

**Aus dem Institut für Physiologie  
der Universität zu Lübeck**

Direktorin: Univ. Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog

in Zusammenarbeit

**mit der Klinik für Strahlentherapie  
der Universität zu Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Dunst

**Strahlenresponsivität von Tumorzellen und Modifikation der subzellulären  
Lokalisation von zellulären Sauerstoffsensoren als kritische Parameter der  
molekularen Sauerstoffsensoren**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung der Doktorwürde

**der Universität zu Lübeck**

**-Aus der Sektion Medizin-**

vorgelegt von

**Marie Nagel**

aus Hamburg

**Lübeck 2019**

1. Berichterstatterin: Univ. Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dirk Rades

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.10.2020

Promotionskommission der Sektion Medizin



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	IV
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VII
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	XI
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	XII
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Zelluläre Sauerstoffhomöostase .....	1
1.1.1 Prinzipien der Sauerstoffhomöostase .....	1
1.1.2 Normoxie und Hypoxie in der Zelle .....	2
1.1.3 Die Hypoxie- induzierbaren Faktoren .....	3
1.1.4 Regulation und Modifikation der HIFs .....	6
1.1.5 HIF-1- abhängige Zielgene .....	9
1.2 Sauerstoffhomöostase und Tumorgenese .....	12
1.2.1 Tumorpathophysiologie .....	12
1.2.2 Einfluss von Hypoxie auf die Tumorprogression .....	13
1.2.3 Rolle der HIFs und PHDs in Tumorzellen .....	15
1.3 Strahlentherapie .....	18
1.3.1 Ziele und Anwendungsgebiete einer Bestrahlungstherapie .....	18
1.3.2 Wirkung der Strahlentherapie auf zellulärer Ebene .....	19
1.3.3 Prinzipien der Strahlenresistenz .....	20
1.3.4 Einfluss der HIFs und PHDs auf die Strahlenresponsivität von Tumoren ..	22
1.4 Die Hypoxie- induzierbaren Faktoren im Kontext des subzellulären Proteintransports .....	25
1.4.1 Bedeutung des subzellulären Proteintransports .....	25
1.4.2 Proteintransport durch die Kernmembran .....	26
1.4.3 Importin $\alpha/\beta$ - vermittelter Kernimport .....	26
1.4.4 Inhibition des Proteintransports .....	29
1.4.5 Transportmechanismen und Bedeutung der subzellulären Lokalisation der HIFs .....	32
1.5 Der HIF- Signalweg als Ziel für Therapeutika .....	34
1.5.1 Prinzipien und bisherige Identifikation von Inhibitoren und Aktivatoren des HIF- Signalweges .....	34
1.5.2 Entdeckung und Anwendung von Ivermectin und dessen Rolle als spezifischer Importin $\alpha/\beta$ - Inhibitor .....	38
1.6 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit .....	41
<b>2 Methoden</b> .....	43
2.1 Zellbiologische Methoden .....	43
2.1.1 Zellkultivierung .....	43
2.1.2 Zellzahlbestimmung .....	43
2.1.3 Herstellung von Gesamtzelllysaten .....	44
2.1.4 Herstellung von Kernextrakten .....	44
2.1.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	45
2.1.6 Behandlung mit Ivermectin .....	47
2.1.7 Zytotoxizitäts- Assay .....	47
2.1.8 Luciferase- Reportergen Assay .....	48
2.1.9 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	49
2.1.10 Bestrahlung von Zellen mit Röntgenbremsstrahlung .....	50
2.1.11 Koloniebildungstest ( <i>Clonogenic Survival Assay</i> ) .....	50

2.2	Mikrobiologische Methoden.....	52
2.2.1	Vorbereitung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen .....	52
2.2.2	Präparation von Plasmid- DNA aus <i>E. coli</i> - Zellen .....	53
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	54
2.3.1	Quantitative Real- Time- Polymerase- Kettenreaktion.....	54
2.3.2	Agarose- Gelelektrophorese von DNA.....	57
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	58
2.4.1	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	58
2.4.2	SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese .....	58
2.4.3	Western- Blot Analyse.....	59
2.5	Statistische Auswertung .....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	62
3.1	Einfluss der PHD2- Expression auf die Strahlenresponsivität .....	62
3.1.1	Erfolgreicher <i>knockdown</i> und Überexpression von PHD2 in Tumorzellen	62
3.1.2	Strahlenresponsivität unter PHD2- <i>knockdown</i> und PHD2- Überexpression .	66
3.2	Einfluss des Importin $\alpha/\beta$ 1- spezifischen Inhibitors Ivermectin auf den HIF- Signaltransduktionsweg.....	70
3.2.1	Zytotoxische Effekte von Ivermectin .....	70
3.2.2	Einfluss von Ivermectin auf die subzelluläre Lokalisation von HIF-1 $\alpha$ .....	72
3.2.3	Einfluss von Ivermectin auf die nukleäre HIF-1 $\alpha$ - Proteinexpression.....	74
3.2.4	Einfluss von Ivermectin auf die Transaktivierungsfunktion von HIF-1 .....	77
3.2.5	Einfluss von Ivermectin auf die Expression HIF-1- abhängiger Zielgene ..	80
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	83
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	84
4.1	Zusammenhang zwischen PHD2- Expression und Bestrahlungsverhalten von Tumorzellen.....	85
4.2	Gezielte subzelluläre Umverteilung von Sauerstoffsensorenproteinen als potentielle Therapiestrategie.....	92
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	101
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	103
<b>Anhang A: Materialien und Geräte</b> .....		133
	Hersteller .....	133
	Chemikalien und Reagenzien .....	134
	Antikörper .....	136
	<i>Small interfering RNAs</i> (siRNAs).....	137
	Plasmide .....	137
	Primer für qRT- PCR.....	137
	Enzyme und Größenmarker .....	138
	Zelllinien .....	138
	Bakterienstämme für Plasmidpräparation.....	138
	Puffer, Lösungen und Gele.....	139
	Kits .....	141
	Geräte .....	142
	Einwegmaterial.....	143
	Software .....	144
<b>Anhang B: Veröffentlichungen und Kongressbeiträge</b> .....		145
	Originalveröffentlichung.....	145
	Abstrakte .....	145
	Kongressbeiträge .....	145

<b>Anhang C: Danksagung .....</b>	<b>146</b>
<b>Anhang D: Lebenslauf (Kurzversion).....</b>	<b>147</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Nachfolgend sind alle in der Arbeit genannten Abkürzungen aufgeführt, ggf. mit der deutschen Übersetzung.

%	Prozent
‰	Promille
°C	Grad Celsius
4-HPR	N-(4-Hydroxyphenyl) Retinamid
AKT	Proteinkinase B
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Amp	Ampicillin
AMP/ ADP/	Adenosinmono-/ Adenosindi-/ Adenosintriphosphat
ATP	
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARD1	<i>arrest defective protein homologue 1</i>
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i> , Kofaktor von p53
bHLH	<i>basic helix- loop- helix- domain</i> , basische Helix- Schleife- Helix- Domäne
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C-TAD	<i>C- terminal transactivation domain</i> , C- terminale Transaktivierungsdomäne
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAS	<i>cellular apoptosis susceptibility gene</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	Casein Kinase
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRISPR/ Cas	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated</i> , gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen/ CRISPR-assoziiertes Protein
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1</i> , Exportin 1
CSC	<i>cancer stem cells</i> , Krebsstammzellen
Ct	<i>cycle threshold</i> , Schwellenwert- Zyklus
Cu	Kupfer
DAPI	6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylidicarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMOG	Dimethyloxalylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNA- PK	DNA- abhängige Proteinkinase
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA-1	<i>Epstein Barr nuclear antigen 1</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence substrate</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, s. auch HER-2
EGLN	<i>egl-9 family hypoxia inducible factor</i>
engl.	englisch
EPO	Erythropoietin
<i>et al.</i>	et alii/ et aliae, und andere
FDA	<i>U.S. Food &amp; Drug Administration</i> , Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten
Fe <sup>2+</sup>	zweiwertiges Eisen
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i> , HIF- inhibierender Faktor
FKS	Fötales Kälberserum
FLU	Firefly- Luciferase- Aktivität
g	Gramm
g	Gravitation/ Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GDP/ GTP	Guanosindi-/ Guanosintriphosphat
GLUT	Glukosetransporter
Gy	Gray
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HE4	<i>human epididymis protein 4</i>
HER-2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor, s. auch EGFR
HIF	<i>hypoxia- inducible factor</i> , Hypoxie- induzierbarer Faktor
HIV	Humanes- Immundefizienz- Virus
HLJDT	Huang- Lian- Jie- Du- Tang, Medikament aus der traditionellen chinesischen Medizin
HNSCC	<i>head and neck squamous- cell cancer</i> , Tumore des Kopf- und Halses
HOX	Hypoxie
HRE	<i>hypoxia responsive element</i> , Hypoxie- responsives Element
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettich- Peroxidase
IU	<i>international units</i> , internationale Einheiten
IVM	Ivermectin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kiloDalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Kontr.	Kontrolle
LB	Luria- Müller
LET	<i>linear energy transfer</i> , linearer Energietransfer
LMB	Leptomycin B, Elactocin
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen- activated protein kinase</i> , Mitogen- aktivierte Proteinkinase
MDR	<i>multidrug- resistance</i> , Multiple Medikamentenresistenz
mg	Milligramm

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mind.	mindestens
miRNA	MikroRNA
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol	Mol
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten- Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> , Ziel des Rapamycins im Säugetier
MW	Mittelwert
n	Anzahl wiederholter Versuche
N-TAD	<i>N- terminal transactivation domain</i> , N- Terminale Transaktivierungsdomäne
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid- Adenin- Dinukleotid- Phosphat
NES	<i>nuclear export signal</i> , Kernexportsignal
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells = nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> , Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	Normoxie
ns	nicht signifikant
NTF2	<i>Nuclear transport factor 2</i> , nukleärer Transportfaktor 2
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
ODDD	<i>oxygen dependent degradation domain</i> , sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne
P/ S	Penicillin/ Streptomycin
PAK1	p21- aktivierte Kinase 1
PAS	Per- ARNT- Sim
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , Phosphat- gepufferte Salzlösung
pCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDK	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1
PHD	<i>Prolyl-4-Hydroxylase- Domain enzymes</i> , Prolyl-4-Hydroxylase
PI3K	Phosphatidylinositol-3- Kinase
PKC	Proteinkinase C
pmol	Pikomol
PMRT1	Protein- Arginin- Methyltransferase 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
pVHL	Protein- von- Hippel- Lindau
qRT- PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit Polymerase- Kettenreaktion

RanGAP1	GTPase- aktivierendes Protein 1
RanGTP	<i>GTP- binding RAs-related nuclear protein</i> , GTPase Ran
Rb	Retinoblastom
RCC1	<i>regulator of chromatin condensation 1</i> , Ran- Effektor Guaninnukleotid- Austauschfaktor
Ref-1	Redox- Faktor 1
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i> , Respiratorisches Syncytial- Virus
RT	Reverse Transkription
s.	siehe
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS- Page	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Polyacrylamid- Gelelektrophorese
sec	<i>second(s)</i> , Sekunde(n)
SINE	<i>selective inhibitors of nuclear export</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SLC2A1	<i>solute carrier family 2 member 1</i> , ehemals auch bekannt als GLUT
SP	<i>specificity Protein</i>
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGF	<i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
u.v.m.	und viele mehr
U/ min.	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/ cm <sup>2</sup>	Volt pro Quadratcentimeter
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
x <sup>R</sup>	<i>Registered</i>
x <sup>TM</sup>	<i>Trademark</i>
YAP1	<i>yes-associated protein 1</i>
z.B.	zum Beispiel
μl	Mikroliter
μM	Mikromol pro Liter
μmol	Mikromol

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Struktureller Aufbau der HIF- Untereinheiten .....	5
<b>Abbildung 2:</b> Molekulare Mechanismen zur Regulation von HIF-1 $\alpha$ .....	8
<b>Abbildung 3:</b> Prinzipien HIF-1 $\alpha$ - vermittelter Strahlenresistenz.....	23
<b>Abbildung 4:</b> Importin $\alpha/\beta$ 1- vermittelter Kernimport .....	28
<b>Abbildung 5:</b> PHD2- <i>knockdown</i> in den Zelllinien HeLa und MCF7 .....	63
<b>Abbildung 6:</b> PHD2- Überexpression in den Zelllinien HeLa und MCF7.....	65
<b>Abbildung 7:</b> Klonogenes Überleben nach Bestrahlung von PHD2- defizienten Zellen...	67
<b>Abbildung 8:</b> Klonogenes Überleben nach Bestrahlung von PHD2- überexprimierenden Zellen .....	69
<b>Abbildung 9:</b> Überprüfung zytotoxischer Effekte von Ivermectin .....	71
<b>Abbildung 10:</b> Einfluss von Ivermectin auf die subzelluläre Lokalisation von HIF-1 $\alpha$ ....	74
<b>Abbildung 11:</b> Einfluss von Ivermectin auf die nukleäre HIF-1 $\alpha$ - Proteinexpression .....	75
<b>Abbildung 12:</b> Einfluss von Ivermectin auf die nukleäre HIF-1 $\alpha$ - Akkumulation.....	76
<b>Abbildung 13:</b> Verhalten der relativen Firefly- Luciferase- Aktivität unter hypoxischer Inkubation .....	78
<b>Abbildung 14:</b> Einfluss von Ivermectin auf die Transaktivierungsfunktion von HIF-1 ....	79
<b>Abbildung 15:</b> Hypoxische Induktion der Expression des HIF-1- abhängigen Zielgens <i>SLC2A1</i> .....	81
<b>Abbildung 16:</b> Einfluss von Ivermectin auf die Expression des HIF-1- abhängigen Zielgens <i>SLC2A1</i> .....	82

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Inhibitoren des Kerntransports.....	30
<b>Tabelle 2:</b> Inhibitoren und Aktivatoren des HIF- Signalweges .....	35
<b>Tabelle 3:</b> Zielmoleküle von Ivermectin in Tumorzellen .....	40
<b>Tabelle 4:</b> Transfektionsgemisch <i>GeneJuice<sup>R</sup></i> .....	46
<b>Tabelle 5:</b> Transfektionsgemisch <i>Lipofectamine2000<sup>TM</sup></i> .....	47
<b>Tabelle 6:</b> Präinkubationsansatz Reverse Transkription.....	55
<b>Tabelle 7:</b> Mastermix Reverse Transkription.....	55
<b>Tabelle 8:</b> Mastermix qRT- PCR.....	56

# 1 Einleitung

## 1.1 Zelluläre Sauerstoffhomöostase

### 1.1.1 Prinzipien der Sauerstoffhomöostase

Alle Zellen höherer Organismen sind zum Überleben auf eine kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff ( $O_2$ ) angewiesen. Komplexe Lebewesen kombinieren zu diesem Zweck zwei Transportwege miteinander: Die Konvektion, d.h. der Transport von Atemgasen ( $O_2$  und Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ )) mithilfe eines Trägermediums, und die Diffusion, d.h. der passive Transport von Molekülen entlang eines Konzentrationsgradienten. Diese Kombination findet während der Atmung statt [1]. Bei Säugetieren erfolgt per Diffusion der Gasaustausch zwischen der aus den Bronchien zuströmenden Luft und der Luft in den Lungenalveolen, zwischen selbiger und dem Blut und zwischen den Kapillaren und den Zielgewebezellen entlang des Gaspartialdruckgefälles. Mithilfe der Atemluft werden die Atemgase per Konvektion in und aus den Atemwegen und mithilfe des Blutes im Blutkreislauf transportiert [1].

Der Mensch verbraucht in Ruhe etwa 300 ml  $O_2$  pro Minute. Eine ausreichende Versorgung aller Zielgewebe erreicht der menschliche Körper durch die Pumpfunktion des Herzmuskels mit einem Herzzeitvolumen von ca. 5 Litern pro Minute [2]. Da Sauerstoff im Blut eine geringe physikalische Löslichkeit besitzt, ist für den Transport von Sauerstoff zu den Zielzellen im menschlichen Körper das Hämoglobin (Hb) als Sauerstofftransportmolekül unerlässlich [1]. Bei hohem Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), wie er im Lungenkreislauf herrscht, bindet es  $O_2$  an das in seinen vier Hämgruppen jeweils enthaltene zweiwertige Eisen ( $Fe^{2+}$ ). Dies wird als Oxygenation bezeichnet. Bei niedrigem  $pO_2$  in metabolisch aktivem Gewebe wird der Sauerstoff dann an die Zielzelle abgegeben (Desoxygenation) [1].

Die Zielzellen benötigen  $O_2$  für eine kontinuierliche Herstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP), um ihre Funktion und Struktur aufrechterhalten zu können [3]. Der Sauerstoffverbrauch und damit Energiebedarf ist dabei abhängig von der zellulären Aktivität, die unter anderem von Körpertemperatur, Hormonen und zellulären Modulatoren, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), beeinflusst wird, und kann auch innerhalb eines Organs variieren [3]. Die Gewinnung von ATP erfolgt über verschiedene

Oxidationsschritte mithilfe der Atmungskette, in der molekularer Sauerstoff als terminaler Elektronenrezeptor fungiert [4].

Bei einer Reduktion des Sauerstoffangebots, durch eine Störung der Atmung oder der Durchblutung, kommt es durch die verminderte Neubildung von ATP zu einer erheblichen Störung der Zellfunktion. Beispielsweise führt ein verringerter Ionentransport über die Zellmembran über eine Veränderung des Membranpotentials zu einer verminderten Erregbarkeit von Muskel- und Nervenzellen oder auch zu einer verminderten Resorptions- und Sekretionsleistung von Epithelzellen [3]. An der Aufrechterhaltung der zellulären Sauerstoffhomöostase sind neben Atmung, Hb- Gehalt und Durchblutung eine Reihe von Proteinen als Faktoren molekularer Signaltransduktionskaskaden beteiligt.

### 1.1.2 Normoxie und Hypoxie in der Zelle

In Meereshöhe beträgt der  $pO_2$  in der Luft ca. 160 mmHg, im arteriellen Blut physiologisch (unter anderem abhängig vom Alter) zwischen 60 mmHg und 90 mmHg und im gemischt- venösen Blut 40 mmHg. In der intrazellulären Flüssigkeit fällt der  $pO_2$  physiologisch auf weniger als 5 mmHg ab und beträgt in Endorganzellen, wie beispielsweise den renalen papillären Zellen, nur 1 mmHg bis 2 mmHg [2;5]. Der  $pCO_2$  liegt bei 0,3 mmHg in der Luft und zwischen 40 mmHg und 60 mmHg in den Körperzellen [2].

Herrschen eben genannte Sauerstoffpartialdrücke spricht man im Allgemeinen von Normoxie. Gängige Inkubatoren zur Durchführung von *in vitro* Experimenten arbeiten in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit ca. 21% Sauerstoffgehalt. Im Gewebe liegt der tatsächliche Sauerstoffpartialdruck physiologisch aber deutlich unter dem in der Atemluft. Dieser Zustand von Normoxie in Abhängigkeit des jeweiligen Gewebe- bzw. Zelltyps wird als „Physioxia“ bezeichnet [6]. Zu einer mangelhaften Sauerstoffversorgung und damit einer Gewebhypoxie ( $pO_2 < \text{normal}$ ) oder Gewebeanoxie ( $pO_2 = 0$  mmHg) kommt es bei Störungen des Gasaustausches in der Lunge oder bei Störungen des Atemgastransportes im Blut.  $O_2$ - Bedarf und  $O_2$ - Angebot stimmen dann nicht mehr überein [3]. Man unterscheidet dabei unter anderem die arterielle von der venösen Hypoxie. Bei Erstgenannter kommt es zu einer Senkung des arteriellen  $pO_2$  (Hypoxie) und des  $O_2$ - Gehaltes im Blut (Hypoxämie). Dies kann durch eine eingeschränkte Lungenatmung (alveoläre Hypoventilation, z.B. bei Infektionen der Lunge) oder eine

verlängerte alveoläre Diffusionsstrecke (z.B. im Rahmen von Lungengerüsterkrankungen wie dem Lungenemphysem) verursacht sein [3]. Bei der venösen Hypoxie erfolgt durch verstärkte Sauerstoffausschöpfung im Kapillarbett bei erhöhtem O<sub>2</sub>-Bedarf oder durch einen reduzierten Blutfluss im Rahmen von Durchblutungsstörungen (z.B. bei einer Thrombose) ein ausgeprägter pO<sub>2</sub>-Abfall im kapillären Blut. Dies führt durch eine Verminderung des Gaspartialdruckgefälles zu einer eingeschränkten Diffusion und einer reduzierten O<sub>2</sub>-Versorgung der Zellen (ischämische Gewebhypoxie) [3]. Bei einer anämischen Hypoxie ist durch eine Erniedrigung des Hb-Gehaltes des Blutes oder bei Blutverlusten der Sauerstoffgehalt vermindert [3]. Als Hypoxydose werden Störungen der Zellatmung beschrieben, die im Rahmen von einer Hypoxämie, einer Ischämie oder auch einer Hypoglykämie und bei toxischer Schädigung bestimmter Enzyme auftreten können [7].

Treten Veränderungen in der Sauerstoffversorgung von Geweben akut auf, resultiert daraus zunächst ein noch reversibler Funktionsausfall der Zelle. Ist der O<sub>2</sub>-Mangelzustand anhaltend, führt dies zu einer irreversiblen Zellschädigung und schließlich zum Zelltod.

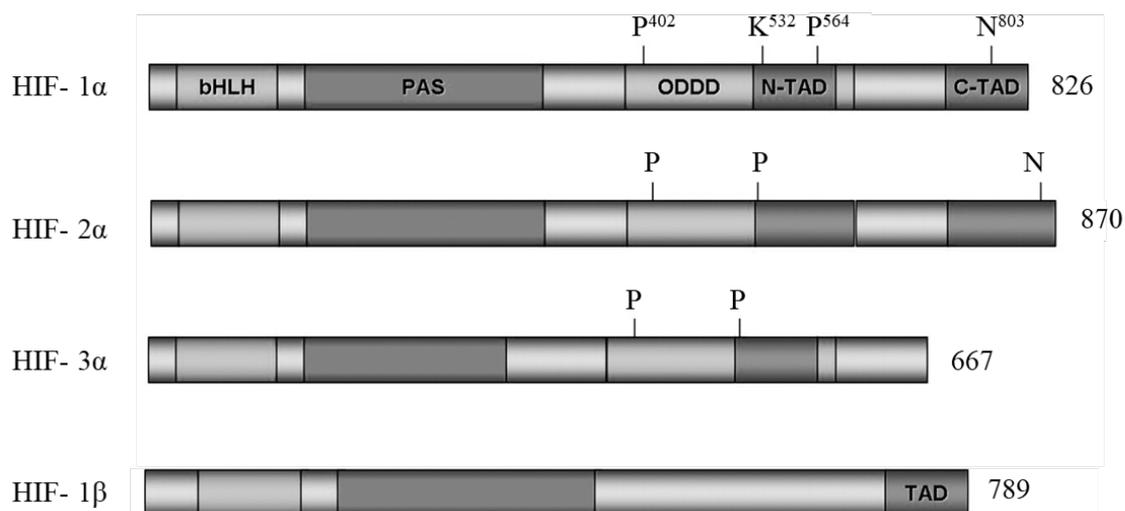
Bei chronisch- oder latent- hypoxischen Bedingungen besitzt der Organismus Anpassungsmechanismen auf zellulärer, organischer und systemischer Ebene zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase. Diese umfassen die Aktivität von verschiedenen Sauerstoffsensoren, die unter hypoxischen Bedingungen eine Gefäßerweiterung und Steigerung der Durchblutung sowie eine vermehrte Expression bestimmter Gene, beispielsweise zur Anpassung von Zellmetabolismus und –proliferation, bewirken können [3]. Auf diese Weise werden das respiratorische und kardiovaskuläre System an eine reduzierte Sauerstoffversorgung angepasst [8].

### 1.1.3 Die Hypoxie- induzierbaren Faktoren

Die Hypoxie- induzierbaren Faktoren (*hypoxia- inducible factor(s)*, HIF(s)) nehmen eine Schlüsselrolle in der sauerstoffabhängigen Genexpression ein. Sie regulieren die Transkription von Hunderten von Genen, um das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und –bedarf in allen Zellen aufrecht zu erhalten [9;10]. Die Entdeckung der HIFs gelang Semenza und Wang 1992 bei der Untersuchung der Enhancer- Region des *Erythropoetin (EPO)*- Gens unter hypoxischen Bedingungen [11]. Die Hypoxie- induzierbaren Faktoren sind heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus einer

sauerstofflabilen  $\alpha$ - Untereinheit (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , oder HIF-3 $\alpha$ ) und einer überwiegend konstitutiv exprimierten  $\beta$ - Untereinheit (auch bekannt als *aryl receptor nuclear translocator*, ARNT) bestehen. Sie gehören zur Superfamilie der basischen Helix- Loop- Helix- Per- ARNT- Sim (bHLH- PAS)- Proteine [12]. Die PAS- Domäne ist verantwortlich für die Heterodimerisierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten. Das N- terminale basische bHLH- Sequenzmotiv ermöglicht eine spezifische Bindung an sogenannte Hypoxie- responsive- Elemente (*hypoxia responsive element*, HRE) der Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA) der Zielgene [13].

HIF-1 $\alpha$  besitzt eine sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne (*oxygen dependent degradation domain*, ODDD), die über Hydroxylierung von zwei Prolin- und Acetylierung eines Lysinrestes für die Stabilität des Transkriptionsfaktors verantwortlich ist [14]. Die Prolinreste sind auch in HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  zu finden [8;15]. HIF-2 $\alpha$  ist strukturell eng verwandt mit HIF-1 $\alpha$ . Beide besitzen eine N- terminale und eine C- terminale Transaktivierungsdomäne (*N- terminal transactivation domain*, N-TAD und *C- terminal transactivation domain*, C-TAD) für Protein- Protein- Interaktionen, die über Wechselwirkung mit bestimmten Koaktivatoren, wie z.B. CBP/ p300, eine Aktivierung der Gentranskription bewirken [16]. HIF-3 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  besitzen lediglich eine Transaktivierungsdomäne [8;17]. Der strukturelle Aufbau der HIF- Untereinheiten ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Struktureller Aufbau der HIF- Untereinheiten.**

HIF- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ) und HIF-1 $\beta$  gehören der Superfamilie der bHLH- PAS- Proteine an. HIF-1 $\alpha$  enthält eine sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne (ODDD), die über Hydroxylierung von zwei Prolinresten (P) und einem Lysinrest (K) die sauerstoffabhängige Stabilität reguliert. Die Prolinreste sind auch in der HIF-2 $\alpha$ - und HIF-3 $\alpha$ - Untereinheit zu finden. HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  enthalten außerdem zwei Transaktivierungsdomänen (C-TAD und N-TAD), wohingegen HIF-3 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  nur über eine TAD verfügen. Von HIF-3 $\alpha$  existieren zahlreiche Splice- Varianten. Die Gesamt- Aminosäurenlänge jeder Untereinheit ist jeweils am Ende der Domänenstruktur aufgeführt. Modifiziert nach [8].

Sowohl HIF-1 $\alpha$  als auch HIF-2 $\alpha$  sind in einer Vielzahl von Zell- und Gewebetypen (ko-) exprimiert und scheinen komplexe, sich überlappende, aber auch antagonistische Funktionen in der Sauerstoffsensitivität zu besitzen [5]. Die Expression von HIF-3 $\alpha$  ist ebenfalls Hypoxie- induziert und HIF-3 $\alpha$  scheint im Rahmen eines negativen Feedback- Mechanismus als Zielgen von HIF-1 und HIF-2 zu fungieren [17]. Von HIF-3 $\alpha$  existieren Splice- Varianten, die vorrangig eine inhibitorische Funktion auf die Transaktivierungsfunktion von HIF-1 $\alpha$  und die Expression von HIF-1- und HIF-2- abhängigen Zielgenen besitzen [18-20].

Sowohl die Transaktivierungsfunktion von HIF-1 und HIF-2 als auch deren Proteinstabilität, Protein- Protein- Interaktionspotential und Expressionslevel unterliegen spezifischen posttranslationalen Regulationsmechanismen. Diese umfassen Hydroxylierungen, Methylierungen, Acetylierungen, S- Nitrosylierungen, SUMOylierungen und Phosphorylierungen spezifischer Aminosäurereste [21-26].

### 1.1.4 Regulation und Modifikation der HIFs

HIF-1 $\beta$  wird überwiegend konstitutiv und weitgehend unabhängig von der Sauerstoffversorgung der Zelle exprimiert [12]. Mandl *et al.* konnten allerdings jüngst einen positiven Feedback- Mechanismus identifizieren, bei dem es HIF-1 $\alpha$ - abhängig zu einer Hochregulation von HIF-1 $\beta$  unter hypoxischen Bedingungen kommt [27-29]. HIF-1 $\alpha$  wird zwar ebenfalls konstitutiv exprimiert, kann jedoch aufgrund seiner geringen Halbwertszeit von ca. 5 Minuten unter normoxischen Bedingungen nicht detektiert werden [12;30;31]. In Normoxie sorgen verschiedene Modifikationen für eine Degradierung von HIF- $\alpha$  und für eine Hemmung der transkriptionellen Funktion. Neu synthetisiertes HIF- $\alpha$  wird durch spezifische Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD) an zwei Prolinresten (P<sup>402</sup> und P<sup>564</sup>) innerhalb der ODDD hydroxyliert, wodurch HIF- $\alpha$  von dem Tumorsuppressor- Protein- von- Hippel- Lindau erkannt, polyubiquitinyliert und dann proteasomal abgebaut wird [22;32;33].

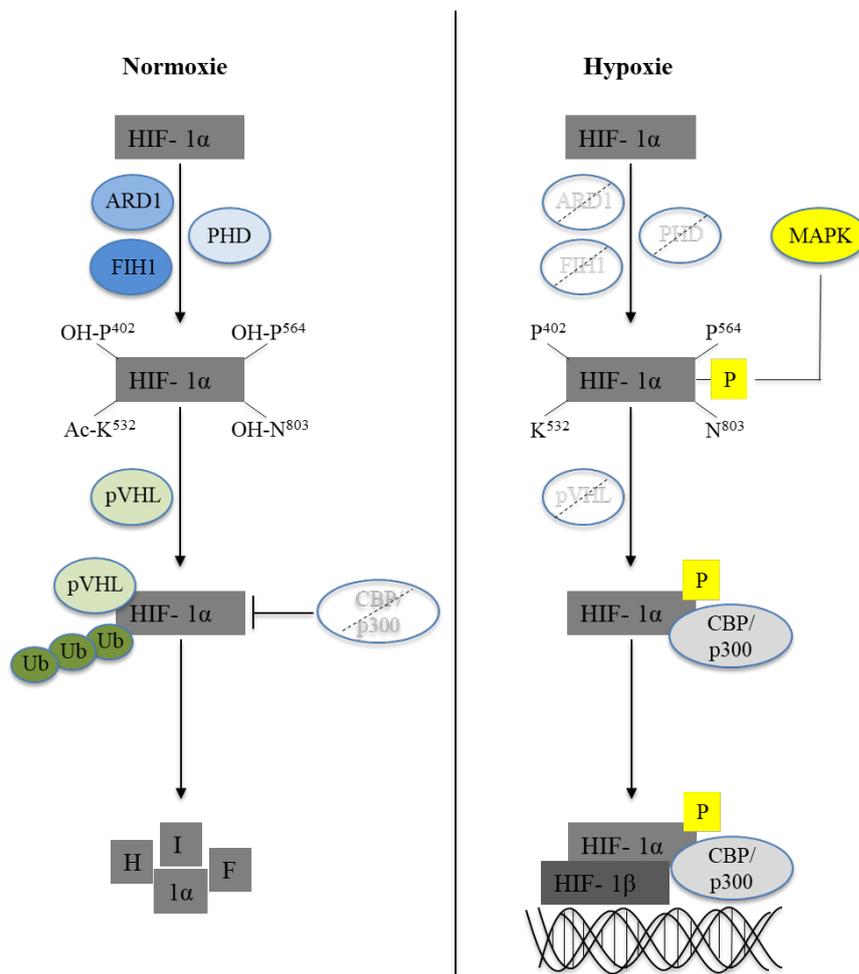
Die Isoformen PHD1, PHD2 und PHD3 haben alle drei die Fähigkeit, die Stabilität von HIF- $\alpha$  zu beeinflussen [33]. Für ihre enzymatische Aktivität benötigen die PHDs  $\alpha$ -Ketoglutarat, zweiwertiges Eisen (Fe<sup>2+</sup>) und Ascorbinsäure als Kofaktoren. Molekularer Sauerstoff wird durch die PHDs gespalten, wobei ein Sauerstoffatom auf den Prolinrest im HIF- $\alpha$ - Protein übertragen wird, das andere Sauerstoffatom reagiert mit  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinat und CO<sub>2</sub> [34]. Analoga von  $\alpha$ -Ketoglutarat können die PHD- Funktion erfolgreich inhibieren und somit die Halbwertszeit von HIF- $\alpha$  erhöhen [35;36]. Zudem wurde in verschiedenen Arbeiten herausgefunden, dass Eisenchelatoren oder bestimmte Metalle, wie z.B. Cobalt, durch Bindung oder Austausch von Fe<sup>2+</sup> die Aktivität der PHDs einschränken und HIF- $\alpha$  stabilisieren können [37]. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit von Fe<sup>2+</sup> als Kofaktor der PHDs, welches innerhalb dieser Enzyme relativ labil an zwei Histidin- und einen Asparginsäurerest gebunden ist. Ascorbinsäure ist ebenfalls essentiell für eine volle enzymatische Aktivität der PHDs, indem es Eisen in seinem zweiwertigen Zustand hält [38]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verfügbarkeit der eben genannten Kofaktoren, sogar in Anwesenheit von Sauerstoff, limitierend auf die enzymatische Aktivität der PHDs wirkt [39].

Die drei PHD- Isoformen haben eine unterschiedliche Präferenz gegenüber den HIF- $\alpha$  Untereinheiten und weisen eine differierende gewebe- und kompartimentspezifische Expression auf [40-42]. PHD2 wurde *in vitro* als Hauptregulator von HIF-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen identifiziert. Arbeiten mit PHD2- spezifischer *small*

*interfering RNA* (siRNA), welche für einen PHD2- Protein- *knockdown* sorgt, resultierten in einer erfolgreichen Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  in Normoxie. Dahingegen konnten mit PHD1- oder PHD3- spezifischer siRNA keine ähnlichen Effekte erzeugt werden [40]. Zudem zeigte sich, dass in den meisten normoxischen Zellen die Expression von PHD2 höher als die der anderen Isoformen ist [32]. PHD3 scheint dahingegen einen stärkeren Einfluss auf HIF-2 $\alpha$  als auf HIF-1 $\alpha$  zu besitzen. Das *egl-9 family hypoxia inducible factor 1 (EGLN1)*- Gen codiert für PHD2 und enthält ein HRE mit spezifischer Bindungsstelle für HIF-1 $\alpha$ . Das *EGLN3*- Gen (für PHD3) enthält wiederum ein HRE mit spezifischer Bindungsstelle für HIF-2 $\alpha$  [41]. Unter hypoxischen Bedingungen wird so die Genexpression von PHD2 und PHD3, nicht aber von PHD1, im Rahmen eines Feedback-Mechanismus durch die Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  gesteigert [41]. Lokalisierungsstudien konnten zeigen, dass PHD1 ausschließlich im Zellkern zu finden ist, wohingegen PHD2 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist, jedoch über spezifische Transportwege zwischen Nukleus und Zytoplasma hin- und herbewegt wird. PHD3 ist in beiden Kompartimenten lokalisiert [41-43]. PHD2 zeigt das höchste Expressionsniveau in Fettgewebe, Herz und Skelettmuskel, PHD3 in Herz und Plazenta und PHD1 in den Hoden [44].

Die Hydroxylierung der Prolinreste im HIF- $\alpha$ - Protein dient als Markierung für das Tumorsuppressor- Protein- von- Hippel- Lindau (pVHL), welches eine spezifische Bindung mit den Hydroxyprolinresten eingeht [45]. Durch Komplexbildung mit den Proteinen Elongin C, Elongin B, Cullin-2 und Rbx1 bildet pVHL einen funktionellen E3- Ligase- Komplex, welcher eine Polyubiquitinylierung und proteasomale Degradierung von HIF- $\alpha$  bewirkt [46-48]. Eine Acetyltransferase (*arrest defective protein 1 homologue*, ARD1) stabilisiert die Bindung von pVHL an HIF-1 $\alpha$  durch Acetylierung eines spezifischen Lysinrestes in der ODDD (K<sup>532</sup>) [23].

Neben der Regulation der Stabilität von HIF- $\alpha$  wird auch dessen transkriptionelle Funktion durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. In Normoxie, unter Anwesenheit molekularen Sauerstoffs,  $\alpha$ -Ketoglutarats, Fe<sup>2+</sup> und Ascorbinsäure hydroxyliert das Enzym *factor- inhibiting HIF-1* (FIH1) einen Asparaginrest in der C-TAD von HIF- $\alpha$  (N<sup>803</sup>). Dieser Schritt inhibiert die Interaktion von HIF- $\alpha$  mit den Koaktivatoren CBP/ p300 und somit die Aktivierung HIF- abhängiger Zielgene [49]. Eine Übersicht der molekularen Mechanismen zur Regulation von HIF-1 $\alpha$  unter Normoxie und Hypoxie ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Molekulare Mechanismen zur Regulation von HIF-1α.**

Unter normoxischen Bedingungen (links) hydroxylieren Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD) und das Enzym *factor-inhibiting HIF-1* (FIH1) zwei Prolinreste (P<sup>402</sup>, P<sup>564</sup>) bzw. einen Asparaginrest (N<sup>803</sup>) im HIF-1α-Protein. Hydroxyliertes HIF-1α bindet an einen Protein- von- Hippel- Lindau (pVHL)-E3-Ligase-Komplex. Diese Bindung wird durch Acetylierung eines Lysinrestes (K<sup>532</sup>) durch die Acetyltransferase ARD1 stabilisiert. HIF-1α wird polyubiquitinyliert und proteasomal abgebaut. Die Hydroxylierung durch FIH1 verhindert die Interaktion zwischen HIF-1α und den Koaktivatoren CBP/ p300 und damit die transkriptionelle Aktivität. In Abwesenheit von Sauerstoff (rechts) sind PHDs, FIH1 und ARD1 nicht aktiv, die Bindung an pVHL findet nicht statt. HIF-1α ist stabilisiert, transloziert in den Zellkern und heterodimerisiert mit HIF-1β, was durch Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) induzierte Phosphorylierung unterstützt wird. Zusammen mit den Koaktivatoren CBP/ p300 bindet HIF-1α an die Hypoxie-responsiven Elemente (HRE) spezifischer Zielgene und sorgt für deren Transkription. Modifiziert nach [8].

Die Genexpression von HIF-1α und HIF-2α unterliegt ebenfalls bestimmten Regulationsmechanismen. Durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren (z.B. SP1 und SP3) mit verschiedenen Enzymen kann die *messenger RNA* (mRNA)-Expression von

HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  reduziert (z.B. durch die Protein- Arginin- Methyltransferase 1, PRMT1) oder gesteigert werden (z.B. durch die Proteinkinase C, PKC) [24]. Als wichtiger Aktivierungsschritt der HIF- Proteinsynthese sei zudem die Induktion des Phosphatidylinositol-3- Kinase (PI3K)/ Proteinkinase B (AKT)/ *mammalian target of Rapamycin* (mTOR)- Signalweges durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) oder Wachstumsfaktoren genannt [50-54].

S- Nitrosylierung, SUMOylierung und Phosphorylierung von spezifischen Aminosäureresten, beispielsweise von Serinresten durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (*mitogen- activated protein kinase*, MAPK, s. Abbildung 2), haben ebenfalls einen Einfluss auf die HIF- Aktivität [55;56]. Ferner sorgen Zytokine, Wachstumshormone und äußere Umweltbedingungen für eine sauerstoffunabhängige Regulation von HIF-1 $\alpha$  [8;15].

Unter hypoxischen Bedingungen ist die enzymatische Funktion von PHDs und FIH1 inhibiert, da molekularer Sauerstoff als Substrat nicht zur Verfügung steht. Somit wird HIF-1 $\alpha$  stabilisiert, transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern und heterodimerisiert dort mit der HIF-1 $\beta$ - Untereinheit [30]. Der aktivierte Komplex bindet dann an die HRE bestimmter Zielgene und interagiert mit Koaktivatoren zur Induktion der Genexpression [8;15;29]. Aufgrund der definitiven Notwendigkeit der Anwesenheit von Sauerstoff als Substrat, werden die PHDs als entscheidende molekulare Sauerstoffsensoren angesehen [33].

### 1.1.5 HIF-1- abhängige Zielgene

Es ist eine gewebeabhängige und präzise Aktivierung bestimmter Gene notwendig, um Zellen an veränderte Sauerstoffbedingungen anzupassen. HIFs sorgen für eine Genexpression durch Bindung an die HRE in der regulierenden Region der zugehörigen Zielgene. Dabei enthält ein funktionelles HRE, neben spezifischen Bindungsstellen für die HIF- Heterodimere, auch Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren oder Koaktivatoren, wie beispielsweise Redox- Faktor 1 (Ref-1) [57]. Die HRE zeichnen sich durch eine Konsensussequenz aus, die sich aus der Basenfolge (A/C)CGTG zusammensetzt [57]. HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  haben sowohl gemeinsame als auch individuelle Zielgene, wobei die N-TAD individuelle und die C-TAD gemeinsame Genspezifitäten der beiden HIF- $\alpha$ - Untereinheiten definiert [58-60]. Bis heute sind über 1000 Gene bekannt,

die durch HIF-1 reguliert werden [61]. DNA- Microarray- Studien konnten zeigen, dass beispielsweise mehr als 2 % aller menschlichen Gene in arteriellen Endothelzellen in ihrer Expression durch HIF-1 gesteuert werden [62].

Unter hypoxischen Bedingungen wird die Expression derjenigen Gene gesteigert, die direkt oder indirekt die Transportkapazität des Blutes für Sauerstoff erhöhen. Hierbei handelt es sich um Gene, die an der Erythropoese oder am Eisenstoffwechsel beteiligt sind. Neben der erhöhten Expression von EPO sorgen HIFs unter anderem auch für eine vermehrte Bildung von Transferrin, dem Transferrinrezeptor und einer Ferroxidase [8]. HIF-1 $\alpha$  spielt dabei eine essentielle Rolle in der Erythropoese im Dottersack während der Embryogenese, wohingegen HIF-2 $\alpha$  als entscheidende Isoform in der Regulation von EPO im Erwachsenenalter gilt [63]. HIF-1 induziert ferner die Expression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF), welcher die Angiogenese fördert, indem er für die Rekrutierung von Endothelzellen in hypoxische und avaskuläre Bereiche und deren Proliferation sorgt [64;65]. Dieser Prozess ist zum Beispiel wichtig für die Wundheilung, aber auch im Kontext des vaskulären Remodelings nach einem Herz- oder Hirninfarkt [66]. Herrscht in einer Zelle Sauerstoffmangel, wird der Glukosemetabolismus vom aeroben Zitratzyklus auf die anaerobe Glykolyse umgestellt [67]. Da die anaerobe Glykolyse jedoch deutlich weniger ATP je Glukosemolekül generiert, müssen die Zellen zur Aufrechterhaltung ihrer Energieversorgung vermehrt Glukose herantransportieren und verstoffwechseln [68]. Dies wird erzielt durch eine HIF-1- vermittelte Aktivierung der Expression von Glukosetransportern und Enzymen der Glykolyse [69-72]. Auch Zellproliferation, Apoptose, Fettstoffwechsel und das Immunsystem werden durch HIF-1-abhängige Zielgenaktivierung beeinflusst [8;15;73;74]. In Experimenten mit *knockout*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass das vollständige Fehlen von HIF- $\alpha$  einen entscheidenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung hatte und zu einer gestörten Entwicklung des kardiovaskulären Systems, der Hämatopoese und zu rascher embryonaler Letalität führte [75;76].

Trotz aller protektiver Funktionen, die HIF-1 bei vermindertem Sauerstoffangebot in der Zelle erfüllt, spielt der Transkriptionsfaktor auch eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie von Krankheiten. So sind HIF-1- aktivierte Signalwege an der Entstehung und Aufrechterhaltung multipler Erkrankungsprozesse des Herz-Kreislaufsystems beteiligt. Exemplarisch seien an dieser Stelle die Bildung artherosklerotischer Plaques, eine erhöhte Katecholaminproduktion unter intermittierend-

hypoxischen Bedingungen beim Schlaf- Apnoe- Syndrom sowie die Formation choroidaler und retinaler Neovaskulisation bei der diabetischen Retinopathie genannt [61;77-81]. In zahlreichen Krebsarten konnten außerdem erhöhte HIF- Spiegel nachgewiesen werden (s. Abschnitt 1.2.3).

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen vermehrter HIF- Expression und der Pathogenese vielfältiger Erkrankungen, wird der HIF- Signalweg immer wieder als Ziel für Therapeutika diskutiert und untersucht, worauf in nachfolgenden Abschnitten genauer eingegangen wird.

## 1.2 Sauerstoffhomöostase und Tumorgenese

### 1.2.1 Tumorpathophysiologie

Nach Herz- Kreislauferkrankungen sind Krebsleiden die häufigste Todesursache sowohl weltweit als auch in Deutschland [82]. In Deutschland zählen Prostata-, Lungen- und Darmkrebs zu den häufigsten Krebsarten beim Mann, bei der Frau stehen Tumore der Brustdrüse, des Darms und der Lunge an führender Position [83]. Generell umschreibt der Begriff „Tumor“ jede Gewebsvermehrung, d.h. auch entzündlich bedingte Schwellungen, jedoch wird er in der Medizin im engeren Sinne gleichgesetzt mit dem Begriff der „Neoplasie“. Mit Neoplasie ist eine autonom proliferierende Gewebsmasse, die von den physiologischen Regulationsmechanismen des Organismus abgekoppelt ist, gemeint [7]. Diese kann sowohl benigne als auch maligne sein, wobei in den folgenden Abschnitten vornehmlich auf maligne Tumore Bezug genommen wird.

Bei der Entstehung maligner Tumore, der Karzinogenese, spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Durch eine Vielzahl von Noxen physikalischer, chemischer und biologischer Art kommt es zu genetischen Veränderungen, die der klinischen Manifestation von Tumoren Jahre vorausgehen können. Neben Umweltfeinflüssen sind auch erbliche Faktoren, Lebensalter und Ernährung in den Prozess der Karzinogenese involviert [7;84]. Auch spontane somatische Mutationen können für eine Tumorentstehung verantwortlich sein [85]. Die Entstehung von Krebs ist ein mehrstufiger Prozess. Genmutationen entstehen meist in mehreren Schritten und führen im Kontext von Umweltbedingungen und genetischen Determinanten zur malignen Transformation [86]. Onkogene sind zellteilungsfördernde Gene, die ein Tumorwachstum induzieren. Diese können durch Mutationen aus normalen, regulierenden Genen entstehen (Protoonkogene) oder durch Mutationen in Signalwegen vermehrt exprimiert sein und so zur Tumorprogression beitragen [7]. Ein Beispiel hierfür ist die gesteigerte Expression des Gens für den *human epidermal growth factor receptor 2* (HER-2) beim HER-2 positiven Brustkrebs, welcher über die Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Signalwege Proliferation und Metastasierung begünstigt [87]. Tumorsuppressorgene wirken normalerweise hemmend auf die Zellproliferation und fördern die Gewebedifferenzierung. Ein wichtiger Vertreter der Tumorsuppressorproteine ist p53, Von p53 sind zahlreiche Mutationsvarianten bekannt, die zu einer onkogenen Zelltransformation beisteuern, metabolische Anpassungen der Tumorzellen bewirken und mit einer schlechten Prognose und Therapieresistenz

assoziiert sind [88;89]. Bei Verlust oder Mutation verschiedener Apoptose- regulierender Gene kommt es ebenfalls zu einer Enthemmung des Zellwachstums [84].

