

Bennour, A., Saad, A. & Sennana, H. (24. August 2015). Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. *Crit Rev Oncol/Hematol.*

Bickmore, W. (2001). Karyotype Analysis and Chromosome Banding. *Encyclopedia of Life Sciences*, S. 1 - 7.

Boutilier, R. G. (2001). Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *The Journal of Experimental Biology* 204, S. 3171-3181.

Brahimi-Horn, C. M., Chiche, J. & Pouysségur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 85, S. 1301-1307.

Brandes, R. P., Fleming, I. & Busse, R. (1. Februar 2005). Endothelial aging. *Cardiovascular Research* 66, S. 286-294.

Breivik, J. (2005). The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Seminars in Cancer Biology* 15, S. 51-60.

Bristow, R. G. & Hill, R. P. (2008). Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature* 8, S. 180-192.

Burn, J. (1986). Williams syndrome. *Journal of Medical Genetics* 23, S. 389-395.

Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. (Februar 2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* Vol. 11, S. 85-95.

Cimini, D., Mattiuzzo, M., Torosantucci, L. & Degrassi, F. (September 2003). Histone Hyperacetylation in Mitosis Prevents Sister Chromatid Separation and Produces Chromosome Segregation Defects. *Molecular Biology of the Cell* Vpl. 14, S. 3821 - 3833.

Corcuera-Flores, J.-R., Castellanos-Cosano, L., Torres-Lagares, D., Serrera-Figallo, M. Á., Rodríguez-Caballero, Á. & Machuca-Portillo, G. (2015). A Systematic Review of the Oral and Craniofacial Manifestations of Cri Du Chat Syndrom. *Clinical Anatomy*, S. 1-6.

CytoSelectTM. (2013). 96-Well Cell Transformation Assay. *Cat. #CBA-135*.

Davoli, T. & de Lange, T. (2011). The Cause and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer. *Annual Review of Cell an Developmental Biology*, S. 585 - 610.

Dewhirst, M. W., Cao, Y. & Moeller, B. (2008). Cycling hypoxie and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. rev. Cancer* 8, S. 425-437.

Diaz-Rodriguez, E., Sotillo, R., Scvartzman, J.-M. & Benezra, R. (2008). Hec1 overexpression hyperactivates the mitotic checkpoint and induces tumor formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, S. 16719-16724.

Duca, D. G., Craiu, D., Boer, M., Chirieac, S. M., Arghir, A., Tutulan-Cunita, A. & Budisteanu, M. (5. Dezember 2013). Diagnostic Approach of Angelman Syndrom. *Maedica* 8(4), S. 321-327.

Ducan, A. W., Newell, A. E., Smith, L., Wilson, E. M., Olson, S. B., Thayer, M. J. & Grompe, M. (Januar 2012). Frequent Aneuploidy Among Normal human Hepatozytes. *Gastroenterology 142(1)*, S. 25-28.

Ducan, A. W., Taylor, M. H., Hickey, R. D., Newell, A. E., Lenzi, M. L., Olson, S. B. & Grompe, M. (7. Oktober 2010). The ploidy conveyor of nature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature Vol. 467*, S. 707-711.

Duesberg, P. (Oktober 2007). Das Chaos in den Chromosomen. *Spektrum der Wissenschaft*, S. 54-64.

Duesberg, P., Fabarius, A. & Hehlmann, R. (Februar 2004). Aneuploidy, the Primary Cause of the Multilateral Genomic Instability of Neoplastic and Preneoplastic Cells. *Life 56(2)*, S. 65-81.

Duesberg, P., Mandrioli, D., McCormack, A. & Nicholson, J. M. (1. Juli 2011). Is carcinogenesis a form of speciation? *Cell Cycle 10:13*, S. 2100-2114.

Dürrbaum, M. & Storchova, Z. (2016). Effects of aneuploidy on gene expression: implications for cancer. *FEBS Journal 283*, S. 791-802.

Ellsworth, M. L., Ellis, C. G., Goldman, D., Stephenson, A. H., Dietrich, H. H. & Sprague, R. S. (April 2009). Erythrocytes: Oxygen Sensors and Modulators of Vascular Tone in Regions of Low PO₂. *Physiology 24*, S. 107-116.

Fagioli, F., Vijg, J. & Montagna, C. (August 2011). Chromosomal aneuploidy in the aging brain. *Mech Agenig Dev. 132(8-9)*, S. 429-436.

