

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologie

Die Bedeutung des Enzyms MTH1 in Krebszellen, insbesondere in Hypoxie und
in Kombination mit ionisierender Strahlung

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Mosche Pomsch
aus Hamm
2019

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/71967

URN: urn:nbn:de:hbz:464-20200714-123237-2

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. E. Metzen
2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. M. Tewes
3. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. V. Jendrossek

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2020

Publikationen:

Kranz P, Neumann F, Wolf A, Classen F, **Pompsch M**, Ocklenburg T, Baumann J, Janke K, Baumann M, Goepelt K, Riffkin H, Metzen E, Brockmeier U. 2017. *PDI is an essential redox-sensitive activator of PERK during the unfolded protein response (UPR)*. Cell Death Dis. 2017 Aug 10;8(8):e2986. PMID: 28796255.

Pompsch M, Vogel J, Classen F, Kranz P, Iliakis G, Riffkin H, Brockmeier U, Metzen E. 2018. *The presumed MTH1-inhibitor TH588 sensitizes colorectal carcinoma cells to ionizing radiation in hypoxia*. BMC Cancer. 2018 Nov 29;18(1):1190. doi: 10.1186/s12885-018-5095-x.

Classen F, Kranz P, Riffkin H, **Pompsch M**, Wolf A, Göpelt K, Baumann M, Baumann J, Brockmeier U, Metzen E. 2019. *Autophagy induced by ionizing radiation promotes cell death over survival in human colorectal cancer cells*. Exp Cell Res. 2019 Jan 1;374(1):29-37. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.11.004. Epub 2018 Nov 6.

Vorträge:

Pompsch M, Riffkin R, Kranz P, Classen F, Wolf A, Goepelt K, Baumann B, Berglund U, Helleday T, Brockmeier U, Metzen E. 2016. *Inhibition of the nucleotide pool sanitizing enzyme MTH1 augments genotoxic effects of ionizing radiation and hypoxia on tumor cells*. 95nd Annual Meeting, Deutsche Physiologische Gesellschaft, 03.-05.03.2016, Lübeck, Germany.

Posterpräsentationen:

Pompsch M, Riffkin R, Kranz P, Classen F, Wolf A, Goepelt K, Baumann B, Berglund U, Helleday T, Brockmeier U, Metzen E. 2015. *Inhibition of the nucleotide pool sanitizing enzyme MTH1 augments genotoxic effects of ionizing radiation and hypoxia on tumor cells*. 14. Forschungstag der Medizinischen Fakultät 20.11.2015, Universitätsklinikum Essen, Germany.

Pompsch M, Riffkin R, Kranz P, Classen F, Wolf A, Goepelt K, Baumann B, Berglund U, Helleday T, Brockmeier U, Metzen E. 2015. *MTH1-Inhibition augments genotoxic effects of ionizing radiation and hypoxia on tumor cells*. Begutachtung des GRK1739 durch die DFG. 15.03.2016, Universitätsklinikum Essen, Germany.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung.....	9
1.1 Krebs.....	9
1.1.1 Krebsentstehung.....	9
1.1.2 Therapie von Krebserkrankungen.....	10
1.1.3 Darmkrebs	11
1.1.4 Stellenwert in der Medizin.....	12
1.2 MTH1	13
1.2.1 Wirkungsmechanismus von MTH1	13
1.2.2 8-oxo-dGTP-assoziierte Schäden und zelluläre Schutzmechanismen	14
1.2.3 MTH1 in der Tumorbiologie	15
1.2.4 MTH1 als therapeutisches Ziel	16
1.3 Reaktive Sauerstoffspezies.....	18
1.4 Ionisierende Strahlung (<i>Ionizing Radiation</i> , IR) und <i>Radiosensitizer</i>	21
1.5 Zelltod	23
1.6 Hypoxie	26
1.7 HUVEC als Modell für die Behandlung gesunder Zellen	30
1.8 Zielsetzung der Arbeit	31

2	Material und Methoden	32
2.1	Materialien.....	32
2.1.1	Technische Geräte	32
2.1.2	Zelllinien	33
2.1.3	Puffer	33
2.1.4	Antikörper	35
2.1.5	Kits.....	36
2.1.6	shRNA und Plasmide.....	36
2.1.7	Sonstige Substrate, Reagenzien und Chemikalien.....	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	Zellkultur	39
2.2.2	<i>Knockdowns</i>	41
2.2.3	Proteinanalyse	43
2.2.4	SDS-Gelelektrophorese (PAGE) und <i>Western Blotting</i>	44
2.2.5	Caspase 3-Aktivitäts Assay	48
2.2.6	Zelltod-Determination mit PI und Hoechst 33342	49
2.2.7	MTT-Assay	50
2.2.8	<i>Colony Formation Assay</i>	51
2.2.9	Fluoreszenzmikroskopie	52
2.2.10	Luciferase-Assay	54
2.2.11	Statistische Analyse.....	55

3	Ergebnisse.....	56
3.1	Strahlensensitivität TH588-behandelter HCT116	56
3.1.1	Caspase 3-abhängige Apoptose nach Kombinationstherapie ...	56
3.1.2	<i>Viability</i> nach Kombinationstherapie	58
3.1.3	Visuelle Zelltodanalyse nach Kombinationstherapie.....	59
3.1.4	PARP- <i>cleavage</i> nach Kombinationstherapie	62
3.1.5	Langzeitüberleben nach Kombinationstherapie	63
3.2	Einfluss der MTH1-Inhibition auf HCT116 in Hypoxie	65
3.2.1	<i>Viability</i> in Hypoxie nach TH588-Behandlung.....	65
3.2.2	Caspase 3-abhängige Apoptose in Hypoxie nach TH588- Behandlung	67
3.2.3	Visualisierung von 8-oxo-dGTP nach TH588-Behandlung	68
3.2.4	MTH1-Expression in Hypoxie	79
3.2.5	HIF-Expression nach TH588-Behandlung	80
3.2.6	Einfluss von TH588 auf die Antioxidans-Expression in Krebszellen.....	83
3.2.7	Strahlensensitivität von Tumorzellen in Hypoxie nach TH588- Behandlung	84
3.3	MTH1- <i>Knockdown</i>	87
3.3.1	<i>Knockdown</i> von MTH1 in HCT116 und SW480.....	87
3.3.2	Zelltod nach MTH1- <i>Knockdown</i>	89
3.3.3	Einfluss des MTH1- <i>Knockdowns</i> auf die <i>Viability</i>	90
3.3.4	<i>Colony Formation Assay</i> nach MTH1- <i>Knockdown</i>	91
3.3.5	Kombination von <i>Knockdown</i> und Inhibitor.....	92
3.4	TH588 in HUVEC	93

4	Diskussion	95
4.1	Die Bedeutung von MTH1 in der medizinischen Forschung.....	95
4.2	Zelllinienspezifische Abhängigkeit von Krebszellen von MTH1	95
4.3	MTH1 und TH588 in Zellen ohne maligne Transformation.....	99
4.4	Wirksamkeit und Wirkmechanismus von TH588	100
4.5	MTH1-Inhibition in Hypoxie	104
4.6	Duale Behandlung mit TH588 und Radiotherapie	105
4.7	Ausblick.....	106
5	Zusammenfassung	107
6	Literaturverzeichnis.....	108
7	Tabellarischer Anhang	117
8	Abkürzungsverzeichnis	118
9	Danksagung.....	120
10	Lebenslauf	121

1 Einleitung

1.1 Krebs

1.1.1 Krebsentstehung

Der Begriff „Krebs“ beschreibt eine Gruppe von Erkrankungen, die durch mutationsbedingtes Wachstum und Hyperproliferation von Zellen gekennzeichnet ist. Im Gegensatz zu benignen Tumoren zeichnen sich maligne Tumore dabei durch invasives Wachstum und die Fähigkeit zur Metastasierung aus. Obwohl der Begriff „Tumor“ auch benigne Erkrankungen einschließt, wird er üblicherweise synonym zu „Krebs“ und „maligne Neoplasie“ verwendet. Mutationen sind Alterationen in der Abfolge der Basenpaare. Sie treten zur Lebenszeit jeder Zelle millionenfach auf (Kong et al., 2012), können zumeist jedoch durch DNA-Reparaturenzyme korrigiert werden. Mutiert ein Gen ohne nachfolgende Reparatur, kann ein verändertes Protein als Ergebnis der Expression gebildet werden und mitunter gravierende Veränderungen im Stoffwechsel und Zellzyklus der Zelle zur Folge haben.

Dabei werden zwei Arten von Genen unterschieden: Protoonkogene und Tumorsuppressorgene. Protoonkogene codieren Proteine, die normalerweise Proliferation oder Apoptose regulieren, beispielsweise den EGFR (*epithelial growth factor receptor*). Erfolgt eine Mutation in der Liganden-bindenden Region des Rezeptors, ist dieser daraufhin konstitutiv und unabhängig von EGF aktiv (Arteaga, 2002). Tumorsuppressorgene hingegen codieren Proteine, die aktiv die Entstehung von Tumoren verhindern. Ein klassisches Beispiel ist das Protein p53, das bei DNA-Schäden in der Zelle akkumuliert und den Zellzyklus arretiert, um die Reparatur der DNA zu gewährleisten und bei irreparablen Schäden Caspasen zu aktivieren, welche wiederum die Zelle in die Apoptose (den geplanten Zelltod, siehe Kapitel 1.5) eintreten lassen. Punktmutationen in dem dazugehörigen Gen (*TP53*) führen zu einem Funktionsverlust von p53, sodass selbst bei starken Schäden der DNA der Zellzyklus nicht arretiert wird (Almog & Rotter, 1997).

Weiterhin ist die Entstehung von Krebs als Mehrschrittprozess beschrieben, wie das Beispiel Darmkrebs verdeutlicht. Über 95 % aller Kolonkarzinome gehen durch sukzessive Mutationen verschiedener Proteine aus einem Adenom hervor (Baenkler, 2001). Proteine, die dabei häufig von Mutationen betroffen sind, sind

KRAS (*Kirsten rat sarcoma*, nach seiner Erstbeschreibung) und p53. KRAS ist eine GTPase, die durch das KRAS-Protoonkogen codiert wird und maßgeblich an der Regulierung mitogener Signalwege beteiligt ist. Auch eine Mutation oder Hochregulation des KRAS-stimulierenden EGFR wird häufig in Darmkrebs gefunden und lässt sich therapeutisch nutzen. Spezifische monoklonale Antikörper gegen EGFR wie Cetuximab verhindern die Signaltransduktion des Rezeptors und können zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms beitragen. Das gelingt allerdings nur, wenn keine aktivierende KRAS-Mutation vorliegt, die KRAS unabhängig von der Aktivierung durch EGFR macht (Baselga, 2001).

1.1.2 Therapie von Krebserkrankungen

Konventionell umfasst die Therapie von Krebserkrankungen drei Ansätze. Bei lokal begrenzten Tumoren gilt die chirurgische Resektion als Goldstandard. Alternativ kann, insbesondere bei chirurgisch schwer erreichbarer Lokalisation oder ausgeprägter Strahlensensitivität, eine Radiotherapie erfolgen. Fortgeschrittene und metastasierte Krebserkrankungen erfordern zusätzlich meist eine medikamentöse Therapie. Dabei kommen vor allem antiproliferative Substanzen zum Einsatz, die aufgrund der hohen Zellteilungsrate vornehmlich Krebszellen abtöten, aber auch gesunde, schnell proliferierende Zellen (z. B. der Schleimhaut oder des hämatopoetischen Systems) beeinträchtigen, sodass eine Therapie mitunter mit gravierenden Nebenwirkungen wie Erbrechen, Durchfällen und einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergeht.

Die *targeted therapy* versucht genau diese Problematik zu umgehen. Dazu werden Medikamente verwendet, die gezielt in den Stoffwechsel von Krebszellen eingreifen (Baudino, 2015). Vorteil dieser Medikamente ist die größere therapeutische Breite durch ein günstigeres Nebenwirkungsprofil, da die Krebszellen selektiv beeinträchtigt werden. Jedoch entfalten einige dieser Substanzen auch nur bei einigen wenigen Krebsentitäten die gewünschte Wirkung, da diese aufgrund der starken genomischen Heterogenität sehr variable Stoffwechsellanpassungen aufweisen können. Dies ist ein Nachteil gegenüber den konventionellen Chemotherapeutika, die allgemein gegen verschiedene Krebserkrankungen eingesetzt werden können (Baudino, 2015).

Die einzelnen Möglichkeiten zur Therapie von Krebserkrankungen werden üblicherweise im Sinne einer multimodalen Therapie miteinander kombiniert, um das Nebenwirkungsprofil der einzelnen Therapieoptionen zu minimieren und deren Effektivität zu steigern.

1.1.3 Darmkrebs

Theoretisch trägt jede Zelle des Körpers die Gefahr der Entartung im Sinne einer malignen Transformation in sich. Resultierend ist für fast jeden Zelltypus im menschlichen Körper eine entsprechende Neoplasie beschrieben. Unterteilt werden die bösartigen Tumore anhand des ontogenetischen Ursprungs der Zelle, wobei die Gruppe der Karzinome (Neoplasien epithelialen Ursprungs) die höchste Prävalenz aufweist (Krebsregisterdaten, 2015). Jede dieser Gruppen besteht ihrerseits aus vielen eigenständigen Entitäten, die wiederum durch verschiedene Mutationen entstehen können und sich deshalb auch, obwohl demselben Gewebe entstammend, verschiedenartig präsentieren. Aufgrund der Diversität in puncto Ursprungsgewebe und Entstehungsmechanismus weist jede Krebsform ein unterschiedliches Wachstums- und Streuungsverhalten auf und reagiert unterschiedlich auf therapeutische Manipulationen (Baenkler, 2001).

Die für die meisten Versuche in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (HCT116 und SW480) wurden Patienten mit kolorektalem Karzinom entnommen und sind somit epithelialen Ursprungs. Diese Krebsform zeichnet sich durch einfache Zellkulturbedingungen aus und ist aufgrund der verschiedenen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten ein gutes *in vitro* Modell für die Erprobung der Reaktion von Krebszellen auf medikamentöse Behandlung oder gentechnische Manipulationen, wie zum Beispiel *Knockdowns*. HCT116 und SW380 entstammen Adenokarzinomen.

Mit fast 13 % ist Darmkrebs nach Prostata- und Lungenkrebs die dritthäufigste Tumorlokalisation in Deutschland bei Männern und bei Frauen sogar die zweithäufigste nach dem Mammakarzinom. Darmkrebs ist bei Männern nach Prostatakrebs für die meisten Krebssterbefälle verantwortlich. Bei Frauen ist es nach Brustdrüse und Lunge die dritthäufigste zum Tode führende Tumorlokalisation (Krebsregisterdaten, 2015). In über 60 % der Patienten manifestiert sich der Krebs

im Dickdarm, in etwa 30 % im Rektum. Abgesehen von seltenen Plattenepithelkarzinomen im Analbereich handelt es sich fast ausschließlich um Adenokarzinome.

Die wichtigsten Darmkrebs begünstigenden Risikofaktoren sind in absteigender Reihenfolge Tabakkonsum, Übergewicht, Bewegungsmangel und ballaststoffarme Ernährung, aber auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen spielen eine Rolle (Krebsregisterdaten, 2015). Neben der häufiger auftretenden sporadischen Form des Karzinoms gibt es hereditäre aber seltenere Varianten wie das Lynch-Syndrom oder die familiäre adenomatöse Polyposis.

Bei der Therapie von Darmkrebs kommen viele Therapieprinzipien zur Anwendung. Grundsätzlich wird eine en-bloc-Resektion des befallenen Darmsegmentes mit Lymphadenektomie angestrebt, beim Rektumkarzinom zusätzlich eine Exzision des umgebenden Mesorektums. Neoadjuvant, adjuvant oder palliativ wird zusätzlich eine zytostatische Chemotherapie eingesetzt, bei der Folinsäure in Kombination mit Pyrimidin-Antagonisten (u. a. 5-Fluorouracil), Topoisomerase-Hemmstoffe sowie platinhaltige Substanzen angewandt werden, ggf. unterstützt durch Antikörper gegen VEGF (*vascular endothelial growth factor*, Bevacizumab) oder EGFR (Cetuximab). Im Falle des Rektumkarzinoms wird ab Stadium II zusätzlich eine (neo-)adjuvante Radiotherapie empfohlen (Herold, 2015; Pox, 2014).

1.1.4 Stellenwert in der Medizin

Krebserkrankungen stellen nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen dar. Im Jahr 2008 erkrankten in der EU 2,45 Millionen Menschen an Krebs, 1,23 Millionen starben daran (Luengo-Fernandez et al., 2013). In Deutschland lag die Inzidenz von Krebserkrankungen 2008 bei über 450.000 und es ereigneten sich knapp 220.000 Krebssterbefälle (Krebsregisterdaten, 2015). Da das Lebensalter durch den medizinischen Fortschritt immer weiter steigt, wird die Inzidenz von Krebserkrankungen in Zukunft voraussichtlich noch weiter steigen. Entsprechend hoch sind auch die Kosten, die durch Krebserkrankungen verursacht werden. Allein in der EU betragen die jährlichen Gesamtausgaben, bestehend aus Behandlungskosten und Produktivitäts-

Einbußen durch Morbidität und Mortalität, etwa 126 Milliarden Euro. Knapp 35 Milliarden davon entfallen auf Deutschland (Luengo-Fernandez et al., 2013).

1.2 MTH1

1.2.1 Wirkungsmechanismus von MTH1

MutT Homolog 1 (MTH1, 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin Triphosphatase) ist ein Enzym, das durch das NUDT1 Gen codiert wird und oxidierte Nukleotide aus dem Desoxy-Nukleotidtriphosphat(dNTP)-Pool der Zelle entfernt. Zu diesem Zweck hydrolysiert MTH1 vorwiegend 8-Oxo-7,8-Dihydro-2-Deoxyguanosin-5-Triphosphat (8-oxo-dGTP) zu 8-Oxo-7,8-Dihydro-2-Deoxyguanosin-5-Monophosphat (8-oxo-dGMP) (Kamiya et al., 2002) durch nucleophile Substitution von Wasser am β -Phosphat (Mishima et al., 2004). Dieser Vorgang ist in Abbildung 1 illustriert. 8-oxo-dGTP diffundiert, wenn es nicht hydrolysiert wird, in den Zellkern und wird bei der Replikation durch Polymerasen in die DNA eingebaut.

Da 8-Oxoguanin (8-oxo-G) anders als eine reguläre Guaninbase anstelle von drei nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der Base des Komplementärstranges ausbilden kann, führt die Insertion zu G:C zu A:T Transversionen. Die Akkumulation von 8-oxo-G bzw. des korrespondierenden Nucleosids 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-oxo-dG) in nukleärer DNA verursacht eine poly-ADP-Ribose-Polymerase(PARP)-abhängige Translokation von Apoptose-induzierbaren Faktoren. In mitochondrialer DNA triggert der Einbau des veränderten Nucleotids eine Kalzium-Freisetzung mit konsekutiver mitochondrialer Dysfunktion. Beide Wege resultieren im Zelltod und werden durch die Akkumulation von Einzelstrangbrüchen (*single-strand breaks*, SSB) getriggert (Oka et al., 2008).

Die Pyrophosphatase-Aktivität von MTH1 verhindert den Einbau von 8-oxo-dGTP in genomische und mitochondriale DNA (Yoshimura et al., 2003). Somit ist das Enzym durch Schutz vor DNA-Schäden am Erhalt der Zelle beteiligt und verhindert programmierten Zelltod und Seneszenz sowie Mutagenese (Nakabeppu et al., 2010). MTH1 kann auch andere oxidierte Nucleotide hydrolysieren, wobei die höchste Affinität für 2-OH-dATP besteht (Fujikawa et al., 2001). Jedoch ist 8-oxo-dGTP das am häufigsten entstehende oxidierte Nucleotid und deshalb von größerer biologischer Relevanz (Svenberg et al., 2011).

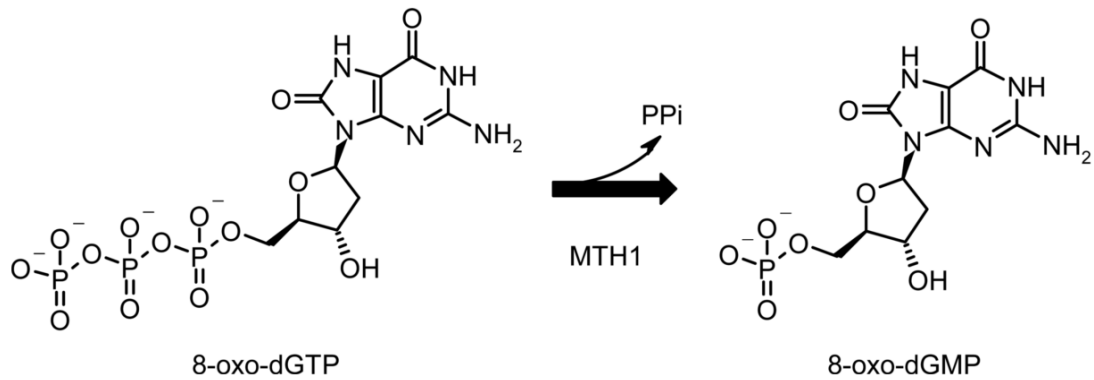


Abbildung 1: Katalytische Aktivität von MTH1. MTH1 hydrolysiert 8-oxo-dGTP zu 8-oxo-dGMP durch Abspaltung von Pyrophosphat. In der Folge kann das Mononukleotid nicht mehr in die DNA eingebaut werden (Papeo, 2016).

1.2.2 8-oxo-dGTP-assoziierte Schäden und zelluläre Schutzmechanismen

Während MTH1 den Einbau oxidierter Nukleotide in die DNA verhindert, entfernen Proteine der Basenexisions-Reparatur (BER) bereits eingefügtes 8-oxo-G. Dabei stehen vier Enzyme im Vordergrund: 8-Oxoguanin Glykosylase (OGG1), Apurini-sche/aprimidinische Endonuclease 1 (APE1), DNA Polymerase β (POLB) und DNA Ligase I (Fortini, 2003). OGG1 trennt als Glykosylase die glykosidische Bin-dung zwischen Desoxyribose und der beschädigten Base. APE1 erzeugt daraufhin einen Knick im Phosphodiester-Rückgrat der DNA an der nun basenlosen Stelle und schneidet sie so, dass eine Hydroxylgruppe am 3'-Terminus und ein Desoxy-ribosephosphat am 5'-Terminus entstehen. Die Desoxyribose-Gruppe wird durch die 2-Desoxyribose-5-Phosphat Lyase-Aktivität der POLB aus dem DNA-Rückgrat geschnitten und durch ihre Polymerase-Aktivität wird die entstandene Lücke kom-plementär zum Gegenstrang neu aufgefüllt. Schließlich wird der Bruch durch die DNA Ligase I verschlossen (Idriss et al., 2002).

Obwohl die Möglichkeit der Reparatur von 8-oxo-G-bedingten Fehlpaarungen be-steht, scheint MTH1 einen großen Einfluss auf den durch 8-oxo-dGTP verursach-ten Schaden zu nehmen. Dies wird bei der Betrachtung MTH1-defizienter Mäuse (MTH1^{-/-}) deutlich, bei denen die Inzidenz von Lungen-, Leber- und Magentumoren erhöht ist (Tsuzuki et al., 2001). Dies kann Ausdruck einer erhöhten Mutationsrate durch Akkumulation von Basenfehlpaarungen sein, welche durch das beschriebene Reparatursystem nicht in vollem Umfang kompensiert werden kann.

Die genaue Rolle der oben genannten Reparaturenzyme in der Kompensation der MTH1-Defizienz ist insgesamt noch unklar, da beispielsweise keine Hochregulation von OGG1 nach der Behandlung mit MTH1-Hemmstoffen auf mRNA- oder Proteinebene gemessen werden konnte (Ellermann et al., 2017).

1.2.3 MTH1 in der Tumorbilogie

Besonders deutlich wird die Funktion von MTH1 allerdings erst in Situationen, in denen viele oxidierte Nukleotide produziert werden. Einer der Hauptmediatoren der durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufenen DNA-Schäden ist 8-oxo-dGTP (Valavanidis et al., 2009). Aufgrund des alternierenden Levels von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, siehe Kapitel 1.3) in Krebszellen im Vergleich zu gesunden Körperzellen kommt dem Enzym MTH1 hier eine höhere Bedeutung zu, da eine entsprechend höhere Anzahl oxidierter Nukleotide produziert wird (Helleday, 2014). Beispielsweise ist im Urin von Patienten mit kolorektalem Karzinom ein erhöhter 8-oxo-dGTP-Spiegel messbar (Obtulowicz et al., 2010), was auf die verstärkte Produktion hindeutet. Zudem ist der Expressionsgrad von MTH1 in vielen Krebszelllinien gegenüber untransformierten Zellen signifikant erhöht (Gad et al., 2014; Li et al., 2017; Pudelko et al., 2017). MTH1 ist zur Kompensation des intensiven Sauerstoffstresses in Krebszellen hochreguliert, so dass eine Abhängigkeit der Krebszellen von dem Enzym anzunehmen ist.

Folglich kommt MTH1 als Zielstruktur für die Behandlung maligner Neoplasien in Betracht. Eine gegen MTH1 gerichtete Therapie würde demnach selektiv Krebszellen betreffen, da nur in diesen Zellen mit einem erhöhten 8-oxo-dGTP-Vorkommen zu rechnen ist und dementsprechend auch nur das Überleben maligner Zellen von MTH1 abhängt (Abbildung 2). Zudem würde durch diesen Wirkungsmechanismus ein breites Spektrum verschiedener Krebsentitäten behandelbar sein, da MTH1 in vielen Krebszelllinien in hohem Maße exprimiert wird. Zu diesem Zweck haben Gad et al. 2014 den ersten MTH1-Hemmstoff entwickelt. TH588 ähnelt strukturell 8-oxo-dGTP, dem Substrat des Enzyms, und ist daher in der Lage, an das aktive Zentrum des Enzyms zu binden (Gad et al., 2014).

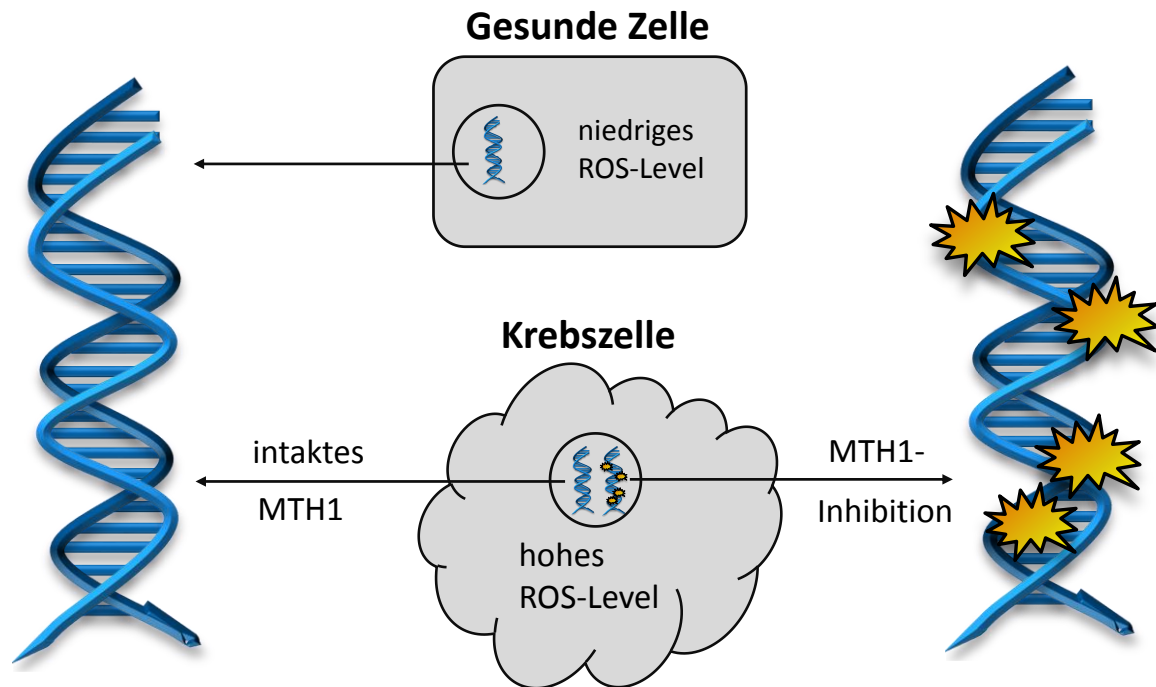


Abbildung 2: These des selektiven Tumorzelltodes durch MTH1-Inhibition. In gesunden Körperzellen spielt 8-oxo-dGTP aufgrund der geringen Belastung durch ROS nur eine untergeordnete Rolle. In Krebszellen hingegen muss MTH1 die ROS-bedingte Überproduktion des oxidierten Nukleotids kompensieren, um die DNA vor Schäden zu bewahren. Wird MTH1 gehemmt, entfällt dieser Schutz und die resultierenden DNA-Schäden können zum Tode der Tumorzelle führen. Auf diese Weise sollen MTH1-Hemmstoffe selektiv auf Krebszellen wirken. Modifiziert nach (Gad et al., 2014).

1.2.4 MTH1 als therapeutisches Ziel

Neben TH588 sind weitere Hemmstoffe von MTH1 bekannt. Der MTH1 inhibierende Effekt des Krebsmedikamentes Crizotinib wurde erst nach Erstzulassung beschrieben. Während das (R)-Enantiomer von Crizotinib als Tyrosinkinase-Inhibitor für die Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms genutzt wird, zeigt es in der (S)-Konformation eine relevante Inhibition von MTH1, die sich in der Akkumulation von DNA-SSBs, Stimulation der DNA-Reparatur in humanen Kolonkarzinomzellen und verringertem Tumorwachstum im Tiermodell äußert (Huber et al., 2014).

In jüngster Zeit wurden zudem, als Reaktion auf die Ergebnisse von Gad et al., spezifische Hemmstoffe von MTH1 durch verschiedene Arbeitsgruppen entwickelt, die trotz nachgewiesener MTH1-inhibierender Eigenschaften das Überleben von Krebszellen nicht oder zumindest weniger effektiv als TH588 und Crizotinib ver-

hindern (Ellermann et al., 2017; Kawamura et al., 2016; Kettle et al., 2016; Petrocchi et al., 2016).

Aufgrund dieser Entwicklung wurde kürzlich die Funktionsweise von TH588 als Hemmstoff von MTH1 angezweifelt. Konträr dazu zeigten Gad et al., dass siRNA gegen MTH1 sowie ein *Knockdown* von MTH1 in SW480 Zellen das Tumorumfugen bei Mäusen signifikant verminderte (Gad et al., 2014). Daraus ergibt sich die Frage, warum der *Knockdown* von MTH1 sowie die *first-in-class*-Inhibitoren TH588 und TH287 und auch Crizotinib einen Phänotyp erzeugen, der bei dem Einsatz anderer spezifischer Hemmstoffe ausbleibt. Eine mögliche Erklärung ist, dass MTH1 nur in einigen Zelllinien für das Überleben essentiell ist, in anderen hingegen nicht. So wäre die von Kettle et al. beschriebene Abwesenheit eines Phänotyps in U2OS-Zellen nach Behandlung mit MTH1 si-RNA zu erklären und auch die Reduktion des Tumorumfugens in der Veröffentlichung von Gad et al., 2014. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit unter anderem untersucht, ob zelllinienspezifische Unterschiede in der Abhängigkeit von MTH1 bestehen.

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, "Sauerstoffradikale") sind reaktive und potentiell schädliche Derivate des Sauerstoffs. Biologisch relevante Vertreter sind das Superoxid-Anion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal ($HO\cdot$). Es gibt jedoch noch viele weitere sauerstoffenthaltende, reaktive Stoffe. Der wohl reaktivste dieser Stoffe ist das Hydroxyl-Radikal, das Elektronen von jedem Molekül in seinem Umfeld entfernt, dieses so in ein freies Radikal konvertiert und auf diese Weise eine Kettenreaktion begünstigt. Wasserstoffperoxid ist weniger reaktiv und kann deshalb in den Zellkern diffundieren und dort direkt DNA-Strangbrüche induzieren (Driessens et al., 2009). Die wichtigsten Sauerstoffspezies sind in Abbildung 3 dargestellt.

ROS sind ein natürlich vorkommendes Stoffwechselprodukt der Zelle. Makrophagen und neutrophile Granulozyten produzieren gezielt Sauerstoffradikale, um sie bei der Phagozytose in Form eines *oxidative bursts* schlagartig freizusetzen (Robinson, 2008). Die meisten endogenen ROS sind mitochondrialen Ursprungs, wo durch oxidative Phosphorylierung ATP generiert und Sauerstoff mit H^+ -Ionen in Wasser umgewandelt wird. In diesem Prozess entstehen gelegentlich auch Superoxid-Anionen, die selbst zur toxischen Lipid-Peroxidation führen können oder enzymatisch in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Während ROS also ein Produkt normaler Zellaktivität sind, können übermäßige Mengen der Zelle schaden. Exogene Quellen von ROS sind vielfältig und umfassen Zigarettenrauch, Alkohol und Medikamente (Halliwell & Cross, 1994; Tang et al., 2009). Besonders in der Gruppe der Chemotherapeutika finden sich viele Wirkstoffe, deren Wirkungs- oder Nebenwirkungsprofil auf der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beruht (Fang et al., 2007). Auch für TH588 wurde eine ROS-modulierte, MTH1 unabhängige Apoptose-Induktion beschrieben (J. Y. Wang et al., 2016).

Eine weitere Noxe, deren DNA-schädigende Wirkung zumindest teilweise auf der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies basiert, ist ionisierende Strahlung. Radiolyse von Wasser kann in der Produktion von Hydroxyl-Radikalen resultieren (Riley, 2009) und UV-Strahlen-induzierte ROS-Produktion ist einer der wichtigsten Faktoren bei der Entstehung des malignen Melanoms (Larsson et al., 2006). Insgesamt ist Sauerstoffstress mit dem Auftreten kardiovaskulärer, inflammatorischer und neoplastischer Erkrankungen assoziiert.

Eukaryotische Zellen besitzen Mechanismen zum Schutz vor schädigendem Einfluss übermäßiger ROS-Bildung. Neben dem reduzierenden Milieu der Zelle sind vor allem Superoxid-Dismutasen (SOD) an der Elimination der ROS beteiligt. Diese Gruppe von Enzymen katalysiert die Reaktion von Superoxid-Anionen und Protonen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff. Wasserstoffperoxid wird entweder weiter durch die Katalase prozessiert, wobei aus zwei Molekülen H_2O_2 ein Molekül Sauerstoff und zwei Moleküle Wasser entstehen, oder aber reagiert mit einem freien Elektron, wobei ein hochreaktives Hydroxyl-Radikal gebildet wird.

Ein weiterer Schutz der Zelle vor ROS ist das Tripeptid Glutathion (GSH), welches eine Thiolgruppe besitzt und Elektronen auf ROS übertragen kann. Dabei verlieren diese ihre destruktive Wirkung. Zwei Moleküle oxidiertes Glutathions bilden ein Dimer (GSSG), das durch die Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von zwei NADPH zu zwei Molekülen GSH reduziert werden kann (Rassow, 2006). Die Expression von SOD, Glutathion-Reduktase und weiterer Enzyme, die an der als *antioxidant defense* bezeichneten Antwort der Zelle auf Sauerstoffstress beteiligt sind, wird durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2) reguliert (Zhu et al., 2005). In der ungestressten Zelle wird Nrf2 durch verschiedene Proteine schnell abgebaut. Bei Sauerstoffstress wird Nrf2 nicht degradiert, sondern transloziert in den Zellkern, bindet hier an als *antioxidant responsive elements* (ARE) bezeichnete DNA-Promotorregionen und induziert die Transkription von antioxidativ aktiven Genen (X. J. Wang et al., 2006).

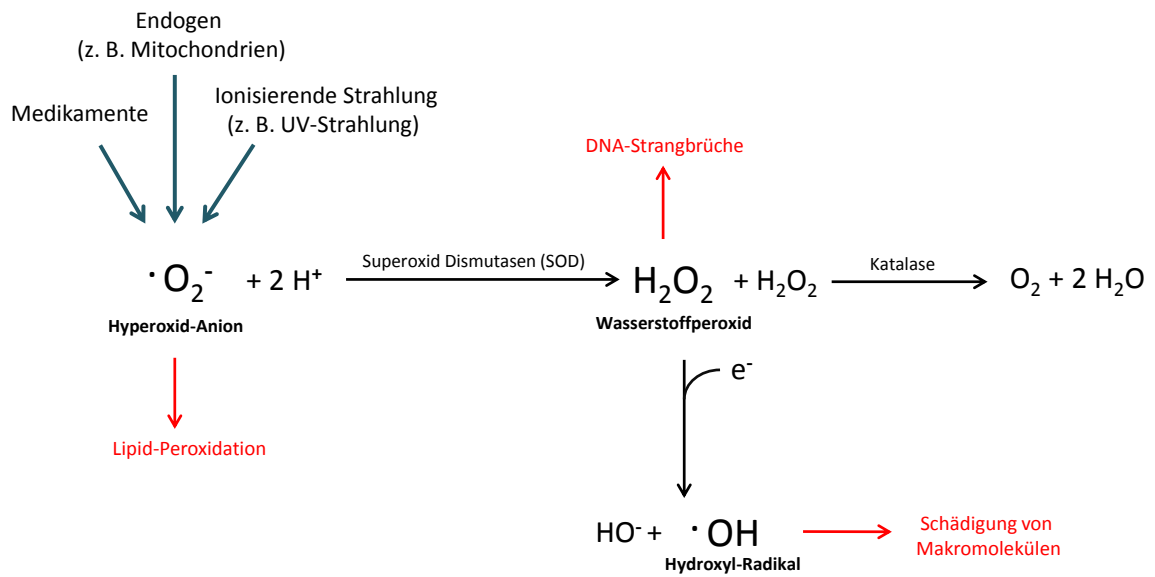


Abbildung 3: Entstehung und Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies. Superoxid-Anionen entstehen durch viele endogene und exogene Einflüsse auf die Zelle und werden von Superoxid-Dismutasen zu Wasserstoffperoxid abgebaut und von Katalasen weiter zu Sauerstoff und Wasser prozessiert. Durch Reaktion von H_2O_2 mit einem Elektron entstehen hochreaktive Hydroxyl-Radikale. Alle drei ROS-Spezies schädigen zelluläre Strukturen wie den dNTP-Pool und können so zu Krankheitsentstehung und -progression beitragen.

1.4 Ionisierende Strahlung (*Ionizing Radiation*, IR) und *Radiosensitizer*

Ionisierende Strahlung bezeichnet jene Partikel oder elektromagnetische Wellen, die genug Energie besitzen, um Elektronen aus Atomen oder Molekülen herauszubrechen und somit zu ionisieren. Elektromagnetische Wellen mit ionisierenden Eigenschaften haben eine Wellenlänge im Spektrum von 200 nm bis 100 pm und umfassen damit kurzwellige UV-Strahlung, Röntgenstrahlung und Gammastrahlung. Aufgrund ihrer ionisierenden Eigenschaften können alle diese genannten Strahlungstypen diagnostisch oder therapeutisch eingesetzt werden. Klassischerweise werden maligne Tumore mit Elektronenbremsstrahlung bestrahlt. Die Wirkung der entstehenden Photonen auf die Zelle beruht dabei entweder auf der direkten Ionisierung der DNA oder auf der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Baskar et al., 2014). Beispielsweise entstehen bei der Radiolyse von Wasser Hydroxyl-Radikale, welche wiederum die DNA schädigen. Bei Röntgenstrahlung mit niedrigem linearem Energietransfer und bei Gammastrahlung werden 60 % der Schäden durch die indirekten Strahlungseffekte verursacht (Barcellos-Hoff et al., 2005).