Haben maligne Transformation und eine dadurch ermöglichte Tumorentstehung stattgefunden, besitzen Tumorzellen Eigenschaften, die über verschiedene Wege eine Anpassung an das Tumormilieu, wie beispielsweise eine reduzierte Sauerstoffversorgung, bewirken und damit eine Progression und auch eine Metastasierung begünstigen. Der Metabolismus von Tumorzellen weist beispielsweise deutliche Unterschiede zu dem gesunder Zellen auf. Tumorzellen generieren ihre Energie auch in Anwesenheit von Sauerstoff vornehmlich über den Stoffwechselweg der Glykolyse mit anschließender Ausscheidung von Laktat [89-91]. Dieser Effekt wird auch als aerobe Glykolyse oder Warburg- Effekt bezeichnet und dient neben der Bereitstellung von ATP der Generierung glykolytischer Intermediate, die nach der Zellteilung der Nährstoffversorgung entstandener Tochterzellen dienen [89;90]. Zudem sind Glutaminolyse, der Pentose- Phosphat- Weg und die Synthese von Fettsäuren und Cholestorol in Krebszellen gesteigert [89;90]. Eine wichtige, Stoffwechsel- aktivierende Rolle spielen dabei ROS, die durch eine vermehrte Produktion, mitochondriale Dysfunktion, unkontrollierte Wachstumsfaktor- und Zytokinfreisetzung und einen verminderten Abbau in erhöhter Konzentration in Krebszellen vorliegen [92;93]. Neben der Anpassung des zellulären Stoffwechsels sind ROS an der Zellproliferation durch Interaktion mit Rezeptor- Tyrosinkinase und MAPK, an der Metastasierung (unter anderem über Aktivierung von Metalloproteinasen), an der Angiogenese und an der Verhinderung der Apoptose beteiligt [93-95].

Diese Veränderungen tragen zum Zellüberleben und, über Anpassung an einen steigenden Nährstoffbedarf stark proliferierender Zellen, zur Tumorprogression bei.

### **1.2.2 Einfluss von Hypoxie auf die Tumorprogression**

Bereits in subklinischen Stadien sind Tumorzellen bei vermehrtem Größenwachstum einer schlechteren Nährstoffversorgung ausgesetzt. Dazu zählt auch eine mangelnde Sauerstoffversorgung. Hypoxische Zellen können über die Induktion verschiedener Signalwege die Angiogenese und Vaskulogenese anregen. Diese resultieren jedoch meist in einer insuffizienten oder chaotisch angeordneten Vaskularisation, welche dem wachsenden Sauerstoffbedarf stark proliferierender Tumorzellen nicht nachkommen kann [96;97]. Je weiter entfernt von einem versorgenden Blutgefäß desto niedriger sind die

messbaren Sauerstoffkonzentrationen. Auch eine tumorbedingte Anämie kann verantwortlich für eine verminderte Sauerstoffversorgung des Organismus allgemein und der Tumorzellen im Speziellen sein [98]. Hypoxie resultiert in normalem Gewebe in einem Arrest des Zellwachstums und einer Induktion der Apoptose, wenn die Anpassungsmechanismen nicht ausreichen oder der Sauerstoffmangel schwer oder anhaltend ist. In Tumorzellen sind diese Mechanismen durch oben genannte Mutationen ausgeschaltet und Hypoxie übt einen Selektionsdruck auf die Zellen aus, welcher in einem aggressiveren und geringer differenzierten Phänotyp resultiert. Dadurch ist Tumorphypoxie mit einer schlechteren Prognose unabhängig von den Behandlungsmodalitäten assoziiert [39;44].

In Tumorzellen kommen unterschiedliche Arten der Hypoxie vor. Insbesondere in größeren Tumorformationen herrschen chronisch- hypoxische Bedingungen, die über verschiedene Wege die genetische Instabilität und Mutagenese begünstigen. Tumore zeigen aber am häufigsten eine sogenannte zyklische Hypoxie, bei der es durch die desorganisierte Blutversorgung zu kurzen Phasen der Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung kommt [99]. Die zyklische Hypoxie hat eine stärkere Aktivierung Hypoxie- induzierter Signalwege zur Folge, unter anderem über eine erhöhte Produktion von ROS, die zum Tumorzellüberleben und zur Tumorprogression beitragen [100;101].

Neben dem HIF- Signalweg sind weitere Signalwege in die zelluläre Anpassung an hypoxische Bedingungen in Tumoren involviert. Dazu zählen der PI3K/ AKT/ mTOR-, der MAPK- und der NFκB- Signalweg, die für Zellproliferation und –überleben, Angiogenese und Vaskularisation, Metabolismus sowie Migration und Inflammation verantwortlich sind [102]. Eben diese Signalwege werden in Tumorzellen auch Hypoxie- unabhängig über verschiedene Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren aktiviert, die an Rezeptor-Tyrosinkinasen, G- Protein- gekoppelte Rezeptoren und *toll- like*- Rezeptoren binden und die Signalkaskaden in Gang setzen. Zusätzlich kommt es durch epigenetische Veränderungen und erworbene Mutationen der einzelnen Faktoren, die eine Überstimulation von Rezeptoren und Signalwegen bewirken, zu einem unkontrollierten Zellwachstum [102].

Hypoxische Tumorzellen sind resistenter sowohl gegenüber Bestrahlungs- als auch Chemotherapie. Zelluläre Anpassungsmechanismen, die diese Resistenz verursachen, umfassen unter anderem die Induktion eines Arrests des Zellzyklus, welcher die Zellen vor externem Stress schützt, sowie die Inhibierung der Apoptose und die Induktion

spezifischer Gene [102]. Die Medikamentenresistenz kann erklärt werden durch eine geringere Wirkstoffverfügbarkeit in schlecht vaskularisierten Tumorregionen oder die hypoxische Induktion von *multidrug-resistance (MDR)*- Genen, die für einen Efflux von Chemotherapeutika aus der Zelle sorgen. Zudem benötigen manche Chemotherapeutika Sauerstoff zur Wirkstoffaktivierung [103;104]. Auf die Bestrahlungsresistenz wird in den Abschnitten 1.3.3 und 1.3.4 eingegangen.

### 1.2.3 Rolle der HIFs und PHDs in Tumorzellen

In den meisten humanen Tumorzelllinien konnte ein erhöhtes Expressionsniveau von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  oder beiden nachgewiesen werden. Erklärt werden kann dies in Teilen durch die Ausbildung hypoxischer Regionen in soliden Tumoren mit zunehmendem Größenwachstum (s. Abschnitt 1.2.2). Ein Großteil solider Tumore, inklusive der Blase, des Gehirns, der Brust, des Darms, der Ovarien, des Pankreas, der Nieren und der Prostata zeigte in Zellkulturmodellen und Gewebeproben eine verstärkte nukleäre Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  [105]. HIF-2 $\alpha$  konnte zudem vermehrt in Tumor- assoziierten Makrophagen nachgewiesen werden [105]. In den meisten dieser Tumore und auch in Tumoren des Ösophagus, der Leber, der Lunge, des Magens, des Uterus, der Haut und in Kopf und Hals Tumoren sowie im Kontext akuter lymphatischer und myeloischer Leukämie waren erhöhte Spiegel von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  mit einer erhöhten Mortalität verbunden [61]. Im Gegenzug resultierte die Abwesenheit von HIF-1 $\alpha$  in Tierexperimenten in einer späteren Tumorentstehung und einem verringerten Tumor- und Metastasenwachstum [104].

Neben Sauerstoffmangel als direktem Aktivator des HIF- Signalweges (über Hemmung der PHDs, s. Abschnitt 1.1.4) spielen weitere Faktoren eine Rolle. Ein erhöhtes Vorkommen von Stickstoffmonoxid (NO) und ROS in Tumorzellen allgemein und insbesondere in zyklisch- hypoxischen Regionen sorgt für eine verstärkte Expression von HIF-1 $\alpha$  über Aktivierung des PI3K/ MAPK- Signalweges, für eine Stabilisierung des Proteins durch S-Nitrosylierung und für eine vermehrte Zielgenaktivierung durch die Funktion als Koaktivator [99;101;106]. Zudem hemmen ROS, Mitglieder der MAPK- Familie und weitere Proteine, wie z.B. das Adapterprotein CIN85 in Brustkrebszellen, die enzymatische Aktivität der PHDs [107-109]. Unabhängig von der reduzierten Sauerstoffversorgung können ferner Mutationen von Enzymen des Krebszyklus, wie der Fumarat- Hydratase

oder der Succinat- Dehydrogenase, die PHD- Funktion durch Akkumulation der  $\alpha$ -Ketoglutarat Analoga Fumarat und Succinat hemmen [110]. Eine Vielzahl genetischer Veränderungen ist bekannt, die zu einer erhöhten HIF-1 $\alpha$ - Expression führen. Beispielfhaft seien *loss- of- function* Mutationen im *pVHL*- Gen, wie sie beim von- Hippel- Lindau- Syndrom vorliegen, sowie *gain- of- function* Mutationen im *NF $\kappa$ B*- Gen und im PI3K/ AKT/ mTOR- Signalweg, welche eine wichtige pathophysiologische Rolle beim HER-2 positiven Mammakarzinom spielen, aufgeführt [111-113]. Zudem sorgen Mutationen im *p53*- Gen für eine vermehrte, aktivierende Interaktion mit HIF-1 $\alpha$  und dadurch für eine Tumorprogression in vorangeschrittenen Stadien [114].

Die Auswahl eben genannter HIF- Aktivierungsschritte und weitere führen in Tumorzellen zu einer Immortalisierung der Zellen, einem optimierten Metabolismus, einer verbesserten Blutversorgung und einer Evasion immunregulatorischer antikanzerogener Mechanismen [72;112;115-117]. Jedoch spielen HIFs nicht nur bei der Entstehung und Progression von Primärtumoren eine Rolle, sondern treiben über verschiedene Wege auch die Metastasierung voran. Über die Aktivierung HIF- spezifischer Zielgene wird die Kollagenbildung gesteigert, die Intravasation und Margination, d.h. die Einwanderung in Blutgefäße und Adhäsion an die Gefäßwände, und die Invasion ins lymphatische System begünstigt [61;118]. Aufgrund dieser Eigenschaften werden HIFs als wichtige Regulatoren der Tumorprogression und als mitverantwortlich für Therapieresistenzen und ein schlechteres Patientenüberleben angesehen [113].

Unerwarteterweise nehmen HIFs und PHDs trotz ihrer gegenseitigen Regulationsmechanismen nicht grundsätzlich eine inverse Rolle in der Tumorpathophysiologie ein. Immunohistochemische Studien in humanen Krebsgeweben konnten zeigen, dass die drei PHD- Isoformen in zahlreichen Krebsarten in unterschiedlicher Weise, auch unabhängig von Sauerstoffversorgung und HIF- Expression, überexprimiert sind. Alle drei präsentierten sich vermehrt in Tumoren der Prostata, des Pankreas und der Brust [44]. Dies kann zum Teil durch die verstärkte Anwesenheit von Wachstumsfaktoren und –rezeptoren oder die hormonabhängige PHD- Geninduktion erklärt werden [44]. Exemplarisch trägt PHD2 in Brustkrebszellen zur Tumorprogression und Metastasierung bei, indem das Enzym den hochregulierten *epidermal growth factor receptor* (EGFR) stabilisiert und die Kollagensynthese aktiviert [119;120]. PHD2 wurde zudem vermehrt in Tumoren des Kopf und Halses (*head and neck squamous- cell cancer*, HNSCC) und klarzelligen Ovarialtumoren gefunden [121;122]. In HNSCC war die

gesteigerte nukleäre Expression mit einer schlechteren Differenzierung sowie einer erhöhten Aggressivität und Therapieresistenz des Tumors assoziiert [123]. Außerdem konnte durch Jokilehto *et al.* in Kolonkarzinomzellen mit erhöhter nukleärer PHD2-Proteinkonzentration ein gesteigertes Verankerungs- unabhängiges Zellwachstum festgestellt werden, wobei dieser Effekt unabhängig von der spezifischen PHD2-Hydroxylasefunktion war [124].

PHD2 wird aber auch als Tumorsuppressorprotein diskutiert. Ein niedriges Expressionsniveau von PHD2 konnte beispielsweise in Zellen kolorektaler Karzinome im Frühstadium einem schlechteren Tumorgrading und Patientenüberleben zugeordnet werden, unabhängig vom HIF-1 $\alpha$ - Expressionsniveau [125]. Eine PHD2- Überexpression bewirkte hingegen in Tumoren des Pankreas eine Reduktion von Tumorwachstum und – invasion [126]. Im Gegensatz zu oben genannten Krebsarten konnten in Nierenzellkarzinomen, follikulären Lymphomen und bronchogenen Tumoren niedrigere Mengen von PHD1, PHD2 und PHD3 nachgewiesen und keine eindeutige Assoziation zwischen PHD- und HIF- Expression bzw. der HIF- Hydroxylase- Funktion festgestellt werden [44].

Zusammenfassend muss also hervorgehoben werden, dass die Expression der drei PHD-Isoformen eine wichtige, aber duale Rolle in der Tumorgenese spielt, stark abhängig von Zell- und Tumortyp und dabei zu Teilen unabhängig von der HIF- hydroxylierenden Funktion ist. Auf diese Aspekte wird in den Untersuchungen dieser Arbeit genauer eingegangen. Das Wissen darüber, wie Hypoxie, HIFs und Tumorwachstum zusammenhängen, eröffnet ein Forschungsfeld für die Entwicklung von Therapeutika, die auf das PHD- HIF- System wirken und das Potential haben, die Therapieresistenz gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung zu überwinden.

## 1.3 Strahlentherapie

### 1.3.1 Ziele und Anwendungsgebiete einer Bestrahlungstherapie

Neben Resektion und Chemotherapie stellt die Strahlentherapie eine der drei wesentlichen Säulen in der Krebstherapie dar [127]. Eine Bestrahlungstherapie kann sowohl in kurativer als auch palliativer Absicht angewandt werden. Zudem kann sie beispielsweise zum Downstaging eines Tumors vor Operationen (neoadjuvant), in Kombination mit radiosensibilisierenden Chemotherapeutika (Radiochemotherapie) und zur Verringerung des lokalen Rezidivrisikos nach einer Operation (adjuvant) eingesetzt werden [128]. Es gibt sogar Krebsarten, wie z.B. Prostatakrebs im lokal begrenzten Stadium mit niedrigem Risikoprofil, die durch alleinige Strahlentherapie geheilt werden können [129].

Im Gegensatz zur Chemotherapie wirkt die Strahlentherapie lokal und der Zielbereich kann genau definiert werden (Präzisionsbestrahlung). Dennoch werden neben Tumorzellen auch immer angrenzende, im Strahlengang liegende, gesunde Zellen von den ionisierenden Strahlen getroffen. Um Nebenwirkungen gering zu halten und eine Reparatur gesunder Zellen zu ermöglichen, wird die Gesamtstrahlendosis von 40 Gray bis 70 Gray (Gy) in kurativer Absicht auf Einzeldosen von 1,5 Gy bis 3 Gy aufgeteilt (Normofraktionierung). Bei schnell wachsenden Tumoren ist auch eine Hypofraktionierung, d.h. eine Aufteilung der notwendigen Bestrahlungsdosis auf wenige Fraktionen denkbar [128].

Gängige Techniken sind die Bestrahlungen von außen (perkutan) mit Linearbeschleunigern oder von innen mit umschlossenen Radionukliden (Brachytherapie). Im Rahmen der Nuklearmedizin werden ferner Bestrahlungen mit offenen Radionukliden durchgeführt [130]. Im palliativen Kontext wird die Bestrahlungstherapie eingesetzt, um gezielt Metastasen oder den Primärtumor zu bestrahlen, in der Absicht, Schmerzen und andere Symptome zu lindern [127]. Eine Behandlung mit Protonen oder anderen schweren Ionen (Ionentherapie) findet ihre Anwendung bei der Therapie von Tumoren, die nahe äußerst strahlensensibler Organe liegen, wie beispielsweise Tumore der Schädelbasis, oder bei der Therapie kindlicher Tumore. Die Ionentherapie ermöglicht eine bessere Dosisverteilung durch das spezielle Absorptionsprofil der Ionen im Gewebe [128].

Nebenwirkungen einer Strahlentherapie umfassen neben allgemeinen Symptomen, wie Schwächegefühl und Appetitlosigkeit, vornehmlich örtliche Nebenwirkungen im Bereich des Bestrahlungsfeldes. Dazu zählen Schleimhautentzündungen (Mukositiden) bei

Bestrahlung der Kopf- Hals- Region, gastrointestinale Symptome bei Bestrahlungen des Bauchraums oder Anämien, Leukozytopenien und Thrombozytopenien bei Knochenbestrahlungen. Diese Nebenwirkungen treten akut mit zeitlichem Bezug zur Bestrahlung auf. Zu einer Strahlenpneumonitis kommt es typischerweise erst mehrere Wochen nach einer Strahlentherapie. Als chronische Strahlenschäden sind unter anderem Gewebefibrosierungen (z.B. Lungenfibrose), Hautschäden, Störungen der Blutbildung sowie Fertilitäts- und Wachstumsstörungen zu nennen. Ferner ist das Risiko der Bildung von Zweitumoren erhöht [7;131]. Patienten mit einem Hodgkin- Lymphom, die im Rahmen ihrer Therapie bestrahlt wurden, haben beispielsweise ein nahezu fünffach erhöhtes Risiko, mit einer Latenz von 20 bis 40 Jahren ein Zweitkarzinom (z.B. Leukämien, Mammakarzinome, Schilddrüsenkarzinome) zu entwickeln [132].

### **1.3.2 Wirkung der Strahlentherapie auf zellulärer Ebene**

Bei der in der Strahlentherapie angewandten Strahlung handelt es sich um ionisierende Strahlung. Ionisierende Strahlung vermag es, elektrisch geladene Teilchen (Ionen) zu erzeugen und Energie im bestrahlten Gewebe abzugeben. Die Wechselwirkungen mit der bestrahlten Materie werden in der Strahlenphysik als Primärprozesse bezeichnet [133]. Im Rahmen von Sekundärprozessen kommt es durch die Radiolyse von Wasser zur Bildung von Wasserradikalen, welche dann mit biologischen Molekülen, wie z.B. der DNA, reagieren (indirekte Strahlenwirkung). Eine wichtige Rolle spielt dabei die Anwesenheit von Sauerstoff, welcher durch Reaktion mit Wasserradikalen Peroxidradikale, respektive ROS, bildet und die Strahlenwirkung um ein Mehrfaches steigert. Im Gegensatz dazu kann die ionisierende Strahlung auch ohne Zwischenschritt mit dem Zielmolekül wechselwirken, was als direkte Strahlenwirkung bezeichnet wird [133].

Strahlentherapie wirkt auf zellulärer Ebene durch Schäden an der DNA, die in einer Hemmung der Zellproliferation oder dem Zelltod resultieren [134]. Dabei haben ionisierende Strahlen sowohl auf Tumorzellen als auch auf angrenzende oder im Strahlengang liegende, normale Zellen einen schädigenden Einfluss. Dennoch verfügen gesunde Zellen physiologisch über schnellere und effektivere Reparaturmechanismen als Tumorzellen, unter anderem durch eine Redundanz zelleigener Reparaturenzyme. Somit können sie im Zeitraum zwischen den einzelnen Bestrahlungsfraktionen ihre normale Zellfunktion wiedererlangen [135]. Die biologische Wirkung ionisierender Strahlung ist

abhängig vom linearen Energietransfer (d.h. wie viel Energie ein ionisierendes Teilchen pro Längeneinheit an das bestrahlte Gewebe abgibt, LET), totaler Dosis, Fraktionierung und Strahlenempfindlichkeit des bestrahlten Gewebes [136]. Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hängt dabei maßgeblich vom Zellzyklus- Stadium ab. Zellen, die sich in der Mitose befinden, sind besonders strahlensensitiv, wohingegen in der mittleren bis späten S- Phase eine Radioresistenz festzustellen ist [96]. Durch direkte oder indirekte Strahlenwirkung kommt es in der DNA zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen, zu DNA-Vernetzungen (zwischen den Einzelsträngen oder zwischen DNA und Proteinen), Basenschäden oder mehrerer der genannten gleichzeitig (sogenannte *bulky lesions*) [96]. Bei einer Strahlendosis von 1 Gy bis 2 Gy werden in einer oxygenierten Zelle ca. 1000 Basenschäden, 1000 Einzelstrang- und 40 Doppelstrangbrüche verursacht [133]. Die vermehrte strahleninduzierte Produktion von ROS bzw. ein insuffizientes antioxidatives System in Tumorzellen sorgt außerdem für posttranslationale Modifikation zahlreicher Proteine und Enzyme, welche irreparable Zellschäden, aber auch eine vermehrte Mutagenese und Strahlenresistenz zur Folge haben können [137;138].

Können Schäden an DNA oder anderen Makromolekülen nicht repariert werden, resultiert ein irreversibler Zellzyklusarrest (Seneszenz) oder der Zelltod. Tumorzellen sterben dabei nicht unmittelbar nach der Bestrahlung. Vielmehr kommt es zunächst zu einer genomischen Instabilität und Seneszenz der Zellen, die nach Stunden, Tagen oder Wochen zum Zelltod führt, hauptsächlich durch Induktion der Apoptose oder Nekrose, durch Autophagie oder mitotische Katastrophe [139-141]. Dennoch induziert die Bestrahlung gleichzeitig eine Vielzahl von Signalwegen, die sowohl gesunde Zellen als auch Tumorzellen vor den zytotoxischen Effekten ionisierender Strahlung schützen und zu einer Strahlenresistenz von Tumorzellen führen können.

### 1.3.3 Prinzipien der Strahlenresistenz

Eine Resistenz gegenüber einer Strahlentherapie mit der Folge von Tumorresiduen und – rezidiven gehört zu den größten Problemen in Bezug auf das Langzeitüberleben von Patienten, die sich einer Bestrahlungstherapie unterziehen. Eine Strahlenresistenz kann sowohl durch eine intrinsische Resistenz einer Subpopulation klonogener Tumorzellen erklärt werden als auch in erworbenen Resistenzmechanismen unter laufender

Bestrahlungstherapie begründet sein. Dabei spielen Krebsstammzellen und auch verschiedene intrazelluläre Signalwege eine entscheidende Rolle [142].

Bei Krebsstammzellen (*cancer stem cells*, CSCs) handelt es sich um eine kleine Subpopulation von Zellen innerhalb eines Tumors, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und sich zu heterogenen Krebszellen differenzieren können [143]. Der genaue Entstehungsmechanismus von CSCs ist unklar, jedoch wird vermutet, dass sie durch onkogene Transformation aus normalen Krebszellen entstehen oder durch ionisierende Strahlung, z.B. über den PI3K/ AKT/ mTOR- und HIF-1 $\alpha$ - Signalweg, aktiviert werden [144-146]. Unter anderem durch eine vermehrte Aktivierung von Zellzyklus- Kontrollenzymen und eine optimierte Inhibierung proapoptotischer Signalwege sind CSC- Subpopulationen innerhalb eines Tumors generell resistenter gegenüber einer Bestrahlung als die übrigen Tumorzellen [142].

Ionisierende Strahlung aktiviert außerdem eine Vielzahl von Signalwegen, die das Überleben von Tumorzellen fördern [147]. Das Tumorsuppressorprotein p53 ist als Transkriptionsfaktor auf verschiedene Weise in die zelluläre Reaktion auf Bestrahlung involviert. Es reagiert auf ionisierende Strahlung und dadurch hervorgerufene Zellschäden mit der Initiierung eines Zellzyklusarrests in der G1- bzw. G2/ M- Phase des Zellzyklus, der Einleitung zellulärer Seneszenz, mit einer Aktivierung der Apoptose oder mit der Veranlassung von DNA- Reparaturmechanismen [141;148-151]. Dadurch wird zum einen der therapeutische Effekt ionisierender Strahlen umgesetzt, zum anderen aber auch ungünstigerweise die Regenerierung der Tumorzellen nach Bestrahlung ermöglicht.

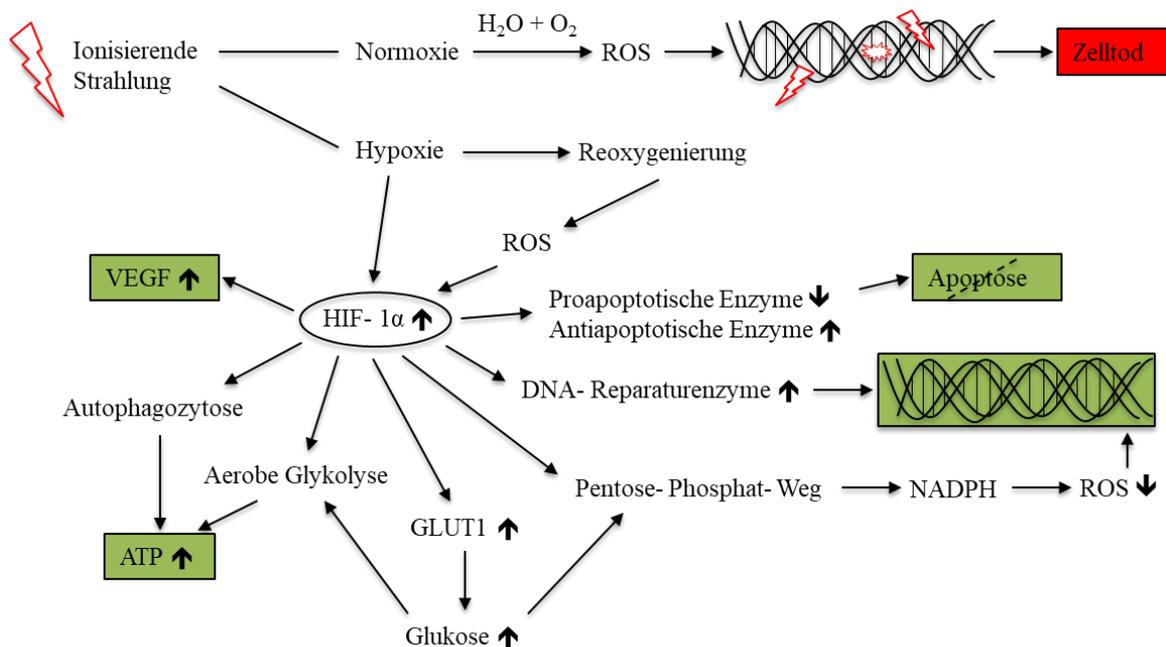
Reaktive Sauerstoffspezies nehmen ebenfalls einerseits eine zentrale Rolle in der therapeutischen Wirkung ionisierender Strahlung ein (s. Abschnitt 1.3.2). Andererseits sorgen ROS für eine Adaption der Tumorzellen an strahleninduzierten Stress und somit für die Entwicklung einer Strahlenresistenz. Typischerweise erfahren sowohl gut oxygenierte als auch hypoxische Tumorzellen kurz nach der Bestrahlung eine Phase der Reoxygenierung, welche entscheidend zur Radioresistenz beiträgt [101;152;153]. Bedingt ist die Reoxygenierung durch einen reduzierten Sauerstoffverbrauch durch den Tod strahlensensiblerer Zellen und eine verbesserte Perfusion [99;154]. ROS gelten als eine der maßgeblichen Initiatoren der aeroben Glykolyse bei erhöhtem Glukosebedarf in dieser Reoxygenierungsphase. Zum einen wird dieser Stoffwechselweg durch Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  über den PI3K/ AKT/ PKC/ Histon- Deacetylase- Signalweg induziert, zum

anderen durch direkte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. TGF- $\beta$ ), die wiederum die Synthese glykolytischer Enzyme steigern [89;155].

Ein weiteres Prinzip der Strahlenresistenz ist die Liganden- unabhängige Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch die direkte ionisierende Wirkung der Strahlung sowie durch mutierte oder posttranslational modifizierte Rezeptorproteine (z.B. EGFR) [136;147]. Diese regulieren zahlreiche nachgeschaltete Enzyme (z.B. PI3K und nachgelagerte Kinasen), die wiederum Signalwege für u.a. Zellzyklus, Metabolismus, Angiogenese und Proliferation kontrollieren und ein Überleben bestrahlter Tumorzellen ermöglichen [136;156;157].

#### **1.3.4 Einfluss der HIFs und PHDs auf die Strahlenresponsivität von Tumoren**

In den 1950er Jahren wurde erstmals beobachtet, dass Hypoxie zu einer Strahlenresistenz solider Tumore führt, [158]. Dieses Phänomen ist zum einen auf eine geringere Sauerstoff-induzierte DNA- Schädigung zurückzuführen. Zum anderen ist HIF- $\alpha$  durch die inaktiven PHDs und weitere Faktoren (s. Abschnitte 1.2.3, 1.3.3) stabilisiert und sorgt durch Genaktivierungen für eine Anpassung und ein Überleben der Tumorzellen [99;101;154;155]. Eine vermehrte Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  in soliden Tumoren ist mit einer erhöhten Resistenz gegenüber gängigen Therapien assoziiert. Die HIF- vermittelte Strahlenresistenz ist dabei auf eine HIF-1 $\alpha$  regulierte Inhibierung der Apoptose, die Einleitung autophagozytischer Schritte, eine gesteigerte Fähigkeit zur DNA- Reparatur und auf eine Anpassung des Zellmetabolismus zurückzuführen [159]. Eine Übersicht ist in Abbildung 3 dargestellt.



### Abbildung 3: Prinzipien HIF-1 $\alpha$ -vermittelter Strahlenresistenz.

Unter Anwesenheit von Sauerstoff führt ionisierende Strahlung durch Generierung von ROS zu Schäden an der DNA (Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Basenschäden). Können diese Schäden nicht repariert werden, resultiert daraus der Zelltod. Unter hypoxischen Bedingungen ist HIF-1 $\alpha$  stabilisiert, unter anderem auch durch Erhöhung von ROS in der Reoxygenierungsphase nach Bestrahlung. HIF-1 $\alpha$  vermittelt eine Inhibition der Apoptose, die Erhöhung der ATP-Produktion durch Autophagozytose und aerobe Glykolyse, eine Verbesserung und Protektion der Vaskularisation durch VEGF-Induktion und die Reparatur von DNA-Schäden. Durch diese Mechanismen umgehen hypoxische Tumorzellen den Zelltod durch Bestrahlung.

Zahlreiche Proteine und Enzyme, die in DNA-Reparaturmechanismen involviert sind, werden durch HIF-1 $\alpha$  reguliert und sorgen für eine effektive und schnelle Behebung strahleninduzierter DNA-Schäden in hypoxischen Tumorzellen. HIF-1 $\alpha$  induziert beispielsweise die Überexpression der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) und der DNA Ligase IV, welche für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen mitverantwortlich sind, sowie von Basenschäden-reparierenden Enzymen [160-162].

Weitere Mechanismen, die zur Strahlenresistenz beitragen, sind HIF-1 $\alpha$ -induzierte Veränderungen im Zellmetabolismus zur Sicherstellung der zellulären Energieversorgung. Durch Hochregulation des *solute carrier family 2 member 1*-Gens (*SLC2A1*, auch bekannt als Glukosetransporter, GLUT1) und eine vermehrte Expression glykolytischer Enzyme, wie z.B. der Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 (PDK), erfolgt eine Umstellung im Glukosemetabolismus auf die aerobe Glykolyse (Warburg-Effekt) [155;163;164]. In hoher Menge zur Verfügung stehende Glukose wird auch in den Pentose-Phosphat-Weg

eingespeist und führt auf diese Weise, über die Produktion von Reduktionsmitteln wie Nicotinamid- Adenin- Dinukleotid- Phosphat (NADPH) und Glutathion, zur Elimination von ROS und Minderung der DNA- Schäden [165]. Außerdem steigert HIF-1 $\alpha$  die Expression von Zytokinen, VEGF und anderer proangiogenetischer Faktoren, welche eine verbesserte Vaskularisation nach Bestrahlung und Protektion der in Endothelzellen bestehenden Tumorgefäße erwirken [154;166].

Durch Inhibition des intrinsischen und extrinsischen Weges der Apoptose und durch Initiierung autophagozytischer Schritte zur Generierung von ATP in metabolischen Stresssituationen bewahrt HIF-1 $\alpha$  bestrahlte Tumorzellen vor dem Zelltod [167-170].

Eben genannte Prinzipien HIF- vermittelter Strahlenresistenz werden bestätigt durch Studien, die zeigten, dass eine selektive HIF-1- Inhibition, z.B. durch PX-478 oder spezifische siRNA, in einer erhöhten Strahlensensibilität resultierte [171-173]. Eine Suppression von HIF-2 $\alpha$  führte über eine gesteigerte Apoptose ebenfalls zu einem verbesserten Ansprechen von Tumorzellen auf eine Bestrahlung [172;174]. Mandl *et al.* konnten außerdem zeigen, dass auch eine Depletion von HIF-1 $\beta$  in Tumorzellen die Strahlenresponsivität erhöht [175].

HIFs und PHDs können aber, wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, auch gleichzeitig vermehrt exprimiert sein, was für eine voneinander unabhängige Funktion bei Tumorprogression und Therapieresistenz spricht. So zeigte sich HIF-1 $\alpha$  in HNSCC vermehrt und war dort mit einer erhöhten Chemotherapie- und Bestrahlungsresistenz assoziiert [176-178]. Gleichzeitig konnten eine hohe Expression von PHD2 allgemein und insbesondere eine hohe nukleäre PHD2- Expression mit einer schlechteren Differenzierung und einer signifikant niedrigeren Strahlensensibilität von HNSCC in Verbindung gebracht werden [123;179]. Ein selektiver PHD2- *knockdown* führte dazu passend zu einer deutlichen Erhöhung der Strahlensensibilität von Kopf- Hals- Tumoren [180]. Eine hohe zytoplasmatische Konzentration von PHD1 korrelierte hingegen mit einem kürzeren Rezidiv- freien Überleben bei Patienten mit klassischem Hodgkin- Lymphom, die sich einer Radiotherapie unterzogen haben [181].

Der Zusammenhang zwischen PHD- Expression bzw. intrazellulärer Lokalisation der jeweiligen Hydroxylasen und der Strahlenresponsivität scheint dementsprechend stark vom Tumorzelltyp abhängig zu sein. Der weiteren Untersuchung der Assoziation zwischen PHD2- Expression und Strahlenresponsivität *in vitro* wird sich in dieser Arbeit gewidmet.

## **1.4 Die Hypoxie- induzierbaren Faktoren im Kontext des subzellulären Proteintransports**

### **1.4.1 Bedeutung des subzellulären Proteintransports**

In eukaryotischen Zellen existieren mit Zytoplasma und Zellkern zwei physikalisch voneinander getrennte Zellkompartimente, in denen unterschiedliche Zellfunktionen erfüllt werden. Die Translation von Proteinen findet beispielsweise an den zytoplasmatischen Ribosomen statt, jedoch erfüllen Proteine häufig ihre Funktion im Zellkern, wozu RNA-Prozessierung, Transkription, DNA- Reparatur und Replikation gehören. Um ihre Rolle in der Signaltransduktion erfüllen zu können, ist ein Proteintransport über die Kernmembran notwendig. Andere Proteine nehmen eine wichtige Rolle in der zytoplasmatischen Signaltransduktion für Zellzyklus oder Zellmetabolismus ein und sind auf einen Transport aus dem Zellkern in das zytoplasmatische Kompartiment angewiesen. Aufgrund dieser räumlichen Trennung verschiedener Signalwege und Funktionen innerhalb der Zelle haben Eukaryoten ein System gerichteter Transportmechanismen entwickelt, welches neben internen auch externen Stimuli unterliegt [182;183].

Der nukleäre Import von Proteinen spielt eine zentrale Rolle in der Zelldifferenzierung- und Entwicklung, unter anderem durch den Notch- Signalweg, die Vermittlung der zirkadianen Rhythmik und der Sauerstoffsensorik [184-186]. Das Expressionsmuster verschiedener am Import beteiligter Moleküle verändert sich während der Zelldifferenzierungsprozesse und hat einerseits einen entscheidenden physiologischen Einfluss, beispielsweise auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen, die Ausreifung von Nervenzellen und die Fertilität [187].

Andererseits sind zahlreiche Pathologien bekannt, bei denen Interaktionen mit dem subzellulären Transportapparat zur Manifestation viraler Erkrankungen, wie exemplarisch dem humanen Immundefizienz- Virus (HIV) oder dem Dengue- Virus, beitragen [188-190]. Eine Modulation des Expressionsmusters der verschiedenen Transportmoleküle und der Transport von Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise NFκB, nehmen zudem eine essentielle Rolle in immunregulatorischen Prozessen, aber auch der Pathophysiologie von allergischen Reaktionen ein [191]. Eine Störung des nukleären Transports ist ferner mit der onkogenen Transformation von Zellen, z.B. bei der akuten Leukämie, oder auch mit der Motoneuron- Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) assoziiert [192-194].

### 1.4.2 Proteintransport durch die Kernmembran

Die Kernmembran trennt Zellkern und Zytoplasma voneinander und besteht aus einer Lipid- Doppelschicht, in die tausende, aus ca. 30 verschiedenen Nukleoporinen zusammengesetzte Kernporen- Komplexe eingebettet sind [195]. Proteine mit einer Molekülmasse bis etwa 40 kDa können passiv durch die Kernporen- Komplexe diffundieren, wohingegen größere Proteine auf einen selektiven, aktiven Transport angewiesen sind. Dieser ist von spezifischen Transportsignalen in der Aminosäuresequenz der Zielproteine abhängig, die als Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) und Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) bezeichnet werden [196-198]. Über diese binden die Proteine an Transportrezeptoren, die sogenannten Karyopherine, die abhängig von der Transportrichtung entweder als Importine oder Exportine agieren [198]. Das klassische NLS ist in einem basischen Sequenzabschnitt enthalten, welches reich an Lysin- und Argininresten ist [199]. Zielproteine binden typischerweise über das klassische NLS an die Importine. Der Transport durch die Kernporenkomplexe bzw. die Dissoziation von Importinen und transportierten Frachtproteinen wird schließlich durch die GTPase Ran vermittelt. Diese stellt durch Guanosintriphosphat (GTP)- Hydrolyse und Nukleotidaustausch die für den Kernimport oder -export notwendige Energie bereit [183;187;200].

Der nukleäre Export wird klassischerweise durch Leucin- reiche Sequenzbereiche im NES von Zielproteinen herbeigeführt, welche durch Exportine erkannt werden [197]. Bisher konnten acht verschiedene Exportine identifiziert werden, von denen das *chromosome region maintenance 1 protein* (CRM1), auch bekannt als Exportin 1, die größte Anzahl von Zielproteinen transportiert [198;201;202]. CRM1 bindet verschiedene hydrophobe NES in der Aminosäuresequenz der Zielproteine und vermittelt ebenfalls RanGTP- abhängig den Transport aus dem Zellkern über die Kernporen- Komplexe ins Zytoplasma [203].

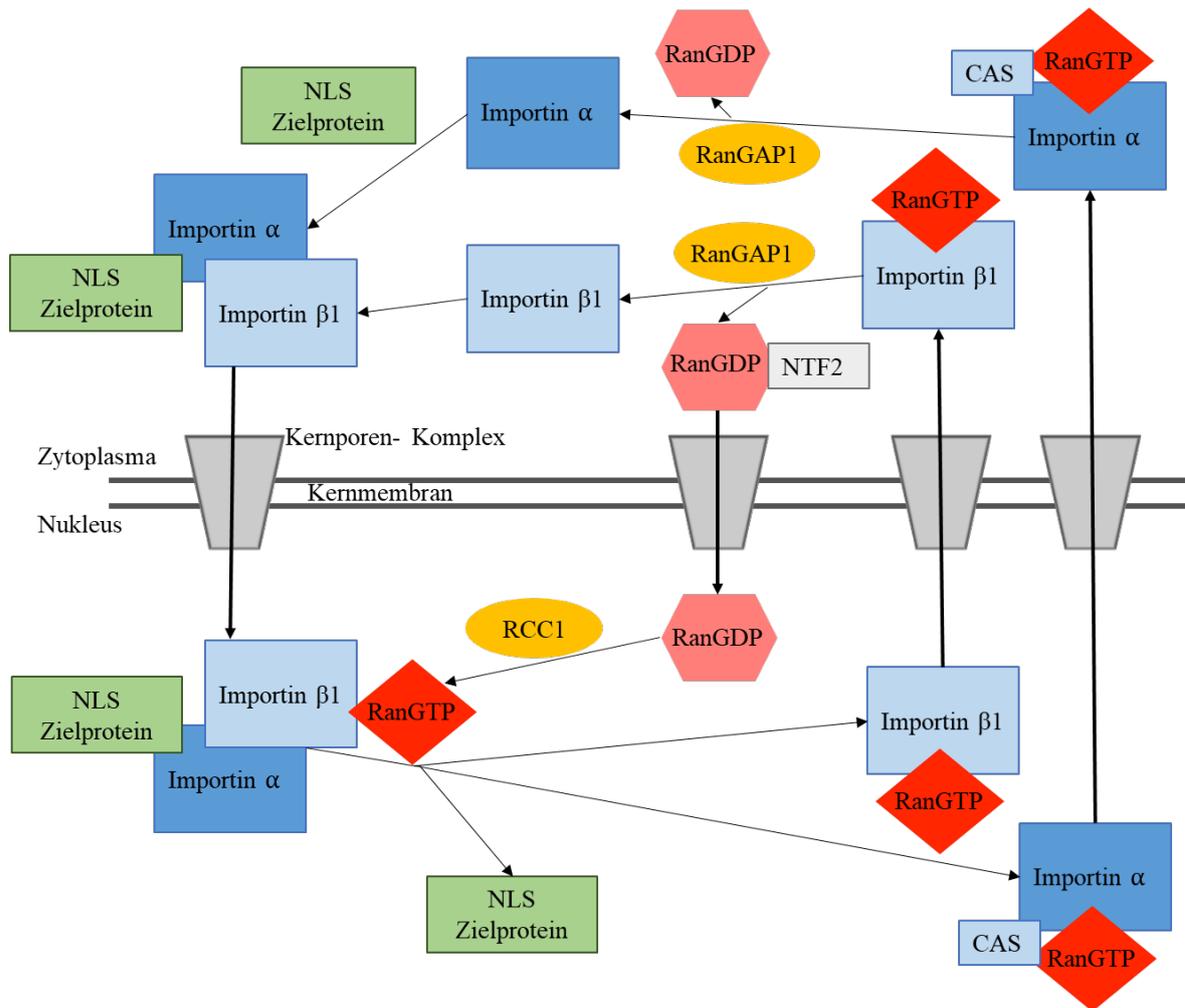
### 1.4.3 Importin $\alpha/\beta$ 1- vermittelter Kernimport

Im Rahmen des klassischen Kernimports werden Proteine durch Bindung an den heterodimeren Importin  $\alpha/\beta$ 1- Komplex durch die Kernmembran transportiert. Dabei handelt es sich bei Importin  $\alpha$  um ein Adapter- Protein, welches am nukleären Import beteiligt ist, aber für die eigentliche Interaktion mit den Nukleoporinen an Importin  $\beta$ 1

binden muss [187]. Einige Proteine benötigen für den Kernimport lediglich die Bindung an ein Mitglied der Importin  $\beta$ - Familie [204].

Bisher wurden sieben humane Importin  $\alpha$ - Isoformen identifiziert, die nach Ähnlichkeiten in ihren Sequenzen in drei Subgruppen klassifiziert werden [187]. Am C- terminalen Ende besitzt Importin  $\alpha$  eine Proteindomäne, die aus zehn hintereinander liegenden Armadillo-Motiven besteht. Diese bilden eine große und eine kleinere Bindungstasche für das NLS der Zielproteine [205]. Am N- terminalen Ende befindet sich eine Importin  $\beta$ 1-Bindungsdomäne, die im monomeren Zustand eine Autoinhibierung des NLS-Erkennungsbereiches vermittelt und erst nach Heterodimerisierung mit Importin  $\beta$ 1 die Bindung von Zielproteinen ermöglicht [206]. Die Importin  $\beta$ - Familie umfasst mindestens 20 Proteine, dazu gehören Importine, Exportine und bidirektionale Rezeptoren, welche allesamt durch Bindung an die Nukleoporene den Kerntransport verschiedenster Frachtproteine vermitteln können. Importin  $\beta$ 1 ist das einzige Mitglied dieser Familie, welches Adapter- Proteine für den Proteintransport nutzt [187;207].

Im Zytoplasma wird das NLS- besitzende Zielprotein durch Importin  $\alpha$  erkannt, Importin  $\beta$ 1 bindet an Importin  $\alpha$  und formt einen ternären Proteinkomplex, welcher dann durch Bindung von Importin  $\beta$ 1 an Phenylalanin- Glycin- reiche Motive der Nukleoporene durch die Kernmembran gelangt [195;208]. Im Zellkern bindet RanGTP an Importin  $\beta$ 1, was in einer Konformationsänderung des Proteinkomplexes und einer Dissoziation von Importin  $\alpha$ , Importin  $\beta$ 1 und transportiertem Protein resultiert. Importin  $\alpha$  und Importin  $\beta$ 1 gelangen jeweils in Verbindung mit RanGTP zurück ins Zytoplasma [187]. Zur Passage der Kernmembran benötigt Importin  $\alpha$  zusätzlich den spezifischen Transportfaktor *cellular apoptosis susceptibility gene* (CAS) [209]. Im Zytoplasma dissoziieren die Komplexe durch Konversion von RanGTP zu RanGDP (Guanosindiphosphat) durch die hydrolytische Funktion des zytoplasmatischen GTPase- aktivierenden Proteins (RanGAP1) [210]. Danach stehen die Importine für den weiteren Proteintransport wieder zur Verfügung. RanGDP wird durch den spezifischen Import- Rezeptor *nuclear transport factor 2* (NTF2) in den Zellkern transportiert, wo der Ran- Effektor Guaninnukleotid- Austauschfaktor *regulator of chromatin condensation 1* (RCC1) durch Nukleotidaustausch den Übergang von RanGDP zu RanGTP herbeiführt [211;212]. Abbildung 4 stellt eine Übersicht des Importin  $\alpha/\beta$ 1- vermittelter Kernimports dar.



