

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

Direktor: Prof. Dr. Jürgen Dunst

in Kooperation

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

Direktorin: Prof. Dr. Kristina Kusche-Vihrog

**„Einfluss der selektiven Inhibition von CRM1 mittels Selinexor
auf den HIF-Signalweg und die Radiosensibilität von Krebszellen“**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Moritz von Fallois

aus Preetz

Lübeck 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Dunst
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolas von Bubnoff
Tag der mündlichen Prüfung: 18.1.2022
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.1.2022
- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
1 Einleitung.....	1
1.1 Maligne Neoplasien: Herausforderungen auf vielen Ebenen.....	1
1.2 Hypoxie und Hypoxie-induzierbare Faktoren.....	3
1.2.1 Sauerstoff und Hypoxie	3
1.2.2 Hypoxie-induzierbare Faktoren.....	4
1.2.3 Zielgene der Hypoxie-induzierbaren Faktoren	6
1.3 Zelluläre Transportmechanismen am Beispiel von Exportin 1	7
1.3.1 Physiologische Bedeutung.....	7
1.3.2 Bedeutung von CRM1 in neoplastisch entarteten Zellen.....	9
1.3.3 Pharmakologische Inhibitoren von CRM1	9
1.4 Precision medicine am Beispiel des Wirkstoffes Selinexor	10
1.5 Strahlentherapie – historische Entwicklung und heutige Praxis	12
1.6 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Materialien	16
2.1.1 Hersteller.....	16
2.1.2 Geräte.....	17
2.1.3 Chemikalien.....	18
2.1.4 Lösungen und Puffer	20
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.6 Kits.....	22
2.1.7 Zelllinien	22
2.1.8 Antikörper	23
2.1.9 Software	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen	24
2.2.2 Anzucht und Herstellung chemisch kompetenter Zellen	24
2.2.3 Transformation.....	25
2.2.4 Plasmidpräparation	25
2.2.5 Transfektion von Säugerzellen	25

2.2.6 Bestimmung der Zellzahl	26
2.2.7 Gewinnung von Zellfraktionen	26
2.2.8 Proteinbestimmung und Immunoblotanalyse (Western Blot)	26
2.2.9 Densitometrie.....	27
2.2.10 Kernexportinhibition mit Selinexor	27
2.2.11 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion.....	28
2.2.12 Zellviabilitätsassay AlamarBlue™	28
2.2.13 Bestrahlung von Zellen mit Röntgenbremsstrahlung.....	28
2.2.14 Bestimmung der klonogenen Überlebensfraktion nach Bestrahlung	29
2.2.15 Statistische Auswertung	30
3 Ergebnisse	31
3.1 Alamar-Blue Vitalitäts-Assay von Hep3B, MCF-7 und U2OS Zelllinien	31
3.2 Einfluss der CRM1-Inhibition auf die intranukleäre p53-Konzentration	33
3.3 Einfluss der CRM1-Inhibition auf die intranukleäre HIF-1 α -Konzentration	34
3.4 Einfluss der CRM1-Inhibition auf die Expression des HIF-1 α Zielgens <i>SLC2A1</i>	36
3.5 Einfluss der CRM1-Inhibition auf die Strahlensensibilität von Hep3B und U2OS Zellen ..	39
4 Diskussion.....	41
4.1 Der Einfluss der selektiven Kernexport-Inhibition auf die intranukleäre Konzentration von p53	41
4.2 Der Einfluss der selektiven Kernexport-Inhibition auf den HIF-Signalweg.....	43
4.3 Der Einfluss der selektiven Kernexport-Inhibition auf die Strahlensensibilität.....	45
4.4 Resümee und Ausblick	48
5 Zusammenfassung.....	51
6 Literaturverzeichnis.....	53
7 Danksagung	64
8 Curriculum Vitae.....	65

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Krogh-Zylinder

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der HIF-Proteinfamilie

Abbildung 3: Strukturformel Leptomycin B

Abbildung 4: Strukturformel Selinexor

Abbildung 5: Strahleneffekt auf DNA

Abbildung 6: Alamar-Blue-Assay

Abbildung 7: Immunoblotanalyse der relativen intranucleären p53 Konzentration

Abbildung 8: Immunoblotanalyse der relativen intranucleären HIF-1 α Konzentration

Abbildung 9: qRT-PCR

Abbildung 10: Dosiswirkungskurven von DMSO / Selinexor-behandelten Zellen

Tabelle 1: Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basische Helix-loop-Helix-Domäne
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cFID	<i>consensus induced fit docking</i> , Computersimulationsmethode
cm	centimeter, Zentimeter
CAD	C-terminale Transaktivierungsdomäne
CRM1	chromosome region maintenance 1
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
<i>et al.</i>	<i>et alli/ et alliae</i> , und andere
F	Phenylalanin, Aminosäure
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , amerikanische Arzneimittel- und Lebensmittelbehörde
FKS	fötale Kälberserum
G	Glycin, Aminosäure
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm

GAP	GTPase aktivierendes Protein
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i> , GTP-Austauschfaktor
GTP/GDP	Guanosintri-/diphosphat
GLUT-1	Glucosetransporter 1
Gy	Gray
h	hour, Stunde
HCl	Salzsäure
HIF	hypoxia inducible factor, Hypoxie-induzierbarer Faktor
HOX	Hypoxie
H ₂ O	Wasser
HRE	hypoxia responding element, Hypoxie-regulierte Einheit
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
I	Isoleucin
IPAS	Inhibitory PAS Domain protein
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kDa, MDa	Kilodalton, Megadalton
L	Leucin
LMB	Leptomycin B
m	Meter
M	Methionin
M	Mol pro Liter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mmol	Millimol
mol	Mol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NAD	N-terminale Transaktivierungsdomäne
NES	nuclear export signal, Kernexportsignal
NLS	nuclear localisation signal, Kernlokalisierungssignal
NOX	Normoxie
NPC	Nuclear pore complex
NSCLC	<i>Non small cell lung cancer</i> , Nicht kleinzelliges Bronchial Karzinom
NUPs	nuclear proteins
O ₂	Sauerstoff
ODDD	<i>oxygen dependant degradation domain</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Per-Arnt-Sim-Domäne
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDK1	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1
PFK1	Phosphofruktokinase 1
PE	Plattierungseffizienz
PHD 1 - 3	Prolyl-4-Hydroxylase 1, 2 und 3
PM	<i>Precision medicine</i> , Präzisionsmedizin
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pVHL	von-Hippel-Lindau Protein

qRT-PCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RanBP 1, 2	Ran-bindendes Protein 1 und 2
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> , Eigenname, Zellkulturmedium
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate, Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SINE	selective inhibitor of nuclear export, Selektiver Kernexportinhibitor
<i>SLC2A1</i>	solute carrier family 2 member 1 = für GLUT-1 kodierendes Gen
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
V	Valin
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
XPO-1	Exportin-1
$\mu\text{g}/\mu\text{l}/\mu\text{m}$	Mikrogramm/Mikroliter/Mikrometer
μM	Mikromol pro Liter
μmol	Mikromol

1 Einleitung

1.1 Maligne Neoplasien: Herausforderungen auf vielen Ebenen

Mit 231.318 Todesfällen von insgesamt 939.520 Todesfällen waren bösartige Neoplasien im Jahr 2019 in der Bundesrepublik Deutschland weiterhin die zweithäufigste zum Tode führende Erkrankung nach Leiden des kardiovaskulären Systems [1]. Weltweit liegen bösartige Neoplasien in der geschätzten Todesursachenstatistik der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) auf Platz drei etwa gleichauf mit den durch chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen verursachten Todesfällen [2]. Maligne Neoplasien stellen somit eine fortbestehende medizinische sowie aufgrund des damit verbundenen ökonomischen Aufwands volkswirtschaftliche Herausforderung dar.