Die DNA-schädigende Wirkung wird also sowohl der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies als auch direkter DNA-Interaktion zugeschrieben. Resultat beider Wege ist die Induktion von DNA-Strangbrüchen, die das Überleben der Zelle kompromittieren. Während Doppelstrangbrüche (DSB) den apoptotischen Zelltod einleiten können, sobald die Kompensation durch Reparaturmechanismen überschritten ist, treten Einzelstrangbrüche vermehrt während der DNA-Replikation in Vorbereitung auf die Mitose auf und haben weniger gravierende Auswirkungen. Vielmehr akkumulieren sie, arretieren den Zellzyklus und überführen die Zelle in eine Art post-mitotischen Zustand der vergleichbar ist mit der altersbedingten zellulären Seneszenz (Nassour et al., 2016).

Aus diesem Wirkungsmechanismus ergeben sich drei Konsequenzen: Erstens sind vor allem Zellen von der Wirkung von IR betroffen, die sich häufig teilen (Bergonie & Tribondeau, 1959). Da Krebszellen sich häufiger teilen als die meisten normalen Körperzellen, wird ihr Erbgut entsprechend häufiger durch die Auswirkungen der Strahlung geschädigt. Das Prinzip der Strahlentherapie basiert daher, ähnlich wie das der Chemotherapie, auf der höheren Zellteilungsrate und somit größeren Verwundbarkeit verglichen mit dem umgebenden bzw. gesunden

Gewebe. Zweitens ist der Erfolg der Strahlentherapie abhängig vom Sauerstoffangebot in dem bestrahlten Gewebe. Ohne Sauerstoff können durch die Strahlung nur wenig Sauerstoffradikale erzeugt werden. Tumor-Hypoxie ist deshalb mit einer verminderten Ansprechrate auf Radiotherapie assoziiert (Okunieff et al., 1996). Drittens besteht die Wirkung der Strahlentherapie nicht nur in einer direkten Zerstörung von Krebszellen, sondern dem Tumor wird zudem die Fähigkeit zu Wachstum und Entdifferenzierung genommen.

Ein etablierter Ansatz, um die Effektivität der Strahlentherapie zu steigern, ist der Einsatz von sog. *Radiosensitizern* (Linkous & Yazlovitskaya, 2012). Darunter versteht man Substanzen, die Tumorzellen für die Effekte der Bestrahlung sensitivieren. Durch eine Behandlung mit einer solchen Substanz vor der Strahlentherapie kann deshalb entweder der kanzerotoxische Effekt der Bestrahlung verstärkt oder die Strahlendosis vermindert und so das umliegende Gewebe geschont werden. Im Gegensatz zu Radioprotektoren, die vielmehr das umliegende, gesunde Gewebe von den Folgen der Bestrahlung abschirmen sollen, wirkt ein optimaler *Radiosensitizer* also ausschließlich in der Krebszelle. Das Pharmakon muss dabei nicht zwangsläufig eine von der Radiotherapie unabhängige Wirksamkeit besitzen. Aufgrund des ROS-abhängigen Wirkmechanismus von MTH1-Inhibitoren kommt TH588 als *Radiosensitizer* in Betracht und soll in dieser Arbeit auf diese Eigenschaft hin untersucht werden.

1.5 Zelltod

Der Zelltod ist seit Langem das Ziel umfangreicher Forschung, da er bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen auftritt. Bei der Beschreibung von Zelltodmechanismen werden in der Literatur meist Nekrose und Apoptose als zwei unterschiedliche Prozesse voneinander abgegrenzt. Als Nekrose wird eine Form des Zelltodes bezeichnet, bei dem die Zelle so stark beschädigt wird, dass Zytoplasma und Zellorganellen durch die Plasmamembran in den Extrazellulärraum gelangen und eine lokale oder generalisierte Entzündungsreaktion hervorrufen. Die darauf folgende Hyperämie und Rekrutierung von Leukozyten kann eine effiziente Abwehr pathogener Mikroorganismen und die Geweberegeneration begünstigen (Rock & Kono, 2008). Andererseits ist die Nekrose häufig Folge schwerwiegender und irreversibler Gewebeschäden. Auch können die bei der Nekrose freigesetzten Zellbestandteile schwere systemische Komplikationen mit sich bringen. Bei massivem nekrotischem Zellsterben, beispielsweise durch die Behandlung eines zellreichen Tumors, werden große Mengen von Stoffwechselmetaboliten und Elektrolyten freigesetzt und resultieren im „Tumorlyse-Syndrom“, das sich durch Nierenversagen oder Herzrhythmusstörungen äußert (Davidson et al., 2004).

Auch wenn in der letzten Dekade weitere Mechanismen des Zelltodes (beispielsweise Autophagie) und mit der „Necroptose“ ein Mischstadium zwischen Nekrose und programmiertem Zelltod beschrieben wurde (Ouyang et al., 2012), wird noch immer die Apoptose als zweite wichtige Form des Zelltodes von der Nekrose unterschieden. Die Abgrenzung der Apoptose von der traumatisch provozierten Nekrose erfolgt neben morphologischen und ätiologischen Kriterien anhand des systematischen Abbaus der Zellbestandteile und somit einer verminderten bzw. gezielteren Immunreaktion des Körpers. Apoptose ereignet sich physiologisch vielfach im menschlichen Organismus und ist essentiell für die Entwicklung der Extremitäten in der Fetalzeit (Haanen & Vermes, 1996), Elimination virusbelasteter Zellen (Thomson, 2001) oder bei der Selektion funktionstüchtiger Lymphozyten (Opferman, 2008). Morphologisch äußert sich die Apoptose durch Kondensation des Chromatins, Fragmentierung des Kerns, Lösen der Zelle aus dem Zellverband, Schrumpfung der Zelle und schließlich dem Abkapseln der Zellorganellen in

sog. *apoptotic bodies*. Letztgenannte sind mikroskopisch sichtbar und werden in nachfolgenden Schritten von Makrophagen phagozytiert (Ziegler, 2004).

Die Apoptose kann durch einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg ausgelöst werden. Beide Wege münden in der Aktivierung von Cystein-Aspartat-Proteasen (Caspasen). Unterteilt werden die Caspasen in Initiator-Caspasen (2, 8, 9, 10) und Effektor-Caspasen (3, 6, 7). Durch Messung der Aktivität der Caspase 3 kann deshalb experimentell auf das Vorkommen von Apoptose geschlossen werden. Aktive Initiator-Caspasen aktivieren Effektor-Caspasen durch limitierte Proteolyse. Diese wiederum aktivieren sekundäre Effektor-Proteine, welche die Degradation der Zelle vorantreiben (z. B. DNasen) oder spalten selbst Strukturproteine und Reparaturenzyme der Zelle (Elmore, 2007). Eines der von der Caspase 3 prozessierten Enzyme ist die PARP, die durch Anhängen von Poly-ADP-Ribose-Ketten an geschädigte DNA die Reparatur ebendieser initiiert. Gespaltene PARP kann im *Western Blot* als separate Bande bei 89 kDa unterhalb der eigentlichen PARP-Bande detektiert werden und eignet sich somit als experimenteller Nachweis der Apoptose. Bei dem extrinsischen Weg erfolgt die Aktivierung der Initiator-Caspasen durch Ligandenbindung an „Todesrezeptoren“ aus der Familie der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren an der Außenseite der Plasmamembran. Diese trimerisieren und spalten über eine intrazelluläre Signalkaskade die Procaspase 8 zur Caspase 8 (Guicciardi & Gores, 2009).

Der intrinsische Weg hingegen beruht auf einem gestörten Gleichgewicht zwischen verschiedenen pro- und antiapoptotisch wirkenden Proteinen. Am besten untersucht ist wohl die Bcl-2 Familie, die sowohl proapoptotische (Bax, Bad) wie auch antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-XL) Proteine enthält. Werden beispielsweise Bax und Bad durch p53 bei Schädigung der DNA aktiviert, wird eine Pore in der Membran der Mitochondrien gebildet, durch die Cytochrom c ins Zytoplasma gelangt und dort durch Bindung an den apoptotischen Proteasen-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) und die Caspase 9 das Apoptosom bildet, das die Aktivierung der Caspase 9 initiiert (Saelens et al., 2004). Die Auslöser für den Ablauf des intrinsischen Weges sind vielfältig und umfassen DNA-Schäden, Hypoxie, Hitzeschäden, Nährstoff- oder Wachstumsfaktordeprivation sowie ionisierende Strahlung. Abbildung 4 zeigt schematisch den Ablauf der beiden wichtigsten Apoptose-Wege.

Von besonderer Bedeutung ist die Apoptose auch aufgrund ihres Stellenwertes für die Krebsmedizin. Einerseits können Mutationen in proapoptotischen Proteinen

wie p53 die Ausbildung von Malignomen provozieren, beispielsweise in der Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms. Andererseits kann die gezielte medikamentöse Induktion von Apoptose in entarteten Zellen therapeutisch genutzt werden (Kaufmann & Earnshaw, 2000).

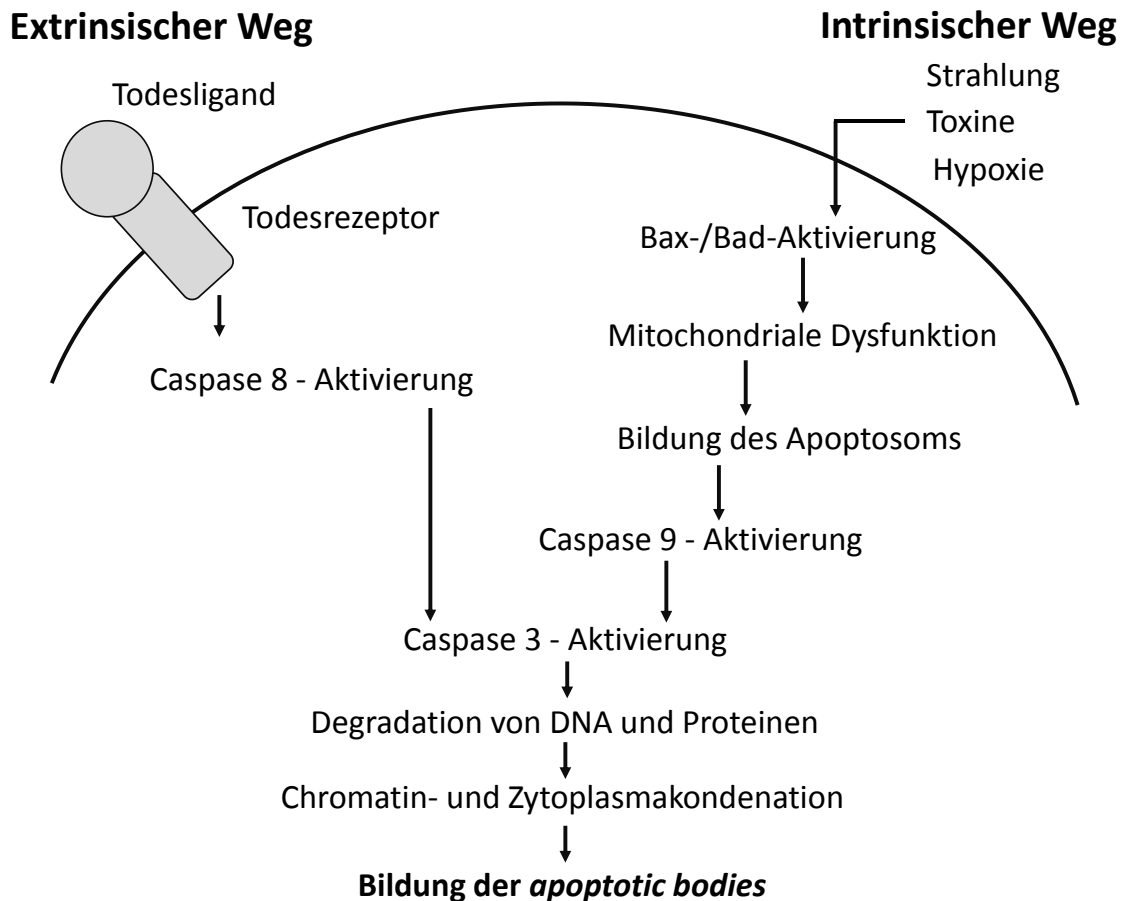


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung des Ablaufs der Apoptose. Aktivierung der Caspase 3 durch Liganden- und Todesrezeptor-initiierten extrinsischen oder Apoptosom-vermittelten intrinsischen Weg, gefolgt von der Degradation von DNA und Zytoskelett und Bildung der *apoptotic bodies*. Modifiziert nach (Elmore, 2007).

1.6 Hypoxie

Hypoxie bezeichnet die Mangelversorgung eines Gewebes mit Sauerstoff (von griech. *hypo* – „darunter, unter“, lat. *oxygenium* = „Sauerstoff“). Innerhalb des Körpers variieren Sauerstoffkonzentration und -partialdruck zwar stark, jedoch sind die meisten Zellen und Gewebe auf Sauerstoff angewiesen, um Energie in Form von ATP zu erzeugen. Ausnahmen bilden dabei lediglich Erythrozyten, welche weder Kern noch Mitochondrien enthalten und deshalb kein ATP über die Atmungskette gewinnen können (Rassow, 2006). Zellen, denen der Sauerstoff entzogen wird, können auf zwei Arten auf die veränderten Bedingungen reagieren. Sind in der Lage ihren Stoffwechsel soweit umzustellen, dass der Verbrauch von Energieäquivalenten die Summe aus Produktion unter anaeroben Bedingungen und gespeicherter Kapazität nicht übersteigt, können die Zellen überleben. Andernfalls kann der Ionengradient über die Membran der Zelle nicht mehr durch die Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhalten werden und es kommt zum Platzen und somit zum Tod der Zelle (Michiels, 2004).

Gewebshypoxie ist die pathophysiologische Grundlage vieler Krankheitsbilder. Ursächlich für die Unterversorgung mit Sauerstoff sind alle Zustände, welche die Aufnahme oder den Transport von Sauerstoff behindern, beispielsweise durch verminderten alveolären Gasaustausch bei Lungen- und Herzerkrankungen oder mechanischer Behinderung bei Pneumonien oder Ergüssen. Auch eine eingeschränkte Sauerstofftransportkapazität durch einen verminderten Hämoglobingehalt des Blutes bei Anämien führt zu einer verminderten Energiegewinnung in den sauerstoffabhängigen Geweben und bedingt mitunter eine körperliche Leistungsminderung (Herold, 2015). Einen häufigen und schwerwiegenden Ausdruck hypoxischer Gewebeschädigung *in vivo* stellen jedoch ischämische Ereignisse aufgrund thrombembolischer und atherosklerotischer Gefäßverschlüsse dar, wie die hohe Inzidenz und Mortalität des ischämischen Schlaganfalls und der myokardialen Ischämie verdeutlichen.

Auch in malignen Tumoren spielt die Sauerstoffversorgung eine wesentliche Rolle, denn Tumor-Hypoxie ist mit einer ungünstigen Prognose für den Patienten assoziiert (Vaupel & Mayer, 2007). Ein typisches Kennzeichen maligner Tumore ist eine ausgeprägte Heterogenität, verursacht durch ein instabiles Genom, schnelles Wachstum und fluktuierende metabolische Anforderungen. Auch die Versorgung

mit Blut und somit Sauerstoff variiert innerhalb eines Tumors beträchtlich, vornehmlich dann, wenn die Proliferation der Zellen die Neubildung versorgender Gefäße übersteigt. Die dabei entstehenden hypoxischen Bereiche sind essentiell für den Erfolg oder den Misserfolg einer Therapie, da der Transport von Medikamenten eingeschränkt ist und klonale Selektion die Resistenzbildung in hypoxischen Zellen begünstigt (Tatum et al., 2006). Hypoxie vermindert deshalb die Effektivität verschiedener erprobter Krebstherapeutika, einschließlich *Biologicals* (Chan et al., 2010) und Chemotherapeutika (Yoshida et al., 2009). *Biologicals* werden auch als Biopharmazeutika bezeichnet und sind Medikamente, die gentechnisch oder mithilfe von genetisch veränderten Organismen hergestellt werden, beispielsweise monoklonale Antikörper. Insbesondere die Tubulin-bindenden Taxane sind in hypoxischen Zellen weniger wirksam (Wilson & Hay, 2011).

In diesem Zusammenhang stellt sich die therapeutisch relevante Frage, ob TH588 in Hypoxie seine Wirkung entfalten kann. Die Heterogenität der Tumorzellen bedingt nicht nur die Resistenz hypoxischer Zellen gegenüber medikamentöser Therapie, sondern vermindert auch die Wirkung ionisierender Strahlung (Adams et al., 1976). Eine weitere Frage, die einer Klärung bedarf ist also, ob eine Behandlung mit TH588 die Strahlensensitivität von hypoxischen Zellen erhöhen kann.

Eine besondere Bedeutung im Zusammenhang mit hypoxischer Signalübertragung im Allgemeinen und speziell in Tumoren entfällt auf Transkriptionsfaktoren, die als Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF) bezeichnet werden. Bislang wurden drei Isoformen dieses Proteins entdeckt. HIF ist ein Heterodimer aus zwei Untereinheiten. Während die β -Untereinheit (auch bezeichnet als Aryl-Hydrocarbon-Receptor-Nuclear-Translocator, ARNT) stabil ist, ist die α -Untereinheit labil und wird unter normoxischen Bedingungen durch HIF-regulierende Prolyl-Hydroxylasen (PHDs) an zwei Prolyl-Resten hydroxyliert. Die Hydroxylierung steigert die Affinität des Proteins zu dem von-Hippel-Landau Protein (pVHL), welches die α -Untereinheit ubiquitiniert und deren proteasomalen Abbau einleitet. In Hypoxie hingegen wird HIF- α nicht hydroxyliert, da die PHDs hierfür molekularen Sauerstoff benötigen (Huang et al., 1998; Maxwell et al., 1999). Folglich diffundiert die α -Untereinheit bei Sauerstoffmangel in den Zellkern und dimerisiert dort mit der β -Untereinheit wodurch der aktive Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktor entsteht. Im Zellkern fördert dieser durch Bindung an *hypoxia-responsive elements* (HRE) die Transkription verschiedener Gene. Es sind mehr als 200 Zielgene bekannt

(siehe Abbildung 5). Die Produkte dieser Gene begünstigen beispielsweise das Wachstum neuer Gefäße oder ermöglichen die Umstellung des Metabolismus auf anaerobe Energiegewinnung. Genau dies sind jedoch auch Eigenschaften, die den Tumor zu schnellem Wachstum befähigen (Tatum et al., 2006). Die Gefäßneubildung in Tumoren wird durch die Hochregulation des VEGF in Hypoxie stimuliert (Morfoisse et al., 2014). Der Warburg-Effekt verdeutlicht die Abhängigkeit von Krebszellen von Glucose-Transportern, welche ebenfalls HIF-induziert exprimiert werden (Semenza, 2013). Ein zweiter Mechanismus, die HIF-vermittelte Transkription in oxygenierten Zellen zu inaktivieren, besteht in der Hydroxylierung von HIF an einem Asparagin-Rest (Asn803). Dies verhindert die Interaktion mit dem p300 Transkriptions-Ko-Aktivator (Metzen & Ratcliffe, 2004). Dieses Protein wird *factor inhibiting HIF* (FIH) genannt und hat in Mausversuchen kaum Einfluss auf klassische Aspekte der HIF-Signalwege wie Angiogenese oder Erythropoiese gezeigt. Stattdessen scheint es in der Regulation zentraler Stoffwechselwege involviert zu sein (Zhang et al., 2010).

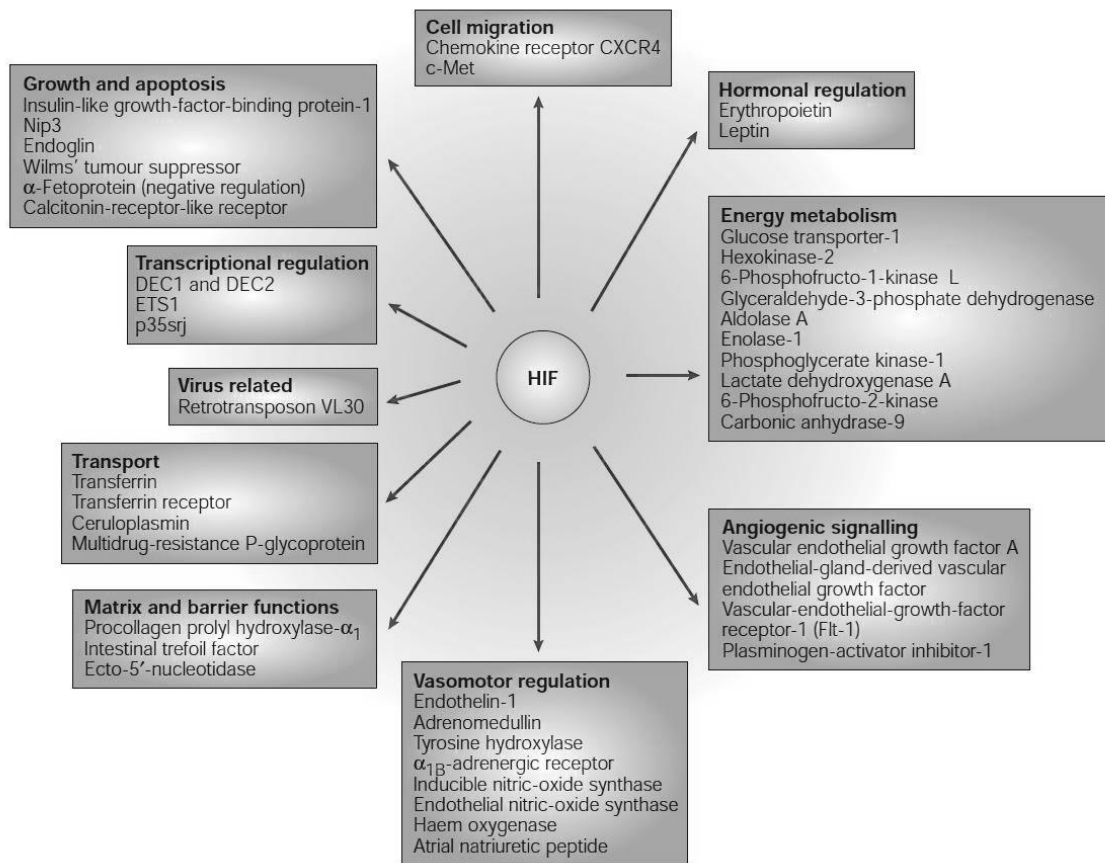


Abbildung 5: Zielgene des Transkriptionsfaktors HIF. Insgesamt sind über 70 Zielgene für HIF identifiziert, deren Genprodukte die Antwort des Organismus auf veränderte Sauerstoffbedingungen darstellen. Modifiziert nach (Schofield & Ratcliffe, 2004).

1.7 HUVEC als Modell für die Behandlung gesunder Zellen

Gad et al., 2014 beschreiben, dass die Wirksamkeit von TH588 auf der Hemmung von MTH1 beruht. Da MTH1 vornehmlich in Krebszellen überexprimiert ist, die MTH1-Expression in gesunden Körperzellen hingegen gering ist, komme dem Enzym im Stoffwechsel der Zellen entsprechende Bedeutung zu. Zellen, die eine maligne Transformation durchlaufen haben, benötigen demnach MTH1 für die Gewährleistung zellulären Überlebens, während das Enzym in untransformierten Zellen keine essentielle Funktion hat (Gad et al., 2014). Die Toxizität von Arzneimitteln muss vor der Zulassung ausgiebig in Tierversuchen und später in klinischen Studien getestet werden. Eine Methode, um bereits *in vitro* auf die Toxizität von Substanzen zu schließen ist die Behandlung gesunder Körperzellen. Da diese durch eine geringe Proliferationsrate gekennzeichnet sind und im Gegensatz zu Krebszellen nur eine geringe Anzahl von Mitosen durchlaufen können, ist eine Kultivierung solcher Zellen nur bedingt möglich. Aus diesem Grund werden für die Untersuchung von Nicht-Krebszelllinien häufig künstlich immortalisierte Zellen eingesetzt. Dies wird erreicht, indem beispielsweise exogene komplementäre DNA (cDNA) für humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) in die Zelle transferiert wird. Auf diese Weise wird die Verkürzung der Telomere und so auch zelluläre Seneszenz verhindert (Lee et al., 2004). Dabei werden Fibroblastenzelllinien wie hTERT-immortalisierte VH10 verwendet (Boehm & Hahn, 2004). Zwar kann durch eine solche Manipulation eine zuvor nicht kultivierbare Zelllinie für *in vitro*-Versuche nutzbar gemacht werden, jedoch unterscheiden sich diese veränderten Zellen in einigen Aspekten von Krebszellen, sodass sie nur näherungsweise stellvertretend für das Verhalten gesunder Körperzellen auf bestimmte Noxen genutzt werden können. Eine Alternative dazu bieten humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC). Diese Zellen sind humanen Ursprungs und zeichnen sich durch eine relativ hohe Teilungsrate aus. Sie dienen deshalb als Modell für das Verhalten gesunder Körperzellen, insbesondere hinsichtlich der Angiogenese (Park et al., 2006).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der steigenden Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen in unserer Gesellschaft besteht ein wachsender Bedarf an neuen Krebsmedikamenten. Durch den neuartigen Wirkmechanismus kommen Inhibitoren von MTH1 als Medikamente zur Behandlung von Tumoren in Betracht. TH588 hat sich in den vorliegenden Studien als Substanz mit potenten Eigenschaften zur Elimination von Krebszellen *in vitro* erwiesen. Da es MTH1 hemmt und so den Einbau oxidierter Nukleotide in die DNA fördert, liegt die Abhängigkeit von ROS und der damit verbundenen Strahlensensitivität nahe. Die Untersuchung von TH588 auf seine Eigenschaften als *Radiosensitizer* war deshalb ein Ziel dieser Arbeit.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob TH588 seine Wirkung auf Krebszellen auch in Hypoxie entfalten kann. Hypoxische Tumorareale zeichnen sich durch ein vermindertes ROS-Level aus und sind mit einer Therapieresistenz assoziiert. Da der Wirkungsmechanismus von MTH1-Hemmstoffen ROS-abhängig ist, kann die Wirksamkeit von TH588 in Hypoxie nicht grundsätzlich angenommen und muss genauer untersucht werden. Insbesondere ist auch die Strahlensensitivität in hypoxischem Gewebe vermindert, so dass der Frage nach einer Kombination aus TH588 und Bestrahlung in Hypoxie eine besondere Bedeutung zukommt.

Ein weiterer in dieser Arbeit untersuchter Aspekt ist der Wirkungsmechanismus von TH588, der in der aktuellen Literatur hinterfragt wird. Hierfür wurde ein *Knock-down* von MTH1 in verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichen *hairpin*-Sequenzen untersucht. Weiterhin sollte das wichtigste Substrat des Enzyms, 8-oxo-dGTP, und dessen Induktoren, die reaktiven Sauerstoffspezies, dargestellt werden.

Da der Wirkungsmechanismus von TH588 noch nicht ausreichend bekannt ist, ist auch die zuvor angenommene Krebszellen-Spezifität des Hemmstoffes fraglich. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zusätzlich die schädigende Wirkung auf gesunde Körperzellen mithilfe nicht-transformierter kultivierter Zellen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Technische Geräte

Informationen zu den verwendeten technischen Geräten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Technische Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Bestrahlungsquelle	X-rad 320	PXI (North Branford, CT, USA)
Blotting-Apparatur	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Biorad (Hercules, CA, USA)
Chemilumineszenzsystem	Fusion Fx7	Peqlab (Erlangen, D)
CO ₂ -Inkubator	Hera Cell 150i	Heraeus (Hanau, D)
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Durchlichtmikroskop	CK2	Olympus (Tokyo, JP)
Feinwaage	Kern EW	Göntgen (Bottrop, D)
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 40C	Zeiss (Oberkochen, D)
Hypoxie-Inkubator	<i>Hypoxic Work Chamber</i>	Toepffer Lab Systems (Göppingen, D)
Hypoxie-Inkubator	H35 Hypoxystation	Don Whitley Scientific (ShIPLEY, UK)
Laserscan Mikroskop	Zeiss LSM510	Zeiss (Oberkochen, D)
Microplate Reader	FLx800 fluorescent reader	BioTek Instruments (Winooski, VT, USA)
Microplate Reader	Synergy HT	BioTek (Winooski, VT, USA)
Sterilwerkbank	Clean Air Technic B.V.	BIOFLOW Technik GmbH (Woerden, NL)
Zellzähler	Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience (Lawrence, MA, USA)
Zentrifuge	Centrifuge 5418	Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge	Labofuge 400R	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge	Mikro 220R	Hettich (Mühlheim an der Ruhr, D)

2.1.2 Zelllinien

Folgende in Tabelle 2 gelisteten Zelllinien wurden für die Durchführung der Versuche verwendet.

Tabelle 2: Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Charakteristika	Medium	Selektion	Zulieferer
HEK293T	Humane embryonale Niere	Wildtyp	DMEM high glucose	/	DSMZ #ACC-635
HCT116	Humanes kolorektales Karzinom	Wildtype	McCoy's 5A	/	ATCC #CCL-247
HCT116	Humanes kolorektales Karzinom	Doxycylin-induzierbarer MTH1 <i>Knockdown</i>	McCoy's 5A	2 µg/ml	ATCC #CCL-247
HUVEC	Humanes Nabelschnur-venen Endothel	Wildtyp	Endothelial Cell Growth Medium	/	Promocell C-12203
SW480	Humanes kolorektales Adenokarzinom	Doxycylin-induzierbarer MTH1- <i>Knockdown</i>	RPMI 1640	/	(Gad et al., 2014)*

* Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Thomas Helleday aus dem Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden.

2.1.3 Puffer

Die Zusammensetzungen der häufig verwendeten Puffer und Acrylamidgele sind in Tabelle 3 näher erläutert.

Tabelle 3: Puffer und Acrylamidgele

Puffer/Gel		
Blocking Solution (Western Blot)	5 % (w/v)	TBST Milchpulver
Blocking Solution (Avidin-Assay)	0,1 % (v/v) 15 % (v/v)	TBST Triton X-100 FBS

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	138 mM 8,1 mM 2,7 mM 1,5 mM	Tris (pH 7,4) Na ₂ HPO ₄ KCl KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Caspase-Lysepuffer	150 mM 50 mM 1 % (v/v)	NaCl Tris (pH 7,4) NP-40 pH 7,3
Caspase-Substratpuffer	100 mM 20 mM 10 % (w/v) 0,1 % (v/v)	NaCl HEPES Saccharose Chaps pH 7,3
Coomassie Färbelösung	0,5 % (w/v) 45 % (v/v) 5 % (v/v) 55 % (v/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) Methanol Essigsäure Aqua bidest
Laufpuffer (SDS-PAGE)	192 mM 25 mM 0,1 % (w/v)	Glycin Tris (pH 7,4) SDS
MTT Lysepuffer	DMSO 10 % (w/v) 0,6 % (v/v)	SDS Essigsäure
RIPA Puffer (Radioimmuno-precipitation assay)	150 mM 50 mM 2 mM 1 % (v/v) 0,5 % (w/v) 0,1 % (w/v)	NaCl Tris (pH 7,4) EDTA NP-40 Natriumdesoxycholat SDS Aqua bidest
Sammelgel (SDS-PAGE)	375 mM 5 % (w/v) 0,1 % (w/v) 0,1 % (v/v) 0,05 % (w/v)	Tris (pH 7,4) Acrylamid SDS TEMED APS
SDS-Probenpuffer	62,5 mM 25 mM 0,25 mg/ml 10 % (v/v) 3 % (v/v) 2 % (w/v)	Tris (pH 7,4) DTT Bromphenolblau Glycerol β-Mercaptoethanol SDS
TBST (Tris buffered saline + Tween)	137 mM 20 mM	NaCl Tris (pH 7,4)
Transfer Puffer (Western Blot)	192 mM 25 mM	Glycin Tris (pH 7,4)
Trenngel (SDS-PAGE)	375 mM 5–12,5 % (v/v) 0,1% (w/v) 0,05 % (v/v) 0,05 % (v/v)	Tris (pH 8,8) Acrylamid SDS TEMED APS

2.1.4 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 beschrieben.

Tabelle 4: Primärantikörper

Antigen	Molekulargewicht	Produktnummer	Biologische Quelle	Hersteller
α -Tubulin	50 kDa	GTX628802	Maus	GeneTex (Irvine, CA, USA)
β -Aktin	42 kDa	A5441	Maus	Sigma (München, D)
β -Aktin	42 kDa	A2103	Kaninchen	Sigma (München, D)
8-Hydroxyguanin	Keine Angabe	Ab48508	Maus	Abcam (Cambridge, UK)
8-Hydroxyguanin	Keine Angabe	GTX41080	Maus	GeneTex (Irvine, CA, USA)
HIF-1 α	120 kDa	610959	Maus	BD Biosciences (Heidelberg, D)
HIF-1 β	87 kDa	#3718	Kaninchen	Cell Signaling (Cambridge, UK)
MTH1	18 kDa	L5-C335577/60883	Kaninchen	LSBio (Seattle, WA, USA)
MTH1	18 kDa	NB100-109	Kaninchen	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
PARP	116 kDa und 89 kDa	#1442	Kaninchen	Cell Signaling (Cambridge, UK)

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Konjugat	Spezifität	Produktnummer	Biologische Quelle	Hersteller
HRP	Maus	P0448	Ziege	DAKO (Eching, D)
HRP	Kaninchen	P0447	Ziege	DAKO (Eching, D)
Alexa Fluor 488	Maus	A11017	Ziege	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Alexa Fluor 488	Kaninchen	A11070	Ziege	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Alexa Fluor 594	Kaninchen	A11012	Ziege	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

2.1.5 Kits

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* von *Thermo Scientific* (Waltham, MA, USA) verwendet. Für die Detektion von Proteinen im *Western Blot* wurde die Chemilumineszenzreaktion mit der *Ace Glow Solution* von *Peqlab* (Erlangen, D) oder *SuperSignal West Femto* von *Thermo Scientific* initiiert. Beim Strippen von Membranen wurde *Restore PLUS WB Stripping Buffer* von *Thermo Scientific* verwendet. Für die Luziferase-Assays wurde das *Dual-Luciferase Reporter Assay System* von *Promega* (Fitchburg, WI, USA) verwendet. Für die Ablösung der HUVEC von der Gefäßoberfläche wurde das *DetachKit 2 (C-41202)* von *PromoCell* (Heidelberg, D) genutzt.

2.1.6 shRNA und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Sequenzen und Plasmide sind in den Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 6: shRNA Sequenzen

Bezeichnung	Vektor	Sequenz	Referenz
Non-target 1 (HCT116)	pLKO-TetON	CAACAAGATGAAGAGCACCAA	Sigma (München, D)
MTH1 Hairpin A	pLKO-TetON	CCTGAGCTCATGGACGTGCAT	Sigma (München, D)
MTH1 Hairpin B	pLKO-TetON	CCTGCTTCAGAAGAAGAAATT	Sigma (München, D)
Non-target 2 (SW480)	FH1tUTG	Keine Angabe	(Gad et al., 2014)*
MTH1 Hairpin 3	FH1tUTG	Keine Angabe	(Gad et al., 2014)*

* Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Thomas Helleday und Dr. Ulrika Berglund aus dem Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden.

Tabelle 7: Plasmide

Plasmid	Charakteristik	Referenz
pMD2.G	<i>Envelope</i> -Plasmid, codiert für lentivirale Hüllproteine	Addgene (#12259)
psPAX2	Gag-pol-Plasmid, codiert für lentivirale Enzyme	Addgene (#12260)
Tet-pLOK-puro	Codiert für die jeweilige Ziel-shRNA für <i>Knock-downs</i> , Tetrazyklin-indizierbar, mit Puromycin-Resistenz	Addgene (#21915)
pWPXL	EGFP mit EF-1 alpha Promotor, lentivirales Kontrollplasmid	Addgene (#12257)
pcDNA3-Nrf2	Nrf2-Überexpressionsplasmid	Hoogewijs, D*, Addgene (#36971)
pGL4.74	Codiert für Renilla Luciferase	Promega E6921
pGL3-8xARE	Codiert für <i>Firefly</i> -Luciferase mit ARE	(X. J. Wang et al., 2006)**
pGL3-3xHRE-HIF-1- α	Codiert für <i>Firefly</i> -Luciferase mit HRE	(Metzen et al., 2005)

* Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ass. Prof. David Hoogewijs, Universität Freiburg, Schweiz.

** Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Roland Wolf, Jacqui Wood Cancer Centre, University of Dundee, UK.

2.1.7 Sonstige Substrate, Reagenzien und Chemikalien

In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurden diverse weitere Substrate, Reagenzien und Chemikalien eingesetzt, welche in Tabelle 8 aufgeführt sind.

Tabelle 8: Reagenzien

Reagenz	Funktion	Konzentration	Hersteller
DEVD-AMC	Substrat für den Caspase-3-Assay	66 µM	Sigma (München, D)
DMSO	Lösungsmittel		Sigma (München, D)
Etoposid	Chemotherapeutikum	50 µM	Sigma (München, D)
5-Flourouracil	Chemotherapeutikum	1 mM	Sigma (München, D)
L-cysteine ethyl ester hydrochlorid	Reduktionsmittel	100 µM	Sigma (München, D)
MTT	Substrat für den MTT-Assay	0,5 mg/ml	Sigma (München, D)
Page Ruler Prestained	Protein-Größenstandard für <i>Western Blots</i>		Thermo Scientific (Weltham, MA, USA)
Polybrene	Transfektionsreagenz	8 mg/ml	Sigma (München, D)
Protease/Phosphatase-Inhibitor	Vermindert den Abbau von Proteinen in einem Zelllysate	1:100	Cell Signaling (Cambridge, UK)
Luperox	Stabiles H ₂ O ₂ -Derivat	1:200	Sigma (München, D)
TH588	MTH1 Hemmstoff	3–20 µM	Helleday, T. *

* Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Thomas Helleday aus dem Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kulturbedingungen

Um Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurden sämtliche Zellkultur-Arbeiten unter einer sterilen Sicherheitswerkbank ausgeführt. Da die Zellen humanem Gewebe entstammen, wurden sie bei 37 °C, in angefeuchteter Luft, versetzt mit 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. CO₂ war in dieser Konzentration nötig, um im Zusammenspiel mit HCO₃⁻ die pH-Pufferung zur Konstanthaltung eines physiologischen pH-Wertes zu ermöglichen. Die Tumorzellen wurden in T25 oder T75 Gewebekulturflaschen kultiviert, bis 60–80 % der Fläche überwachsen war. Da die Versuche ausschließlich mit adhärennten Zellen durchgeführt wurden, mussten sie für die Erhaltungskultur mittels einer Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst werden. Trypsin ist eine pankreatische Endopeptidase und spaltet Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt vermittelnde Proteine. EDTA bindet als Chelator mehrwertige Kationen (z. B. Kalzium) und blockiert so die erneute Adhäsion der Zellen nach dem Ablösen. Um eine enzymatische Verdauung von Membranproteinen möglichst zu verhindern, wurde das Trypsin nach kurzer Inkubation durch die Zugabe von Kulturmedium mit fetalem bovinem Serum (FBS) neutralisiert und anschließend für drei Minuten bei 1200 g zentrifugiert. Die Zellzählung erfolgte automatisch durch das Cellometer Auto T4. Bei der Arbeit mit HUVEC wurde Trypsin-EDTA aus dem DetachKit 2 von PromoCell verwendet, da diese Zellen sensibler auf Trypsinreagieren.