Fagioli, F., Wang, T., Vijg, J. & Montagna, C. (6. September 2012). Chromosome-specific accumulation of aneuploidy in the aging mouse brain. *Human Molecular Genetics Vol. 21 No. 24*, S. 5246-5253.

Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E. V., Bronson, R. T. & Pellman, D. (13. Oktober 2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature 437*, S. 1043-1047.

Gaber, T., Dziurla, R., Tripmacher, R., Burmester, G. R. & Buttigereit, F. (30. März 2005). Hypoxie inducible factor (HIF) in rheumatolog: low O₂! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis 64*, S. 971-980.

Ganem, N. J. & Pellman, D. (10. Dezember 2012). Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *The Journal of Cell Biology* Vol. 199 No. 6, S. 871-881.

Ganem, N. J., Godinho, S. A. & Pellman, D. (9. Juli 2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* Vol. 460, S. 278-283.

Ganem, N. J., Storchova, Z. & Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Current Opinion in Genetic & Development* 17, S. 157-162.

Ganmore, I., Smooha, G. & Izraeli, S. (2009). Constitutional aneuploidy and cancer predisposition. *Human Molecular Genetics* 18, S. 84-93.

Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. (November 2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* Vol. 4, S. 891-899.

Geraedts, J. P., Mol, A., Briet, E., Hartgrink-Groeneveld, C. A. & Ottolander, G. J. (1980). Klinefelter syndrom: predisposition to acute non-lymphocytic leukaemia? *Lancet* 1, S. 774.

Gilany, K. & Vafakhah, M. (2010). Hypoxia: a Review. *Journal of Paramedical Sciences* 1, S. 43-60.

Giovannucci, E., Harlan, D., Archer, M., Bergenstal, R., Gapstur, S., Habel LA & et al. (2010). Diabetes and cancer:a consensus report. *Diabetes Care* 33, S. 1674-1685.

Goldblatt, H. & Cameron, G. (1. April 1953). Induced malignancy in cells from rat myocardium subjected to intermitent anaerobiosis during long propagation in vitro. *the Journal of Experimental Medicine* 97, S. 525-551.

Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W. & Giaccia, A. J. (4. Januar 1996). Hypoxia-mediated selection of cells with dimished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, S. 88-91.

Hacihamdioglu, B., Hacihamdioglu, D. & Delil, K. (2015). 22q11 deletion syndrome: current perspective. *The Application of Clinical Genetics* 8, S. 123-132.

Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. & Bartek, J. (7. März 2008). An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* 319, S. 1352-1355.

Hanahan, D. & Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, S. 57-70.

Hansemann, D. (1890). Ueber asymmetrische Zellteilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchows Arch. Patholog. Anat.* 119, S. 299-326.

Haque, N., Rahman, M. T., Kasim, N. H. & Alabsi, A. M. (2013). Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. *The Scientific World Journal*, S. 1-12.

Hardy, P. A. & Zacharias, H. (2005). Reappraisal of the Hansemann-Boveri hypothesis on the origin of tumors. *Cell Biology International* 29, S. 983-992.

Hasle, H., Clemmensen, I. & Mikkelsen, M. (2000). Risks of leukemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* 355, S. 168-169.

Hasle, H., Mellemaaard, A., Nielsen, J. & Hansen, J. (1995). Cancer incidence in men with Klinefelter syndrome. *Br. J. Cancer* 71, S. 416-420.

Hasle, H., Olsen, J. H., Nielsen, J., Hansen, J., Friedrich, U. & Tommerup, N. (1996). Occurrence of cancer in women with Turner syndrome. *Br. J. Cancer* 73, S. 1156-1159.

Hasper, B. (1964). Ultramikroskopische Herzmuskelveränderungen nach wiederholter Hypoxie. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Hassold, T., Hall, H. & Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics* 16, S. 203-208.

Heald, R. & Khodjakov, A. (14. Dezember 2015). Thirty years of search and capture: the complex simplicity of mitotic spindle assembly. *j. Cell Biol.*, S. 1-9.

Hibi, K., Takahashi, T., Yamakawa, K., Ueda, R., Sekido, Y., Ariyoshi, Y. et al (7. März 1992). Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* (3), S. 445-449.

Hirohashi, S. & Kanai, Y. (Juli 2003). Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci Vol. 94 no. 7*, S. 575-581.