**Abbildung 4: Importin α/β1- vermittelter Kernimport.**

Im Zytosol bindet das NLS- enthaltende Zielprotein an Importin  $\alpha$ , daraufhin bindet Importin  $\beta$ 1 an Importin  $\alpha$  und der Komplex passiert über die Kernporen- Komplexe die Kernmembran. Im Nucleus dissoziiert die Verbindung durch Bindung von RanGTP an Importin  $\beta$ 1. CAS dient als spezifischer Transportfaktor für Importin  $\alpha$  und Importin  $\alpha$  und Importin  $\beta$ 1 gelangen in Verbindung mit RanGTP zurück ins Zytosol. Dort dissoziieren die Komplexe durch Konversion von RanGTP zu RanGDP, katalysiert durch RanGAP1, und stehen für einen erneuten Transport wieder zur Verfügung. RanGDP gelangt in Verbindung mit dem spezifischen Import- Rezeptor NTF2 in den Zellkern, wo RCC1- vermittelt RanGDP wieder zu RanGTP umgewandelt wird. Modifiziert nach [187].

Die zellulären Transportmechanismen unterliegen zahlreichen Regulationsprinzipien. Der nukleäre Import wird beispielsweise durch Phosphorylierungen von Komponenten des Transportsystems beeinflusst [213]. Einerseits kann durch Phosphorylierung von Aminosäureresten der Nucleoporine in den Kernmembran- Komplexen der nukleäre Import physiologisch inhibiert werden [214]. Andererseits nutzt z.B. das Epstein- Barr- Virus die Phosphorylierung eines Serinrestes im NLS seines, für die Virusreplikation

essentiellen, nukleären Antigens 1 (*Epstein Barr nuclear antigen 1*, EBNA-1), um durch Erhöhung der Bindungsaffinität zwischen NLS und Importin  $\alpha$  den Kernimport zu verstärken [215]. Palmitoylierung von Importin  $\alpha$  führt zu einer Positionierung des Karyopherins an der Zellmembran und zu einer Bindung von NLS-enthaltenden Zielproteinen, welche während der Embryogenese intrazelluläre Strukturen an sich verändernde Zellgrößen anpassen [216]. Ferner kann unter anderem oxidativer Stress den Export bestimmter Transkriptionsfaktoren durch Bildung von Disulfidbrücken im NES verhindern, was in einer Akkumulation der Transkriptionsfaktoren im Zellkern und einer vermehrten Expression überlebenswichtiger Gene resultiert [217]. Auch eine Maskierung/Demaskierung des NLS oder NES durch andere Proteine kann den Transport regulieren [218].

Neben ihrer nukleären Importfunktion scheinen Importin  $\alpha$  und Importin  $\beta$  zahlreiche weitere Funktionen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern einzunehmen. Dazu zählen exemplarisch die Retention von Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma als Form der negativen Regulation des Proteinimports, die Kontrolle der Formation des Spindelapparats während der Mitose oder der retrograde axonale Proteintransport während der neuronalen Regeneration [219-221].

#### 1.4.4 Inhibition des Proteintransports

Wie in Abschnitt 1.4.1 erläutert, ist die subzelluläre Transportmaschinerie in zahlreiche pathophysiologische Prozesse involviert. Daher haben die Modifikation des intrazellulären Transports und die gezielte subzelluläre Umverteilung von Proteinen das Potential zur Medikamentenentwicklung und der Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen.

Bisher war die Entwicklung von Inhibitoren des nukleären Exports erfolgreicher als die Entwicklung von Suppressoren des Kernimports [222]. Eine Auswahl bisher identifizierter Inhibitoren des Kerntransports ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Inhibitoren des Kerntransports.**

Auswahl bisher identifizierter Inhibitoren des Kerntransports, aufgeteilt nach Inhibitoren des Exports bzw. Imports mit Aufzählung von Zielmolekül, Substanz und Referenz. Modifiziert nach [222].

Inhibierter Transportweg	Zielmolekül	Substanz	Referenz
Kernexport	CRM1	Leptomycin B (LMB, Elactocin)	[223-225]
		Ratjadone	[226]
		Anguinomycin C + D	[227]
		<i>Selective inhibitors of nuclear export</i> (SINE)- z.B. Verdinexor, Selinexor	[228-232]
		Importin $\beta$ / RanGTP	Importazole
Kernimport	Importin $\beta$ Importin $\alpha/\beta 1$	2-Aminothiazol Derivat 1	[234;235]
		Mifepristone, Ivermectin	[236;237]
		N-(4-Hydroxyphenyl) Retinamid (4-HPR)	[238]
		GW5074	[239]
		Importin $\gamma$ , Importin $\delta$	EPE- Peptid, PERY- Peptid

Als erster erfolgreicher Inhibitor des Kernexports wurde Leptomycin B (LMB, Elactocin) identifiziert, welcher als spezifischer Inhibitor von CRM1 agiert [223]. CRM1 ist als Exportin am Transport zahlreicher Proteine beteiligt, dazu zählen beispielsweise Tumorsuppressorproteine oder die mRNA zu translatierender Proteine, aber auch der Export von Medikamenten, wie Chemotherapeutika oder antiviralen Wirkstoffen [198;201;202]. Eine erhöhte CRM1- Expression gilt darüber hinaus als Indikator für eine schlechte Prognose von z.B. Magen- und Eierstockkrebs [242;243]. LMB bindet kovalent an einen Cysteinrest in der zentralen Bindungsregion von CRM1 und hemmt dadurch irreversibel die Interaktion mit dem NES des Zielproteins [225;244]. Deutliche Nebenwirkungen führten zu einem Abbruch klinischer Studien in Phase I, LMB dient aber dennoch weiterhin als nützliche Substanz zur Untersuchung zellulärer Exportmechanismen [245].

Viele weitere Inhibitoren des CRM1- vermittelten nukleären Exports konnten in den letzten Jahren identifiziert werden. Dazu zählen unter anderem als LMB- Derivate Ratjadone und Anguinomycin C und D, welche Zellwachstum und -proliferation supprimieren und für einen Zellzyklusarrest oder Apoptose sorgen [226;227]. Auch hier ist das therapeutische Potential jedoch durch die toxischen Nebenwirkungen begrenzt [246].

Eine weitere Gruppe CRM1- inhibierender Moleküle umfasst die *selective inhibitors of nuclear export* (SINE). Diese besitzen eine suffiziente orale Bioverfügbarkeit, gelten als hochselektiv und führen eine nukleäre Akkumulation von Tumorsuppressoren und Zellzyklusinhibitoren sowie von Medikamenten herbei. Sie wurden zunächst als Krebsmedikamente getestet, der Substanz Verdinexor konnten aber auch breite antivirale Eigenschaften nachgewiesen werden, z.B. im Einsatz gegen Influenza- und RS- Viren oder opportunistische Viruserkrankungen [222;247;248]. Selinexor zeigte ein hohes Therapieansprechen bei Patienten mit refraktärem Non- Hodgkin Lymphom und multiplen Myelom [228;230]. Das Medikament wurde 2019 in einem beschleunigten Verfahren durch die *U.S. Food & Drug Administration* (FDA) in Kombination mit Dexamethason zur Behandlung des rezidivierend- refraktären Multiplen Myeloms zugelassen [232]. Einige der SINE- Mitglieder werden weiterhin in klinischen Studien in Phase I/ II/ III getestet. Insbesondere als Kombinationstherapie mit gängigen Chemotherapeutika und Cortison (unter anderem zur Reduktion von Nebenwirkungen) besitzen SINE ein hohes Potential zur Bekämpfung von Krebsleiden und weiteren Erkrankungen [222].

Inhibitoren des nukleären Imports wurden bisher noch nicht in klinischen Studien getestet, finden aber einen breiten Einsatz in der Grundlagenforschung, um Prinzipien des Kernimports zu ergründen. Hintersteiner und Ambrus *et al.* konnten 2010 kleinmolekulare Inhibitoren des Importin  $\alpha/\beta$ - vermittelten Kernimports *in vitro* charakterisieren [249]. Der nukleäre Import- Inhibitor 2-Aminothiazol Derivat 1 interagiert beispielsweise mit Importin  $\beta$  und führt zu einem Zellzyklusarrest in der G2/ M- Phase. In Krebszellen kam es dadurch zu einer Hemmung der Proliferation, während gesunde Zellen durch die Inhibition nicht betroffen zu sein schienen [234;235].

Mifepristone und Ivermectin wurden als spezifische Breitspektrum-inhibitoren des Importin  $\alpha/\beta$ - vermittelten Kernimports mit hochpotenten antiviralen Eigenschaften identifiziert. Dabei haben sie keinen Einfluss auf andere Transportwege [236;237]. Auf weitere Erkenntnisse über Ivermectin wird in Abschnitt 1.5.2 genauer eingegangen. N-(4-Hydroxyphenyl) Retinamid (4-HPR) hemmt auf gleiche Weise den Kernimport von Virusbestandteilen des Zika- und Dengue- Virus und konnte somit die Vervielfältigung des viralen Genmaterials und die Ausbreitung einer Infektion verhindern [238]. Spezifisch entwickelten Peptiden konnte zudem jüngst eine erfolgreiche Proliferationshemmung verschiedener Krebszellen nachgewiesen werden, welche auf einer Inhibition der nukleären Translokation bestimmter Mitogen- aktivierter Proteinkinasen beruht [241].

### 1.4.5 Transportmechanismen und Bedeutung der subzellulären

#### Lokalisation der HIFs

Die Funktion der HIFs als Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren erfordert den intrazellulären Transport beider HIF- Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) sowie der HIF- $\alpha$ -spezifischen Hydroxylasen. HIF- $\alpha$  akkumuliert unter hypoxischen Bedingungen im Zellkern und wird in normoxischen oder reoxygenierten Zellen zurück ins Zytoplasma transportiert oder bereits nukleär abgebaut [250]. Der nukleäre Export von HIF-1 $\alpha$  wird durch CRM1 vermittelt. Eine MAPK- induzierte Phosphorylierung von zwei Serinresten in der Nähe eines atypischen NES kann den Export verhindern und resultiert in einer nukleären Anreicherung und Genaktivierung von HIF-1 $\alpha$  [56;251]. Der Kernimport von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  wird vornehmlich durch den Importin  $\alpha/\beta$ 1- Transportweg und ein C- terminal gelegenes klassisches NLS reguliert, welches für eine Interaktion mit Importin  $\alpha$  sorgt [186;252]. HIF-2 $\alpha$  wird zudem unabhängig von Importin  $\alpha$  durch direkte Bindung an Importin  $\beta$  transportiert [186]. In den Transport von HIF-1 $\alpha$  sind weitere Mitglieder der Transportrezeptorfamilie involviert, wozu Importin 4 und 7 gehören, die über Interaktion mit der N- terminalen bHLH- PAS- Domäne den Kernimport vermitteln [253]. Ferner konnte durch Carbonaro *et al.* und Lee *et al.* gezeigt werden, dass HIF-1 $\alpha$  an polymerisierte Mikrotubuli und das Motoradapterprotein BICD1 binden und mithilfe des Dynein- Motorproteins in den Zellkern gelangen kann. Dieser Mechanismus spielt zum einen in der Tumorangio-genese, zum anderen aber auch in der Regeneration von mesenchymalen Stammzellen und Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen eine wichtige Rolle [254-256].

Die hypoxisch- induzierte nukleäre Akkumulation von HIF- $\alpha$  und der Kernexport in Normoxie sind neben spezifischen Transportrezeptoren abhängig von der Aktivität der PHDs. Die PHDs unterliegen dabei ebenfalls den intrazellulären Transportmechanismen, was eine wichtige Rolle in der zellulären Sauerstoffsensitivität spielt. PHD1 ist fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert und eine Interaktion zwischen PHD1 und HIF-1 $\alpha$  findet einzig in diesem Kompartiment statt [42;257;258]. Der nukleäre Import von PHD1 geschieht Importin  $\alpha/\beta$ 1- vermittelt über Assoziation eines klassischen NLS mit der kleineren Bindungstasche von Importin  $\alpha$  [42;259]. PHD3 konnte im Zellkern und im Zytoplasma nachgewiesen werden und wird ebenfalls über den klassischen Importin  $\alpha/\beta$ 1- vermittelten Weg transportiert [257]. PHD2 konnte gleichermaßen sowohl im Zytoplasma

als auch im Zellkern detektiert werden [257;260]. Die Hydroxylierung und proteasomale Degradierung von HIF-1 $\alpha$  in Anwesenheit von Sauerstoff findet sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern statt. Die PHD2- Aktivität scheint jedoch im Nukleus regulatorisch bedeutender zu sein [261;262]. Wird PHD2 in Form von Deletionsmutanten im Zellkern gehalten, kommt es zu einer Reduktion der transkriptionellen Aktivität von HIF-1, des HIF-1 $\alpha$ - Proteinspiegels sowie der Expression HIF-1- induzierter Zielgene [262]. Dabei ist der Kernimport nicht Importin  $\alpha/\beta$ 1- vermittelt, ein klassisches NLS ist in der PHD2- Sequenz nicht enthalten [259;262]. Pientka *et al.* konnten ein atypisches NLS identifizieren, die Charakterisierung des genauen Mechanismus für den nukleären Import von PHD2 ist jedoch noch ausstehend [262]. Der Kernexport wird CRM1- abhängig, ohne Vorliegen eines klassischen NES, jedoch über eine spezifische N- terminale Aminosäuresequenz im PHD2- Molekül kontrolliert [42;262].

Eben genannte Erkenntnisse beweisen, dass die subzelluläre Lokalisation der HIF- Untereinheiten sowie der HIF- regulierenden Proteine entscheidend für die zelluläre Sauerstoffsensitivität und Hypoxie- induzierte HIF- abhängige Geninduktion sind. Da die PHD2- katalysierte sauerstoffabhängige Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  vorrangig im Zellkern stattfindet, ist ein dynamischer, subzellulärer Transport beider Proteine essentiell [262]. Das Tumorsuppressor- Protein- von- Hippel- Lindau bewegt sich konstitutiv und sauerstoffunabhängig zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her. Nach nukleärer Hydroxylierung von HIF- $\alpha$  sorgt es für dessen zytoplasmatische bzw. nukleäre proteasomale Degradation [250].

Neben in Abschnitt 1.1.4 beschriebenen Regulationsmechanismen existiert mit den subzellulären Transportmechanismen der HIFs sowie der HIF- modulierenden Proteine folglich ein weiteres Prinzip der Kontrolle des HIF- Signalweges. Das Potential, diese Transportmechanismen auch als Angriffsziel für die Entwicklung von Medikamenten zur Therapie von Krebserkrankungen und anderen Pathologien zu nutzen, soll in dieser Arbeit ergründet werden.

## **1.5 Der HIF- Signalweg als Ziel für Therapeutika**

### **1.5.1 Prinzipien und bisherige Identifikation von Inhibitoren und Aktivatoren des HIF- Signalweges**

Wie in den vorigen Abschnitten aufgeführt, haben sowohl Modifikation als auch intrazelluläre Lokalisation der HIFs einen entscheidenden Einfluss auf die physiologische Zelladaptation an eine reduzierte Sauerstoffversorgung. Sie spielen zudem eine zentrale Rolle in der Tumorgenese und Manifestation anderer Erkrankungen sowie der Resistenz gegenüber gängigen Therapien. Daher bietet der HIF- Signalweg ein vielversprechendes Angriffsziel für Therapeutika.

Dabei stehen zwei Prinzipien im Mittelpunkt: Zum einen kann durch eine Verstärkung des HIF- Signalweges das Outcome ischämischer oder hypoxischer Erkrankungen verbessert werden. Zum anderen kann eine Inhibierung desselbigen unter anderem die Therapie von Krebserkrankungen unterstützen, da diese das HIF- System für Wachstum und Ausbreitung nutzen [5]. Die Therapiemöglichkeiten und Nebenwirkungen sind aufgrund der vielfältigen HIF- Funktionen komplex. Bisher zielen die meisten fortgeschrittenen klinischen Ansätze auf eine Suppression der HIF- Aktivität durch Inhibierung der Proteinsynthese oder der transkriptionellen Aktivität bzw. auf eine Aktivierung von HIF- $\alpha$  durch Inhibierung der PHDs ab [5;263]. Weitere Substanzen wirken z.B. auf Ebene des intrazellulären Transports [264]. Eine Übersicht exemplarischer Inhibitoren und Aktivatoren des HIF- Signalweges ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Inhibitoren und Aktivatoren des HIF- Signalweges.**

Exemplarische Auswahl von Inhibitoren und Aktivatoren des HIF- Signalweges mit jeweiligem Wirkprinzip, Substanznamen, Zielmolekül und Referenz. Modifiziert und erweitert nach [263;265].

<b>Prinzip der HIF-Modulation</b>	<b>Substanzname</b>	<b>Zielmolekül</b>	<b>Referenz</b>
<b>Hemmung der mRNA-Prozessierung/ Translation/ Protein-Expression und – Stabilität</b>	Wortmannin	PI3K	[266]
	LY94002	PI3K	[266;267]
	Temsirolimus, Everolimus, Sirolimus	mTOR	[268;269]
	Glyceolline	PI3K/ AKT/ mTOR	[270]
	Rezeptor- Tyrosinkinase-Inhibitoren (Gefitinib)	EGFR	[271]
	Digoxin, Herzglykoside	unbekannt	[272-274]
	Topotecan, Irinotecan	Topoisomerase-I	[275;276]
	PX-478	unbekannt	[277;278]
<b>Inhibierung des intrazellulären Transports</b>	Ivermectin	Importin $\alpha/\beta$ 1	[264]
<b>Inhibierung der HIF-1<math>\alpha</math>/ HIF-1<math>\beta</math>- Dimerisation</b>	Acriflavin, PT2385	PAS- Domäne der $\alpha$ - Untereinheiten	[279-281]
<b>Inhibierung der DNA Bindung</b>	Echinomycin	HRE	[282]
	Anthrazykline	HRE	[283]
<b>Inhibition der transkriptionellen Aktivität</b>	Chetomin	p300	[284]
	Bortezomib	C-TAD von HIF-1 $\alpha$	[285]
<b>Regulation der Funktion von HIF- Zielgenen</b>	Antikörper (Bevacizumab)	VEGF	[286;287]
	Rezeptor- Tyrosinkinase-Inhibitoren (Cediranib, Sorafenib)	VEGF- aktivierte Rezeptor- Tyrosinkinasen	[288;289]
<b>Aktivierung der HIF-<math>\alpha</math>-Hydroxylierung durch PHD2</b>	Metallorganische Ruthenium- Verbindung, BBAPH-1	PHD2	[290;291]
<b>PHD- Inhibition</b>	Intermediate des Krebszyklus	$\alpha$ -Ketoglutarat-Bindungsstelle	[110]
	$\alpha$ -Ketoglutarat- Analoga (z.B. DMOG)	$\alpha$ -Ketoglutarat-Bindungsstelle	[35;36]
	Eisenchelatoren (Daprodustat, Roxadustat, Vadadustat, Molidustat)	Fe <sup>2+</sup>	[292]
	<b>HIF-<math>\alpha</math>- Stabilisierung</b>	HLJDT	PI3K/ AKT
	MG-132, Epoxomicin	Proteasom	[294]

Substanzen, welche eine vermehrte HIF- Proteinsynthese in Tumorzellen hemmend beeinflussen, wirken z.B. als mTOR- Inhibitoren oder als Inhibitoren vorgeschalteter Kinasen, wie PI3K/ AKT oder MAPK, sowie von Rezeptor- Tyrosinkinasen (z.B. EGFR) [266]. Die mTOR- Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus sind exemplarisch in der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen [295]. Als weiteres Beispiel kann der Topoisomerase-I- Inhibitor Irinotecan aufgeführt werden, welcher HIF-1 $\alpha$  durch Modifikation mRNA- regulierender MikroRNA (miRNA) inhibiert und in der randomisierten GLARIUS Studie in Kombination mit dem VEGF- Antikörper Bevacizumab zu einem längeren progressionsfreien Überleben von Patienten mit Glioblastoma multiforme führte [296].

Andere Substanzen wirken über Inhibierung des intrazellulären Transports, der Dimerisation der HIF- Untereinheiten, der DNA- Bindung und der transkriptionellen Aktivität [264;279-285]. Exemplarisch sei die Gruppe der Anthrazykline (z.B. Doxorubicin, Danurubicin) genannt, für welche bereits viele Therapieindikationen bestehen, beispielsweise in der medikamentösen Behandlung des Mammakarzinoms [297;298]. Durch Interkalation mit der DNA und Erzeugung von Strangbrüchen, welche die Assoziation zwischen HIFs und HRE unterbinden, hemmen die Chemotherapeutika die HIF- abhängige Zielgenexpression [283]. Jüngst konnte durch Vidimar *et al.* über eine direkte Aktivierung von PHD2 durch eine metallorganische Ruthenium- Verbindung eine HIF-1 $\alpha$ - Inhibition erreicht und Angiogenese und Wachstum von Xenograft- Modellen humaner Kolontumore reduziert werden [290].

Weitere therapeutische Möglichkeiten bestehen in der Modulation des Effektes von HIF- induzierten Proteinen, wie beispielsweise in einer Hemmung der VEGF- Wirkung durch spezifische VEGF- Antikörper (z.B. Bevacizumab) oder durch Inhibierung VEGF- aktivierter Rezeptor- Tyrosinkinasen (z.B. Cediranib, Sorafenib). Diese Substanzen erfahren bereits ein breites Anwendungsspektrum in der Onkologie [286-289;299].

Durch Hemmung der enzymatischen Aktivität der PHDs kann HIF- $\alpha$  auch unter normoxischen Bedingungen stabilisiert werden. Da das HIF- induzierte *EPO*- Gen streng durch hypoxische Stimuli reguliert ist, dienten die PHDs zu allererst als Angriffsziel in der Behandlung von Anämien, insbesondere renaler Anämien mit insuffizienter EPO Produktion [5]. Dabei vermögen es PHD- Inhibitoren, den endogenen EPO- Spiegel erfolgreich zu erhöhen. Ferner kurbeln sie durch andere Effekte, wie beispielsweise durch

eine verbesserte Eisenresorption, effektiv die Erythropoese an, ohne durch eine Steigerung der EPO- Menge über das physiologische Maß hinaus toxische Effekte hervorzurufen [265;300]. Außerdem lassen viele Studien vermuten, dass eine Inhibition der PHDs das Outcome ischämischer, vaskulärer sowie inflammatorischer Erkrankungen (z.B. Myokardinfarkt, zerebraler ischämischer Insult, ischämische Hautulzerationen, Kolitis, alkoholische Fettlebererkrankung) verbessern kann [36;301-304]. PHD-Inhibitoren zeigten zudem bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen zusätzliche Vorteile, wie eine Senkung des Cholesterinspiegels, und in Tiermodellen eine Reduktion des arteriellen Blutdrucks [305;306].

Viele PHD- Inhibitoren wirken über eine Hemmung der Interaktion mit den für die enzymatische Funktion essentiellen Kofaktoren, wie z.B.  $\alpha$ -Ketoglutarat- Analoga oder Eisenchelatoren. In Tabelle 2 aufgeführte Verbindungen wurden zum größten Teil bisher aufgrund der unspezifischen Wirkungen nicht in klinischen Studien getestet, dienen aber als Grundlage für die Erforschung des Wirkmechanismus der PHDs bzw. des HIF-Signalweges [307].

Die Substanzen Daprodustat (GSK-1278863), Roxadustat (FG-4592), Vadadustat (AKB-6548) und Molidustat (BAY 85-3934) befinden sich hingegen aktuell in der klinischen Testung in Phase III Studien bei Patienten mit chronischem Nierenversagen mit und ohne Dialysetherapie. Alle vier Substanzen führten zu einer effektiven Erhaltung des Hb-Spiegels ohne hypertensive Effekte, welche rekombinantes EPO hervorrufen kann. Dabei scheinen sie eine relative Spezifität für die HIF- $\alpha$ - hydroxylierende Funktion der PHDs zu besitzen [292;308-311]. Sie wirken ebenfalls durch Chelatbildung mit dem Eisenatom im aktiven Zentrum der Enzyme, was zu elektrostatischen Interaktionen mit der  $\alpha$ -Ketoglutarat- Bindungsstelle und einer kompetitiven Hemmung der Kofaktor-Rekrutierung führt [292]. Roxadustat ist seit Mitte 2019 in China zur Behandlung renaler Anämien bei Patienten, die sich einer Dialysetherapie unterziehen, zugelassen [312].

HIF- $\alpha$ - Stabilisatoren agieren über eine Aktivierung des PI3K/ AKT- Signalweges oder Hemmung des proteasomalen Abbaus und präsentierten sich in präklinischen Versuchsreihen als vielversprechend in der Verbesserung des Outcomes zerebraler Ischämien [294].

Eine dauerhafte Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  ist jedoch mit der Entwicklung von Kardiomyopathien sowie Polycythämien mit entsprechenden Komplikationen assoziiert [313;314]. Das Auftreten von weiteren Nebenwirkungen durch Aktivierung des

HIF- Signalweges, insbesondere bei der Langzeitanwendung, wie beispielsweise protumorgenetische Effekte, Erhöhung der Glukosewerte oder eine Lebertoxizität, muss in Betracht gezogen werden und wird ebenfalls in klinischen Studien getestet [265].

### 1.5.2 Entdeckung und Anwendung von Ivermectin und dessen Rolle als spezifischer Importin $\alpha/\beta 1$ - Inhibitor

Ivermectin ist ein FDA- zugelassenes Medikament, welches seit den 1980er Jahren als Breitspektrum- Antiparasitikum zur Behandlung von internen und externen Infektionen mit Nematoden und Arthropoden bei Menschen und Tieren eingesetzt wird. Aufgrund immer größer werdender Anwendungsmöglichkeiten wird Ivermectin inzwischen von ca. 250 Millionen Menschen jährlich eingenommen [315]. Ivermectin gehört zur Gruppe der Avermectine, bei denen es sich um makrozyklische Laktone handelt, und wurde erstmals 1981 als Antiparasitikum in der Landwirtschaft, bei der Zucht von Wassertieren und in der Veterinärmedizin eingesetzt. 1987 wurde es zur Behandlung von Onchozerkose, auch bekannt als Flussblindheit, beim Menschen zugelassen [316]. Ivermectin bindet an Glutamat- und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)- aktivierte Chloridkanäle und führt durch den ausgelösten Chloridionen- Einstrom zur Hyperpolarisation der Zellen. Dies resultiert in einer Blockade der Erregungsüberleitung zwischen Nerven- und Muskelzellen, führt zu einer Paralyse und letztlich zum Tod der Parasiten. Dabei sind Menschen durch die Blut-Gehirnschranke vor der neurotoxischen Wirkung geschützt. Zusätzlich scheint Ivermectin systemeigene Sekretionssysteme der Parasiten zu hemmen und somit eine Detektion der parasitären Antigene durch das Immunsystem des Wirtes zu ermöglichen [316;317]. Das Medikament ist gut verträglich, Nebenwirkungen sind in der immunologischen und inflammatorischen Reaktion des Körpers begründet (z.B. Abgeschlagenheit, Fieber, Hautausschlag, Juckreiz) [318]. Bei hoher oraler Bioverfügbarkeit und einer Halbwertszeit von ca. 12 bis 36 Stunden wird es über das Cytochrom P- System der Leber abgebaut [319].

Inzwischen ist die Substanz bei einer Vielzahl von parasitären Erkrankungen zugelassen, unter anderem für die Behandlung von Trypanosomiasis, Skabies, Läusen, Faden- und Madenwürmern und zahlreichen weiteren [316]. Einige Studien in den letzten Jahren zeigten zudem das Potential von Ivermectin als komplementäres, effektives Therapeutikum in der Behandlung von Malaria [320-322]. Dabei gelang es Chaccour *et al.* in einer

Pilotstudie am Tiermodell eine Rezeptur für eine subkutane Ivermectin- Anwendung mit langsamer Wirkstofffreisetzung zu entwickeln. Diese Methode erzeugt über mehr als 12 Wochen konstante Plasmaspiegel der Substanz und sorgt für eine effektive Elimination der verschiedenen Entwicklungsstadien der Anopheles Mücke [319;323]. Durch wiederholte Gaben von Ivermectin konnte zudem die Anzahl der Malaria- Episoden bei Kindern in einer randomisiert- kontrollierten Studie effektiv reduziert werden [324].

Durch Interaktion mit dem zellulären Transportsystem hemmt Ivermectin den nukleären Import von Virusbestandteilen, die essentiell für eine Replikation von Plasmodium falciparum, dem Erreger der gefährlichen Malaria tropica, sind [322]. Wagstaff *et al.* identifizierten Ivermectin 2012 als spezifischen Inhibitor des Importin  $\alpha/\beta$ - vermittelten Kerntransports. Das Medikament bindet irreversibel an die NLS- Bindungstasche von Importin  $\alpha$  und verhindert so die Interaktion zwischen dem NLS des Frachtproteins und dem Transportrezeptor (s. Abschnitt 1.4.3) [237]. Dabei hat Ivermectin keinen inhibierenden Einfluss auf den Transport von NLS- enthaltenden Zielproteinen, die von anderen Mitgliedern der Karyopherin- Familie erkannt werden [236;237]. Basierend auf diesem Wirkmechanismus konnte durch Hemmung des Importin  $\alpha/\beta$ - vermittelten Kernimports viruseigener Enzyme die Replikation des HI- und Dengue- Virus sowie des Venezolanischen Pferdeenzephalomyelitis- Virus durch Ivermectin erfolgreich inhibiert werden [190;237;325-327].

Neben antiviralen und antiparasitären Eigenschaften hat Ivermectin großes Potential als Medikament in der Krebstherapie. *Human epididymis protein 4* (HE4)- überexprimierende Ovarialtumorzellen konnten beispielsweise durch Ivermectin für eine Therapie mit den Chemotherapeutika Fulvestrant und Tamoxifen sensibilisiert werden. Ivermectin (insbesondere in Kombination mit Antiöstrogenen) inhibiert erfolgreich den nukleären Import von HE4, welches für eine Tumorgenese und Chemoresistenz verantwortlich ist [328]. Der Einfluss von Ivermectin auf den Hypoxie- induzierten Signalweg durch Inhibierung des Importin  $\alpha/\beta$ - vermittelten Kerntransports von HIF-1 $\alpha$  wird erstmals im Rahmen dieser Arbeit untersucht [264]. In Tabelle 3 aufgeführte Proteine bzw. Gene konnten außerdem in verschiedenen präklinischen Studien als Angriffsziele von Ivermectin in Tumorzellen *in vitro* identifiziert werden. Exemplarisch seien an dieser Stelle die Inhibition des MDR- Proteins, welches verantwortlich für die Entwicklung multipler Chemotherapieresistenzen ist, und die Herunterregulation von Genen (z.B. *Nanog/Sox2/Oct4*), die für das Überleben von Krebsstammzellen essentiell sind,

genannt [329;330]. *In vivo* wurde Ivermectin in Tiermodellen mit akuter myeloischer Leukämie, Glioblastom, Mamma- und Kolonkarzinom sowie Lymphosarkom getestet und führte zu einer bis über 50 %-igen Reduktion des Tumolvolumens [316].

**Tabelle 3: Zielmoleküle von Ivermectin in Tumorzellen.**

Angriffsziele von Ivermectin in Tumorzellen *in vitro* mit Aufführung von Zielmolekül, Wirkmechanismus, Effekt und Referenz. Modifiziert und erweitert nach [316].

Zielmolekül	Wirkmechanismus	Effekt	Referenz
MDR- Protein	Inhibierung	Suppression von multipler Medikamentenresistenz	[329;331]
Chloridkanal	Aktivierung	Hyperpolarisation der Zellmembran, Zelltod	[332]
AKT/ mTOR-Signalweg	Inhibierung	Mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, DNA- Schäden	[333;334]
P2X4/ P2X7 Rezeptoren	Aktivierung	Induktion von Apoptose und Nekrose	[335]
Cytochrom C, Bax, Caspase-3, Caspase-9	Aktivierung	Induktion von Apoptose	[336]
PAK1 Protein	Inhibierung	Zytostatische Autophagozytose	[337;338]
WNT- TCF- Signalweg	Inhibierung	Proliferationshemmung, Apoptose	[339]
YAP1	Inhibierung	Proliferationshemmung, Apoptose	[340;341]
SIN3- Domäne von Multiprotein Repressorkomplexen	Inhibierung	Transkriptionelle Modulation, Hemmung der Metastasierung, Sensitivierung gegenüber Medikamenten	[342]
NS3 DDX23- Helikase	Inhibierung	Herunterregulierung von miRNA, Invasion und Zellproliferation	[343]
<i>Nanog/ Sox2/ Oct4</i> Gene	Herunterregulierung	Reduktion von Krebsstammzellen	[330]
Importin $\alpha/\beta$ - Proteinkomplex	Inhibierung	Hemmung des HIF- Signalweges	[264]

## 1.6 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit

Die Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase unter sich stetig verändernden Belastungen und Umweltbedingungen ist entscheidend für die Zellfunktion und das Überleben des gesamten Organismus. Dabei spielt der HIF- Signalweg sowohl in physiologischem als auch pathophysiologischem Kontext eine zentrale Rolle, indem HIFs als heterodimere Transkriptionsfaktoren die Expression von Hunderten von Genen regulieren. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF- $\alpha$  durch die enzymatische Funktion der PHDs negativ kontrolliert und die PHDs gelten als entscheidende molekulare Sauerstoffsensoren. Intratumorale Hypoxie ist ein bekanntes Phänomen in der Tumorgenese und durch eine HIF- induzierte Genexpression besitzen hypoxische Tumorzellen einen Überlebensvorteil, welcher maligne Progression und Metastasierung begünstigt. HIFs und PHDs können durch unterschiedliche Mechanismen in Tumoren parallel hochreguliert sein. Dabei ist eine vermehrte Expression von HIF-1 $\alpha$  und PHD2 unabhängig voneinander häufig mit einer schlechteren Differenzierung und einer erhöhten Therapieresistenz assoziiert.

Im Rahmen der Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe „Hypoxie“ des Instituts für Physiologie wird in dieser Arbeit in Kooperation mit dem Institut für Strahlentherapie der Universität zu Lübeck der Zusammenhang zwischen der Expression des Sauerstoffsensorproteins PHD2 und der Strahlenresponsivität von Tumorzellen *in vitro* beleuchtet. Dafür wurden zwei bekannte Tumorzelllinien, in denen durch gezielte Transfektion ein PHD2- *knockdown* bzw. eine PHD2- Überexpression herbeigeführt wurde, mit gängigen Strahlendosen im Linearbeschleuniger bestrahlt und anschließend das klonogene Überleben der Zellen beurteilt. Hierdurch gewonnene Erkenntnisse sollen Rückschlüsse auf Ursachen einer Strahlenresistenz in Tumoren ermöglichen und denkbare Perspektiven für eine therapeutische Erhöhung der Strahlenresponsivität eröffnen.

Nur durch kontrollierten Transport über die Kernmembran können HIFs und PHDs ihre biologische Wirkung entfalten. Die gezielte subzelluläre Umverteilung von Transkriptionsfaktoren und Sauerstoffsensoren stellt daher einen attraktiven Ansatz für die Entwicklung neuartiger Therapeutika dar. Durch möglichst spezifische chemische Inhibition des Importin  $\alpha/\beta$ 1- vermittelten Kerntransports der HIFs können weitere Erkenntnisse in der Regulation sauerstoffabhängiger Genexpression gewonnen sowie das therapeutische Potential für die Umgehung HIF- induzierter Therapieresistenzen untersucht werden. Die antiparasitär und antiviral wirkende Substanz Ivermectin wurde bereits als

erster spezifischer Inhibitor des Importin  $\alpha/\beta$ -vermittelten Kerntransports identifiziert. In Erweiterung der Ausgangshypothese dieser Arbeit soll die biologische und physiologische Aktivität von Ivermectin im Rahmen des Hypoxie-induzierten Signalweges auf molekularer Ebene analysiert werden. Diesem Zweck diene die Bestimmung der subzellulären Lokalisation und der nukleären Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  sowie der HIF-1-Transaktivierungsfunktion und der HIF-1-abhängigen Zielgenexpression unter Ivermectin-Behandlung. Hierdurch gewonnenes Wissen soll einen Beitrag auf dem Weg zur Entwicklung von Wirkstoffen leisten, welche sich die Manipulation der intrazellulären Lokalisation von Proteinen, beispielsweise zur Bekämpfung therapeutischer Resistenzen, zu Nutze machen.

## 2 Methoden

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Methoden wurden die in Anhang A aufgelisteten Materialien und Geräte verwendet.

### 2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.1.1 Zellkultivierung

Untersuchungen an Zellkulturen eignen sich vorzugsweise, um zelluläre Prozesse sowie externe und interne Einflüsse auf Signaltransduktion und Toxizität der Zelle gezielt zu erforschen.

Die Handlungsschritte zur Kultivierung humaner Zelllinien fanden ausschließlich an einer Sterilwerkbank statt. Die Zelllinien HeLa, MCF7 und U2OS wurden in DMEM-Kulturmedium, die Zelllinien Hep3B, HepG2, HRG1 und Kelly in RPMI-1640-Kulturmedium im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen kultiviert. Allen Kulturmedien wurden, wenn nicht anders angegeben, 10 % fötales Kälberserum (FKS) sowie 100 IU/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (P/ S) zugesetzt. Ein Kulturmediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich bis zum Erreichen einer Zelldichte von ca. 60 % bis 80 % Konfluenz. Zur Subkultivierung wurden die adhärennten Zellen nach Absaugen des Kulturmediums durch fünfminütige Inkubation mit Trypsin/ EDTA gelöst. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt und die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 mit Medium verdünnt.

Um hypoxische Bedingungen herzustellen, wurden die Zellen für 24 Stunden einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 3 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> sowie 92 % N<sub>2</sub> im Zellinkubator ausgesetzt. Zum direkten Vergleich wurden Zellen unter normoxischen Bedingungen mit 21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 74 % N<sub>2</sub> für die gleiche Zeitspanne inkubiert.

#### 2.1.2 Zellzahlbestimmung

Je nach erwünschter Zellzahl wurden nach erfolgreicher Kultivierung bzw. durchgeführter Zellkulturexperimente definierte Zellzahlen nach Bestimmung mithilfe des Zellzählers *Cellometer<sup>TM</sup> Auto T4* in entsprechende Zellkulturgefäße ausgesät. Zur

Zellzahlbestimmung wurden die adhärenenten Zellen, wie oben beschrieben durch Trypsin/ EDTA Zugabe, vom Zellkulturgefäßboden gelöst und nach Stoppen der Reaktion mittels Medium jeweils 40 µl in Eppendorfgefäße überführt. Anschließend erfolgte eine Färbung mittels 20 µl Trypanblau. Der Farbstoff kann die Zellmembran intakter Zellen nicht überwinden und somit lässt sich aus der Nichtaufnahme auf die Zellviabilität schließen. Im Zellzähler wurde jeweils eine Dreifachbestimmung der Zellzahl durchgeführt, um einen Mittelwert bilden zu können. Zur Aussaat definierter Zellzahlen erfolgte die Division der gewünschten Zellzahl mit der Anzahl der im Zellzähler bestimmten Zellen pro µl.

### 2.1.3 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Die Herstellung von Gesamtzelllysaten diente in dieser Arbeit des quantitativen Proteinnachweises durch Western- Blot Analyse. Hierfür wurden entsprechend vorbehandelte Zellen in ihren Zellkulturgefäßen mit eiskalter, phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) überschichtet und der adhärenente Zellrasen am Boden des Gefäßes anschließend mit einem sterilen Zellschaber gelöst. Die Zellsuspension wurde dann mit einer Pipette in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Urea- Zelllysispuffer resuspendiert und nachfolgend sonifiziert (25 % Leistung, 20 sec). Durch erneute Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Minuten wurden Überstand (Gesamtzelllysate) und Zelldetritus voneinander getrennt. Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt, um eine Degradierung der Proteine durch zelluläre Proteasen zu vermeiden. Abschließend wurde das Gesamtzelllysate bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.1.4 Herstellung von Kernextrakten

Kernextrakte wurden nach der von Semenza und Wang entwickelten und von Hellwig-Bürgel *et al.* modifizierten Methode hergestellt, um die nukleäre HIF-1 $\alpha$  Expression unter dem Einfluss von Ivermectin zu analysieren [11;344]. Kultivierte und mit Ivermectin bzw. DMSO vorbehandelte U2OS und Kelly Zellen wurden mit eiskaltem PBS- Puffer gewaschen, adhärenente Zellen mit dem Zellschaber gelöst, in PBS aufgenommen und bei 800 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Entstandene Zellpellets wurden mit 4 ml

eiskaltem Puffer A für Kernextrakte gewaschen, in Puffer A resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Die erfolgreiche Zelllyse wurde durch Trypan-Blau-Färbung und Betrachtung unter dem Mikroskop überprüft. Die Kerne wurden anschließend bei 3500 rpm und 4 °C für 5 Minuten pelletiert, die Pellets in 100 ml Puffer C für Kernextrakte resuspendiert und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kernextrakte für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des *Bio-Rad DC Protein Assays* bestimmt und die nukleäre HIF-1 $\alpha$  Expression mittels SDS-Page und Western-Blot Analyse überprüft (s. Abschnitt 2.4).

Es wurden jeweils mindestens vier voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und entsprechend statistisch ausgewertet.

### 2.1.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Bei einer Transfektion handelt es sich in der Zellbiologie um das Einbringen von Fremd-DNA bzw. -RNA in eukaryotische Zellen. Hierfür stehen sowohl chemische als auch physikalische und biologische Verfahren zur Verfügung. Eine Transfektion kann zeitweilig (transient) oder auch dauerhaft (stabil) erfolgen.

In dieser Arbeit wurde zum einen Plasmid-DNA zum Erwirken einer (Über-) Expression eines Zielproteins in die Zielzelle eingeschleust. Hierfür diente das Transfektionsreagenz *GeneJuice*<sup>R</sup>, bei dem es sich um ein wenig-toxisches, zelluläres Polyamin handelt, das über Komplexbildung mit der Plasmid-DNA durch die Zellmembran der Zielzelle gelangt. Zum anderen wurde *small interfering RNA* (siRNA) eingesetzt, um gezielt die Expression bestimmter Zielproteine der Zelle zu unterdrücken (Protein-*knockdown*). Durch Bindung an komplementäre Nukleotidsequenzen der *messenger-RNA* (mRNA) induziert die siRNA deren selektiven Abbau und inhibiert auf diese Weise die Translation der Proteinbiosynthese. Zum Einbringen von siRNA in die Zielzellen wurde das Transfektionsreagenz *Lipofectamine2000*<sup>TM</sup> verwendet, welches durch Bilden einer kationischen Lipidhülle um die negativ geladene Ribonukleinsäure-Molekülkette Zell- und Kernmembranen überwindet. Die Transfektionen erfolgten jeweils bei einem zu ca. 60 % konfluenten Zellrasen, um eine suffiziente Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen gewährleisten zu können. Der Transfektionserfolg wurde mittels

Proteinkonzentrationsbestimmung, SDS- Page und Western- Blot Analyse überprüft (s. Abschnitt 2.4).

Es wurden jeweils mindestens fünf voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und entsprechend statistisch ausgewertet.

Die Transfektion mit Plasmid- DNA mithilfe des Transfektionsreagenzes *GeneJuice*<sup>R</sup> erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers und in unten angegebenen Verhältnissen. Das Transfektionsreagenz wurde in *Opti-MEM*<sup>R</sup> vorverdünnt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert. Ebenso wurde die Plasmid- DNA in *Opti-MEM*<sup>R</sup> vorgelegt und nach fünfminütiger Präinkubationszeit dem Transfektionsreagenz zugefügt. Nach anschließender fünfzehnminütiger Inkubationszeit erfolgte nach Waschung und Überschichtung der Zielzellen mit FKS versetztem Medium ohne P/ S die Inkubation der Zielzellen mit dem Transfektionsgemisch für 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C. Als Kontrolle diente ein Leervektor bzw. die reine Zugabe des Transfektionsreagenzes zum Medium.

**Tabelle 4: Transfektionsgemisch *GeneJuice*<sup>R</sup>.**

Zellkulturgefäß	Volumen <i>Opti-MEM</i> <sup>R</sup>	Volumen <i>GeneJuice</i> <sup>R</sup>	Volumen Medium	Plasmid- DNA
6- Loch- Platten	100 µl	3 µl	2 ml	1 µg
24- Loch- Platten	25 µl	0,75 µl	0,5 ml	0,25 µg

Die Transfektion mit siRNA mithilfe des Transfektionsreagenzes *Lipofectamine2000*<sup>TM</sup> erfolgte ebenfalls gemäß den Angaben des Herstellers und unten aufgeführten Verhältnissen. Getrennt voneinander wurden siRNA und Transfektionsreagenz jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit *Opti-MEM*<sup>R</sup> präinkubiert, anschließend zu gleichen Teilen vermischt und für weitere 20 Minuten inkubiert. Die Zielzellen wurden ebenfalls mit FKS versetztem Medium ohne antibiotische Zusätze gewaschen und überschichtet und nachfolgend mit dem Transfektionsreagenz versetzt. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen für weitere 44 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Zum Nachweis des spezifischen Effekts der verwendeten siRNA auf die Inhibierung der Proteinsynthese des entsprechenden Zielproteins wurde zur Kontrolle das Reagenz *BLOCKit*<sup>TM</sup>, eine Fluorophor- markierte unspezifische siRNA, verwendet.

**Tabelle 5: Transfektionsgemisch *Lipofectamine2000*<sup>TM</sup>.**

Zellkulturgefäß	Volumen <i>Opti-MEM</i> <sup>R</sup>	Volumen <i>Lipofectamine2000</i> <sup>TM</sup>	Volumen Medium	siRNA
6- Loch- Platten	200 µl	10 µl	2 ml	5 pmol
24- Loch- Platten	50 µl	1,25 µl	0,5 ml	5 pmol

### 2.1.6 Behandlung mit Ivermectin

Für die Untersuchung der Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionskaskaden wurden verschiedene Zelllinien für unterschiedliche Experimente (in folgenden Abschnitten beschrieben) mit Ivermectin behandelt. Die kultivierten und in 24- Loch- Platten mit definierter Zellzahl ausgesäten Zielzellen ( $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Loch) wurden für eine Stunde mit Ivermectin präinkubiert. Ivermectin war zuvor in Dimethylsulfoxid (DMSO) in entsprechenden Konzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  bis  $25 \mu\text{M}$  gelöst worden. Anschließend wurden die Zellkulturen ohne vorherigen erneuten Mediumwechsel für 24 Stunden normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (s. Abschnitt 2.1.1). Als Kontrollen wurden jeweils entsprechende Mengen DMSO (0,31 ‰) dem Medium zugesetzt.

### 2.1.7 Zytotoxizitäts- Assay

Die zytotoxische Wirkung von Ivermectin auf die Zelllinien U2OS, HepG2 und Kelly wurde durch Nutzung des *CytoToxGlo*<sup>TM</sup> Zytotoxizitätstests überprüft. Mit definierter Zellzahl ausgesäte Zellen wurden mit Ivermectin in einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  bis  $25 \mu\text{M}$  bzw. zur Kontrolle mit DMSO für 24 Stunden unter normoxischen Inkubationsbedingungen behandelt (s. Abschnitt 2.1.1). Zytotoxische Effekte durch eine Behandlung mit Ivermectin zeigten sich in einem Anstieg der relativen Anzahl toter Zellen, welche nach 24 Stunden nach Protokollangaben des Herstellers bestimmt wurde. Hierbei nutzt der Assay ein nachleuchtendes Peptidsubstrat, das nur die nicht mehr intakten Zellmembranen toter Zellen passieren kann. Die Lumineszenz wurde mit dem Luminometer Berthold *Mithras LB940* gemessen und die Daten auf die DMSO- Kontrolle

normiert. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und entsprechend statistisch ausgewertet.