Kryokonservierung

Um die Zellen länger zu erhalten, wurden sie bei –80 °C gelagert. Hierfür wurden die Zellen in FBS resuspendiert und mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in spezielle Kryokonservierungsgefäße überführt. Das DMSO dient dabei als Frostschutzmittel, da es die Bildung von Eiskristallen verhindert. Unmittelbar danach wurden die Gefäße bei –80 °C langsam eingefroren. Wenn die Zellen aus dem konservierten Zustand wieder in Kultur genommen werden sollten, wurde das Gefäß mit den entsprechenden Zellen eine Minute in warmem Wasser geschwenkt, der Inhalt

dann möglichst schnell in ein *Falcon Tube* überführt und bei 1200 g für drei Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml FBS resuspendiert und in eine T25 Zellkulturflasche mit 3 bis 5 ml Medium überführt. Am Folgetag erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Sobald die Zellen auf dem Boden der Flasche konfluent waren, konnten die Zellen gesplittet und als Erhaltungskultur weitergeführt werden.

Zellkultur in Hypoxie

Versuche in Hypoxie wurden mit 1 % (Hypoxie-Inkubator von Toepffer Lab Systems) und 0,1 % Sauerstoff (Hypoxie-Inkubator von Don Whitley Scientific) durchgeführt. Die Zellen wurden erst vier Stunden nach dem Ausplattieren in den Inkubator unter der Hypoxie-Werkbank gestellt, um eine vorherige Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Die Behandlung der Zellen erfolgte in Hypoxie ohne Gefahr einer Reoxygenierung. Bei Bestrahlungen wurden die Platten mit Parafilm versiegelt, bevor sie zur Bestrahlung aus der Kammer genommen und erst unter der Hypoxie-Werkbank wieder geöffnet wurden. Jeder Versuch wurde mit einer Kontrolle bei normaler Sauerstoffkonzentration im Inkubator durchgeführt.

Bestrahlung und chemotherapeutische Behandlung von Zellkulturen

Die Behandlung der Zellen mit Doxycyclin oder TH588 und DMSO erfolgte 12 bis 18 Stunden nach dem Ausplattieren auf die Gewebekulturplatte, um eine vollständige Adhäsion der Zellen vor der Behandlung zu ermöglichen. Auch eine Bestrahlung mit 1, 3 oder 10 Gy erfolgte nach 12 bis 18 Stunden. In Versuchen, bei denen Bestrahlung und chemotherapeutische Behandlung kombiniert eingesetzt wurden, wurde zunächst bestrahlt und anschließend innerhalb von einer Stunde mit den oben genannten Reagenzien behandelt. Reagenzien, die für etwaige Kontrollen benötigt wurden, wurden entweder ebenfalls nach 12 bis 18 Stunden (Etoposid, Thapsigargin, 5-Fluorouracil) oder aber 4 bis 8 Stunden (Dimethyloxalylglycin, DMOG) oder 10–20 Minuten vor Ende des Versuches (L-Cystein Ethylester-Hydrochlorid, H₂O₂, Luperox®) appliziert.

2.2.2 Knockdowns

Für die Herstellung eines lentiviralen *Knockdowns* ist es notwendig, Viren mit der gewünschten DNA-Sequenz zu produzieren und diese anschließend in die Zielzelle einzuschleusen. Für die Herstellung des Virus bedarf es dreier Komponenten, die als Plasmide vorliegen: *Gag-Pol*-Plasmid, *Envelope*-Plasmid und das Zielplasmid. Das *Envelope*-Plasmid codiert virale Hüllproteine, während das *Gag-Pol*-Plasmid für die Funktion des Virus essentielle Enzyme enthält, wie die Integrase, Protease und Reverse Transkriptase. Das Zielplasmid enthält diejenige DNA-Sequenz, die in die Zielzelle integriert werden soll. Weiterhin enthält nur das Zielplasmid eine sogenannte *packaging*-Sequenz, sodass nur das Zielplasmid in die lentiviralen Partikel gepackt wird. Da *Envelope* und *Gag-Pol* nicht in das Virus geladen werden, kann die viral transduzierte Zelle selbst keine Lentiviren bilden, was eine Sicherheitsvorkehrung für lentivirale Transduktionssysteme darstellt. Diese kann sowohl Proteine, wie das als Kontrolle genutzte GFP (*green fluorescent protein*), als auch *small-hairpin*-RNAs codieren. Zudem enthält das Zielplasmid eine Resistenz gegen Puromycin, eine Eigenschaft, die später für die Selektion der gentechnisch veränderten Zellen nötig ist. Für die Experimente in dieser Arbeit wurden drei verschiedene *hairpin*-Sequenzen gegen MTH1-mRNA verwendet. Zudem wurde als Kontrolle einer von zwei *non target*-Vektoren, die ungerichtete shRNA codieren, in Zellen eingeschleust, um unspezifische Effekte durch die genetische Manipulation der Zielzellen selbst in den Versuchen ausschließen zu können. Weiterhin wurde ein GFP-Vektor verwendet, um später die Effizienz der Transduktion beurteilen zu können.

Produktion von Lentiviren in HEK293T-Zellen

Für die Herstellung von Lentiviren wurden $7,5 \times 10^5$ HEK293T-Zellen in DMEM in eine T25-Kulturflasche überführt. Am Folgetag war die Oberfläche des Gefäßes zu 50–70 % überwachsen. Nun wurden 36 μl des Transfektionsreagenz *GeneJuice* im Verhältnis von 3:1 mit den drei Plasmiden, also *Envelope*, *Gag-Pol* und Zielplasmid, in 500 μl serumfreiem Medium gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das vollständige Volumen wurde anschließend tröpfchenweise auf die Zellen im Vollmedium gegeben. Nach weiteren 48–60 Stunden Inkubation konnte der nun virushaltige Überstand (Titer etwa $1,5 \times 10^6$ TU/ml) von den Zellen

abgenommen, durch einen Filter mit 0,45 µm Porendurchmesser gereinigt und für die Transduktion verwendet werden.

Lentivirale Transduktion und Selektion der Zellen

Für die virale Transduktion der Zielzellen, wurden 2×10^5 dieser Zellen mit der Virussuspension gemischt und unter Zugabe von Polybrene für 24 Stunden inkubiert. Polybrene verstärkt die Bindung der Viren an die Zelle, indem es die elektrostatische Abstoßung minimiert. Parallel zu den Viren mit den *hairpin*-Vektoren wurde eine Zellkulturflasche mit Viren mit einem GFP-Vektor transduziert, welcher von der Zielzelle konstitutiv exprimiert wird. So konnte überprüft werden, wie viele der Zellen erfolgreich transduziert wurden, indem der Anteil der unter dem Fluoreszenzmikroskop grün leuchtenden Zellen an der Gesamtzahl der Zellen errechnet wurde. Des Weiteren wurde eine Zellkulturflasche mit Polybrene behandelt, ohne jedoch Virus hinzuzugeben. Diese *Mock*-Zellen wurden im weiteren Verlauf genutzt, um die erfolgreiche Selektion der transduzierten Zellen zu kontrollieren. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von 2 µg/ml Puromycin, einem Nukleosid-Antibiotikum mit zytotoxischer Wirkung. Wie oben beschrieben, integrieren die Viren zusammen mit dem eigentlichen Ziel-Gen auch ein Gen in die Zelle, dessen Genprodukt eine Resistenz der Zelle gegenüber Puromycin verursacht. Somit wurden transduzierte Zellen nicht von der Puromycin-Behandlung abgetötet. Auf diese Weise konnte die Effizienz der Transduktion, und somit auch des *Knockdowns*, deutlich gesteigert werden. Die *Mock*-Zellen beinhalteten keine Puromycin-Resistenz und sollten nach der Behandlung absterben. Nach der Selektion wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert.

Besonderheiten des lentiviralen *Knockdown*-Systems

Die Besonderheit des verwendeten *Knockdown*-Systems ist, dass der *Knockdown* in den Kulturzellen nur dann aktiv ist, wenn ein Aktivator in Form von Doxycyclin hinzugegeben wird. Dieses Verfahren ist vorteilhaft beim Ausschalten von Proteinen, die essentiell für das Überleben von Krebszellen sind. Ein permanenter *Knockdown* in diesen Zellen würde dazu führen, dass die Zellen mit *Knockdown* sterben, während diejenigen ohne *Knockdown* keinem Selektionsdruck unterliegen. In diesem Fall wären die Kulturzellen nach wenigen Passagen von Zellen ohne *Knockdown* überwachsen und die Verwendung von Zellen mit permanentem

Knockdown wäre auf eine relativ geringe Passagenzahl limitiert. Da in dem angewendeten System der *Knockdown* allerdings nur dann aktiv ist, wenn Doxycyclin den Zellen hinzugegeben wird, kann der *Knockdown* selektiv für die Versuche „angeschaltet“ werden, während die transduzierten Zellen wie Wildtyp-Zellen ungehindert wachsen können. In den Versuchen steht deshalb die Bezeichnung „+ Dox“ für den Zusatz von Doxycyclin und damit für einen aktiven *Knockdown*, während „- Dox“ Zellen ohne aktiven *Knockdown* und somit Negativkontrollen mit Wildtyp-Verhalten kennzeichnet.

2.2.3 Proteinanalyse

Aufbereitung von Proteinen

Für die Untersuchung der Proteine in einer Zelle ist zuvor häufig eine Aufbereitung notwendig. Für die Experimente wurden $1,5\text{--}3 \times 10^5$ Zellen/*well* auf einer *6-well*-Platte ausplattiert und dem Versuch entsprechend behandelt. Zur Aufbereitung wurden die Zellen von der *6-well*-Platte mechanisch gelöst und inklusive Medium in ein 15 ml *Falcon Tube* überführt. Nach vierminütiger Zentrifugation bei 1300 g wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 1 ml DPBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1200 g wurde der Überstand wieder verworfen und die Probe in 100 μl eines vom Versuch abhängigen Lysepuffers (Western Blot: RIPA; Caspase-3-Assay: Caspase-Lysepuffer) aufgenommen. Nach 20 Minuten (Western Blot) bzw. 40 Minuten (Caspase Assay) Inkubation wurde bei 18000 g zentrifugiert, um die Proteine von den übrigen Zellbestandteilen zu trennen. Anschließend wurde der Überstand mit den Proteinen in ein separates Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Proteingehalt einer Probe kann mithilfe des Bicinchoninsäure (BCA)-Testes kolorimetrisch bestimmt werden. Die chemische Grundlage dieses Verfahrens stellt die Biuret-Reaktion dar, welche durch die Reduktion von zweiwertigen Kupferionen in alkalischer Lösung in Anwesenheit von Proteinen gekennzeichnet ist. Durch Zugabe von BCA kann die Reaktion nachgewiesen werden, da BCA nur mit einwertigen Kupferionen Chelatkomplexe bildet. Proportional zu der Proteinkon-

zentration der Probe steigt auch die Lichtabsorption der Lösung, sodass mithilfe von Eichlösungen mit bekannten Proteinkonzentrationen der Proteingehalt der Probe berechnet werden kann. Für die Eichlösungen wurden Proben mit verschiedenen Konzentrationen Albumin verwendet. Für die Durchführung des BCA-Tests wurden die Proben auf einer *96-well*-Platte im Verhältnis 1:20 mit dem Lysepuffer verdünnt. Um die Biuret-Reaktion zu initiieren, wurden zu jeder Probe sowie zu der Eichreihe 200 µl der BCA-Lösung pipettiert (BCA Protein Assay Kit, Pierce). Nach kurzer Inkubation bei 37 °C wurde die optische Dichte bei 552 nm bestimmt (Epoch Microplate Reader, BioTek). Mit den ermittelten OD-Werten konnte nun rechnerisch die Proteinkonzentration der Proben aus den OD-Werten der Eichreihe unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt werden. Jede Probe wurde dreifach bestimmt.

2.2.4 SDS-Gelelektrophorese (PAGE) und *Western Blotting*

Der *Western Blot* ist eine Methode, mit der Proteine aufgetrennt (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE), auf eine Trägermembran übertragen (*Western Blotting*) und dann mithilfe einer Antikörper-gekoppelten Peroxidase nachgewiesen werden können.

Gelherstellung für die SDS-PAGE

Ein Polyacrylamid-Gel besteht aus zwei Komponenten, dem Sammelgel und dem Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine aufgetragen. Das Trenngel besitzt Poren, die Proteine in Abhängigkeit von der Molekülgröße im elektrischen Feld unterschiedlich schnell passieren können. Da größere Proteine stärker durch die Poren des Gels zurückgehalten werden, wandern kleine Proteine im elektrischen Feld entsprechend schneller. Auf diese Weise werden die Proteine der Größe nach aufgetrennt. Je größer der Acrylamidanteil des Gels ist, desto kleiner sind die Poren. Dementsprechend eignet sich ein höherprozentiges Gel, um kleinere Proteine aufzutrennen, während für große Proteine die Verwendung eines Gels mit geringerem Acrylamidanteil sinnvoller ist. Der pH-Wert des Sammelgels ist neutral, der des Trenngels basisch. Durch diese pH-Differenz akkumulieren die Proteine der Probe vor dem Trenngel und sind nach der Auftrennung nach Anfärbung

als deutliche Banden sichtbar. In dieser Arbeit wurden Gele mit einem Acrylamidanteil von 5–12,5 % verwendet. Die für die Herstellung der Gele verwendeten Komponenten sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein Detergens, das an Proteine ($1,4 \frac{g \text{ SDS}}{g \text{ Protein}}$) bindet und deren negative Ladung verstärkt. Die Zugabe von SDS bewirkt so eine Linearisierung der Proteine durch Ladungsabstoßung, was zu einer besseren Auftrennung nach der Kettenlänge führt. Da die Kettenlänge nahezu proportional zur Molekülmasse ist, werden mittels der SDS-PAGE die Proteine fast ausschließlich nach der Größe aufgetrennt, während die verhältnismäßig geringe Eigenladung der Proteine vernachlässigt werden kann. Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurden erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele hinzugegeben. APS dient als Polymerisationsinitiator, indem die bei der Zersetzung entstehenden Sulfatradikale die Kohlenstoffdoppelbindungen des Acrylamids angreifen und so dessen Polymerisierung als Kettenreaktion fördern. TEMED katalysiert diese Reaktion. Innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe beider Substanzen härteten die Gele aus und wurden maximal eine Woche lang feucht bei 4 °C gelagert.

SDS-PAGE

Bevor Proteine mittels SDS-PAGE getrennt werden konnten, mussten die Proben vorbereitet werden. Insgesamt wurden 30 µg Protein in jede Tasche des Gels aufgetragen. Dafür wurden diese in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit RIPA-Puffer auf 30 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden 3 µl 10x SDS-Probenpuffer und 1 µl Dithiothreitol (DTT) hinzugegeben. Der Probenpuffer enthält neben Bromphenolblau zum Anfärben der Probe auch β-Mercaptoethanol, welches zusammen mit DTT Disulfidbindungen reduziert. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden die Proben 5 Minuten lang auf 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde je eine Probe in eine Tasche des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde auf jedes Gel ein Größenmarker geladen, der aus Proteinen bekannter Größe besteht und parallel zu den eigentlichen Proben mitläuft. So konnte die Größe des detektierten Proteins später abgeschätzt werden. Durch Anlegen eines kontinuierlichen Stromflusses von 40–60 mA wurde die Wanderung der nun negativ geladenen Proteine durch das Polyacrylamidgel induziert.

Western Blotting

Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese mittels *Blotting* auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Trägermembran übertragen. Der Transfer fand bei 0,4 A statt und nahm 90 Minuten in Anspruch. Zur Fixation der Proteine auf der Membran wurde diese 30 Minuten lang bei 37 °C getrocknet und anschließend für eine Stunde mit TBS-T mit 5 % Magermilchpulver inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Auch das in TBS-T enthaltene Detergens Tween 20 vermindert unspezifische Antikörperbindung.

Proteindetektion

Um ein bestimmtes Protein in der Probe und somit auf der Membran nachzuweisen, wurden Antikörper gegen dieses verwendet. Diese entstammen häufig Kaninchen oder Mäusen und wurden, anhängig von der Sensitivität der Antikörper, in einem Verhältnis von 1:1000 bis 1:3000 mit TBS-T verdünnt. Zusätzlich wurde 5 % BSA hinzugegeben, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermindern. Die Antikörper wurden über Nacht bei 4 °C auf der Membran belassen. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 Minuten mit vollentsalztem Wasser und TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundenen Antikörper von der Membran zu verdrängen. Zum Nachweis der Antikörper, und somit indirekt auch des Proteins, wurden weitere Antikörper („Zweitantikörper“) genutzt, welche gegen den F_C-Teil des Erstantikörpers gerichtet sind (Abbildung 6). Diese Zweitantikörper werden häufig in Ziegen produziert und binden spezifisch an Kaninchen- oder Mausantikörper. Die Zweitantikörper sind mit Meerrettich-Peroxidasen (HRP) konjugiert, welche die Chemilumineszenzreaktion mit Wasserstoffperoxid und Luminol katalysieren. Die Zweitantikörper wurden im Verhältnis von 1:3000 bis 1:10000 mit TBS-T verdünnt und für eine Stunde auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran erneut 3 x 5 Minuten mit vollentsalztem Wasser und TBS-T gewaschen, bevor je 350 µl Luminol und Peroxid (*Ace Glow Solution* Kit von *Peqlab* oder *SuperSignal West Femto* Kit von *Thermo Scientific*) hinzugegeben wurden. Um ein vorzeitiges Austrocknen der Membran zu verhindern, wurde diese in Plastikfolie eingeschlagen. Nur da, wo Erst- und Zweitantikörper an der Membran gebunden waren, konnte mithilfe des *Fusion Fx7* (*Peqlab*) ein Chemilumineszenzsignal nachgewiesen werden. Auf diese Weise konnte die Expression bestimmter Proteine in verschiedenen Proben verglichen werden.

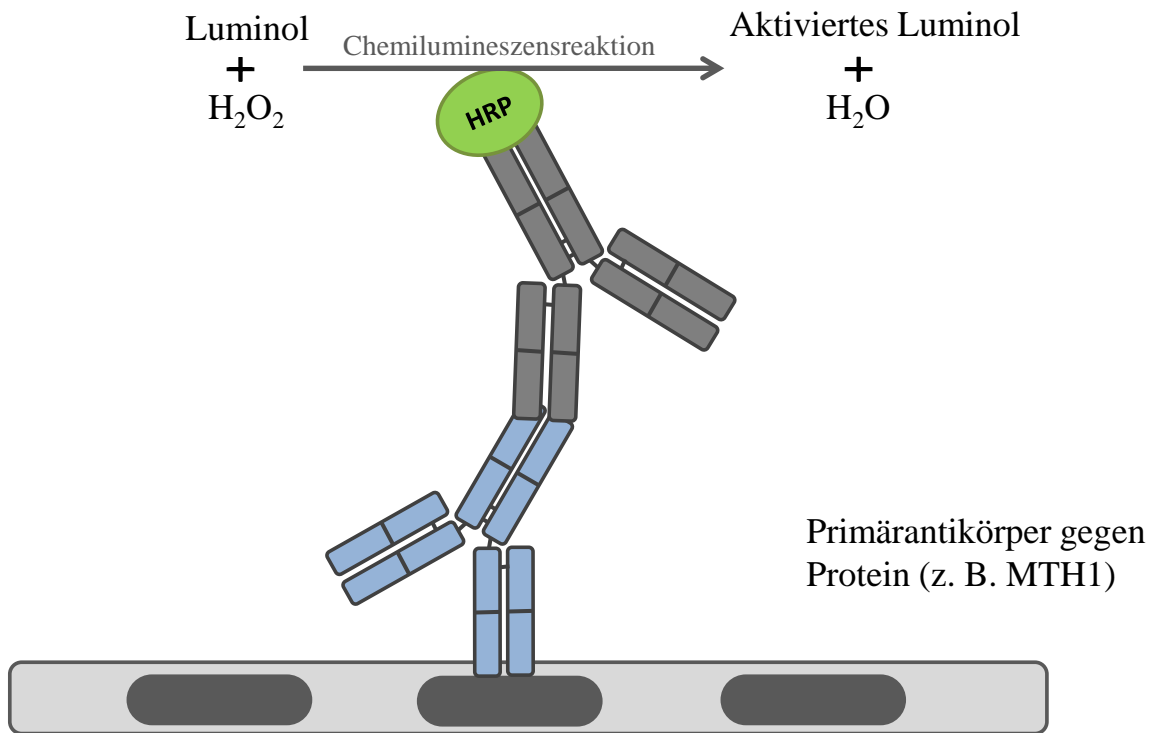


Abbildung 6: Prinzip der Proteindetektion mittels Chemilumineszenz: Bindung des Primärantikörpers an das auf die Membran transferierte Protein erlaubt die Bindung eines zweiten, HRP-konjugierten Antikörpers, der die Chemilumineszenzreaktion katalysiert und das Protein als Bande sichtbar macht.

2.2.5 Caspase 3-Aktivitäts Assay

Die Caspase 3 (Cysteinprotease 3) ist ein Enzym, das Teil vieler der bekannten Signalwege der Apoptose ist. Zwar kann Apoptose auch Caspasen-unabhängig ausgelöst werden, doch ist die Caspase 3 in den meisten Fällen involviert (siehe Kapitel 1.5). Somit kann der fehlende Nachweis der Aktivität des Enzyms nicht notwendigerweise als Beweis für das Ausbleiben des programmierten Zelltodes gedeutet werden. Wohl aber bedeutet ein Anstieg der Enzymaktivität auch eine Zunahme an Apoptose in den Zellen. Die Caspase 3 spaltet diverse Proteine, unter anderem die Poly-ADP-Polymerase 1, was für die Bestimmung der Caspase 3-Aktivität eines Zelllysates nützlich ist. Dazu wird eine Aminosäuresequenz verwendet, welche auch innerhalb von PARP gefunden werden kann (Asp-Glu-Val-Asp; im Einbuchstabencode DEVD). An diese Sequenz ist 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) gebunden, ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch die Aktivität der Caspase 3 freigesetzt wird und spektrometrisch bestimmt werden kann. Für die Bestimmung der Caspase 3-Aktivität wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen auf 6-well-Platten ausplattiert, wie oben beschrieben behandelt und nach 72 Stunden lysiert. Dem schloss sich eine Proteinkonzentrationsbestimmung an. 50 µg Protein wurden in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und mit Caspase-Lysepuffer auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 150 µl Substratpuffer mit 20 mM DTT und 66 µM DEVD-AMC hinzugegeben. Über einen Zeitraum von vier Stunden wurde daraufhin die Fluoreszenz bei Exzitation von 360 nm und Emission von 460 nm alle 10 Minuten mit dem *FLx800 fluorescence reader* gemessen. Für die Auswertung wurde der Zweistundenwert genutzt, da die Kinetik zu diesem Zeitpunkt noch eine linear steigende Caspase 3-Aktivität dokumentierte. Die Wirkung jeder Behandlung wurde in mindestens drei unabhängigen Proben untersucht.

2.2.6 Zelltod-Determination mit PI und Hoechst 33342

Propidiumiodid (PI, Emissionsmaximum 617 nm) ist ein Fluorophor, das mit DNA interkaliert. Da Zellmembranen nicht permeabel für PI sind, wird nur die DNA von Zellen mit perforierter Membran (toter Zellen) mit PI angefärbt. Hoechst 33342 hingegen färbt auch die DNA von Zellen mit intakter Zellmembran. Auf diese Weise können unter dem Fluoreszenzmikroskop lebende von toten Zellen unterschieden werden (Abbildung 7).

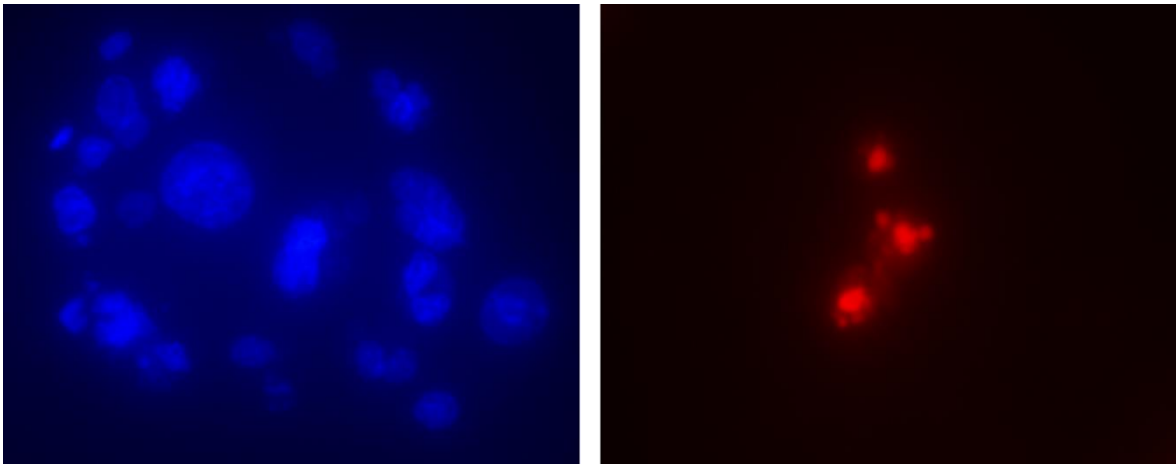


Abbildung 7: Unterscheidung vitaler und toter Zellen durch Fluoreszenzfarbstoffe. Hoechst 33342 (links) bindet an DNA und stellt so die Zellkerne von Zellen unabhängig vom Funktionszustand dar. PI (rechts) hingegen bindet nur an die DNA von Zellen mit perforierter Plasmamembran und dient so zur Detektion toter Zellen.

Für die Versuche wurden 1×10^5 HCT116 Zellen auf 6-Well-Platten ausplattiert und nach 12–18 Stunden bestrahlt und anschließend mit TH588 behandelt. 48 Stunden nach der Behandlung wurde $2,5 \mu\text{g/ml}$ PI und $0,85 \mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 hinzugegeben und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei 2000 g zentrifugiert, damit die meist schwimmenden toten Zellen zusammen mit den adhärennten lebenden für die Mikroskopie in einer Ebene liegen. Die Mikroskopie wurde an einem Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop von Zeiss durchgeführt. Anschließend wurden tote und lebende Zellen gezählt und der Quotient berechnet. So konnte der Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt werden.

$$\text{Anteil toter Zellen} = \frac{\text{Anzahl toter Zellen (PI)}}{\text{Gesamtzahl der Zellen (Hoechst)}}$$

Eine Differenzierung der verschiedenen Formen des Zelltodes konnte mit dieser Methode nicht vorgenommen werden.

2.2.7 MTT-Assay

Der MTT-Assay dient der Erfassung der metabolischen Aktivität von Zellen. Zur Bestimmung dieser wurde ein gelber Farbstoff (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, MTT, Abbildung 8) *in vitro* zu den Zellen gegeben. Abhängig von der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase und den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH wurde dieser Farbstoff umgesetzt und konnte photometrisch mit dem *Epoch Microplate Reader* (BioTek) bestimmt werden. Somit stellt die gemessene optische Dichte ein Maß für die Glykolyse und Zellatmung der Zelle dar. In der Literatur wird der MTT-Test häufig als Maß für die *Viability* verwendet, da diese stark mit der metabolischen Aktivität korreliert. Die *Viability* ist die Fähigkeit eines Organismus zum Überleben. Daher wird das Ergebnis des MTT-Tests im Rahmen der vorliegenden Arbeit vereinfacht als *Viability* bezeichnet. Die Ausführung des Assays erfolgte folgendermaßen: Zunächst wurden 2×10^3 HCT116, 3×10^3 SW480 oder 8×10^3 HUVEC auf einer 96-Well-Platte ausgesät (10-fach Bestimmung) und nach 12 Stunden behandelt. 72 Stunden später wurde das MTT-Reagenz im Überschuss dazu gegeben und nach einer Stunde Inkubation zusammen mit dem noch vorhandenen Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit 100 μ l eines MTT-Lysepuffers aufgelöst, bevor die Extinktion mit dem Plattenspektrometer bei 570 nm Wellenlänge gemessen wurde.

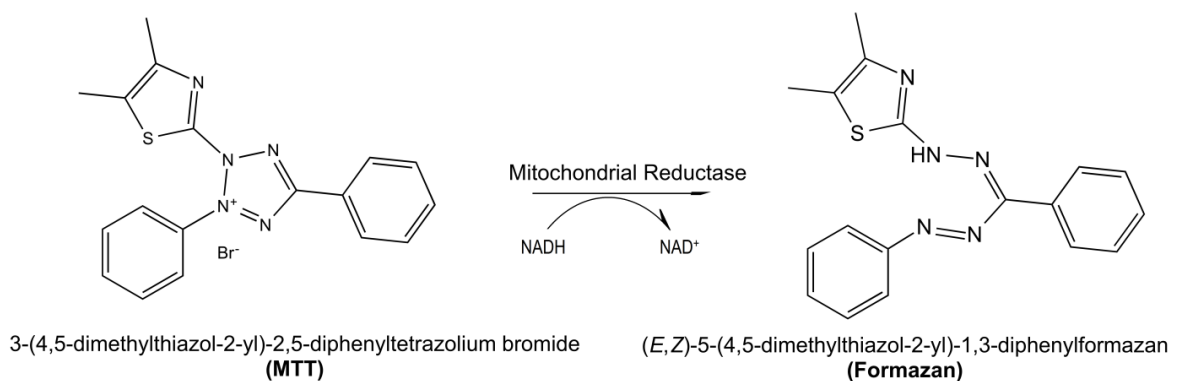


Abbildung 8: Reaktion von MTT zu Formazan. Für diese Reaktion ist das Vorhandensein von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH notwendig. Die Menge des photometrisch detektierten Formazan korreliert strikt mit der Menge an vorhandenem NADH.

2.2.8 Colony Formation Assay

Der *Colony Formation Assay* gibt Auskunft über die Wirksamkeit von Bestrahlung auf Krebszellen *in vitro* und kann als Maß für die Langzeitwirkung einer zytotoxischen Behandlung genutzt werden. Eines der Kennzeichen von Krebs ist die Fähigkeit, sich unbegrenzt zu teilen. Bei diesem Assay werden Zellen isoliert ausgesät und anschließend gezählt, wie viele der einzelnen Zellen nach 10–14 Tagen noch in der Lage sind, Kolonien von mindestens 50 Zellen zu bilden. Nach einer Bestrahlung ist diese Fähigkeit i. d. R. eingeschränkt. Zunächst wurden 6-Well-Platten mit Kollagen beschichtet und für 30–60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die anschließend ausgesäte Zellzahl richtete sich nach der geschätzten bzw. experimentell ermittelten Effektivität der Behandlung. Beeinträchtigte die Behandlung die Teilungsfähigkeit der Zellen sehr stark, mussten entsprechend mehr Zellen ausgesät werden. 8–12 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen erfolgten Bestrahlung und Behandlung. Das Ende des Versuches war abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Kolonien, erfolgte aber stets zwischen 10 und 14 Tagen. Die Zellen wurden mit 0,25 % para-Formaldehyd (PFA) fixiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und eine Stunde mit Coomassie gefärbt (Abbildung 9). Anschließend wurden die Bilder unter UV-Licht mit dem *Fusion-FX7* erstellt. Zur Auswertung wurde in unbehandelten Kulturen die Anzahl der Kolonien durch die Anzahl ausgesäter Zellen geteilt, um die *Plating Efficiency* (PE) zu bestimmen. Die Überlebensrate (*Survival Fraction*, SF) ergibt sich anschließend aus dem Quotienten der Kolonienzahl der behandelten Gruppe und dem Produkt aus der Anzahl ausgesäter Zellen und der PE.

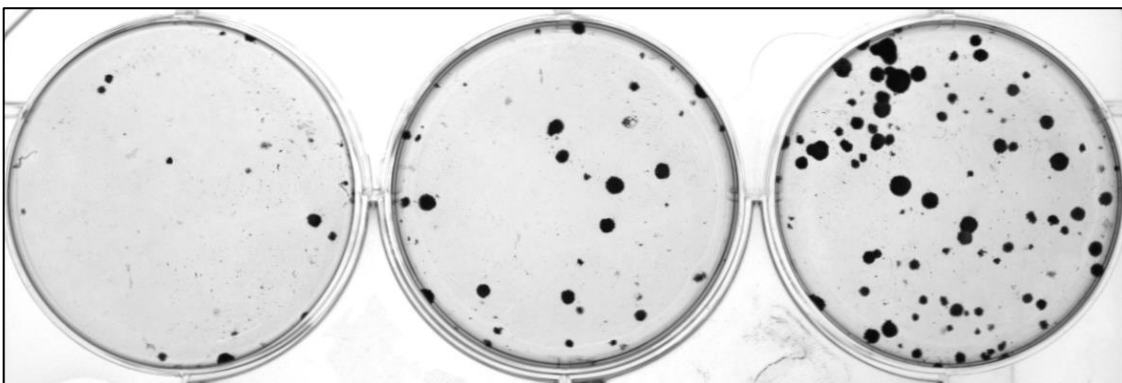


Abbildung 9: Mit Coomassie gefärbte Kolonien auf einer 6-well-Platte. Die Anzahl der Kolonien lässt einen Rückschluss auf die Effektivität einer Therapie zu.

2.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Avidin-Assay

8-oxo-dGTP ist das am häufigsten durch MTH1 prozessierte oxidierte Nukleotid und wird von Avidin nach Literaturangaben hochspezifisch gebunden (Gad et al. 2014). An Alexa Fluor 488 gebunden kann Avidin und so auch 8-oxo-dGTP im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Für die Experimente wurden 5×10^3 Zellen auf runden Deckgläsern in *24-well*-Platten ausplattiert und 16 Stunden später behandelt. Wurde der Versuch in Hypoxie durchgeführt, wurden die Zellen vier Stunden vor der Behandlung in Hypoxie platziert, um eine Adaptation an den veränderten Sauerstoffpartialdruck zu gewährleisten. Die Behandlung der Zellen erfolgte je nach Versuch mit Doxycyclin zur Induktion der shRNA Expression oder mit TH588. Bei Versuchen mit TH588 wurde als Positivkontrolle eine Probe 10 Minuten vor der Fixierung mit H_2O_2 behandelt, welches als ROS die Bildung von 8-oxo-dGTP induzieren sollte. 48 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit Methanol bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 20 Minuten lang fixiert und anschließend für 15 Minuten in TBS mit 0,1 % Triton X-100 inkubiert. Durch die zweistündige Inkubation in Blockierlösung, bestehend aus TBS mit 0,1 % Triton X-100 und 15 % FBS, wurden unspezifische Bindungsstellen für Avidin vermindert. Die Färbung erfolgte mit $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Alexa488-konjugiertem Avidin (Life Technologies) in der Blockierlösung bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ für eine Stunde. Anschließend wurde 2×5 Minuten mit TBS mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen. Der letzte Schritt beinhaltete eine Färbung mit $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342, das an DNA bindet und deshalb als Kontrolle für die Lokalisation von 8-oxo-dGTP innerhalb der Zelle genutzt werden konnte. Anschließend wurden die Deckgläser auf einen Objektträger übertragen und mit *Mounting Medium* (DAKO) befestigt. Die Bilder wurden an einem konfokalen Lasermikroskop (Zeiss Axiovert 200M) mit einem Objektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1.3 erstellt.

8-oxo-G Antikörper

Um die Spezifität der Avidin-Bindung an 8-oxo-dGTP zu überprüfen, wurde in einem weiteren Versuch 8-oxo-G mit einem Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Dafür wurden 2×10^5 Zellen pro *Well* auf Deckgläsern in einer 24-*Well*-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Behandlung mit DMSO oder TH588 für 24 Stunden. Als Positivkontrolle wurde Luperox® verwendet, ein stabileres Wasserstoffperoxidderivat, welches die Bildung von 8-oxo-dGTP induzieren sollte. Für die Negativkontrolle wurde das Reduktionsmittel L-Cystein Ethylester Hydrochlorid verwendet. Beide Reagenzien wurden 20 Minuten vor Ende des Versuches auf die Zellen gegeben. Nach zweimaligem Waschen wurden dafür die Zellen mit Methanol/Aceton (-20 °C) in einem Verhältnis von 1:1 für 30 Minuten fixiert und anschließend erneut zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Denaturierung von Proteinen in 2N HCl für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Nach fünf weiteren Waschschritten wurden die Proben eine Stunde lang in PBS mit 4 % BSA blockiert und danach über Nacht mit einem Anti-Hydroxyguanosin-Antikörper (Abcam oder GeneTex) in einer 1:200 Verdünnung in PBS inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben erneut dreimal gewaschen und für eine Stunde mit Alexa Fluor-488-konjugierten Antikörpern gegen Mausantikörper im Verhältnis 1:500 inkubiert. Während des letzten der folgenden drei Waschschrritte wurde zudem Hoechst 33342 appliziert, um die Kerne der Zellen anzufärben. Danach wurden die Deckgläser mit *Mounting Medium* (DAKO) auf Objektträgern fixiert und Bilder mit dem konfokalen Lasermikroskop Zeiss Axiovert 200M erstellt. Dazu wurde ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1.3 verwendet.

2.2.10 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay ist ein Reporter-Gen-Assay, der Auskunft über die Menge eines Transkriptionsfaktors oder Genproduktes gibt. Um diese zu quantifizieren, macht man sich die Eigenschaft einer Gruppe von Enzymen (Luciferasen) zunutze, die unter Verbrauch von ATP und Sauerstoff Luciferin in Oxyluciferin umwandeln, wobei Licht emittiert wird. Wird nun ein Plasmid in die Zielzelle eingeschleust, auf dem ein Gen für die Expression einer Luciferase dem Promotor eines Zielgenes nachgeschaltet ist, wird die entsprechende Luciferase in dem Maße exprimiert, in dem Transkriptionsfaktoren an den Promotor binden bzw. in dem auch das Zielprotein exprimiert wird.