Hung, J., Kishimoto, Y., Sugio, K., Virmani, A., McIntire, D. D., Minna, J. D. & Gazdar, A. F. (15. Februar 1995). Allele-Spezifische Chromosom 3p Deletions Occur at an Early Stage in the Pathogenesis of Lung Carcinoma. *JAMA* 273:7, S. 558-563.

Ishida, H., Kumamoto, K., Amano, K., Ishibashi, K., Iwama, T., Higashi, M. & Tamaru, J. (2013). Identification of APC Gene Mutations in Jejunal Carcinomas from a Patient with Familial Adenomatous Polyposis. *Jpn J Clin Oncol* 43, S. 929-934.

Jiang, W., Wang, X. W., Unger, T., Forques, M., Kim, J. W., Hussain, S. P. et al (2010). Cooperation of tumor-derived HBx mutants and p53-249ser mutant in regulating cell proliferation, anchorage-independent growth and aneuploidy in a telomerase-immortalized normal human hepatocyte-derived cell line. *Int. J. Cancer*: 127, S. 1011–1020.

Ke, N., Albers, A., Claassen, G., Yu, D.-h., Chatterton, J., Hu, X. et al (May 2004). One-week 96-well soft agar growth assay for cancer target validation. *BioTechniques Vpö*. 36, No. 5, S. 826 - 833.

King, R. (September 2008). When 2+2=5: The Origins and Tales of Aneuploid and Tetraploid Cells. *Biochim Biophys Acta* 1786(1), S. 4-14.

Kingsbury, M. A., Friedman, B., McConnell, M. J., Rehen, S. K., Yang, A. H., Kaushal, D. & Chun, J. (26. April 2005). Aneuploid neurons are functionally active and integrated into brain circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences Vol. 102 No. 17*, S. 6143-6147.

Kondoh, M., Ohga, N., Akiyama, K., Hida, Y., Maishi, N., Towfik, A. M. et al (November 2013). Hypoxie-Induced Reactive Oxygen Species Cause Chromosomal Abnormalities in Endothelial Cells in the Tumor Microenvironment. *PLOS ONE* 8:11, S. 1-14.

Kother, L. & Sandritter, W. (1964). Über den DNS-Gehalt des carcinoma in situ. *Gynaecologia* 157/9, S. 9-19.

Krajovic, M. & Overholtzer, M. (23. März 2012). Mechanisms of Ploidy Increase in Human Cancers: A New Role for Cell Cannibalism. *American Association for Cancer Research* 72(7), S. OF 1-OF6.

Krtolica, A. & Ludlow, J. W. (1. März 1996). Hypoxia Arrests Ovarian Carcinoma Cell Cycle Progression, but Invasion is Unaffected. *Cancer Resarch* 56, S. 1168-1173.

Kumar, H. & Choi, D.-K. (2014). Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Hindawi Publishing Corporation*, S. 1-11.

Kumareswaran, R., Ludkovski, O., Meng, A., Sykes, J., Pintilie, M. & Bristow, R. G. (2011). Chronic hypoxia compromises repair of DNA double-stand breaks to drive genetic instability. *Journal of Cell Science* 125, S. 189-199.

Lindl, T. (2002). Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.

Lluis, J. M., Buricchi, F., Chiarugi, P., Morales, A. & Fernandez-Checa, J. C. (1. August 2007). Dual Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Hypoxia Signaling: Activation of Nuclear Factor κ B via c-SRC- and Oxidant-Dependent Cell Death. *Cancer Res* 67. 15, S. 7368-7377.

Luoto, K. R., Kumareswaran, R. & Bristow, R. G. (2013). Tumor hypoxia as a driving force in genetic instability. *BioMedCentral*, S. 1-15.

Lv, L., Zhang, T., Yi, Q., Huang, Y., Wang, Z., Hou, H. et al (1. August 2012). Tetraploid cells from cytokinesis failure induce aneuploidy and spontaneous transformation of mouse ovarian surface epithelial cells. *Cell Cycle Vol. 11:15*, S. 2864-2875.

Mason, N. & Ratcliffe, P. J. (2014). Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer & Metabolism* 2, S. 1-17.

McEvoy, J., Nagahawatte, P., Finkelstein, D., Richards-Yutz, J., Valentine, M., Ma, J. et al (11. Januar 2014). RB1 gene inactivation by chromothripsis in human retinoblastoma. *Oncotarget* 5, S. 438-450.

McLennan, A. H., Carty, M. J., Sheppard, B. L. & Sharp, F. (1975). An ultrastructural study of the reversibility of the effects of hypoxia on human trophoblast maintained in organ culture. *J. Reprod. Fert.* 43, S. 501-504.

Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J. & Maley, C. C. (Dezember 2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Vol. 6*, S. 924-935.

Michor, F., Iwasa, Y., Vogelstein, B., Lengauer, C. & Nowak, M. A. (2005). Can chromosomal instability initiate tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology* 15, S. 43-49.

Milner, J., Ponder, B., Hughes-Davies, L., Seltmann, M. & Kouzarides, T. (1997). Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* 386, S. 772-773.

Mohr, M., Tosun, S., Arnold, W. H., Edenhofer, F., Zänker, K. S. & Dittmar, T. (2015). Quantification of cell fusion events in human breast cancer cells and breast epithelial cells using a Cre-LoxP-based double fluorescence reporter system. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, S. 3769-3782.

Musacchio, A. & Salmon, E. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, S. 379-393.

Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. (März 2010). Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. *Nature Review* 11, S. 220-228.

Nowinski, G. P., Van Dyke, D. L., Tilley, B. C., Jacobsen, G., Babu, V. R., Worsham, M. J. et al (1990). The Frequency of Aneuploidy in Cultured Lymphocytes Is Correlated with Age and Gender but Not with Reproductive History. *Am. J. Hum. Genet.* 46, S. 1101-1111.

Østergaard, L., Tietze, A., Nielsen, T., Drasbek, K. R., Mouridsen, K., Jespersen, S. N. & Horsman, M. R. (13. Juni 2013). The relationship between tumor blood flow, angiogenesis, tumor hypoxia, and aerobic glycolysis. *Cancer Res.* S. 1-20.

Paltsyn, A. A., Manukhina, E. B., Goryacheva, A. V., Downey, H. F., Dubrovin, I. P., Komissarova, S. V. & Kubatiev, A. A. (2014). Intermittent hypoxia stimulates formation of binuclear neurons in brain cortex - A role of cell fusion in neuroprotection? *Experimental Biology and Medicine* 239, S. 595-600.

Pflugrad, U. (Oktober 2009). Identifizierung und Charakterisierung Hypoxie-abhängig regulierter Gene in Prostata-Tumorzelllinien und primären Prostata-Epithelzellen. Berlin: Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Rajendran, J. G., Mankoff, D. A., O'Sullivan, F., Peterson, L. M., Schwartz, D. L., Conrad, E. U. et al (2004). Hypoxia and Glucose Metabolism in Malignant Tumors: Evaluation by [18F]Fluoromisonidazole and [18F]Flurodeoxyglucose Positron Emission Tomography Imaging. *Clinical Cancer Research* 10, S. 2245-2252.

Reeves, S. G., Meldrum, C., Groombridge, C., Spigelman, A., Suchy, J., Kurzawski, G. et al (2012). DNA repair gene polymorphisms and risk of early onset colorectal cancer in Lynch syndrome. *Cancer Epidemiology* 36, S. 183-189.

Rehen, S. K., McConnel, M. J., Kaushal, D., Kingsbury, M. A., Yang, A. H. & Chun, J. (6. November 2001). Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammilian nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Vol. 98 No. 23, S. 13361-13366.

Rehen, S. K., Yung, Y. C., McCreight, M. P., Kaushal, D., Yang, A. H., Almeida, B. S. et al (2. März 2005). Constitutional Aneuploidy in the Normal Human Brain. *The Journal of Neuroscience* 25(9), S. 2176-2180.

Reiter, M. (2007). Chromosomale Alterationen und Mutagensensitivität in humanen Lymphozyten und Schleimhautzellen. S. 44-45. München: Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

Ricke, R. & van Deursen, J. (1. April 2013). Aneuploidy in health, disease, and aging. *The Journal of Cell Biology* Vol. 201 No. 1, S. 11-21.

Ricke, R., van Ree, J. & van Deursen, J. (2008). Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship. *Trends Genet.* 24, S. 457-466.

Sandritter, W. (1965). DNA content of tumours Cytophotometric measurements. *Eur J Cancer* 1, S. 303-307.

Scanlon, S. E. & Glazer, P. M. (2015). Multifaceted Control of DNA Repair Pathways by the Hypoxic Tumor Microenvironment. *DNA repair (Amst.)* 32, S. 180-189.

Schaffer, L. G., McGowan-Jordan, J. & Schmid, M. (Hrsg.). (2013). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel u.a.: Karger.