Aus medizinischer Sicht eröffnet sich ein weites Feld an Therapieansätzen beginnend bei der operativen Therapie, über die medikamentöse Therapie bis hin zur Strahlentherapie. Darüber hinaus bestehen durch die Fortschritte in der Molekularbiologie der letzten Jahrzehnte immer mehr Möglichkeiten einer individualisierten Therapie für den einzelnen Patienten. Therapeutische Ansätze, die zum Beispiel aufgrund genetischer Merkmale für Patient A infrage kommen könnten, sind unter Umständen bei Patient B aufgrund anderer Merkmale nicht erfolgsversprechend. Derart individualisierte Ansätze werden heute im Forschungsfeld der *Precision Medicine* (PM) verfolgt [3].

Um diese Therapieansätze verstehen zu können, soll im Folgenden zunächst auf die Grundgemeinsamkeiten aller bösartigen Neoplasien eingegangen werden. Danach wird die Wirkung des noch neuen Wirkstoffs Selinexor als potentiellen Vertreter der PM vorgestellt. Am Beispiel des Signalwegs der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) soll eine Perspektive für einen therapeutischen Ansatz auch in Kombination mit der Strahlentherapie aufgezeigt werden.

Hanahan und Weinberg beschrieben als Erste die sechs typischen „Markenzeichen“ von Krebszellen [4]:

1. ein unbegrenztes Wachstumspotential,
2. Unabhängigkeit,
3. die Fähigkeit zur Angiogenese,

4. die Verhinderung von Apoptose,
5. ein invasives Wachstum und
6. die Fähigkeit zur Metastasierung.

Darüber hinaus stellten sie fest, dass Krebserkrankungen diese Charakteristika vor allem aufgrund von angeborenen oder erworbenen genetischen Mutationen oder Schäden der Desoxyribonukleinsäure (DNA) erlangen [5].

Der DNA-Schaden kann dabei endogen, also beispielsweise im Rahmen einer Keimbahnmutation, oder exogen durch chemische oder physikalische Noxen wie zum Beispiel Arzneistoffe oder Strahlung bedingt sein [6]. Um Folgeschäden zu verhindern und auch die Vererbung in weitere Generationen zu vermeiden, verfügen Zellen über Reparaturmechanismen und haben, sofern diese nicht mehr genügen, prinzipiell die Möglichkeit in einen Zellzyklusarrest einzutreten oder bei irreparablem Schaden die durch Kerr *et al.* erstbeschriebene Apoptose, also den geregelten Zelltod, einzuleiten [7]. Hauptregulator für diese Abläufe ist das Tumorsuppressorprotein p53 [8].

Überdies wird das häufig ungehinderte Wachstum von Neoplasien durch ihre Fähigkeit zur Angiogenese unterstützt. Diese wird durch eine zunehmende Gewebshypoxie des unkontrolliert wachsenden Tumors angestoßen. Wichtige Transkriptionsfaktoren als Schlüssel dafür sind die Hypoxie-induzierbaren Faktoren.

Die Bedeutung von Tumorhypoxie als wichtiger prognostischer Marker und dessen wichtige Rolle für die Strahlensensitivität wurde schon früh erkannt. Die dänische Head and Neck Cancer Study Group untersuchte von 1979 bis 1985 den Wirkstoff Misonidazol an Patienten mit Larynx- und Pharynx-Karzinomen in einer kombinierten Radiochemotherapie (DAHANCA 2 Studie) [9]. In dieser und in einer weiteren Studie der DAHANCA-Studiengruppe - diesmal mit dem Wirkstoff Nimorazol - konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen einer niedrigen Hämoglobin-Konzentration der Patienten und schlechterem Gesamtüberleben besteht. Dabei konnten beide Wirkstoffe einen Nutzen als sogenannte *Radiosensitizer* zeigen [10].

1.2 Hypoxie und Hypoxie-induzierbare Faktoren

1.2.1 Sauerstoff und Hypoxie

Sauerstoff (O_2) macht mit 20,9% nach Stickstoff (N_2 , 78,1%) den zweitgrößten Anteil der Luft innerhalb der Erdatmosphäre aus. Daraus resultiert ein Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von 160mmHg auf Meereshöhe. Im arteriellen System des Menschen besteht ein pO_2 von 75-95mmHg, welcher beim Gesunden für eine ausreichende Oxygenierung der Gewebe sorgt. Aufgrund der physiologischen Sauerstoffbindungskurve nimmt der Sauerstoffgehalt des Hämoglobins im Gewebe ab. Entlang der Blutkapillare bis in das venöse System, sowie senkrecht und mit zunehmendem Abstand zur Kapillare kommt es entsprechend dem Krogh-Zylinder-Modell (**Abbildung 1**) zu einem Abfall des pO_2 , sodass je nach Ausprägungsgrad der Kapillarisation und je nach pO_2 eine Gewebshypoxie resultieren kann [11].

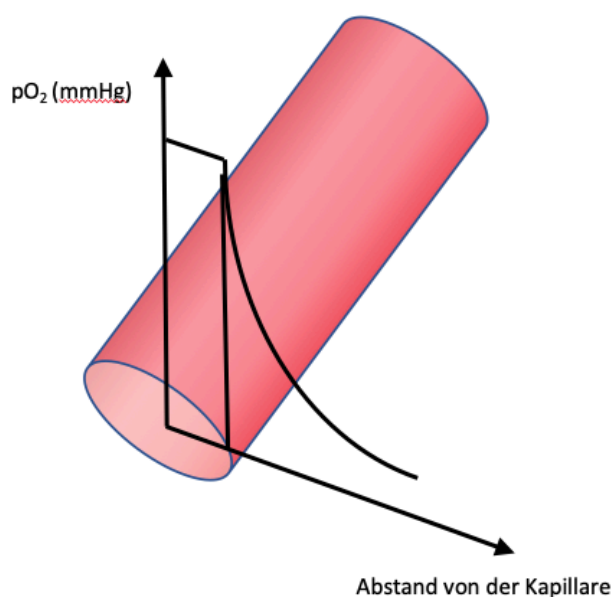


Abb. 1: Schematische Darstellung der Sauerstoffbindungskurve am Krogh-Zylinder-Modell modifiziert nach Silbernagel *et al.* [12].

Sauerstoff dient als Oxidationsmittel für biochemische Prozesse. Entscheidend für das pflanzliche und tierische Leben, sowie für das Überleben vieler Mikroorganismen ist dabei die oxidative Phosphorylierung als chemisches Korrelat der biologischen Atmung, die sogenannte Atmungskette. Sie dient der Bildung von Adenosintriphosphat (ATP), welches wiederum als Energieträger für nachfolgende biochemische Prozesse notwendig ist [13].

Bei länger anhaltender Hypoxie kommt es zu einem verstärkten Atemantrieb, welcher aufgrund der gesteigerten Atemfrequenz eine konsekutive Hypokapnie zur

Folge hat. Es resultiert eine respiratorische Alkalose, welche metabolisch kompensiert werden kann. Dabei nimmt die Mitochondriendichte im Muskelgewebe zu und die Kapillarisation des Muskelgewebes wird erhöht.

Grundlage dafür ist die sauerstoffabhängige Regulierung nachgeschalteter Prozesse in den einzelnen Zellen durch die Familie der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF), welche im Folgenden eingehender beschrieben wird.

1.2.2 Hypoxie-induzierbare Faktoren

Hypoxie-induzierbare Faktoren dienen sowohl physiologischen wie auch pathologischen Prozessen mit ihrem nachgeschalteten Signalweg als sensibles Instrument, um die einzelne Zelle und den Gesamtorganismus an Sauerstoffmangelsituationen anzupassen. Durch Aktivierung von HIFs kommt es in der Folge zu einer verbesserten Versorgung der Zelle mit Nährstoffen, einer Verstärkung der Angiogenese und einer Förderung der Zellmigration, um so Anschluss an suffizient versorgte Regionen zu erhalten [14-16].

Darüber hinaus sind viele Tumorzellen aber in der Lage sich über den HIF-Signalweg der Notwendigkeit einer suffizienten Sauerstoffversorgung zu entziehen. Eine niedrige Sauerstoffkonzentration innerhalb des Tumors ist in vielen Entitäten wie zum Beispiel beim Mamma-Karzinom oder den bereits erwähnten Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert [9, 10, 17].