### 2.1.8 Luciferase- Reportergen Assay

Um die Rolle der HIFs und anderer Transkriptionsfaktoren zu ergründen, muss deren transkriptionelle Aktivität nachgewiesen werden. Hierfür eignen sich Reportergen Assays. Ein Reportergen enthält eine Gensequenz, die für ein Protein kodiert, das der Kontrolle eines aufwärts liegenden Promotors unterliegt. Das Genprodukt hat häufig die Eigenschaft, chemilumineszente Reaktionen zu katalysieren, die dann als Korrelat der Expression des Reporterproteins im Zelllysat detektiert werden können. Das in dieser Arbeit verwendete Reportergen kodiert für eine Firefly- Luciferase, welche Luziferin unter Hinzunahme von Sauerstoff und ATP oxidiert. Beim Zerfall des entstandenen Oxyluziferins wird schließlich sichtbares Licht emittiert [345].

Es dienten die Zelllinien U2OS und HRG1 dazu, die Transaktivierungsfunktion von HIF-1, d.h. dessen Fähigkeit als Transkriptionsfaktor unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Expression bestimmter Zielgene zu bewirken, unter Einfluss von Ivermectin zu überprüfen. HRG1 Zellen sind HepG2 Zellen, die mit einem Hypoxie- responsiven Reportergenkonstrukt stabil transfiziert sind [346]. U2OS Zellen wurden in 24- Loch-Platten kultiviert und transient mit einem Hypoxie- responsiven Luciferase-Reportergenkonstrukt (*pGL3[pH3SLV]luc*) in Konzentrationen von 100 ng, 200 ng und 300 ng transfiziert (s. Abschnitte 2.1.1, 2.1.5). Das verwendete Reportergenkonstrukt enthält drei Hypoxie- responsive Elemente (HRE) mit jeweils zwei und somit insgesamt sechs HIF-1- Bindungsstellen aus dem humanen *Transferrin*- Gen [347]. Ein leerer pGL4 Vektor diente als Kontrolle der Transfektion. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Alle Zelllinien wurden mit Ivermectin in einer Konzentration von 1 µM bis 10 µM oder DMSO, wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben, entsprechend vorbehandelt und für 24 Stunden normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Für den Reportergen Assay wurde das *Dual- Luciferase<sup>TM</sup> Reporter System* genutzt. Der Inkubation folgend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 100 µl kaltem Reporter-Lysispuffer für 15 Minuten unter konstanter Rüttlung inkubiert. Es folgte ein Einfrieren bei -80 °C für weitere 10 Minuten. Nachfolgend wurden jeweils 20 µl des Zelllysats in 96-Loch- Mikrotiterplatten überführt. Durch sukzessive Zugabe von jeweils 100 µl Substrat

erfolgte die Messung der Firefly- Luziferase- Aktivität (FLU) am Luminometer Berthold *Mithras LB940*. Die Firefly- Luziferase- Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration im Zellysate normiert (Bestimmung mithilfe des *Bio- Rad Dc Protein Assays*, s. Abschnitt 2.4.1).

Es wurden jeweils fünf voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und entsprechend statistisch ausgewertet.

### 2.1.9 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Für zellbiologische Untersuchungen zur Lokalisation von HIF-1 $\alpha$  in der Zelle unter Einfluss von Ivermectin wurde in dieser Arbeit die Methode der indirekten Immunfluoreszenzfärbung genutzt. U2OS Zellen wurden in 24- Loch- Platten bis zu einer Konfluenz von 60 % kultiviert und für eine Stunde mit 7,5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Ivermectin oder DMSO unter normoxischen Bedingungen behandelt (s. Abschnitte 2.1.1, 2.1.6). Zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  und Simulation hypoxischer Bedingungen wurde die PHD- Aktivität durch vierstündige Zugabe von 1 mM Dimethyloxaloylglycine (DMOG) inhibiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 Minuten mit 250 ml kalter Fixierlösung fixiert, mit Permeabilisierungspuffer für 5 Minuten permeabilisiert und mit Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz für 2 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe des in Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz verdünnten, antigenspezifischen monoklonalen Maus-anti- HIF-1 $\alpha$ - Primärantikörpers und die Inkubation über Nacht. Am Folgetag wurde nach dem Waschen der Zellen mit PBS der fluoreszenzmarkierte polyklonale Sekundärantikörper (Alexa Fluor<sup>R</sup> 488- Ziege- Anti- Maus - IgG) für eine Stunde hinzugegeben. Die Proben wurden dann mit *ProLong<sup>R</sup> Gold Antifade Reagent with DAPI* auf Objektträgern eingebettet. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am *all- in- one Type Fluorescence Microscope BZ- 9000* mithilfe der *BZ Analyzer Software*. Die HIF-1 $\alpha$ - Signalintensität wurde in Relation zur Gesamtzellzahl (DAPI- Signal) gesetzt und auf die DMSO Kontrolle normiert. Die Quantifizierung erfolgte automatisch durch einen spezifischen „Hybrid cell count“- Algorithmus der Software. Die Gesamtzellzahl eines repräsentativen Ausschnittes wurde durch das DAPI- Signal und eine automatische Zellseparationsmethode ermittelt, die HIF-1 $\alpha$ - Signalintensität innerhalb dieses Areals durch Detektion der Helligkeit ab einem definierten Schwellenwert bestimmt.

Es wurden fünf voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und entsprechend statistisch ausgewertet.

### 2.1.10 Bestrahlung von Zellen mit Röntgenbremsstrahlung

Zur Ermittlung des Effekts von Röntgenbremsstrahlung auf teilungsaktive Zellen wurde in dieser Arbeit ein Koloniebildungstest nach Bestrahlung von Tumorzellen durchgeführt. Die untersuchten Zellen wurden 48 Stunden zuvor mit siRNA zur Inhibierung der Proteinsynthese bzw. Plasmid- DNA zur Überexpression bestimmter Proteine (s. Abschnitt 2.1.5) transfiziert. Nach einem Mediumwechsel erfolgte die Bestrahlung in 24- Loch- Platten mit Gesamtenergiedosen von 2 Gray, 4 Gray und 6 Gray (Gy). Die Bestrahlung wurde mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Strahlentherapie der Universität zu Lübeck mit dem Linearbeschleuniger *Varian Trilogy- Cone-beam-CT- RapidArc* durchgeführt. Dosimetrie und Durchführung wurden durch die Mitarbeiter des Instituts übernommen. Es wurden zur Kontrolle zu jedem Bestrahlungsgang in gleicher Weise vorbehandelte Zellen mitgeführt, die nicht bestrahlt wurden, jedoch auf diesem Wege den gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt wurden. Der Transport erfolgte in styroporisolierten Transportboxen, die Zellen wurden für maximal 40 Minuten dem Brutschrank entnommen und nach erfolgter Bestrahlung bis zum nächsten Arbeitsschritt wieder umgehend den üblichen Zellinkubationsbedingungen zugeführt.

### 2.1.11 Koloniebildungstest (*Clonogenic Survival Assay*)

Der Koloniebildungstest (*Clonogenic Survival Assay*) dient der indirekten Messung des Zelltods nach Bestrahlung. Als Maß für die intrinsische Strahlenwirkung kann mit seiner Hilfe die Abtötungseffizienz der Röntgenbremsstrahlung auf die vorbehandelten Tumorzellen getestet werden.

HeLa und MCF7 Zellen wurde, unmittelbar im Anschluss an die im vorigen Abschnitt beschriebene Bestrahlung, 200 µl *Accutase*<sup>TM</sup> zugegeben und es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Anschließend wurden die Zellen jedes Lochs im Zellzähler *Cellometer*<sup>TM</sup> *Auto T4* gezählt. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung der Zellzahl durchgeführt, um einen zuverlässigen Mittelwert bilden zu können. 1000 Zellen/ Loch wurden in 6- Loch- Platten im mit FKS und

Penicillin/ Streptomycin versetzten Medium dreifach je Vorbehandlung ausgesät. Dann erfolgte die Inkubation im Zellinkubator unter Standardbedingungen für 12 Tage (s. Abschnitt 2.1.1). Die Zelldichte wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Alle vitalen Zellen bildeten nach dieser Inkubationszeit eine makroskopisch sichtbare Zellkolonie. Zur Fixierung und Färbung wurden diese zunächst mit PBS gewaschen, für 10 Minuten mit Fixierlösung fixiert und nachfolgend mit Ethanol (70 %) für weitere 10 Minuten überschichtet. Dann erfolgte eine kurze Inkubation mit Coomassie-Färbelösung. Der in der Färbelösung enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 lagert sich an basische Seitenketten von Aminosäuren an und führt zu einer Blaufärbung der proteinreichen Zellkolonien. Nach erneutem Waschgang mit PBS und Wasser konnten die nun makroskopisch sichtbaren, gefärbten Kolonien gezählt und aus der jeweiligen Dreifachbestimmung der Mittelwert gebildet werden. Die Auszählung erfolgte dabei verblindet, um Beeinflussbarkeiten durch zu erwartende Ergebnisse zu vermeiden. Zur Normierung der ermittelten Koloniezahl wurden die Daten jeweils auf die Koloniezahl der unbestrahlten Kontrollen bezogen.

Es wurden jeweils fünf voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und entsprechend statistisch ausgewertet.

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Vorbereitung und Transformation kompetenter *E. coli*- Zellen

Als Transformation wird in der Mikrobiologie die nicht- virale Übertragung freier DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Diese Methode wird als Teilschritt der Klonierung angewandt, um über einen eingeschleusten Vektor gezielt DNA- Abschnitte zu vervielfältigen.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*)- Bakterien besteht jedoch keine natürliche Kompetenz, fremde DNA aufzunehmen. Daher ist eine Vorbereitung der Zellen notwendig. Die Kultivierung von *E. coli*- Zellen (Bakterienstamm XLI<sup>R</sup>) erfolgte aerob in LB- Medium (25 g LB- Medium + 1000 ml H<sub>2</sub>O) oder auf LB- Agarplatten (40 g LB- Agar + 1000 ml H<sub>2</sub>O). Die Arbeiten mit *E. coli*- Bakterien fanden ausschließlich an einer Sterilwerkbank statt. Zur Kultivierung auf LB- Agarplatten in Petrischalen wurden Einzelkolonien auf dem festen Nährboden ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dem Nährboden wurde für die Resistenzselektion Ampicillin (100 µg/ ml) bzw. Kanamycin (25 µg/ ml) zugesetzt. Zur Vorbereitung der Transformation wurden 5 ml LB- Medium mit 5 µl des entsprechenden Antibiotikums versetzt und zur Kultivierung Bakterienkolonien von LB- Agarplatten mit einer Pipettenspitze abgenommen und dem Kultivierungsansatz zugegeben. Eine Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 180 U/ min bei guter Belüftung im Schüttelinkubator.

Um die *E. coli*- Zellen zur Aufnahme fremder DNA chemisch kompetent zu machen, wurde die Calciumchlorid- Methode genutzt. Hierfür wurden 4 ml der Übernachtskultur in 400 ml LB- Medium bei 37 °C wachsen gelassen, bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,375 bei 590 nm (OD<sub>590</sub>). Die Bakteriensuspension wurde dann auf 2 Zentrifugenbecher aufgeteilt und für 5 bis 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1600 g und 4 °C für 7 Minuten. Das entstandene Bakterienpellet wurde nachfolgend in 40 ml eiskalter Calciumchlorid- (CaCl<sub>2</sub>) Lösung aufgenommen und für weitere 5 Minuten bei 1100 g und 4 °C zentrifugiert. Dem Bakteriensediment wurde hiernach erneut 40 ml eiskalte CaCl<sub>2</sub>- Lösung zugeführt und das Gemisch für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien abermals bei 1100 g und 4 °C für 5 Minuten pelletiert und das Pellet im Anschluss in 8 ml CaCl<sub>2</sub>- Lösung resuspendiert. Die nun chemisch kompetenten *E. coli*- Zellen wurden abschließend in 200 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C eingelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*- Zellen aufgetaut, 100 µl der Bakteriensuspension mit 500 µg PHD2- Plasmid- DNA bzw. 750 ng HRE-Firefly- Luziferase- Plasmid- DNA vermischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 Minuten und die erneute Inkubation auf Eis. Anschließend wurde 900 µl warmes LB- Medium hinzugegeben und die Bakterien zur phänischen Expression für eine Stunde bei 37 °C und 180 U/ min im Schüttelinkubator inkubiert. Schließlich wurde der Transformationsansatz auf LB- Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz mit einem sterilen Spatel ausgestrichen und bei 37 °C für 24 Stunden im Zellinkubator inkubiert.

### 2.2.2 Präparation von Plasmid- DNA aus *E. coli*- Zellen

Für die Isolation von kleinen Mengen Plasmid- DNA (bis 20 µg) aus transformierten *E. coli*- Zellen wurde das *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* verwendet. Die Plasmid- DNA wurde aus 1 ml einer Übernachtskultur gemäß den Angaben des Herstellers präpariert. Das Verfahren beruht auf einer zunächst durchgeführten Lyse und Zentrifugation der Bakterien. Das Lysat wird dann auf eine Spinsäule appliziert, die eine Membrantechnologie auf Silikabasis nutzt, um selektiv DNA-Moleküle bei hoher Salzkonzentration zu binden. Die gebundene DNA wird durch Waschen von kontaminierenden Anteilen getrennt und die aufgereinigte Plasmid- DNA in Elutionspuffer eluiert. Mithilfe des Spektrometers *Nanodrop ND- 1000* wurden Konzentration und Reinheit der präparierten Plasmid- DNA durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm überprüft. Der Quotient aus den bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessenen Absorptionsmaxima sollte bei einer proteinfreien Aufreinigung zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Zur Bewertung der Plasmid- Qualität wurde zudem eine Agarose- Gelelektrophorese durchgeführt (s. Abschnitt 2.3.2).

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Quantitative Real- Time- Polymerase- Kettenreaktion

Die Methode der Polymerase- Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung bestimmter Nukleinsäureabschnitte. Diese befinden sich zwischen zwei sogenannten Primern, bei denen es sich um bekannte Oligonukleotidsequenzen handelt. Das Grundprinzip der PCR besteht aus wiederkehrenden Zyklen von Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Annealing (Anlagern) der gewählten Primer und Neusynthese des selektierten Nukleinsäureabschnittes (Elongation). Die quantitative Real- Time- Polymerase- Kettenreaktion (*quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT- PCR) beruht auf dem Grundprinzip der PCR und ermöglicht zusätzlich mithilfe von Fluoreszenz Messungen, die während des PCR- Zyklus in Echtzeit (*real time*) erfasst werden, die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Diese Methode gestattet es, über die Amplifikation von komplementärer DNA (*complementary desoxyribonucleic acid*, cDNA) indirekt die vorhandene mRNA- Menge eines bestimmten Zielgens zu messen.

In dieser Arbeit wurde die mRNA- Menge des spezifischen HIF-1- Zielgens *solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1)* unter Einfluss von Ivermectin ermittelt. Zunächst ist hierfür die Isolation zellulärer Gesamt- RNA aus Zellkulturen notwendig. Mit definierter Zellzahl ausgesäte U2OS und HepG2 Zellen ( $0,5 \times 10^5$  Zellen pro Loch) wurden in 24- Loch- Platten mit Ivermectin in Konzentrationen zwischen  $1 \mu\text{M}$  und  $10 \mu\text{M}$  vorbehandelt (s. Abschnitt 2.1.6) und anschließend normoxischen bzw. hypoxischen Inkubationsbedingungen ausgesetzt (s. Abschnitt 2.1.1). Eine Behandlung mit DMSO diente als Kontrolle. Nach 24 Stunden wurde die zelluläre Gesamt- RNA unter Nutzung der *ABI PRISM<sup>R</sup>6100 Nucleic Prepstation* im *RNA Cell-* Programm nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die kultivierten Zellen wurden mit PBS Puffer gewaschen und in  $500 \mu\text{l}$  Lysispuffer lysiert. Es folgten im *RNA Cell-* Programm mehrere Waschschrte mit Waschlösungen und anschließend die Elution in Elutionslösung. Die Konzentration der extrahierten RNA wurde im Spektrophotometer *NanoDrop ND 1000* bestimmt und die Lösung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Mittels reverser Transkription wurde die RNA (100 ng bis 300 ng) dann in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden die M- MuLV Reverse Transkriptase und Random Hexamer- Primer genutzt. Für ihre enzymatische Aktivität benötigt die Reverse Transkriptase zudem den Zusatz von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs). Der

untenstehende Präinkubationsansatz wurde für 5 Minuten auf 65 °C im Thermocycler erhitzt und anschließend auf Eis gestellt.

**Tabelle 6: Präinkubationsansatz Reverse Transkription.**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
zelluläre Gesamt- RNA	11 µl
Random Hexamer Primer (100 µM)	1 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
DEPC- H <sub>2</sub> O	16 µl

Nachfolgend wurden je Probe 4 µl des Mastermixes für die Reverse Transkription zugegeben und das Gemisch für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert.

**Tabelle 7: Mastermix Reverse Transkription.**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
M- MuLV Reverse Transkriptase Puffer (10x)	2 µl
RNase Inhibitor	0,25 µl
M- MuLV Reverse Transkriptase	1 µl
DEPC- H <sub>2</sub> O	0,75 µl

Die cDNA- Synthesereaktion wurde dann durch zehnminütiges Erhitzen auf 90 °C gestoppt.

Die qRT- PCR wurde im *ABI PRISM<sup>R</sup>7000 Sequence Detection System* mithilfe des *SensiMix<sup>TM</sup> SYBR<sup>R</sup>& Fluorescein Kits* durchgeführt. Je Ansatz wurden 1 µl cDNA (1:1 mit DEPC- H<sub>2</sub>O verdünnt) und 24 µl des untenstehenden Mastermixes eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Anhang A mit ihren jeweiligen Sequenzen aufgeführt.

**Tabelle 8: Mastermix qRT- PCR.**

Substanz	Menge
<i>SensiMix™ SYBR<sup>R</sup> &amp; Fluorescein Kit</i>	12,5 µl
Primer forward (10 µM)	0,25 µl
Primer reverse (10 µM)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	11 µl

Für die qRT- PCR galten folgende Zyklusbedingungen: Aufwärmung der Proben bei 50 °C für 2 Minuten, Denaturierung der doppelsträngigen DNA und Polymeraseaktivierung bei 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen Primerhybridisierung (Annealing) bei 95 °C für 15 Sekunden und DNA- Neusynthese (Elongation) bei 60 °C für 60 Sekunden. Wasserkontrollproben wurden stets mitgeführt. Zur qualitativen Analyse der amplifizierten DNA- Abschnitte wurde anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wird die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird (von 60 °C auf 95 °C). Bei einer für den DNA- Abschnitt spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der DNA- Doppelstrang und dabei wird ein Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Diese Fluoreszenzänderung wird vom System detektiert. Schmelztemperatur und Schmelzkurve hängen von Länge und Basenzusammensetzung des amplifizierten DNA- Abschnittes ab und spezifische doppelsträngige DNA- Abschnitte weisen einen höheren Schmelzpunkt auf als unspezifisch entstandene Primerdimere. Daher dient die Schmelzkurvenanalyse der Beurteilung von Qualität und Spezifität der entstandenen PCR- Produkte. Zur Quantifizierung wurde die  $\Delta\Delta C_t$ - Methode verwendet und die Messwerte der *SLC2A1*- mRNA- Expression auf die Expression der konstitutiv exprimierten mRNA für das humane ribosomale Strukturprotein L28 normiert (hierfür wurde die cDNA 1:1000 mit DEPC H<sub>2</sub>O verdünnt).

Es wurden jeweils fünf voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und entsprechend statistisch ausgewertet.

### 2.3.2 Agarose- Gelelektrophorese von DNA

Die Agarose- Gelelektrophorese dient in der Molekularbiologie der Auftrennung von Nukleinsäuren (RNA oder DNA) nach ihrer Größe und dem Vergleich ihrer Größe und Masse mit Nukleinsäuren bekannter Basenpaarlängen.

In dieser Arbeit wurde die Methode genutzt, um im Anschluss an die Präparation von Plasmid- DNA die Qualität der gewonnenen Ziel- DNA zu überprüfen. Bei zu erwartender Länge der Nukleinsäuren zwischen 500 bis 10.000 Basenpaaren (bp) wurden Agarosekonzentrationen von 1 % verwendet. 1 g Agarosepulver wurde in 100 ml Tris-Acetat- EDTA (TAE)- Puffer durch Aufkochen gelöst und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen Farbstoff, der nach Interkalation in Nukleinsäuren ein Fluoreszenzsignal emittiert. Die Mischung wurde hiernach in eine Gelkammer eingegossen und konnte für 20 Minuten aushärten. Anschließend wurde das Gel in einer horizontalen Gelkammer mit TAE- Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit Laufpuffer für Agarose- Gele versetzt und in die Probentaschen gegeben. Eine Probe mit Nukleinsäuren bekannter Länge diente als Marker zur späteren Größenbestimmung der aufgetrennten DNA. Die Gelelektrophorese wurde bei 60 mA und 10 V/ cm<sup>2</sup> über mind. 30 Minuten durchgeführt. Abschließend wurden die aufgetrennten DNA- Fragmente im Agarose- Gel in der Geldokumentationsanlage *EASY Win32* unter Anregung durch UV- Licht analysiert. Da eine Restriktion durch Restriktionsendonukleasen hier nicht durchgeführt wurde, lagen die aufgetrennten DNA- Abschnitte in supercoilter Form vor. Die zu erwartende Basenpaarlängen ergaben sich dabei aus der Größe des Vektors und der bekannten Größe des klonierten DNA- Abschnittes (pcDNA3 PHD2: 8555 bp, pEGFG- PHD2: 7811 bp, GL3[pH3SLV]luc: 5910 bp) [348-350].

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration von Zelllysaten und Kernextrakten wurde mithilfe des *Bio- Rad Dc Protein Assays* bestimmt. Hierbei wurde nach den Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Das Prinzip des Assays beruht auf der Biuret- Reaktion, bei der mindestens zwei Peptidbindungen in wässrig- alkalischer Lösung einen farbigen Komplex mit zweiwertigen Kupferionen eingehen. Die zweiwertigen Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) werden dabei zu einwertigem Kupfer ( $\text{Cu}^{1+}$ ) reduziert. Dieses bildet mit der in der Lösung vorhandenen Bicinchinonsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) einen spezifischen violetten Farbkomplex, dessen Absorption mittels Luminometer (Berthold *Mithras LB940*) bei 700 nm gemessen werden kann. Die Farbstoffintensität korreliert dabei direkt mit der Proteinmenge der jeweiligen Probe. Der Proteingehalt ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) kann somit über eine Albumin- Standardverdünnungsreihe bestimmt werden.

### 2.4.2 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Die SDS- Page (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld. Als Trennmedium fungiert ein diskontinuierliches Gel, zusammengesetzt aus Sammel- und Trenngel, denen Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt wurde. SDS überdeckt als anionisches Tensid die Eigenladung der Proteine, sodass diese konstant negativ geladen sind. Durch vorige Denaturierung wird eine Streckung der zuvor gefalteten Polypeptidketten erreicht, die im elektrischen Feld zunächst durch das Sammel-, dann durch das Trenngel nach ihrer Kettenlänge und proportional zur Molekülmasse aufgetrennt werden (längere Polypeptidketten werden im Gel stärker zurückgehalten als kürzere).

Gesamtzelllysate oder Kernextrakte wurden, wie in den Abschnitten 2.1.3 und 2.1.4 geschildert, entsprechend vorbereitet und 40  $\mu\text{g}$  bis 100  $\mu\text{g}$  Protein mit Aqua Bidest versetzt, sodass gleiche Probenmengen von 30  $\mu\text{l}$  erreicht wurden. Danach erfolgte die Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Ladepuffer für SDS- Page und die Proteine wurden durch fünfminütiges Aufkochen bei 100 °C denaturiert.

Zur weiteren Vorbereitung war die Herstellung von Sammel- und Trenngelen notwendig. Die Gele hatten eine Größe von 83 x 73 x 1,5 mm, die Acrylamidkonzentration wurde

entsprechend der Größe der aufzutrennenden Proteine gewählt. Die vertikalen Gele wurden in die passenden Kammern eingebaut und mit Laufpuffer für SDS- Page überschichtet. Die Proben sowie ein Größenmarker wurden in die Probentaschen gegeben und die Gelelektrophorese bei 70 V für 2 Stunden durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch Western- Blot Analyse visualisiert und beurteilt (s. folgender Abschnitt).

### 2.4.3 Western- Blot Analyse

Eine Möglichkeit zur Beurteilung der in der SDS- Page aufgetrennten Proteine bietet das Verfahren der Western- Blot Analyse. Hierbei werden die Proteine durch einen Elektrotransfer auf eine Trägermembran übertragen (Blotting) und anschließend sichtbar gemacht.

Die Gele wurden nach SDS- Page den Elektrophoresekammern entnommen und auf der Vorderseite mit einer Nitrozellulose- Trägermembran sowie von beiden Seiten mit drei Lagen Filterpapier bedeckt. Trägermembran und Filterpapiere wurden zuvor mit Western- Blot Transferpuffer benetzt. Anschließend erfolgte das Blotting bei 10 V für 1 Stunde im *Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell* System. Um den Proteintransfer sichtbar zu machen, wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde diese bei Raumtemperatur für mindestens 2 Stunden in Blockierungspuffer aus 5 % Magermilchpulver in PBS geschwenkt. Anschließend fand die Inkubation mit einem entsprechenden und in Blockierungspuffer spezifisch verdünnten, antigenspezifischen Primärantikörper bei 4 °C auf einem Schüttler über Nacht statt. Am Folgetag wurde die Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener Primärantikörper dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden enzymgekoppelten Sekundärantikörper für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten drei weitere Waschgänge der Membran mit PBS. Zum indirekten Proteinnachweis dienten die 2 Komponenten des *Amersham™ ECL Plus™ Western- Blotting* Reagenzes, die das Substrat der an die Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase enthalten. Als Ergebnis des enzymatischen Substratumsatzes entsteht ein chemilumineszentes Signal, das durch Exposition eines Röntgenfilms an der Nitrozellulosemembran für 1 bis 20 Minuten detektiert wurde. Die Entwicklung des Films erfolgte manuell in der Dunkelkammer.

Zur Überprüfung gleicher Proteinladung und –transfer wurde eine Ladekontrolle mit einem anti- Aktin-, anti- Lamin A/C oder anti- SP1- Antikörper durchgeführt. Zur Quantitativen Auswertung der Proteinbanden diente ein densitometrisches Verfahren, das mithilfe des Computerprogramms *Image J* durchgeführt wurde. Dabei wurden die Proben auf die entsprechenden Proteinmengen der konstitutiv exprimierten Ladekontroll- Gene *Aktin*, *Lamin A/C* oder *SP1* normiert.

## 2.5 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens drei-, meist jedoch fünfmal unabhängig voneinander durchgeführt. Dabei steht „n“ in den Ergebnissen für die Anzahl der unabhängigen Wiederholungen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (*standard deviation*, SD) dargestellt. Es wurden der Kolmogorow- Smirnow- Test zur Überprüfung der Normalverteilung der Daten, im sorgfältig geprüften Einzelfall der Grubbs‘ Ausreißertest, der gepaarte t- Test zur Ermittlung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zweier normierter Datengruppen sowie die ANOVA- Analyse und der Bonferroni Post- Test zur Varianzanalyse angewandt. Ein p- Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Zu beachten sei, dass ermittelte Signifikanzen bei  $n < 5$  unter Vorbehalt zu betrachten sind, da ein Test auf Normalverteilung bei kleiner Stichprobenzahl nicht durchführbar ist.

Die graphische und statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Computerprogramms *GraphPad Prism 5*, die Generierung der Abbildungen mithilfe des Computerprogramms *Inkscape* sowie *Microsoft Office Power Point*.

## 3 Ergebnisse

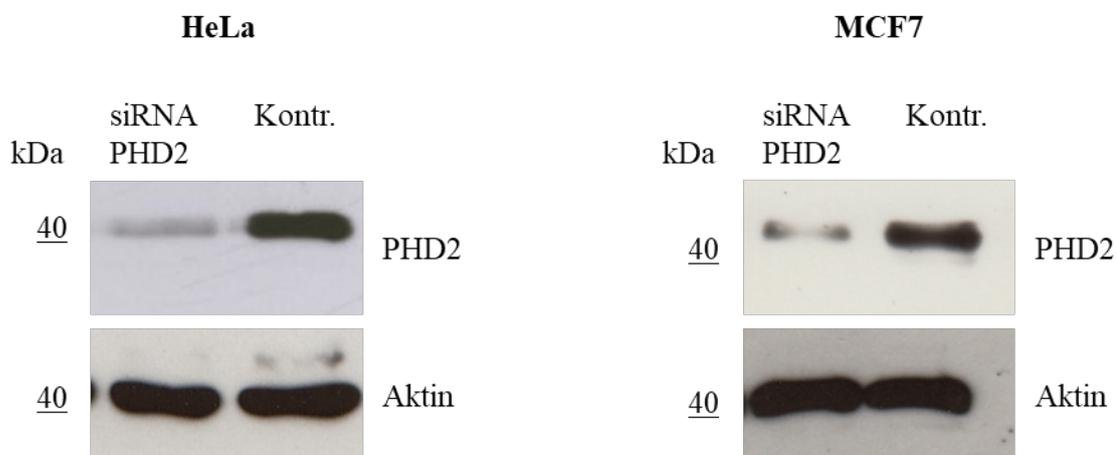
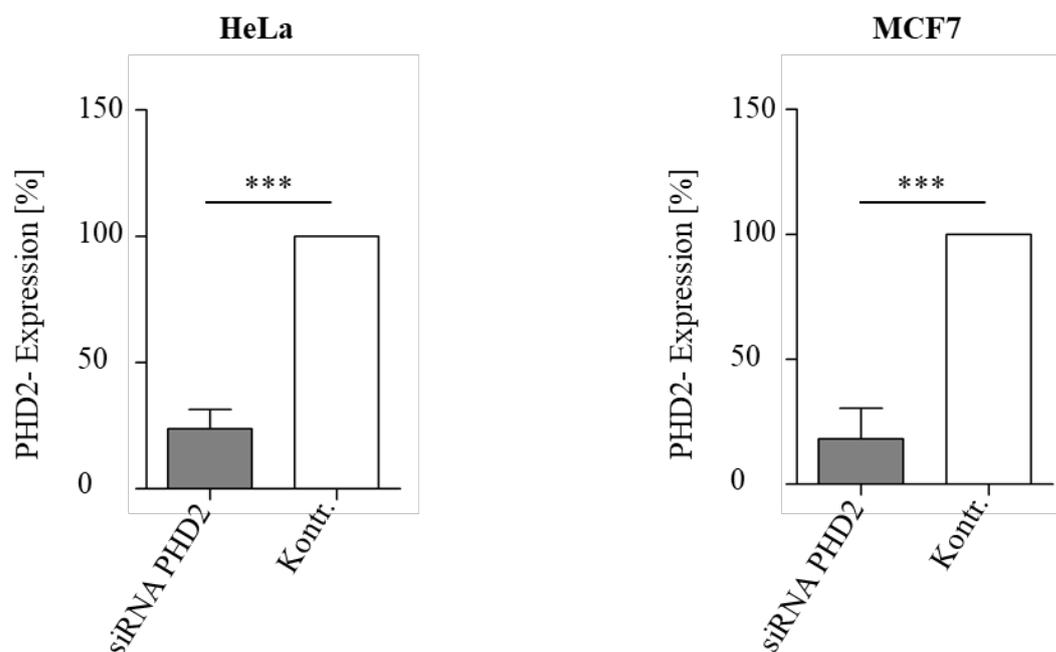
### 3.1 Einfluss der PHD2- Expression auf die Strahlenresponsivität

Zur Analyse der Zelltyp- abhängigen Strahlenresponsivität nach einem Protein- *knockdown* einerseits sowie einer Überexpression von PHD2 andererseits wurden die Tumorzelllinien HeLa und MCF7 ausgewählt. HeLa Zellen entstammen einem humanen Zervixkarzinom, bei dessen Therapieansätzen nach aktuellen Leitlinien sowohl die neoadjuvante, adjuvante als auch primäre Radio- (Chemo-) Therapie eine entscheidende Rolle spielen. Gleichmaßen bedeutsam ist die Radio- (Chemo-) Therapie im Kontext der Therapie des Mammakarzinoms (Strahlentherapie s. Abschnitt 1.3.1). MCF7 Zellen entstammen einem Adenokarzinom der Brustdrüse (ER+, PR+/-, HER-2-) [297;298].

#### 3.1.1 Erfolgreicher *knockdown* und Überexpression von PHD2 in Tumorzellen

Zur Vorbereitung der Bestrahlung mit Röntgenbremsstrahlung wurden die Zelllinien HeLa und MCF7, wie in Abschnitt 2.1.5 erläutert, für einen Protein- *knockdown* transient mit siRNA PHD2 transfiziert. Die erfolgreiche Inhibierung der PHD2- Expression wurde mittels Western- Blot überprüft (s. Abschnitt 2.4).

Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, konnte durch die siRNA- Behandlung ein signifikanter PHD2- *knockdown* für HeLa Zellen (links) und MCF7 Zellen (rechts) nachgewiesen werden (A). Es wurden *knockdown*- Raten von im Mittel 74,7 % in HeLa Zellen und 84,1 % in MCF7 Zellen erreicht (B).

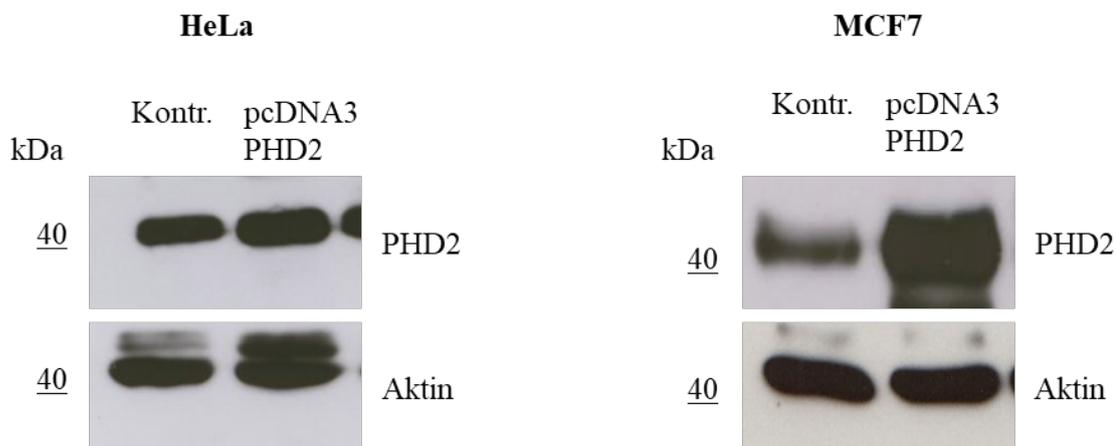
**A****B****Abbildung 5: PHD2- knockdown in den Zelllinien HeLa und MCF7.**

HeLa Zellen (links) und MCF7 Zellen (rechts) wurden transient mit siRNA PHD2 bzw. *BLOCK-it<sup>TM</sup>* als Kontrolle (Kontr.) transfiziert. Die PHD2- Proteinexpression im Gesamtzelllysat wurde mittels Western- Blot Analyse untersucht. **A:** Repräsentative Darstellung der spezifischen PHD2- und Aktin- Proteinbanden im Western- Blot. Aktin diente als Ladekontrollprotein. Angabe der Proteingröße in kDa. **B:** Die Signalintensität der Proteinbanden wurde densitometrisch mithilfe des Programms *Image J* ausgewertet und die zur Aktin- Expression relative PHD2- Signalintensität auf die relative Signalintensität der Kontrolle (100 %) normiert. MW  $\pm$  SD (gepaarter t- Test), n = 5, \*\*\* p < 0,001.

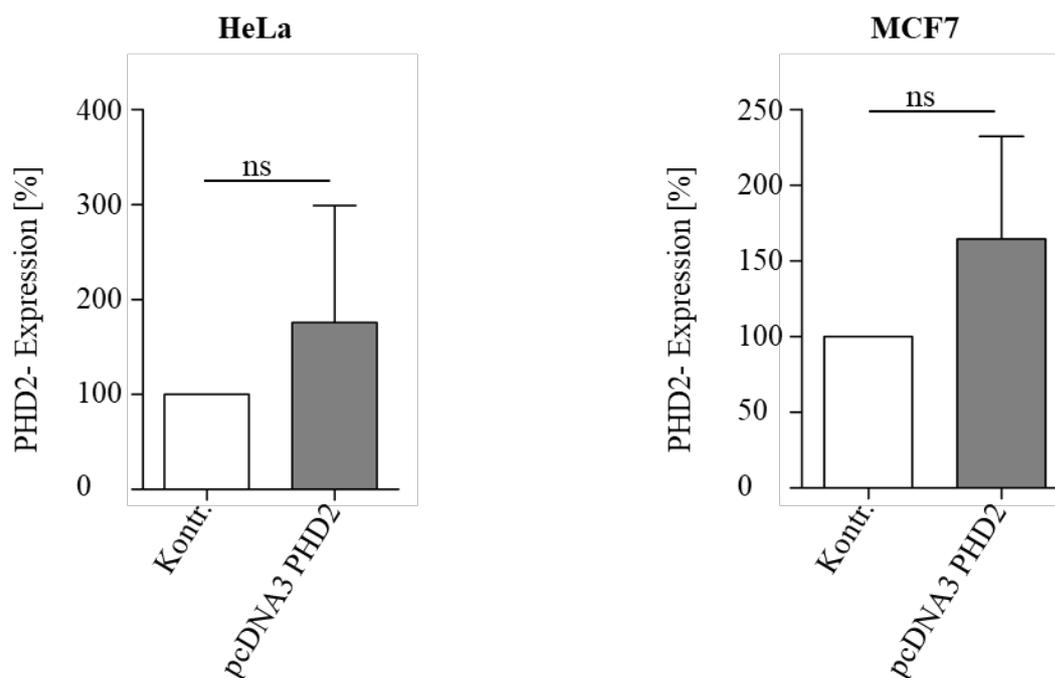
Des Weiteren sollte geprüft werden, welchen Effekt eine PHD2- Überexpression auf die Strahlenresponsivität oben genannter Zelllinien hat. Hierfür wurden HeLa und MCF7 Zellen, wie in Abschnitt 2.1.5 aufgeführt, transient mit Plasmid- DNA (pcDNA3 PHD2) transfiziert.

Die Western- Blot Analyse zeigte, wie in Abbildung 6 zu sehen ist, eine erkennbare Überexpression von PHD2 in HeLa Zellen (links) und MCF7 Zellen (rechts) (A). Die PHD2- Proteinmenge im Gesamtzelllysate wurde im Mittel um 36,7 % in HeLa Zellen und um 47,2 % in MCF7 Zellen erhöht (B). Eine statistische Auswertung ermittelte die Überexpression als nicht signifikant bei  $n = 5$  und hoher Standardabweichung der Werte.

A



B



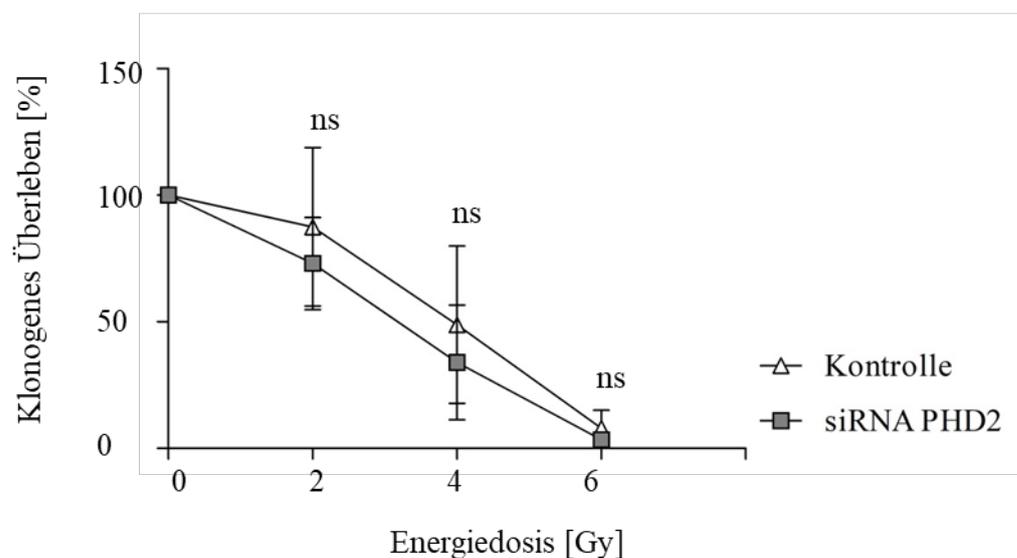
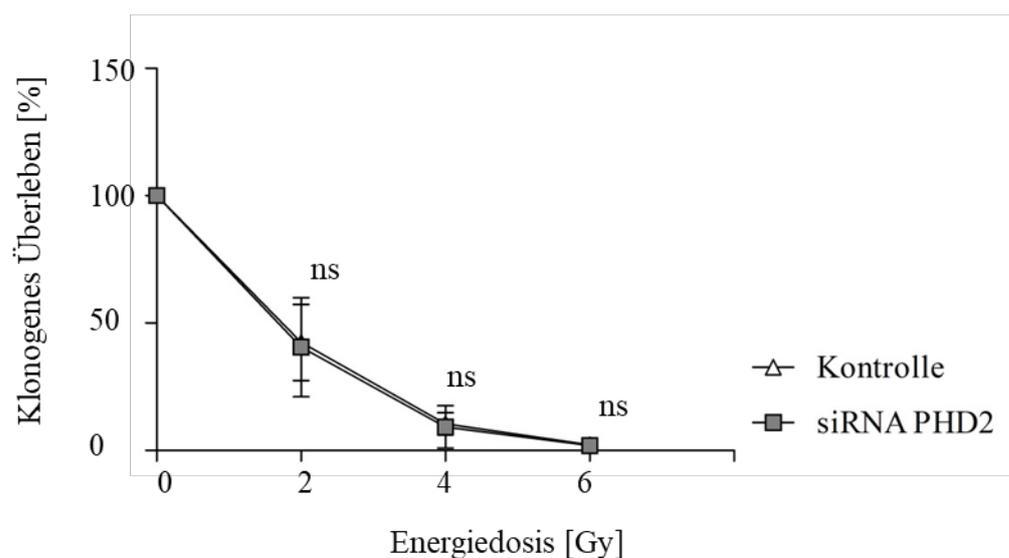
### Abbildung 6: PHD2- Überexpression in den Zelllinien HeLa und MCF7.

HeLa Zellen (links) und MCF7 Zellen (rechts) wurden transient mit pcDNA3 PHD2 bzw. einem Leervektor (pcDNA3) als Kontrolle (Kontr.) transfiziert. Die PHD2- Proteinexpression im Gesamtzelllysat wurde mittels Western- Blot Analyse untersucht. **A:** Repräsentative Darstellung der spezifischen PHD2- und Aktin- Proteinbanden im Western- Blot. Aktin diene als Ladekontrollprotein. Angabe der Proteingröße in kDa. **B:** Die Signalintensität der Proteinbanden wurde densitometrisch mithilfe des Programms *Image J* ausgewertet und die zur Aktin- Expression relative PHD2- Signalintensität auf die relative Signalintensität der Kontrolle (100 %) normiert. MW  $\pm$  SD (gepaarter t- Test), n = 5, ns = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.2 Strahlenresponsivität unter PHD2- *knockdown* und PHD2- Überexpression

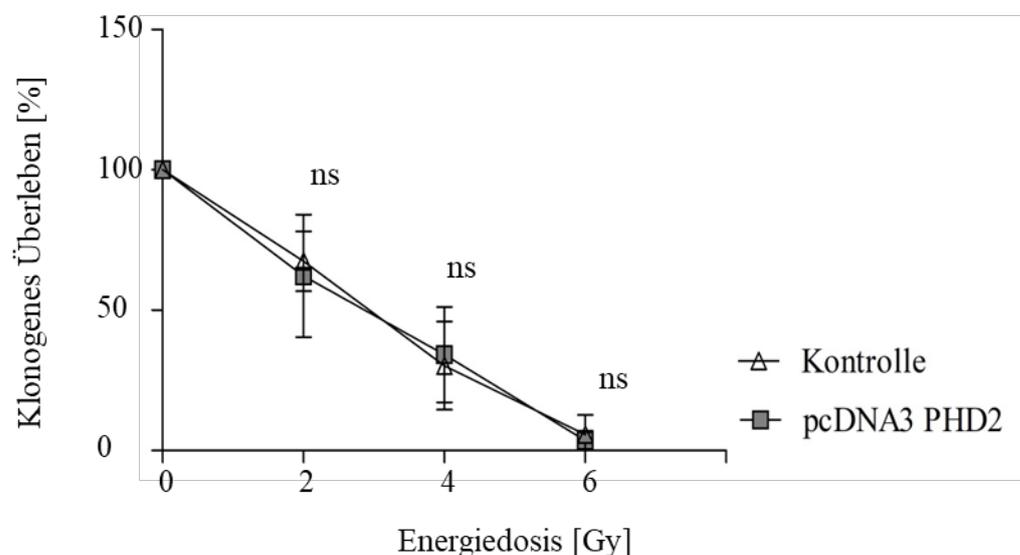
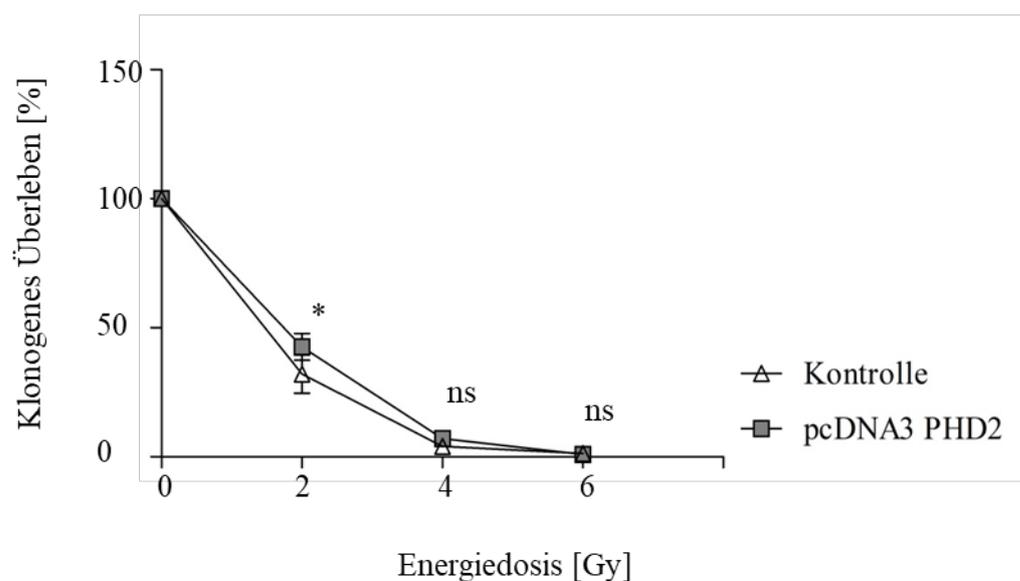
Zur Untersuchung der Strahlenresponsivität unter PHD2- *knockdown* und PHD2- Überexpression wurden die zuvor mit siRNA bzw. Plasmid- DNA transfizierten Zelllinien HeLa und MCF7 im Linearbeschleuniger *Varian Trilogy- Cone-beam-CT- RapidArc* mit in der klinischen Praxis üblichen Einzeldosen von 2 Gray bis 4 Gray (Gy) bestrahlt. Zur Verdeutlichung des Kurvenverlaufs des klonogenen Überlebens der Zellen wurde außerdem mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlt. Nicht bestrahlte Zellen zur späteren Normierung der Daten wurden stets mitgeführt. 12 Tage nach Bestrahlung erfolgte die Auswertung des Anteils vitaler Zellen mithilfe des Koloniebildungstests (s. Abschnitte 2.1.10 und 2.1.11).