HIF-Nachweis

In diesem Versuch wurde ein Plasmid verwendet, bei dem das Gen für eine *Firefly*-Luciferase hinter einen HRE-Promotor (*hypoxia-response-element*) geschaltet war (pGL3-3xHRE-HIF-1 α). Somit konnte die Produktion des kurzlebigen Hypoxie-induzierbaren Faktors in die stabilere Luciferase übersetzt werden. Zusätzlich wurde ein Plasmid mit dem Gen für eine Renilla-Luciferase transfiziert (pGL4.74, Promega), welches hinter einem sehr starken konstitutiven CMV-Promotor liegt. Die später gemessene, von der Renilla-Luciferase katalysierte Reaktion, wurde als Maß für den Transfektionserfolg genutzt, damit die einzelnen Proben vergleichbar miteinander waren. Die Transfektion fand in *24-Well*-Platten statt, auf die 4–8 Stunden zuvor je 1×10^5 HCT116 Zellen aufgetragen wurden. Dabei wurden 500 ng der *Firefly*- und 100 ng der Renilla-DNA zusammen mit dem Transfektionsreagenz Viafect in einem Verhältnis von 3 μ l Viafect auf 1 μ g DNA pro Well hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Behandlung mit DMSO oder TH588 in verschiedenen Konzentrationen. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden 25 μ l Beetle Luciferin (LARII, Substrat der *Firefly*-Luciferase) auf die Probe gegeben und die Messung am Luminometer gestartet, wobei die Messzeit 10 Sekunden und die Verzögerung 2 Sekunden betrug. Danach wurde eine Lösung hinzugegeben, die die *Firefly*-Reaktion abstoppte und zusätzlich Coelenterazin enthielt, das als Substrat für die Renilla-Luciferase fungiert. Nach einer erneuten Messung konnte so der Quotient aus *Firefly*- und Renilla-Luciferase für jede Probe bestimmt werden.

Antioxidans-Nachweis

Die Expression von Antioxidantien als Antwort auf oxidativen Stress kann ebenfalls mithilfe des Luciferase-Assays nachgewiesen werden. Der Versuchsablauf war analog zu dem oben beschriebenen Nachweis von HIF. Jedoch enthielt das verwendete *Firefly*-Plasmid (pGL3-8xARE) einen Promotor, an den der Transkriptionsfaktor NRF2 bindet. NRF2 ist bei oxidativem Stress aktiv und reguliert Enzyme mit antioxidativer Wirkung. Für die Positivkontrolle wurden Zellen zusätzlich mit einem Überexpressionsplasmid (pcDNA3-Nrf2) für NRF2 behandelt, sodass die Hochregulation der *Firefly*-Luciferase durch NRF2 verifiziert werden konnte.

2.2.11 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde die Software Graphpad Prism 6 verwendet. Beim Vergleich von zwei Gruppen wurde der *Students t-test* genutzt. Sofern mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde ein *Two-Way* ANOVA mit -HOC-Test verwendet. Der post-HOC Test wurde, wie in den jeweiligen Abbildungen angegeben, nach Bonferroni oder Dunnett's durchgeführt. Die Ergebnisse wurden ab $p < 0.05$ als signifikant angesehen (*), $p < 0.01$ als hochsignifikant (**) und $p < 0.001$ als höchst signifikant (***).

3 Ergebnisse

3.1 Strahlensensitivität TH588-behandelter HCT116

Um die Effektivität und den möglichen Effektivitäts-Zugewinn von Bestrahlung durch eine zusätzliche Behandlung mit TH588 zu untersuchen, wurden verschiedene Assays verwendet, die das Kurz- oder Langzeitüberleben der Zellen messen. Dabei konzentrieren sich die meisten der Kurzzeittests auf den Parameter Zelltod. Des Weiteren wurde die *Viability* gemessen. Für die Untersuchung des längerfristigen Erfolges der Behandlung wurde der *Colony Formation Assay* verwendet. Im Folgenden werden „Kombination“ und „Kombinationsbehandlung“ stellvertretend für „Kombination von Bestrahlung und Behandlung mit TH588“ verwendet.

3.1.1 Caspase 3-abhängige Apoptose nach Kombinationstherapie

Für die Beurteilung des Kurzzeitüberlebens wurde die Caspase 3-Aktivität von HCT116 nach TH588-Behandlung und Bestrahlung bestimmt, da diese mit der Anzahl apoptotischer Zellen korreliert (Abb. 10). Eine Behandlung mit 5 μM TH588 allein erhöhte die relative Aktivität auf das Doppelte des Wertes der unbehandelten Kontrolle und konnte durch Steigerung der Konzentration auf den nahezu dreifachen Wert erhöht werden. Bestrahlung mit 1, 3 oder 10 Gy steigerte den Anteil der Zellen in Apoptose ebenfalls, wobei bei 3 Gy die maximale Erhöhung um den Faktor 2 gemessen werden konnte. Auch nach einer Kombinationsbehandlung war die relative Caspase 3-Aktivität erhöht, jedoch wurde der Maximalwert, der durch die Einzelbehandlung mit 10 μM TH588 erreicht wurde, nicht überschritten. Teilweise wurde die TH588-induzierte Apoptose sogar durch zusätzliche Bestrahlung tendenziell vermindert. So erhöhten 20 μM TH588 allein die Apoptose um den Faktor 2,5, wohingegen dieselbe Konzentration mit zusätzlicher Bestrahlung mit 10 Gy die Apoptose nur um den Faktor 2 steigern konnten. Demnach ist durch eine zusätzliche Bestrahlung keine Zunahme des Caspase 3-abhängigen Zelltodes zu verzeichnen.

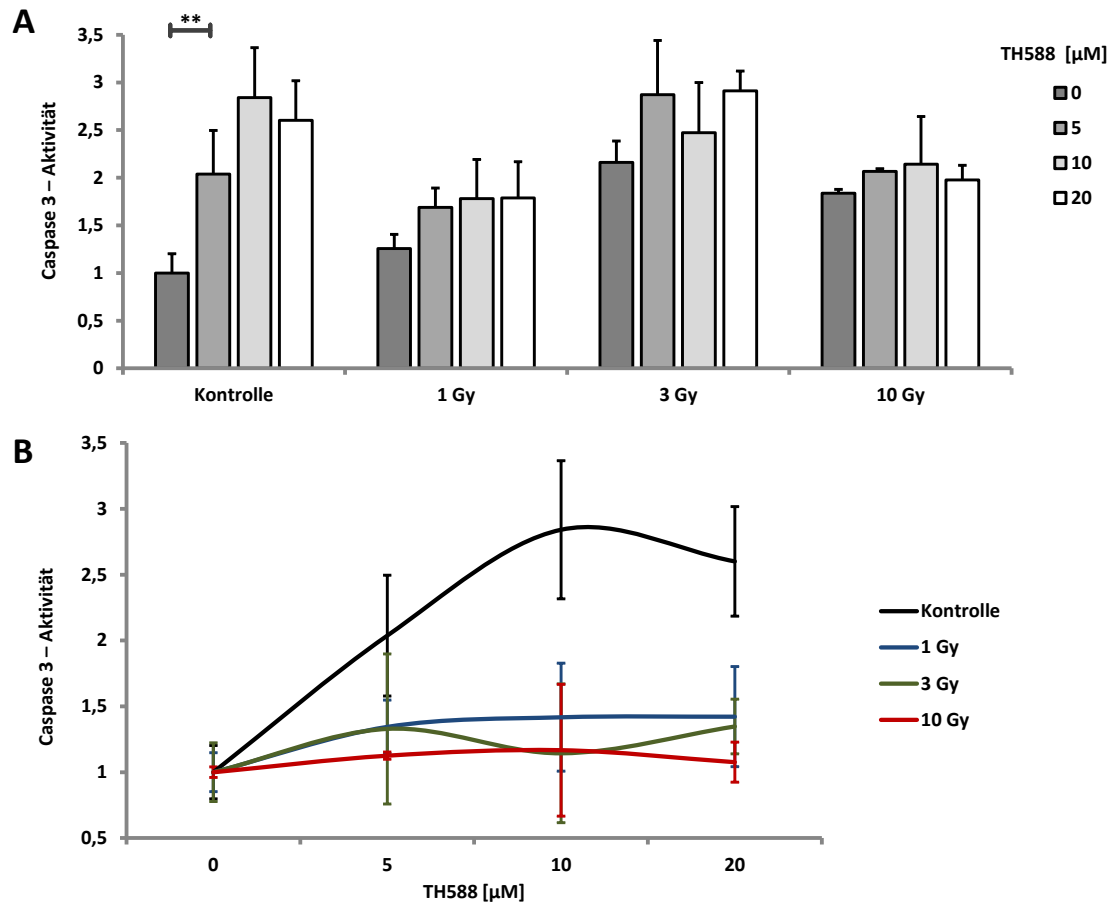


Abbildung 10: Relative Caspase 3-Aktivität nach Bestrahlung und TH588-Behandlung. Caspase 3-Aktivität wurde 72 Stunden nach der Behandlung in HCT116 gemessen. Die Lyse der Zellen erfolgte 72 Stunden nach Behandlung und Bestrahlung. (A) Die Normierung erfolgte auf die unbehandelte und unbestrahlte Kontrolle. (B) Die Normierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrolle in jeder Gruppe. Gezeigt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung (SD).

3.1.2 Viability nach Kombinationstherapie

Der MTT-Test zeigt in HCT116, wie in Abbildung 11 dargestellt, eine Reduktion der *Viability* auf 60 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Behandlung mit 5 μM TH588. Eine Steigerung der Konzentration auf 10 μM konnte die Zahl der Reduktionsäquivalente weiter auf etwa 20 % reduzieren. Die Bestrahlung mit 3 Gy verminderte die *Viability* auf etwa 30 %. Wurde zusätzlich zu der Bestrahlung mit TH588 behandelt, konnte eine weitere Reduktion erreicht werden. Nutzt man für die Normierung jedoch die bestrahlten, aber nicht behandelten Zellen statt der vollständig unbehandelten Kontrolle (B) wird ersichtlich, dass die relative Reduktion der *Viability* durch den Einsatz von TH588 bei den zusätzlich bestrahlten Zellen geringer ist als bei den ansonsten unbehandelten. Die Kombination von TH588-Behandlung und Bestrahlung reduziert also die *Viability* nicht stärker als die Behandlung allein.

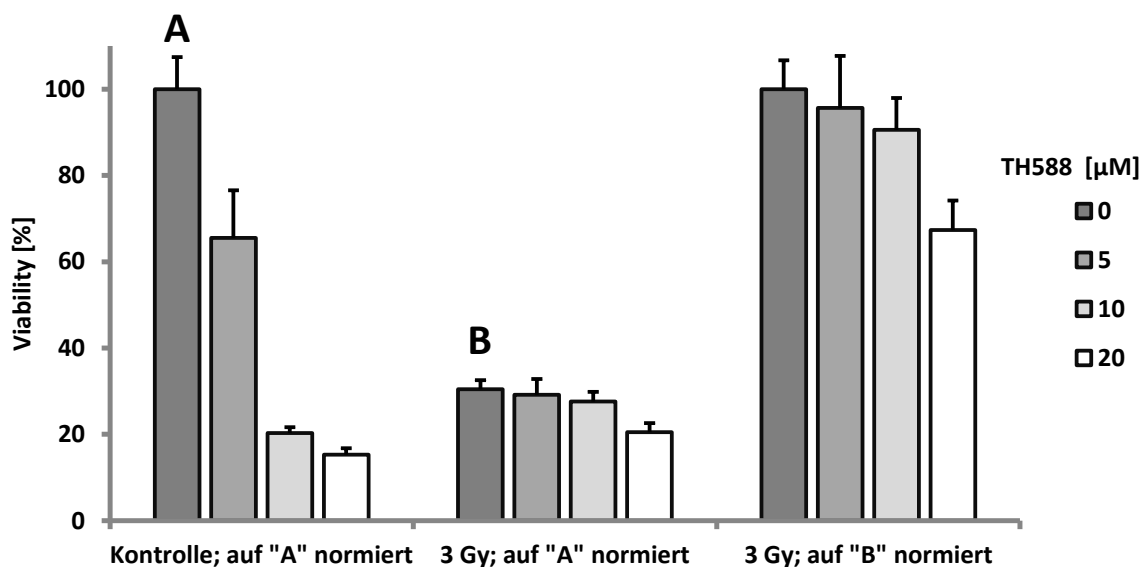


Abbildung 11: MTT-Test nach Bestrahlung und TH588-Behandlung. Die *Viability* wurde 72 Stunden nach Behandlung in HCT116 gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Die linke und mittlere Gruppe ist auf die unbehandelte Kontrolle (A) normiert. Die rechte Gruppe zeigt ebenso wie die mittlere die mit 3 Gy bestrahlten Zellen, jedoch sind die Werte dieser Gruppe auf den OD der bestrahlten, aber unbehandelten Kontrolle (B) normiert, um den zusätzlichen Effekt durch die Behandlung zu verdeutlichen.

3.1.3 Visuelle Zelltodanalyse nach Kombinationstherapie

Um eine Aussage zum Gesamtzelltod zu erhalten, der auch Caspase 3-unabhängige Formen des Zelltods umfasst, wurden die behandelten Zellen zusätzlich unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Färbung der Zellen mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid erlaubte die Unterscheidung vitaler von toten Zellen. Hoechst 33342 kann die Zellmembran uneingeschränkt passieren, so dass sowohl die DNA lebender als auch toter Zellen durch den interkalierenden Farbstoff blau markiert wurde. Propidiumiodid passiert nur geschädigte Zellmembranen und färbt damit sterbende und tote, jedoch keine lebenden Zellen an. Hierbei wird im Gegensatz zum Caspase 3-Assay auch die Nekrose als Form des Zelltodes berücksichtigt. Bei der Betrachtung der Zellen ist in der unbehandelten Kontrolle ein dichter Zellrasen sichtbar (Abbildung 12). Zudem gibt es auch hier vereinzelt tote Zellen. Wurden die Zellen ohne TH588-Behandlung bestrahlt, fällt auf, dass zwar die Menge vitaler Zellen mit der Strahlendosis abnimmt, die Anzahl toter Zellen jedoch konstant bleibt. Die Behandlung der Zellen mit TH588 bewirkte bereits in geringer Konzentration (5 μM) eine deutliche Reduktion vitaler Zellen, während auch hier kaum mehr tote Zellen zu sehen sind. Steigerte man die Konzentration weiter auf 10 μM , stieg auch der Anteil toter Zellen. Eine sehr deutliche Zunahme toter Zellen ist erst sichtbar, wenn die Behandlung mit TH588 und Bestrahlung kombiniert wurden. Der Effekt wird sowohl bei einer Kombination aus geringen Konzentrationen des Wirkstoffes (5 μM) mit hoher Strahlendosis (3 Gy) als auch bei geringer Strahlendosis (1 Gy) in Verbindung mit hoher TH588-Konzentration (10 μM) deutlich. Die stärkste Zunahme toter Zellen ist bei der Kombination von 3 Gy mit 10 μM TH588 zu beobachten.

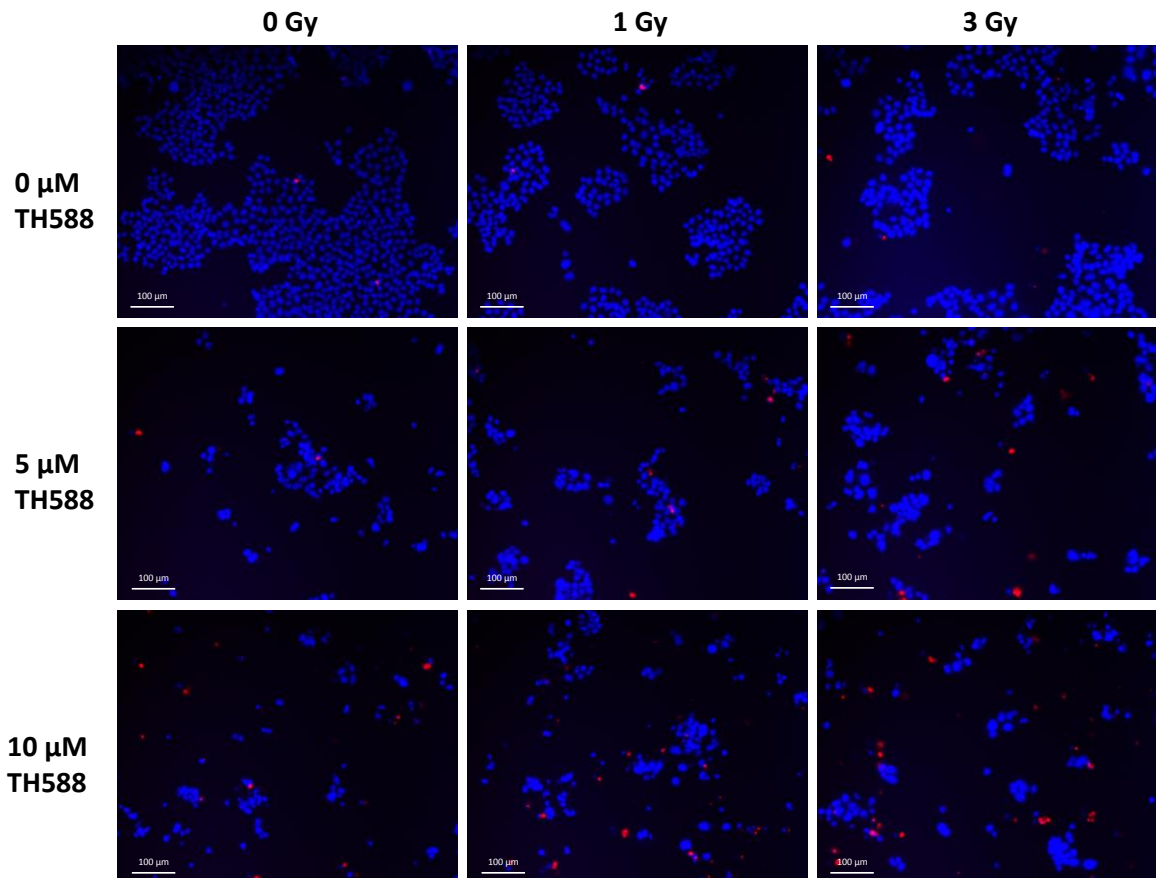


Abbildung 12: Zelltod-Determination durch Hoechst 33342 und Propidiumiodid. HCT116 wurden mit Hoechst 33342 (blau) und Propidiumiodid (rot) gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Markierung umfasst 100 μm. Die Bildausschnitte repräsentieren exemplarisch eine Reihe von Bildern von jeder Probe, die quantitative Auswertung ist in Abbildung 13 dargestellt.

Die Auszählung der oben beschriebenen Bilder bestätigt die bereits visuell erkennbaren Ergebnisse. Sowohl der Einsatz ionisierender Strahlung als auch die Behandlung mit TH588 verminderte die absolute Zahl vitaler Zellen unabhängig voneinander (Abbildung 13, A). Dabei war der Einfluss des Hemmstoffes ausgeprägter als die Wirkung der Bestrahlung, da bereits bei geringer Konzentration (5 μM) die Anzahl stärker supprimiert werden konnte als durch 3 Gy Strahlung. Zudem konnte durch eine weitere Steigerung der Konzentration sowie durch eine Kombination mit Bestrahlung die Anzahl vitaler Zellen kaum weiter vermindert werden. Der relative Anteil toter Zellen (Abbildung 13, B) spiegelt diese Aussage wieder. Zwar konnte durch den alleinigen Einsatz ionisierender Strahlung die Anzahl toter Zellen nicht wesentlich gesteigert werden, wohl aber durch die Kombination mit TH588. Der Wirkstoff selbst erzeugte wiederum unabhängig von der Bestrahlung einen dosisabhängigen Anstieg des Anteils toter Zellen von nahezu 0 %

in der unbehandelten Kontrolle zu etwa 15 % bei einer Konzentration von 10 μM . Die deutlichste Steigerung war bei der Kombination dieser Konzentration mit 3 Gy nachweisbar. Hier lag der Anteil toter Zellen bei 25 %, was selbst den Wert der Positivkontrolle (50 μM Etoposid, Bilder in Abbildung 12 nicht gezeigt) knapp überstieg.

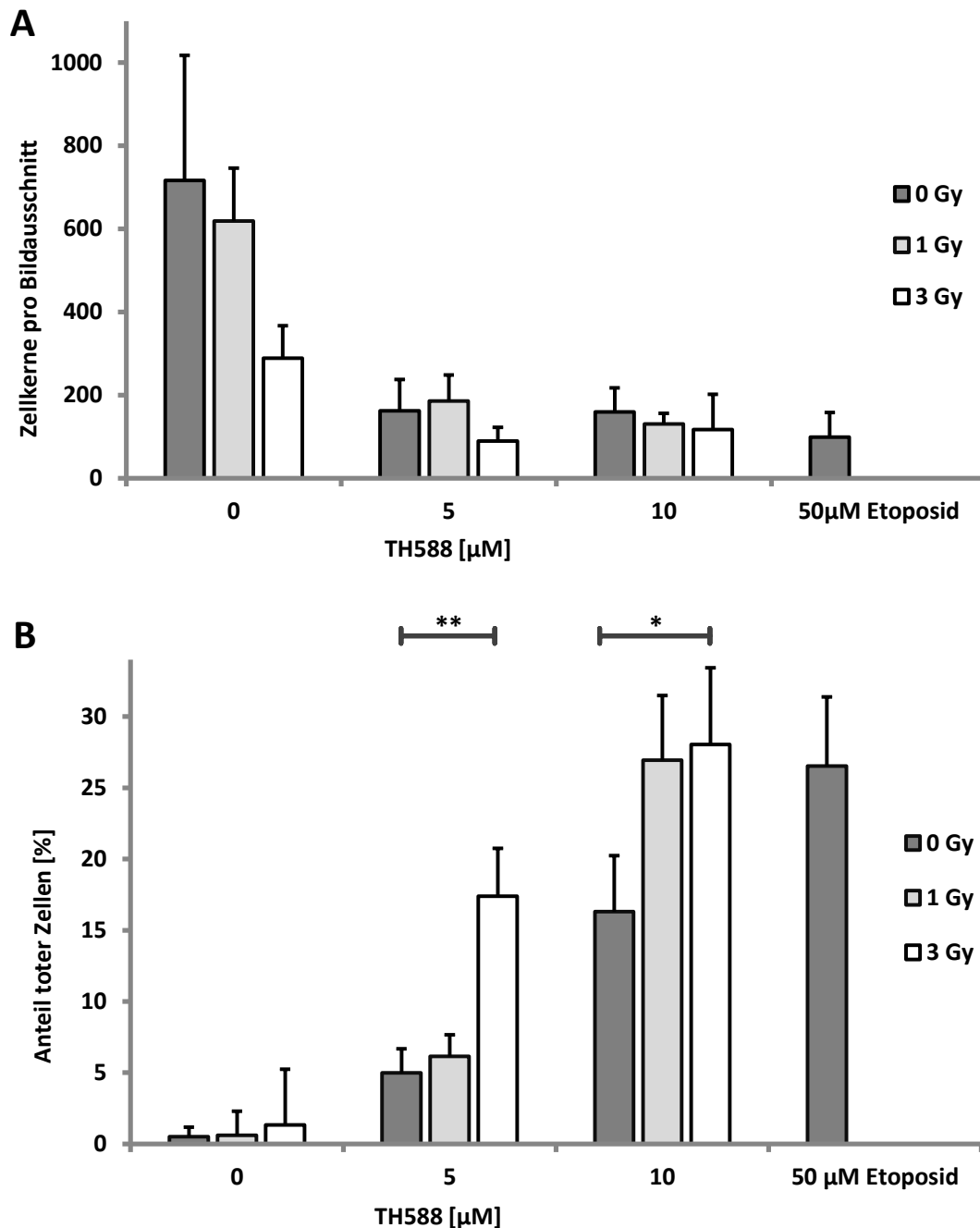


Abbildung 13: Quantifizierung von Abbildung 12. (A) Anzahl der Zellkerne pro Bildausschnitt 48 Stunden nach Behandlung mit TH588 und Bestrahlung. N = 5. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. (B) Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl 48 Stunden nach Behandlung mit TH588 und Bestrahlung. N = 5. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Als post-hoc Test wurde der Test nach Bonferroni verwendet.

3.1.4 PARP-cleavage nach Kombinationstherapie

Eine weitere Möglichkeit, Apoptose in Zellen zu detektieren, besteht in dem Nachweis der Spaltprodukte, welche durch die von Caspasen katalysierte Reaktion entstehen. PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) ist eines derjenigen Enzyme, die durch Caspasen während der Apoptose gespalten werden. Dabei entsteht ein Spaltprodukt, das sich im *Western Blot* unterhalb der eigentlichen PARP-Bande darstellt. Die PARP-cleavage nahm nach singulärer Behandlung oder Bestrahlung zu, wobei die Ausprägung nach der Behandlung mit 10 μM TH588 deutlicher war, als durch Bestrahlung mit 10 Gy. Die größte Menge des PARP-Spaltstückes war sichtbar nach der Kombinationsbehandlung, sowohl nach 72 als auch nach 96 Stunden.

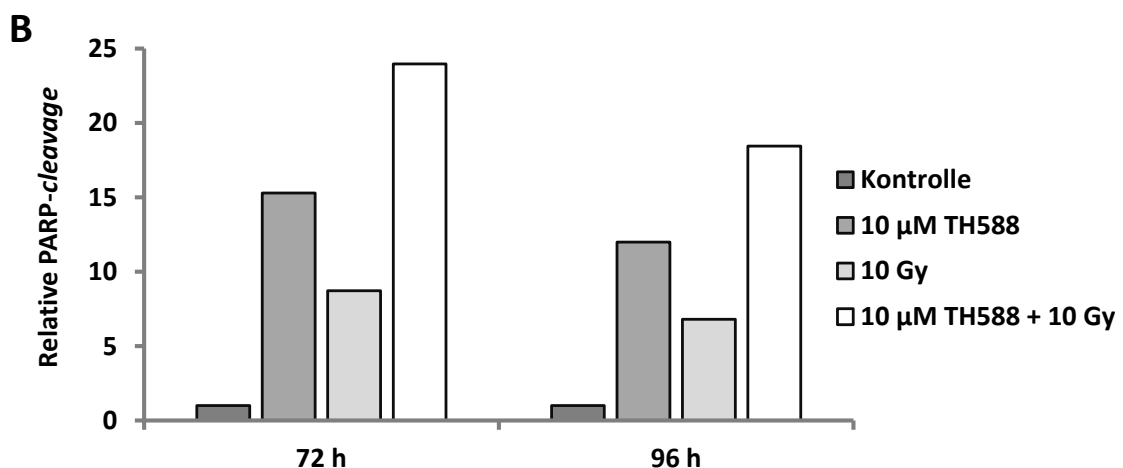
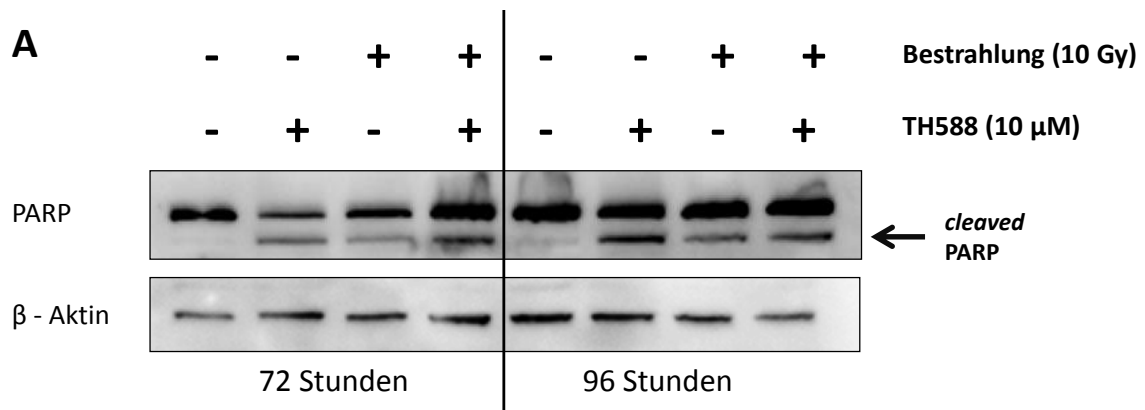


Abbildung 14: PARP-cleavage im *Western Blot* nach TH588-Behandlung und Bestrahlung. (A) HCT116 wurden 72 und 96 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy und Behandlung mit 10 μM TH588 lysiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Gel mit 10 % Polyacrylamid-Anteil. β -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung von A. Densitometrische Bestimmung der PARP-cleavage in Relation zu β -Aktin. Die Graphen sind normiert auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle.

3.1.5 Langzeitüberleben nach Kombinationstherapie

Eine Aussage zum Langzeitüberleben von Krebszellen *in vitro* erlaubt der *Colony Formation Assay*. Wie in Abbildung 15 A dargestellt, reduzierte die Behandlung mit 5 μM TH588 Kolonieanzahl und -größe deutlich. So mussten bei der Kombination mit einer höheren Strahlendosis achtmal mehr Zellen ausgesät werden, damit überhaupt Kolonien gebildet wurden. Nach der Behandlung wurden die Platten für 10 Tage inkubiert. Es wird deutlich, dass bei gleicher Anzahl ausgesäter Zellen auch nach alleiniger Bestrahlung die Anzahl der Kolonien reduziert wurde. Einer Bestrahlung mit 1 Gy bewirkte eine Reduktion um fast 50 % und mit 3 Gy sogar um nahezu 90 %. Eine alleinige Behandlung mit TH588 in einer Konzentration von 5 μM verminderte die SF hingegen lediglich um knapp 40 %. Kombinierte man nun aber die TH588-Behandlung mit 1 Gy Strahlendosis, wurde eine Reduktion der SF um ca. 75 % messbar. Wurden 3 Gy mit 5 μM TH588 kombiniert, wurde die SF um über 95 % reduziert.

Um zu ermitteln, ob die Kombination lediglich additiv wirkt oder ob die Wirkung der Bestrahlung durch die Behandlung noch verstärkt werden kann, muss die prozentuale Reduktion durch die Behandlung nach der Bestrahlung betrachtet werden. Im Falle von 1 Gy wurde die bereits um 50 % reduzierte SF durch die zusätzliche Behandlung mit TH588 noch einmal um die Hälfte auf insgesamt 25 % reduziert. Verglichen mit der Behandlung ohne Bestrahlung ergibt sich also eine effektivere Beeinträchtigung des relativen Langzeitüberlebens, d. h. der noch teilungsfähigen Zellen durch die Kombination, da diese durch die Behandlung ohne Bestrahlung weniger als 50 % betrug. Bei einer Strahlendosis von 3 Gy wurde die SF durch zusätzliche Behandlung von ca. 10 % auf 6 % supprimiert, was bezogen auf die noch teilungsfähigen Zellen nach der Bestrahlung einer Reduktion um 40 % entspricht. Somit war nach der Kombination von 1 Gy und 5 μM TH588 nicht nur die größte absolute Beeinträchtigung des Langzeitüberlebens messbar, sondern auch die größte Effektivität von Bestrahlung und Behandlung.

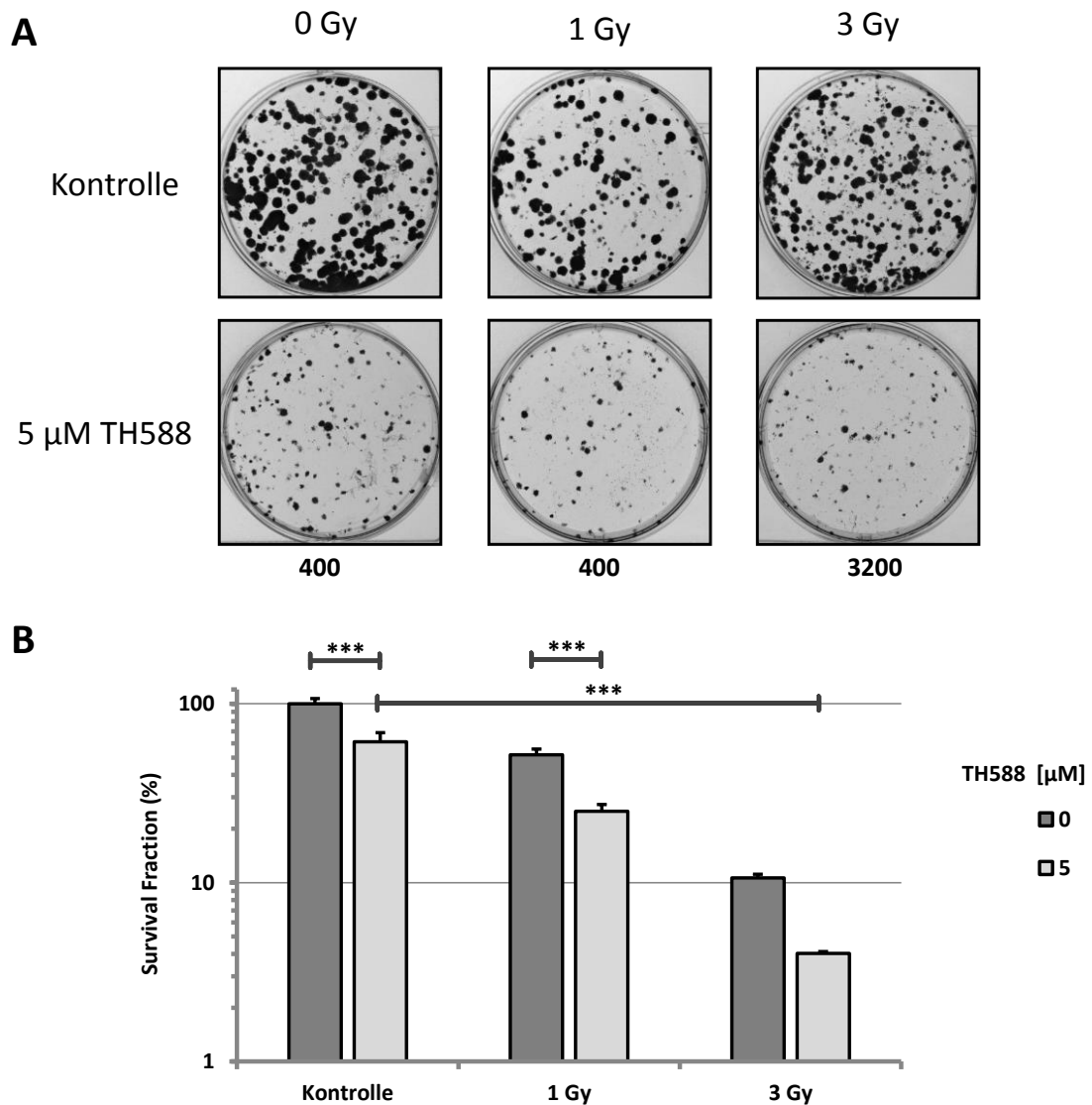


Abbildung 15: Colony Formation Assay in HCT116 nach Bestrahlung und TH588-Behandlung. (A) Dargestellt sind einzelne Wells von 6-well-plates, auf denen die Zellen ausplattiert wurden. Die Zahl der ausgesäten Zellen pro Well ist unter den Bildern angegeben. (B) Gezeigt ist die Quantifizierung von A. Angegeben ist die *Survival Fraction*, die wie im Methodenteil beschrieben berechnet wird und ein Maß für Zellteilungsfähigkeit der unbehandelten Tumorzellen ist. Die Darstellung ist logarithmisch. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Als posthoc-Test wurde der Test nach Bonferroni verwendet.

3.2 Einfluss der MTH1-Inhibition auf HCT116 in Hypoxie

Im Folgenden wird der Einfluss von TH588 auf Tumorzellen, die in Hypoxie kultiviert wurden, näher betrachtet. Um die allgemeine Wirksamkeit von TH588 in Hypoxie zu prüfen, wurden die *Viability* und die Caspase 3-Aktivität ermittelt. Der Einfluss auf das Langzeitüberleben und die Strahlensensitivität in Hypoxie wurde mithilfe des *Colony Formation Assays* untersucht. Zudem wurden Expression und Aktivität von HIF nach Behandlung mittels *Western Blotting* und *Luciferase-Assay*, sowie die Expression von MTH1 in Hypoxie gemessen, um eine mögliche Abhängigkeit dieser beiden Proteine voneinander zu detektieren. Weiterhin wurden eine Anfärbung von 8-oxo-dGTP bzw. 8-oxo-G sowie *Luciferase-Assays* durchgeführt, um den möglichen Zusammenhang der Wirkung der Substanz zum Redox-Zustand der Zelle zu untersuchen.

3.2.1 *Viability* in Hypoxie nach TH588-Behandlung

Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, ist im MTT-Test nach TH588-Behandlung in HCT116 bei normalen Sauerstoffbedingungen eine deutliche dosisabhängige Reduktion der *Viability* sichtbar. Zellen, die für den gesamten Behandlungszeitraum bei 1 % Luftsauerstoff inkubiert wurden, zeigten eine ebenso deutliche Verminderung der metabolischen Aktivität. Selbst nach Inkubation bei 0,1 % Sauerstoffanteil („schwere Hypoxie“) war diese Tendenz sichtbar, jedoch trat eine zu 5 μM in Normoxie äquipotente Reduktion erst bei 20 μM ein (Abbildung 16, A). In SW480 Zellen war ebenfalls eine Reduktion der *Viability* sichtbar, wenn auch nicht so ausgeprägt wie in HCT116 (Abbildung 16, B).

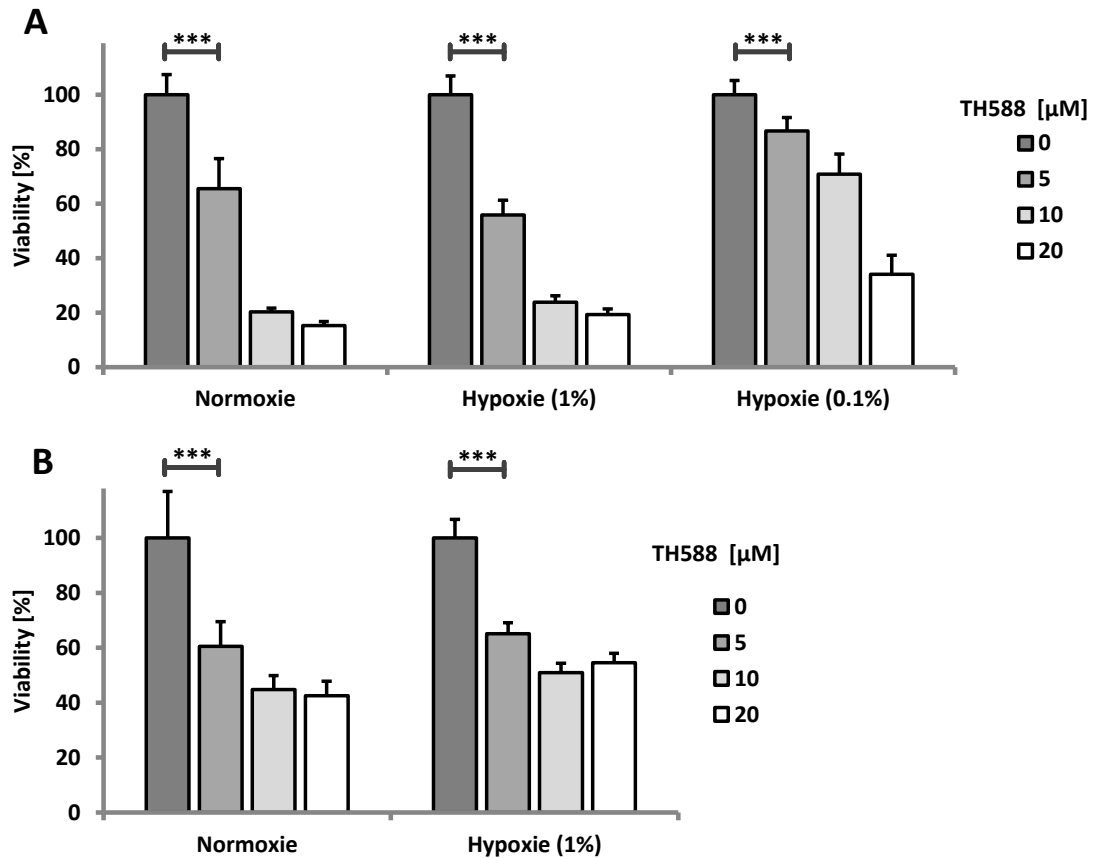


Abbildung 16: Viability von HCT116 (A) und SW480 (B) bei 21, 1 und 0,1 % Luftsauerstoff nach TH588-Behandlung. Die Viability wurde 72 Stunden nach der Behandlung in HCT116 gemessen. Die Zellen befanden sich für den gesamten Zeitraum der Inkubation in Hypoxie. Jede Gruppe wurde auf die jeweils unbehandelte Kontrolle normiert. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SD.