HIFs sind Teil einer Familie basischer Helix-Loop-Helix-Proteine (bHLH) und binden als Transkriptionsfaktoren an Hypoxie-Responsive-Elemente (Hypoxia responding elements, HREs) in den Promotor- und Enhancer-Regionen ihrer Zielgene, welche allesamt die gleiche Kernsequenz 5'-RCGTG-3' aufweisen.

HIFs bestehen aus einer gemeinsamen konstitutiv exprimierten β -Einheit (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, ARNT, HIF- β), sowie drei verschiedenen α -Einheiten, aus denen sich $\alpha\beta$ -Dimere bilden [18]. Dabei konnte bisher gezeigt werden, dass HIF-1 α sowie HIF-2 α sowohl gemeinsame als auch für den jeweiligen Faktor spezifische Zielgene besitzen. Derweil scheint HIF-3 α sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte zu haben [19].

N-terminal gelegen befindet sich bei allen HIF-Proteinen die bHLH-Sequenz, welche für die Bindung an die HRE-Zielsequenzen verantwortlich ist. Es folgt die für die Dimerisierung entscheidende Per-Arnt-Sim (PAS) - Domäne. Sie kommt in sämtlichen Lebensformen vor und ist wichtig für die Bindung weiterer Faktoren. Weiter C-terminal gelegen ist die sogenannte *oxygen dependent degradation domain* (ODDD) - Sequenz. Sie ist zusammen mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (NAD) wichtig für die Degradierung. Alle Subtypen der HIF- α Familie beinhalten eine Kernlokalisations-Sequenz (nuclear localization signal, NLS), welche aufgrund der Größe des Proteins für den gerichteten Transport zwischen den zellulären Kompartimenten unerlässlich ist [20]. HIF-1 α und HIF-2 α verfügen zusätzlich über eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (CAD).

HIF-3 α existiert in einer weiteren Splice-Variante unter dem Namen IPAS (Inhibitory PAS Domain protein). IPAS interagiert direkt mit HIF-1 α und verhindert die Dimerisierung mit HIF-1 β [21]. Darüber hinaus interagiert IPAS scheinbar mit HIF-1 β und bildet einen transkriptionell inaktiven und zur hypoxischen Antwort antagonistisch wirkenden Komplex [22, 23]. Eine schematische Darstellung der Proteinstrukturen findet sich in **Abbildung 2**.

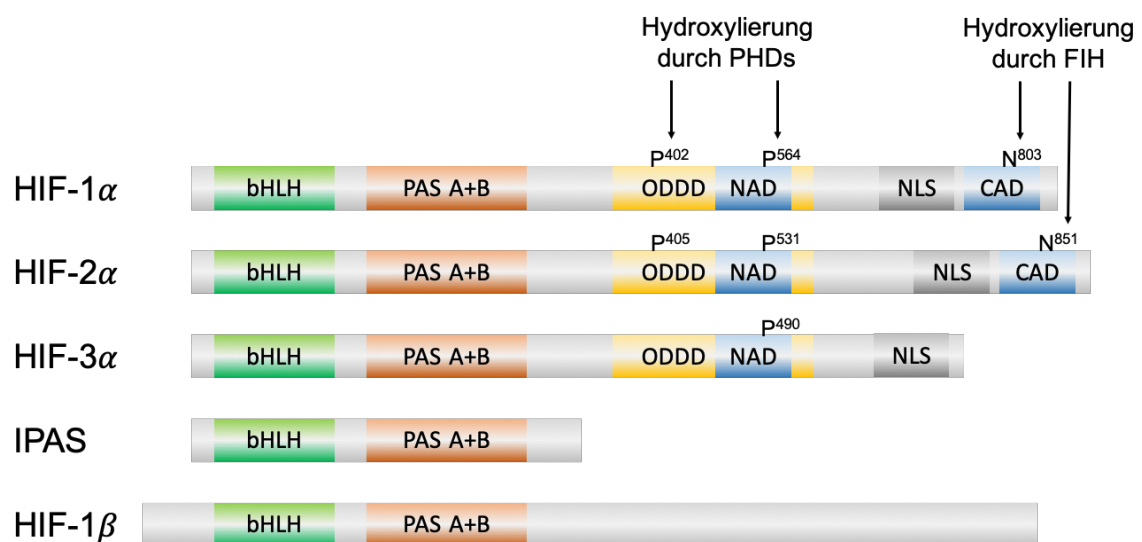


Abb. 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Proteine der HIF-Familie modifiziert nach Lisy *et al.*

Reguliert wird die HIF- α Aktivität durch eine Enzymfamilie mit Prolylhydroxylase-Domäne (PHD1, PHD2, PHD3), welche die jeweils zwei spezifischen Prolylreste

von HIF- α s hydroxylieren können. Dabei sind O₂, Ascorbat, Eisen(II) und 2-Oxoglutarat wichtige Cofaktoren dieser sowohl im Zytosol als auch im Zellkern stattfindenden Reaktion [24, 25]. Durch das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) werden die hydroxylierten Aminosäuren ubiquitinyliert und die Proteine so zum proteasomalen Abbau markiert. Unter Normoxie beträgt die zelluläre Halbwertszeit von HIF-1 α und HIF-2 α weniger als fünf bis acht Minuten [26-28]. Unter den drei bekannten PHD-Isoenzymen scheint PHD2 das entscheidende Enzym in der Regulation der HIF-1 α -Untereinheit im Zellkern zu sein [29]. Die HIF- α -Untereinheit wird unter Normoxie abgebaut und ist damit für die Aktivität der HIF-Dimere verantwortlich [30]. Mit abfallendem Sauerstoffpartialdruck kommt es somit zu einer Stabilisierung der HIF-Dimere, einer Steigerung ihrer Aktivität und einer konsekutiven Aktivierung von HREs.

Darüber hinaus ist die HIF-Aktivität auch von der subzellulären Lokalisation der einzelnen HIF-Proteine abhängig. In Immunfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass sich HIFs infolge von Hypoxie im Zellkern anreichern [31]. Taylor *et al.* konnten sogar zeigen, dass sich HIF-1 α und HIF-2 α im Zellkern zur gleichen Zeit nach verschiedenen Mustern anreichern [32].

1.2.3 Zielgene der Hypoxie-induzierbaren Faktoren

Von besonderer Bedeutung für die Tumorgenese sind jene Zielgene, welche eine Expansion und eine Vaskularisierung des Tumors fördern und somit das Mikromilieu des Tumors aufrechterhalten. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bisher zeigen, dass die Aktivierung des HIF-Signalwegs zu einer verstärkten Angiogenese führt [33-35].

Dazu bedarf es primär einer suffizienten Versorgung mit Nährstoffen. Über den HIF-Signalweg kommt es zu einer verstärkten Transkription des für den Glucose-Transporter GLUT1 kodierenden Gens *SLC2A1*, wodurch eine erhöhte insulinunabhängige Glucoseaufnahme in die Zelle ermöglicht wird [34]. Weiterhin werden durch den HIF-Signalweg die Transkription der für die Enzyme Aldolase und Phosphofruktokinase 1 (PFK1) kodierenden Gene gesteigert, sodass ein verstärkter Metabolismus der Glucose ermöglicht wird [36]. Durch die Inhibierung des Zielgens für die Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1) hemmen

HIFs die oxidative Phosphorylierung und die Entstehung toxischer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [37].

Nachdem nun einerseits dargelegt wurde, dass HIFs eine wichtige Rolle im Überleben und der Expansion von neoplastischen Zellen spielen, konnte wiederum auch gezeigt werden, dass die experimentell herbeigeführte Degradierung von HIF einen Untergang von Tumorzellen zur Folge hat und zu einem Rückgang von transkriptionellen Faktoren wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und epidermalen Wachstumsfaktoren (*epidermal growth factor*, EGF) führt [38].