Abbildung 7 stellt den Einfluss der Inhibierung der PHD2- Expression in HeLa Zellen (oben) und MCF7 Zellen (unten) auf das klonogene Überleben nach Bestrahlung dar. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, hatte ein PHD2- *knockdown* keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das klonogene Überleben in den Zelllinien HeLa und MCF7 bei Bestrahlungsdosen von 2 Gy bis 6 Gy. Es zeigte sich jedoch ebenfalls eine hohe Standardabweichung der einzelnen Messwerte.

**HeLa****MCF7****Abbildung 7: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung von PHD2- defizienten Zellen.**

Mit siRNA transient transfizierte HeLa Zellen (oben) und MCF7 Zellen (unten) wurden im Linearbeschleuniger mit Energiedosen von 2 Gray bis 6 Gray (Gy) bestrahlt. Nach 12 Tagen wurde der Anteil vitaler Zellen mittels Koloniebildungstest bestimmt. Die Anzahl gewachsener Kolonien der bestrahlten PHD2- *knockdown* bzw. Kontrollzellen wurde auf die der unbestrahlten Zellen normiert. Die unspezifische siRNA *BLOCK-it™* diente als Kontrolle. MW  $\pm$  SD (two- way ANOVA- Analyse, Bonferroni Post- Test), n = 5, ns = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

In Abbildung 8 ist der Einfluss der PHD2- Überexpression auf die Strahlenresponsivität in denselben Zelllinien zu sehen. Es ist festzustellen, dass eine PHD2- Überexpression in HeLa Zellen (oben) keinen Einfluss auf das klonogene Überleben nach Bestrahlung in den angegebenen Energiedosen hatte. In PHD2- überexprimierenden MCF7 Zellen (unten) zeigte sich eine signifikant erniedrigte Strahlensensibilität bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy mit einem mittleren klonogenen Überleben von 42,9 % im Vergleich zu 25,6 % in den Kontrollzellen.

**HeLa****MCF7****Abbildung 8: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung von PHD2-überexprimierenden Zellen.**

Mit Plasmid- DNA transient transfizierte HeLa Zellen (oben) und MCF7 Zellen (unten) wurden im Linearbeschleuniger mit Energiedosen von 2 Gray bis 6 Gray (Gy) bestrahlt. Nach 12 Tagen wurde der Anteil vitaler Zellen mittels Koloniebildungstest bestimmt. Die Anzahl gewachsener Kolonien der bestrahlten PHD2- überexprimierenden- bzw. Kontrollzellen wurde auf die der unbestrahlten Zellen normiert. Der Leervektor pcDNA3 diente als Kontrolle. MW  $\pm$  SD (two- way ANOVA- Analyse, Bonferroni Post- Test), n = 5, ns = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), \*  $p < 0,05$ .

## **3.2 Einfluss des Importin $\alpha/\beta$ - spezifischen Inhibitors Ivermectin auf den HIF- Signaltransduktionsweg**

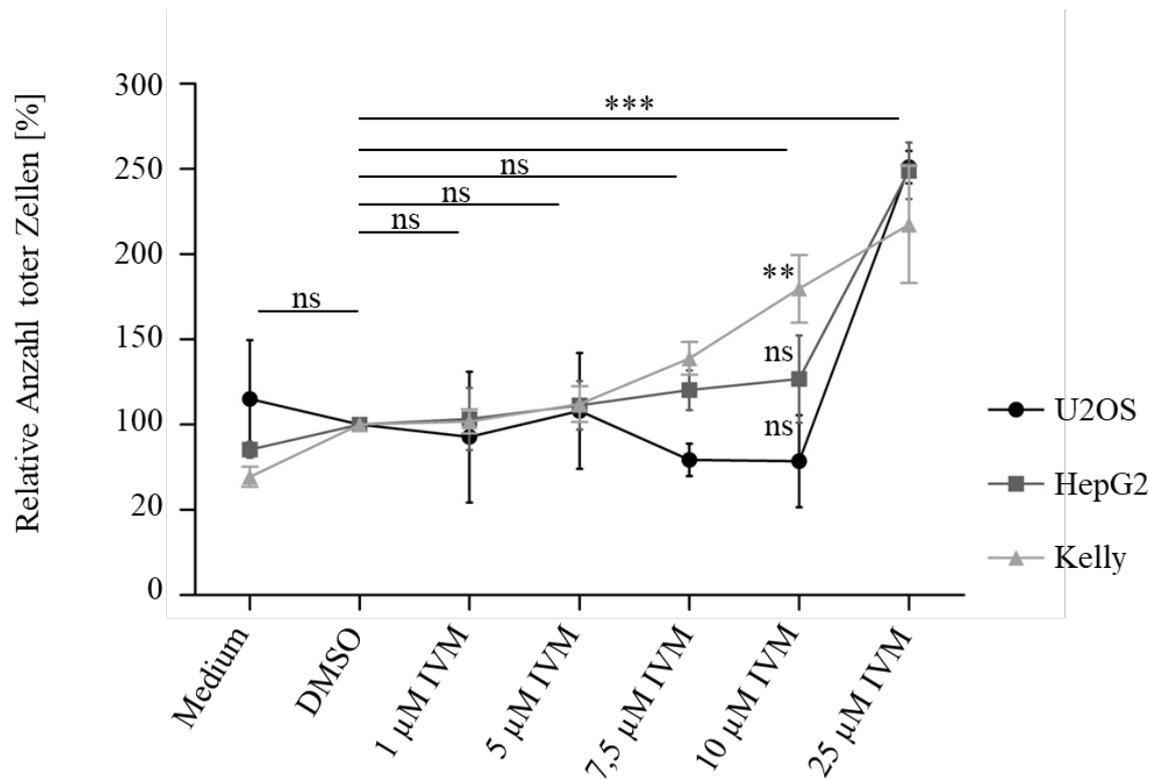
In dieser Arbeit wurde die biologische und physiologische Rolle von Ivermectin in der Sauerstoffsensitivität auf molekularer Ebene, insbesondere der Einfluss auf den Importin  $\alpha/\beta$ - abhängigen HIF- Signaltransduktionsweg, untersucht. Nachfolgende Resultate und Abbildungen werden in den Ergebnissen von Kosyna *et al.* gezeigt [264].

### **3.2.1 Zytotoxische Effekte von Ivermectin**

Zur Beurteilung des zytotoxischen Effekts von Ivermectin wurde zuallererst das Zellüberleben der in den weiteren Versuchen verwendeten Zelllinien U2OS, HepG2 und Kelly nach Behandlung mit Ivermectin mithilfe des *CytoTox-Glo<sup>TM</sup>* Zytotoxizitätstests überprüft (s. Abschnitte 2.1.6, 2.1.7).

In Abbildung 9 ist gezeigt, dass die relative Anzahl toter Zellen unter vierundzwanzigstündiger Ivermectin- Behandlung mit Konzentrationen höher als 10  $\mu$ M (respektive 7,5  $\mu$ M bei Kelly Zellen) sichtbar anstieg, eine statistische Signifikanz zeigte sich ab 25  $\mu$ M (respektive 10  $\mu$ M bei Kelly Zellen). Zwischen einer Behandlung mit reinem Medium bzw. DMSO- versetztem Medium, welches in nachfolgenden Versuchen jeweils als Kontrolle diente, konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zytotoxizität festgestellt werden [264].

Um zytotoxische Effekte zu vermeiden, wurden basierend auf diesen Ergebnissen in den folgenden Experimenten Ivermectin- Dosen von maximal 10  $\mu$ M verwendet.



### Abbildung 9: Überprüfung zytotoxischer Effekte von Ivermectin.

Mit definierter Zellzahl ausgesäte U2OS, HepG2 und Kelly Zellen wurden mit Ivermectin (IVM) in Konzentrationen von 1 µM bis 25 µM behandelt und anschließend für 24 Stunden normoxischen Inkubationsbedingungen ausgesetzt. Zytotoxische Effekte von Ivermectin wurden mithilfe des *CytoTox-Glo™* Zytotoxizitätstests geprüft und zeigten sich in einem Anstieg der Anzahl toter Zellen. Dargestellt ist die relative Anzahl toter Zellen in Bezug auf mit DMSO behandelte Kontrollzellen. MW ± SD (two- way ANOVA- Analyse, Bonferroni Post- Test, n = 3, ns = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  [264].

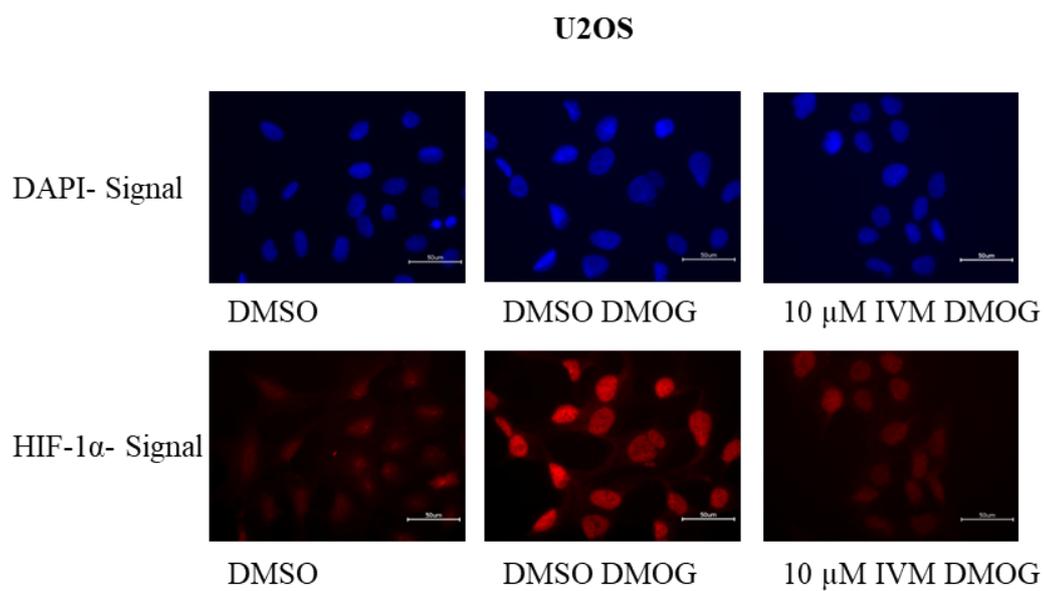
### 3.2.2 Einfluss von Ivermectin auf die subzelluläre Lokalisation von HIF-1 $\alpha$

Mithilfe von Lokalisierungsstudien sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Ivermectin auf die subzelluläre Lokalisation von HIF-1 $\alpha$  genauer untersucht werden. Dafür wurde die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von HIF-1 $\alpha$  in U2OS Zellen genutzt und die HIF-1 $\alpha$ - Signalintensität unter Ivermectin- Behandlung fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (s. Abschnitte 2.1.6, 2.1.9).

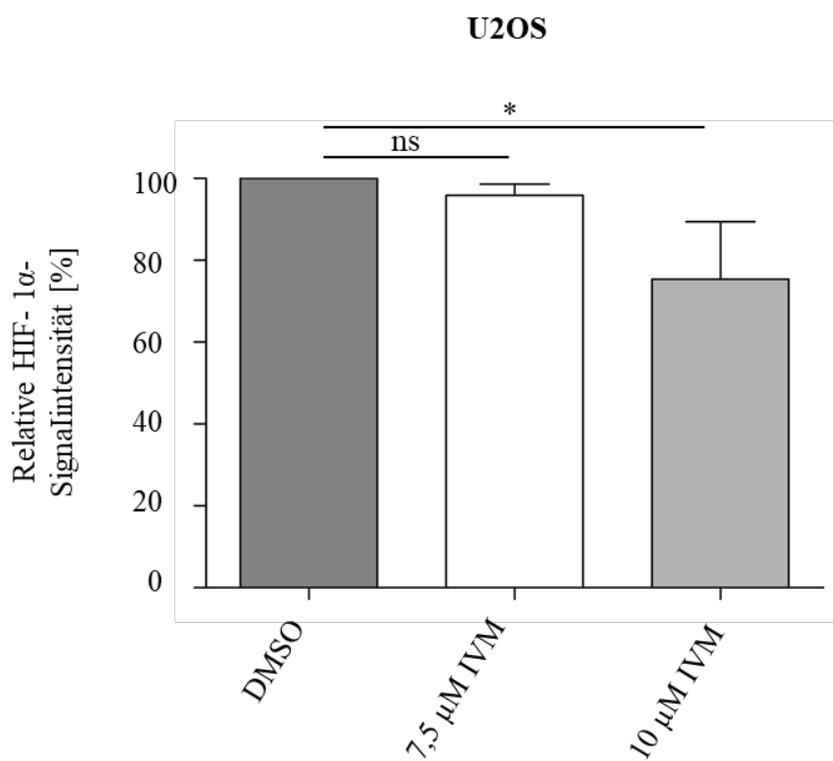
Die repräsentativen Bilder in Abbildung 10 zeigen, dass HIF-1 $\alpha$  nach DMOG- Behandlung hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, die nukleäre Akkumulation nach Ivermectin- Behandlung in einer Konzentration von 10  $\mu$ M jedoch sichtbar reduziert war (A). Dass dieser Effekt signifikant ist, zeigt die statistische Auswertung von fünf voneinander unabhängigen Versuchen, in denen die nukleäre Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  durchschnittlich auf 80,2 % gesenkt wurde (B) [264].

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ivermectin die hypoxisch- induzierte nukleäre Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  hemmend beeinflusst.

A



B



### **Abbildung 10 (vorige Seite): Einfluss von Ivermectin auf die subzelluläre Lokalisation von HIF-1 $\alpha$ .**

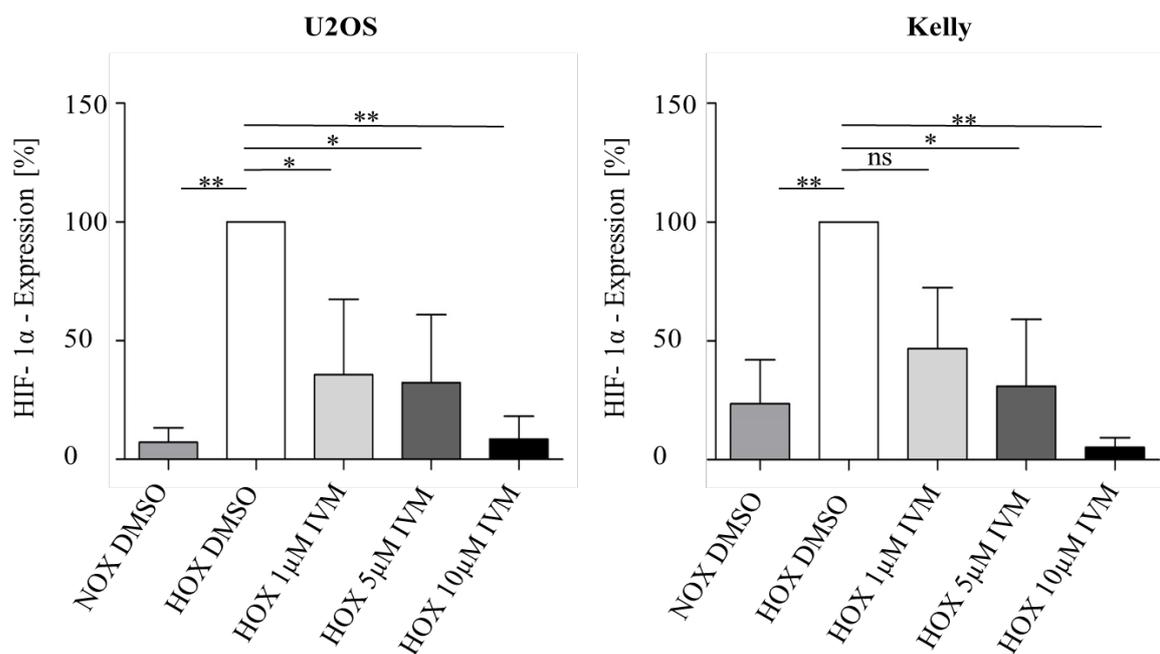
Bis zu einer Konfluenz von 60 % kultivierte U2OS Zellen wurden mit Ivermectin (IVM) in Konzentrationen von 7,5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M bzw. DMSO als Kontrolle für 1 Stunde behandelt. Die PHD- Aktivität wurde durch Zugabe von 1 mM DMOG für 4 Stunden inhibiert. HIF-1 $\alpha$  wurde durch einen antigenspezifischen Primär- und einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert. Das Immunfluoreszenzsignal wurde mit dem *all- in- one Type Fluorescence Microscope BZ- 9000* mithilfe der *BZ Analyzer Software* ausgewertet. **A:** Dargestellt sind repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung. Maßstab unten rechts: 50  $\mu$ m. **B:** Die HIF-1 $\alpha$ - Signalintensität wurde in Relation zur Gesamtzellzahl (DAPI- Signal) gesetzt und auf die DMSO Kontrolle normiert. MW  $\pm$  SD (one- way ANOVA- Analyse, Bonferroni Post- Test), n = 5, ns = nicht signifikant (p > 0,05), \* p < 0,05 [264].

### **3.2.3 Einfluss von Ivermectin auf die nukleäre HIF-1 $\alpha$ - Proteinexpression**

Den im vorigen Punkt beschriebenen Lokalisierungsstudien folgend wurde anschließend der Einfluss von Ivermectin auf den Kernimport und die nukleäre Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  tiefergehend analysiert. Die Zelllinien U2OS und Kelly wurden zu diesem Zweck nach Behandlung mit Ivermectin unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen inkubiert (s. Abschnitte 2.1.1, 2.1.6). Anschließend wurden Kernextrakte, wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, hergestellt und die nukleäre HIF-1 $\alpha$ - Proteinexpression mittels Western- Blot Analyse beurteilt (s. Abschnitt 2.4).

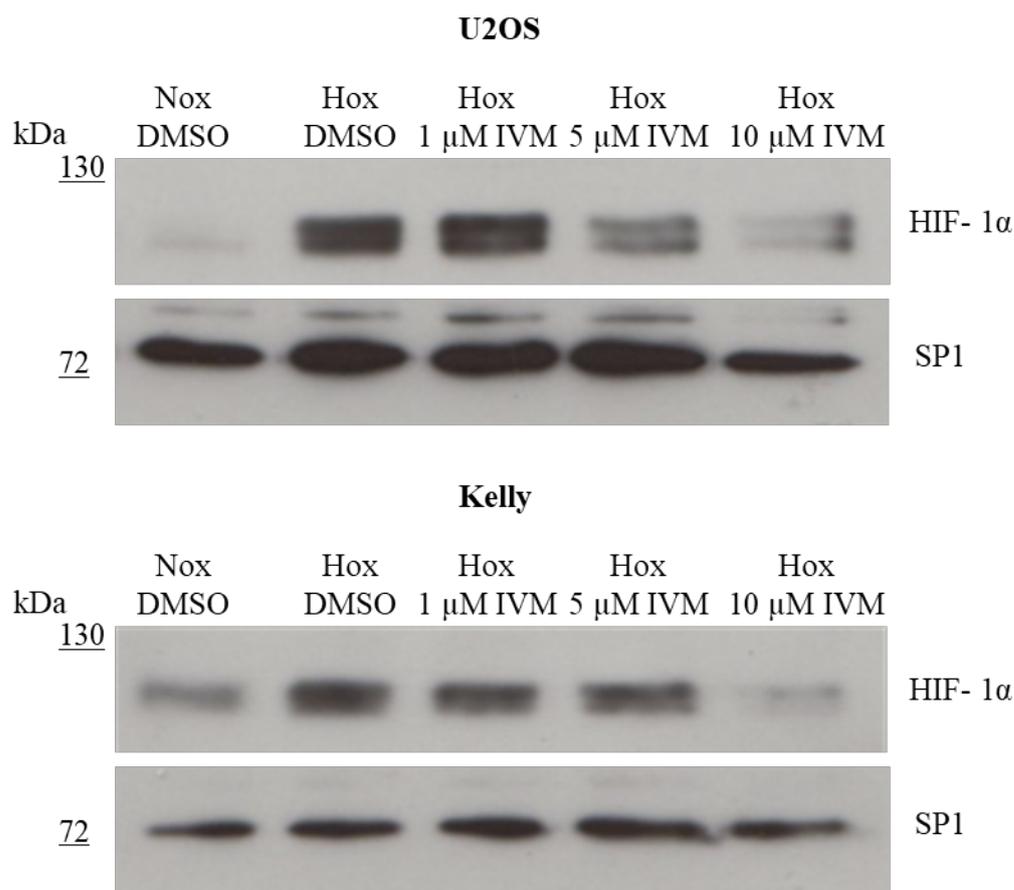
Es konnte unter Normoxie eine niedrige HIF-1 $\alpha$ - Proteinexpression detektiert werden, wohingegen eine hypoxische Inkubation in signifikant und sichtbar höheren nukleären HIF-1 $\alpha$ - Proteinspiegeln resultierte. Wie in Abbildung 11 und anhand der repräsentativen Immunoblots in Abbildung 12 zu erkennen ist, führte in beiden Zelllinien eine Behandlung mit Ivermectin zu signifikant niedrigeren HIF-1 $\alpha$ - Proteinmengen im Zellkern im Vergleich zu einer Behandlung mit DMSO [264].

Dieser Effekt zeigte sich dosisabhängig mit einer Reduktion der HIF-1 $\alpha$ - Expression auf im Mittel 41,7 % (1  $\mu$ M IVM), 38,1 % (5  $\mu$ M IVM) und 6,4 % (10  $\mu$ M IVM) in U2OS Zellen (links) und 59,1 % (1  $\mu$ M IVM), 33,8 % (5  $\mu$ M IVM) und 6,4 % (10  $\mu$ M IVM) in Kelly Zellen (rechts).



**Abbildung 11: Einfluss von Ivermectin auf die nukleäre HIF-1 $\alpha$ - Proteinexpression.**

Mit definierter Zellzahl ausgesäte U2OS Zellen (links) und Kelly Zellen (rechts) wurden mit Ivermectin (IVM) in Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend normoxischen (NOX) bzw. hypoxischen (HOX) Inkubationsbedingungen ausgesetzt. Nach 24 Stunden wurde die HIF-1 $\alpha$ - Proteinexpression in Kernextrakten beider Zelllinien mittels Western- Blot Analyse untersucht. SP1 diente als Ladekontrollprotein. Die Signalintensität der Proteinbanden wurde densitometrisch mithilfe des Programms *Image J* ausgewertet und die zur SP1- Expression relative HIF-1 $\alpha$ - Signalintensität auf die relative Signalintensität der Kontrolle (100 %) normiert. MW  $\pm$  SD (one- way ANOVA- Analyse, Bonferroni Post- Test), n = 3, ns = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .



**Abbildung 12: Einfluss von Ivermectin auf die nukleäre HIF-1 $\alpha$ - Akkumulation.**

Mit definierter Zellzahl ausgesäte U2OS Zellen (oben) und Kelly Zellen (unten) wurden mit Ivermectin (IVM) in Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend normoxischen (NOX) bzw. hypoxischen (HOX) Inkubationsbedingungen ausgesetzt. Nach 24 Stunden wurde die HIF-1 $\alpha$ - Proteinexpression in Kernextrakten beider Zelllinien mittels Western- Blot Analyse untersucht. SP1 diente als Ladekontrollprotein. Angabe der Proteingröße in kDa. Die gezeigten Immunoblots stehen repräsentativ für mindestens vier voneinander unabhängige Experimente (n = 4) [264].

Bei erniedrigter nukleärer HIF-1 $\alpha$ - Akkumulation blieb die zelluläre Gesamtproteinmenge von HIF-1 $\alpha$  unter Ivermectin- Behandlung dennoch annähernd gleich. Dargestellt wird dies ebenfalls in den Ergebnissen von Kosyna *et al.*, welche, den Versuchen mit Kernextrakten folgend, die Proteinbanden repräsentativer Western- Blots von Gesamtzelllysaten zeigen [264].

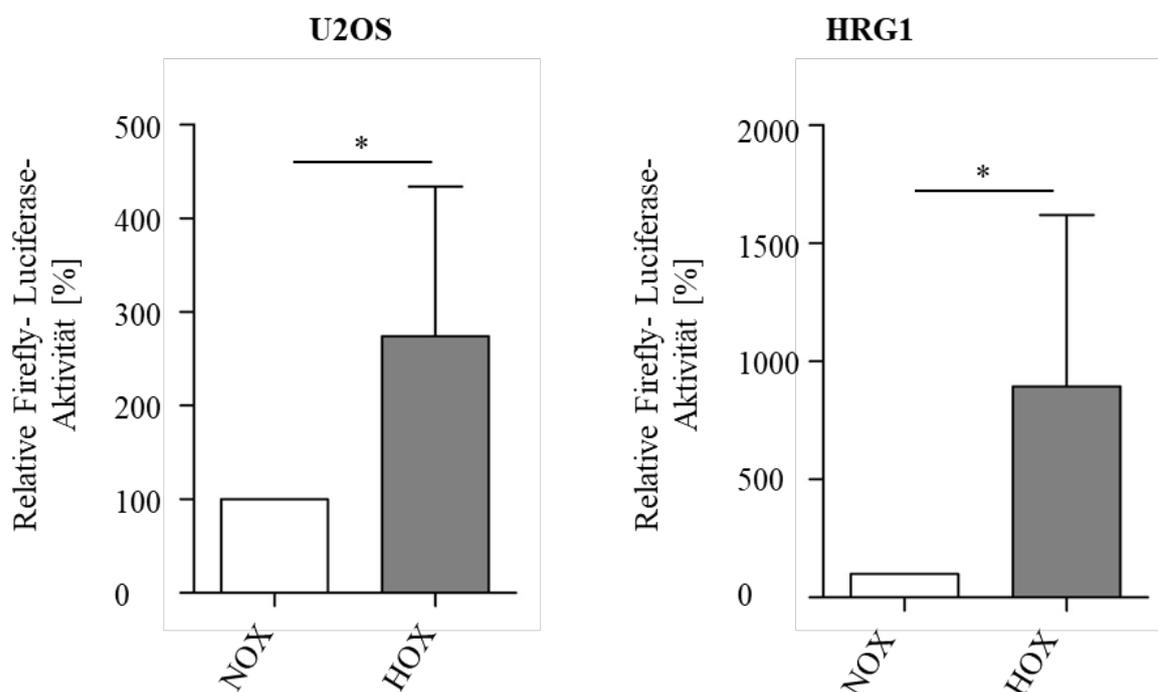
Auf den Lokalisierungsstudien im vorigen Abschnitt aufbauend unterstützen diese Ergebnisse die Arbeitshypothese, dass Ivermectin die nukleäre Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  zu reduzieren vermag.

### 3.2.4 Einfluss von Ivermectin auf die Transaktivierungsfunktion von HIF-1

Zur Beurteilung der HIF-1- Transaktivierungsfunktion unter chemischer Beeinflussung durch Ivermectin wurde in dieser Arbeit der Luciferase- Reportergen Assay genutzt. Hierfür wurden U2OS Zellen, wie in den Abschnitten 2.1.5 und 2.1.8 aufgeführt, transient mit einem Hypoxie- responsiven Luciferase- Reportergenkonstrukt (*pGL3[pH3SLV]luc*) transfiziert. Ferner wurden HRG1 Zellen untersucht, bei denen es sich um HepG2 Zellen handelt, die mit einem Hypoxie- responsiven Reportergenkonstrukt stabil transfiziert sind [346]. Beide Zelllinien wurden nach Kultivierung mit Ivermectin behandelt und normoxischen bzw. hypoxischen Inkubationsbedingungen ausgesetzt. Als Korrelat für die Rate der HIF-1- abhängigen Genexpression konnte anschließend die Firefly- Luziferase- Aktivität (FLU) am Luminometer gemessen werden.

In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass die HIF-1- abhängige Firefly- Luciferase unter hypoxischer Inkubation in U2OS Zellen (links) und HRG1 Zellen (rechts) mit einer höheren Expression reagierte als unter normoxischen Inkubationsbedingungen. Die Genexpression wurde durchschnittlich auf das 2,5- fache in U2OS Zellen (250,7 %) und auf das 6,5- fache in HRG1 Zellen (643,6 %) gesteigert.

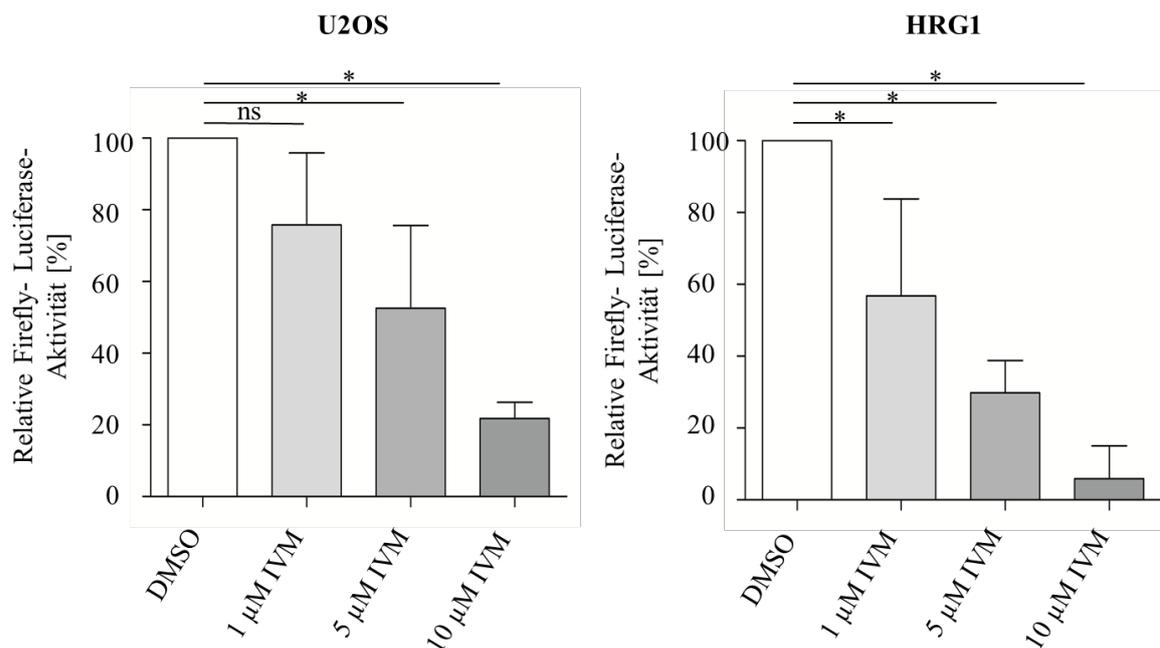
Diese Ergebnisse stimmen mit vorigen Studienresultaten überein und verdeutlichen die Hypoxie- Responsivität des verwendeten Reportergenkonstrukts [347].



**Abbildung 13: Verhalten der relativen Firefly- Luciferase- Aktivität unter hypoxischer Inkubation.**

U2OS Zellen (links) und HRG1 Zellen (rechts) wurden mit definierter Zellzahl ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. U2OS Zellen wurden transient mit einem HIF-1- abhängigen Firefly- Luciferase- Reporter-genkonstrukt (*pGL3[pH3SLV]luc*) transfiziert. HRG1 Zellen sind mit demselben Reporter-genkonstrukt stabil transfiziert. Beide Zelllinien wurden mit DMSO behandelt und für 24 Stunden normoxischen (NOX) bzw. hypoxischen (HOX) Inkubationsbedingungen ausgesetzt. Die Firefly- Luciferase- Aktivität wurde am Luminometer Berthold *Mithras LB940* gemessen und die Daten auf die Proteinkonzentration im Zelllysate normiert. MW  $\pm$  SD (gepaarter t- Test), n = 6, \* p < 0,05.

Durch eine Ivermectin Behandlung konnte in beiden Zelllinien eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der HIF-1- abhängigen FLU unter hypoxischen Bedingungen erreicht werden (Abbildung 14). In U2OS Zellen (links) wurde die FLU auf 80,6 % (1  $\mu$ M IVM), 56,6 % (5  $\mu$ M IVM) und 21,9 % (10  $\mu$ M IVM), in HRG1 Zellen (rechts) auf 56,8 % (1  $\mu$ M IVM), 29,8 % (5  $\mu$ M IVM) und 5,9 % (10  $\mu$ M IVM) reduziert [264].



**Abbildung 14: Einfluss von Ivermectin auf die Transaktivierungsfunktion von HIF-1.**

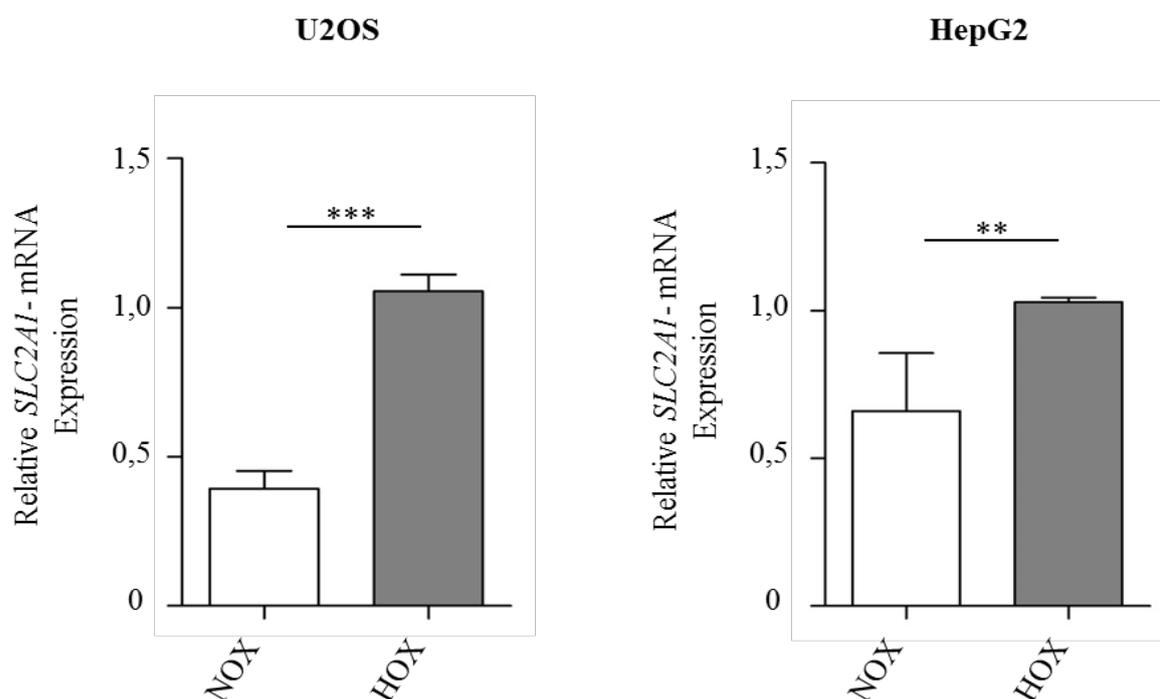
U2OS Zellen (links) und HRG1 Zellen (rechts) wurden mit definierter Zellzahl ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. U2OS Zellen wurden transient mit einem HIF-1- abhängigen Firefly- Luciferase- Reporter-genkonstrukt (*pGL3[pH3SLV]luc*) transfiziert. HRG1 Zellen sind mit demselben Reporter-genkonstrukt stabil transfiziert. Beide Zelllinien wurden für eine Stunde mit Ivermectin (IVM) in Konzentrationen von 1 µM bis 10 µM bzw. DMSO als Kontrolle vorbehandelt und für 24 Stunden normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Die Firefly- Luciferase- Aktivität wurde am Luminometer Berthold *Mithras LB940* gemessen und repräsentiert die transkriptionelle Aktivität von HIF-1. Dargestellt sind die Werte nach hypoxischer Inkubation. Die Daten wurden auf die Proteinkonzentration im Zelllysate normiert. MW ± SD (one-way ANOVA- Analyse, Bonferroni Post- Test), n = 5, ns = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), \*  $p < 0,05$  [264].

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ivermectin einen reduzierenden Einfluss auf die Transaktivierungsfunktion von HIF-1 hat.

### 3.2.5 Einfluss von Ivermectin auf die Expression HIF-1- abhängiger Zielgene

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von Ivermectin auf die Expression HIF-1- abhängiger Zielgene eingehender zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde mittels quantitativer Real- Time- Polymerase- Kettenreaktion (qRT- PCR) indirekt die *messenger RNA* (mRNA)- Menge des spezifischen HIF-1- Zielgens *solute carrier family 2 member 1* (*SLC2A1*) unter Einfluss von Ivermectin analysiert. Kultivierte U2OS und HepG2 Zellen wurden mit Ivermectin vorbehandelt, normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und die zelluläre Gesamt- RNA, wie in Abschnitt 2.3.1 geschildert, isoliert. Die qRT- PCR erfolgte nach Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA). Zur Quantifizierung wurde die  $\Delta\Delta C_t$ - Methode verwendet. Die Menge der amplifizierten *SLC2A1*- cDNA steht dabei stellvertretend für die Menge der mRNA des HIF-1- abhängigen Zielgens und somit für die transkriptionelle Aktivität von HIF-1.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, konnte unter Hypoxie eine signifikant erhöhte relative mRNA- Expression des HIF-1- abhängigen Zielgens *SLC2A1* auf 1,04 (0,41 unter Normoxie) in U2OS (links) und 1,03 (0,68 unter Normoxie) in HepG2 Zellen (rechts) gemessen werden. Dieses Resultat verdeutlicht die hypoxisch- induzierte transkriptionelle Aktivität von HIF-1.

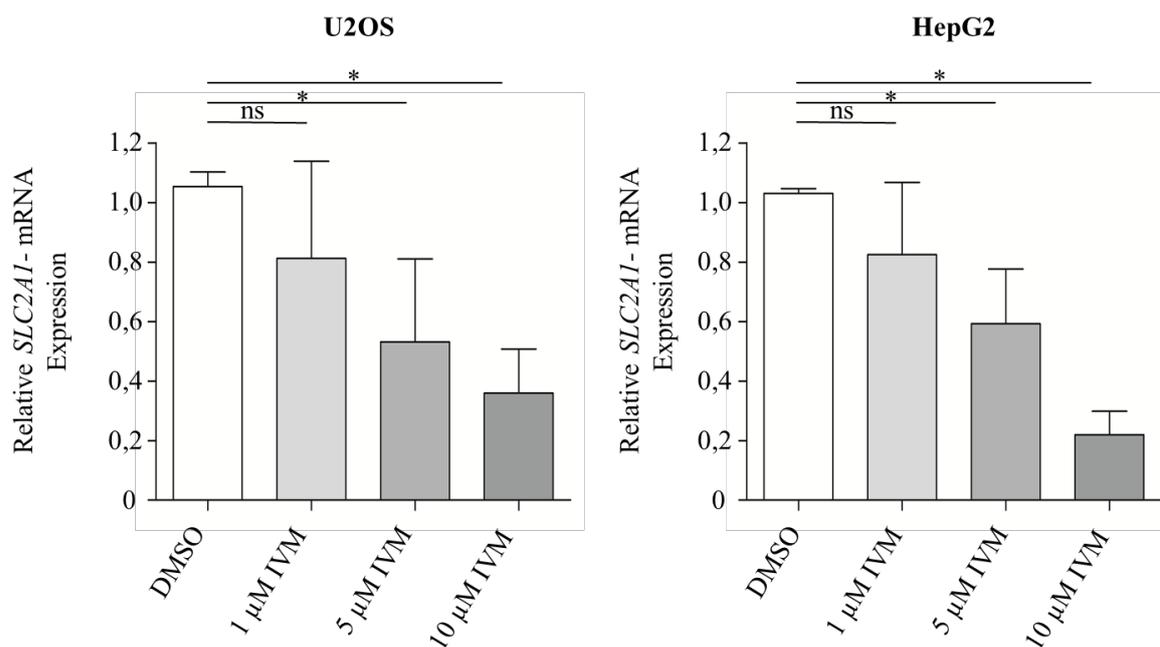


**Abbildung 15: Hypoxische Induktion der Expression des HIF-1- abhängigen Zielgens *SLC2A1*.**

Mit definierter Zellzahl ausgesäte U2OS Zellen (links) und HepG2 Zellen (rechts) wurden unter Standardbedingungen kultiviert und für 24 Stunden normoxischen (NOX) bzw. hypoxischen (HOX) Bedingungen ausgesetzt. Beiden Zelllinien wurde DMSO zugegeben. Die Analyse der *SLC2A1*- Genexpression erfolgte durch qRT- PCR. Die Messwerte der über die amplifizierte *SLC2A1*- cDNA indirekt bestimmten *SLC2A1*- mRNA- Expression wurden auf die Expression der konstitutiv exprimierten mRNA für das humane ribosomale Strukturprotein L28 normiert. MW  $\pm$  SD (gepaarter t- Test), n = 5, Werte U2OS korrigiert nach Grubbs' Ausreißertest, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Im Vergleich zu mit DMSO behandelten Kontrollzellen resultierte eine Ivermectin-Behandlung in einer signifikant erniedrigten relativen *SLC2A1*- mRNA- Expression unter hypoxischen Bedingungen sowohl in U2OS als auch in HepG2 Zellen.

Dieser Effekt präsentierte sich dosisabhängig mit einer Reduktion der relativen *SLC2A1*- mRNA- Expression auf 0,8 (1  $\mu$ M IVM), 0,41 (5  $\mu$ M IVM) und 0,3 (10  $\mu$ M IVM) in U2OS Zellen (links) und 0,84 (1  $\mu$ M IVM), 0,5 (5  $\mu$ M IVM) und 0,21 (10  $\mu$ M IVM) in HepG2 Zellen (rechts) (Abbildung 16) [264].



**Abbildung 16: Einfluss von Ivermectin auf die Expression des HIF-1- abhängigen Zielgens *SLC2A1*.**

Mit definierter Zellzahl ausgesäte U2OS Zellen (links) und HepG2 Zellen (rechts) wurden mit Ivermectin (IVM) in Konzentrationen von 1 μM bis 10 μM bzw. DMSO als Kontrolle vorbehandelt und für 24 Stunden normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Die Analyse der *SLC2A1*- Genexpression erfolgte durch qRT- PCR. Dargestellt sind die Werte nach hypoxischer Inkubation. Die Messwerte der über die amplifizierte *SLC2A1*- cDNA indirekt bestimmten *SLC2A1*- mRNA- Expression wurden auf die Expression der konstitutiv exprimierten mRNA für das humane ribosomale Strukturprotein L28 normiert. MW ± SD (one- way ANOVA- Analyse, Bonferroni Post- Test), n = 5, ns = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), \*  $p < 0,05$  [264].

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Ivermectin die Expression HIF-1- abhängiger Zielgene inhibieren kann.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den Zelllinien HeLa und MCF7 mittels Transfektion mit siRNA und Plamid- DNA ein erfolgreicher Protein- *knockdown* bzw. eine Überexpression von PHD2 erreicht werden konnte. In PHD2- defizienten Zellen konnte im Anschluss weder in HeLa noch in MCF7 Zellen eine statistisch signifikante Veränderung der Strahlenresponsivität bei Bestrahlung mit Röntgenbremsstrahlung festgestellt werden. Zwischen PHD2- überexprimierenden- und Wildtyp- HeLa Zellen konnte ebenfalls kein Unterschied hinsichtlich der Strahlensensibilität ermittelt werden. MCF7 Zellen präsentierten bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy jedoch ein signifikant höheres klonogenes Überleben als die Kontrollzellen.

Unter Behandlung mit dem Importin  $\alpha/\beta$ 1- spezifischen Inhibitor Ivermectin in maximalen, nicht zytotoxischen Konzentrationen von 10  $\mu$ M konnte sowohl in Immunfluoreszenz- Lokalisierungsstudien als auch in Western- Blot Analysen von Kernextrakten eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der nukleären Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  beobachtet werden. Zudem zeigte sich in Reporter- Untersuchungen die Hypoxie- responsive Aktivität der Firefly- Luciferase als Korrelat der HIF-1- Transaktivierungsfunktion signifikant und in Abhängigkeit der Ivermectin- Dosis vermindert. Ebenso präsentierte sich die mRNA- Expression des HIF-1- abhängigen Zielgens *SLC2A1* unter Ivermectin Behandlung signifikant und dosisabhängig verringert [264].

## 4 Diskussion

Die Aufrechterhaltung der für den gesamten Organismus überlebenswichtigen Sauerstoffhomöostase unterliegt auf molekularer Ebene entscheidend der Regulation durch die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) sowie der HIF-kontrollierenden Enzyme, im Besonderen der Prolyl-4-Hydroxylasen (PHDs). HIFs nehmen eine Schlüsselrolle in der sauerstoffabhängigen Genexpression ein, indem sie die Transkription mehrerer Hundert Gene regulieren, um Zellen an veränderte äußere und innere Bedingungen anzupassen. Die PHDs kontrollieren sauerstoffabhängig die Stabilität von HIF- $\alpha$  und gelten als die wichtigsten Proteine in der molekularen Sauerstoffsensitivität. Sowohl die HIF- als auch die PHD-vermittelte Signaltransduktion sind jedoch auch in die Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen, wie z.B. der Tumorphysiologie oder Ischämien, involviert. Daher stellen Inhibition oder Aktivierung der HIFs sowie die Beeinflussung der PHD-Funktion bedeutende Ziele in der Entwicklung von Therapeutika dar.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der PHD2-Expression auf die Strahlenresponsivität von Tumorzellen *in vitro* untersucht, um Zelltyp-abhängige Zusammenhänge zwischen PHD2-Ausprägung und Strahlenresistenzen aufzudecken.

Im zweiten Teil wurde sich der chemischen Inhibition intrazellulärer Transportwege durch den spezifischen Importin  $\alpha/\beta$ 1-Inhibitor Ivermectin und daraus resultierender gezielter subzellulärer Umverteilung von HIF-1 $\alpha$  gewidmet. Hierdurch gewonnene Erkenntnisse sollen zur Beurteilung des therapeutischen Potentials der Hemmung des intrazellulären Transports zur Behandlung HIF-induzierter Pathologien und Therapieresistenzen beitragen.