3.2.2 Caspase 3-abhängige Apoptose in Hypoxie nach TH588-Behandlung

Unter normalen Sauerstoffbedingungen stieg die Aktivität der Caspase 3 und somit auch die Apoptose in HCT116 nach Behandlung mit TH588 konzentrationsabhängig an. So konnte bei einer Konzentration von 5 μM bereits eine Zunahme um den Faktor 1,5 gemessen werden, wie Abbildung 17 zeigt. Die relative Enzymaktivität stieg mit der eingesetzten Konzentration des Stoffes und erreichte ihr Maximum bei 10 μM mit dem Faktor 3,5. Während in Normoxie bereits bei 5 μM eine Zunahme der Caspase 3-Aktivität beobachtet werden konnte, stieg diese in Hypoxie bei 1 % Sauerstoff erst bei 10 μM und bei 0,1 % Sauerstoff bei 20 μM TH588. Maximal nahm die Enzymaktivität in Hypoxie um den Faktor 2,5 zu, während in Normoxie der Faktor 3,5 erreicht wurde. Somit induzierte die Behandlung mit TH588 auch unter Sauerstoffmangel die Apoptose in HCT116, jedoch in geringem Ausmaß.

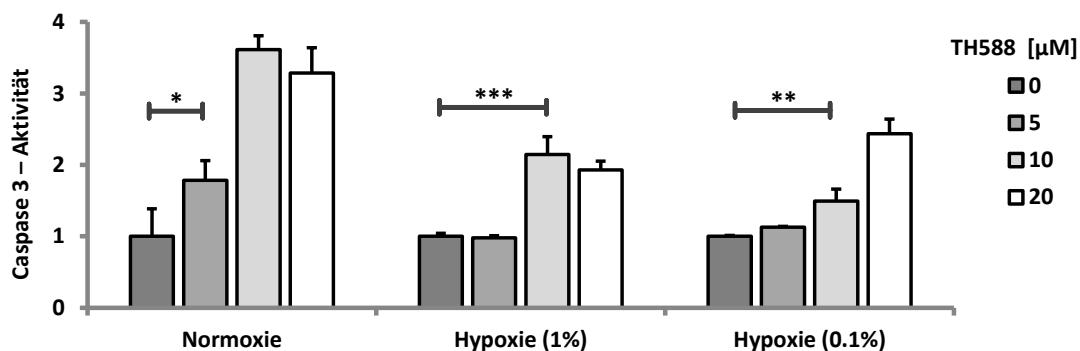


Abbildung 17: Caspase 3-Aktivität in HCT116 bei 21, 1 und 0,1 % Luftsauerstoff. Die Proteinlysate wurden 72 Stunden nach Behandlung der Zellen erzeugt. Die Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle in jeder Gruppe normiert, um den Effekt der TH588-Behandlung hervorzuheben. Jede Gruppe wurde auf die jeweils unbehandelte Kontrolle normiert. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SD.

3.2.3 Visualisierung von 8-oxo-dGTP nach TH588-Behandlung

Färbung von 8-oxo-dGTP mit Avidin

In der Literatur ist beschrieben, dass Avidin spezifisch an das Nukleotid 8-oxo-dGTP, das Substrat von MTH1, bindet (Gad et al., 2014). Wenn Avidin mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist (Alexa Fluor 488), sollte 8-oxo-dGTP fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden können. Wie in Abbildung 18 dargestellt, konnten die Zellkerne und das darin enthaltene Heterochromatin in der unbehandelten Kontrolle deutlich durch die Färbung mit Hoechst 33342 dargestellt werden. Es zeigte sich ein dichter und gleichmäßiger Zellrasen. Ebenso war eine kräftige Grünfärbung durch das Alexa 488-konjugierte Avidin in den Zellen sichtbar, welches hauptsächlich im Zytosol, insbesondere perinukleär lokalisiert war. Bei den mit TH588 behandelten Zellen war kein dichter Zellrasen mehr vorhanden. Zudem änderte sich die Zellmorphologie nach Behandlung, denn die Zellen wiesen weniger lange Ausläufer auf. Während bei einer Konzentration von 5 μM die Zellen noch weitgehend denen der Kontrolle ähnelten, war bei 10 und 20 μM eine deutliche Kernpyknose sichtbar. Diese kann möglicherweise als Zeichen der fortschreitenden Apoptose gewertet werden. Weiterhin konnte eine eindruckliche Zunahme der Intensität der Grünfärbung nach TH588-Behandlung ab einer Konzentration von 10 μM beobachtet werden. Korrelierend mit dem Avidin-Gehalt scheint auf den ersten Blick der 8-oxo-dGTP-Gehalt in den Krebszellen durch die TH588-Behandlung zuzunehmen.

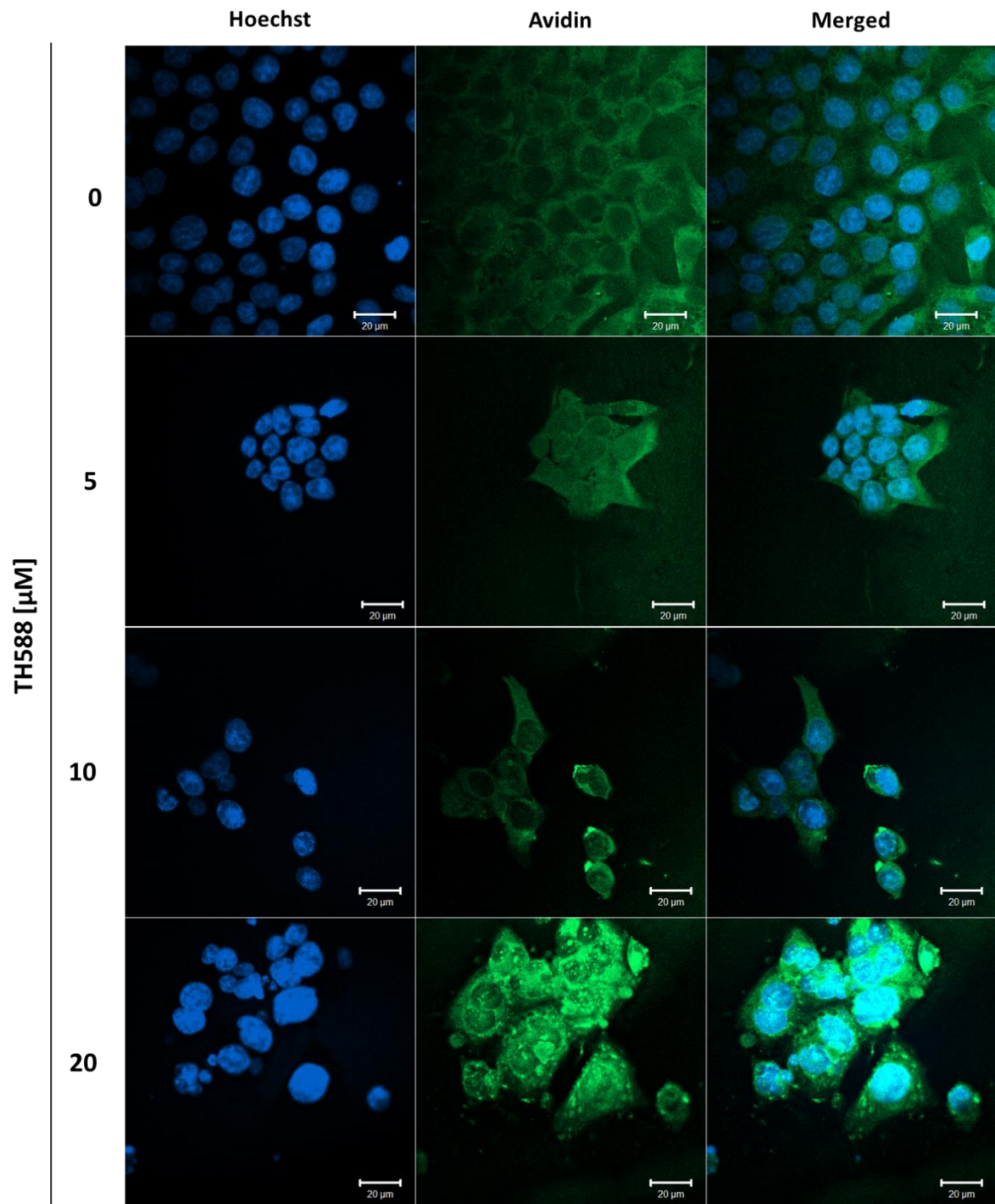


Abbildung 18: Lokalisation von 8-oxo-dGTP in HCT116 nach TH588-Behandlung. Die Zellen wurden für die Darstellung von 8-oxo-dGTP mit Alexa 488-konjugiertem Avidin inkubiert (grün) und die Zellkerne durch Hoechst 33342 eingefärbt (blau). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop erzeugt. Die Markierung umfasst 20 μm .

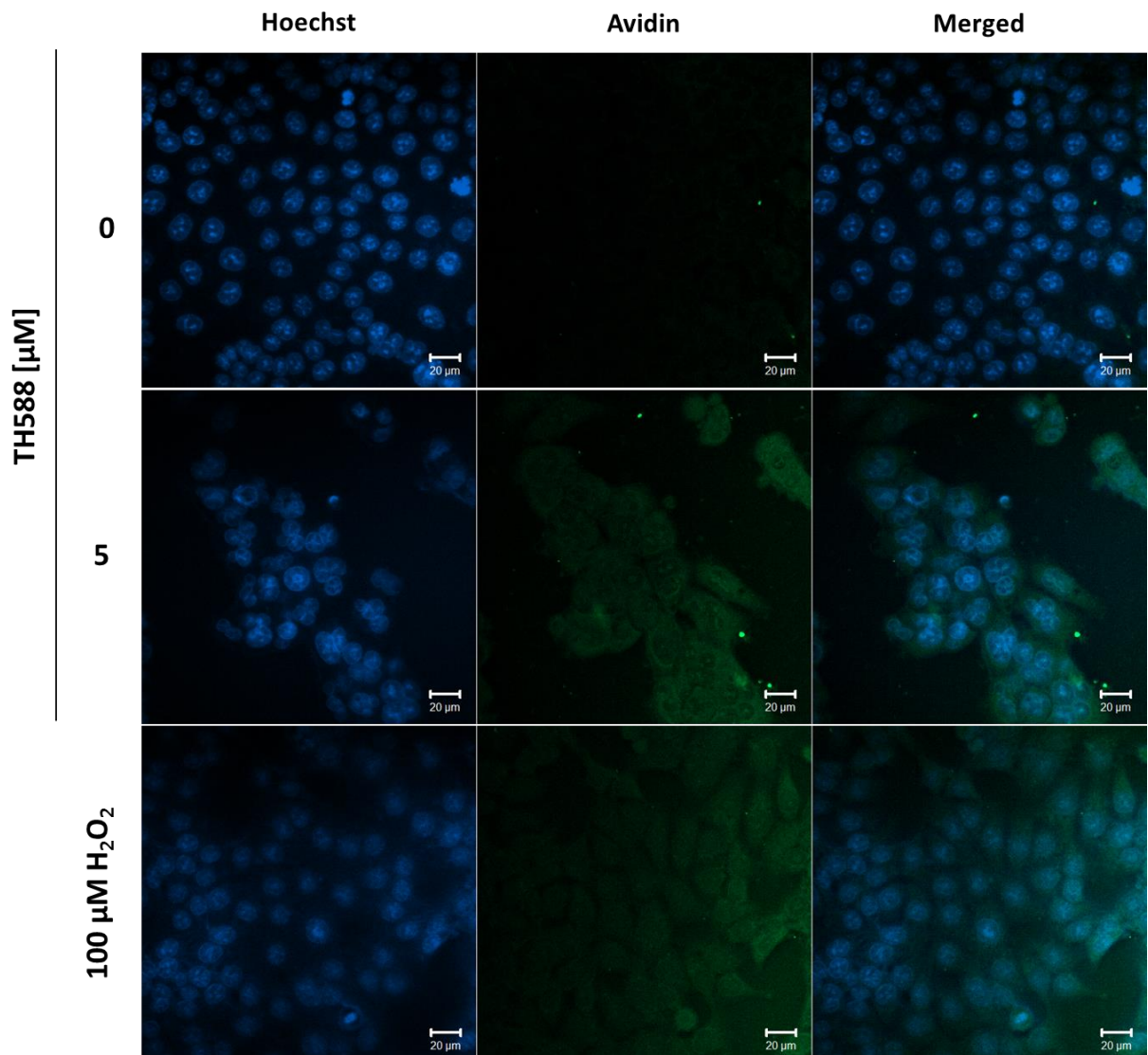


Abbildung 19: Lokalisation von 8-oxo-dGTP in HCT116 nach Behandlung mit TH588 und Wasserstoffperoxid. Die Zellen wurden für die Darstellung von 8-oxo-dGTP mit Alexa 488-konjugiertem Avidin inkubiert (grün) und die Zellkerne durch Hoechst 33342 eingefärbt (blau). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop erzeugt. Die Markierung umfasst 20 μm.

In einem weiteren Versuch (Abbildung 19) wurden als Positivkontrolle mit Wasserstoffperoxid behandelte Zellen betrachtet. Hierfür wurde eine Probe 10–20 Minuten vor Beginn des Fixationsprozesses mit 100 μM H_2O_2 inkubiert. H_2O_2 oxidiert DNA und freie Nukleotide. Somit sollte auch 8-oxo-dGTP ansteigen. Allerdings war kein eindeutiger Anstieg unter H_2O_2 nachweisbar.

Abbildung 20 zeigt den Vergleich zwischen Normoxie und Hypoxie der Avidin-gefärbten, TH588-behandelten Zellen. Betrachtet man Zellen, die während der Behandlung mit TH588 in Hypoxie bei 1 % Sauerstoff inkubiert wurden, so waren, wie in Normoxie, Kernpyknosen und apoptotische Einschlusskörperchen sichtbar. Ebenfalls war auch hier eine Zunahme der Intensität der Grünfärbung und damit auch der 8-oxo-dGTP-Konzentration nach Behandlung zu beobachten. Entweder wird das oxidierte Nukleotid unabhängig vom Sauerstoffgehalt produziert oder die Färbung weist einen hohen unspezifischen Hintergrund auf.

Weitere Versuche in dieser Reihe waren sehr heterogen, so dass insgesamt von methodischen Problemen ausgegangen werden muss. Folglich bindet Avidin möglicherweise nicht spezifisch an 8-oxo-dGTP und lässt somit keinen eindeutigen Schluss über den Gehalt des oxidierten Nukleotides in der Zelle zu.

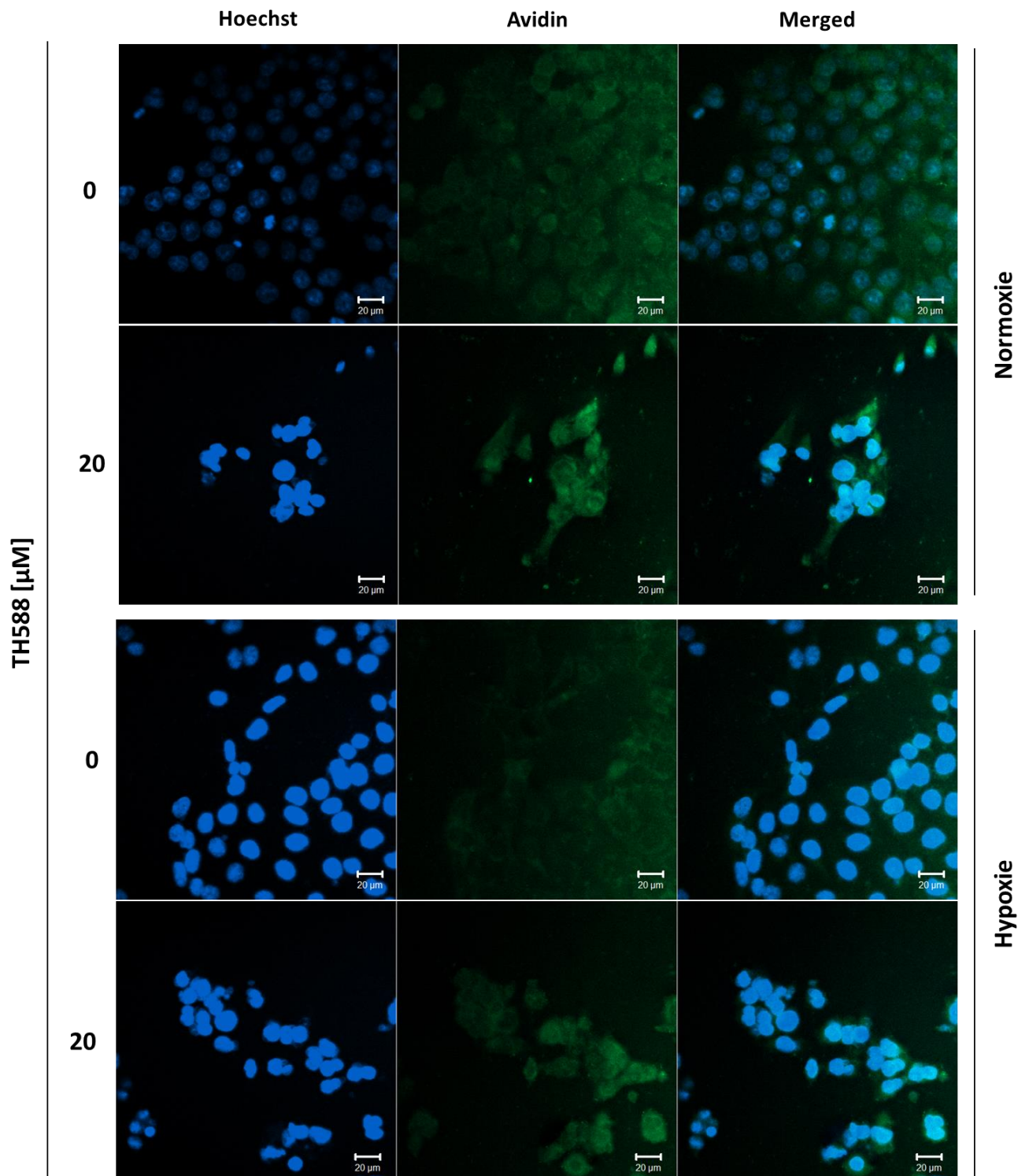


Abbildung 20: Lokalisation von 8-oxo-dGTP in Normoxie und Hypoxie. Die Zellen wurden für die Darstellung von 8-oxo-dGTP mit Alexa 488-konjugiertem Avidin inkubiert (grün) und die Zellkerne durch Hoechst 33342 eingefärbt (blau). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop erzeugt. Die Markierung umfasst 20 μm.

Färbung von 8-oxo-dGTP durch Antikörper

Vergleichend mit Avidin wurde ein Antikörper von GeneTex (GTX41080) für die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von 8-oxo-dGTP verwendet, wie in Abbildung 21 gezeigt. Dabei konnte kein Unterschied zwischen der unbehandelten Probe und der Positivkontrolle mit 100 μM H_2O_2 nachgewiesen werden.

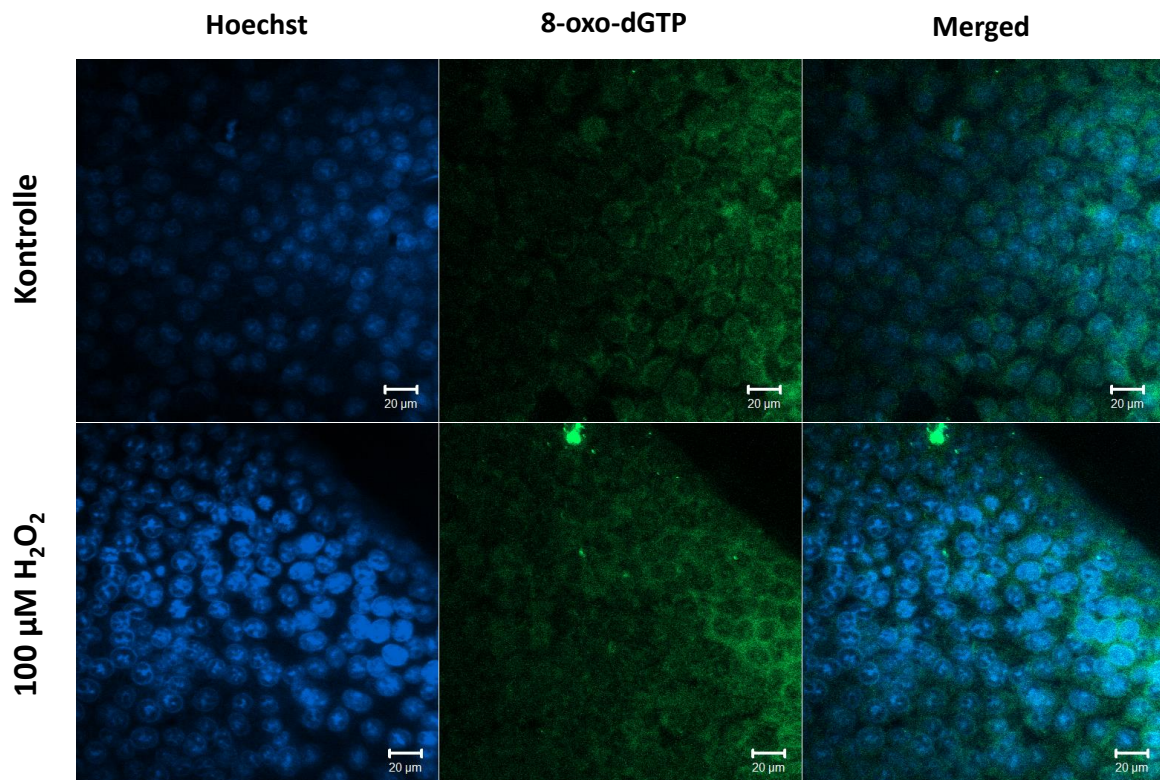


Abbildung 21: Färbung von 8-oxo-dGTP in HCT116. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau) und 8-oxo-dGTP wurde mit einem Antikörper von GeneTex markiert, bevor die Zellen mit einem Alexa 488-konjugierten Zweitantikörper behandelt wurden (grün). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop erzeugt. Die Markierung umfasst 20 μm .

Schließlich wurde eine weitere fluoreszenzmikroskopische Färbung mit einem Antikörper von Abcam (Ab48508) durchgeführt. Als Positivkontrolle diente hierbei Luperox®, ein stabileres Wasserstoffperoxidderivat. Zudem wurde eine Negativkontrolle in Form von L-Cystein verwendet. Dieses Reduktionsmittel verhindert die Oxidation der Nukleotide und sollte somit zu einem verminderten Signal führen. Bei der Interpretation von Abbildung 23 wird deutlich, dass zwar keine Unterschiede zwischen den unbehandelten und den mit TH588 behandelten Proben bestanden, jedoch in Hypoxie insgesamt deutlich weniger Signal vorhanden war. Da in

Hypoxie weniger Sauerstoff und somit auch weniger Sauerstoffradikale vorhanden sein sollten, erscheint dieses Ergebnis zunächst sinnvoll. Betrachtet man nun jedoch die Kontrollen (Abbildung 22), so fällt auf, dass unter Einfluss des Oxidationsmittels Luperox® deutlich weniger Signal detektiert werden konnte, als nach Einsatz des Reduktionsmittels L-Cystein. Sowohl Avidin als auch die Antikörper scheinen nicht spezifisch genug an das oxidierte Nukleotid zu binden oder die Methode zum Anfärben desselben ist nicht korrekt durchgeführt worden. Somit sind auch die Erkenntnisse aus dieser Versuchsreihe fraglich und erbringen keine definitive Aussage über die Lokalisation von 8-oxo-dGTP und die Wirkung von TH588 auf das 8-oxo-dGTP-Level in der Zelle.

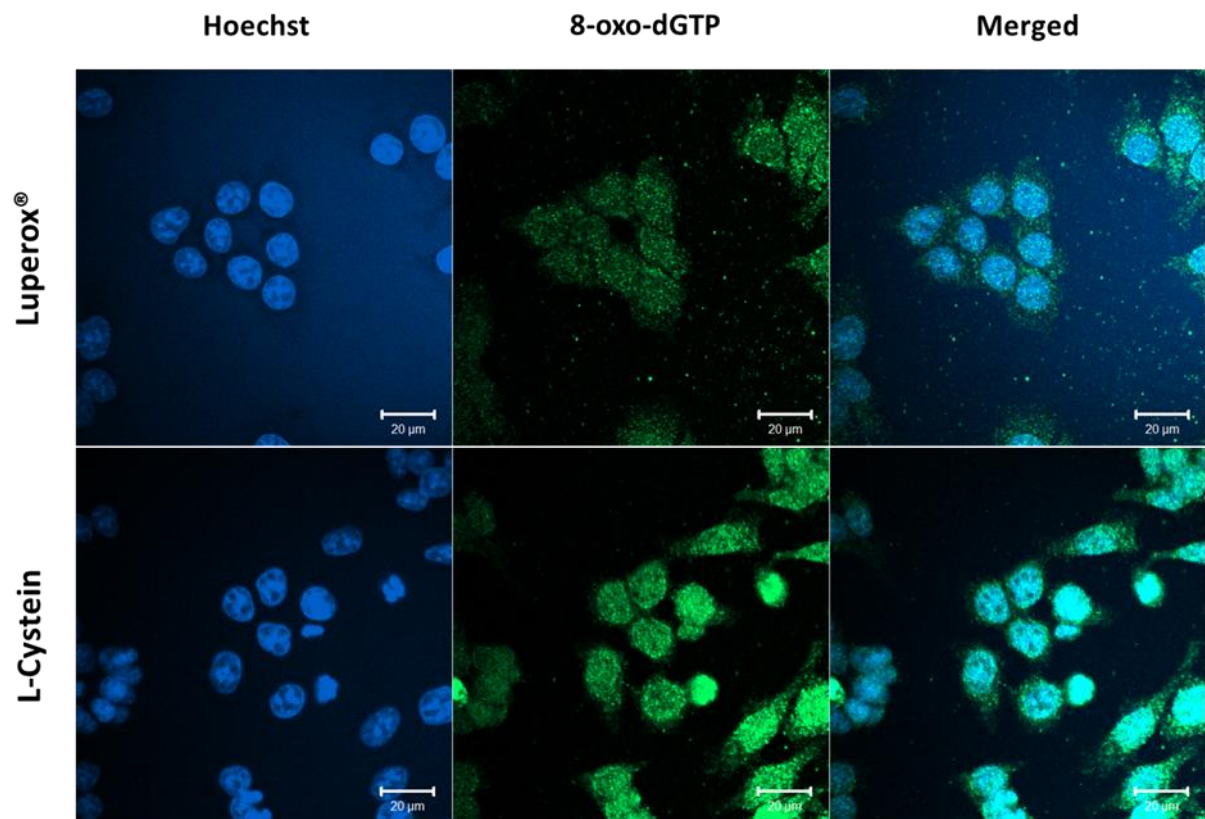


Abbildung 22: Lokalisation von 8-oxo-dGTP in HCT116 nach Behandlung mit Luperox® oder L-Cystein. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau) und 8-oxo-dGTP wurde mit einem Antikörper von Abcam markiert, bevor die Zellen mit einem Alexa 488-konjugierten Zweitantikörper behandelt wurden (grün). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop erzeugt. Die Markierung umfasst 20 µm.

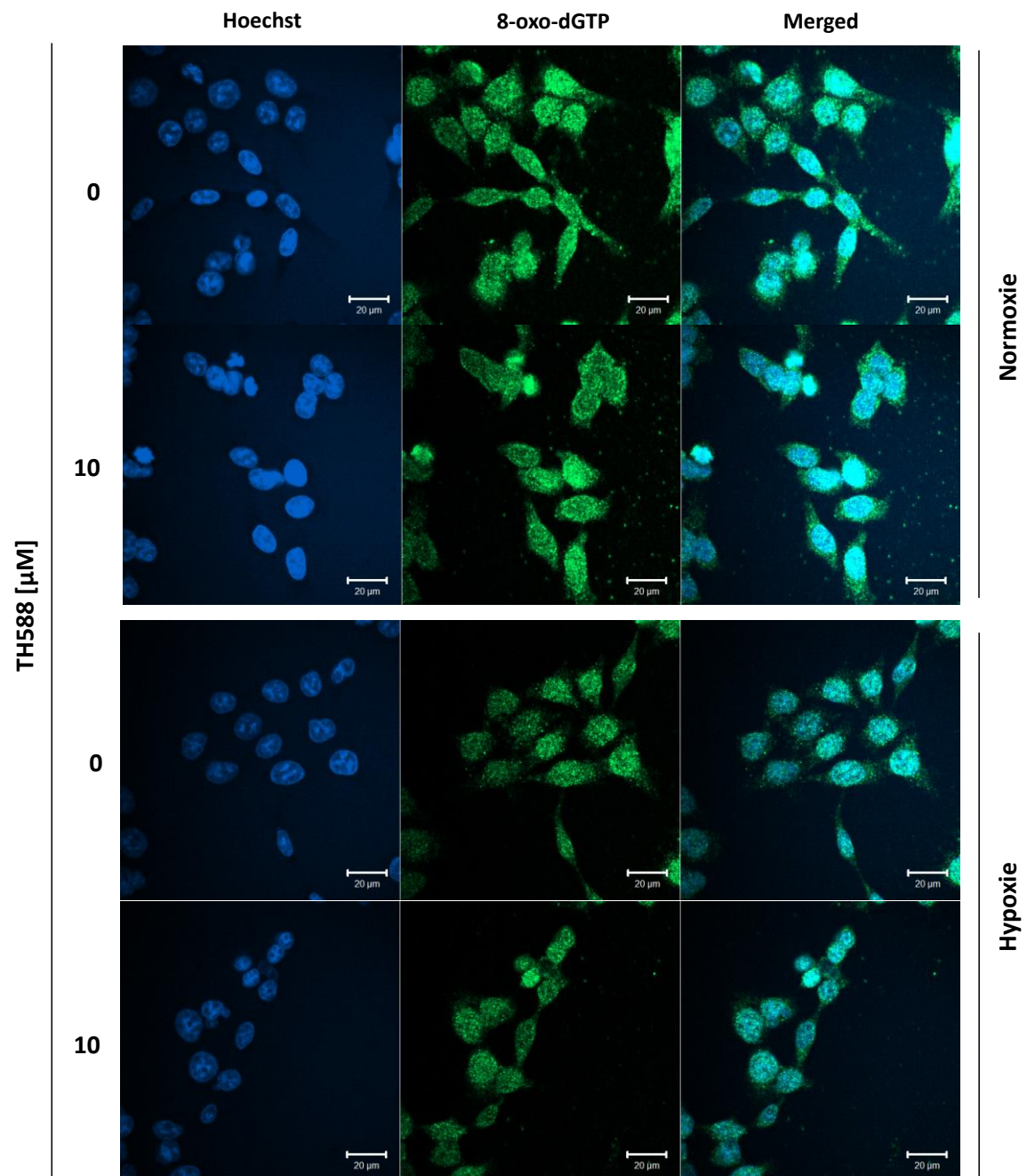


Abbildung 23: Lokalisation von 8-oxo-dGTP in HCT116 in Normoxie und Hypoxie. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau) und 8-oxo-dGTP wurde mit einem Antikörper von Abcam markiert, bevor die Zellen mit einem Alexa 488-konjugierten Zweitantikörper behandelt wurden (grün). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop erzeugt. Die Markierung umfasst 20 μm.

Visualisierung von 8-oxo-G nach MTH1-Knockdown

Neben mit TH588 behandelten Zellen wurden auch MTH1-Knockdown-Zellen (siehe Kapitel 3.3) durch Alexa 488-konjugiertes Avidin bzw. einen Antikörper von *GeneTex* angefärbt, um 8-oxo-G zu visualisieren. Dabei wurde Avidin in HCT116 verwendet (Abbildung 24) und der Antikörper in SW480 (Abbildung 25) genutzt. Als Kontrolle wurde in beiden Zelllinien eine Probe mit Produktion ungerichteter shRNA nach Doxycyclin-Zugabe gefärbt (*Non-target*). In beiden Zelllinien war ein dichter und gleichmäßiger Zellrasen sichtbar, wie die Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 verdeutlicht. Bei der Betrachtung der Grünintensität waren weder in der Avidin- noch in der Antikörperfärbung Unterschiede zwischen Kontrolle und *Knockdown* nachweisbar.

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik in Hinsicht auf Kontrollen und fehlende Konsistenz des Ergebnisses bei Wiederholungen muss die Methodik insgesamt als unzuverlässig eingestuft werden und lässt auch nach *Knockdown* keine sicheren Schlüsse über das 8-oxo-G-Level der Zelle zu.

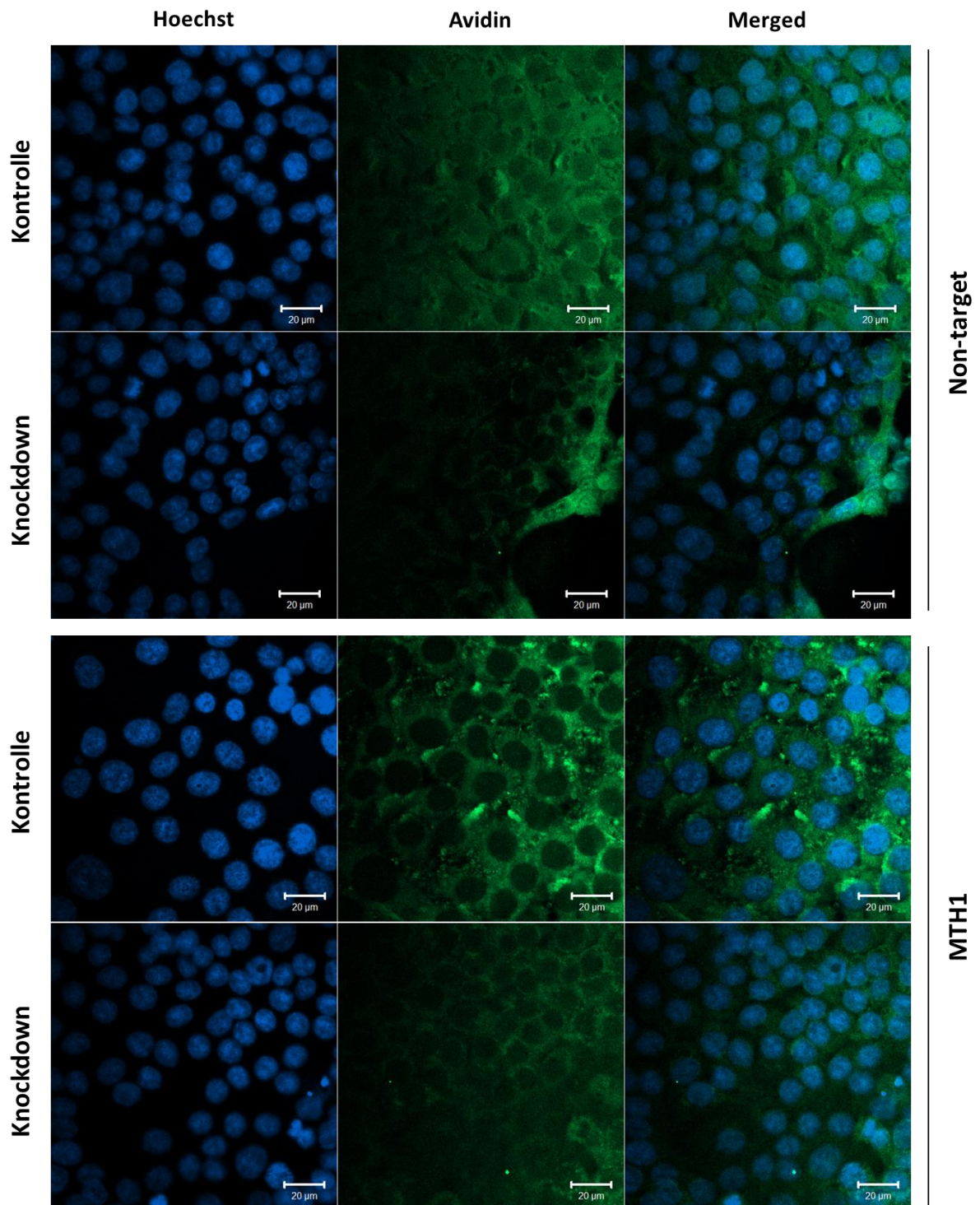


Abbildung 24: Avidin-Färbung in HCT116 nach MTH1-Knockdown. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau) und mit Alexa 488-konjugiertem Avidin inkubiert (grün). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop erzeugt. Die Markierung entspricht 20 μ M.