Diese Eigenschaften machen HIFs zu potentiellen therapeutischen Zielen in der Behandlung von Krebserkrankungen. Als Ansatzpunkt könnte eine Beeinflussung der subzellulären Lokalisation von HIF-Proteinen dienen. Dazu soll im Folgenden näher auf zelluläre Transportmechanismen eingegangen werden.

1.3 Zelluläre Transportmechanismen am Beispiel von Exportin 1

1.3.1 Physiologische Bedeutung

Eukaryotische Zellen besitzen verschiedene Kompartimente, in denen jeweils spezifische Prozesse zur Aufrechterhaltung der Funktion der einzelnen Zelle und des Gesamtorganismus ablaufen. In erster Linie lassen sich dabei der Nucleus, also der Zellkern, vom Zytoplasma unterscheiden. Der Nucleus ist von einer inneren und einer äußeren Membran umgeben [39], wodurch verhindert wird, dass sich Makromoleküle ab einer bestimmten Größe zwischen den Kompartimenten frei bewegen können. Als Verbindung zwischen Zellkern und Zytoplasma bestehen Kernporenkomplexe (*Nuclear pore complexes*, NPCs), welche einen gerichteten Transport in und aus dem Zellkern heraus ermöglichen. Sie besitzen eine Masse von etwa 125MDa und bestehen aus etwa 100 verschiedenen Proteinen, den sogenannten Nucleoporinen (*nuclear proteins*, NUPs) [40]. Dabei existieren Ankerproteine, welche die Poren in der Membran fixieren, Strukturproteine, welche die eigentliche Pore, ein Korb-artiges Makromolekül, bilden sowie Protein-Filamente, welche auf der Innen- und Außenseite des Kerns in den transmembranären Transport involviert sind. Sie bestehen aus repetitiven Sequenzen der Aminosäuren Phenylalanin (F) und Glycin (G), werden daher als

FG-NUPs bezeichnet, und verfügen über keine Sekundärstruktur [41]. Die FG-Bereiche bilden hydrophobe Abschnitte im Gesamtproteinkomplex und tragen so nach aktueller Vorstellung als sogenanntes „*Oily Spaghetti*“-Modell zur Barrierefunktion bei [42, 43].

Teilchen und Proteine bis zu einer Größe von 40kDa oder bis zu einem Diameter von 5nm können frei durch den NPC wandern, während größere Moleküle eines gerichteten, enzymatisch getriebenen Transports durch lösliche Rezeptoren bedürfen [44, 45]. Ein Großteil dieser Enzyme ist der Familie der β -Karyopherine zuzuordnen. Jedes einzelne Karyopherin erkennt bestimmte Gruppen von Proteinen oder Ribonucleinsäure (ribonucleic acid, RNA). Dazu besitzen diese Moleküle in ihrer Struktur ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) oder ein Exportsignal (nuclear export signal, NES). Das NES wurde erstmalig 1995 durch Fischer *et al.* im humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) nachgewiesen [46]. Unter den Kern-Zytoplasma-Transportsignalen konnten bisher drei Klassen identifiziert werden, welche unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Dabei existiert unter anderem ein NES, welches über einen hohen Anteil der Aminosäuren Leucin (L), Isoleucin (I), Methionin (M), Phenylalanin und Valin (V) verfügt und sehr hydrophob ist [47]. Es scheint zwischen den verschiedenen Varianten dieses NES starke Unterschiede in der Aminosäuren-Sequenz zu geben, doch konnte das gemeinsame Motiv $HX_{2-3}HX_{2-3}HXH$ gezeigt werden, bei dem H einer der oben genannten hydrophoben Aminosäuren und X einer beliebigen Aminosäure entspricht [48, 49].

Dieses NES wird spezifisch durch das Kernexportprotein Exportin-1 (XPO-1) erkannt, welches auch als Chromosome maintenance region 1 (CRM1) bezeichnet wird. Nach aktuellem Kenntnisstand ist CRM1 am Transport von fast 300 verschiedenen Proteinen beteiligt, darunter Transkriptionsfaktoren, ribosomale Untereinheiten, Signalmoleküle, RNAs und weitere Moleküle [50].

Die Komplexbildung zwischen dem NES und den Karyopherinen und die anschließende Dissoziation erfordert als aktiver Prozess viel Energie. Diese wird durch den RanGTP-GDP-Zyklus bereitgestellt. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) bewirken eine Konformationsänderung des Ran-Proteins, wodurch die intrinsische Hydrolyse gesteigert wird. Zudem stimulieren die Ran-bindenden Proteine 1 und 2 (RanBP1, 2) die GTP-Hydrolyse. Anschließend wird die

Dissoziation von GDP im Tausch gegen GTP durch Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) katalysiert [40, 51].

1.3.2 Bedeutung von CRM1 in neoplastisch entarteten Zellen

Eine erhöhte Expression von Kerntransportern in neoplastisch entartetem Gewebe ist mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet. So konnte auf Seiten der Importine gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Importin-beta1 zu einer verstärkten Proliferation und Chemoresistenz in Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen führt [52].

Eine Überexpression des Kernexportproteins CRM1 konnte unter anderem in Pankreas-, Magen-, Lungen-, Prostata-, Ovarial- und Zervixkarzinomen nachgewiesen werden und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert [53-58].

Auch in hämatoonkologischen Entitäten ist eine Veränderung bezüglich der CRM1-Expression zu beobachten [45, 58-62].

CRM1 kommt dabei neben anderen Kerntransportern eine wichtige Rolle in der Regulation zellulärer Signalkaskaden zu. Depping *et al.* legten in einer Übersichtsarbeit dar, dass der HIF-Signalweg unter anderem durch Kerntransporter wie zum Beispiel CRM1 reguliert wird [20].

1.3.3 Pharmakologische Inhibitoren von CRM1

Die Zusammenhänge zwischen der Funktion von CRM1, gewissermaßen als „Türsteher“ zwischen Zellkern und Zytoplasma, und grundlegenden zellulären Prozessen machen CRM1 zu einem vielversprechenden Ziel für die Entwicklung neuer Krebstherapien.

Als erster Inhibitor von CRM1 wurde 1984 Leptomycin B (LMB, **Abbildung 3**) identifiziert, welches beim Versuch, ein neues Antibiotikum zu generieren, aus *Streptomyces* Bakterien isoliert wurde [63, 64]. LMB alkyliert über eine kovalente Bindung einen Cystein-Rest von CRM1 an Position 528 und blockiert so die Bildung des CRM1-NES-RanGTP-Komplexes, sodass ein Export verhindert wird [65, 66]. In *In-vitro* Studien an HeLa-Zellen konnte eine signifikante Wachstumshemmung unter

Behandlung mit LMB im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden und im Mausmodell konnten Mäuse mit vorher induzierter Peritonealkarzinose mittels LMB-Gabe geheilt werden [67].

Newlands *et al.* konnten allerdings in einer Phase I Studie keinen positiven therapeutischen Effekt nachweisen. Es zeigten sich lediglich auf Ebene der Tumormarker zeitweilige Veränderungen. So kam es bei einer Patientin mit einem Ovarial-Karzinom zu einem transienten Abfall des Tumormarkers CA.125. Zudem kam LMB (Handelsname: Elactocin) als Wirkstoff aufgrund toxischer Nebenwirkungen nicht infrage. Es kam zu Übelkeit, massivem Erbrechen, Gewichtsverlust und einer damit einhergehenden Allgemeinzustandsverschlechterung [68].

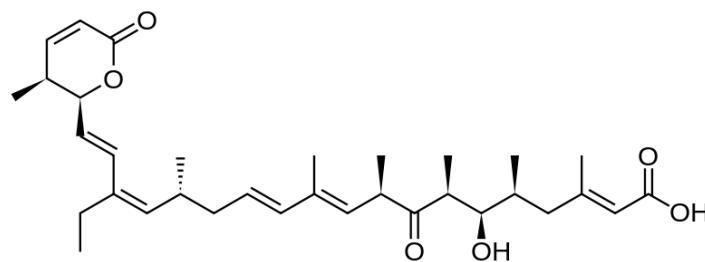


Abb. 3: Strukturformel Leptomycin B, $C_{33}H_{48}O_6$

In der Folge wurden weitere Inhibitoren teilweise auch als Abkömmlinge von LMB entwickelt, darunter unter anderem Ratjadon, Anguinomycin und KOS2464. Letzterer Wirkstoff zeigte im Mausmodell signifikante Effekte in verschiedenen hämatologischen und soliden Tumoren, konnte aber bis heute keine klinische Bedeutung erlangen [69].