## 4.1 Zusammenhang zwischen PHD2- Expression und Bestrahlungsverhalten von Tumorzellen

Die Bestrahlungstherapie bildet einen der Therapie- Grundpfeiler in der Onkologie und wird heutzutage indikationsgerecht und Patienten- individuell in einem breiten Anwendungsbereich eingesetzt [127;128]. Die Strahlenresistenz von Tumorzellen sowie damit verbundene Tumorrezidive stellen dabei ein schwerwiegendes Problem dar. Die Umgehung bzw. Verhinderung der Entstehung von Strahlenresistenzen ist eine große Herausforderung in der Optimierung des Langzeitüberlebens von Patienten. Eine Resistenz gegenüber einer Bestrahlungstherapie ist in verschiedenen Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene begründet. Die Existenz von Krebsstammzellen spielt hierbei eine ebenso wichtige Rolle wie die durch ionisierende Strahlung hervorgerufene Aktivierung intrazellulärer Signalwege [142]. Durch Anpassung des Metabolismus, Einleitung von DNA- Reparaturmechanismen oder Induktion der Angiogenese können Tumorzellen die zytotoxischen Effekte einer Bestrahlung mildern und die Einleitung des Zelltodes verhindern [99;155;351;352]. Viele dieser Signalwege sind insbesondere auch in Sauerstoff- minderversorgten Tumorbereichen, welche sich in soliden Tumoren mit zunehmenden Größenwachstum ausbilden, hochreguliert [97]. Hypoxische Tumore zeichnen sich durch einen aggressiveren Phänotyp aus und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Tumorphoxie führt außerdem durch eine erhöhte Strahlen- und Medikamentenresistenz zu einer deutlichen Minderung des Therapieerfolges [39;44]. Die Inhibierung von Signalwegen, welche für das Überleben der Tumorzellen unverzichtbar sind, stellt daher eine vielversprechende Option zur Steigerung der Behandelbarkeit von Tumoren dar.

Die Hypoxie- induzierbaren Faktoren gelten als zentrale Regulatoren sauerstoffabhängiger Genexpression und weisen in den meisten soliden Tumoren ein erhöhtes Expressionsniveau auf [105]. Eine vermehrte Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  ist dabei mit einer erhöhten Strahlenresistenz verbunden, welche unter anderem durch eine HIF-1 $\alpha$ - regulierte Inhibierung der Apoptose, die Einleitung autophagozytotischer Schritte und eine Umstellung des Zellmetabolismus erklärt werden kann [159]. Aber nicht nur die HIFs, sondern auch eine erhöhte Expression der Prolyl-4-Hydroxylasen (sowohl HIF- abhängig als auch HIF- unabhängig) konnten in den letzten Jahren mit einer schlechteren Tumordifferenzierung und einer Therapieresistenz in Verbindung gebracht werden. Dabei

ist die tumorpathogenetische Rolle der PHD- Isoformen 1- 3 stark Gewebe- und Zelltyp-abhängig [120;123;125;126;353]. PHD2 gilt als Hauptregulator von HIF-1 $\alpha$  und somit als wichtigste Isoform der Hydroxylasen in der molekularen Sauerstoffsensorik [40]. Infolgedessen wurden bisher insbesondere die Zusammenhänge zwischen PHD2-Expression bzw. intrazellulärer Lokalisation und der Strahlenresponsivität von Tumorzelllinien *in vitro* beleuchtet. Dabei konnten ein selektiver PHD2- *knockdown* insgesamt sowie im Speziellen eine niedrige nukleäre PHD2- Expression bereits mit einer erhöhten Strahlensensibilität in Kopf- Hals- Tumoren in Verbindung gebracht werden [179].

Um die Beziehung zwischen PHD2- Expression und Strahlenresponsivität *in vitro* in weiteren Tumorentitäten zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein selektiver PHD2-*knockdown* durch siRNA in Zervix- und Mammakarzinom- Zellen herbeigeführt und die Zellen anschließend einer Behandlung mit ionisierender Strahlung ausgesetzt (s. Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2). Eine PHD2- Defizienz hatte in beiden Tumorzelllinien keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Bestrahlungsverhalten. Eine Inhibierung des Sauerstoffsensorproteins muss daher in diesem Kontext als nicht zielführend bei der Verbesserung des Therapieerfolges einer Bestrahlung beurteilt werden. Eine vermehrte Expression von PHD2, welche durch Transfektion mit Plasmid- DNA erreicht wurde, resultierte in den Mammakarzinom-, jedoch nicht in den Zervixkarzinom- Zellen, bei einer Bestrahlung mit klinisch üblichen Energiedosen von 2 Gray (Gy) in einem signifikant höheren klonogenen Überleben (s. Abbildung 8). Diese Ergebnisse verdeutlichen die bereits beschriebene Zelltyp- abhängige Rolle von PHD2 in Bezug auf die Strahlenresponsivität von Tumorzellen. Bei der Beurteilung von PHD2 als Surrogatparameter der Strahlensensibilität muss dieser Aspekt unbedingt berücksichtigt und eine Vielzahl verschiedener Tumorzelllinien getestet werden, um eine sichere Vorhersage zur Therapieresponsivität treffen zu können. Zumal wurde PHD2 in einigen Arbeiten auch als Tumorsuppressor diskutiert und eine gezielte Ausschaltung von PHD2 könnte in bestimmten Tumoren somit die Tumorprogression begünstigen [125;126]. In Kolonkarzinomzellen konnte jüngst über eine Stabilisierung von PHD2 durch eine metallorganische Ruthenium- Verbindung sogar eine Reduktion von Angiogenese und Tumorwachstum erreicht werden [290].

Ferner wird die Beobachtung unterstützt, dass eine erhöhte Expression von PHD2 in Tumorzellen bei der Tumorphathogenese und Entstehung einer Radioresistenz (zumindest in Teilen) eigenständig neben der Genexpression- induzierenden HIF- Funktion eine Rolle spielt [123]. Eine hohe PHD2- Expression würde theoretisch physiologisch zu niedrigeren HIF- $\alpha$ - Spiegeln führen und HIF- induzierte Signalwege zur Umgehung der Strahlenwirkung inhibieren. Dabei sei jedoch anzumerken, dass in den vorliegenden Versuchsreihen im Zellkulturmodell die HIF- Expression nicht parallel mituntersucht wurde. PHD2 scheint indes eine eigene Funktionsweise in der Entwicklung einer Strahlenresistenz einzunehmen. Denkbar wäre eine PHD2- vermittelte Aktivierung von Rezeptoren, welche über andere Signalwege als die HIF- induzierte Signaltransduktion Proteine und Gene aktivieren, die wiederum eine Radioresistenz begünstigen. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen Jokilehto *et al.*, die PHD2 eine Rolle in der Zelldifferenzierung und -proliferation zusprechen, welche unabhängig von der sauerstoffabhängigen HIF- $\alpha$ - hydroxylierenden Funktion zu sein scheint [123;354;355]. Übereinstimmend mit diesen Überlegungen konnten Kozlova *et al.* jüngst herausfinden, dass PHD2 direkt mit dem in Brustkrebszellen hochregulierten *epidermal growth factor receptor* (EGFR) interagiert und über dessen Stabilisierung für eine Tumorprogression sorgt [120]. Weitere PHD- Isoformen wurden in dieser Arbeit nicht überprüft, sollten aber Gegenstand weiterführender Experimente sein, um deren unterschiedliche Rollen in der Tumorphathophysiologie genauer charakterisieren zu können. Durch gleichzeitige Untersuchung der HIF- Expressionslevel und der Strahlenresponsivität unter hypoxischen Bedingungen würde zudem ein tiefergehendes Verständnis von Prinzipien der Hypoxie-induzierten Strahlenresistenz gewonnen werden können.

Zu beachten sei, dass bei kleiner Stichprobenzahl und hoher Standardabweichung Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen in der statistischen Auswertung als nicht signifikant berechnet wurden. Die absoluten Werte der einzelnen Stichproben sowie der Kurvenverlauf des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung deuten jedoch einen Effekt des PHD2- Protein- *knockdown* auf die Erhöhung der Strahlensensibilität in den untersuchten Zervixkarzinom- Zellen an (s. Abbildung 7). Dies wäre konform mit bereits gewonnenen Erkenntnissen früherer Arbeiten, in denen eine erhöhte PHD2- Expression als Marker für eine Therapieresistenz identifiziert wurde [178;179]. Eine Erhöhung der Stichprobenzahl würde die Aussagekraft der Resultate steigern und ggf. einen signifikanten Unterschied zwischen PHD2- Wildtyp- und PHD2- *knockdown*- Zellen

ergeben. Auch eine Signifikanz der PHD2-Überexpression wäre bei bereits ausdrucksstarken absoluten Werten und einer Erhöhung der Stichprobenzahl zu erwarten. An dieser Stelle muss zudem herausgestellt werden, dass kein vollständiger Protein- *knockout* von PHD2 erreicht werden konnte. Ein Dosiseffekt ist möglich, d.h. ein deutlicheres Ergebnis bei (nahezu) gänzlicher PHD2- Defizienz wäre vorstellbar. In den Studienergebnissen von Lukkaa *et al.* zeigte sich beispielsweise erst ab einem Wert von unter 10 % immunhistochemischem Nachweis von PHD2 in Zellkernen von HNSCC-Tumoren ein signifikant verbessertes Ansprechen auf eine Radiotherapie [179]. Auch die niedriger ausfallende Responsivität der Mammakarzinom- Zellen auf eine Bestrahlung mit einer Energiedosis von 2 Gy könnte auf einen Dosiseffekt zurückgeführt werden, da in diesen Zellen eine stärkere PHD2- Überexpression als in den Zervixkarzinom- Zellen vorlag. Um eine vollständige Defizienz oder eine konstante Überexpression von PHD2 zu erreichen, wäre die Anwendung der CRISPR/ Cas- Methode zur gezielten Einfügung bzw. Entfernung des *EGLN1*- Gens denkbar und könnte die Auswirkung eines Dosiseffektes experimentell umgehen.

Ferner könnte die Analyse der Beziehung zwischen intrazellulärer Lokalisation von PHDs und Bestrahlungsverhalten wichtige weitere Erkenntnisse liefern, welche auf bereits bestehenden Arbeiten aufbauen [179;180]. Im nächsten Schritt sollte eine Ausweitung auf *in vivo* Tumormodelle vorgenommen werden, um den Einfluss gewebespezifischer Mikroumgebungsbedingungen mit in Betracht zu ziehen.

Wie bereits eingangs ausführlich beschrieben, sorgen die PHDs für einen sauerstoffabhängigen Abbau von HIF- $\alpha$  (s. Abschnitt 1.1.4) [22;32;33]. Eine Inhibierung der PHD- Funktion würde dementsprechend zu einer Stabilisierung von HIF- $\alpha$  und einer HIF- induzierten Genexpression führen. Eine gesteigerte HIF- Aktivierung ist jedoch maßgeblich mit einer vermehrten Tumorphiliferation, Invasion, metastatischer Ausbreitung, einem schlechteren Patientenüberleben sowie mit einem verminderten Therapieansprechen assoziiert [61;113;114;118]. Eine HIF- Defizienz führt wiederum zu einem verbesserten Ansprechen auf eine Bestrahlungstherapie [171-173]. Eine dauerhafte Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  konnte außerdem, abgesehen von protumorgenetischen Effekten, mit der Entwicklung von Kardiomyopathien, einer potentiellen Lebertoxizität, der Entstehung diabetogener Stoffwechsellagen sowie der Ausbildung von Polycythämien mit entsprechenden Komplikationen in Verbindung gebracht werden [265;313;314]. Die PHDs scheinen zudem zahlreiche weitere Zielproteine zu hydroxylieren. Deren Anzahl

und Art sind erst in Teilen bekannt und eine generelle Hemmung der PHD- Funktion würde diese Zielmoleküle ebenfalls beeinflussen [355]. Diese und weitere Konsequenzen müssen bei der Anvisierung einer PHD- Inhibierung in der Entwicklung neuer Therapiestrategien zwingend in Betracht gezogen und eingehend eruiert werden.

Die meisten bisher charakterisierten PHD- Inhibitoren weisen außerdem häufig eine unzureichende Selektivität auf. Aufgrund eben genannter Mechanismen sowie durch Beeinflussung HIF- unabhängiger Signalwege können weitreichende Auswirkungen auf den gesamten Organismus entstehen.  $\alpha$ -Ketoglutarat Analoga inhibieren die PHDs in ihrer enzymatischen Funktion, jedoch ist eine Beeinflussung anderer  $\alpha$ -Ketoglutarat- abhängiger Oxygenasen denkbar. Auch Eisenchelatoren, welche die PHD- Funktion effektiv supprimieren können, wirken auf weitere Zielmoleküle, wie beispielsweise Hämoglobin und Myoglobin, sowie auf eisenabhängige Enzyme, z.B. der Steroidhormonsynthese, der Atmungskette oder des zellulären Entgiftungsapparats (Cytochrome, Peroxidasen, Demethylasen u.v.m.). Daher müssen Zeitfenster und Anwendungsmöglichkeiten von PHD- Inhibitoren, beispielsweise eher lokaler Art zur Vermeidung systemischer Nebenwirkungen, genauestens evaluiert werden. Jüngst konnten Inhibitoren entwickelt werden, welche spezifisch auf die HIF- $\alpha$ - hydroxylierende Funktion der PHDs abzielen und bei Patienten mit renaler Anämie in klinischen Studien getestet werden [292;356]. Einer dieser Inhibitoren, Roxadustat, ist seit kurzem auf dem chinesischen Markt für Dialyse- Patienten mit chronischem Nierenversagen zugelassen [312]. Eine Testung dieser Substanzen an PHD- überexprimierenden und strahlenresistenten Tumorzellen war bis dato noch nicht Gegenstand der Forschung.

Die genaue Charakterisierung der PHD- Funktion birgt hohes Potential in der Tumorforschung und eine Entwicklung von Wirkstoffen zur Erhöhung des Therapieansprechens von Tumorzellen ist denkbar. Jedoch stellen die zell- und gewebespezifisch variierende Rolle der PHDs und die Beteiligung von PHDs und HIFs an Hypoxie- unabhängigen Signalwegen eine große Herausforderung dar. Auch die Problematik einer unselektiven Wirkung von Inhibitoren der molekularen Sauerstoffsensoren trägt zur Komplexität der Arzneimittelentwicklung bei.

Die Bestrahlung wurde in dieser Arbeit mit jeweils einmaligen Energiedosen von 2 Gy bis 6 Gy durchgeführt. Beachtet werden muss, dass im klinischen Alltag jedoch meist eine Fraktionierung der Bestrahlung mit Energiedosen von 1,5 Gy bis 3 Gy über mehrere

Wochen durchgeführt wird. Dadurch kann eine Regeneration gesunden Gewebes ermöglicht und die maximal tolerierte Gesamtdosis des Normalgewebes um ein Vielfaches gesteigert werden. Die applizierte Gesamtstrahlendosis ist damit experimentell deutlich geringer als die bei Patienten angewandte. Durch mehrfache Wiederholung der Versuche und stetem Mitführen unbestrahlter Kontrollzellen wurde ferner versucht, Versuchsbedingungen möglichst konstant zu halten und eine Beeinflussung der Ergebnisse durch äußere Faktoren zu begrenzen. Diese können aber in der Klinik bei einem Patienten, der sich einer Bestrahlungstherapie unterzieht, durchaus von hoher Relevanz sein. Zellkulturmodelle mit standardisierten Versuchsreihen wurden in dieser Arbeit dennoch sinnvoll eingesetzt, um elementare Prinzipien der Tumorphagenese und Reaktionen auf verschiedene Therapien *in vitro* zu verstehen und ggf. im nächsten Schritt auf *in vivo* oder intermediäre Modelle übertragen zu können.

Bei der methodischen Verwendung des Koloniebildungstests zur Bestimmung der vitalen Zellen nach Bestrahlung besteht das Problem der langen Inkubationszeit bzw. einer hohen Zelldichte bei starkem Wachstum der Zellpopulation. Infolgedessen kann es zu einem Absterben der Zellen durch Verbrauch der Nährstoffe oder Aktivierung verschiedener Signalwege kommen, welche nicht Gegenstand der Untersuchung waren. In diesen Fällen würde die Aussagekraft der Strahlenwirkung reduziert sein. Durch Aussäen definierter Zellzahlen, welche sich durch mehrfache Testung als praktikabel erwiesen hatten, sowie regelmäßige Überprüfung der Zelldichte unter dem Mikroskop, wurde dieses Problem weitestgehend minimiert. Eine weitere Fehlerquelle besteht in der Zählung der Kolonien durch den Versuchsdurchführenden. Um eine Beeinflussbarkeit durch zu erwartende Ergebnisse zu vermeiden, wurde die Auszählung daher verblindet durchgeführt.

Als weitere Methode zur Bewertung des Zellüberlebens stände der *MTT- Assay* zur Verfügung, welcher insbesondere zur Ermittlung der Chemosensitivität oder Medikamententoxizität genutzt wird. Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit eines hohen Probendurchsatzes in kürzerer Zeit. Der klonogene Assay bestimmt jedoch den Anteil proliferationsfähiger Zellen, wohingegen der *MTT Assay* die metabolische Aktivität von Zellen misst [357;358]. Der klonogene Assay vermeidet im Kontext einer Bestrahlung eine Verfälschung der Werte, indem nur Zellen, welche fähig zur Proliferation sind, überleben, zur Koloniebildung führen und bei der Auswertung berücksichtigt werden. Dieses Prinzip ermöglicht einen genaueren Einblick in die Fähigkeit von Tumorzellen,

toxische Effekte ionisierender Strahlung abzuwehren, die Proliferationsfähigkeit nach Bestrahlung zu erhalten und somit eine Strahlenresistenz auszubilden.

## 4.2 Gezielte subzelluläre Umverteilung von Sauerstoffsensorproteinen als potentielle Therapiestrategie

Aufgrund der räumlichen Trennung verschiedener Signalwege und Funktionen innerhalb der Zelle haben Eukaryoten ein System gerichteter Transportmechanismen entwickelt. Dieses spielt eine entscheidende Rolle in physiologischen Prozessen, wie der Anpassung an veränderte Umweltbedingungen oder der Zelldifferenzierung [182;184-186]. Die zelluläre Transportmaschinerie ist jedoch auch in die pathophysiologischen Abläufe zahlreicher Erkrankungen involviert. In der Vergangenheit konnten exemplarisch eine erhöhte Expression nukleärer Transportrezeptoren sowie Störungen des Kerntransports mit der onkogenen Transformation von Zellen, wie beispielsweise bei der akuten Leukämie, oder auch mit der Motorneuron- Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und der neurodegenerativen Huntington- Krankheit in Verbindung gebracht werden [192-194;243;359]. Zudem ist der intrazelluläre Proteintransport ein wichtiger Schritt in der Entstehung und Ausbreitung viraler und parasitärer Erkrankungen sowie der Vermittlung allergischer Reaktionen [188-191;360;361]. Daher stellt die gezielte subzelluläre Umverteilung von Proteinen eine vielversprechende Strategie in der Entwicklung neuer Medikamente, insbesondere auch in der Krebstherapie, dar. Jüngst konnte mit den *selective inhibitors of nuclear export* (SINE) eine Gruppe CRM1- inhibierender Moleküle charakterisiert werden, welche durch Hemmung des Kernexports zu einer nukleären Akkumulation von Tumorsuppressoren und Zellzyklusinhibitoren sowie zu einer Anreicherung von Chemotherapeutika führen [222;247]. Die Substanz Selinexor wurde vor kurzem zur Behandlung des rezidivierend-refraktären Multiplen Myeloms als Kombinationstherapie mit Dexamethason durch die FDA zugelassen [232].

Die Hypoxie- induzierbaren Faktoren weisen insbesondere in hypoxischen Regionen solider Tumore häufig eine erhöhte Expression auf und HIF- induzierte Signalwege konnten mit einem aggressiveren Phänotyp und Therapieresistenzen in Verbindung gebracht werden [61]. Da die transkriptionellen Funktionen ausschließlich im Zellkern erfüllt und HIFs zwischen Nukleus und Zytoplasma hin- und herbewegt werden können, bietet der subzelluläre Transport ein attraktives Angriffsziel zur Kontrolle HIF- induzierter Signaltransduktion [186]. In verschiedenen Arbeiten gelang die Identifikation unterschiedlicher Transportmechanismen durch die Kernporen- Komplexe der Kernmembran [186;195-198;200]. Für den aktiven Proteintransport sind neben

Transportrezeptoren (den Karyopherinen), welche je nach Transportrichtung als Importine oder Exportine bezeichnet werden, Kernlokalisierungs- oder Kernexportsignale (NLS oder NES) in der Aminosäuresequenz der Zielproteine verantwortlich. Im Rahmen des klassischen Kernimports werden Proteine durch Bindung an den heterodimeren Importin  $\alpha/\beta$ 1-Komplex durch die Kernmembran transportiert. Der Kernimport der HIFs wird vornehmlich durch diesen Transportweg reguliert [186]. In den Transport von HIF-1 $\alpha$  sind zudem weitere Mitglieder der Transportrezeptorfamilie, wozu Importin 4 und 7 gehören, sowie die Interaktion mit Mikrotubuli und Motorproteinen involviert [253-255]. Bisher konnten nur wenige Inhibitoren des nukleären Imports in präklinischen Studien identifiziert werden. Der Einfluss einer spezifischen Inhibition des Importin  $\alpha/\beta$ 1-vermittelten Kerntransports auf den HIF-Signalweg und die molekulare Sauerstoffsensitivität war bisher noch nicht Gegenstand der Forschungen und wurde in dieser Arbeit eingehend untersucht.

Das makrozyklische Lakton Ivermectin wurde bislang als Breitspektrum-Antiparasitikum vor allem in der Behandlung der Onchozerkose und lymphatischen Filariasis sowie in der Veterinärmedizin eingesetzt. 2012 konnte die Substanz durch Wagstaff *et al.* als spezifischer Inhibitor des Importin  $\alpha/\beta$ 1-vermittelten Kerntransports identifiziert werden. Ivermectin hemmt die Interaktion zwischen NLS des Zielproteins und NLS-Bindungstasche von Importin  $\alpha$  und hat keinen inhibierenden Einfluss auf den Transport von NLS-enthaltenden Frachtproteinen, die von anderen Mitgliedern der Karyopherin-Familie erkannt werden [236;237]. Durch diese Wirkungsweise konnte Ivermectin in verschiedenen Studien die Replikation des HI- und Dengue-Virus sowie des Venezolanischen Pferdeenzephalomyelitis-Virus erfolgreich inhibieren [190;237;325-327]. Ferner besitzt die Substanz großes Potential in der Krebstherapie durch Interaktion mit zahlreichen Zielmolekülen, welche beispielsweise Chemoresistenzen oder Proliferation vermitteln [316].

In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Ivermectin auf den Hypoxie-induzierten Signalweg durch Inhibition des Importin  $\alpha/\beta$ 1-vermittelten Kerntransports von HIF-1 $\alpha$  analysiert. Lokalisierungsstudien mittels indirekter Immunfluoreszenz sowie die Auswertung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression in Kernextrakten von humanen Osteosarkom- und Neuroblastom-Tumorzellen konnten zeigen, dass durch Ivermectin die hypoxisch-induzierte nukleäre Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  *in vitro* hemmend beeinflusst werden

kann (s. Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3). Als spezifischer Inhibitor des Importin  $\alpha/\beta$ -vermittelten Kerntransports scheint Ivermectin die Bindung von HIF-1 $\alpha$  an Importin  $\alpha$  und somit den Transport des Transkriptionsfaktors über die Kernmembran erfolgreich zu unterbinden [264]. Übereinstimmend mit dieser Erkenntnis konnten Kosyna *et al.* in Importin  $\alpha/\beta$ - GST- Bindungsstudien bestätigen, dass in Anwesenheit von Ivermectin die Bindung von HIF-1 $\alpha$  an alle Importin  $\alpha$ - Isoformen drastisch reduziert wird. Zudem bleibt bei erniedrigter nukleärer HIF-1 $\alpha$ - Expression die zelluläre Gesamtproteinmenge von HIF-1 $\alpha$  unter Ivermectin- Behandlung annähernd gleich. Daher ist eine Reduktion der nukleären HIF-1 $\alpha$ - Akkumulation durch verminderte Produktion oder gesteigerte Degradierung als unwahrscheinlich zu bewerten [264].

Durch Hemmung der nukleären Translokation inhibiert Ivermectin außerdem die Transaktivierungsfunktion von HIF-1. Ohne suffizienten Transport über die Kernmembran können die HIF- Untereinheiten im Zellkern weder heterodimerisieren noch durch Bindung an die HRE von Zielgenen sauerstoffabhängig die Genexpression induzieren. Diese Annahme konnte unter Anwendung von Luciferase- Reportergen Assays und quantitativer Real- Time- Polymerase- Kettenreaktion bestätigt werden (s. Abschnitte 3.2.4 und 3.2.5). Humane Osteosarkom- und hepatozellulären Karzinom- Zellen, welche transient bzw. stabil mit einem Hypoxie- responsiven Luciferase- Reportergenkonstrukt transfiziert worden sind, zeigten unter Ivermectin Behandlung eine signifikante Abnahme der Firefly- Luziferase- Aktivität als Korrelat für die reduzierte Rate der HIF-1- abhängigen Genexpression (s. Abbildung 14) [264]. Entsprechende Ergebnisse ergab auch die Analyse HIF-1- abhängiger Zielgenexpression durch quantitative Real- Time- Polymerase- Kettenreaktion. Über die Blockade des Importin  $\alpha/\beta$ - abhängigen Kerntransports konnte Ivermectin die Expression des HIF-1- abhängigen Zielgens *solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1)* erfolgreich inhibieren (s. Abbildung 16) [264].

Im Hinblick auf das Ausmaß Ivermectin- vermittelter Effekte konnten Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien beobachtet werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Karyopherine ein ungleiches Ausprägungsniveau in den einzelnen Zelllinien aufweisen. Dazu passend konnten unter anderem Li *et al.* feststellen, dass die Transportrezeptoren in verschiedenen Geweben in Abhängigkeit der jeweiligen Funktion unterschiedlich stark exprimiert sind [207;362;363]. Insgesamt liegt die intrazelluläre Transportmaschinerie in Eukaryoten evolutionär hoch konserviert vor, eine Auswirkung Ivermectin- vermittelter Inhibition kann daher generell erwartet werden [364]. Wichtig ist

jedoch zu beachten, dass die zum Transport zur Verfügung stehende Importinmenge unter Einfluss von Stressfaktoren limitiert ist [365-367]. Oxidativer Stress, Hitzeschock und ultraviolette Strahlung resultieren beispielsweise in einer Retention von Importin  $\alpha$  im Zellkern und somit zur Hemmung dessen weiterer Transportfunktionen [365]. Unter hypoxischen Bedingungen, welche zu oxidativem Stress führen, wäre daher ebenfalls eine Zelltyp- abhängige Reduktion der funktionsfähigen Importinmenge denkbar.

In allen untersuchten Tumorentitäten konnte der HIF- Signalweg durch Ivermectin, zumindest in Teilen, unterbrochen werden, wodurch ein entscheidender Einfluss auf die molekulare Sauerstoffsensitivität und HIF- vermittelte Geninduktion genommen wird [264]. Hierin kann ein potentiell abschwächender Effekt auf eine HIF- verursachte Tumoraggressivität und Therapieresistenz liegen, welcher durch Ausweitung der Versuchsreihen auf Tumorsphäroide und im nächsten Schritt auf *in vivo* Tumormodelle weitergehend überprüft werden sollte. Da eine HIF- Stabilisierung zu einer gesteigerten Bestrahlungsresistenz führt, ist es zudem denkbar, dass eine Modifikation des Kernimports der HIFs die Strahlensensibilität von Tumorzellen beeinflusst. Durch Anwendung von Röntgenbremsstrahlung und Koloniebildungstests könnte dieser Effekt *in vitro* getestet werden.

Ein wichtiger Aspekt in der Beurteilung Ivermectin- hervorgerufener Effekte ist der unselektive Einfluss auf den Importin  $\alpha/\beta$ 1- abhängigen Transport anderer Zielproteine als HIF-1 $\alpha$  sowie auf die Funktionen der Transportrezeptoren, welche unabhängig vom Proteintransport über die Kernmembran sind. Zu weiteren Frachtproteinen zählen Moleküle, die unter anderem zentral in Zelldifferenzierungs- und Entwicklungsprozesse, die Vermittlung zirkadianer Rhythmik oder immunregulatorische Abläufe involviert sind [184;186;191]. Diese würden ebenfalls von einer Inhibition der Transportmaschinerie beeinflusst werden, wodurch weitreichende Konsequenzen, beispielweise für die Ausreifung von (Nerven-) Zellen, die Embryonalentwicklung oder Fertilität, entstehen könnten. Diese unerwünschten Wirkungen werden dadurch verstärkt, dass Ivermectin die Bindung von Zielproteinen an alle Importin  $\alpha$ - Isoformen deutlich zu reduzieren vermag [264]. Dadurch kann der Funktionsverlust einer einzelnen Importin  $\alpha$ - Isoform nicht durch die anderen kompensiert werden, wie es physiologisch bei wichtigen Frachtproteinen und Signalwegen der Fall zu sein scheint [186]. Bei diesen Überlegungen muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass unter hypoxischen Bedingungen eine Stabilisierung und nachfolgende Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  stattfindet und die

sauerstoffabhängige Signaltransduktion in dieser Situation entscheidend von den nukleären Transportmechanismen abhängt. Als Folge einer gesteigerten HIF- Proteinmenge ist es daher zu erwarten, dass der Effekt Ivermectin- vermittelter Importin  $\alpha/\beta$ - Inhibition auf den Kernimport der HIFs stärker ausfallen wird als der auf weitere Importin  $\alpha/\beta$ - Zielproteine. Diese würden unter hypoxischen Bedingungen keine Hochregulation erfahren oder könnten einen Funktionsausfall der Transportmaschinerie eventuell länger tolerieren. Dennoch könnten weitere Funktionen der Importine, zu denen z.B. die Kontrolle der Formation des Spindelapparats während der Mitose und Meiose zählt, durch Substanzen wie Ivermectin unterbunden werden [220]. Hierdurch entscheidend beeinflusste Schritte des Zellzyklus könnten zu Störungen von Zellproliferation und Zellregeneration sowie möglicherweise zu chromosomalen Veränderungen von Tochterzellen führen. Hiermit übereinstimmend sind die Erkenntnisse von Geles *et al.*, die unter Depletion bestimmter Importin  $\alpha$ - Isoformen in Fadenwürmern eine embryonale Letalität und schwere chromosomale Verteilungsstörungen beobachten konnten [368]. Importin  $\alpha$ 7- *knockout* Mäuse zeigten sich in Studien von Rother *et al.* zwar lebensfähig, wiesen jedoch eine Infertilität auf, welche auf eine gestörte Aktivierung zygotischer Gene zurückzuführen war [369]. Ob Ivermectin durch Interaktion mit der NLS- Bindungstasche die vielfältigen Funktionen von Importin  $\alpha$ , welche neben der Proteintransportfunktion existieren, beeinflusst und somit ungeahnte Effekte haben könnte, sollte daher weitergehend geprüft werden.

In dieser Arbeit wurde, unter anderem, der Einfluss von Ivermectin auf die intrazelluläre Lokalisation und nukleäre Akkumulation von HIF-1 $\alpha$ , nicht aber von weiteren HIF- Untereinheiten, untersucht. Zahlreiche Studien konnten in der Vergangenheit belegen, dass die Rolle der Untereinheiten HIF-1 $\alpha$  bzw. HIF-2 $\alpha$  sowohl in physiologischen als auch pathologischen Prozessen, zumindest in Teilen bzw. Zelltyp- abhängig, divergiert. HIF-2 $\alpha$  zeigt unter hypoxischen Bedingungen beispielsweise eine langsamere und länger andauernde Induktion und kann die Translation von Proteinen auf alternativen Wegen aktivieren. HIF-1 $\alpha$  stimuliert ferner die Expression glykolytischer Enzyme, wohingegen HIF-2 $\alpha$  Hauptregulator des *EPO*- Gens zu sein scheint [5;252]. Exemplarisch sind in Brustkrebszellen die hypoxisch- induzierte Genexpression und Tumorprogression maßgeblich abhängig von HIF-1 $\alpha$ , in Nierenzellkarzinomen jedoch von HIF-2 $\alpha$  [370;371]. Zudem wurden den HIF- Untereinheiten sowohl pro- als auch antitumorigenische Effekte nachgewiesen, welche ebenfalls entscheidend vom Zelltyp abhängig sind [371]. Daher ist

es unbedingt notwendig, dass der Effekt von Ivermectin auf weitere HIF- Untereinheiten in Betracht gezogen und eingehend analysiert wird. Zumal mit der direkten, Importin  $\alpha$ -unabhängigen Bindung von HIF-2 $\alpha$  an Importin  $\beta$  ein Transportweg für HIF-2 $\alpha$  existiert, welcher von Ivermectin nicht tangiert werden sollte [186]. Eine genaue Charakterisierung des Ausprägungsgrades der einzelnen Untereinheiten in verschiedenen Tumorentitäten sowie der Einfluss von Ivermectin auf diese sind essentiell bei der Beurteilung des Potentials von Ivermectin in der Tumorthherapie. Aussichtsreich wäre eine auf den Patienten individuell abgestimmte Therapie durch vorherige Analyse des HIF-Expressionsniveaus sowie der einzelnen HIF- Untereinheiten, Mutationen und Transportrezeptormoleküle im Zielgewebe.

Außerdem darf die physiologische Funktion der HIFs, insbesondere in der Anpassung an reduzierte Sauerstoffbedingungen, auf keinen Fall außer Acht gelassen werden (s. Abschnitt 1.1.5). Eine systemische Hemmung des HIF- Signalweges könnte weitreichende Konsequenzen für den gesamten Organismus haben und z.B. eine Anämie verstärken oder die Regeneration von Geweben nach Ischämien verhindern. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass Tumorzellen durch ihren gesteigerten Metabolismus und ihre vermehrte Proliferationsrate eine höhere Sensibilität gegenüber einer Inhibition der intrazellulären Transportmaschinerie aufweisen als gesunde Zellen [222;225]. Sharmeen *et al.* fanden anhand von Zellkulturmodellen akuter myeloischer Leukämiezellen heraus, dass Ivermectin bereits in niedrigen mikromolaren Dosen von 10  $\mu$ M den Zelltod herbei führt, gesunde hämatopoetische Zellen aber überleben [332]. Durch diesen Unterschied in der Sensitivität zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen könnten unerwünschte systemische Nebenwirkungen bei entsprechender Dosis gemildert werden.

Zuletzt gilt Ivermectin jedoch auch als sogenanntes „schmutziges Medikament (*Dirty Drug*)“. Neben seiner eigentlichen Wirkung, der Bindung an Glutamat- und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)- aktivierte Chloridkanäle, interagiert die Substanz mit zahlreichen weiteren Proteinen und Bindungspartnern, z.B. Importin  $\alpha$ . Hierin ist einerseits das breite Potential in der Krebstherapie begründet, da Ivermectin verschiedenste Signalwege, die tumorgenetisch relevant sind, beeinflusst. Exemplarisch kann Ivermectin die Bioverfügbarkeit von Chemotherapeutika durch Inhibierung des MDR- Proteins erhöhen und auch eine Reduktion von Krebsstammzellen bewirken [330;331]. Hochselektive Chemotherapeutika, welche lediglich spezifisch auf einzelne Komponenten in Tumorzellen wirken, führen häufig zu Medikamentenresistenzen. Eine „mehrzellige“ Substanz wie

Ivermectin könnte genau solche Resistenzmechanismen umgehen. Außerdem konnten Nagai *et al.* unlängst herausfinden, dass Ivermectin durch Induktion einer Cytochrom-C-Oxidase die ATP Produktion in den Mitochondrien hypoxischer Kardiomyozyten aufrechterhalten und dadurch auch eine Hypertrophie des Herzmuskels mindern und die kardiale Funktion verbessern kann [372]. Über die antiviralen Effekte wurde bereits berichtet. Die Wirkungen von Ivermectin sind also vielfältig und noch längst nicht in ihrer vollen Bandbreite identifiziert. Das sich ergebende therapeutische Potential der Substanz erscheint groß. Andererseits kann es aber durch eben diese unspezifischen und vielfältigen Bindungspartner zu unbeabsichtigten und unvorhersehbaren Nebenwirkungen kommen. Von Vorteil ist jedoch, dass Nebenwirkungs- und Interaktionsprofile von Ivermectin durch die jahrelange Anwendung als Antiparasitikum an Millionen von Patienten weitestgehend detailliert bekannt sind. Vor einem möglichen klinischen Einsatz müssen jedoch die notwendige Dosis, Dauer und Art der Anwendung sowie die systemischen Auswirkungen einer Ivermectin- Behandlung in einem durch tumorpathophysiologische Prozesse veränderten Organismus genauestens analysiert werden. Bisher durchgeführte *in vivo* und *in vitro* Studien zeigten, dass die tumortherapeutischen Eigenschaften von Ivermectin in Konzentrationsbereichen erreicht werden können, welche nach ausführlicher Testung an gesunden oder parasitär erkrankten Patienten als sicher und nebenwirkungsarm gelten [316]. Eine Neupositionierung von Ivermectin von einem antiparasitären und antiviralen zu einem komplementären Medikament in der Krebstherapie sowie eine Einbindung in klinische Studien an Tumorpatienten in naher Zukunft sind daher durchaus vorstellbar [341;373].

Bisher entwickelte Inhibitoren des HIF- Signalweges zielen vor allem auf eine Suppression der HIF- Aktivität durch Inhibierung einzelner Komponenten der Proteinsynthese, der Proteinstabilisierung oder der transkriptionellen Aktivität ab (s. Abschnitt 1.5.1) [5;263]. Da die Aktivierung bzw. Stabilisierung der HIFs jedoch durch viele verschiedene Signalwege gesteuert wird, ist die Entwicklung ganzheitlicher Inhibitoren der HIF-vermittelten Signaltransduktion schwierig. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit der Inhibition des Transports über die Kernmembran ein vielversprechendes neuartiges Prinzip der HIF- Kontrolle existiert, da an diesem Punkt die verschiedenen HIF-aktivierenden Signalwege zusammenlaufen und der Schritt der nukleären Translokation entscheidend für die weitere Erfüllung der HIF- Funktion ist [264]. Um eine unselektive Hemmung des Transports weiterer Frachtproteine von Importin  $\alpha/\beta 1$  zu verhindern, wäre

es zielführend, anstelle eines Inhibitors wie Ivermectin spezifischere Substanzen zu entwickeln, welche selektiv auf die Interaktion zwischen HIFs und Importin  $\alpha$  Einfluss nehmen. Die Entwicklung von Peptiden könnte einen attraktiven Ansatzpunkt auf diesem Weg darstellen. Arafah *et al.* und Flores *et al.* gelang beispielsweise jüngst die Entwicklung spezifischer Peptide, welche durch Interaktion mit Importin 7 und Importin 9 den Kernimport bestimmter Mitogen-aktivierter-Kinasen inhibieren und so eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von Krebszellen ausüben [240;241]. Durch Kopplung von Peptiden oder anderen Molekülen an Antikörper, die spezifisch an Antigene von Tumorzellen binden, könnte zudem möglicherweise eine exklusive Wirkung auf Tumorzellen und eine Erhaltung der protektiven, physiologischen Funktionen der HIFs in gesunden Zellen erreicht werden. Eine selektive Hemmung weiterer Komponenten des intrazellulären Transportapparats, wie es z.B. in Form einer spezifischen Inhibierung von Importin  $\beta$  durch Importazole oder Aminothiazole bereits beschrieben wurde, ist ein weiterer vielversprechender Vorstoß zur Inhibierung Tumor- charakteristischer Signalwege [233-235].

Unabhängig vom HIF- Signalweg konnte die Überexpression bestimmter Transportrezeptoren als prognostischer Marker verschiedener Pathologien, insbesondere von Krebserkrankungen, identifiziert werden. So wurde beispielsweise eine erhöhte CRM1- Expression als negativer Prädiktor in verschiedenen Tumoren beschrieben, beispielsweise in Adenokarzinomen des Pankreas oder Tumoren der Brustdrüse [222;374;375]. Sowohl Importin  $\beta$ 1 als auch Importin 4 konnten in Magenkarzinomzellen mit einer Steigerung der Proliferation, einer schlechten Prognose und einer Chemotherapieresistenz in Verbindung gebracht werden [376;377]. Zudem konnte eine erhöhte Expression von Importinen und Exportinen im Herzmuskelgewebe von Patienten mit ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie gefunden werden [378]. Diese Zusammenhänge können dabei sowohl auf die Transportfunktion für Transkriptionsfaktoren, welche beispielsweise Proliferation und Zellzyklus regulieren, als auch auf weitere Funktionen der Transportrezeptoren in Zytoplasma und Nukleus, wie z.B. die Interaktion mit Rezeptorproteinen an der Zellmembran oder die Regulation DNA-bindender Proteine, zurückgeführt werden [187].

Importin  $\alpha/\beta$ 1- Inhibitoren haben das Potential, eine Re- bzw. Mislokalisierung von Proteinen innerhalb der subzellulären Kompartimente und auch eine Hemmung weiterer Funktionen der Importine und Exportine zu erreichen. Daher stellt deren Charakterisierung

und präzise Untersuchung einen vielversprechenden Fortschritt in der weiteren Entwicklung von Strategien zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen dar. Natürlich sind in die pathophysiologischen Prozesse von Krebs-, Infektions- und weiteren Erkrankungen zahlreiche unterschiedliche Moleküle, Mechanismen und Signalwege involviert, in deren Abläufe gängige Medikamente bereits eingreifen. Die Anwendung von Inhibitoren intrazellulärer Transportwege offeriert jedoch die Möglichkeit, in Form einer Kombinationstherapie mit bereits existierenden Medikamenten das Therapieansprechen zu verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Alle Zellen höherer Organismen sind zum Überleben auf eine kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff angewiesen. Die Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase unter variierenden Umweltbedingungen unterliegt einer präzisen Regulation auf systemischer, lokaler und molekularer Ebene. Im Rahmen zellulärer Anpassungsmechanismen an eine reduzierte Sauerstoffversorgung nehmen die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) als heterodimere Transkriptionsfaktoren sowie deren regulierenden Enzyme, insbesondere die Prolyl-4-Hydroxylasen (PHDs), eine Schlüsselrolle ein. Die Isoform PHD2 gilt dabei als wichtigster Regulator der HIF-1 $\alpha$ -Stabilität und als zentrales Protein in der molekularen Sauerstoffsensitivität. Sowohl die HIF- als auch die PHD-vermittelte Signaltransduktion spielen jedoch auch in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, wie z.B. bei der Entstehung von Tumoren, eine wichtige Rolle. HIF-induzierte Signalwege sowie eine erhöhte Expression von PHD2 konnten mit einer malignen Progression und der Resistenz gegenüber einer Strahlentherapie verschiedener Tumore in Verbindung gebracht werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde durch einen siRNA-vermittelten *knockdown* und eine Plasmid-DNA-vermittelte Überexpression der Zelltyp-abhängige Einfluss der PHD2-Expression auf das Bestrahlungsverhalten von Tumorzellen *in vitro* untersucht. Dabei konnte keine statistisch signifikante Erhöhung der Strahlensensibilität in PHD2-defizienten Zervix- und Mammakarzinom-Zellen festgestellt werden. PHD2-überexprimierende Mammakarzinom-Zellen zeigten bei einer Energiedosis von 2 Gray jedoch eine signifikant verminderte Strahlensensibilität. Diese Resultate bestätigen die Zelltyp-abhängige Rolle von PHD2 in Bezug auf die Strahlenresponsivität von Tumorzellen, welche unabhängig von der sauerstoffabhängigen HIF- $\alpha$ -hydroxylierenden Funktion zu sein scheint.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung des spezifischen Importin  $\alpha/\beta$ 1-Inhibitors Ivermectin auf den HIF-Signalweg und die molekulare Sauerstoffsensitivität *in vitro* analysiert. Durch eine Behandlung mit Ivermectin konnten eine verminderte hypoxisch-induzierte nukleäre Akkumulation und Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$ , eine Hemmung der transkriptionellen Funktion sowie eine Inhibierung HIF-1-abhängiger Zielgenexpression in verschiedenen Tumorzelllinien erreicht werden. Durch Inhibierung des Importin  $\alpha/\beta$ 1-vermittelten Kerntransports kann somit ein entscheidender Einfluss auf

die molekulare Sauerstoffsensorik und die HIF- vermittelte Geninduktion genommen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse verdeutlichen, dass eine spezifische und selektive Inhibition sowie eine gezielte Umverteilung von Proteinen innerhalb der subzellulären Kompartimente ein hohes therapeutisches Potential in der Optimierung des Therapieansprechens von Tumoren und anderen Leiden besitzen. Die umfassende Kenntnis über PHD- und HIF- kontrollierte und –kontrollierende Signalwege sowie das Verständnis der molekularen Sauerstoffsensorik in Physiologie und Pathophysiologie stellen einen essentiellen und vielversprechenden Fortschritt in der weiteren Entwicklung von Strategien zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen dar.

## 6 Literatur

1. Ehmke, H.: Atmung. In *Duale Reihe Physiologie* (Behrends, J.C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., Wischmeyer, E.) 2. Auflage, Kapitel 8: 224-265, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2010.
2. Jelkmann, W.: Atemgastransport. In *Physiologie des Menschen* (Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M.) 31. Auflage, Kapitel 8: 741-750, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010.
3. Pohl, U.: Der Sauerstoff im Gewebe- Substrat, Signal, Noxe. In *Physiologie des Menschen* (Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M.) 31. Auflage, Kapitel 8: 764-777, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010.
4. Berg, M.J., Gatto, jr.G.J., Stryer, L., Tymoczko, J.L.: Die oxidative Phosphorylierung. In *Stryer Biochemie* 8. Auflage, Kapitel 18: 621-636, Springer-Verlag GmbH Deutschland, Berlin, 2018.
5. Bishop, T. and Ratcliffe, P.J.: Signaling hypoxia by hypoxia-inducible factor protein hydroxylases: a historical overview and future perspectives. *Hypoxia. (Auckl.)* 2, 197-213, 2014.
6. Chen, C., Tang, Q., Zhang, Y., Yu, M., Jing, W., Tian, W.: Physioxia: a more effective approach for culturing human adipose-derived stem cells for cell transplantation. *Stem Cell Res. Ther.* 9, 148, 2018.
7. Frahm, S.O., Kellner, U., Krams, M., Mawrin, C.: Grundlagen der Pathologie. In *Kurzlehrbuch Pathologie*, Kapitel 1: 11-13, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2010.
8. Ke, Q. and Costa, M.: Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* 70, 1469-1480, 2006.
9. Wang, G.L. and Semenza, G.L.: Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270, 1230-1237, 1995.
10. Semenza, G.L.: A compendium of proteins that interact with HIF-1alpha. *Exp. Cell Res.* 356, 128-135, 2017.
11. Semenza, G.L. and Wang, G.L.: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* 12, 5447-5454, 1992.
12. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L.: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5510-5514, 1995.
13. Crews, S.T.: Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* 12, 607-620, 1998.

14. Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J.: Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 11205-11214, 1997.
15. Masoud, G.N. and Li, W.: HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* 5, 378-389, 2015.
16. Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., Bruick, R.K.: FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 16, 1466-1471, 2002.
17. Liu, P., Fang, X., Song, Y., Jiang, J.X., He, Q.J., Liu, X.J.: Expression of hypoxia-inducible factor 3alpha in hepatocellular carcinoma and its association with other hypoxia-inducible factors. *Exp. Ther. Med.* 11, 2470-2476, 2016.
18. Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., Imura, N.: Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 808-813, 2001.
19. Tanaka, T., Wiesener, M., Bernhardt, W., Eckardt, K.U., Warnecke, C.: The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochem. J.* 424, 143-151, 2009.
20. Augstein, A., Poitz, D.M., Braun-Dullaeus, R.C., Strasser, R.H., Schmeisser, A.: Cell-specific and hypoxia-dependent regulation of human HIF-3alpha: inhibition of the expression of HIF target genes in vascular cells. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 2627-2642, 2011.
21. Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C. et al.: Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 275, 25733-25741, 2000.
22. Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J. et al.: Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472, 2001.
23. Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H. et al.: Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111, 709-720, 2002.
24. Lafleur, V.N., Richard, S., Richard, D.E.: Transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) by the protein arginine methyltransferase PRMT1. *Mol. Biol. Cell* 25, 925-935, 2014.
25. Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., Pouyssegur, J.: p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32631-32637, 1999.

26. Han, X., Wang, X.L., Li, Q., Dong, X.X., Zhang, J.S., Yan, Q.C.: HIF-1alpha SUMOylation affects the stability and transcriptional activity of HIF-1alpha in human lens epithelial cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 253, 1279-1290, 2015.
27. Mandl, M., Lieberum, M.K., Depping, R.: A HIF-1alpha-driven feed-forward loop augments HIF signalling in Hep3B cells by upregulation of ARNT. *Cell Death. Dis.* 7, e2284, 2016.
28. Mandl, M., Kapeller, B., Lieber, R., Macfelda, K.: Hypoxia-inducible factor-1beta (HIF-1beta) is upregulated in a HIF-1alpha-dependent manner in 518A2 human melanoma cells under hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 166-172, 2013.
29. Mandl, M. and Depping, R.: Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1beta): is it a rare exception? *Mol. Med.* 20, 215-220, 2014.
30. Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., Poellinger, L.: Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 5667-5672, 1997.
31. Salceda, S. and Caro, J.: Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272, 22642-22647, 1997.
32. Appelhoff, R.J., Tian, Y.M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W. et al.: Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 279, 38458-38465, 2004.
33. Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R. et al.: C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43-54, 2001.
34. Masson, N. and Ratcliffe, P.J.: HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J. Cell Sci.* 116, 3041-3049, 2003.
35. Mole, D.R., Schlemminger, I., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. et al.: 2-oxoglutarate analogue inhibitors of HIF prolyl hydroxylase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 2677-2680, 2003.
36. Cummins, E.P., Seeballuck, F., Keely, S.J., Mangan, N.E., Callanan, J.J., Fallon, P.G. et al.: The hydroxylase inhibitor dimethylxalylglycine is protective in a murine model of colitis. *Gastroenterology* 134, 156-165, 2008.
37. Hirsila, M., Koivunen, P., Xu, L., Seeley, T., Kivirikko, K.I., Myllyharju, J.: Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *FASEB J.* 19, 1308-1310, 2005.

38. Knowles, H.J., Raval, R.R., Harris, A.L., Ratcliffe, P.J.: Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res.* 63, 1764-1768, 2003.
39. Ratcliffe, P.J.: Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J. Physiol* 591, 2027-2042, 2013.
40. Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., Pouyssegur, J.: HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J.* 22, 4082-4090, 2003.
41. Metzzen, E., Stiehl, D.P., Doege, K., Marxsen, J.H., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W.: Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem. J.* 387, 711-717, 2005.
42. Steinhoff, A., Pientka, F.K., Mockel, S., Kettelhake, A., Hartmann, E., Kohler, M. et al.: Cellular oxygen sensing: Importins and exportins are mediators of intracellular localisation of prolyl-4-hydroxylases PHD1 and PHD2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 705-711, 2009.
43. Wotzlaw, C. and Fandrey, J.: Monitoring of cellular responses to hypoxia. *Methods Mol. Biol.* 591, 243-255, 2010.
44. Jokilehto, T. and Jaakkola, P.M.: The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. *J. Cell Mol. Med.* 14, 758-770, 2010.
45. Hon, W.C., Wilson, M.I., Harlos, K., Claridge, T.D., Schofield, C.J., Pugh, C.W. et al.: Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* 417, 975-978, 2002.
46. Kaelin, W.G., Jr. and Ratcliffe, P.J.: Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 30, 393-402, 2008.
47. Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W.: Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10430-10435, 2000.
48. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M. et al.: HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292, 464-468, 2001.
49. Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., Whitelaw, M.L.: Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295, 858-861, 2002.
50. Page, E.L., Robitaille, G.A., Pouyssegur, J., Richard, D.E.: Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J. Biol. Chem.* 277, 48403-48409, 2002.

51. van, U.P., Kenneth, N.S., Rocha, S.: Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem. J.* 412, 477-484, 2008.
52. Semenza, G.L.: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721-732, 2003.
53. Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G. et al.: Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 63, 1138-1143, 2003.
54. Schaffer, L., Scheid, A., Spielmann, P., Breymann, C., Zimmermann, R., Meuli, M. et al.: Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta* 24, 941-950, 2003.
55. Kalousi, A., Mylonis, I., Politou, A.S., Chachami, G., Paraskeva, E., Simos, G.: Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J. Cell Sci.* 123, 2976-2986, 2010.
56. Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A. et al.: Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J. Biol. Chem.* 281, 33095-33106, 2006.
57. Wenger, R.H., Stiehl, D.P., Camenisch, G.: Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci. STKE.* 2005, re12, 2005.
58. Wang, V., Davis, D.A., Haque, M., Huang, L.E., Yarchoan, R.: Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. *Cancer Res.* 65, 3299-3306, 2005.
59. Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.J. et al.: HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 20, 557-570, 2006.
60. Hu, C.J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H., Simon, M.C.: The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol. Biol. Cell* 18, 4528-4542, 2007.
61. Semenza, G.L.: Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu. Rev. Pathol.* 9, 47-71, 2014.
62. Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q. et al.: Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659-669, 2005.
63. Gruber, M., Hu, C.J., Johnson, R.S., Brown, E.J., Keith, B., Simon, M.C.: Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 2301-2306, 2007.
64. Conway, E.M., Collen, D., Carmeliet, P.: Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res.* 49, 507-521, 2001.

65. Hellwig-Burgel, T., Stiehl, D.P., Katschinski, D.M., Marxsen, J., Kreft, B., Jelkmann, W.: VEGF production by primary human renal proximal tubular cells: requirement of HIF-1, PI3-kinase and MAPKK-1 signaling. *Cell Physiol Biochem.* 15, 99-108, 2005.
66. Lee, S.H., Wolf, P.L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S.W., Thistlethwaite, P.A.: Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N. Engl. J. Med.* 342, 626-633, 2000.
67. Dang, C.V. and Semenza, G.L.: Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 24, 68-72, 1999.
68. Wenger, R.H.: Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* 16, 1151-1162, 2002.
69. Pescador, N., Villar, D., Cifuentes, D., Garcia-Rocha, M., Ortiz-Barahona, A., Vazquez, S. et al.: Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS. One.* 5, e9644, 2010.
70. Semenza, G.L.: Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76, 347-353, 2011.
71. Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M. et al.: Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 19611-19616, 2011.
72. Singh, D., Arora, R., Kaur, P., Singh, B., Mannan, R., Arora, S.: Overexpression of hypoxia-inducible factor and metabolic pathways: possible targets of cancer. *Cell Biosci.* 7, 62, 2017.
73. Yun, Z., Maecker, H.L., Johnson, R.S., Giaccia, A.J.: Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev. Cell* 2, 331-341, 2002.
74. Hellwig-Burgel, T., Stiehl, D.P., Wagner, A.E., Metzen, E., Jelkmann, W.: Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J. Interferon Cytokine Res.* 25, 297-310, 2005.
75. Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H. et al.: Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149-162, 1998.
76. Yoon, D., Pastore, Y.D., Divoky, V., Liu, E., Mlodnicka, A.E., Rainey, K. et al.: Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J. Biol. Chem.* 281, 25703-25711, 2006.

77. Abe, H., Semba, H., Takeda, N.: The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *J. Atheroscler. Thromb.* 24, 884-894, 2017.
78. Yu, A.Y., Shimoda, L.A., Iyer, N.V., Huso, D.L., Sun, X., McWilliams, R. et al.: Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J. Clin. Invest* 103, 691-696, 1999.
79. Peng, Y.J., Nanduri, J., Yuan, G., Wang, N., Deneris, E., Pendyala, S. et al.: NADPH oxidase is required for the sensory plasticity of the carotid body by chronic intermittent hypoxia. *J. Neurosci.* 29, 4903-4910, 2009.
80. Ozaki, H., Yu, A.Y., Della, N., Ozaki, K., Luna, J.D., Yamada, H. et al.: Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 182-189, 1999.
81. Warbrick, I. and Rabkin, S.W.: Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1alpha) as a factor mediating the relationship between obesity and heart failure with preserved ejection fraction. *Obes. Rev.* 20, 701-712, 2019.
82. Destatis- Statistisches Bundesamt Deutschland. Todesursachen. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>. Zugriff am 09.08.2019.
83. Zentrum für Krebsregisterdaten. Krebsarten. Robert Koch Institut. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html). Zugriff am 09.08.2019.
84. Manjili, M.H.: Tumor Dormancy and Relapse: From a Natural Byproduct of Evolution to a Disease State. *Cancer Res.* 77, 2564-2569, 2017.
85. Frank, S.A.: Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Somatic evolutionary genomics: mutations during development cause highly variable genetic mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107 Suppl 1, 1725-1730, 2010.
86. Hiddemann, W., Huber, H., Bartram, C.R.: Was ist Krebs? In *Die Onkologie. Teil I: Allgemeiner Teil* 1. Auflage, Kapitel 1: 8-10, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2004.
87. Hung, M.C. and Lau, Y.K.: Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin. Oncol.* 26, 51-59, 1999.
88. Brosh, R. and Rotter, V.: When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* 9, 701-713, 2009.
89. Lee, S.Y., Jeong, E.K., Ju, M.K., Jeon, H.M., Kim, M.Y., Kim, C.H. et al.: Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol. Cancer* 16, 10, 2017.

90. Mims, J., Bansal, N., Bharadwaj, M.S., Chen, X., Molina, A.J., Tsang, A.W. et al.: Energy metabolism in a matched model of radiation resistance for head and neck squamous cell cancer. *Radiat. Res.* 183, 291-304, 2015.
91. Nagao, A., Kobayashi, M., Koyasu, S., Chow, C.C.T., Harada, H.: HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2019.
92. Szatrowski, T.P. and Nathan, C.F.: Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 51, 794-798, 1991.
93. Fiaschi, T. and Chiarugi, P.: Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 762825, 2012.
94. Svineng, G., Ravuri, C., Rikardsen, O., Huseby, N.E., Winberg, J.O.: The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connect. Tissue Res.* 49, 197-202, 2008.
95. Chiarugi, P., Pani, G., Giannoni, E., Taddei, L., Colavitti, R., Raugei, G. et al.: Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J. Cell Biol.* 161, 933-944, 2003.
96. Weber, K.J. and Wenz, F.: Strahlenbiologische Grundlagen. In *Strahlentherapie* (Wannenmacher, M., Wenz, F., Debus, J.) 2. Auflage, Kapitel 3: 48-78, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013.
97. Folkman, J.: Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 273-286, 2007.
98. Vaupel, P., Hockel, M., Mayer, A.: Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. *Antioxid. Redox. Signal.* 9, 1221-1235, 2007.
99. Dewhirst, M.W., Cao, Y., Moeller, B.: Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer* 8, 425-437, 2008.
100. Mansfield, K.D., Guzy, R.D., Pan, Y., Young, R.M., Cash, T.P., Schumacker, P.T. et al.: Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- $\alpha$  activation. *Cell Metab* 1, 393-399, 2005.
101. Hsieh, C.H., Lee, C.H., Liang, J.A., Yu, C.Y., Shyu, W.C.: Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity. *Oncol. Rep.* 24, 1629-1636, 2010.
102. Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., Azab, A.K.: The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia. (Auckl.)* 3, 83-92, 2015.
103. Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., Colgan, S.P.: Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 62, 3387-3394, 2002.

104. Bertout, J.A., Patel, S.A., Simon, M.C.: The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 967-975, 2008.
105. Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. et al.: The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* 157, 411-421, 2000.
106. Quintero, M., Brennan, P.A., Thomas, G.J., Moncada, S.: Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in cancer: role of free radical formation. *Cancer Res.* 66, 770-774, 2006.
107. Bell, E.L., Klimova, T.A., Eisenbart, J., Moraes, C.T., Murphy, M.P., Budinger, G.R. et al.: The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J. Cell Biol.* 177, 1029-1036, 2007.
108. Kozlova, N., Mennerich, D., Samoylenko, A., Dimova, E.Y., Koivunen, P., Biterova, E. et al.: The pro-oncogenic adaptor CIN85 acts as an inhibitory binding partner of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2. *Cancer Res.*, 2019.
109. Li, Z., Zhou, W., Zhang, Y., Sun, W., Yung, M.M., Sun, J. et al.: ERK regulates HIF-1 $\alpha$ -mediated platinum resistance by directly targeting PHD2 in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2019.
110. Hewitson, K.S., Lienard, B.M., McDonough, M.A., Clifton, I.J., Butler, D., Soares, A.S. et al.: Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *J. Biol. Chem.* 282, 3293-3301, 2007.
111. Kaelin, W.G., Jr.: The VHL Tumor Suppressor Gene: Insights into Oxygen Sensing and Cancer. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 128, 298-307, 2017.
112. Tiburcio, P.D., Choi, H., Huang, L.E.: Complex role of HIF in cancer: the known, the unknown, and the unexpected. *Hypoxia. (Auckl.)* 2, 59-70, 2014.
113. Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., Semenza, G.L.: HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell Biol.* 21, 3995-4004, 2001.
114. Amelio, I., Mancini, M., Petrova, V., Cairns, R.A., Vikhрева, P., Nicolai, S. et al.: p53 mutants cooperate with HIF-1 in transcriptional regulation of extracellular matrix components to promote tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 115, E10869-E10878, 2018.
115. Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegue, E. et al.: HIF1 $\alpha$  induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13, 206-220, 2008.

116. Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I.S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L.P. et al.: Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 475, 226-230, 2011.
117. Sun, X., Hu, F., Hou, Z., Chen, Q., Lan, J., Luo, X. et al.: SIX4 activates Akt and promotes tumor angiogenesis. *Exp. Cell Res.* 111495, 2019.
118. Tsai, Y.P. and Wu, K.J.: Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis. *J. Biomed. Sci.* 19, 102, 2012.
119. Xiong, G., Deng, L., Zhu, J., Rychahou, P.G., Xu, R.: Prolyl-4-hydroxylase alpha subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. *BMC. Cancer* 14, 1, 2014.
120. Kozlova, N., Wottawa, M., Katschinski, D.M., Kristiansen, G., Kietzmann, T.: Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 (PHD2) is a direct regulator of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in breast cancer. *Oncotarget.* 8, 9885-9898, 2017.
121. Jokilehto, T., Rantanen, K., Luukkaa, M., Heikkinen, P., Grenman, R., Minn, H. et al.: Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. *Clin. Cancer Res.* 12, 1080-1087, 2006.
122. Price, C., Gill, S., Ho, Z.V., Davidson, S.M., Merkel, E., McFarland, J.M. et al.: Genome-Wide Interrogation of Human Cancers Identifies EGLN1 Dependency in Clear Cell Ovarian Cancers. *Cancer Res.* 79, 2564-2579, 2019.
123. Jokilehto, T., Rantanen, K., Luukkaa, M., Heikkinen, P., Grenman, R., Minn, H. et al.: Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. *Clin. Cancer Res.* 12, 1080-1087, 2006.
124. Jokilehto, T., Hogel, H., Heikkinen, P., Rantanen, K., Elenius, K., Sundstrom, J. et al.: Retention of prolyl hydroxylase PHD2 in the cytoplasm prevents PHD2-induced anchorage-independent carcinoma cell growth. *Exp. Cell Res.* 316, 1169-1178, 2010.
125. Xie, G., Zheng, L., Ou, J., Huang, H., He, J., Li, J. et al.: Low expression of prolyl hydroxylase 2 is associated with tumor grade and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 237, 860-866, 2012.
126. Su, Y., Loos, M., Giese, N., Metzen, E., Buchler, M.W., Friess, H. et al.: Prolyl hydroxylase-2 (PHD2) exerts tumor-suppressive activity in pancreatic cancer. *Cancer* 118, 960-972, 2012.
127. Onkologie Portal Deutsche Krebsgesellschaft. Strahlentherapie.  
<https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/therapieformen/strahlentherapie-bei-krebs.html>. Zugriff am 09.08.2019.

128. Baskar, R., Lee, K.A., Yeo, R., Yeoh, K.W.: Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J. Med. Sci.* 9, 193-199, 2012.
129. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Version 5.1 – Mai 2019. AWMF- Registernummer: 043/022OL. [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata\\_5\\_0/LL\\_Prostatakarzinom\\_Langversion\\_5.1.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostatakarzinom_Langversion_5.1.pdf). Zugriff am 09.08.2019.
130. Richter, E. and Feyerabend, T.: Allgemeine Strahlentherapie. In *Grundlagen der Strahlentherapie* 2. Auflage, Kapitel 7: 141-146, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, 2002.
131. Herold, G.: Hämatologie. In *Herold Innere Medizin 2018*, Kapitel 1: 76-77, Gerd Herold, Köln, 2018.
132. Schaapveld, M., Aleman, B.M., van Eggermond, A.M., Janus, C.P., Krol, A.D., van der Maazen, R.W. et al.: Second Cancer Risk Up to 40 Years after Treatment for Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 373, 2499-2511, 2015.
133. Münter, M. and Weber, K.J.: Strahlenbiologie. In *Duale Reihe Radiologie* (Reiser, M., Kuhn, F.P., Debus, J.) 4. Auflage, Kapitel 2: 37-60, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2017.
134. Jackson, S.P. and Bartek, J.: The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078, 2009.
135. Moding, E.J., Kastan, M.B., Kirsch, D.G.: Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 526-542, 2013.
136. Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., Yeoh, K.W.: Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol. Biosci.* 1, 24, 2014.
137. Nicolussi, A., D'Inzeo, S., Capalbo, C., Giannini, G., Coppa, A.: The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 6, 139-153, 2017.
138. Leach, J.K., Van, T.G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., Mikkelsen, R.B.: Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res.* 61, 3894-3901, 2001.
139. Surova, O. and Zhivotovsky, B.: Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* 32, 3789-3797, 2013.
140. Kuwahara, Y., Oikawa, T., Ochiai, Y., Roudkenar, M.H., Fukumoto, M., Shimura, T. et al.: Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. *Cell Death. Dis.* 2, e177, 2011.
141. Lindgren, T., Stigbrand, T., Raberg, A., Riklund, K., Johansson, L., Eriksson, D.: Genome wide expression analysis of radiation-induced DNA damage responses in isogenic HCT116 p53+/+ and HCT116 p53-/- colorectal carcinoma cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 91, 99-111, 2015.

142. Chang, L., Graham, P., Hao, J., Ni, J., Deng, J., Bucci, J. et al.: Cancer stem cells and signaling pathways in radioresistance. *Oncotarget*. 7, 11002-11017, 2016.
143. Li, F., Zhou, K., Gao, L., Zhang, B., Li, W., Yan, W. et al.: Radiation induces the generation of cancer stem cells: A novel mechanism for cancer radioresistance. *Oncol. Lett.* 12, 3059-3065, 2016.
144. Ghisolfi, L., Keates, A.C., Hu, X., Lee, D.K., Li, C.J.: Ionizing radiation induces stemness in cancer cells. *PLoS. One*. 7, e43628, 2012.
145. Chang, L., Graham, P.H., Hao, J., Ni, J., Bucci, J., Cozzi, P.J. et al.: Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death. Dis.* 4, e875, 2013.
146. Lv, Z., Liu, R.D., Chen, X.Q., Wang, B., Li, L.F., Guo, Y.S. et al.: HIF1alpha promotes the stemness of oesophageal squamous cell carcinoma by activating the Wnt/betacatenin pathway. *Oncol. Rep.*, 2019.
147. Hein, A.L., Ouellette, M.M., Yan, Y.: Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (review). *Int. J. Oncol.* 45, 1813-1819, 2014.
148. Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304-6311, 1991.
149. Rodier, F., Munoz, D.P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D. et al.: DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.* 124, 68-81, 2011.
150. Greiss, S., Schumacher, B., Grandien, K., Rothblatt, J., Gartner, A.: Transcriptional profiling in *C. elegans* suggests DNA damage dependent apoptosis as an ancient function of the p53 family. *BMC. Genomics* 9, 334, 2008.
151. Chen, J.: The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a026104, 2016.
152. Milas, L., Hunter, N., Mason, K.A., Milross, C., Peters, L.J.: Tumor reoxygenation as a mechanism of taxol-induced enhancement of tumor radioresponse. *Acta Oncol.* 34, 409-412, 1995.
153. Bussink, J., Kaanders, J.H., Rijken, P.F., Raleigh, J.A., Van der Kogel, A.J.: Changes in blood perfusion and hypoxia after irradiation of a human squamous cell carcinoma xenograft tumor line. *Radiat. Res.* 153, 398-404, 2000.
154. Moeller, B.J., Cao, Y., Li, C.Y., Dewhirst, M.W.: Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 5, 429-441, 2004.
155. Zhong, J., Rajaram, N., Brizel, D.M., Frees, A.E., Ramanujam, N., Batinic-Haberle, I. et al.: Radiation induces aerobic glycolysis through reactive oxygen species. *Radiother. Oncol.* 106, 390-396, 2013.

156. Huang, S.M. and Harari, P.M.: Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* 6, 2166-2174, 2000.
157. Kiyozuka, M., Akimoto, T., Fukutome, M., Motegi, A., Mitsuhashi, N.: Radiation-induced dimer formation of EGFR: implications for the radiosensitizing effect of cetuximab. *Anticancer Res.* 33, 4337-4346, 2013.
158. GRAY, L.H., CONGER, A.D., EBERT, M., HORNSEY, S., SCOTT, O.C.: The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br. J. Radiol.* 26, 638-648, 1953.
159. Xia, Y., Jiang, L., Zhong, T.: The role of HIF-1alpha in chemo-/radioresistant tumors. *Oncol. Targets. Ther.* 11, 3003-3011, 2018.
160. Um, J.H., Kang, C.D., Bae, J.H., Shin, G.G., Kim, D.W., Kim, D.W. et al.: Association of DNA-dependent protein kinase with hypoxia inducible factor-1 and its implication in resistance to anticancer drugs in hypoxic tumor cells. *Exp. Mol. Med.* 36, 233-242, 2004.
161. Sugrue, T., Lowndes, N.F., Ceredig, R.: Hypoxia enhances the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 32, 2188-2200, 2014.
162. Shenoy, N., Dronca, R., Quevedo, F., Boorjian, S.A., Chevillat, J., Costello, B. et al.: Low hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) expression in testicular germ cell tumors - a major reason for enhanced chemosensitivity? *Chin J. Cancer Res.* 29, 374-378, 2017.
163. Baker, L.C., Boulton, J.K., Walker-Samuel, S., Chung, Y.L., Jamin, Y., Ashcroft, M. et al.: The HIF-pathway inhibitor NSC-134754 induces metabolic changes and anti-tumour activity while maintaining vascular function. *Br. J. Cancer* 106, 1638-1647, 2012.
164. Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., Dang, C.V.: HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3, 177-185, 2006.
165. Harada, H.: Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *J. Radiat. Res.* 57 Suppl 1, i99-i105, 2016.
166. Gorski, D.H., Beckett, M.A., Jaskowiak, N.T., Calvin, D.P., Mauceri, H.J., Salloum, R.M. et al.: Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res.* 59, 3374-3378, 1999.
167. Takasaki, C., Kobayashi, M., Ishibashi, H., Akashi, T., Okubo, K.: Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha affects tumor proliferation and antiapoptosis in surgically resected lung cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 5, 295-300, 2016.

168. Pei, G.T., Wu, C.W., Lin, W.W.: Hypoxia-induced decoy receptor 2 gene expression is regulated via a hypoxia-inducible factor 1alpha-mediated mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1274-1279, 2010.
169. Zou, Y.M., Hu, G.Y., Zhao, X.Q., Lu, T., Zhu, F., Yu, S.Y. et al.: Hypoxia-induced autophagy contributes to radioresistance via c-Jun-mediated Beclin1 expression in lung cancer cells. *J. Huazhong. Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 34, 761-767, 2014.
170. Feng, H., Wang, J., Chen, W., Shan, B., Guo, Y., Xu, J. et al.: Hypoxia-induced autophagy as an additional mechanism in human osteosarcoma radioresistance. *J. Bone Oncol.* 5, 67-73, 2016.
171. Schwartz, D.L., Powis, G., Thitai-Kumar, A., He, Y., Bankson, J., Williams, R. et al.: The selective hypoxia inducible factor-1 inhibitor PX-478 provides in vivo radiosensitization through tumor stromal effects. *Mol. Cancer Ther.* 8, 947-958, 2009.
172. Strofer, M., Jelkmann, W., Metzen, E., Brockmeier, U., Dunst, J., Depping, R.: Stabilisation and knockdown of HIF--two distinct ways comparably important in radiotherapy. *Cell Physiol Biochem.* 28, 805-812, 2011.
173. Shen, L.F., Zhao, X., Zhou, S.H., Lu, Z.J., Zhao, K., Fan, J. et al.: In vivo evaluation of the effects of simultaneous inhibition of GLUT-1 and HIF-1alpha by antisense oligodeoxynucleotides on the radiosensitivity of laryngeal carcinoma using micro 18F-FDG PET/CT. *Oncotarget.* 8, 34709-34726, 2017.
174. Bertout, J.A., Majmundar, A.J., Gordan, J.D., Lam, J.C., Ditsworth, D., Keith, B. et al.: HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 14391-14396, 2009.
175. Mandl, M., Lieberum, M., Dunst, J., Depping, R.: The expression level of the transcription factor Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) determines cellular survival after radiation treatment. *Radiat. Oncol.* 10, 229, 2015.
176. Aebbersold, D.M., Burri, P., Beer, K.T., Laissue, J., Djonov, V., Greiner, R.H. et al.: Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 61, 2911-2916, 2001.
177. Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Simopoulos, C., Turley, H., Talks, K. et al.: Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 53, 1192-1202, 2002.
178. Bachtiry, B., Schindl, M., Potter, R., Dreier, B., Knocke, T.H., Hainfellner, J.A. et al.: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 2234-2240, 2003.
179. Luukkaa, M., Jokilehto, T., Kronqvist, P., Vahlberg, T., Grenman, R., Jaakkola, P. et al.: Expression of the cellular oxygen sensor PHD2 (EGLN-1) predicts radiation

- sensitivity in squamous cell cancer of the head and neck. *Int. J. Radiat. Biol.* 85, 900-908, 2009.
180. Friederike Katharina Pientka: Bedeutung der subzellulären Lokalisation der Prolyl-4-Hydroxylasen für die molekulare Sauerstoffsensitivität. *Rer. nat. Diss.*, Lübeck, 2012.
181. Bur, H., Haapasaari, K.M., Turpeenniemi-Hujanen, T., Kuittinen, O., Auvinen, P., Marin, K. et al.: Strong Prolyl Hydroxylase Domain 1 Expression Predicts Poor Outcome in Radiotherapy-treated Patients with Classical Hodgkin's Lymphoma. *Anticancer Res.* 38, 329-336, 2018.
182. Vandromme, M., Gauthier-Rouviere, C., Lamb, N., Fernandez, A.: Regulation of transcription factor localization: fine-tuning of gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 21, 59-64, 1996.
183. Gorlich, D. and Kutay, U.: Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 607-660, 1999.
184. Huenniger, K., Kramer, A., Soom, M., Chang, I., Kohler, M., Depping, R. et al.: Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7. *Cell Mol. Life Sci.* 67, 3187-3196, 2010.
185. Lee, Y., Jang, A.R., Francey, L.J., Sehgal, A., Hogenesch, J.B.: KPNB1 mediates PER/CRY nuclear translocation and circadian clock function. *Elife.* 4, 2015.
186. Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S.G., Friedrich, B., Fagerlund, R., Metzen, E. et al.: Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 394-404, 2008.
187. Oka, M. and Yoneda, Y.: Importin alpha: functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 94, 259-274, 2018.
188. Ao, Z., Danappa, J.K., Wang, B., Zheng, Y., Kung, S., Rassart, E. et al.: Importin alpha3 interacts with HIV-1 integrase and contributes to HIV-1 nuclear import and replication. *J. Virol.* 84, 8650-8663, 2010.
189. Takeda, E., Murakami, T., Matsuda, G., Murakami, H., Zako, T., Maeda, M. et al.: Nuclear exportin receptor CAS regulates the NPI-1-mediated nuclear import of HIV-1 Vpr. *PLoS. One.* 6, e27815, 2011.
190. Fraser, J.E., Rawlinson, S.M., Wang, C., Jans, D.A., Wagstaff, K.M.: Investigating dengue virus nonstructural protein 5 (NS5) nuclear import. *Methods Mol. Biol.* 1138, 301-328, 2014.
191. Aggarwal, A. and Agrawal, D.K.: Importins and exportins regulating allergic immune responses. *Mediators. Inflamm.* 2014, 476357, 2014.
192. Yoneda-Kato, N. and Kato, J.Y.: Shuttling imbalance of MLF1 results in p53 instability and increases susceptibility to oncogenic transformation. *Mol. Cell Biol.* 28, 422-434, 2008.

193. Nagara, Y., Tateishi, T., Yamasaki, R., Hayashi, S., Kawamura, M., Kikuchi, H. et al.: Impaired cytoplasmic-nuclear transport of hypoxia-inducible factor-1alpha in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol.* 23, 534-546, 2013.
194. Tavolieri, M.V., Droppelmann, C.A., Campos-Melo, D., Volkening, K., Strong, M.J.: A novel overlapping NLS/NES region within the PH domain of Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (RGNEF) regulates its nuclear-cytoplasmic localization. *Eur. J. Cell Biol.* 98, 27-35, 2019.
195. Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T., Matunis, M.J.: Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 158, 915-927, 2002.
196. Fontes, M.R., Teh, T., Kobe, B.: Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J. Mol. Biol.* 297, 1183-1194, 2000.
197. Ia, C.T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S.: Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17, 527-536, 2004.
198. Okada, N., Ishigami, Y., Suzuki, T., Kaneko, A., Yasui, K., Fukutomi, R. et al.: Importins and exportins in cellular differentiation. *J. Cell Mol. Med.* 12, 1863-1871, 2008.
199. Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., Corbett, A.H.: Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* 282, 5101-5105, 2007.
200. Gorlich, D. and Kutay, U.: Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 607-660, 1999.
201. Ossareh-Nazari, B., Gwizdek, C., Dargemont, C.: Protein export from the nucleus. *Traffic.* 2, 684-689, 2001.
202. Turner, J.G., Dawson, J., Sullivan, D.M.: Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1021-1032, 2012.
203. Fung, H.Y., Fu, S.C., Chook, Y.M.: Nuclear export receptor CRM1 recognizes diverse conformations in nuclear export signals. *Elife.* 6, 2017.
204. Riddick, G. and Macara, I.G.: The adapter importin-alpha provides flexible control of nuclear import at the expense of efficiency. *Mol. Syst. Biol.* 3, 118, 2007.
205. Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., Kuriyan, J.: Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94, 193-204, 1998.
206. Kobe, B.: Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat. Struct. Biol.* 6, 388-397, 1999.

- 
207. Kimura, M., Morinaka, Y., Imai, K., Kose, S., Horton, P., Imamoto, N.: Extensive cargo identification reveals distinct biological roles of the 12 importin pathways. *Elife*. 6, 2017.
  208. Frey, S. and Gorlich, D.: A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes. *Cell* 130, 512-523, 2007.
  209. Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., Gorlich, D.: Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90, 1061-1071, 1997.
  210. Bischoff, F.R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A., Ponstingl, H.: RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 2587-2591, 1994.
  211. Bischoff, F.R. and Ponstingl, H.: Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 354, 80-82, 1991.
  212. Smith, A., Brownawell, A., Macara, I.G.: Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr. Biol.* 8, 1403-1406, 1998.
  213. Nardoizzi, J.D., Lott, K., Cingolani, G.: Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun. Signal.* 8, 32, 2010.
  214. Kehlenbach, R.H. and Gerace, L.: Phosphorylation of the nuclear transport machinery down-regulates nuclear protein import in vitro. *J. Biol. Chem.* 275, 17848-17856, 2000.
  215. Kitamura, R., Sekimoto, T., Ito, S., Harada, S., Yamagata, H., Masai, H. et al.: Nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 mediated by NPI-1 (Importin alpha5) is up- and down-regulated by phosphorylation of the nuclear localization signal for which Lys379 and Arg380 are essential. *J. Virol.* 80, 1979-1991, 2006.
  216. Brownlee, C. and Heald, R.: Importin alpha Partitioning to the Plasma Membrane Regulates Intracellular Scaling. *Cell* 176, 805-815, 2019.
  217. Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y. et al.: Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol. Cell Biol.* 21, 6139-6150, 2001.
  218. Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., Wahl, G.M.: A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 18, 1660-1672, 1999.
  219. Sekimoto, T., Miyamoto, Y., Arai, S., Yoneda, Y.: Importin alpha protein acts as a negative regulator for Snail protein nuclear import. *J. Biol. Chem.* 286, 15126-15131, 2011.

- 
220. Gruss, O.J., Carazo-Salas, R.E., Schatz, C.A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M. et al.: Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* 104, 83-93, 2001.
221. Ben-Yaakov, K., Dagan, S.Y., Segal-Ruder, Y., Shalem, O., Vuppalanchi, D., Willis, D.E. et al.: Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J.* 31, 1350-1363, 2012.
222. Kosyna, F.K. and Depping, R.: Controlling the Gatekeeper: Therapeutic Targeting of Nuclear Transport. *Cells* 7, 2018.
223. Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S., Beppu, T.: Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J. Biol. Chem.* 269, 6320-6324, 1994.
224. Newlands, E.S., Rustin, G.J., Brampton, M.H.: Phase I trial of elactocin. *Br. J. Cancer* 74, 648-649, 1996.
225. Dickmanns, A., Monecke, T., Ficner, R.: Structural Basis of Targeting the Exportin CRM1 in Cancer. *Cells* 4, 538-568, 2015.
226. Koster, M., Lykke-Andersen, S., Elnakady, Y.A., Gerth, K., Washausen, P., Hofle, G. et al.: Ratjadones inhibit nuclear export by blocking CRM1/exportin 1. *Exp. Cell Res.* 286, 321-331, 2003.
227. Bonazzi, S., Eidam, O., Guttinger, S., Wach, J.Y., Zemp, I., Kutay, U. et al.: Anguinomycins and derivatives: total syntheses, modeling, and biological evaluation of the inhibition of nucleocytoplasmic transport. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 1432-1442, 2010.
228. Kuruvilla, J., Savona, M., Baz, R., Mau-Sorensen, P.M., Gabrail, N., Garzon, R. et al.: Selective inhibition of nuclear export with selinexor in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 129, 3175-3183, 2017.
229. Sadowski, A.R., Gardner, H.L., Borgatti, A., Wilson, H., Vail, D.M., Lachowicz, J. et al.: Phase II study of the oral selective inhibitor of nuclear export (SINE) KPT-335 (verdinexor) in dogs with lymphoma. *BMC. Vet. Res.* 14, 250, 2018.
230. Bahlis, N.J., Sutherland, H., White, D., Sebag, M., Lentzsch, S., Kotb, R. et al.: Selinexor plus low-dose bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*, 2018.
231. Shafique, M., Ismail-Khan, R., Extermann, M., Sullivan, D., Goodridge, D., Boulware, D. et al.: A Phase II Trial of Selinexor (KPT-330) for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist.* 24, 887-e416, 2019.
232. FDA- U.S. Food & Drug Administration. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-treatment-refractory-multiple-myeloma>. Zugriff am 29.07.2019.
-

233. Soderholm, J.F., Bird, S.L., Kalab, P., Sampathkumar, Y., Hasegawa, K., Uehara-Bingen, M. et al.: Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin-beta. *ACS Chem. Biol.* *6*, 700-708, 2011.
234. Kim, Y.H., Ha, S., Kim, J., Ham, S.W.: Identification of KPNB1 as a Cellular Target of Aminothiazole Derivatives with Anticancer Activity. *ChemMedChem.* *11*, 1406-1409, 2016.
235. Ha, S., Choi, J., Min, N.Y., Lee, K.H., Ham, S.W.: Inhibition of Importin beta1 With a 2-Aminothiazole Derivative Resulted in G2/M Cell-cycle Arrest and Apoptosis. *Anticancer Res.* *37*, 2373-2379, 2017.
236. Wagstaff, K.M., Rawlinson, S.M., Hearps, A.C., Jans, D.A.: An AlphaScreen(R)-based assay for high-throughput screening for specific inhibitors of nuclear import. *J. Biomol. Screen.* *16*, 192-200, 2011.
237. Wagstaff, K.M., Sivakumaran, H., Heaton, S.M., Harrich, D., Jans, D.A.: Ivermectin is a specific inhibitor of importin alpha/beta-mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem. J.* *443*, 851-856, 2012.
238. Wang, C., Yang, S.N.Y., Smith, K., Forwood, J.K., Jans, D.A.: Nuclear import inhibitor N-(4-hydroxyphenyl) retinamide targets Zika virus (ZIKV) nonstructural protein 5 to inhibit ZIKV infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *493*, 1555-1559, 2017.
239. Yang, S.N.Y., Atkinson, S.C., Fraser, J.E., Wang, C., Maher, B., Roman, N. et al.: Novel Flavivirus Antiviral That Targets the Host Nuclear Transport Importin alpha/beta1 Heterodimer. *Cells* *8*, 2019.
240. Flores, K., Yadav, S.S., Katz, A.A., Seger, R.: The Nuclear Translocation of Mitogen-Activated Protein Kinases: Molecular Mechanisms and Use as Novel Therapeutic Target. *Neuroendocrinology* *108*, 121-131, 2019.
241. Arafah, R., Flores, K., Keren-Paz, A., Maik-Rachline, G., Gutkind, N., Rosenberg, S. et al.: Combined inhibition of MEK and nuclear ERK translocation has synergistic antitumor activity in melanoma cells. *Sci. Rep.* *7*, 16345, 2017.
242. Zhou, F., Qiu, W., Yao, R., Xiang, J., Sun, X., Liu, S. et al.: CRM1 is a novel independent prognostic factor for the poor prognosis of gastric carcinomas. *Med. Oncol.* *30*, 726, 2013.
243. Noske, A., Weichert, W., Niesporek, S., Roske, A., Buckendahl, A.C., Koch, I. et al.: Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer. *Cancer* *112*, 1733-1743, 2008.
244. Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B. et al.: Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 9112-9117, 1999.

245. Wolff, B., Sanglier, J.J., Wang, Y.: Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* 4, 139-147, 1997.
246. Fleta-Soriano, E., Martinez, J.P., Hinkelmann, B., Gerth, K., Washausen, P., Diez, J. et al.: The myxobacterial metabolite ratjadone A inhibits HIV infection by blocking the Rev/CRM1-mediated nuclear export pathway. *Microb. Cell Fact.* 13, 17, 2014.
247. Wang, A.Y. and Liu, H.: The past, present, and future of CRM1/XPO1 inhibitors. *Stem Cell Investig.* 6, 6, 2019.
248. Jorquera, P.A., Mathew, C., Pickens, J., Williams, C., Luczo, J.M., Tamir, S. et al.: Verdinexor (KPT-335), a Selective Inhibitor of Nuclear Export, Reduces Respiratory Syncytial Virus Replication In Vitro. *J. Virol.* 93, 2019.
249. Hintersteiner, M., Ambrus, G., Bednenko, J., Schmied, M., Knox, A.J., Meisner, N.C. et al.: Identification of a small molecule inhibitor of importin beta mediated nuclear import by confocal on-bead screening of tagged one-bead one-compound libraries. *ACS Chem. Biol.* 5, 967-979, 2010.
250. Groulx, I. and Lee, S.: Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol. Cell Biol.* 22, 5319-5336, 2002.
251. Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E., Simos, G.: Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J. Biol. Chem.* 283, 27620-27627, 2008.
252. Depping, R., Jelkmann, W., Kosyna, F.K.: Nuclear-cytoplasmic shuttling of proteins in control of cellular oxygen sensing. *J. Mol. Med. (Berl)* 93, 599-608, 2015.
253. Chachami, G., Paraskeva, E., Mingot, J.M., Braliou, G.G., Gorlich, D., Simos, G.: Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 235-240, 2009.
254. Carbonaro, M., Escuin, D., O'Brate, A., Thadani-Mulero, M., Giannakakou, P.: Microtubules regulate hypoxia-inducible factor-1alpha protein trafficking and activity: implications for taxane therapy. *J. Biol. Chem.* 287, 11859-11869, 2012.
255. Lee, H.J., Jung, Y.H., Oh, J.Y., Choi, G.E., Chae, C.W., Kim, J.S. et al.: BICD1 mediates HIF1alpha nuclear translocation in mesenchymal stem cells during hypoxia adaptation. *Cell Death. Differ.*, 2018.
256. Guo, H., Zheng, H., Wu, J., Ma, H.P., Yu, J., Yiliyaer, M.: The key role of microtubules in hypoxia preconditioning-induced nuclear translocation of HIF-1alpha in rat cardiomyocytes. *PeerJ.* 5, e3662, 2017.

257. Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M. et al.: Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J. Cell Sci.* 116, 1319-1326, 2003.
258. Wotzlaw, C. and Fandrey, J.: Monitoring of cellular responses to hypoxia. *Methods Mol. Biol.* 591, 243-255, 2010.
259. Yasumoto, K., Kowata, Y., Yoshida, A., Torii, S., Sogawa, K.: Role of the intracellular localization of HIF-prolyl hydroxylases. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 792-797, 2009.
260. Berchner-Pfannschmidt, U., Tug, S., Trinidad, B., Oehme, F., Yamac, H., Wotzlaw, C. et al.: Nuclear oxygen sensing: induction of endogenous prolyl-hydroxylase 2 activity by hypoxia and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 283, 31745-31753, 2008.
261. Berra, E., Roux, D., Richard, D.E., Pouyssegur, J.: Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) escapes O(2)-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep.* 2, 615-620, 2001.
262. Pientka, F.K., Hu, J., Schindler, S.G., Brix, B., Thiel, A., Jöhren, O. et al.: Oxygen sensing by the prolyl-4-hydroxylase PHD2 within the nuclear compartment and the influence of compartmentalisation on HIF-1 signalling. *J. Cell Sci.* 125, 5168-5176, 2012.
263. Wigerup, C., Pahlman, S., Bexell, D.: Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol. Ther.* 164, 152-169, 2016.
264. Kosyna, F.K., Nagel, M., Kluxen, L., Kraushaar, K., Depping, R.: The importin alpha/beta-specific inhibitor Ivermectin affects HIF-dependent hypoxia response pathways. *Biol. Chem.* 396, 1357-1367, 2015.
265. Haase, V.H.: Therapeutic targeting of the HIF oxygen-sensing pathway: Lessons learned from clinical studies. *Exp. Cell Res.* 356, 160-165, 2017.
266. Jiang, B.H., Jiang, G., Zheng, J.Z., Lu, Z., Hunter, T., Vogt, P.K.: Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ.* 12, 363-369, 2001.
267. Mohlin, S., Hamidian, A., von, S.K., Bridges, E., Wigerup, C., Bexell, D. et al.: PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res.* 75, 4617-4628, 2015.
268. Hudson, C.C., Liu, M., Chiang, G.G., Otterness, D.M., Loomis, D.C., Kaper, F. et al.: Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol. Cell Biol.* 22, 7004-7014, 2002.
269. Liu, N.N., Zhao, N., Cai, N.: Suppression of the proliferation of hypoxia-Induced retinal pigment epithelial cell by rapamycin through the /mTOR/HIF-1alpha/VEGF/ signaling. *IUBMB. Life* 67, 446-452, 2015.
270. Lee, S.H., Jee, J.G., Bae, J.S., Liu, K.H., Lee, Y.M.: A group of novel HIF-1alpha inhibitors, glyceollins, blocks HIF-1alpha synthesis and decreases its stability via

- inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway and Hsp90 binding. *J. Cell Physiol* 230, 853-862, 2015.
271. Rho, J.K., Choi, Y.J., Lee, J.K., Ryoo, B.Y., Na, I.I., Yang, S.H. et al.: Gefitinib circumvents hypoxia-induced drug resistance by the modulation of HIF-1alpha. *Oncol. Rep.* 21, 801-807, 2009.
272. Zhang, H., Qian, D.Z., Tan, Y.S., Lee, K., Gao, P., Ren, Y.R. et al.: Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 19579-19586, 2008.
273. Wei, D., Peng, J.J., Gao, H., Li, H., Li, D., Tan, Y. et al.: Digoxin downregulates NDRG1 and VEGF through the inhibition of HIF-1alpha under hypoxic conditions in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 7273-7285, 2013.
274. Lin, J., Zhan, T., Duffy, D., Hoffman-Censits, J., Kilpatrick, D., Trabulsi, E.J. et al.: A pilot phase II Study of digoxin in patients with recurrent prostate cancer as evident by a rising PSA. *Am. J. Cancer Ther. Pharmacol.* 2, 21-32, 2014.
275. Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Scudiero, D.A., Selby, M., Sausville, E.A., Shoemaker, R.H. et al.: Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res.* 62, 4316-4324, 2002.
276. Bertozzi, D., Marinello, J., Manzo, S.G., Fornari, F., Gramantieri, L., Capranico, G.: The natural inhibitor of DNA topoisomerase I, camptothecin, modulates HIF-1alpha activity by changing miR expression patterns in human cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 13, 239-248, 2014.
277. Koh, M.Y., Spivak-Kroizman, T., Venturini, S., Welsh, S., Williams, R.R., Kirkpatrick, D.L. et al.: Molecular mechanisms for the activity of PX-478, an antitumor inhibitor of the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol. Cancer Ther.* 7, 90-100, 2008.
278. Zhu, Y., Zang, Y., Zhao, F., Li, Z., Zhang, J., Fang, L. et al.: Inhibition of HIF-1alpha by PX-478 suppresses tumor growth of esophageal squamous cell cancer in vitro and in vivo. *Am. J. Cancer Res.* 7, 1198-1212, 2017.
279. Lee, K., Zhang, H., Qian, D.Z., Rey, S., Liu, J.O., Semenza, G.L.: Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 17910-17915, 2009.
280. Yin, T., He, S., Shen, G., Wang, Y.: HIF-1 Dimerization Inhibitor Acriflavine Enhances Antitumor Activity of Sunitinib in Breast Cancer Model. *Oncol. Res.* 22, 139-145, 2014.
281. Courtney, K.D., Infante, J.R., Lam, E.T., Figlin, R.A., Rini, B.I., Brugarolas, J. et al.: Phase I Dose-Escalation Trial of PT2385, a First-in-Class Hypoxia-Inducible Factor-2alpha Antagonist in Patients With Previously Treated Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 36, 867-874, 2018.