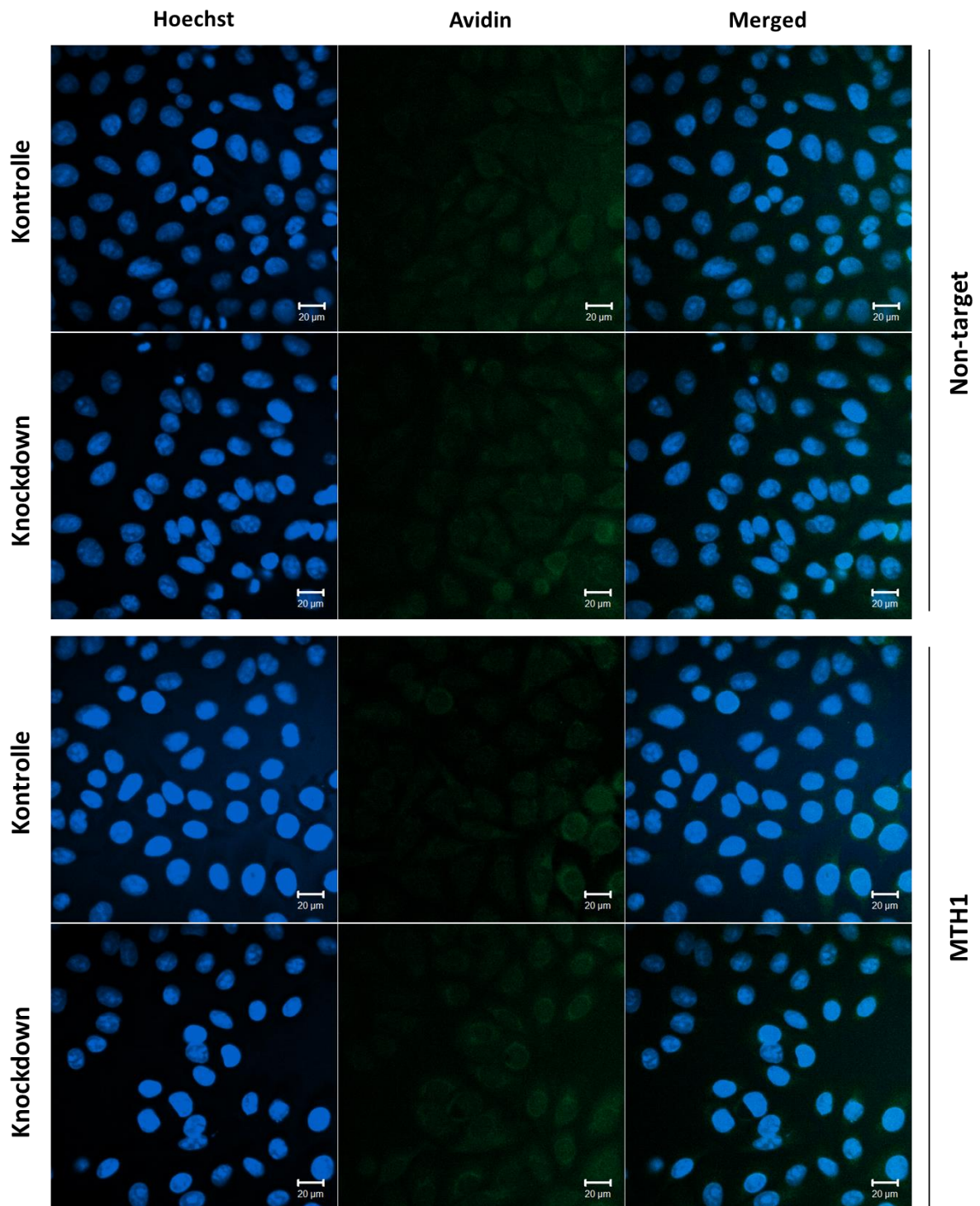


Abbildung 25: Visualisierung von 8-oxo-dGTP in SW480 nach MTH1-Knockdown. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau) und 8-oxo-dGTP wurde mit einem Antikörper von GeneTex markiert, bevor die Zellen mit einem Alexa 488-konjugierten Zweitantikörper behandelt wurden (grün). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop erzeugt. Die Markierung entspricht 20 µM.

3.2.4 MTH1-Expression in Hypoxie

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, wirkt die Behandlung von Tumorzellen mit TH588 auch in Hypoxie. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Frage, ob die MTH1-Expression durch den Sauerstoffpartialdruck reguliert wird. In Abbildung 26 ist die Expression von MTH1 in Hypoxie auf Proteinebene dargestellt. Sowohl in Hypoxie, als auch nach Inkubation mit der HIF-induzierenden Substanz Dimethyloxalylglycin (DMOG) wurde ein Anstieg von MTH1 um weniger als den Faktor 2 detektiert. HIF-1 α diente als Kontrolle für die hypoxischen Bedingungen und war sowohl in den hypoxischen Proben als auch nach Behandlung mit 1 mM DMOG deutlich verstärkt exprimiert. Da HIF ein wichtiger Modulator der Zelle im Zusammenhang mit Hypoxie ist und eine geringe Induktion von MTH1 in Hypoxie gezeigt werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass die Expression von MTH1 von HIF abhängt.

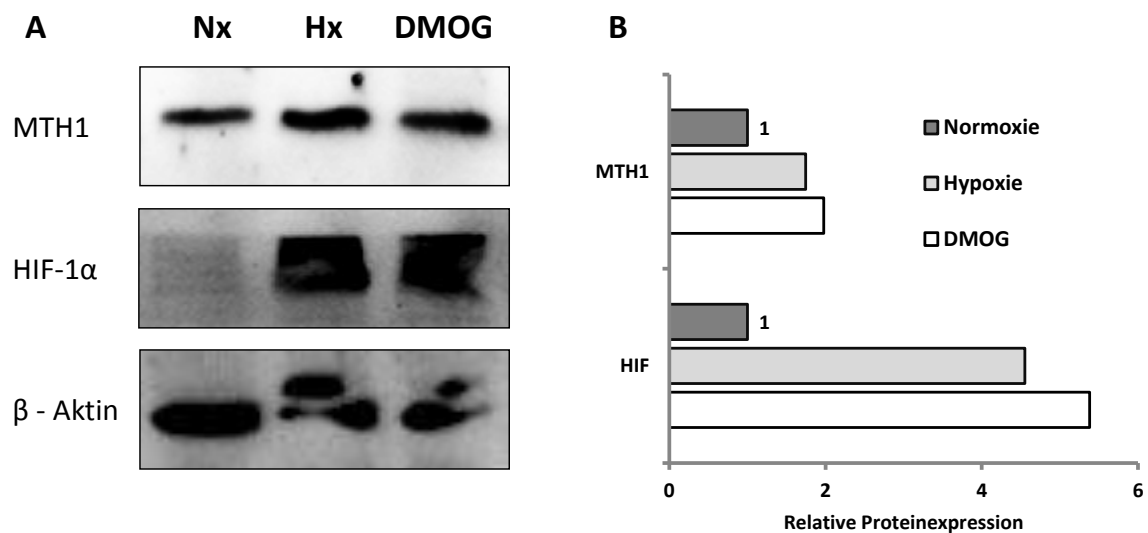


Abbildung 26: Einfluss von Hypoxie auf die MTH1-Expression. (A) *Western Blot* von MTH1 in Normoxie, Hypoxie und mit DMOG in HCT116. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Gel mit 10 % Polyacrylamid-Anteil. Die Behandlung mit 1 mM DMOG und die Detektion von HIF-1 α dienen als Hypoxie-Kontrolle. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin genutzt. Die Zellysate wurden nach 6-stündiger Inkubation in Hypoxie bzw. 6 Stunden nach Behandlung mit DMOG hergestellt. (B) Gezeigt ist die Quantifizierung von A. Densitometrisch bestimmtes MTH1- bzw. HIF-1 α -Protein in Relation zu β -Aktin. Die Graphen sind normiert auf das relative Verhältnis des detektierten Proteins zu β -Aktin in Normoxie.

3.2.5 HIF-Expression nach TH588-Behandlung

HIF-1 α im *Western Blot*

Der Hypoxie-induzierbare Faktor ist ein Transkriptionsfaktor, der maßgeblich an der Antwort des Organismus auf eine Verminderung der Sauerstoffversorgung beteiligt ist. Da der Einsatz von TH588 offenbar auch in Hypoxie eine kanzerotoxische Wirkung erzielt, stellt sich die Frage, ob sich die Behandlung mit TH588 auch auf die HIF-Expression auswirkt. Abbildung 27 zeigt die Expression von HIF-1 α in HCT116 72 Stunden nach Behandlung mit TH588 in unterschiedlicher Konzentration. Als Ladekontrolle diente HIF-1 β , das konstitutiv exprimiert wird. In Abbildung 27 ist eine deutliche HIF-1 α Bande bei der unbehandelten Probe in Hypoxie sichtbar. Als Positivkontrolle diente DMOG, das kompetitiv HIF-Prolyl-Hydroxylasen inhibiert und somit die Degradation der α -Einheit verhindert. Auch hier zeigte der *Western Blot* eine deutliche Hochregulation von HIF-1 α . Bei den Proben, die unter normalen Sauerstoffbedingungen kultiviert wurden, war kein bzw. kaum HIF-1 α nachweisbar (während HIF-1 β wie erwartet konstitutiv exprimiert wurde). Setzt man die Expression von HIF-1 α in Relation zu HIF-1 β und normiert alle so erhaltenen Werte für jede Probe auf die unbehandelte Kontrolle bei Normoxie, wird deutlich, dass die Behandlung mit TH588 in Normoxie kaum Unterschiede in der HIF-Expression erzeugte. In Hypoxie hingegen zeigte sich ein auffälliger konzentrationsabhängiger Verlust von HIF-1 α durch die Behandlung mit TH588. So wurde durch die Behandlung mit 5 μ M TH588 eine Reduktion des Signals um 50 % erwirkt. Eine weitere Dosissteigerung verstärkte diesen Effekt, so dass bei 10 μ M weniger als 25 % des HIF-1 α nachweisbar waren und bei 20 μ M die Menge der geringen Expression in Normoxie entspricht.

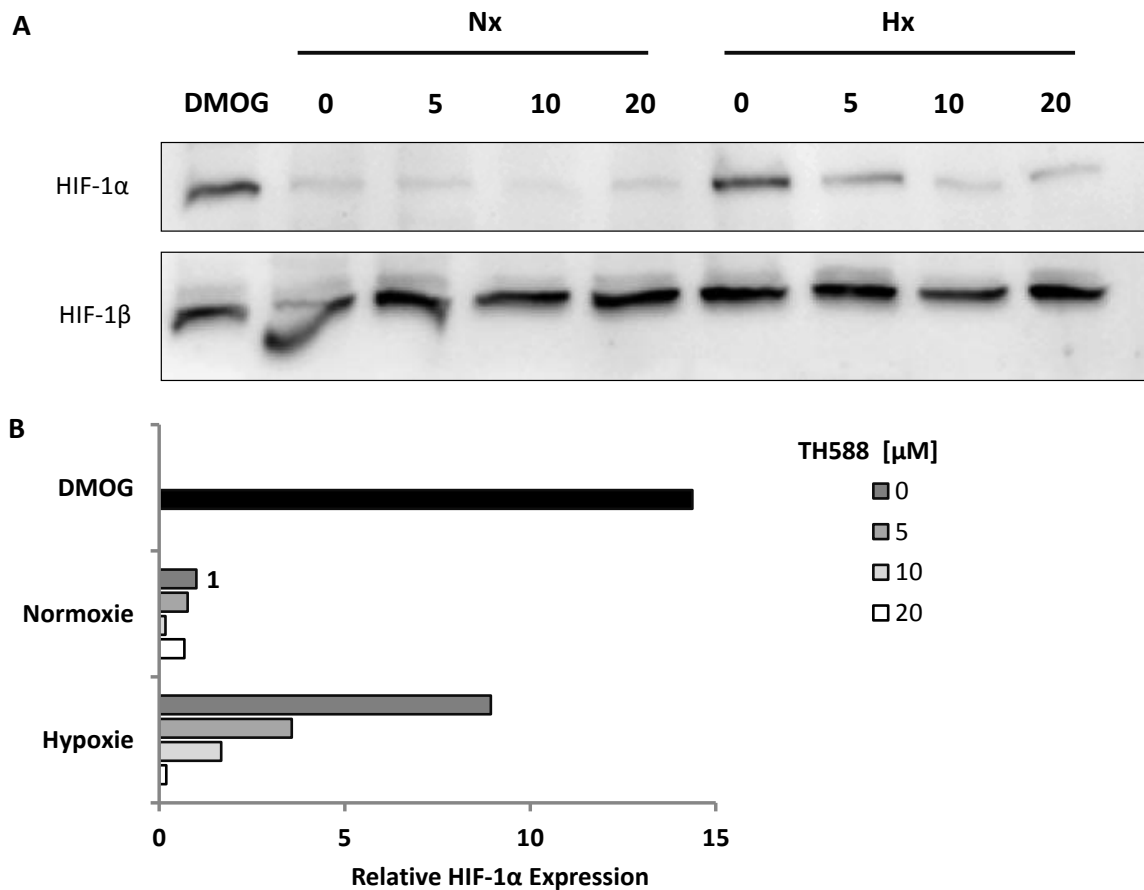


Abbildung 27: HIF-Expression im *Western Blot* nach TH588-Behandlung in Normoxie und Hypoxie. (A) Die Auftrennung der HCT116 und Isolation der Proteine erfolgte 72 Stunden nach Behandlung. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Gel mit 7 % Polyacrylamid-Anteil. DMOG wurde in einer Konzentration von 1 mM als Positivkontrolle verwendet. (B) Die Quantifizierung von A zeigt die HIF-1 α Expression in HCT116 in Relation zu HIF-1 β . Die Graphen sind normiert auf die unbehandelte Kontrolle in Normoxie.

Luciferase-Assay

Mithilfe des in Abbildung 28 dargestellten Luciferase-Assays konnten die Ergebnisse aus dem *Western Blot* verifiziert werden. In diesem Assay wurde ein Plasmid in HCT116-Zellen transfiziert, welches das Gen für das Enzym *Firefly-Luciferase* enthält. Diesem Gen ist ein Promotor vorgeschaltet, der ein *HIF-Responsive-Element* (HRE) enthält. Nur in Anwesenheit des stabilen HIF-1-Heterodimers wird das Gen abgelesen und die Luciferase exprimiert. Die Produktion der Luciferase und somit auch deren Aktivität korrelieren deshalb mit der Menge an stabilisiertem HIF. Wie auch im *Western Blot* war in Normoxie eine sehr geringe Menge stabilen HIFs exprimiert, die durch die TH588-Behandlung nur unwesentlich beeinflusst wurde. In Hypoxie hingegen war die HIF-Aktivität um mehr

als den Faktor 10 gesteigert. Dies äußerte sich in einer gesteigerten Aktivität der *Firefly*-Luciferase. Die relative Luciferase-Aktivität und damit auch das HIF-Level nahmen bei Behandlung mit TH588 konzentrationsabhängig ab. Jedoch ist zu beachten, dass die verminderte Expression von HIF einerseits statistisch nicht signifikant und andererseits geringer war als in Abbildung 27. In der Zusammenschau dieser beiden Ergebnisse ist also lediglich einer Tendenz zur Reduktion von HIF durch die TH588-Behandlung erkennbar.

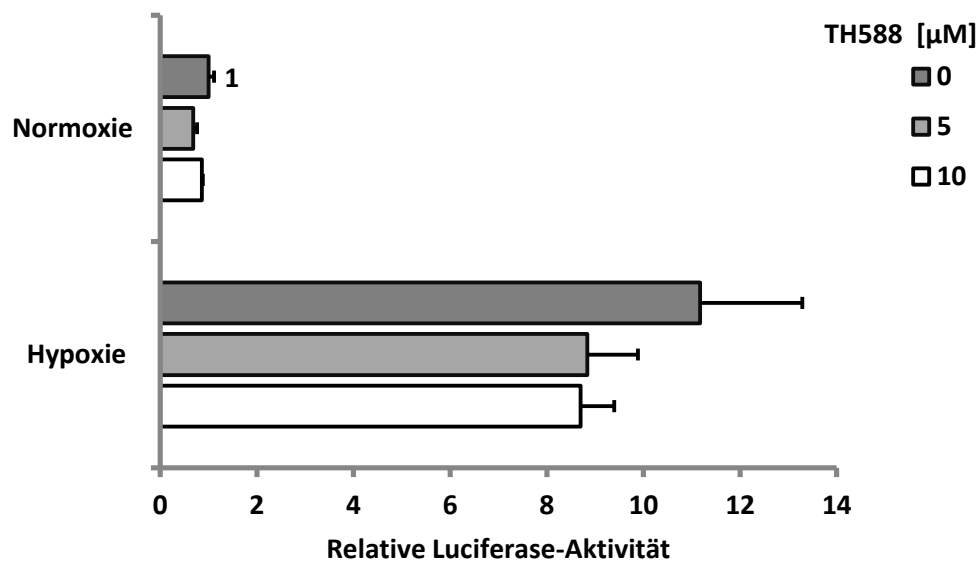


Abbildung 28: HIF-1 α Aktivität bestimmt mittels relativer Luciferase-Aktivität. *Firefly*-Luciferase-Plasmid mit HRE und Renilla-Luciferase-Plasmid in HCT116 co-transfiziert. Die Messung erfolgte 24 Stunden nach der Behandlung mit TH588. Dargestellt ist die Aktivität der HIF-abhängigen *Firefly*-Luciferase geteilt durch die Aktivität der konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase. Alle Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle in Normoxie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD.

3.2.6 Einfluss von TH588 auf die Antioxidans-Expression in Krebszellen

Unter der ursprünglichen Annahme, dass die kanzerotoxische Wirkung von TH588 auf der Hemmung von MTH1 beruht, welches wiederum Teil der antioxidativen Reaktion der Zelle auf Sauerstoffstress ist, ergibt sich die Frage, ob sich die Hemmung des Enzyms durch eine veränderte antioxidative Antwort der Zellen äußert. Mithilfe des Luciferase-Assays kann der Einfluss auf die Expression von antioxidativen Enzymen verdeutlicht werden, indem ein Plasmid in die Zelle eingebracht wird, welches das Gen für die *Firefly*-Luciferase mit einem *Antioxidant Response Element* (ARE)-Promotor enthält. Dieser ist auch vor Proteinen lokalisiert, deren Expression bei erhöhtem Sauerstoffstress gesteigert werden müssen und wird unter physiologischen Bedingungen durch den Transkriptionsfaktor *NF-E2 p45-related Factor 2* (NRF2) stimuliert. Mithilfe dieses Reporter-Gen-Assays kann deshalb die Aktivität der *Firefly*-Luciferase als Maß für den Sauerstoffstress der Zelle gewertet werden, durch den die Bildung bzw. Freisetzung von NRF2 stimuliert wird. Bei normalen Sauerstoffbedingungen (21 % Sauerstoff) war ein Anstieg der Luciferase-Aktivität nach TH588-Behandlung messbar (Abbildung 29). Bei 10 μM stieg die Aktivität um den Faktor 1,5, bei 20 μM verdoppelte sie sich sogar. In Hypoxie war dieselbe Tendenz erkennbar, jedoch war der Anstieg geringer als in Normoxie. Somit scheint der Einsatz von TH588 die Produktion von Redox-Stressoren in der Zelle zu fördern. Relativiert wird diese Annahme durch die Positivkontrolle, für die zusätzlich zu den Luciferase-Plasmiden ein Überexpressionsplasmid für NRF2 in die Zellen transfiziert wurde. Dieses resultiert in einer übermäßigen Bindung von NRF an den ARE-Promotor des *Firefly*-Luciferase-Gens. Der Einsatz des Überexpressionsplasmides steigerte die Aktivität der *Firefly*-Luciferase um ein Vielfaches (ca. Faktor 70).

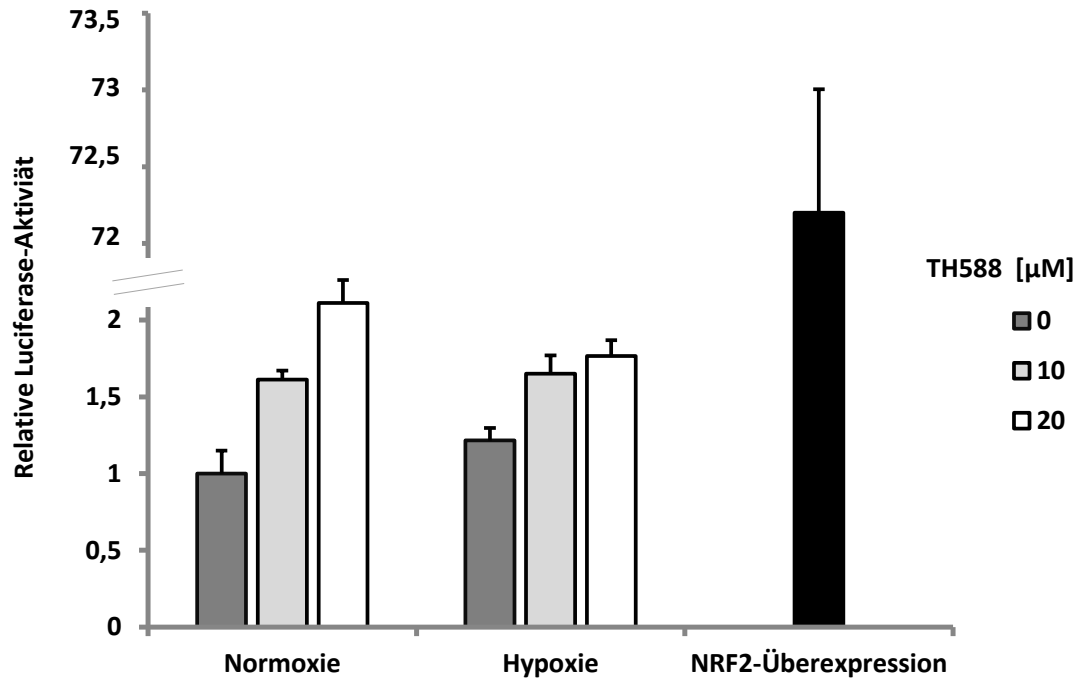


Abbildung 29: NRF2-Produktion in HCT116 nach Behandlung mit TH588 im Reporter-Gen-Assay. Das *Firefly*-Luciferase-Plasmid mit NRF2-Promotor und Renilla-Luciferase-Plasmid wurden in HCT116 transfiziert. Die Messung erfolgte 24 Stunden nach Behandlung mit TH588. Dargestellt ist die Aktivität der NRF2-abhängigen *Firefly*-Luciferase in Relation zur Aktivität der konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase. Alle Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle in Normoxie normiert. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich ein Überexpressionsplasmid für NRF2 transfiziert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD.

3.2.7 Strahlensensitivität von Tumorzellen in Hypoxie nach TH588-Behandlung

Das Langzeitüberleben von Tumorzellen nach TH588-Behandlung in Hypoxie wurde durch den *Colony Formation Assay* untersucht. Abbildung 30 zeigt exemplarisch einzelne *Wells* vor und nach der Behandlung bzw. Bestrahlung. Sichtbar waren einzelne Kolonien, die nach zytotoxischer Behandlung sowohl in Größe als auch Anzahl abnahmen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war das Wachstum der Kolonien deutlich eingeschränkt. Dabei fiel auf, dass die Reduktion der *Survival Fraction* durch geringe Konzentrationen TH588 (5 µM) in Hypoxie deutlich stärker war als in Normoxie. Während bei 21 % Sauerstoff die SF um 40 % reduziert wurde (wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben), konnte sie in Hypoxie um fast 80 % gesenkt werden (Abbildung 31, B). Eine den Untersuchungen bei Normoxie ähnliche Ausprägung (siehe Abbildung 15 in Kapitel 3.1.5) durch die Behandlung wurde durch Reduktion der Konzentration des Hemmstoffes auf 3 µM

erreicht (Abbildung 31, A), eine Konzentration, die in anderen Experimenten nicht in der Lage war, den Zelltod in HCT116 zu induzieren.

Auch wird in Abbildung 31 ersichtlich, dass eine Bestrahlung allein die Teilungsfähigkeit der Tumorzellen weniger beeinträchtigte, als es in Normoxie der Fall war. Dies ist Ausdruck der verminderten Strahlensensitivität in Hypoxie. Wie auch bei Normoxie lässt sich zudem eindeutig zeigen, dass die Fähigkeit der klonalen Expansion am stärksten durch die Kombination von TH588-Behandlung und Bestrahlung kompromittiert wurde. So konnte nach Bestrahlung mit 3 Gy die SF durch 5 μM TH588 auf ca. 9 % und durch 3 μM auf ca. 13 % gesenkt werden, während sie nach alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy noch 20–30 % betrug.

Während 5 μM oder 3 Gy allein die SF um jeweils 80 % reduzierte, konnte bei 3 Gy Strahlung die SF durch zusätzliche Behandlung mit 5 μM TH588 auf insgesamt 8,5 % gesenkt werden. Somit wirken Bestrahlung und Behandlung zwar synergistisch, jedoch kann nicht von einer Radiosensitivierung der Krebszellen durch die Behandlung wie bei Normoxie gesprochen werden. Dasselbe gilt für 3 μM TH588.

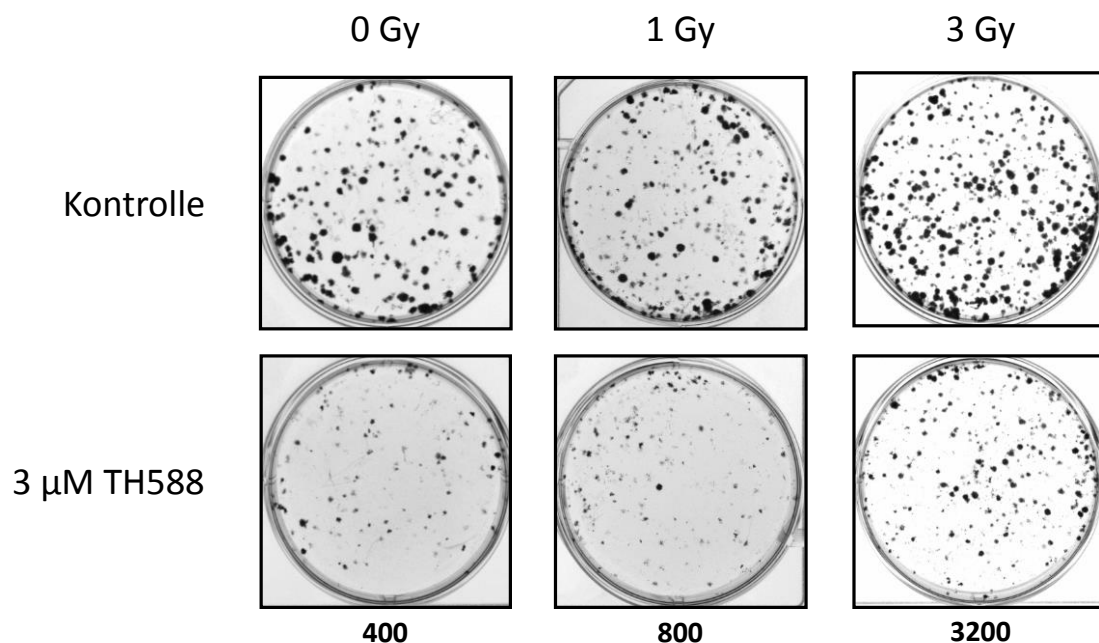


Abbildung 30: Colony Formation Assay in HCT116 nach Bestrahlung und TH588-Behandlung in Hypoxie. Dargestellt sind einzelne Wells von 6-well-plates, auf denen die Zellen ausplattiert wurden. Die Zahl der ausplattierten Zellen pro Well ist unter den Bildern angegeben.

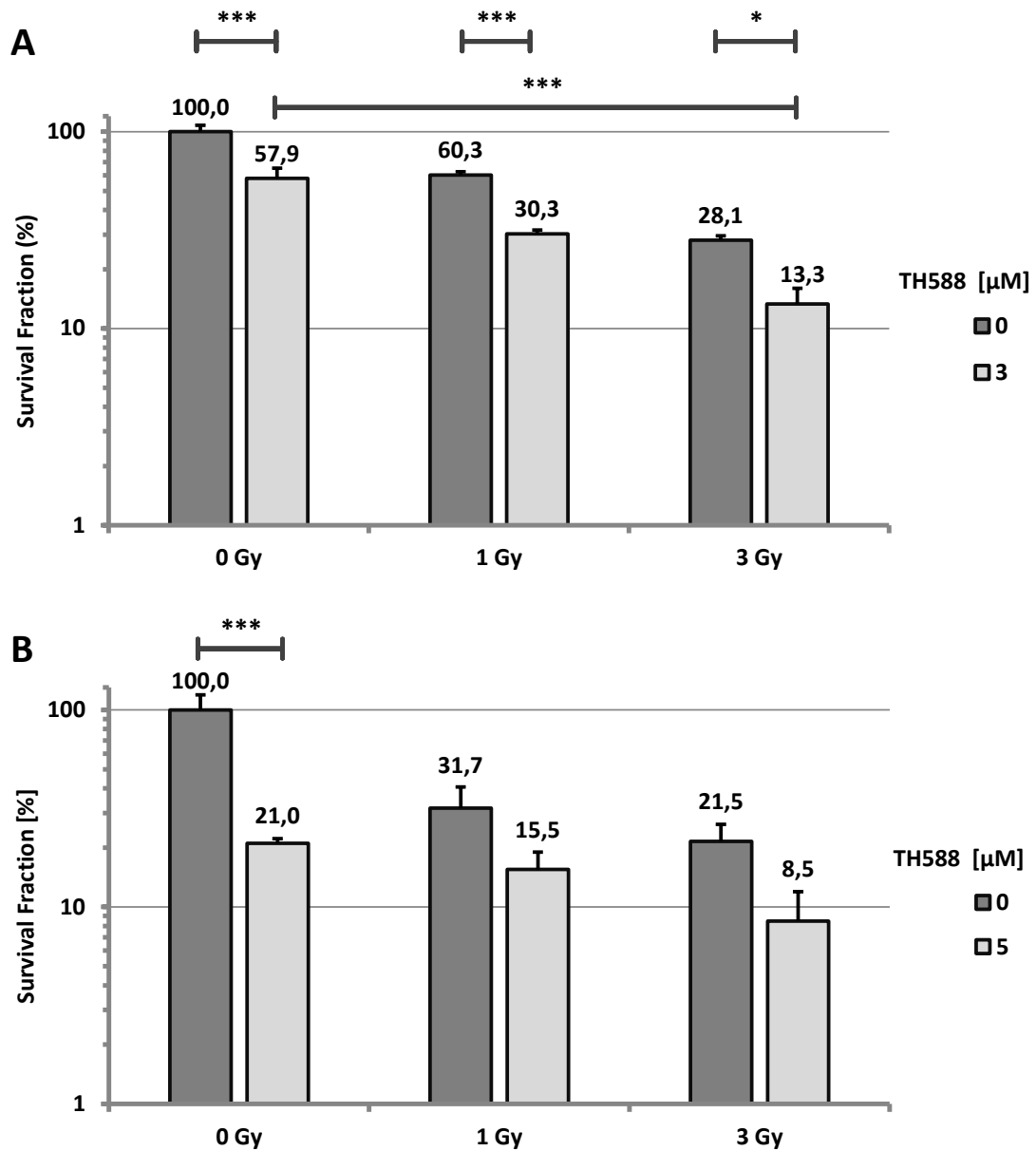


Abbildung 31: Langzeitüberleben von HCT116 nach Behandlung mit (A) 3 μM und (B) 5 μM TH588 in Hypoxie in Kombination mit Bestrahlung. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD.

3.3 MTH1-*Knockdown*

Neben chemischen Hemmstoffen ist der *Knockdown* von Proteinen eine weitere Möglichkeit, die Aktivität eines Enzymes *in vitro* zu vermindern. Hierbei wird ein DNA-Abschnitt in das Genom der Zelle integriert, welches für eine RNA mit Haarnadelstruktur codiert. Eine solche RNA wird als *small hairpin* RNA oder shRNA bezeichnet (im Folgenden auch mit „*Hairpin*“ abgekürzt). Diese shRNAs binden mit ihrer Haarnadelstruktur die mRNA eines Zielproteins, die daraufhin degradiert wird oder im Zytosol nicht mehr translatiert werden kann. Mithilfe von *Knockdowns* von MTH1 konnten die Effekte auf das Überleben von Krebszellen nach einer TH588-Behandlung verglichen und die Frage beantwortet werden, ob bzw. welche Krebszellen von MTH1 abhängig sind.

3.3.1 *Knockdown* von MTH1 in HCT116 und SW480

Durch lentivirale Transduktion wurden *Knockdowns* von MTH1 erzeugt. Dabei wurden initial zwei verschiedene Hairpins (A und B) in HCT116 verwendet. Obwohl die *Knockdown*-Effizienz in beiden Fällen über 80 % betrug (Abbildung 32), konnte nicht der erwartete Phänotyp betrachtet werden, der sich durch die Behandlung mit TH588 einstellte. Deshalb wurde ein weiterer *Hairpin* (C) hinzugezogen, dessen Effekt auf SW480 bereits demonstriert wurde (Gad et al., 2014). Auch hier betrug die *Knockdown*-Effizienz ca. 75 %. Im Verlauf der Untersuchungen wurden zusätzlich die beiden *Hairpin*-Sequenzen, die bereits in HCT116 angewendet worden waren, in SW480 Zellen transduziert. Hier ergab sich bei *Hairpin* A eine Effizienz von lediglich etwa 25 %, während durch *Hairpin* B etwa zwei Drittel der Proteinexpression supprimiert werden konnte.

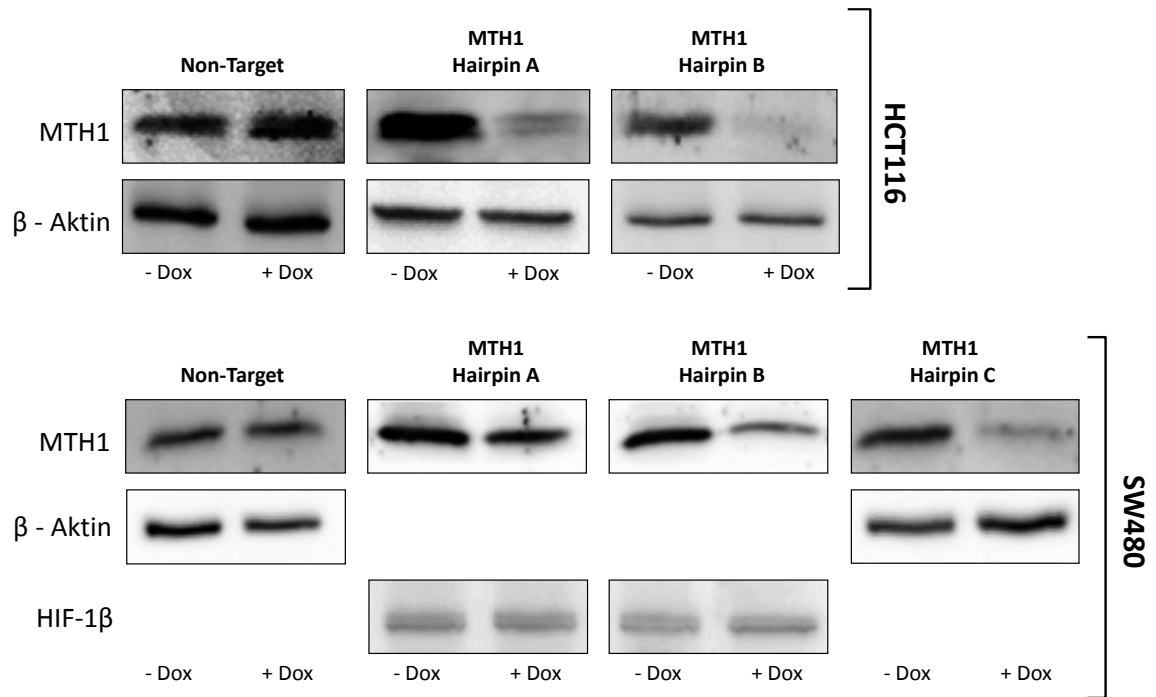
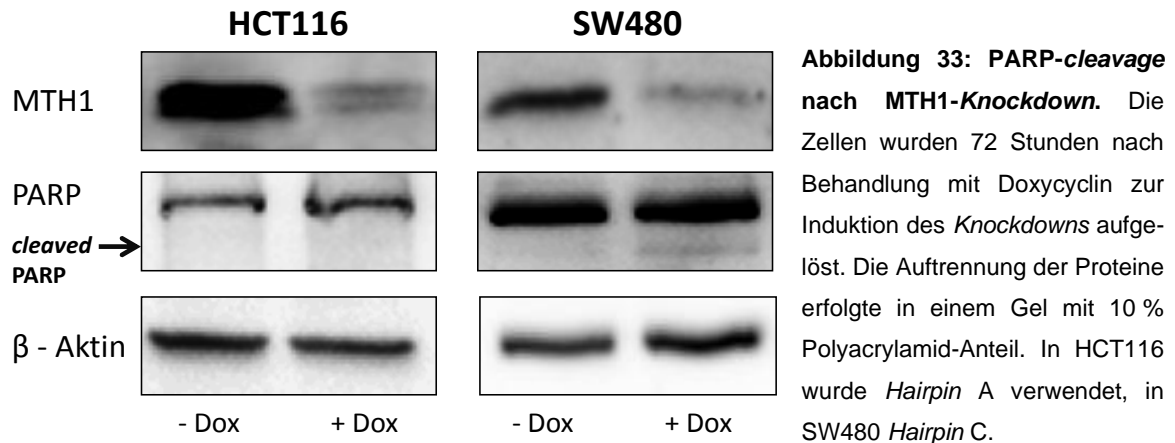


Abbildung 32: Knockdown von MTH1 in HCT116 und SW480. Die Zellen wurden 72 Stunden nach Behandlung mit Doxycyclin lysiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Gel mit 10 % Polyacrylamid-Anteil. β-Aktin und HIF-1β dienten als Ladekontrolle.

3.3.2 Zelltod nach MTH1-Knockdown

Im *Western Blot* war nach *Knockdown*-Induktion durch Doxycyclin keine PARP-*cleavage* in HCT116 sichtbar (Abbildung 33). In SW480 war eine schwache Bande sichtbar, die auf eine gering ausgeprägte Apoptose-Induktion schließen lässt. Im Vergleich dazu war nach TH588-Behandlung (10 μ M) eine deutliche Bande sichtbar (Abbildung 14).



Der Caspase 3-Assay spiegelt dieses Bild wider (Abbildung 34). Hier konnte durch keine der beiden *Hairpin*-Sequenzen ein Anstieg der Apoptose in HCT116 erzeugt werden. In SW480 war nur bei *Hairpin B* und *C* eine Zunahme der Caspase 3-Aktivität zu beobachten und nur bei *Hairpin C* war diese auch signifikant. Generell lag der relative Anstieg maximal bei Faktor 1,3 im Vergleich zur Kontrolle. Verglichen mit dem Anstieg um den Faktor 2 nach Behandlung mit 5 μ M TH588 (siehe Abbildung 10) ist diese Zunahme als gering zu bewerten.

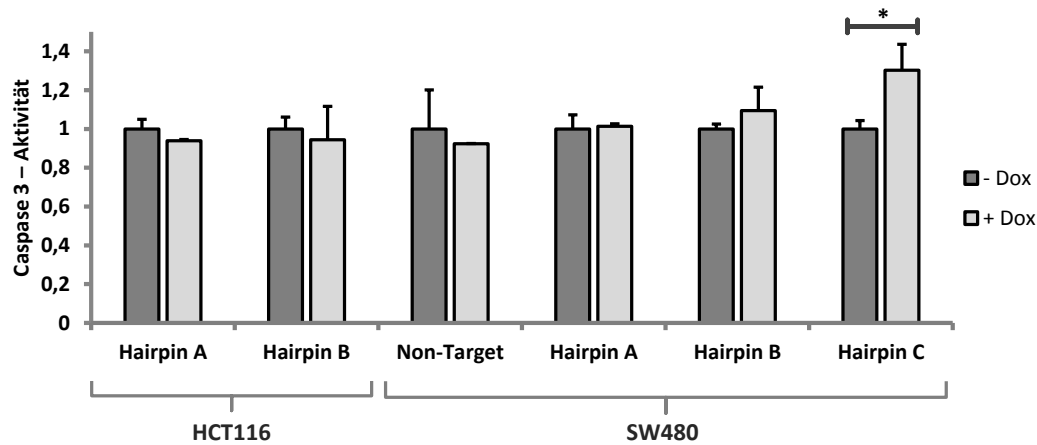


Abbildung 34: Caspase 3-Aktivität nach MTH1-Knockdown. Caspase 3-Aktivität wurde 72 Stunden nach der *Knockdown*-Induktion mit Doxycyclin in HCT116 und SW480 gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SD.