1.4 Precision medicine am Beispiel des Wirkstoffes Selinexor

Nachdem mit CRM1 ein vielversprechendes Therapieziel identifiziert war, bisherige Inhibitoren aber klinisch keine Bedeutung gewinnen konnten, versuchte man konsequenterweise, selektive Inhibitoren mit möglichst geringen toxischen Effekten zu entwickeln.

Mittels des *consensus-induced fit docking* (cFID) konnte zunächst am Computer simuliert werden, welche Moleküle potentiell mit CRM1 interagieren könnten. Die Familie der selektiven Kernexportinhibitoren (selectiv inhibitors of nuclear export, SINE) war entstanden und hatte mit KPT-330 (Internationaler Freiname, INN und im Folgenden: Selinexor) und KPT-335 (INN: Verdinexor) rasch potente Vertreter. Selinexor (Strukturformel $C_{17}H_{11}F_6N_7O$, **Abbildung 4**), mit Handelsnamen Xpovio, ist dabei ein Akronym für einen „selective inhibitor of nuclear export“. Wie Leptomycin B bindet auch Selinexor kovalent an Cystein-Rest 528 von CRM1, unterscheidet sich aber unter anderem dahingehend, dass die Bindung zwischen Selinexor und CRM1 langsam reversibel ist [70].

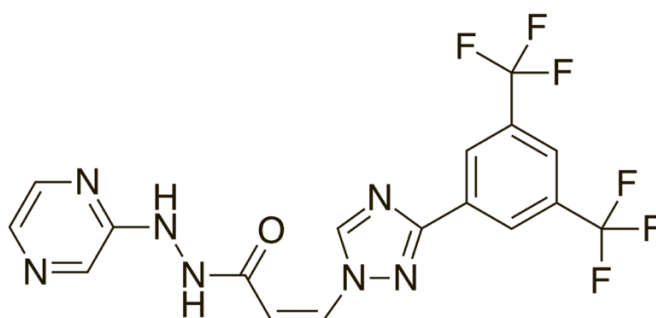


Abb. 4: Strukturformel von Selinexor, $C_{17}H_{11}F_6N_7O$

Zwei Phase I-Studien zeigten im Jahre 2016 insgesamt wenig Nebenwirkungen bei der Einnahme von Selinexor, was mit der reversiblen Bindung an CRM1 erklärt wurde. Zudem zeigten sich bei Patienten mit Knochen- und Weichgewebs-Sarcomen in 33% der Fälle eine Stabilisierung der Tumorerkrankung [71, 72]. In der Folge konnte in weiteren Tumorentitäten das Potential von Selinexor bestätigt werden. Sun *et al.* zeigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* positive Effekte im Mausmodell beim Nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinom (Non-small cell lung cancer, NSCLC) [73].

Selinexor ist seit Juli 2019 von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) in Kombination mit dem Kortikosteroid Dexamethason zur Therapie des refraktären Multiplen Myeloms bei Erwachsenen zugelassen [74].

1.5 Strahlentherapie – historische Entwicklung und heutige Praxis

Mit der Auszeichnung von Wilhelm Conrad Röntgen mit dem ersten Nobelpreis für Physik im Jahre 1901 für die Entdeckung der Röntgenstrahlung sechs Jahre zuvor war auch die Hoffnung verknüpft, diese neuen Entdeckung medizinisch einsetzen zu können.

Versuche von Röntgen konnten früh zeigen, dass ein im wahrsten Sinne des Wortes „Durchleuchten“ von Menschen bzw. Körperteilen von außerordentlichem diagnostischem Wert ist. Es entstanden die ersten konventionellen Röntgenaufnahmen, deren grundsätzliches Prinzip bis heute weiter genutzt wird. Ebenso stellte sich aber alsbald heraus, dass die „neue Art von Strahlen“ Nebenwirkungen wie Haarausfall oder Dermatitisen mit sich brachte [75]

Daraus leitete sich schon im Jahre 1897 der erste therapeutische Einsatz der Röntgenstrahlung bei einem Naevus pigmentosus piliferus eines fünfjährigen Mädchens durch Leopold Freund ab [76]. Es folgte 1925 die Errichtung des ersten Vorläufers eines Bestrahlungsgerätes in Erlangen, welches es ermöglichte die Röntgenröhre um den Patienten herumzubewegen; man bezeichnete dies als „Kreuzfeuerbestrahlung“.

Bei der heute in der Radiotherapie angewandten Strahlung handelt es sich in der Regel um ionisierende Strahlung. Das heißt die Strahlen führen in den erfassten Geweben zur Ionisation von Teilchen. Dies führt einerseits zu direkten Schäden an der DNA in Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen. Letztere sind den zelleigenen Reparaturmechanismen nicht zugänglich und führen zu einem Absterben der Zelle einerseits über die Apoptose und auch über den mitotischen Tod, da eine Replikation der geschädigten DNA in der Regel nicht mehr gelingt [77]. Dabei korreliert die Strahlensensibilität mit der Anzahl der entstandenen DNA-Schäden [78].

Andererseits kommt es durch die Ionisierung zur Ausbildung von toxisch wirkenden freien Radikalen (**Abbildung 5**).

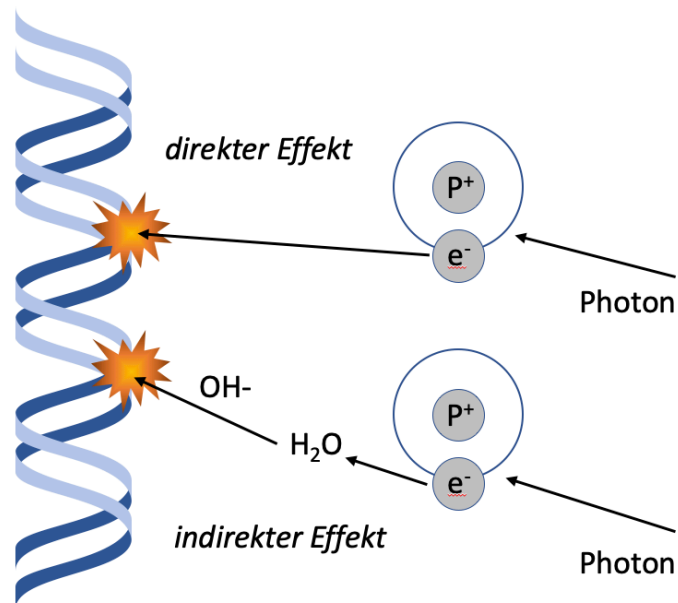


Abb. 5: Schematische Darstellung des durch Strahlung hervorgerufenen direkten und indirekten Effekts an der DNA modifiziert nach Y. Ogawa [79].

In der Folge kommt es über Tage bis Monate zur Induktion eines Zelltods, sodass noch lange nach Ende eines Bestrahlungsregimes ein relevanter Effekt der durchgeführten Behandlung erwartet und einkalkuliert wird.

Unvermeidlich ist dabei eine Schädigung von gesundem Gewebe. Man macht sich aber zunutze, dass gesunde Zellen im Gegensatz zu Krebszellen in der Lage sind, Schäden an ihrer DNA bis zu einem gewissen Maße im Rahmen ihres üblichen Replikationsprozesses zu reparieren. Dies ist entarteten Zellen häufig aufgrund ihrer extrem gesteigerten Teilungsrate nicht oder zumindest nur teilweise möglich.