Schnerch, D., Hasskarl, J., Engelhardt, M. & Wäsch, R. (2006). Entstehung und Bedeutung von numerischen Chromosomenveränderungen bei bösartigen Tumorerkrankungen. *Dtsch Med Wochenschr* 131, S. 1747-1753.

Schoemaker, M., Swerdlow, A. J., Higgins, C. D., Wright, A. F. & Jacobs, P. A. (2008). Cancer incidence in women with turner syndrome in Great britain: a national cohort study. *Lancet Oncol.* 9, S. 239-246.

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 148, S. 399-408.

Semenza, G. L. (2014). Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology. *Annu. Rev. Pathol- Mech. Dis.* 9, S. 47-71.

Shi, Q. & King, R. (2005). Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437, S. 1038-1042.

Siegel, J. J. & Amon, A. (9. Juli 2012). New Insights into the Troubles of Aneuploidy. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, S. 189-214.

Simon, M. C. & Keith, B. (April 2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9.4, S. 285-296.

So, M. J., Cheville, J., M.D., Katzmamn, J. A., Ph.D., Riehle, D. L. et al (25. März 2001). Factors That Influence the Measurment of Prostate Cancer DNA Ploidy and Proliferation in Paraffin Embedded Tissue Evaluated by Flow Cytometry. *The United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. Vol. 14 No. 9*, S. 906-912.

Stoeckenius, M. (21. Januar 1966). Methodische Hinweise zur Diagnostik von Chromosomen-Anomalien. *Dtsch. med. Wschr.* 3, S. 125-126.

Stoler, D. L., Chen, N., Badik, M., Kahlenberg, M. S., Rodriguez-Bigas, M. A., Petrelli, N. J. & Anderson, G. R. (21. Dezember 1999). The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *PNAS* 96:26, S. 15121-15126.

Storchova, Z. (2012). The Causes ans Consequences of Aneuploidy in Eukaryotic Cells. In Z. Storchova, *Aneuploidy in Health and Disease* (S. 3-22). Rijeka, Croatia: InTech.

Storchova, Z. & Kuffer, C. (16. Oktober 2008). The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *Journal of Cell Science* 121, S. 3859-3866.

Tarek, A., Keaton, M. A. & Dutta, A. (18. Januar 2013). Genomic Instability in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a012914, S. 1-18.

Theile, U., Draf, U. & Heldt, J. (29. September 1978). Das Rubinstein-Taybi Syndrom. *Dtsch Med Wochenschr.* 103(39), S. 1505-1510.

Therman, E. & Susman, M. (1993). Human Chromosomes: Structure, Behavior and Effects (3 Ausg.). New York: Springer-Verlag.

Thomlinson, R. & Gray, L. (22. September 1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British Journal of Cancer* Vol. 9, No. 4, S. 539-549.

Thompson, S. L. & Compton, D. A. (2011). Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Res.* 19(3), S. 433-444.

Thompson, S. L., Bakhoun, S. F. & Compton, D. A. (23. März 2010). Mechanisms of Chromosomal Instability. *Current Biology* 20, S. 285-295.

Tomasini, R., Mak, T. W. & Melino, G. (2008). The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer. *Trends in Cell Biology* 18:5, S. 244-252.

Tsutsui, T., Maizumi, H., McLachlan, J. A. & Barrett, J. C. (August 1983). Aneuploidy Induction and Cell Transformation by Diethylstilbestrol: A Possible Chromosomal Mechanism in Carcinogenesis. *Cancer Res* 43, S. 3814-3821.

Ueyama, H., Horibe, T., Hinotsu, S., Tanaka, T., Inoue, T., Urushihara, H. et al (27. Januar 2011). Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, S. 72-82.

van Zyl, A. W., van Heerden, M. B., Langenegger, E. & van Heerden, W. F. (2012). Correlation Between Dysplasia and Ploidy Status in oral Leukoplakia. *Head and Neck Pathol* 6, S. 322-327.

Vaupel, P. (2004). Tumor Microenvironmental Physiology and Its Implications for Radiation Oncology. *Seminars in Radiation Oncology* 14, S. 198-206.

Vitale, I., Galluzzi, L., Senovilla, L., Cricollo, A., Jemaà, M., Castedo, M. & Kroemer, G. (2011). Illicit survival of cancer cells during polyplloidization and depolyplloidization. *Cell Death and Differentiation* 18, S. 1403-1413.