3.3.3 Einfluss des MTH1-Knockdowns auf die *Viability*

Die *Viability* wurde durch den *Knockdown* in beiden Zelllinien und durch alle verwendeten *Hairpins* gegen MTH1 vermindert. In HCT116 war die Ausprägung dieses Effektes jedoch gering. Abbildung 35 zeigt, dass die *Viability* dort um maximal 20 % reduziert wurde. Eine deutlichere Reduktion war in SW480 Zellen sichtbar. Hier wurde durch zwei von drei *Hairpins* eine signifikante und relevante Beeinträchtigung erzielt. Im Vergleich war der Effekt des *Knockdowns* hier etwa so groß wie der Effekt der TH588-Behandlung zwischen 5 und 10 μM Konzentration und lag bei maximal 50 %.

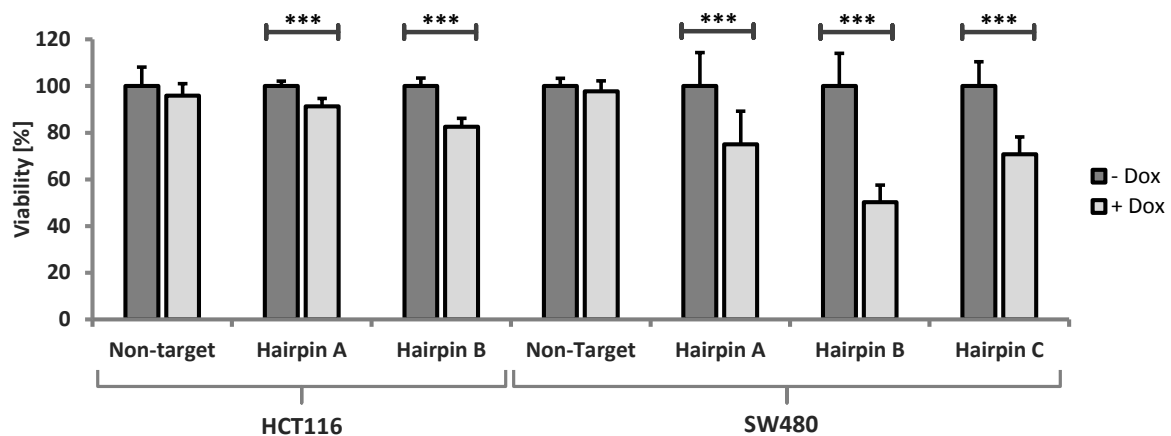


Abbildung 35: *Viability* nach MTH1-Knockdown. Die *Viability* wurde 72 Stunden nach *Knockdown*-Induktion mit Doxycyclin in HCT116 und SW480 gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SD.

3.3.4 Colony Formation Assay nach MTH1-Knockdown

Das Langzeitüberleben von Tumorzellen mit MTH1-Knockdown wurde durch den *Colony Formation Assay* bestimmt und ist in Abbildung 36 dargestellt. In HCT116 wurde die *Survival Fraction* durch keinen der verwendeten *Hairpins* signifikant beeinflusst. In SW480 hingegen erzeugte der *Knockdown* eine deutliche und signifikante Reduktion der SF. Diese variierte von unter 40 % bei *Hairpin A* (bei dem der *Knockdown* relativ schwach ausgeprägt ist) bis zu über 70 % bei *Hairpin C*. Damit übersteigt die Auswirkung des *Knockdowns* die Effektivität der TH588-Behandlung mit 5 μ M deutlich (siehe Abbildung 15, B).

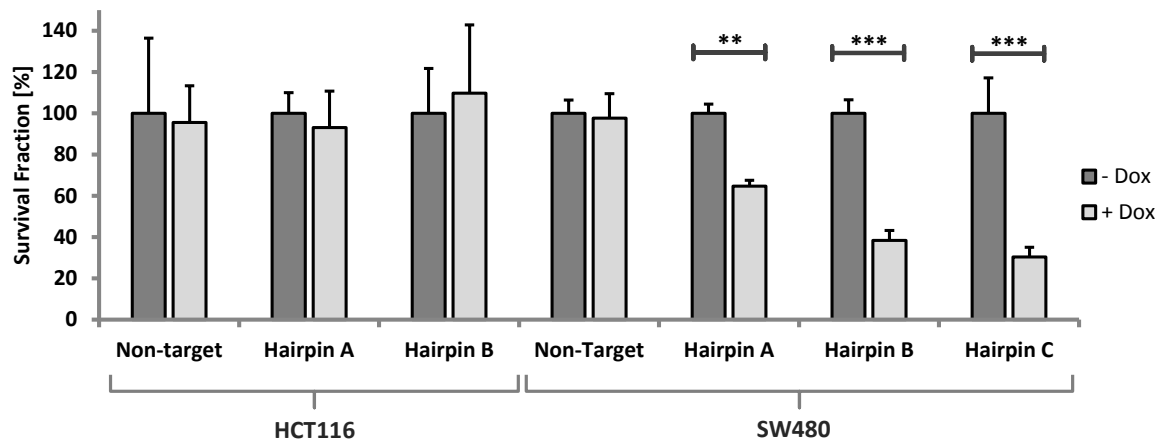


Abbildung 36: Colony Formation Assay nach MTH1-Knockdown. Die *Survival Fraction* wurde 10 Tage nach *Knockdown*-Induktion mit Doxycyclin in HCT116 und SW480 bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SD.

3.3.5 Kombination von *Knockdown* und Inhibitor

Um auszuschließen, dass die deutliche Zytotoxizität des Inhibitors durch eine vollständige Suppression von MTH1 bedingt ist, die jedoch bei *Knockdown* in HCT116 und SW480 ausbleibt, wurden diese Zellen zusätzlich zum *Knockdown* mit TH588 behandelt. Durch die Zugabe des Hemmstoffs in geringer Konzentration (5 μM) sollte die nach *Knockdown* noch vorhandene Restaktivität des Enzyms blockiert werden. Experimentell konnte die *Viability* durch diese Maßnahme nicht weiter supprimiert werden (Abbildung 37). Es wurde jeweils der *Hairpin* mit der höheren *Knockdown*-Effizienz genutzt (*Hairpin B* in HCT116, *Hairpin C* in SW480).

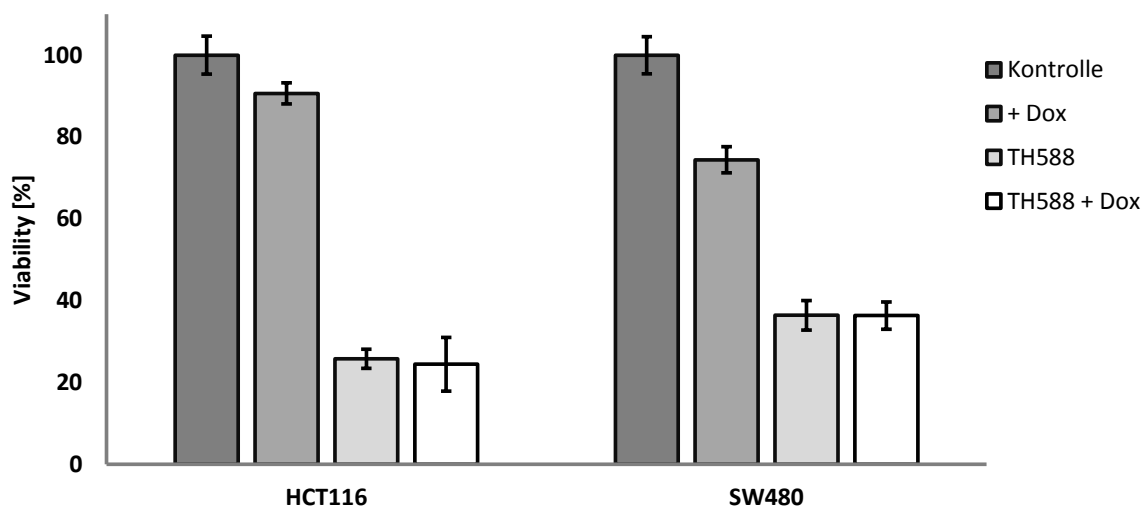


Abbildung 37: *Viability* nach *Knockdown* und TH588-Behandlung. Die *Viability* wurde 72 Stunden nach *Knockdown*-Induktion mit Doxycyclin und/oder Behandlung mit TH588 (5 μM) in HCT116 und SW480 gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SD.

3.4 TH588 in HUVEC

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) sind der Nabelschnur entnommene, venöse Endothelzellen. Sie dienen als *in vitro* Modell für gesunde Körperzellen, die keine Transformation im Sinne einer Tumorentwicklung durchlebt haben. Medikamente gegen Krebs haben häufig ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil. Zum Ausschluss zellschädigender Effekte auf Nicht-Krebszellen durch ein Medikament bieten sich die kultivierbaren HUVEC also an. Die Behandlung mit TH588 verminderte in HUVEC die *Viability* sowohl bei 8.000 pro *Well* ausplattierten Zellen (Abbildung 38, A), als auch bei 40.000 pro *Well* ausplattierten Zellen (Abbildung 38, B).

Bei 8.000 pro *Well* ausplattierten Zellen reduzierten bereits 5 μM die *Viability* um 50 %. Dieser Verlust der Stoffwechsellleistung wurde durch Konzentrationssteigerung auf 10 bzw. 20 μM intensiviert und war äquipotent zu der Behandlung mit 5-Fluorouracil (5-FU, Konzentration 1 mM). 5-FU ist ein Antimetabolit, der in der Krebstherapie Anwendung findet und sehr potent, aber auch nebenwirkungsreich ist. Als weitere Positivkontrolle wurde hier Triton X-100 verwendet, das die Plasmamembran der Zellen permeabilisiert und sie so durchgängig für die gemessenen Reduktionsäquivalente macht.

Bei 40.000 pro *Well* ausplattierten Zellen war die *Viability* bei einer Konzentration von 5 μM TH588 um etwa 40 % reduziert. Diese Effektivität konnte nicht durch eine Konzentrationssteigerung intensiviert werden. Während 8.000 pro *Well* ausplattierte Zellen subkonfluent sind und daher proliferieren, ist der Zellrasen bei 40.000 Zellen vollständig konfluent. Da Endothelzellen einer ausgeprägten Kontaktinhibition unterliegen, eignen sie sich unter diesen Bedingungen, um Effekte auf nicht proliferierende, nicht transformierte Zellen zu untersuchen und stellen somit ein physiologischeres Modell für das Verhalten von Nicht-Krebszellen dar.

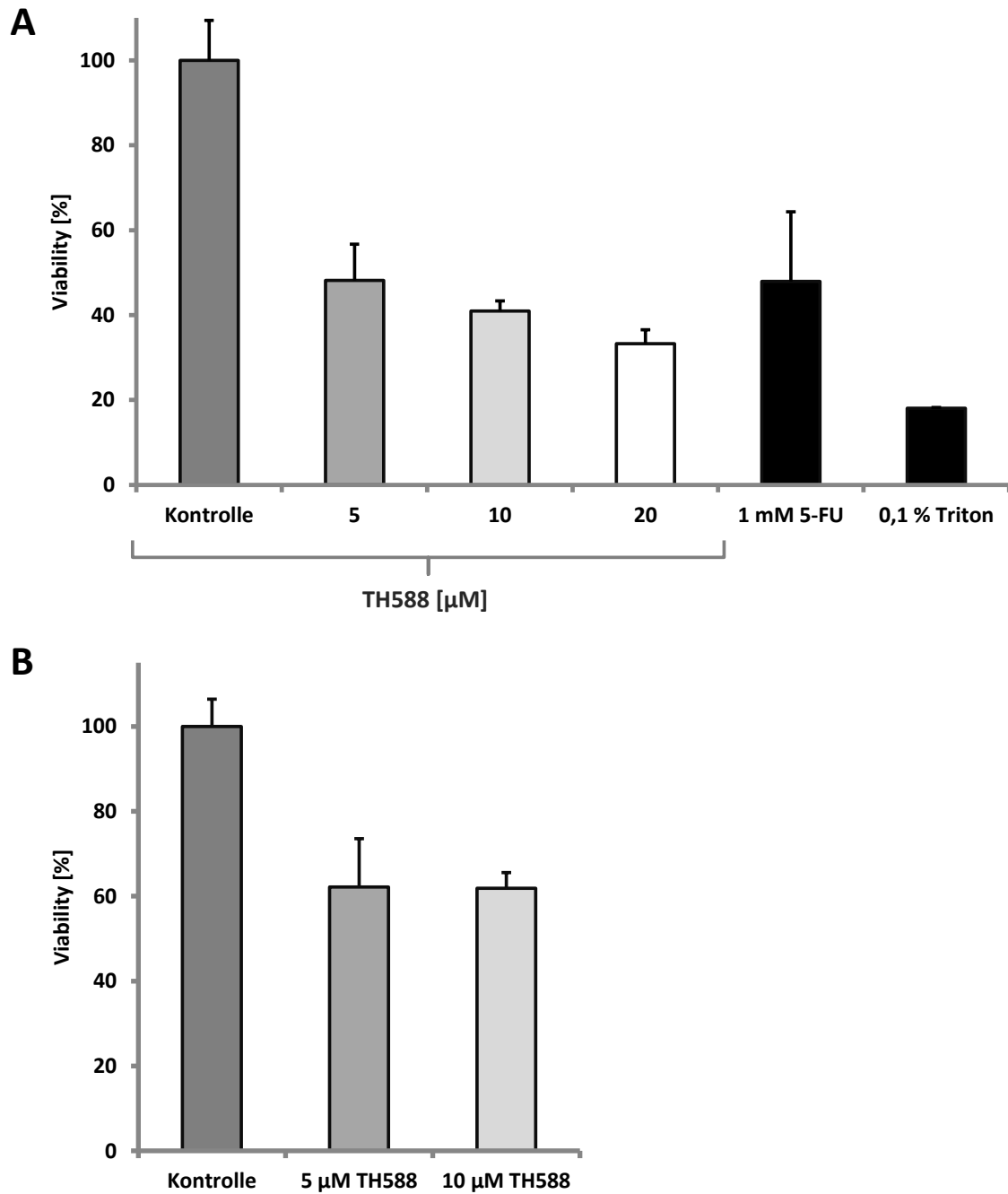


Abbildung 38: Viability von HUVEC nach TH588-Behandlung. (A) Pro *Well* wurden 8.000 Zellen ausplattiert. Die *Viability* wurde 72 Stunden nach der Behandlung in HUVEC gemessen. Als Positivkontrolle wurde kurz vor der Auswertung 0,1 % Triton auf die Zellen gegeben. Zum Vergleich mit anderen zytotoxischen Chemotherapeutika wurde 72 Stunden mit 1 mM 5-FU inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SD. (B) Pro *Well* wurden 40.000 Zellen ausplattiert. Die *Viability* wurde 72 Stunden nach der Behandlung in HUVEC gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SD.

4 Diskussion

4.1 Die Bedeutung von MTH1 in der medizinischen Forschung

MTH1 greift durch die Elimination oxidiertes Nukleotide maßgeblich in die ROS-abhängigen zellulären Signalwege ein. Diese haben in all jenen Erkrankungen einen hohen Stellenwert, die mit einem erhöhten Vorkommen von Sauerstoffstress behaftet sind, so dass eine Rolle von MTH1 in der Pathogenese dieser Erkrankungen vorstellbar ist und das Enzym möglicherweise eine potentielle therapeutische Zielstruktur darstellt. So ist beispielsweise in neurodegenerativen Erkrankungen eine 8-Oxoguanin-Akkumulation nachgewiesen und eine Abhängigkeit der Neurogenese von MTH1 wird vermutet (Leon et al., 2016). Auch ist das verstärkte Vorkommen von 8-oxo-G mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko behaftet (Hooten et al., 2012), was sogar eine protektive Funktion von MTH1 vermuten lässt. Am besten untersucht ist die Rolle des Enzyms in Krebszellen, denn diese weisen durch ihren veränderten Stoffwechsel sowie die zum Wachstum notwendige intensive Sauerstoffversorgung eine hohe ROS-Exposition auf. Deshalb sind Krebszellen in besonderem Maße abhängig von Enzymen, die die ROS-assoziierten Schäden verhindern oder reparieren. Hier rückt MTH1 in den Fokus, denn die als zelltoxisch beschriebene Akkumulation von 8-oxo-G in der DNA kann durch dieses Enzym verhindert werden. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Krebszellen deshalb auch von MTH1 abhängig sind.

4.2 Zelllinienspezifische Abhängigkeit von Krebszellen von MTH1

Trotz hoher *Knockdown*-Effizienz bei allen verwendeten shRNAs gegen MTH1 (*Hairpin A–C*) wurde in HCT116 lediglich eine geringfügige Verminderung der *Viability* und keine Veränderung der Apoptose oder des Langzeitüberlebens nach *Knockdown* gemessen. In SW480 hingegen war neben einer leichten Apoptose-Induktion eine deutliche Reduktion der *Viability* messbar, sowie eine maßgebliche Einschränkung des klonogenen Überlebens, die vergleichbar war mit dem Ausmaß, dass durch die Behandlung mit TH588 erreicht wurde. Zwar variierte die Ausprägung dieser Reduktion, allerdings in Abhängigkeit von der *Knockdown*-

Effizienz. In SW480 könnte der Mangel an MTH1 weniger eine direkte Auswirkung auf den Zelltod haben, als vielmehr die Proliferation und Teilungsfähigkeit aktiv zu beeinträchtigen. Dies deckt sich mit der Beschreibung von Lungenkarzinom-Zellen die mit MiR-145 MicroRNA behandelt wurden, die ebenfalls die Expression von MTH1 herabregulierte, woraufhin es zu einem Proliferationsarrest ohne Zelltod-Induktion kam (Cho et al., 2011). Auch wurde gezeigt, dass MTH1 siRNAs in verschiedenen anderen Krebszelllinien wie U2OS (Osteosarkom), SW620 (kolorektale Karzinom-Metastase), MDA-MB231 (Brustkrebs) und NTUB1/P (Blasenkrebs) das Überleben der Krebszellen einschränkte (Gad et al., 2014; Huber et al., 2014), während in HeLa (Kawamura et al., 2016) oder durch alternative MTH1 siRNA in U2OS (Kettle et al., 2016) kein Einfluss auf das Überleben festgestellt wurde. Insgesamt ist auch die Beeinträchtigung des Überlebens zwischen den Zelllinien sehr heterogen ausgeprägt. Da in unseren Experimenten die Wirkung der Hemmung in SW480 durch den *Hairpin* von Gad et al. (*Hairpin C*) mit zwei verschiedenen *Hairpins* validiert wurde (*Hairpin A* und *B*), die wiederum in HCT116 keinen veränderten Phänotyp hervorriefen, kann geschlussfolgert werden, dass entweder einige der Zelllinien sensibler auf den MTH1-Verlust reagieren, weil ihr Überleben in einem größeren Maße von dem Enzym anhängig ist oder aber die si- bzw. shRNA die Expression des Enzyms in einigen Zelllinien stärker supprimiert als in anderen. Letzteres kann als Erklärung dafür dienen, dass die siRNA in U2OS bei Gad et al. zu einem Phänotyp führte, der bei Kettle et al. ausblieb, da die Effizienz verschiedener siRNA durchaus unterschiedlich sein kann und auch bei jeder Transfektion variiert. Im Fall der in den Experimenten dieser Arbeit genutzten stabileren shRNA ist dies allerdings unwahrscheinlich, da erstens dieselben *Hairpins* in beiden Zelllinien verwendet wurden und zweitens die *Knockdown*-Effizienz densitometrisch überprüft wurde und immer zwischen 80 und 90 % lag. Somit muss der relative Anteil aktiven Proteins in HCT116 und SW480 nach *Knockdown* etwa gleich groß gewesen sein. Es wird deutlich, dass die Empfindlichkeit der Zelllinien gegenüber dem MTH1-Mangel variiert. Für dieses Phänomen kommen mehrere Erklärungsansätze infrage. Beispielsweise besitzen möglicherweise HCT116 eine höhere MTH1-Gesamtmenge, von der auch durch den shRNA-bedingten relativen Verlust von 80 bis 90 % entsprechend mehr aktives Protein verbleibt als in SW480. Dagegen spricht, dass Gad et al. zeigten, dass in beiden Zelllinien etwa gleich viel MTH1 exprimiert wird (Gad et al., 2014). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass

der Mangel des 8-oxo-dGTP-hydrolysierenden Enzyms durch andere Enzyme der Basenexzisionsreparatur kompensiert wird, die das in die DNA eingefügte 8-oxo-G herausschneiden oder ersetzen. Dabei kommen in erster Linie zwei Enzyme in Betracht, die 8-Oxoguanin-Glykosylase 1 (OGG1) und die mutY DNA Glykosylase (MUTYH). Bei beiden handelt es sich um Glykosylasen, die die oxidierte Base aus der DNA entfernen. Auch diese Interpretation der Daten steht im Widerspruch zu Gad et al., da diese demonstrierten, dass eine Überexpression von OGG1 und MUTYH die zytotoxischen Effekte des MTH1-Inhibitors TH588 nicht kompensiert. Auch eine Kompensation durch andere Enzyme der NUDIX Hydrolasen Superfamilie wird durch die geringe physiologische Relevanz dieser Enzyme unwahrscheinlich (Carter et al., 2015).

Letztendlich gibt es noch viele weitere Möglichkeiten, die das Enzym in manchen Zelllinien entbehrlich, in anderen hingegen substantiell für das Überleben machen. Einen vielversprechenden Ansatz bietet hierbei die Verbindung zum RAS-Status der Zelle. Patel et al. demonstrieren, dass das MTH1-Expressionslevel mit dem KRAS-Level korreliert. Außerdem sind Proliferation und Xenograft-Tumorwachstum von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) mit KRAS-Mutation nach MTH1-Suppression eingeschränkt und das Einschleusen von onkogenem RAS induziert die Hochregulation von MTH1 mRNA und Proteinexpression (Patel et al., 2015). Der KRAS-Rezeptorstatus von HCT116 wird durch eine heterozygote G13D-Mutation geprägt, während in SW480 eine homozygote G12V-Mutation vorliegt. Beide Mutationen wirken aktivierend und machen KRAS unabhängig von EGF, was sich in der verminderten Sensitivität gegenüber Cetuximab äußert (Kumar et al., 2014). Wenn der MTH1-Mangel nur bei KRAS-mutierten Zellen zum Tragen kommt, könnte der geringere Einfluss der heterozygoten Mutation in HCT116 das Ausbleiben des Phänotyps durch den MTH1-*Knockdown* erklären. Weiterhin betonen Samaranayake et al. die Assoziation zwischen MTH1-Abhängigkeit und ROS. Ihnen zur Folge bestimmt das Vorhandensein von einem starken oxidativen Faktor wie eine Akt-Hyperaktivierung oder auch Entzündungen darüber, ob MTH1 eine wesentliche Rolle zukommt. Denn relevant wird MTH1 erst, wenn viele Metabolite entstehen, deren Einbau das Enzym verhindern muss (Samaranayake et al., 2017). Unterstützt wird die These der ROS-abhängigen MTH1-Sensitivität von Wang et al., die zeigten, dass der *Knockdown* von MTH1, der in Melanomzellen allein keine Auswirkungen auf das Überleben hat, nach zu-

sätzlicher Behandlung mit dem ROS-induzierenden Agens Elesclomol eine Verminderung der *Viability* bewirkt. Zudem wurde auch die Verminderung der *Viability* nach TH588-Behandlung durch zusätzliche Applikation von Elesclomol verstärkt und von dem Radikalfänger N-Acetyl-L-Cystein sowie durch das Antioxidans Glutathion abgeschwächt (J. Y. Wang et al., 2016). Auch die dabei ermittelte positive Korrelation zwischen TH588-Sensitivität und ROS-Level (gemessen durch den Dihydrorhodamin-123 Färbungs-Assay) bestätigt, dass die MTH1-Sensitivität abhängig vom oxidativen Stress der Zelle ist. Verknüpft wird die ROS-Abhängigkeit der MTH1-Defizienz mit der Korrelation zwischen MTH1 und KRAS durch die Entdeckung, dass RAS-Mutationen den oxidativen Stress erhöhen (Rai et al., 2011). Ob dieser Mechanismus die Unterschiede des Ansprechens von SW480 und HCT116 auf den MTH1-Mangel bedingt, kann beim derzeitigen Forschungsstand nicht eindeutig beantwortet werden.

Die zelllinienspezifische Abhängigkeit von MTH1 zieht auch therapeutische Konsequenzen nach sich, denn sie lässt Vorhersagen über das Ansprechen von Krebserkrankung auf eine gegen MTH1 gerichtete Therapie zu. Sowohl SW480 als auch HCT116 entstammen Patienten mit kolorektalem Karzinom. Es kann daher nicht angenommen werden, dass ein MTH1-Hemmstoff bei allen Tumoren gleicher Lokalisation auch gleichermaßen wirksam ist. Ob die MTH1-Expression als prädiktiver Marker für das Therapieansprechen genutzt werden kann sollte in Tumoren evaluiert werden, die eine besonders hohe MTH1-Expression aufweisen, wie Brustkrebs (Gad et al., 2014) oder das Glioblastom (Pudelko et al., 2017), da hier eine Anhängigkeit von dem Enzym vermutet werden kann. Auch im Falle von Lungenkrebs, bei dem zwischen verschiedenen Zelllinien ein heterogenes MTH1-Expressionsmuster zu finden ist, ist ein Therapieversuch bei hoher MTH1-Expression denkbar, da gezeigt wurde, dass die Prognose von Patienten mit NSCLC bei hoher MTH1-Expression schlechter ist als bei geringer Expression (Fujishita et al., 2017). Auch eine Assoziation der MTH1-Abhängigkeit zum RAS-Status der Zelle sollte erwogen werden, da RAS-mutierte Tumoren wie Adenokarzinome der Lunge oder Pankreaskarzinome eine schlechtere Prognose und höhere Rezidivrate zeigen, wenn MTH1 erhöht ist (Samaranayake et al., 2017).

4.3 MTH1 und TH588 in Zellen ohne maligne Transformation

Auch die Suszeptibilität von gesundem Gewebe gegenüber dem MTH1-Mangel muss ausführlich evaluiert werden. Einerseits wird eine geringe Relevanz des Enzyms in Nicht-Krebszelllinien aufgrund der geringen ROS-Exposition angenommen und der MTH1-Inhibitor TH588 hat keinen Einfluss auf das Überleben von transformierten Fibroblasten (Gad et al., 2014). Andererseits zeigt TH588 im Alamarblau-*Viability*-Assay eine äquipotente Zytotoxizität auf nicht-transformierte Brustdrüsen-Epithelzellen wie auf Krebszellen (Ellermann et al., 2017). Zudem wird nicht ausgeschlossen, dass MTH1 als Teil der anti-oxidativen Antwort der Zelle auch in gesunden Zellen für den Schutz vor den Folgen reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich ist, die ihrerseits für Zellalterung und Krankheitsentstehung verantwortlich gemacht werden. Denn auch Zellen ohne maligne Transformation unterliegen starken Schwankungen der ROS-Exposition, beispielsweise im Zuge von Entzündungen (Mittal et al., 2014). Entsprechend gibt es Veröffentlichungen, die auf eine protektive physiologische Funktion von MTH1 hinweisen. In primären hTERT-immortalisierten humanen Fibroblasten induziert der MTH1-*Knockdown* Seneszenz-assoziierte Betagalaktosidase-Aktivität (Rai et al., 2009), einen der am weitesten verbreiteten Biomarker für zelluläre Seneszenz. Auch der Nutzen des Enzyms für den Gesamtorganismus konnte in einer Studie verdeutlicht werden, in der MTH1-defiziente Mäuse untersucht wurden. Hier wurden bei insgesamt 183 untersuchten Tieren 41 Magen-, Lungen- und Lebertumore bei den MTH1-defizienten Tieren gegenüber 12 dieser Tumore bei MTH1-kompetenten Mäusen festgestellt (Tsuzuki et al., 2001).

Eine Interaktion von MTH1-Inhibitoren wie TH588 mit untransformierten Zellen ist also nicht auszuschließen. Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente konnten demonstrieren, dass auch gesunde Zellen durch Behandlung mit dem Wirkstoff beeinträchtigt wurde. So war die *Viability* von HUVEC nach der Behandlung mit TH588 genauso stark reduziert wie in HCT116. Folglich ist der *bona fide* Hemmstoff nicht wie ursprünglich angenommen selektiv für Krebszellen, sondern betrifft auch andere Gewebe, d. h. bei seinem Einsatz als Medikament muss mit möglichen Nebenwirkungen gerechnet werden. Zumindest Teratotoxizität muss angenommen werden, da HUVEC als Bestandteil der Umbilikalgefäße durch die Bereitstellung von Blut und Nährstoffen das regelhafte Wachstum und die Entwick-

lung eines Fetus gewährleisten. Diese Annahme wird unterstützt durch eine Studie von Zhang et al., bei der gesunde Mäuse mit TH588 behandelt wurden und das Körperwachstum sowie Nieren- und Leberparameter im Blut überwacht wurden. Während laborchemisch keine Organschädigung nachgewiesen wurde, war das Wachstum der Mäuse eingeschränkt (Zhang et al., 2017). Andererseits könnte sich das eingeschränkte Wachstum von Endothelzellen auch als Vorteil bei der Behandlung von Krebs erweisen, da rapide wachsende Tumoren auf eine adäquate Sauerstoffversorgung und die Neubildung neuer Gefäße angewiesen sind (Al-Zoughbi et al., 2014). Wenn neben den Krebszellen auch diese neu wachsenden Gefäße durch die Eigenschaften von TH588 eliminiert werden, fehlt dem Tumor die Versorgung mit Sauerstoff und Stoffwechselmetaboliten.

Die *Viability* der HUVEC war nicht nur bei niedriger ausgesäter Zellzahl, d. h. bei Zellen in Proliferation durch die Behandlung mit TH588 beeinträchtigt. Auch bei hoher Zellzahl pro *Well*, bei der die HUVEC durch Kontaktinhibition einen auch physiologisch vorkommenden pflastersteinartigen Zellrasen bildeten, war die *Viability* signifikant reduziert. Da 8-oxo-dG nur nach Replikation zu Transversionsmutationen führt, sollten auch nur mitotisch aktive Zellen von der MTH1-Inhibition beeinträchtigt werden. Die Wirkung auf nicht-proliferierende HUVEC kann demnach als Hinweis interpretiert werden, dass die zytotoxische Eigenschaft von TH588 nicht nur auf der Hemmung von MTH1 beruht, sondern auch eine *off-target*-Komponente des Inhibitors besteht. Diese Hypothese wird in dem folgenden Kapitel näher betrachtet.

4.4 Wirksamkeit und Wirkmechanismus von TH588

Wie in der Literatur beschrieben, sind auch unsere Ergebnisse eindeutig in Bezug auf die Wirksamkeit von TH588 auf die Krebszellen, da es *Viability* und Langzeitüberleben gleichermaßen effektiv supprimiert sowie Apoptose hervorruft. Ob hingegen diese Zytotoxizität allein oder überhaupt durch die Inhibition von MTH1 zustande kommt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Auch wir konnten zeigen, dass die Behandlung mit TH588 einen deutlichen Einfluss auf das Überleben von HCT116 hat, während durch den *Knockdown* durch zwei verschiedene shRNA die genannten Parameter nicht beeinträchtigt werden konnten. Möglich ist, dass durch

den Einsatz von TH588 das Enzym MTH1 vollständig blockiert wird, während nach dem *Knockdown* eine gewisse Restaktivität verbleibt, die möglicherweise ausreicht, um die Zellen vor dem 8-oxo-G-induzierten Zelltod zu bewahren. Wie wir allerdings zeigen konnten, kann die *Viability* nach *Knockdown* auch durch eine zusätzliche Behandlung mit TH588 in geringer Konzentration nicht supprimiert werden. Wahrscheinlicher ist demnach folgende Erklärung: TH588 scheint nicht nur MTH1 zu inhibieren, sondern auch einen weiteren bisher noch ungeklärten Wirkmechanismus zu besitzen. Dieser *off-target*-Effekt kommt in HCT116 zum Tragen, während in SW480 zumindest eine *on-target*-Komponente besteht.

Auch in der Literatur sind ähnliche Beobachtungen beschrieben. Insgesamt sind dabei die Ergebnisse in Bezug auf MTH1 sehr heterogen. Beispielsweise führt ein vollständiger *Knockdown* von MTH1 durch CRISPR in SW480 nicht zu dem erwarteten Phänotyp (Kettle et al., 2016), während wir in dieser Zelllinie eine deutliche Einschränkung des Überlebens durch shRNA feststellen konnten. Zudem haben als Reaktion auf die Publikation von Gad et al. mehrere Arbeitsgruppen eigene selektive Hemmstoffe gegen MTH1 entwickelt und diese mit den *first-in-class*-Inhibitoren verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 9 in der zeitlichen Reihenfolge ihrer Veröffentlichung zusammengefasst. Dabei wird deutlich, dass die Effektivität der Hemmstoffe stark variiert. Das (S)-Enantiomer Crizotinib, die Substanz SCH51344 sowie TH1579, eine weitere TH-Substanz, weisen insgesamt ähnliche Effektivität auf Krebszellen *in vitro* oder *in vivo* auf wie ihre Vorgänger. Hingegen ist die Wirkung der Hemmstoffe von konkurrierenden Arbeitsgruppen entweder deutlich schwächer (NPD7155/ NPD9948) oder gar nicht nachweisbar (Compound 19 von AstraZeneca, IACS-4619/IACS4759 und zuletzt BAY-707). In den Veröffentlichungen von Kettle, Kawamura, Petrocchi und Ellermann wird dies als Beweis dafür gedeutet, dass es sich bei den Hemmstoffen der TH-Gruppe um einen *off-target*-Effekt handelt. Wie allerdings von Samaranayake et al. ausführlich diskutiert, ist es aufgrund der Verschiedenheit der untersuchten Zelllinien und Untersuchungsmethoden schwierig, allgemeingültige Rückschlüsse über die Hemmung von MTH1 zu ziehen, zumal die TH-Gruppe nachweislich MTH1 inhibiert.

Tabelle 9: Übersicht über die bisher beschriebenen Hemmstoffe von MTH1 und deren Wirkung.

Eigene Darstellung in Anlehnung an (Samaranayake et al., 2017).

Komponente	Zellulärer Phänotyp	Erstpublikation
TH588	Reduktion der Tumorgröße im Maus Xenograft mit SW480; Reduziertes Zellüberleben in SW480; Anstieg des Gesamt-8-oxo-G und verstärkte 8-oxo-G-Inkorporation (<i>Comet Assay</i>) in die DNA in U2OS	(Gad et al., 2014)
TH287	Anstieg des Gesamt-8-oxo-G und verstärkte 8-oxo-G-Inkorporation (<i>Comet Assay</i>) in die DNA in U2OS	(Gad et al., 2014)
Crizotinib ((S)-Enantiomer)	Erhöhung von DNA SSBs und Aktivierung von DNA Reparatur in SW480; Vermindertes Tumorwachstum im Maus-Tiermodell mit SW480	(Huber et al., 2014)
SCH51344	Vermindertes Wachstum von KRAS positiven SW480	(Huber et al., 2014)
Compound 19 (AstraZeneca)	Keine Veränderung in der Apoptose in SW480	(Kettle et al., 2016)
NPD7155	Geringere Verminderung der <i>Viability</i> verschiedener Tumorzelllinien	(Kawamura et al., 2016)
NPD9948	Geringere Verminderung der <i>Viability</i> verschiedener Tumorzelllinien	(Kawamura et al., 2016)
IACS-4619	Keine Zytotoxizität in verschiedenen Tumorzelllinien	(Petrocchi et al., 2016)
IACS-4759	Keine Zytotoxizität in verschiedenen Tumorzelllinien	(Petrocchi et al., 2016)
TH1579	Anstieg des Gesamt-8-oxo-G und mehr DNA-Schaden sichtbar in U2OS; Verstärkte 8-oxo-G-Inkorporation (<i>Comet Assay</i>) in SW480; Reduktion der Tumorgröße im Maus Xenograft in SW480 und aus Patienten gewonnenen Tumorzellen; 8-oxo-G Anstieg sowie vermehrt 53BP1 und Caspase 3 Herde sichtbar im HCT116 Maus Xenograft	(Warpman Berglund et al., 2016)
BAY-707	Keine Induktion von γ -H2AX Herden in HCl-H358; Kein Effekt auf das nukleare 8-oxo-G-Level in U2OS; Kein Einfluss auf das Tumorwachstum im Maus Xenograft mit CT26 oder NCI-H460	(Ellermann et al., 2017)

Auch zu der Frage, welchen möglichen *off-target*-Effekt TH588 haben könnte, gibt es in der Literatur Überlegungen. Kawamura et al. zeigten, dass TH287 und das metabolisch stabilere Analogon TH588 die Polymerisation von Tubulin *in vitro* hemmen, das intrazelluläre Netzwerk aus Mikrotubuli in HeLa-Zellen (Zervixkarzinom) stören und zur Zellschrumpfung führen (Kawamura et al., 2016). Zudem konnten diese und auch andere Arbeitsgruppen (Wang et al., 2016) demonstrieren, dass eine Phosphorylierung von Bcl-2 nach Behandlung mit den TH-Inhibitoren stattfindet, wie es auch von anderen Tubulin angreifenden Agenzien bekannt ist. Im Gegensatz dazu wiesen die Hemmstoffe NPD7155 und NPD9948 keine Effekte auf Tubulin, die Mikrotubulibildung oder Bcl-2 auf. Das „*off-target*“, so Kawamura et al., sei also Tubulin. Demnach hätten die TH-Substanzen also

einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie andere, schon seit langem bekannte und zur Krebstherapie verwendete Chemotherapeutika, beispielsweise die Gruppen der Vinkaalkaloide oder Taxane. Beide Substanzklassen binden an Tubulin und verhindern so die Ausbildung der Mikrotubuli, die für die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen in der Mitose unerlässlich sind, was wiederum zur Apoptose der Zellen führt (Bartsch, 2005).

Ein weiterer möglicher *off-target*-Effekt lässt sich aus der zuvor bereits diskutierten ROS-abhängigen MTH1-Sensitivität ableiten. Wenn MTH1 nur in Krebszellen mit hoher ROS-Last essentiell für das Überleben ist, könnte ein Mechanismus, der den oxidativen Stress triggert, die Relevanz von MTH1 in HCT116 erhöhen und so zum Zelltod führen. Interessanterweise konnten wir eine Steigerung der NRF2-Expression im Luciferase-Assay nach TH588-Behandlung feststellen, die Ausdruck des erhöhten Sauerstoffstresses sein kann und so HCT116 abhängig von MTH1 macht. Denkbar ist dieser Mechanismus auch für SCH51344, für das bereits eine Interaktion mit zwei verschiedenen *Targets* bekannt ist: RAS und MTH1.