Dieser Effekt ist von Bedeutung für die sogenannte Fraktionierung. Dabei kann die benötigte Gesamtdosis für eine Tumorentität auf multiple Einzeldosen zwischen 1 – 3 Gray (Gy) aufgeteilt werden. Der Schaden pro Fraktion kann so relativ gering ausfallen. Es ergibt sich aber ein Summationseffekt, welcher vor allem Krebszellen aufgrund ihrer hohen Mitoserate stark betrifft [80].

Die Einsatzgebiete der Bestrahlung sind heute vielseitig. Um Tumore einer chirurgischen Resektion besser zugänglich zu machen, hat sich für einige Entitäten das Prinzip der neoadjuvanten Bestrahlung etabliert. Dabei wird der Patient zunächst bestrahlt, wodurch man sich eine Verkleinerung des Tumors und damit Verbesserung der Operabilität erhofft.

Die adjuvante Therapie, das heißt die Bestrahlung nach stattgehabter chirurgischer Resektion des Tumors, hat zum Ziel, mikroskopische und damit nicht-sichtbare Tumorreste sicher zu beseitigen. Sie findet zum Beispiel in der Therapie des operablen Mamma-Karzinoms oder auch beim Prostata-Karzinom Anwendung.

Auch in der Palliativmedizin spielt die Bestrahlung eine wichtige Rolle, da sie zum Beispiel das Wachstum von Knochenmetastasen bremsen oder aber auch tumorbedingte Schmerzen lindern kann [81].

Eine Sonderform der Strahlentherapie ist die Brachytherapie. Sie unterscheidet sich von der oben beschriebenen Strahlentherapie insofern, als dass bei ihr die Strahlenquelle beispielsweise mittels Katheter-Technik temporär in unmittelbare Nähe des Tumors gebracht wird und dort wirkt. Sie findet v.a. in der Gynäkologie und bei Prostata-Karzinomen Anwendung. Aber auch andere Tumore, wie zum Beispiel im oropharyngealen Bereich sind unter Umständen sehr gut mittels Brachytherapie zu therapieren.

Eine weitere mögliche Therapie ist die Radiochemotherapie, bei der Chemotherapeutika simultan während einer Bestrahlungsserie verabreicht werden mit dem Ziel einer selektiven Verstärkung der Strahlenwirkung in Tumorzellen. Für zahlreiche Tumorentitäten ist diese simultane Radiochemotherapie mittlerweile die Standardtherapie, und die Kombination hat wesentliche Verbesserungen der Langzeit-Heilungsraten erbracht. Die simultane Chemotherapie in Kombination mit Strahlentherapie ist oft erfolgreicher als eine adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapie. Zahlreiche neue Substanzen befinden sich in klinischer Prüfung, u.a. Medikamente, die die DNA-Reparatur hemmen oder spezifische, durch Bestrahlung hochregulierte Signalwege hemmen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Es soll im Rahmen dieser Dissertation der Versuch unternommen werden, die Zusammenhänge zwischen der Inhibition des Kernexportproteins CRM1 und dem HIF-Signalweg, sowie etwaige Effekte auf die Strahlensensitivität genauer zu untersuchen.

Aufbauend auf den nun beschriebenen theoretischen Grundlagen werden im Folgenden zwei Hypothesen aufgestellt:

1. Eine selektive Inhibition von CRM1 mittels Selinexor hat einen hemmenden Effekt auf den HIF-Signalweg.
2. Infolge der CRM1-Inhibition kommt es über Inhibition des HIF-Signalwegs zu einer gesteigerten Strahlensensitivität von Krebszellen *in vitro*.

Diese Studie soll damit *in vitro* neue Erkenntnisse liefern, um insbesondere den Zusammenhang zwischen Kernexportinhibition und Hypoxie genauer zu verstehen. Auf Grundlage dieser Daten soll eine Perspektive zur Verbesserung zukünftiger Strahlentherapien aufgezeigt werden.

In Zusammenschau aller Ergebnisse soll ein weiterer Beitrag zum Verständnis von Krebserkrankungen und zur Optimierung ihrer Therapien geleistet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Hersteller

Abcam plc	Cambridge, Großbritannien
Air Liquide Deutschland GmbH	Düsseldorf, Deutschland
AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Berthold Technologies GmbH & Co. KG	Bad Wildbad, Deutschland
Bioline GmbH	Luckenwalde, Deutschland
Bio-Rad Laboratories Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Carestream Healthcare Inc.	Rochester, New York, USA
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Elysia-raytest GmbH	Straubenhardt, Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
GraphPad Software	San Diego, Kalifornien, USA
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Eberstadt, Deutschland
Honeywell Fluka GmbH	Seelze, Deutschland
BD Transduction	San Jose, Kalifornien, USA
Dako / Agilent	Santa Clara, Kalifornien, USA
Gerbu Biotechnik GmbH	Gaiberg, Deutschland
Gibco / Life technologies AG	Carlsbad, Kalifornien, USA
Jena Bioscience GmbH	Jena, Deutschland
Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Microsoft Corporation	Redmond, Washington, USA

New England Biolabs GmbH	Frankfurt a.M., Deutschland
Nexcelcom Bioscience LTD.	Lawrence, Massachusetts, USA
Novus Biologicals	Littleton, Colorado, USA
Nunc GmbH & Co. KG	Wiesbaden, Deutschland
PCRmax LTD.	Stone, Großbritannien
Pechiney Plastic Packaging Inc.	Menasha, Wisconsin, USA
Elysia-raytest GmbH	Straubenhardt, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology	Dallas, Texas, USA
Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Scotsman Ice Systems	Vernon Hills, Illinois, USA
Sigma-Aldrich corp.	St. Louis, Missouri, USA
Silvercrest / Targa GmbH	Soest, Deutschland
Systec GmbH	Linden, Deutschland
Thermo Fisher Scientific Inc.	Langenselbold, Deutschland
TSI GmbH & Co. KG	Zeven, Deutschland
Uniequip Laborgerätebau u. -Vertriebs GmbH	Planegg, Deutschland
Varian Medical Systems Inc.	Palo Alto, Kalifornien, USA

2.1.2 Geräte

Flockeneisbereiter AF-100	Scotsman Ice Systems
Folienschweißgerät G 7883 CD	Silvercrest / Targa GmbH
Cellometer™ Auto T4	Nexcelcom Bioscience LTD.
Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG
Eco48 qPCR System	PCRmax LTD
Linearbeschleuniger Clinac DHX	Varian Medical Systems Inc.

Messwaage Kern 510-33	Kern & Sohn GmbH
Microflow Biological safety cabinet Nunc	Nunc GmbH & Co. KG
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG
Mithras LB 940	Berthold Techn. GmbH & Co. KG
Pipette Eppendorf Research 2,5 - 1000µl	Eppendorf AG
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Lab. GmbH & Co. KG
Polymax 1040, Taumelmischer	Heidolph Instr. GmbH & Co. KG
Sonopuls HD 3100	Bandelin GmbH & Co. KG
Systemec V-150 Autoklav	Systemec GmbH
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Trans-Blot Turbo BioRad	Bio-Rad Laboratories Inc.
MiniProtean Tetra System BioRad	Bio-Rad Laboratories Inc.
Hybridizationsoven 6/12 Unitherm	Uniequip GmbH
Inkubator Heracell Vios 160i Co2-Incubator	Thermo scientific
Cellometer Auto T4	Nexcelcom Bioscience LTD.

2.1.3 Chemikalien

Ethanol 99,9% vol.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA
Bactotrypton	Thermo Fisher Scientific Inc.
Calciumchlorid	Merck KGaA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich corp.
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	Thermo Fisher Scientific Inc.
ECL Western Blotting Detection System	Bio-Rad Laboratories Inc.
Fötales Kälberserum (FCS) 10%	Thermo Fisher Scientific Inc.
Gase (N ₂ , CO ₂ , Druckluft)	Air Liquide Deutschland GmbH

Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hefeextrakt	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG
Lipofectamine Transfektionsreagenz	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesiumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesiumchlorid	Honeywell Fluka GmbH
Magnesiumsulfat	Merck KGaA
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG
Methanol	Merck KGaA
M-MuLV reverse Transkriptase	New England Biolabs GmbH
MOPS	Gerbu Biotechnik GmbH
Natriumacetat	Merck KGaA
Natriumcarbonat	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich corp.
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas/ThermoFisherSci. corp.
Penicillin / Streptomycin 1%	Thermo Fisher Scientific Inc.
Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Protease Inhibitor Cocktail Set V, EDTA-free	Merck KGaA
RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute medium)	Thermo Fisher Scientific Inc.