Vitale, I., Senovilla, L., Jemaà, M., Michaud, M., Galluzzi, L., Kepp, O. et al (2010). Multipolar mitosis of tetraploid cells: inhibition by p53 and dependency on Mos. *The EMBO Jornal* Vol. 29 No. 7, S. 1272-1284.

Wagner, P. (2008). The biology of oxygen. *EUR Respir J* 31, S. 887-890.

Warburg, O. (1910). The metabolism of Tumor. *J Physiol Chem* 56, S. 66-305.

Warburg, O. (1930). The metabolsim of Tumours. *English Edition (Dickens), Landon (Constable & Co. Ltd.)*, S. 9.

Warburg, O. (1955). Über die Entstehung der Krebszellen. *Die Naturwissenschaften* 14, S. 401-406.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, S. 309-314.

Weaver, B. A., Silk, A. D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P. & Cleveland, D. W. (Januar 2007). Aneuploidy Acts Both Oncogenically and as a Tumour Suppressor. *Cancer Cell* 11, S. 25-36.

Weaver, B. & Cleveland, D. (2006). Does aneuploidy cause cancer? *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, S. 658-667.

Webster, H. & Ames, A. (1. September 1965). Reversible and irreversible changes in the fine structure of nervous tissue during oxygen and glucose deprivation. *The Journal of cell biology* 26, S. 885-909.

Weinstein, B. S. & Ciszek, D. (29. Januar 2002). The reserve-capacity hypothesis: evolutionary origins and modern implications of the trade-off between tumor-suppression and tissue-repair. *Experimental Gerontology* 37, S. 615-627.

Weissmann, N. (2008). Hypoxia-driven mechanisms in lung biology and disease: a new review series of the ERS Lung Science Conference. *Eur Respir J* 31, S. 697-698.

Yamamoto, H., Masters, J. R., Dasgupta, P., Chandra, A., Popert, R., Freeman, A. & Ahmed, A. (Oktober 2012). CD49f Is an Efficient Marker of Monolayer- and Spheroid Colony-Forming Cells of the Benign and Malignant Human Prostate. *PLOS One* 10.7, S. 1-11.

Yamamoto, M., Wakata, A., Aoki, Y., Miyamae , Y. & Kodama, S. (April 2014). Chromosome loss caused by DNA fragmentation induced in main nuclei and micronuclei of human

lymphoblastoid cells treated with colcemid. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*, S. 10-16.

Yarden, R., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan , K. & Brody, L. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 30, S. 265-269.

Yurov, Y., Iourov, I., Vorsanova, S., Demidova, I., Kravetz, V. & et al. (2008). The schizophrenia brain exhibits low-level aneuploidy involving chromosome 1. *Schizophr. Res.* 98, S. 139-147.

7 Publikationen/Dank

7.1 Publikationen

Kerner, D., Silina, Y., Straube, C., Peuschel, H., Welter, C. & Hanselmann, R. (2018). Prolonged hypoxia and associated cellular energy depletion (ATP/GTP) leads to aneuploidy and chromosomal instability in primary human bronchial epithelial cells in the absence of reactive oxygen species – submitted.

7.2 Dank

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Cornelius Welter vom Institut für Humangenetik und meinem Betreuer Dr. med. Rainer Hanselmann danken. Sie standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und brachten mir das wissenschaftliche Arbeiten mit viel Engagement näher. Zusätzlich waren die gemeinsamen Diskussionen über eine Vielzahl von Themen eine große Bereicherung.

Frau Silvia Bernhard danke ich besonders für die Einarbeitung in die Grundlagen der Zellkultur und der Chromosomenanalyse. Zudem möchte ich mich bei Christa Issacs, Sonja Hoffmann und Sigrid Welsch bedanken. Sie haben mich tatkräftig unterstützt und zu einem kollegialen Arbeitsklima beigetragen.

Besonderen Dank gebührt der Asko Europa-Stiftung sowie dem Leibniz Institut für Neue Materialien in Saarbrücken. Durch die finanzielle Unterstützung der Asko Europa-Stiftung wurden die Experimente erst ermöglicht. Mit dem Leibniz Institut für neue Materialien gab es eine gute Zusammenarbeit bei der Auswertung verschiedener Ergebnisse.

Ich möchte ebenfalls Dr. Michael Jelden, Lisa Bohlen, Dr. Michael Klotz und Anna Kerner für die hilfreichen Anregungen, Kommentare und Korrekturen danken.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Mirco vom ganzen Herzen für die moralische Unterstützung während den Experimenten, aber vor allem während dem Schreiben danken.