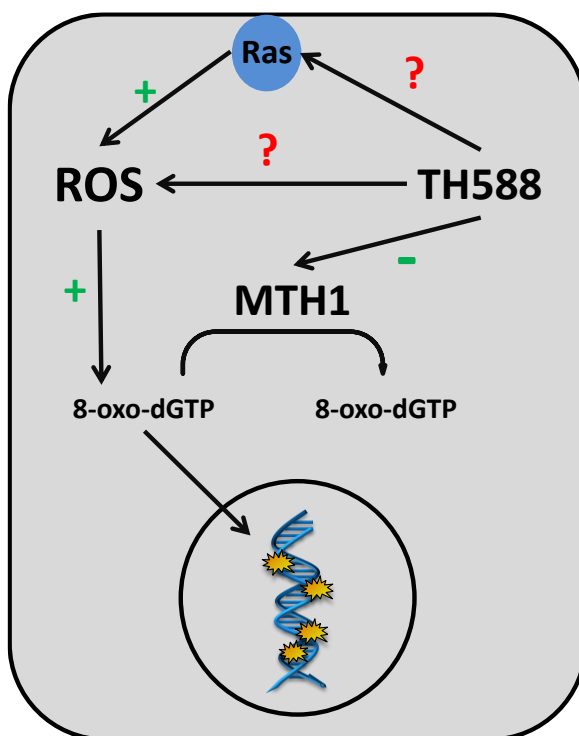


Abbildung 39: Modell zur Wirkungsweise von TH588. TH588 inhibiert MTH1 und verhindert so die Entfernung von oxidierten Nucleotiden aus dem dNTP-Pool und fördert ihren Einbau in die DNA mit konsekutiven DNA-Schäden. Diese fallen jedoch nur bei hohem oxidativem Stress in ausreichendem Maße an, um eine Zellschädigung zu bewirken. Der oxidative Stress kann beispielsweise durch eine RAS-Mutation einen möglichen *off-target*-Mechanismus von TH588 begünstigt werden.

4.5 MTH1-Inhibition in Hypoxie

Besonders interessant ist der ROS-abhängige Mechanismus bei Betrachtung der Situation in Hypoxie. Obwohl hier weniger Sauerstoff vorhanden ist, ist im NRF2-Luciferase-Assay keine verminderte NRF2-Aktivierung sichtbar, was für die Persistenz der reaktiven Sauerstoffspezies bei Sauerstoffmangel spricht. Folglich ist auch die Effektivität der Behandlung mit TH588 erklärbar: Der Hemmstoff verminderte die *Viability* und induzierte Apoptose sowohl bei moderater (1 % Sauerstoff im Inkubationsgas) als auch bei starker (0,1 % Sauerstoff) Hypoxie sehr effektiv, was die Wirksamkeit des MTH1-Inhibitors in Hypoxie eindrücklich demonstriert. Die Induktion von NRF2 durch die TH588-Behandlung ist eher geringer ausgeprägt als unter normalen Sauerstoffbedingungen, was den vernachlässigbar geringen Wirkungsverlust in Hypoxie erklären könnte, denn teilweise waren höhere Konzentrationen des Wirkstoffes in Hypoxie für denselben Effekt wie in Normoxie notwendig. Die MTH1-Expression ist in Hypoxie sowie nach Behandlung mit dem HIF-Hydroxylase-Inhibitor DMOG im Vergleich zur Normoxie nicht erniedrigt, sondern eher erhöht. Dies unterstreicht die Relevanz des Enzyms in Hypoxie, ebenso wie die von Bräutigam et al. beobachtete Hochregulation von MTH1 bei VHL-*Knockdown*-Mäusen (Brautigam et al., 2016). Interessanterweise konnten wir eine dosisabhängige Herabregulation von HIF-1 α nach TH588-Behandlung beobachten. Auch wenn die Ursache dieses Effektes unklar ist, könnte er sich *in vivo* als hilfreich in der Behandlung von Tumoren erweisen, da HIF beispielsweise ein wichtiger Modulator der Bildung und Freisetzung von VEGF und somit der Angiogenese ist, die den Tumor mit den zum Wachstum benötigten Nährstoffen versorgt. Zudem besteht eine inverse Korrelation zwischen der HIF-Expression und der Prognose für den Ausgang einer Radiotherapie bei Krebserkrankungen (Strofer et al., 2011).

4.6 Duale Behandlung mit TH588 und Radiotherapie

Während durch die Kombination von TH588-Behandlung und Bestrahlung weder *Viability* noch Apoptose in einem nennenswerten Maße stärker beeinflusst wurden als durch eine separate Behandlung, war beim Langzeitüberleben ein deutlicher, additiver Effekt der beiden Behandlungsmodalitäten sichtbar. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da ionisierende Strahlung (natürlich in Abhängigkeit von der Bestrahlungsart und -dosis) eher die Progression des Zellzyklus verhindert als die Apoptose zu induzieren. Zudem ist anzumerken, dass die Apoptose zwar nicht im Caspase 3-Assay erhöht war, der Gesamtzelltod aber signifikant durch die Kombinationstherapie gesteigert wurde. Der Einfluss auf das Langzeitüberleben wurde auch durch *Colony Formation Assays* in neuroendokrinen Tumorzelllinien bestätigt (Aristizabal Prada et al., 2017). Besonders interessant ist der Einfluss der Kombinationstherapie auf Zellen in Hypoxie, da Tumorphoxie ein wichtiger Faktor in Bezug auf Strahlensensitivität und Therapieresistenz ist. In Hypoxie wurde beim Langzeitüberleben deutlich, dass nicht nur eine additive Wirkung besteht, sondern auch eine Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber der Bestrahlung durch die Behandlung mit TH588 stattfindet, da die Reduktion der *Survival Fraction* bei Kombination größer war als die addierten Effekte bei separater Applikation. So ist es durchaus vorstellbar, dass (bei entsprechender Kenntnis über den genauen Wirkmechanismus) TH588 als *Radiosensitizer* eingesetzt werden kann. Im Gegensatz dazu konnte kein additiver Effekt von MTH1-Inhibitor BAY-707 und Bestrahlung im Maus Xenograft-Modell in NCI-H460 (NSCLC) und CT26 (kolorektales Adenokarzinom) (Ellermann et al., 2017) festgestellt werden. Insofern scheint also auch der noch unklare, möglicherweise MTH1-unabhängige Wirkmechanismus der kritische Aspekt für die strahlensensitivierende Eigenschaft des Wirkstoffes zu sein. Da die Wirkung der ionisierenden Strahlung maßgeblich durch das Vorkommen von Sauerstoff in der Zelle bestimmt wird, ist eine der gängigsten Ansätze für die Wirkung von *Radiosensitizern* die Erhöhung des Sauerstoffstress in den Krebszellen. Da wie oben beschrieben ebenfalls eine Abhängigkeit der MTH1-Inhibitor von dem Vorkommen reaktiver Sauerstoffspezies besteht und das ROS-Level durch die TH588-Behandlung ansteigt, ist die Erhöhung der Sensitivität über diesen Mechanismus durchaus plausibel. Vor allem in Hypoxie, wo physiologischerweise weniger Sauerstoff vorhanden und aus diesem Grund die Strah-

lenresistenz des Gewebes erhöht ist, könnte dieser Mechanismus zu einem erhöhten Sauerstoffstress führen und so zu einer stärkeren Wirksamkeit beider Komponenten in Kombination.

4.7 Ausblick

Insgesamt ist der Wirkmechanismus von TH588 und den anderen MTH1-Inhibitoren aus dieser Gruppe noch immer unklar und muss auch auf molekularer Ebene weiterhin untersucht werden. Insbesondere die Rolle, die 8-oxo-G in diesem Zusammenhang zukommt, hat dabei einen hohen Stellenwert, denn es ist noch immer nicht klar, wie die Insertion des oxidierten Nukleotids zu den fulminanten DNA-Schäden und dem entsprechenden Phänotyp führt. Zudem gibt es, abgesehen von dem „modifizierten OGG1/MUTYG comet-assay“ (Gad et al., 2014), keinen validen Nachweis der gestiegenen 8-oxo-G-Insertion, wie unsere eigenen Versuche mit Avidin und der Anfärbung durch Antikörper demonstrieren. Daher wäre es interessant, diesen Aspekt im Rahmen zukünftiger Forschung genauer zu untersuchen.

Obwohl der Wirkungsmechanismus von TH588 noch nicht eindeutig entschlüsselt ist, konnte eine potente Beeinträchtigung von Tumorzellen demonstriert werden. Entsprechend interessant ist die Frage nach Wirksamkeit und Verträglichkeit im Menschen. Die durch die Thomas Helleday Foundation entwickelte Folgesubstanz von TH588 trägt den Namen Karonudib (TH1579) und wird aktuell in einer Phase I klinischen Studie auf dosislimitierende Toxizität und maximal tolerierte Dosis getestet. Das Ergebnis dieser Studie bleibt abzuwarten.

Weiterhin ist die Suszeptibilität von verschiedenen Tumorentitäten gegenüber dem Hemmstoff sehr heterogen. So sollte der Einsatz der Hemmstoffe in verschiedenen Krebsentitäten getestet werden, um diejenigen Krebsarten mit der größten Sensibilität gegenüber der Behandlung herauszufiltern.

Insgesamt geht der Trend in der Behandlung von Tumoren hin zur personalisierten Therapie. Mögliche Prädiktoren für das Ansprechen eines Tumors, wie das MTH1-Expressionslevel und der RAS-Status der Zelle, wurden in Kapitel 4.2 diskutiert und könnten in Zukunft in Sinne einer individualisierten *targeted therapy* am Patienten Anwendung finden.

5 Zusammenfassung

Das Enzym MutT Homolog 1 (MTH1) hydrolysiert 8-Oxo-7,8-Dihydro-2-Deoxyguanosin-5-Triphosphat (8-oxo-dGTP) und andere oxidierte Nukleotide und verhindert somit deren Einbau in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) und die damit verbundene zytotoxische Wirkung. Da Krebszellen dem Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies stark unterliegen, kommt das Enzym als therapeutische Zielstruktur in Betracht. Die Substanz TH588 hemmt MTH1 und zeigt in diversen Studien potente kanzerotoxische Wirkung. Ionisierende Strahlung induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. In hypoxischen Tumorearealen hingegen sind diese reduziert und bedingen ein vermindertes Ansprechen auf eine Radio- oder Chemotherapie. Die Wirkung von TH588 in Hypoxie und in Kombination mit ionisierender Strahlung wurde in dieser Arbeit untersucht.

In Hypoxie zeigte der Hemmstoff hinsichtlich der Parameter Zelltod, *Viability* und Langzeitüberleben eine fast ebenso potente Wirkung auf Krebszellen *in vitro* wie in Normoxie. Dies deutet darauf hin, dass die hypoxiebedingte Therapieresistenz mancher Tumore mit der TH588-Therapie möglicherweise umgangen werden kann. Die Kombination der MTH1-Inhibition mit Bestrahlung induzierte ebenfalls Apoptose und reduzierte *Viability* und Langzeitüberleben, so dass insgesamt von einer additiven bis sensitivierenden Eigenschaft des Hemmstoffes bezogen auf die Wirksamkeit der Bestrahlung gesprochen werden kann. Um die Effektivität der chemischen Inhibition von MTH1 mit TH588 zu verifizieren, haben wir durch lentivirale Transduktion einen *Knockdown* von MTH1 in zwei verschiedenen Zelllinien (HCT116 und SW480) generiert und festgestellt, dass die Reaktionen der verschiedenen Zelllinien obgleich des ähnlichen Ursprungsgewebes stark divergieren. Trotz hoher *Knockdown*-Effizienz in beiden Zelllinien wurden die *Viability* und das Langzeitüberleben nur in SW480 relevant reduziert. Apoptose konnte in keiner Zelllinie induziert werden. Dies deutet auf einen von MTH1-unabhängigen *off-target*-Effekt von TH588 hin.

Weiterhin behandelten wir Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) in Zellkultur mit TH588 als möglichst physiologisches Modell zur Beurteilung gesunder Körperzellen. Hier zeigte sich eine verminderte *Viability*, so dass die zuvor postulierte Krebszellen-Spezifität des Hemmstoffes kritisch hinterfragt werden muss.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams, G. E., Fowler, J. F., Dische, S., Thomlinson, R. H. (1976): Hypoxic Cell Sensitisers in Radiotherapy. *The Lancet* 307, 186-188.
2. Al-Zoughbi, W., Huang, J., Paramasivan, G. S., Till, H., Pichler, M., Guertl-Lackner, B., Hoefler, G. (2014): Tumor macroenvironment and metabolism. *Semin Oncol* 41, 281-295.
3. Almog, N., Rotter, V. (1997): Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* 1333, F1-27.
4. Aristizabal Prada, E. T., Orth, M., Nolting, S., Spottl, G., Maurer, J., Auernhammer, C. (2017): The MTH1 inhibitor TH588 demonstrates anti-tumoral effects alone and in combination with everolimus, 5-FU and gamma-irradiation in neuroendocrine tumor cells. *PLoS One* 12, e0178375.
5. Arteaga, C. L. (2002): Epidermal Growth Factor Receptor Dependence in Human Tumors: More Than Just Expression? *The Oncologist* 7, 31-39.
6. Baenkler, H.-W., Fritze, D., Fießl, H.S., Goeckenjan, G., Hamm, C., Harenberg, J. (2001): *Duale Reihe Innere Medizin*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
7. Barcellos-Hoff, M. H., Park, C., Wright, E. G. (2005): Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer* 5, 867-875.
8. Baselga, J. (2001): The EGFR as a target for anticancer therapy - focus on cetuximab. *European Journal of Cancer* 37, S16-S22.
9. Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., Yeoh, K. W. (2014): Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol Biosci* 1, 24.
10. Baudino, T. A. (2015): Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment.
11. Bergonie, J., Tribondeau, L. (1959): Interpretation of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment. *Radiat Res* 11, 587-588.
12. Boehm, J. S., Hahn, W. C. (2004): Immortalized cells as experimental models to study cancer. *Cytotechnology* 45, 47-59.
13. Brautigam, L., Pudelko, L., Jemth, A. S., Gad, H., Narwal, M., Gustafsson, R., Karsten, S., Carreras Puigvert, J., Homan, E., Berndt, C., Berglund, U. W., Stenmark, P., Helleday, T. (2016): Hypoxic Signaling and the Cellular Redox

- Tumor Environment Determine Sensitivity to MTH1 Inhibition. *Cancer Res* 76, 2366-2375.
14. Carter, M., Jemth, A. S., Hagenkort, A., Page, B. D., Gustafsson, R., Griese, J. J., Gad, H., Valerie, N. C., Desroses, M., Bostrom, J., Warpman Berglund, U., Helleday, T., Stenmark, P. (2015): Crystal structure, biochemical and cellular activities demonstrate separate functions of MTH1 and MTH2. *Nat Commun* 6, 7871.
 15. Chan, N., Pires, I. M., Bencokova, Z., Coackley, C., Luoto, K. R., Bhogal, N., Lakshman, M., Gottipati, P., Oliver, F. J., Helleday, T., Hammond, E. M., Bristow, R. G. (2010): Contextual synthetic lethality of cancer cell kill based on the tumor microenvironment. *Cancer Res* 70, 8045-8054.
 16. Cho, W. C. S., S C Chow, A., Au, J. (2011): MiR-145 inhibits cell proliferation of human lung adenocarcinoma by targeting EGFR and NUDT1 (Vol. 8).
 17. Davidson, M. B., Thakkar, S., Hix, J. K., Bhandarkar, N. D., Wong, A., Schreiber, M. J. (2004): Pathophysiology, clinical consequences, and treatment of tumor lysis syndrome. *Am J Med* 116, 546-554.
 18. Driessens, N., Versteyhe, S., Ghaddhab, C., Burniat, A., De Deken, X., Van Sande, J., Dumont, J. E., Miot, F., Corvilain, B. (2009): Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocrine Related Cancer* 16, 845-856.
 19. Ellermann, M., Eheim, A., Rahm, F., Viklund, J., Guenther, J., Andersson, M., Ericsson, U., Forsblom, R., Ginman, T., Lindstrom, J., Silvander, C., Tresaugues, L., Giese, A., Bunse, S., Neuhaus, R., Weiske, J., Quanz, M., Glasauer, A., Nowak-Reppel, K., Bader, B., Irlbacher, H., Meyer, H., Queisser, N., Bauser, M., Haegerbarth, A., Gorjanacz, M. (2017): Novel Class of Potent and Cellularly Active Inhibitors Devalidates MTH1 as Broad-Spectrum Cancer Target. *ACS Chem Biol*
 20. Elmore, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
 21. Fang, J., Nakamura, H., Iyer, A. K. (2007): Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target* 15, 475-486.
 22. Fortini, P. (2003): 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531, 127-139.
 23. Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Nakabeppu, Y., Kasai, H. (2001): Human MTH1 protein hydrolyzes the oxidized ribonucleotide, 2-hydroxy-ATP. *Nucleic Acids Res* 29, 449-454.

24. Fujishita, T., Okamoto, T., Akamine, T., Takamori, S., Takada, K., Katsura, M., Toyokawa, G., Shoji, F., Shimokawa, M., Oda, Y., Nakabeppu, Y., Maehara, Y. (2017): Association of MTH1 expression with the tumor malignant potential and poor prognosis in patients with resected lung cancer. *Lung Cancer* 109, 52-57.
25. Gad, H., Koolmeister, T., Jemth, A. S., Eshtad, S., Jacques, S. A., Strom, C. E., Svensson, L. M., Schultz, N., Lundback, T., Einarsdottir, B. O., Saleh, A., Gokturk, C., Baranczewski, P., Svensson, R., Berntsson, R. P., Gustafsson, R., Stromberg, K., Sanjiv, K., Jacques-Cordonnier, M. C., Desroses, M., Gustavsson, A. L., Olofsson, R., Johansson, F., Homan, E. J., Loseva, O., Brautigam, L., Johansson, L., Hoglund, A., Hagenkort, A., Pham, T., Altun, M., Gaugaz, F. Z., Vikingsson, S., Evers, B., Henriksson, M., Vallin, K. S., Wallner, O. A., Hammarstrom, L. G., Wiita, E., Almlöf, I., Kalderen, C., Axelsson, H., Djureinovic, T., Puigvert, J. C., Haggblad, M., Jeppsson, F., Martens, U., Lundin, C., Lundgren, B., Granelli, I., Jensen, A. J., Artursson, P., Nilsson, J. A., Stenmark, P., Scobie, M., Berglund, U. W., Helleday, T. (2014): MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature* 508, 215-221.
26. Guicciardi, M. E., Gores, G. J. (2009): Life and death by death receptors. *FASEB J* 23, 1625-1637.
27. Haanen, C., Vermes, I. (1996): Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 64, 129-133.
28. Halliwell, B., Cross, C. E. (1994): Oxygen-Derived Species - Their Relation to Human-Disease and Environmental-Stress. *Environmental Health Perspectives* 102, 5-12.
29. Helleday, T. (2014): Cancer phenotypic lethality, exemplified by the non-essential MTH1 enzyme being required for cancer survival. *Ann Oncol* 25, 1253-1255.
30. Herold, G. (2015): *Innere Medizin* (Vol. 2015). Köln: Gerd Herold.
31. Hooten, N. N., Ejiogu, N., Zonderman, A. B., Evans, M. K. (2012): Association of Oxidative DNA Damage and C-Reactive Protein in Women at Risk for Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 32, 2776-+.
32. Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H. F. (1998): Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7987-7992.
33. Huber, K. V., Salah, E., Radic, B., Gridling, M., Elkins, J. M., Stukalov, A., Jemth, A. S., Gokturk, C., Sanjiv, K., Stromberg, K., Pham, T., Berglund, U. W., Colinge, J., Bennett, K. L., Loizou, J. I., Helleday, T., Knapp, S., Superti-

- Furga, G. (2014): Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an anticancer strategy. *Nature* 508, 222-227.
34. Idriss, H. T., Al-Assar, O., Wilson, S. H. (2002): DNA polymerase β . *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 321-324.
35. Kamiya, H., Dugue, L., Yakushiji, H., Pochet, S., Nakabeppu, Y., Harashima, H. (2002): Substrate recognition by the human MTH1 protein. *Nucleic Acids Symposium Series* 2, 85-86.
36. Kaufmann, S. H., Earnshaw, W. C. (2000): Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256, 42-49.
37. Kawamura, T., Kawatani, M., Muroi, M., Kondoh, Y., Futamura, Y., Aono, H., Tanaka, M., Honda, K., Osada, H. (2016): Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival. *Sci Rep* 6, 26521.
38. Kettle, J. G., Alwan, H., Bista, M., Breed, J., Davies, N. L., Eckersley, K., Fillery, S., Foote, K. M., Goodwin, L., Jones, D. R., Kack, H., Lau, A., Nissink, J. W., Read, J., Scott, J. S., Taylor, B., Walker, G., Wissler, L., Wylot, M. (2016): Potent and Selective Inhibitors of MTH1 Probe Its Role in Cancer Cell Survival. *J Med Chem* 59, 2346-2361.
39. Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S. A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Wong, W. S., Sigurdsson, G., Walters, G. B., Steinberg, S., Helgason, H., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D. F., Helgason, A., Magnusson, O. T., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K. (2012): Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488, 471-475.
40. Krebs in Deutschland Krebsregisterdaten, Z. f. (2015). *Krebs in Deutschland Ergebnisse nach ICD-10* (pp. 38 - 41). Berlin: Robert-Koch-Institut.
41. Kumar, S. S., Price, T. J., Mohyeldin, O., Borg, M., Townsend, A., Hardingham, J. E. (2014): KRAS G13D Mutation and Sensitivity to Cetuximab or Panitumumab in a Colorectal Cancer Cell Line Model. *Gastrointestinal cancer research : GCR* 7, 23-26.
42. Larsson, P., Ollinger, K., Rosdahl, I. (2006): Ultraviolet (UV)A- and UVB-induced redox alterations and activation of nuclear factor-kappaB in human melanocytes-protective effects of alpha-tocopherol. *Br J Dermatol* 155, 292-300.
43. Lee, K. M., Choi, K. H., Ouellette, M. M. (2004): Use of exogenous hTERT to immortalize primary human cells. *Cytotechnology* 45, 33-38.
44. Leon, J., Sakumi, K., Castillo, E., Sheng, Z., Oka, S., Nakabeppu, Y. (2016): 8-Oxoguanine accumulation in mitochondrial DNA causes mitochondrial

- dysfunction and impairs neuritogenesis in cultured adult mouse cortical neurons under oxidative conditions. *Sci Rep* **6**, 22086.
45. Li, J., Yang, C. C., Tian, X. Y., Li, Y. X., Cui, J., Chen, Z., Deng, Z. L., Chen, F. J., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., Cai, J. P. (2017): MutT-related proteins are novel progression and prognostic markers for colorectal cancer. *Oncotarget* **8**, 105714-105726.
46. Linkous, A. G., Yazlovitskaya, E. M. (2012): Novel radiosensitizing anticancer therapeutics. *Anticancer Res* **32**, 2487-2499.
47. Luengo-Fernandez, R., Leal, J., Gray, A., Sullivan, R. (2013): Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *The Lancet Oncology* **14**, 1165-1174.
48. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., Ratcliffe, P. J. (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271-275.
49. Metzen, E., Stiehl, D. P., Doege, K., Marxsen, J. H., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W. (2005): Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem J* **387**, 711-717.
50. Michiels, C. (2004): Physiological and Pathological Responses to Hypoxia. *The American Journal of Pathology* **164**, 1875-1882.
51. Mishima, M., Sakai, Y., Itoh, N., Kamiya, H., Furuichi, M., Takahashi, M., Yamagata, Y., Iwai, S., Nakabeppu, Y., Shirakawa, M. (2004): Structure of human MTH1, a Nudix family hydrolase that selectively degrades oxidized purine nucleoside triphosphates. *J Biol Chem* **279**, 33806-33815.
52. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., Malik, A. B. (2014): Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* **20**, 1126-1167.
53. Morfousse, F., Kuchnio, A., Frainay, C., Gomez-Brouchet, A., Delisle, M. B., Marzi, S., Helfer, A. C., Hantelys, F., Pujol, F., Guillermet-Guibert, J., Bousquet, C., Dewerchin, M., Pyronnet, S., Prats, A. C., Carmeliet, P., Garmy-Susini, B. (2014): Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 α -independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep* **6**, 155-167.
54. Nakabeppu, Y., Oka, S., Sheng, Z., Tsuchimoto, D., Sakumi, K. (2010): Programmed cell death triggered by nucleotide pool damage and its prevention by MutT homolog-1 (MTH1) with oxidized purine nucleoside triphosphatase. *Mutat Res* **703**, 51-58.

55. Nassour, J., Martien, S., Martin, N., Deruy, E., Tomellini, E., Malaquin, N., Bouali, F., Sabatier, L., Wernert, N., Pinte, S., Gilson, E., Pourtier, A., Pluquet, O., Abbadie, C. (2016): Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nat Commun* 7, 10399.
56. Obtulowicz, T., Swoboda, M., Speina, E., Gackowski, D., Rozalski, R., Siomek, A., Janik, J., Janowska, B., Ciesla, J. M., Jawien, A., Banaszkiwicz, Z., Guz, J., Dziaman, T., Szpila, A., Olinski, R., Tudek, B. (2010): Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. *Mutagenesis* 25, 463-471.
57. Oka, S., Ohno, M., Tsuchimoto, D., Sakumi, K., Furuichi, M., Nakabeppu, Y. (2008): Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *EMBO J* 27, 421-432.
58. Okunieff, P., de Bie, J., Dunphy, E. P., Terris, D. J., Hockel, M. (1996): Oxygen distributions partly explain the radiation response of human squamous cell carcinomas. *Br J Cancer Suppl* 27, S185-190.
59. Opferman, J. T. (2008): Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ* 15, 234-242.
60. Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., Bao, J. K. (2012): Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 45, 487-498.
61. Papeo, G. (2016): MutT Homolog 1 (MTH1): The Silencing of a Target. *J Med Chem* 59, 2343-2345.
62. Park, H. J., Zhang, Y., Georgescu, S. P., Johnson, K. L., Kong, D., Galper, J. B. (2006): Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Rev* 2, 93-102.
63. Patel, A., Burton, D. G., Halvorsen, K., Balkan, W., Reiner, T., Perez-Stable, C., Cohen, A., Munoz, A., Giribaldi, M. G., Singh, S., Robbins, D. J., Nguyen, D. M., Rai, P. (2015): MutT Homolog 1 (MTH1) maintains multiple KRAS-driven pro-malignant pathways. *Oncogene* 34, 2586-2596.
64. Petrocchi, A., Leo, E., Reyna, N. J., Hamilton, M. M., Shi, X., Parker, C. A., Mseeh, F., Bardenhagen, J. P., Leonard, P., Cross, J. B., Huang, S., Jiang, Y., Cardozo, M., Draetta, G., Marszalek, J. R., Toniatti, C., Jones, P., Lewis, R. T. (2016): Identification of potent and selective MTH1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 26, 1503-1507.
65. Pox, C., Aretz, S., Bischoff, S.C., Graeven, U., Hass, M., Heußner, P., Hohenberger, W., Holstege, W., . (2014). S3 Leitlinie Kolorektales Karzinom. Online-Publikation; <http://leitlinienprogramm->

- onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/LL_KRK_Langfassung_1.1.pdf
(abgerufen 08/2019)
66. Pudielko, L., Rouhi, P., Sanjiv, K., Gad, H., Kalderen, C., Hoglund, A., Squatrito, M., Schuhmacher, A. J., Edwards, S., Hagerstrand, D., Berglund, U. W., Helleday, T., Brautigam, L. (2017): Glioblastoma and glioblastoma stem cells are dependent on functional MTH1. *Oncotarget*
 67. Rai, P., Onder, T. T., Young, J. J., McFaline, J. L., Pang, B., Dedon, P. C., Weinberg, R. A. (2009): Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 169-174.
 68. Rai, P., Young, J. J., Burton, D. G., Giribaldi, M. G., Onder, T. T., Weinberg, R. A. (2011): Enhanced elimination of oxidized guanine nucleotides inhibits oncogenic RAS-induced DNA damage and premature senescence. *Oncogene* 30, 1489-1496.
 69. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (2006): *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
 70. Riley, P. A. (2009): Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology* 65, 27-33.
 71. Robinson, J. M. (2008): Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and Cell Biology* 130, 281-297.
 72. Rock, K. L., Kono, H. (2008): The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 3, 99-126.
 73. Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gorp, M., van Loo, G., Vandenberghe, P. (2004): Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.
 74. Samaranayake, G. J., Huynh, M., Rai, P. (2017): MTH1 as a Chemotherapeutic Target: The Elephant in the Room. *Cancers (Basel)* 9
 75. Schofield, C. J., Ratcliffe, P. J. (2004): Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 343-354.
 76. Semenza, G. L. (2013): HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 123, 3664-3671.
 77. Strofer, M., Jelkmann, W., Metzen, E., Brockmeier, U., Dunst, J., Depping, R. (2011): Stabilisation and knockdown of HIF--two distinct ways comparably important in radiotherapy. *Cell Physiol Biochem* 28, 805-812.
 78. Swenberg, J. A., Lu, K., Moeller, B. C., Gao, L. N., Upton, P. B., Nakamura, J., Starr, T. B. (2011): Endogenous versus Exogenous DNA Adducts: Their

- Role in Carcinogenesis, Epidemiology, and Risk Assessment. *Toxicological Sciences* 120, S130-S145.
79. Tang, Y., Forsyth, C. B., Farhadi, A., Rangan, J., Jakate, S., Shaikh, M., Banan, A., Fields, J. Z., Keshavarzian, A. (2009): Nitric oxide-mediated intestinal injury is required for alcohol-induced gut leakiness and liver damage. *Alcohol Clin Exp Res* 33, 1220-1230.
80. Tatum, J. L., Kelloff, G. J., Gillies, R. J., Arbeit, J. M., Brown, J. M., Chao, K. S., Chapman, J. D., Eckelman, W. C., Fyles, A. W., Giaccia, A. J., Hill, R. P., Koch, C. J., Krishna, M. C., Krohn, K. A., Lewis, J. S., Mason, R. P., Melillo, G., Padhani, A. R., Powis, G., Rajendran, J. G., Reba, R., Robinson, S. P., Semenza, G. L., Swartz, H. M., Vaupel, P., Yang, D., Croft, B., Hoffman, J., Liu, G., Stone, H., Sullivan, D. (2006): Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int J Radiat Biol* 82, 699-757.
81. Thomson, B. J. (2001): Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol* 82, 65-76.
82. Tsuzuki, T., Egashira, A., Igarashi, H., Iwakuma, T., Nakatsuru, Y., Tominaga, Y., Kawate, H., Nakao, K., Nakamura, K., Ide, F., Kura, S., Nakabeppu, Y., Katsuki, M., Ishikawa, T., Sekiguchi, M. (2001): Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11456-11461.
83. Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C. (2009): 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 27, 120-139.
84. Vaupel, P., Mayer, A. (2007): Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 26, 225-239.
85. Wang, J. Y., Jin, L., Yan, X. G., Sherwin, S., Farrelly, M., Zhang, Y. Y., Liu, F., Wang, C. Y., Guo, S. T., Yari, H., La, T., McFarlane, J., Lei, F. X., Tabatabaee, H., Chen, J. Z., Croft, A., Jiang, C. C., Zhang, X. D. (2016): Reactive Oxygen Species Dictate the Apoptotic Response of Melanoma Cells to TH588. *J Invest Dermatol* 136, 2277-2286.
86. Wang, X. J., Hayes, J. D., Wolf, C. R. (2006): Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of nrf2 by cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 66, 10983-10994.
87. Warpman Berglund, U., Sanjiv, K., Gad, H., Kalderen, C., Koolmeister, T., Pham, T., Gokturk, C., Jafari, R., Maddalo, G., Seashore-Ludlow, B., Chernobrovkin, A., Manoilov, A., Pateras, I. S., Rasti, A., Jemth, A. S., Almlöf, I., Loseva, O., Visnes, T., Einarsdóttir, B. O., Gaugaz, F. Z., Saleh, A., Platzack, B., Wallner, O. A., Vallin, K. S., Henriksson, M., Wakchaure,

- P., Borhade, S., Herr, P., Kallberg, Y., Baranczewski, P., Homan, E. J., Wiita, E., Nagpal, V., Meijer, T., Schipper, N., Rudd, S. G., Brautigam, L., Lindqvist, A., Filppula, A., Lee, T. C., Artursson, P., Nilsson, J. A., Gorgoulis, V. G., Lehtio, J., Zubarev, R. A., Scobie, M., Helleday, T. (2016): Validation and development of MTH1 inhibitors for treatment of cancer. *Ann Oncol* 27, 2275-2283.
88. Wilson, W. R., Hay, M. P. (2011): Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11, 393-410.
89. Yoshida, S., Ito, D., Nagumo, T., Shirota, T., Hatori, M., Shintani, S. (2009): Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol* 45, 109-115.
90. Yoshimura, D., Sakumi, K., Ohno, M., Sakai, Y., Furuichi, M., Iwai, S., Nakabeppu, Y. (2003): An oxidized purine nucleoside triphosphatase, MTH1, suppresses cell death caused by oxidative stress. *J Biol Chem* 278, 37965-37973.
91. Zhang, X., Song, W., Zhou, Y., Mao, F., Lin, Y., Guan, J., Sun, Q. (2017): Expression and function of MutT homolog 1 in distinct subtypes of breast cancer. *Oncol Lett* 13, 2161-2168.
92. Zhu, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Zweier, J. L., Li, Y. (2005): Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett* 579, 3029-3036.
93. Ziegler, U. (2004): Morphological Features of Cell Death. *News in Physiological Sciences* 19, 124-128.

7 Tabellarischer Anhang

Tabelle 1: Technische Geräte	32
Tabelle 2: Zelllinien	33
Tabelle 3: Puffer und Acrylamidgele.....	33
Tabelle 4: Primärantikörper	35
Tabelle 5: Sekundärantikörper	35
Tabelle 6: shRNA Sequenzen	36
Tabelle 7: Plasmide	37
Tabelle 8: Reagenzien	38
Tabelle 9: Übersicht über die bisher beschriebenen Hemmstoffe von MTH1 und deren Wirkung.....	102

8 Abkürzungsverzeichnis

2-OH-dATP	–	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
5-FU	–	5-Fluorouracil
8-oxo-dG	–	8-Hydroxydesoxyguanosin
8-oxo-dGMP	–	8-Oxo-7,8-Dihydro-2-Deoxyguanosin-5-Monosphat
8-oxo-dGTP	–	8-Oxo-7,8-Dihydro-2-Deoxyguanosin-5-Triphosphat
8-oxo-G	–	8-Oxoguanin, 8 Hydroxyguanin
APE1	–	Apurinische/apyrimidinische Endonuclease 1
APS	–	Ammoniumperoxidsulfat
ARE	–	<i>Antioxidant-responsible Element</i>
ARNT	–	Aryl-Hydrocarbon-Receptor-Nuclear-Translocator
BCA	–	Bichinonin-Säure
BER	–	Basen-Exzisions Reparatur
cDNA	–	komplementäre DNA
CMV	–	Zytomegalievirus
DNA	–	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	–	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMOG	–	Dimethyloxallylglycin
DMSO	–	Dimethylsulfoxid
Dox	–	Doxycyclin
DPBS	–	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DSB	–	<i>Double Strand Break</i>
DTT	–	Dithiothreitol
EDTA	–	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	–	<i>Endothelial Growth Factor Receptor</i>
FBS	–	Fetales Bovines Serum
FIH	–	<i>Factor Inhibiting HIF</i>
GSH	–	Glutathion
<i>Hairpin</i>	–	<i>Small hairpin RNA</i>
HIF	–	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRE	–	<i>Hypoxia-Responsive Element</i>
HRP	–	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
hTERT	–	humane Telomerase Reverse Transkriptase

HUVEC	–	Humane Nabelschnurendothelzellen
IR	–	<i>Ionizing Radiation</i> , Ionisierende Strahlung
KRAS	–	<i>Kirsten Rat Sarcoma</i> , nach der Erstbeschreibung
MTH1	–	MutT Homolog 1
MTT	–	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MUTYH	–	mutY Homolog, mutY DNA Glycosylase
NSCLC	–	<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i> , Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom
NRF2	–	<i>Nuclear Factor Erythroid 2 p45-Related Factor 2</i>
NUDIX	–	<i>Nucleoside Diphosphates Linked To X</i>
OD	–	Optische Dichte
OGG1	–	8-Oxoguanin-Glykosylase 1
PARP	–	poly-ADP-Ribose-Polymerase
PE	–	<i>Plating Efficiency</i>
PFA	–	para-Formaldehyd
PHD	–	Prolyl-Hydroxylase
POLB	–	Polymerase B
PVDF	–	Polyvinylidenfluorid
RIPA	–	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>
ROS	–	<i>Reactive Oxygen Species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
SDS-PAGE	–	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SF	–	<i>Survival Fraction</i> , Überlebensrate
SOD	–	Superoxid-Dismutase
SSB	–	<i>Single-Strand Break</i>
TBS	–	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	–	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	–	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	–	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	–	Von-Hippel Landau

Anmerkung: Diese Arbeit ist auf Deutsch verfasst. Begriffe, für die entweder keine sinnvolle Übersetzung existiert (z. B. *Viability*) oder die im Laboralltag konsequent in ihrer englischen Form Verwendung finden, werden auch in dieser Arbeit entsprechend genutzt. Diese Begriffe sind durch *kursive* Schreibweise gekennzeichnet.

9 Danksagung

Die Arbeit an dieser Dissertation war ein sehr langer Prozess, der bereits 2015, also kurz nach Abschluss des vorklinischen Abschnitts meines Studiums, begonnen hat. In diesen fast 5 Jahren gab es viele Menschen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt und mir die Freude daran erhalten haben.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Eric Metzen für die Möglichkeit danken, am Institut für Physiologie zu promovieren und auch für seine Bemühungen, meine wissenschaftliche Karriere zu gründen und voranzutreiben. Auch Prof. Joachim Fandrey möchte ich für die wissenschaftliche Förderung danken.

Weiterhin sind meine Laborkollegen Phillip Kranz, Alexandra Wolf, Jennifer Baumann, Melanie Baumann, Kirsten Göpelt, Helena Riffkin, Tobias Ocklenburg, Julia Vogel und Christopher Sängler zu nennen, die eine großartige Arbeitsatmosphäre geschaffen haben.

Besonders hervorzuheben ist die ausgezeichnete Betreuung durch meinen *Supervisor* Ulf Brokmeier, dessen Anleitung und Expertise beispiellos war und das bei der Betreuung von Medizinstudenten übliche Maß wohl weit übersteigt.

Zudem möchte ich auch meinen Kommilitonen und Laborkollegen Fabian Claßen und Kira Kleszka einen besonderen Dank aussprechen, denn diese beiden haben maßgeblich zur Qualität der Dissertation als auch der Arbeit im Labor als solcher beigetragen.

Ebenfalls danken möchte ich meiner Freundin Stefanie Brokbals für die viele Geduld und minutiöse Korrektur dieser Arbeit. Auch Kristin Schlautmann möchte ich für die rigorose Rechtschreibkorrektur danken. Natürlich bin ich auch meiner Familie für ihre kontinuierliche und vorbehaltlose Unterstützung dankbar.

Für die intensive Förderung meiner wissenschaftlichen Qualifikation und die Möglichkeit, mein Projekt zu publizieren, möchte ich dem GRK1739 und hier insbesondere Prof. Verena Jendrossek, Dr. Gabriele Siedenburg und Ivonne Schulte sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken.

10 Lebenslauf

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