282. Kong, D., Park, E.J., Stephen, A.G., Calvani, M., Cardellina, J.H., Monks, A. et al.: Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res.* 65, 9047-9055, 2005.
283. Lee, K., Qian, D.Z., Rey, S., Wei, H., Liu, J.O., Semenza, G.L.: Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 2353-2358, 2009.
284. Kung, A.L., Zabludoff, S.D., France, D.S., Freedman, S.J., Tanner, E.A., Vieira, A. et al.: Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell* 6, 33-43, 2004.
285. Richardson, P.G., Hideshima, T., Anderson, K.C.: Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control* 10, 361-369, 2003.
286. Ranieri, G., Patruno, R., Ruggieri, E., Montemurro, S., Valerio, P., Ribatti, D.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. *Curr. Med. Chem.* 13, 1845-1857, 2006.
287. Roviello, G., Bachelot, T., Hudis, C.A., Curigliano, G., Reynolds, A.R., Petrioli, R. et al.: The role of bevacizumab in solid tumours: A literature based meta-analysis of randomised trials. *Eur. J. Cancer* 75, 245-258, 2017.
288. Lin, Z., Yang, Y., Huang, Y., Liang, J., Lu, F., Lao, X.: Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors versus bevacizumab in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol. Clin. Oncol.* 3, 959-967, 2015.
289. Gong, L., Giacomini, M.M., Giacomini, C., Maitland, M.L., Altman, R.B., Klein, T.E.: PharmGKB summary: sorafenib pathways. *Pharmacogenet. Genomics* 27, 240-246, 2017.
290. Vidimar, V., Licona, C., Ceron-Camacho, R., Guerin, E., Coliat, P., Venkatasamy, A. et al.: A redox ruthenium compound directly targets PHD2 and inhibits the HIF1 pathway to reduce tumor angiogenesis independently of p53. *Cancer Lett.* 440-441, 145-155, 2019.
291. Devi, U., Singh, M., Roy, S., Tripathi, A.C., Gupta, P.S., Saraf, S.K. et al.: PHD-2 activation: a novel strategy to control HIF-1 $\alpha$  and mitochondrial stress to modulate mammary gland pathophysiology in ER+ subtype. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2019.
292. Yeh, T.L., Leissing, T.M., Abboud, M.I., Thinnes, C.C., Atasoylu, O., Holt-Martyn, J.P. et al.: Molecular and cellular mechanisms of HIF prolyl hydroxylase inhibitors in clinical trials. *Chem. Sci.* 8, 7651-7668, 2017.
293. Zhang, Q., Bian, H., Li, Y., Guo, L., Tang, Y., Zhu, H.: Preconditioning with the traditional Chinese medicine Huang-Lian-Jie-Du-Tang initiates HIF-1 $\alpha$ -

- dependent neuroprotection against cerebral ischemia in rats. *J. Ethnopharmacol.* 154, 443-452, 2014.
294. Badawi, Y. and Shi, H.: Relative Contribution of Prolyl Hydroxylase-Dependent and -Independent Degradation of HIF-1alpha by Proteasomal Pathways in Cerebral Ischemia. *Front Neurosci.* 11, 239, 2017.
295. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms. Langversion 1.2 – April 2017. AWMF- Registernummer: 043/017-OL. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/043-017Oll\\_S3\\_Nierenzellkarzinom\\_2017-04-verlaengert.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-017Oll_S3_Nierenzellkarzinom_2017-04-verlaengert.pdf). Zugriff am 09.08.2019.
296. Herrlinger, U., Schafer, N., Steinbach, J.P., Weyerbrock, A., Hau, P., Goldbrunner, R. et al.: Bevacizumab Plus Irinotecan Versus Temozolomide in Newly Diagnosed O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Nonmethylated Glioblastoma: The Randomized GLARIUS Trial. *J. Clin. Oncol.* 34, 1611-1619, 2016.
297. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom. Version 1.0 - September 2014. AWMF-Registernummer: 032/033OL. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032033OL1\\_S3\\_Zervixkarzinom\\_2014-10.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032033OL1_S3_Zervixkarzinom_2014-10.pdf). Zugriff am 09.08.2019.
298. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Langversion 4.1 – September 2018. AWMF-Registernummer: 032-045OL. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032045OL1\\_S3\\_Mammakarzinom\\_2018-09.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032045OL1_S3_Mammakarzinom_2018-09.pdf). Zugriff am 09.08.2019.
299. Semenza, G.L.: Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 59, 379-403, 2019.
300. Barrett, T.D., Palomino, H.L., Brondstetter, T.I., Kanelakis, K.C., Wu, X., Yan, W. et al.: Prolyl hydroxylase inhibition corrects functional iron deficiency and inflammation-induced anaemia in rats. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4078-4088, 2015.
301. Karuppagounder, S.S. and Ratan, R.R.: Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition: robust new target or another big bust for stroke therapeutics? *J. Cereb. Blood Flow Metab* 32, 1347-1361, 2012.
302. Zimmermann, A.S., Morrison, S.D., Hu, M.S., Li, S., Nauta, A., Sorkin, M. et al.: Epidermal or dermal specific knockout of PHD-2 enhances wound healing and minimizes ischemic injury. *PLoS. One.* 9, e93373, 2014.
303. Holscher, M., Silter, M., Krull, S., von, A.M., Hesse, A., Schwartz, P. et al.: Cardiomyocyte-specific prolyl-4-hydroxylase domain 2 knock out protects from acute myocardial ischemic injury. *J. Biol. Chem.* 286, 11185-11194, 2011.

- 
304. Laitakari, A., Ollonen, T., Kietzmann, T., Walkinshaw, G., Mennerich, D., Izzi, V. et al.: Systemic inactivation of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase 2 in mice protects from alcohol-induced fatty liver disease. *Redox. Biol.* 22, 101145, 2019.
305. Flamme, I., Oehme, F., Ellinghaus, P., Jeske, M., Keldenich, J., Thuss, U.: Mimicking hypoxia to treat anemia: HIF-stabilizer BAY 85-3934 (Molidustat) stimulates erythropoietin production without hypertensive effects. *PLoS. One.* 9, e111838, 2014.
306. Provenzano, R., Besarab, A., Wright, S., Dua, S., Zeig, S., Nguyen, P. et al.: Roxadustat (FG-4592) Versus Epoetin Alfa for Anemia in Patients Receiving Maintenance Hemodialysis: A Phase 2, Randomized, 6- to 19-Week, Open-Label, Active-Comparator, Dose-Ranging, Safety and Exploratory Efficacy Study. *Am. J. Kidney Dis.* 67, 912-924, 2016.
307. Bailey, P.S.J. and Nathan, J.A.: Metabolic Regulation of Hypoxia-Inducible Transcription Factors: The Role of Small Molecule Metabolites and Iron. *Biomedicines.* 6, 2018.
308. Chen, N., Hao, C., Liu, B.C., Lin, H., Wang, C., Xing, C. et al.: Roxadustat Treatment for Anemia in Patients Undergoing Long-Term Dialysis. *N. Engl. J. Med.*, 2019.
309. Haase, V.H., Chertow, G.M., Block, G.A., Pergola, P.E., deGoma, E.M., Khawaja, Z. et al.: Effects of vadadustat on hemoglobin concentrations in patients receiving hemodialysis previously treated with erythropoiesis-stimulating agents. *Nephrol. Dial. Transplant.* 34, 90-99, 2019.
310. Macdougall, I.C., Akizawa, T., Berns, J.S., Bernhardt, T., Krueger, T.: Effects of Molidustat in the Treatment of Anemia in CKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 28-39, 2019.
311. Tsubakihara, Y., Akizawa, T., Nangaku, M., Onoue, T., Yonekawa, T., Matsushita, H. et al.: A 24-week Anemia Correction Study of Daprodustat in Japanese Dialysis Patients. *Ther. Apher. Dial.*, 2019.
312. Dhillon, S.: Roxadustat: First Global Approval. *Drugs* 79, 563-572, 2019.
313. Bekerredjian, R., Walton, C.B., MacCannell, K.A., Ecker, J., Kruse, F., Outten, J.T. et al.: Conditional HIF-1alpha expression produces a reversible cardiomyopathy. *PLoS. One.* 5, e11693, 2010.
314. Minamishima, Y.A., Moslehi, J., Bardeesy, N., Cullen, D., Bronson, R.T., Kaelin, W.G., Jr.: Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* 111, 3236-3244, 2008.
315. Crump, A.: Ivermectin: enigmatic multifaceted 'wonder' drug continues to surprise and exceed expectations. *J. Antibiot. (Tokyo)* 70, 495-505, 2017.
-

316. Juarez, M., Schcolnik-Cabrera, A., Duenas-Gonzalez, A.: The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. *Am. J. Cancer Res.* 8, 317-331, 2018.
317. Crump, A. and Omura, S.: Ivermectin, 'wonder drug' from Japan: the human use perspective. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 87, 13-28, 2011.
318. De, S.G., Awadzi, K., Remme, J., Dadzie, K.Y., Ba, O., Giese, J. et al.: A community trial of ivermectin in the onchocerciasis focus of Asubende, Ghana. II. Adverse reactions. *Trop. Med. Parasitol.* 40, 375-382, 1989.
319. Chaccour, C., Hammann, F., Rabinovich, N.R.: Ivermectin to reduce malaria transmission I. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations regarding efficacy and safety. *Malar. J.* 16, 161, 2017.
320. Chaccour, C., Lines, J., Whitty, C.J.: Effect of ivermectin on *Anopheles gambiae* mosquitoes fed on humans: the potential of oral insecticides in malaria control. *J. Infect. Dis.* 202, 113-116, 2010.
321. Chaccour, C.J., Kobylinski, K.C., Bassat, Q., Bousema, T., Drakeley, C., Alonso, P. et al.: Ivermectin to reduce malaria transmission: a research agenda for a promising new tool for elimination. *Malar. J.* 12, 153, 2013.
322. Panchal, M., Rawat, K., Kumar, G., Kibria, K.M., Singh, S., Kalamuddin, M. et al.: Plasmodium falciparum signal recognition particle components and anti-parasitic effect of ivermectin in blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of SRP. *Cell Death. Dis.* 5, e994, 2014.
323. Chaccour, C.J., Ngha'bi, K., Abizanda, G., Irigoyen, B.A., Aldaz, A., Okumu, F. et al.: Targeting cattle for malaria elimination: marked reduction of *Anopheles arabiensis* survival for over six months using a slow-release ivermectin implant formulation. *Parasit. Vectors.* 11, 287, 2018.
324. Foy, B.D., Alout, H., Seaman, J.A., Rao, S., Magalhaes, T., Wade, M. et al.: Efficacy and risk of harms of repeat ivermectin mass drug administrations for control of malaria (RIMDAMAL): a cluster-randomised trial. *Lancet* 393, 1517-1526, 2019.
325. Tay, M.Y., Fraser, J.E., Chan, W.K., Moreland, N.J., Rathore, A.P., Wang, C. et al.: Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1-4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Res.* 99, 301-306, 2013.
326. Lundberg, L., Pinkham, C., Baer, A., Amaya, M., Narayanan, A., Wagstaff, K.M. et al.: Nuclear import and export inhibitors alter capsid protein distribution in mammalian cells and reduce Venezuelan Equine Encephalitis Virus replication. *Antiviral Res.* 100, 662-672, 2013.
327. Xu, T.L., Han, Y., Liu, W., Pang, X.Y., Zheng, B., Zhang, Y. et al.: Antivirus effectiveness of ivermectin on dengue virus type 2 in *Aedes albopictus*. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 12, e0006934, 2018.

328. Lokich, E., Singh, R.K., Han, A., Romano, N., Yano, N., Kim, K. et al.: HE4 expression is associated with hormonal elements and mediated by importin-dependent nuclear translocation. *Sci. Rep.* 4, 5500, 2014.
329. Jiang, L., Wang, P., Sun, Y.J., Wu, Y.J.: Ivermectin reverses the drug resistance in cancer cells through EGFR/ERK/Akt/NF-kappaB pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 265, 2019.
330. Dominguez-Gomez, G., Chavez-Blanco, A., Medina-Franco, J.L., Saldivar-Gonzalez, F., Flores-Torrontegui, Y., Juarez, M. et al.: Ivermectin as an inhibitor of cancer stemlike cells. *Mol. Med. Rep.* 17, 3397-3403, 2018.
331. Didier, A. and Loor, F.: The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs* 7, 745-751, 1996.
332. Sharmeen, S., Skrtic, M., Sukhai, M.A., Hurren, R., Gronda, M., Wang, X. et al.: The antiparasitic agent ivermectin induces chloride-dependent membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. *Blood* 116, 3593-3603, 2010.
333. Liu, Y., Fang, S., Sun, Q., Liu, B.: Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480, 415-421, 2016.
334. Zhu, M., Li, Y., Zhou, Z.: Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 492, 373-378, 2017.
335. Draganov, D., Gopalakrishna-Pillai, S., Chen, Y.R., Zuckerman, N., Moeller, S., Wang, C. et al.: Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. *Sci. Rep.* 5, 16222, 2015.
336. Zhang, P., Zhang, Y., Liu, K., Liu, B., Xu, W., Gao, J. et al.: Ivermectin induces cell cycle arrest and apoptosis of HeLa cells via mitochondrial pathway. *Cell Prolif.* 52, e12543, 2019.
337. Hashimoto, H., Messerli, S.M., Sudo, T., Maruta, H.: Ivermectin inactivates the kinase PAK1 and blocks the PAK1-dependent growth of human ovarian cancer and NF2 tumor cell lines. *Drug Discov. Ther.* 3, 243-246, 2009.
338. Dou, Q., Chen, H.N., Wang, K., Yuan, K., Lei, Y., Li, K. et al.: Ivermectin Induces Cytostatic Autophagy by Blocking the PAK1/Akt Axis in Breast Cancer. *Cancer Res.* 76, 4457-4469, 2016.
339. Melotti, A., Mas, C., Kuciak, M., Lorente-Trigos, A., Borges, I., Altaba, A.: The river blindness drug Ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT-TCF pathway responses in human cancer. *EMBO Mol. Med.* 6, 1263-1278, 2014.

- 
340. Nishio, M., Sugimachi, K., Goto, H., Wang, J., Morikawa, T., Miyachi, Y. et al.: Dysregulated YAP1/TAZ and TGF-beta signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 113, E71-E80, 2016.
341. Kobayashi, Y., Banno, K., Kunitomi, H., Tominaga, E., Aoki, D.: Current state and outlook for drug repositioning anticipated in the field of ovarian cancer. *J. Gynecol. Oncol.* 30, e10, 2019.
342. Kwon, Y.J., Petrie, K., Leibovitch, B.A., Zeng, L., Mezei, M., Howell, L. et al.: Selective Inhibition of SIN3 Corepressor with Avermectins as a Novel Therapeutic Strategy in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 14, 1824-1836, 2015.
343. Yin, J., Park, G., Lee, J.E., Choi, E.Y., Park, J.Y., Kim, T.H. et al.: DEAD-box RNA helicase DDX23 modulates glioma malignancy via elevating miR-21 biogenesis. *Brain* 138, 2553-2570, 2015.
344. Semenza, G.L. and Wang, G.L.: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* 12, 5447-5454, 1992.
345. Baldwin, T.O.: Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure.* 4, 223-228, 1996.
346. Stiehl, D.P., Jelkmann, W., Wenger, R.H., Hellwig-Burgel, T.: Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett.* 512, 157-162, 2002.
347. Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M., Wenger, R.H.: Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 272, 20055-20062, 1997.
348. Addgene- The nonprofit plasmid repository. <https://www.addgene.org>. Zugriff am 09.08.2019.
349. Harvard Medical School. Plasmid ID. <https://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/Home.xhtml>. Zugriff am 09.08.2019.
350. SnapGene<sup>®</sup>. GSL Biotech LCC. <http://www.snapgene.com>. Zugriff am 09.08.2019.
351. He, K., Zheng, X., Li, M., Zhang, L., Yu, J.: mTOR inhibitors induce apoptosis in colon cancer cells via CHOP-dependent DR5 induction on 4E-BP1 dephosphorylation. *Oncogene* 35, 148-157, 2016.
352. Yogevev, O., Barker, K., Sikka, A., Almeida, G.S., Hallsworth, A., Smith, L.M. et al.: p53 Loss in MYC-Driven Neuroblastoma Leads to Metabolic Adaptations Supporting Radioresistance. *Cancer Res.* 76, 3025-3035, 2016.
353. Price, C., Gill, S., Ho, Z.V., Davidson, S.M., Merkel, E., McFarland, J.M. et al.: Genome-Wide Interrogation of Human Cancers Identifies EGLN1 Dependency in Clear Cell Ovarian Cancers. *Cancer Res.* 79, 2564-2579, 2019.
-

354. Frei, C. and Edgar, B.A.: Drosophila cyclin D/Cdk4 requires Hif-1 prolyl hydroxylase to drive cell growth. *Dev. Cell* 6, 241-251, 2004.
355. Strowitzki, M.J., Cummins, E.P., Taylor, C.T.: Protein Hydroxylation by Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Hydroxylases: Unique or Ubiquitous? *Cells* 8, 2019.
356. Hasegawa, S., Tanaka, T., Nangaku, M.: Hypoxia-inducible factor stabilizers for treating anemia of chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 27, 331-338, 2018.
357. Kawada, K., Yonei, T., Ueoka, H., Kiura, K., Tabata, M., Takigawa, N. et al.: Comparison of chemosensitivity tests: clonogenic assay versus MTT assay. *Acta Med. Okayama* 56, 129-134, 2002.
358. Buch, K., Peters, T., Nawroth, T., Sanger, M., Schmidberger, H., Langguth, P.: Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay--a comparative study. *Radiat. Oncol.* 7, 1, 2012.
359. Grima, J.C., Daigle, J.G., Arbez, N., Cunningham, K.C., Zhang, K., Ochaba, J. et al.: Mutant Huntingtin Disrupts the Nuclear Pore Complex. *Neuron* 94, 93-107, 2017.
360. Nuovo, G.J., de Andrade, C.V., Thirukkumaran, C., Nicol, A.F.: Importin-beta and exportin-5 are indicators of acute viral infection: Correlation of their detection with commercially available detection kits. *Ann. Diagn. Pathol.* 34, 36-41, 2018.
361. Tessier, T.M., Dodge, M.J., Prusinkiewicz, M.A., Mymryk, J.S.: Viral Appropriation: Laying Claim to Host Nuclear Transport Machinery. *Cells* 8, 2019.
362. Li, J., Wang, L., Qian, C., Zhang, C.F., Dai, L.S., Liu, Q.N. et al.: Molecular characterization, tissue distribution, and immune reaction expression of karyopherins in the domestic silkworm (*Bombyx mori*). *Genet. Mol. Res.* 14, 13049-13065, 2015.
363. Kimura, M. and Imamoto, N.: Biological significance of the importin-beta family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways. *Traffic.* 15, 727-748, 2014.
364. Siomi, M.C., Fromont, M., Rain, J.C., Wan, L., Wang, F., Legrain, P. et al.: Functional conservation of the transportin nuclear import pathway in divergent organisms. *Mol. Cell Biol.* 18, 4141-4148, 1998.
365. Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Yamashita, J., Yasuda, Y., Kotera, I., Shibata, S. et al.: Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin alpha and cause a conventional nuclear import block. *J. Cell Biol.* 165, 617-623, 2004.
366. Yoshimura, S.H., Otsuka, S., Kumeta, M., Taga, M., Takeyasu, K.: Intermolecular disulfide bonds between nucleoporins regulate karyopherin-dependent nuclear transport. *J. Cell Sci.* 126, 3141-3150, 2013.
367. Ogawa, Y. and Imamoto, N.: Nuclear transport adapts to varying heat stress in a multistep mechanism. *J. Cell Biol.* 217, 2341-2352, 2018.

- 
368. Geles, K.G., Johnson, J.J., Jong, S., Adam, S.A.: A role for *Caenorhabditis elegans* importin IMA-2 in germ line and embryonic mitosis. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3138-3147, 2002.
369. Rother, F., Shmidt, T., Popova, E., Krivokharchenko, A., Hugel, S., Vilianovich, L. et al.: Importin alpha7 is essential for zygotic genome activation and early mouse development. *PLoS. One.* **6**, e18310, 2011.
370. Hu, C.J., Wang, L.Y., Chodosh, L.A., Keith, B., Simon, M.C.: Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell Biol.* **23**, 9361-9374, 2003.
371. Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.L. et al.: Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell Biol.* **25**, 5675-5686, 2005.
372. Nagai, H., Satomi, T., Abiru, A., Miyamoto, K., Nagasawa, K., Maruyama, M. et al.: Antihypertrophic Effects of Small Molecules that Maintain Mitochondrial ATP Levels Under Hypoxia. *EBioMedicine.* **24**, 147-158, 2017.
373. Markowska, A., Kaysiewicz, J., Markowska, J., Huczynski, A.: Doxycycline, salinomycin, monensin and ivermectin repositioned as cancer drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 1549-1554, 2019.
374. Birnbaum, D.J., Finetti, P., Birnbaum, D., Mamessier, E., Bertucci, F.: XPO1 Expression Is a Poor-Prognosis Marker in Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Clin. Med.* **8**, 2019.
375. Cruz-Ramos, E., Sandoval-Hernandez, A., Tecalco-Cruz, A.C.: Differential expression and molecular interactions of chromosome region maintenance 1 and calreticulin exportins in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **185**, 7-16, 2019.
376. Zhu, J., Wang, Y., Huang, H., Yang, Q., Cai, J., Wang, Q. et al.: Upregulation of KPNbeta1 in gastric cancer cell promotes tumor cell proliferation and predicts poor prognosis. *Tumour. Biol.* **37**, 661-672, 2016.
377. Xu, X., Zhang, X., Xing, H., Liu, Z., Jia, J., Jin, C. et al.: Importin-4 functions as a driving force in human primary gastric cancer. *J. Cell Biochem.* **120**, 12638-12646, 2019.
378. Cortes, R., Rosello-Lleti, E., Rivera, M., Martinez-Dolz, L., Salvador, A., Azorin, I. et al.: Influence of heart failure on nucleocytoplasmic transport in human cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **85**, 464-472, 2010.

## Materialien und Geräte

### Hersteller

Nachfolgend sind die Firmensitze der Lieferanten und Hersteller aufgeführt. Um Mehrfachnennungen zu vermeiden, werden diese im weiteren Verlauf nicht nochmals angegeben. Sollte sich im Verlauf der Forschungszeit für diese Arbeit der Herstellername bzw. die Firmenorganisation geändert haben, so ist der aktuelle Hersteller in den nachfolgenden Abschnitten jeweils als letztes aufgeführt.

AEG AG (Frankfurt, Deutschland), Agilent Technologies Inc. (Waldbronn, Deutschland), Air Liquide S.A. (Hamburg, Deutschland), AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland), Bandelin electronic (Berlin, Deutschland), Berthold Technologies GmbH (Bad Wildbad, Deutschland), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Bionline GmbH (Luckenwalde, Deutschland), Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland), Bio- Rad Laboratories Inc. (München, Deutschland), Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland), CIAtronic (Kempfen, Deutschland), DAKO/ Agilent (Santa Clara, CA, USA), DWK Lifesciences GmbH (Wertheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland), GE- Healthcare (Freiburg, Deutschland), Gerbu Biotechnik GmbH (Wieblingen, Deutschland), Gibco<sup>R</sup> (Darmstadt, Deutschland), Gilson<sup>R</sup> Inc. (Middleton, WI, USA), GraphPad Software (La Jolla, CA, USA), Greiner Bio- One International GmbH (Frickhausen, Deutschland), Hartmann Gruppe (Heidenheim an der Brenz, Deutschland), Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland), Hellma (Müllheim, Deutschland), Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland), Herolab Laborgeräte (Wiesloch, Deutschland), Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG (Eberstadt, Deutschland), Invitrogen (Darmstadt, Deutschland), IKA- Werke (Staufen, Deutschland), Irfan Skiljan (Wien, Österreich), Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland), Keyence (Osaka, Japan), KNF Neuberger GmbH (Freiburg, Deutschland), Kodak GmbH (Stuttgart, Deutschland), Kryotec- Kryosafe GmbH (Hamburg, Deutschland), Labinoco BV (Breda, Niederlande), Labnet International Inc. (Edison, NJ, USA), Liebherr (Bulle FR, Schweiz), Medgenix Diagnostics (Ratingen, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA), Miele & Cie. KG (Gütersloh,

Deutschland), Molecular Probes (Karlsruhe, Deutschland), New England Biolabs<sup>R</sup> Inc. (Frankfurt, Deutschland), Nexcelom Bioscience (Lawrence, MA, USA), Novus Biologicals (Littleton, Colorado, USA), PAA Laboratories (Cölbe, Deutschland), Panasonic (Wiesbaden, Deutschland), Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), Raytest (Straubenhardt, Deutschland), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), Sarstedt AG und Co. KG (Nümbrecht, Deutschland), Scotsman Industries Inc. (Mailand, Italien), Siemens AG (München, Deutschland), Sigma- Aldrich (München, Deutschland), Sucofin<sup>R</sup> (Zewen, Deutschland), Systec (Münster, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland; Waltham, Massachusetts, USA), Varian Medical Systems (Palo Alto, CA, USA), VITLAB GmbH (Großostheim, Deutschland), VLM GmbH (Bielefeld, Deutschland), Witeg Labortechnik (Wertheim, Deutschland).

## Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
<i>Accutase</i> <sup>TM</sup>	PAA Laboratories, GE Healthcare; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Acrylamid/ Bis Solution, 37, 5:1	Serva Electrophoresis GmbH
Agarosepulver	Serva Electrophoresis GmbH
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
Ampicillin	Biomol GmbH
Aprotinin	AppliChem GmbH
Benzamidin	AppliChem GmbH
Bromphenolblau	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH und Co. KG
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
Dimethyloxallylglycin (DMOG)	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
Dimethylsulfoxid (DMSO) ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO)	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) Zellkultur Medium	Gibco <sup>R</sup> , Thermo Fisher Scientific
Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG
Ethanol	Carl Roth GmbH und Co. KG
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH und Co. KG
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH und Co. KG

Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco <sup>R</sup> , Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Gase (N <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , Druckluft)	Air Liquide S.A.
Gelatine	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
<i>GeneJuice<sup>R</sup></i>	Merck KGaA
Glycerin	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH
Ivermectin	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH und Co. KG
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH und Co. KG
Kanamycin	Carl Roth GmbH und Co. KG
LB Agar (Luria- Müller)	Carl Roth GmbH und Co. KG
Leupeptin	AppliChem GmbH
Levamisole	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
<i>Lipofectamine2000<sup>TM</sup></i>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Magermilchpulver	Sucofin <sup>R</sup>
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH und Co. KG
Methanol	Carl Roth GmbH und Co. KG
MOPS- Puffer	Gerbu Biotechnik GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH und Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS) granuliert	AppliChem GmbH
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH und Co. KG
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
NTP (Natriumtriphosphat) Mix	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
<i>Opti-MEM<sup>R</sup></i>	Gibco <sup>R</sup> , Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd	Serva Electrophoresis GmbH
Penicillin/ Streptomycin 1 %	PAA Laboratories, Gibco <sup>R</sup> , Thermo Fisher Scientific
Pepstatin	AppliChem GmbH
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem GmbH
Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth GmbH und Co. KG
Ponceau S Solution	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
<i>ProLong<sup>R</sup> Antifade Reagent with DAPI</i>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Protease Inhibitor Cocktail Set V EDTA-free	Calbiochem <sup>R</sup> , Merck KGaA
Protein Assay Standard (Albumin)	Bio- Rad Laboratories Inc.
Röntgenfilmentwickler	Kodak GmbH
Röntgenfilmfixierbad	Kodak GmbH
RPMI-1640 Zellkultur Medium	Gibco <sup>R</sup> , Thermo Fisher Scientific
Salzsäure (HCl) 25 %	Merck KGaA

Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH GmbH und Co. KG
Trypan Blau 0,4 %	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
Trypsin/ EDTA Lösung 0,05 %/ 0,02 %	Gibco <sup>R</sup> , Thermo Fisher Scientific
Urea (Harnstoff)	Carl Roth GmbH und Co. KG
β- Glycerolphosphat	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
β- Mercaptoethanol	Biomol GmbH

## Antikörper

	Name	Hersteller	Eingesetzte Konzentration
Primärantikörper	anti- Aktin C-11 (Ziege, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
	anti- HIF-1α (Maus, monoklonal)	BD Biosciences	1:1000
	anti- Lamin A/C (Ziege, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology	1: 1000
	anti- PHD2 (Kaninchen, polyklonal)	Novus Biologicals	1:500
	anti- SP1 (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Sekundärantikörper	Alexa Fluor <sup>R</sup> 488- anti- Maus (Ziege, polyklonal)	Molecular Probes	1:400
	HRP- anti- Kaninchen (Ziege, polyklonal)	DAKO/ Agilent Technologies Inc.	1:5000
	HRP- anti- Maus (Ziege, polyklonal)	DAKO/ Agilent Technologies Inc.	1:5000
	HRP- anti- Ziege (Kaninchen, polyklonal)	DAKO/ Agilent Technologies Inc.	1:5000

**Small interfering RNAs (siRNAs)**

Name	Hersteller
<i>BLOCK-iT™ floureszent</i>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
siRNA PHD2	Dharmacon, Thermo Fisher Scientific

**Plasmide**

Plasmid	Herkunft/ Referenz	Resistenz
pcDNA3	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Amp
pcDNA3 PHD2	Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck	Amp
pEGFP- PHD2	[257]	Kan
<i>pGL3[pH3SLV]luc</i> (HRE- Firefly- Luziferase)	[347] Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck	Amp
pGL4	Promega	Amp

**Primer für qRT- PCR**

Primerpaar	Sequenz 5'- 3'	Hersteller
Random Hexamer Primer (100 µM)		Thermo Fisher Scientific
SLC2A1	<i>forward</i> GGCCTTTTCGTTAACCGCTT	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
	<i>reverse</i> AGCATCTCAAAGGACTTGCCC	
L28	<i>forward</i> ATGGTCGTGCGGAACTGCT	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
	<i>reverse</i> TTGTAGCGGAAGGAATTGCG	

## Enzyme und Größenmarker

Name	Hersteller
<i>GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
M- MuLV reverse Transkriptase	New England Biolabs <sup>R</sup> Inc.
<i>PageRuler™ Plus DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific

## Zelllinien

Name	Ursprung	Besondere Eigenschaften
HeLa	Humanes Zervixkarzinom	HPV 18 pos., Inaktivierung p53-Tumorsuppressor
Hep3B	Humanes Leberkarzinom	Integriertes Hepatitis B Virus Genom
HepG2	Humanes hepatocelluläres Karzinom (HCC)	
HRG1	Humanes hepatocelluläres Karzinom (HCC)	HepG2 Zellen, stabil transfiziert mit einem Hypoxie- responsiven Reporter genkonstrukt [346]
Kelly	Humanes Neuroblastom	
MCF7	Humanes Mammakarzinom	Adenokarzinom, ER+, PR+/-, HER-2-
U2OS	Humanes Osteosarkom	Expression von wt p53 und Rb

## Bakterienstämme für Plasmidpräparation

Name	Herkunft/ Referenz
XLI <sup>R</sup>	Agilent Technologies Inc.

## Puffer, Lösungen und Gele

### Aus eigener Herstellung

Zum Ansetzen aller Puffer und Lösungen wurde Reinstwasser (Aqua bidest) benutzt.

Name	Zusammensetzung
Agarosegel (1x)	100 ml TAE Puffer 1 g Agarosepulver 5 µl Ethidiumbromid
Blockierungspuffer	5 % (w/v) Milchpulver in 1x PBS
Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz	0,2 % (w/v) Fischhaut Gelatine in 1x PBS
Calcium- Chlorid (CaCl <sub>2</sub> )- Lösung	60 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glycerin 10 mM MOPS
Coomassie- Färbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250
DEPC- H <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v) DEPC autoklavieren
Fixierlösung	3,7 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
Ladepuffer für SDS- Page (4x)	150 mM Tris- HCl, pH 6,8 2 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerin 15 % (v/v) β- Mercaptoethanol 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer für Agarose Gele (1x)	1x TAE- Puffer, pH 8,5
Laufpuffer für SDS- Page (1x)	25 mM Tris- HCl, pH 7,4 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Permeabilisierungspuffer (1x)	0,1 % (v/v) Triton- X- 100 in 1x PBS
Phosphat gepufferte Saline (PBS)- Puffer (1x)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Puffer A für Kernextrakte	10 mM Tris- HCl, pH 7,8 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl  Unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt: 2 µg/ ml Aprotinin 10 µg/ ml Leupeptin 20 µg/ ml Pepstatin 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,5 mM Benzamidin 2 mM Levamisole 10 mM β- Glycerolphosphat 0,5 mM DTT 0,4 mM PMSF
Puffer C für Kernextrakte	20 mM Tris- HCl, pH 7,8 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 420 mM KCl 20 % Glycerol  Unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt: 2 mg/ ml Aprotinin 10 mg/ ml Leupeptin 20 mg/ ml Pepstatin 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,5 mM Benzamidin 2 mM Levamisol 10 mM β- Glycerolphosphat 0,5 mM DTT 0,4 mM PMSF
Sammelgel für SDS- Page 10 ml	2,5 ml Tris- HCl 50 mM, pH 6,8 1,3 ml Acrylamid 6,1 ml Aqua bidest 100 µl SDS 10 % (w/v) 50 µl APS 10 % (w/v) 10 µl TEMED
Trenngel für SDS- Page 50 ml, 10 %	12,5 ml Tris- HCl 1500 mM, pH 8,8 16,7 ml Acrylamid 20,05 ml Aqua bidest 500 µl SDS 10 % (w/v) 250 µl APS 10 % (w/v) 25 µl TEMED
Trenngel für SDS- Page 50 ml, 15 %	12,5 ml Tris- HCl 1500 mM, pH 8,8 25 ml Acrylamid 11,75 ml Aqua bidest 500 µl SDS 10 % (w/v) 250 µl APS 10 % (w/v) 25 µl TEMED

Trenngel für SDS- Page 50 ml, 7,5 %	12,5 ml Tris- HCl 1500 mM, pH 8,8 12,5 ml Acrylamid 24,25 ml Aqua bidest 500 µl SDS 10 % (w/v) 250 µl APS 10 % (w/v) 25 µl TEMED
Tris- Acetat- EDTA (TAE)- Puffer (50x)	2 M Tris, pH 8,5 50 mM EDTA 1 M Essigsäure
Trypan- Blau- Test- Lösung	2 % Trypanblau in 1x PBS
Urea- Zelllysispuffer (1x)	10 mM Tris- HCl, pH 6,8 6,7 M Urea 10 M Glycerin 1 % (w/v) SDS 5 mM DTT 1x Proteaseinhibitor (1:100)
Western- Blot Transferpuffer	25 mM Tris- HCl 200 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

### Kommerzielle Puffer und Lösungen

Name	Hersteller
M- MuLV Reverse Transkriptase Puffer	New England Biolabs <sup>R</sup> Inc.
Nucleic Acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific
Nucleic Acid Purification Elution Solution	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific
RNA Purification Wash Solution	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific

### Kits

Name	Hersteller
<i>Amersham<sup>TM</sup> ECL Plus<sup>TM</sup> Western- Blotting Reagenz</i>	GE Healthcare
<i>Bio- Rad Dc Protein Assay</i>	Bio- Rad Laboratories Inc.
<i>CytoTox-Glo<sup>TM</sup></i>	Promega
<i>Dual- Luciferase<sup>TM</sup> Reporter System</i>	Promega

<i>GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>SensiMix™ SYBR<sup>R</sup> &amp; Fluorescein Kit</i>	Bioline GmbH

## Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Accublock™ DigitalDry Bath</i>	Labnet International Inc
Agarosegelkammern	Peqlab Biotechnologie GmbH
Autoclav V150	Systec
<i>Automatische Pipette Pipetus<sup>R</sup></i>	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss AG
<i>BZ- 9000 Fluoreszenz Microscope</i>	Keyence
<i>Cellometer™ Auto T4</i>	Nexcelom Bioscience
Centrifuge 5417 R	Eppendorf
CO <sub>2</sub> - Inkubator	Heraeus Instruments
Elektroblotter <i>Transblot SD semi-dry transfer cell</i>	Bio- Rad Laboratories Inc.
Flockeneisbereiter AF 80	Scotsman Industries Inc.
Folienschweißgerät	CIATronic
Gel- Gießvorrichtung und Kämme	Bio- Rad Laboratories Inc.
<i>Geldokumentationsanlage EASY Win32</i>	Herolab Laborgeräte
Gelkammern Mini Protean für Polyacrylamid- Gele	Bio- Rad Laboratories Inc.
Kühl- und Gefrierschrankskombination	Liebherr, Siemens AG, AEG AG
Labor Messwaage	Kern & Sohn GmbH
Linearbeschleuniger <i>Varian Trilogy- Cone-beam-CT- RapidArc</i>	Varian Medical Systems
Luminometer <i>Mithras LB940</i>	Berthold Technologies
Magnetrührer RCT Basic	IKA Werke
Mikrotiterplattenschüttler EASIA	Medgenix Diagnostics
Mikrowelle	Panasonic
Netzgerät Consort E835	Sigma- Aldrich, Merck KGaA
<i>Nukleinsäure Extraktionsstation ABI PRISM 6100</i>	Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific
Pipetten	Carl Roth GmbH und Co. KG, Gilson <sup>R</sup>
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments
<i>qRT- PCR ABI PRISM<sup>R</sup> 7000 Sequence Detection System</i>	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific

Reaktionsbecher/- kolben/- zylinder Glas Schott Duran	DWK Liefesiciencies GmbH
Reaktionsgefäß Plastik	VITLAB GmbH
Reaktionsgefäßständer	Hellma
Reinstwassersystem Ultra Clear	VLM GmbH
Saugautomat	KNF Neuberger GmbH
Schüttelinkubator <i>Wisd. WiseCube<sup>R</sup></i>	Witeg Labortechnik
Spektrophotometer <i>Nanodrop ND- 1000</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH
Spülmaschine Miele Professional	Miele & Cie. KG
Sterilwerkbank Aura 200 M A.C.	Nunc, Thermo Fisher Scientific
Sterilwerkbank HB2472 K	Heraeus Instruments
Sterilwerkbank MDH Laminarflow	Nunc, Thermo Fisher Scientific
Thermocycler Primus 96 <sup>plus</sup>	Eurofins Genomics
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tiefkälte Lagertruhe (-80 °C)	Kryotec- Kryosafe GmbH
Ultraschall- Homogenisator SonoPlus HD 3100	Bandelin electronic
Vortexer Power Mix L46	Labinco BV
Zellkulturinkubator Standardbedingungen	Heraeus Instruments

## Einwegmaterial

Name	Hersteller
<i>Amersham<sup>TM</sup> Hyperfilm<sup>TM</sup> MP</i> (Röntgenfilm)	GE Healthcare
<i>Amersham<sup>TM</sup> Protran<sup>TM</sup> Premium</i> <i>Nitrocellulose Blotmembrane</i>	GE Healthcare
<i>Cell Counting Chamber, Cellometer<sup>TM</sup></i> <i>Auto T4</i>	Nexcelom Bioscience
Deckgläser (12 mm)	Carl Roth GmbH und Co. KG
Einmalpipetten	Sarstedt AG und Co. KG
Einmalreaktionsgefäße (Eppendorfgefäße)	Sarstedt AG und Co. KG
Einmalröhrchen	Sarstedt AG und Co. KG, Greiner Bio- One International GmbH
Gewebekulturplatten (6-, 24- Loch)	Sarstedt AG und Co. KG
Gewebekulturplatten 96- Loch	Greiner Bio- One International GmbH
Glaspasteurpipetten	Carl Roth GmbH und Co. KG
Handschuhe	Hartmann Gruppe, Carl Roth GmbH und Co. KG

<i>Mikrotiterplatte Luminunc<sup>TM</sup> weiß (96-Loch)</i>	Nunc, Thermo Fisher Scientific
Objektträger	Carl Roth GmbH und Co. KG
Petrischalen	Sarstedt AG und Co. KG
Pipettenspitzen	Sarstedt AG und Co. KG
Plattierungsspatel	Sarstedt AG und Co. KG
Serologische Pipetten	Sarstedt AG und Co. KG
Zellkulturflaschen	Greiner Bio- One International GmbH
Zellschaber	Sarstedt AG und Co. KG

## Software

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<i>BZ Analyzer Software</i>	Keyence
<i>GraphPad Prism 5</i>	GraphPad Software
<i>Image J</i>	Open Source
<i>Inkscape</i>	GPL (Open Source)
<i>IrfanView</i>	Irfan Skiljan
<i>Microsoft Office Mac</i>	Microsoft Corporation
<i>Microsoft Office Windows</i>	Microsoft Corporation
<i>MikroWin 2000</i>	Berthold Technologies GmbH
<i>Reference Manager</i>	Research Information Systems
<i>AIDA Image Analyzer Software 4.5</i>	Raytest

## Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

### Originalveröffentlichung

Friederike K. Kosyna, Marie Nagel, Larissa Kluxen, Kim Kraushaar and Reinhard Depping. *The importin  $\alpha/\beta$ -specific inhibitor Ivermectin affects HIF- dependent hypoxia response pathways*. Biol. Chem., 2015 Sep 1; 396 (12): 1357-1367.

### Abstrakte

M. Nagel, J. Dunst, R. Depping, F.K. Kosyna. *Expression of cellular oxygen sensor PHD2 correlates with radiation sensitivity in different cancer cell lines*. Acta Physiologica, Vol.210, March 2014.

Lieberum, Maria; Kosyna, Friederike Katharina; Nagel, Marie; Schindler, SG; Depping, Reinhard. *Downregulation of the HIF- signaling pathway by the importin  $\alpha/\beta$ - specific Inhibitor Ivermectin*. Acta Physiologica, Vol.213, March 2015.

Friederike Katharina Kosyna, Marie Nagel, Maria Lieberum, Larissa Kluxen, Kim Kraushaar and Reinhard Depping. *The importin  $\alpha/\beta$ -specific inhibitor Ivermectin affects HIF- dependent hypoxia response pathways*. American Journal of Hematology, Vol. 90, Issue 8, August 2015.

### Kongressbeiträge

#### Poster und Kurzvortrag:

M. Nagel, J. Dunst, R. Depping, F.K. Kosyna. *Expression of cellular oxygen sensor PHD2 correlates with radiation sensitivity in different cancer cell lines*. Jahrestagung der deutschen Physiologischen Gesellschaft, Mainz, März 2014.

#### Poster:

F.K. Kosyna, M. Nagel, M.-K. Lieberum, R. Depping. *The importin  $\alpha/\beta$ -specific inhibitor Ivermectin affects HIF- dependent hypoxia response pathways*.

- Jahrestagung der deutschen Physiologischen Gesellschaft, Magdeburg, März 2015.
- Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology-"Hypoxia- From Basic Mechanisms to Therapeutics", Dublin, Irland, Mai 2015.
- „10th International Luebeck Conference on the Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin and other Haematopoetic Growth Factors“, Lübeck, Juni 2015.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Reinhard Depping**, Frau **Dr. Friederike Katharina Kosyna** und Herrn **Prof. Dr. Jürgen Dunst** sowie meiner Doktormutter Frau **Univ. Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog** für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die vielen Anregungen und das kritische Korrekturlesen meiner Entwürfe. Ich danke Frau **Univ. Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog** für die Übernahme der Doktormutterschaft und für das mir entgegen gebrachte Vertrauen.

Bei Herrn **Dr. Reinhard Depping** möchte ich mich für die ausgesprochen gute und intensive Betreuung und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Auch bei Frau **Dr. Friederike Katharina Kosyna** bedanke ich mich für die umfassenden, hilfreichen wissenschaftlichen Hilfestellungen und die allzeit offenen Ohren für jegliche Fragen. Für die so entstandene Freundschaft und die Unterstützung, auch in privaten Belangen, bin ich sehr dankbar.

Bei **Susanne Schindler**, **Susanne Mathie**, **Tanja Svensson** und **Bettina Rudzewski** möchte ich mich für die geduldige Einarbeitung in den Laboralltag, die unbezahlbare Hilfe und die schöne Zeit bedanken.

Allen Mitarbeitern des **Instituts für Physiologie** danke ich für die freundschaftliche Aufnahme, die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich möchte zudem auch den Mitarbeitern des **strahlenmedizinischen Instituts** meinen Dank aussprechen, insbesondere Herrn **Dr. Markus Dahlke** für die vielen Bestahlungsdurchgänge und das Meistern aller technischen Schwierigkeiten. Ich danke außerdem der **Universität zu Lübeck** für die finanzielle Förderung im Rahmen des Promotionsstipendienprogramms „Exzellenzmedizin“.

Mein allergrößter Dank gilt meiner **Familie** und meinen **Freunden**. Meinem **Ehemann Daniel** danke ich für die unbeschreibliche Unterstützung, seine unschätzbare Ruhe, Gelassenheit und Liebe. Meinen **Kindern Jonathan** und **Carlotta** danke ich für ihr frohes Gemüt, die Ablenkungen und Kuscheleinheiten und für die zahlreichen Malereien auf meinen Aufzeichnungen. Bei meinen **Eltern** möchte ich mich für ihre bedingungslose Liebe und Begleitung in allen Lebenssituationen bedanken und dafür, dass sie mich zu dem Menschen erzogen haben, der ich heute bin. Meinem **Bruder Niklas** und meinen **Freunden** bin ich für die vielen intensiven, lustigen und unterstützenden Gespräche und ihr Vertrauen von Herzen dankbar. Und, lieber **Opi**, diese Arbeit sei dir gewidmet.

## Lebenslauf (Kurzversion)

### Persönliche Daten

Name: Marie Nagel  
Geburtsdatum: 29.04.1990  
Geburtsort: Hansestadt Hamburg  
Familienstand: verheiratet  
Kinder: Jonathan Jens Nagel,  
geb. 18.03.2015  
Carlotta Maja Nagel,  
geb. 04.03.2019



### Ausbildung

2010- 2017 Studentin der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck,  
Abschluss der Ärztlichen Prüfung mit der Note 1,0 (bester Abschluss  
im Studienjahr 2016/2017)  
2000- 2009 Gymnasialausbildung am Emil- von- Behring- Gymnasium  
Großhansdorf, Abschluss der allgemeinen Hochschulreife mit der  
Note 1,0  
1996- 2000 Grundschulausbildung an der Grundschule Wöhrendamm,  
Großhansdorf

### Auslandsaufenthalte

08/2006- 03/2007 Schüleraustausch Rochester, Minnesota, USA  
09/2009- 11/2009 Freiwilligenarbeit in Arusha, Tansania

### **Praktische Erfahrungen**

- seit 01/2018            Assistenzärztin für Innere Medizin und Kardiologie, Sana Kliniken Lübeck
- seit 09/2013            Doktorandin im Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck
- 11/2016- 10/2017      Praktisches Jahr in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Allgemeinmedizin
- 03/2013- 08/2014      Famulaturen in der Zentralen Notaufnahme (Sana Kliniken Lübeck, in der Praxis Dr. Holtkamp (Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe, Lübeck), in den Kliniken für Radiologie, Strahlentherapie und Anästhesiologie (UKSH Campus Lübeck)

### **Förderungen**

- 2013- 2017            Förderung durch die Studienstiftung des deutschen Volkes
- 04/2014- 10/2014      Förderung durch das Promotionsstipendienprogramm "Exzellenzmedizin" der Universität zu Lübeck