Röntgenfilmentwickler LX24	Carestream Healthcare Inc.
Röntgenfixierbad AL4	Carestream Healthcare Inc.
Salzsäure 25% (HCl)	Merck KGaA
Selinexor (KPT-330)	Karyopharm Therapeutics
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypanblau	Sigma-Aldrich corp.
Trypsin-EDTA	Merck KGaA
Tween 20	Merck KGaA
UREA (Harnstoff)	Merck KGaA

2.1.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 1: Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockungsmilch	Magermilchpulver 5g, PBS 100ml
Blotpuffer	25mM Tris, 200mM Glycin, 20% Methanol
Calciumchloridlösung	60mM CaCl ₂ , 15% Glycerin, 10mM MOPS
Laemmlie Laufpuffer	50mM Tris, 400mM Glycin, 2% SDS
PBS (<i>Phosphate buffered Saline</i>)	NaCl 8g/l, KCl 0,2g/l, KH ₂ PO ₄ 1g/l, NaH ₂ PO ₄ 1,44g/l
SDS-Page-Sammelgel	Acrylamid 13%, Tris-HCl pH 6,8 0,125M, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,001%, Aqua bidest.
SDS-Page-Trenngel (10%)	Acrylamid 33%, Tris-HCl pH 8,8 0,375M, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,05%, Aqua bidest.

SOB-Medium	Bactorypton 20g, Hefeextrakt 5g, NaCl 0,5g, KCl 1M 2,5ml, H ₂ O 900ml
Trypanblau-Test	2% Trypanblau in PBS
UREA-Zellysepuffer	Glycerol 10%, SDS 1%, Dithiothreitol 5mM, Tris pH 6,8 10mM, UREA (Harnstoff) 6,7M, Protease Inhibitor Cocktail 1:1000

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

PVDF-Membran	Merck KGaA
MP Cell Counting Chamber CHT4-003	Nexcelcom Bioscience LTD.
Photofilm	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips, steril, 2,5µl	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen Filter Tip, blau, 1000µl	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen Tip, farblos, 2,5µl	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen Tip, gelb, 200µl	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen Tip, blau, 1000µl	Sarstedt AG & Co. KG
PP-Röhrchen, steril, 15ml	Sarstedt AG & Co. KG
PP-Röhrchen, steril, 50ml	Sarstedt AG & Co. KG
Reagiergefäß, Micro tube, 1,5ml	Sarstedt AG & Co. KG
Reagiergefäß, Safe-seal micro tube, 2ml	Sarstedt AG & Co. KG
Rotilabo-Blottingpapiere, 0,35mm	Carl Roth GmbH & Co. KG
Serologische Pipette, steril, 25ml	Sarstedt AG & Co. KG
Serologische Pipette, steril, 10ml	Sarstedt AG & Co. KG
Serologische Pipette, steril, 5ml	Sarstedt AG & Co. KG
Serologische Pipette, steril, 2ml	Sarstedt AG & Co. KG
Tissue Culture Dish, 100mm x 20mm	Sarstedt AG & Co. KG

Tissue Culture Dish, 150mm x 20mm	Sarstedt AG & Co. KG
Tissue Culture Platte, steril, 6 Well	Sarstedt AG & Co. KG
Tissue Culture Platte, steril, 24 Well	Sarstedt AG & Co. KG
Tissue Culture Platte, steril, 96 Well	Sarstedt AG & Co. KG
Zellschaber, 39 cm	Sarstedt AG & Co. KG

2.1.6 Kits

AlamarBlue™-Zellviabilitäts-Assay	Thermo Fisher Scientific Inc.
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extr. Reag.	Thermo Fisher Scientific Inc.
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel
SensiMix SYBR Kit	Bioline GmbH
Total RNA Purification Kit	Jena Bioscience GmbH

2.1.7 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden bei der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)* und der *American Type Culture Collection (ATCC)* erworben. Die Zelllinien werden regelmäßig auf Kontaminationen mit Mycoplasmen untersucht (Mycoplasma Detection Kit).

U2OS

Die Zelllinie U2OS wurde 1964 aus einem Osteosarkom der Tibia eines 15-jährigen weißen, kaukasischen Mädchens isoliert. Die Zellen exprimieren unter anderem die Enzyme insulin-like growth factor Rezeptor (IGF-1) und den insulin-like growth factor-II/Mannose-6-phosphat Rezeptor (IGF-II/M6P).

Hep3B

Die Zelllinie Hep3B entstammt einem hepatocellulären Karzinom eines 8-jährigen afroamerikanischen Jungens. Sie wurde aus einem Biopsat im Jahre 1979 isoliert. Sie trägt ein integrierte Hepatitis B-Virusgenom in sich und ist defizient für das Tumorsupressorprotein p53.

MCF-7

Bei der Zelllinie MCF-7 (Michigan Cancer Foundation – 7) handelt es sich um eine ductale Adenocarcinom-Zelllinie der Brust. Sie wurde durch Isolation aus Zellen aus einem malignen Pleuraerguss im Jahre 1970 gewonnen. Die Patientin war eine 69-jährige, weiße, kaukasische Frau. Die Zelllinie ist ER+, PR+ und HER2-.

2.1.8 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Katalognummer</i>	<i>Hersteller</i>
Alpha-Tubulin (B-7)	sc-5286	Santa Cruz
HIF-1 α	610959	BD Transduction
Lamin	sc-6215	Santa Cruz
p53	ab32389	Abcam

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Katalognummer</i>	<i>Hersteller</i>
HRP-Anti-Kaninchen (Ziege, polyclonal)	P0448	Dako
HRP-Anti-Maus (Ziege, polyclonal)	P0447	Dako
HRP-Anti-Schaf (Kaninchen, polyclonal)	P0163	Dako
HRP-Anti-Ziege (Kaninchen, polyclonal)	P0449	Dako

2.1.9 Software

AIDA Image Analyzer v.4.27	Elysia-raytest GmbH
GraphPad Prism Version 7.1	GraphPad Software
Microsoft Office 2010	Microsoft Deutschland GmbH
MikroWin 2000	Berthold Technologies GmbH & Co. KG

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Zelllinien U2OS und MCF-7 wurden in DMEM (Dulbeccos modified eagle medium) und die Linie Hep3B in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) kultiviert. Die Medien enthielten 10% fötales Kälberserum (FKS), 40µg/ml Penicillin G und 80µg/ml Streptomycin-Sulfat als Zusätze.

Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank (Heracell Vios 160i) bei 37°C unter 100% Luftfeuchte angereichert mit 5% CO₂ und Normoxie (entsprechend ungefähr 21% O₂). Für Hypoxieexperimente erfolgte die Inkubation bei 3% O₂.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von circa 80% inkubiert und nach regelmäßigem Mediumwechsel alle zwei bis sieben Tage – je nach Zelllinie – subkultiviert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen anschließend mit 3ml Trypsin/EDTA 5min lang bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Aktivität von Trypsin wurde im Anschluss mit 10ml Medium mit Zusätzen gestoppt.

Von der entstandenen Zellsuspension wurden 2-3ml in einer neuen Zellkulturflasche mit 10ml Medium gemischt und erneut inkubiert oder die gewünschte Zellzahl für zellkulturelle Experimente auf entsprechenden Petrischalen oder Zellkulturplatten ausgesät.

Für die Experimente wurden je nach Bedarf Petrischalen mit 10cm oder 15cm Durchmesser oder Zellkulturplatten im 6-well oder 24-well-Format verwendet.

2.2.2 Anzucht und Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Anzucht wurde *E. coli* XL1 in LB-Medium nach Lennox unter Hinzugabe von Ampicillin in einer Konzentration von 100µg/l kultiviert.

Im Folgenden wurden 400ml LB-Medium mit 4ml der Bakterienkultur beimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Es erfolgte die Messung der optischen Dichte. Bei einer OD₆₀₀=0,375 wurde die Bakterienkultur in Zentrifugengefäßen 10min auf Eis inkubiert und anschließend bei 1600g für 7min bei 4°C zentrifugiert. Es folgte eine Resuspension des Pellets in 40ml eiskalter CaCl₂-Lösung und erneute Zentrifugation bei 1100g für 5min bei 4°C. Das Pellet wurde anschließend in 40ml CaCl₂-Lösung für 30min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 1100g

für 5min bei 4°C wurde das Pellet in 8ml CaCl₂-Lösung aufgenommen, nach Aliquotierung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Transformation

Zur Einschleusung eines Plasmids in chemisch kompetente Bakterienzellen wurden 100µl einer Bakteriensuspension mit der entsprechenden Menge Plasmid-DNA gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2min bei 42°C. Anschließend wurden 900µl SOB-Medium hinzugegeben, und es erfolgte eine Inkubation für 1h unter Schütteln bei 37°C. Aus der entstandenen Suspension wurden 100µl auf einem LB- und Ampicillin-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4 Plasmidpräparation

Nach erfolgter Transformation von *E.coli* XL1 mit dem entsprechenden Plasmid und Inkubation über Nacht bei 37°C wurde zur Aufreinigung des Plasmids das Kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll verwendet.

2.2.5 Transfektion von Säugerzellen

Wie in Abschnitt 2.1.7 beschrieben, ist die Zelllinie Hep3B von Natur aus defizient für das Tumorsuppressor-Protein p53 [82]. p53 sollte in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle für die Immunoblot-Analysen dienen, sodass die Zelllinie Hep3B mit einem Plasmid mit der für p53 kodierenden DNA transfiziert werden musste.

Dazu wurden Zellen in einer 10cm durchmessenden Petrischale bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert.

500µl Serumfreies Optimem-Medium wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und die aufgetaute Plasmid-DNA wurde darin gelöst. Bei Verwendung einer 10cm Petrischale wurde eine Plasmid-Menge entsprechend 10µg DNA verwendet. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5min wurden 30µl GeneJuice Transfektionsreagenz hinzugegeben. Während einer erneuten Inkubation wurden die ausreichend konfluenten Zellen in ein Serumfreies Medium überführt. Sodann

konnte der Transfektionsansatz hinzugefügt werden und es erfolgte eine Inkubation für 24h. Am darauffolgenden Tage konnten die Zellen für nachfolgende Experimente genutzt werden.

2.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl in Zellsuspension wurde mittels des Zählgeräts Cellometer™ Auto T4 bestimmt. Dazu wurden 40µl Zellsuspension in einem sterilen Reaktionsgefäß mit 20µl Trypanblau gemischt. Davon wurden 20µl in eine Zählkammer pipettiert und die Zellzahl durch doppelte Messung und Mittelwertberechnung errechnet. Im Rahmen der Bestrahlungsexperimente wurden 14µl Zellsuspension und 7µl Trypanblau verwendet. Aus den Messwerten ließ sich im Weiteren die Zellzahl für die jeweiligen Versuche berechnen, sodass standardisiert Zellen ausgesät werden konnten.

2.2.7 Gewinnung von Zellfraktionen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation verschiedener Proteine erfolgte mittels des Kits *NE-PER Nuclear and Cytosolic Extraction Reagents* die Fraktionierung der Zellen entsprechend des Protokolls des Herstellers.

2.2.8 Proteinbestimmung und Immunoblotanalyse (Western Blot)

Zum quantitativen Proteinnachweis im Rahmen der Versuche wurde die Western Blot Methode verwendet.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration vor Durchführung von Immunoblots erfolgte mit den entsprechenden Reagenzien des Herstellers Bio-Rad basierend auf dem Assay nach Bradford nach Herstellerprotokoll [83].

Anschließend wurde zunächst eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate*, SDS-Page) durchgeführt. Diese Methode dient dazu, verschiedene Proteine anhand ihrer Masse aufzutrennen. Dazu wurden 50µg Protein mit Probenpuffer versetzt. Es folgte ein Hitzeschock für 5min bei 100°C. Danach wurden die Proben sowie zusätzlich ein standardisierter Proteinmarker in einem diskontinuierlichen SDS-Trenngel unter 75V Spannung mittels des Systems

MiniProtean von Biorad aufgetrennt. Im Anschluss folgte eine Elektrophorese der Proteine auf eine PVDF-Membran unter Anlage einer Spannung von 10V.

Die Membran wurde im Anschluss für 2h in Magermilchpulver in PBS bei Raumtemperatur gewaschen, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über 24h in Magermilchpulver in PBS bei 4°C. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 5min in PBS bei Raumtemperatur gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Magermilchpulver in PBS für 1h bei Raumtemperatur folgte. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS für je 5min wurde die Membran 1min lang mit ECL benetzt. Es folgte die Belichtung eines Hyperfilms in der Dunkelkammer. Über den aufgetragenen Proteinmarker wurde eine Zuordnung der Proteinbanden zur jeweiligen Größe in kDa ermöglicht.

2.2.9 Densitometrie

Zur quantitativen Analyse der auf dem Hyperfilm detektierten Proteinbanden wurden die Filme an einem Rechner eingescannt und mittels der Software AIDA Image Analyzer nach Angaben des Herstellers ausgewertet. Dabei wurde zunächst der Hintergrund der Filme von der jeweiligen Intensität der zu messenden Bande abgezogen. Der so entstandene Wert wurde auf die Lamin- bzw. Alpha-Tubulin-Kontrolle normalisiert.

2.2.10 Kernexportinhibition mit Selinexor

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss der Inhibition des Kernexport-Proteins CRM1 auf verschiedene subzelluläre Prozesse und die Zellviabilität unter Bestrahlung.

Dazu wurden die Zellen nach Aussaat in entsprechende Reaktionsgefäße bis zu einer Konfluenz von 50-70% inkubiert und anschließend für weitere 24h mit 0,1 oder 1µM Selinexor in Zellkulturmedium inkubiert.

2.2.11 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Zur Untersuchung der Expression des HIF-1 α -Zielgens SLC2A1, welches für das Glucose-Transportprotein GLUT-1 kodiert, wurde eine quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt.

Dazu wurde die Gesamt-RNA mittels des Kit *Total RNA Purification* aus den verschiedenen Zelllinien nach vorheriger Behandlung mit Selinexor entsprechend Herstellerangaben extrahiert. Aus der Gesamt-RNA wurde die cDNA mittels der M-MuLV reversen Transkriptase und entsprechender Primer synthetisiert.

Die qRT-PCR wurde mit 1 μ l cDNA und dem Kit *SensiMix SYBR* in einem Gesamtvolumen von 12,5 μ l durchgeführt. Dazu wurde das Eco48 qPCR System verwendet.

Die Ergebnisse wurden normalisiert zur relativen Expression des ribosomalen Proteins L28 (*RPL28*). Es wurden insgesamt vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

2.2.12 Zellviabilitätsassay AlamarBlueTM

Vor Beginn der Versuche mit dem Wirkstoff Selinexor wurde mittels eines Zell-Viabilitätsassays die unter *in vitro* Bedingungen optimale Dosis ermittelt. Dazu wurden die Zelllinien mit Dosierungen von 0.031 μ M bis 1.000 μ M Selinexor (0.031 μ M, 0.063 μ M, 0.125 μ M, 0.250 μ M, 0.500 μ M, 1.000 μ M) für 72h unter Normoxie und Hypoxie inkubiert. Anschließend wurde der Assay entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.13 Bestrahlung von Zellen mit Röntgenbremsstrahlung

Wie einleitend dargestellt, stellt die Bestrahlung bei bestimmten Krebsentitäten und anderen Krankheitsformen eine vielversprechende Therapieoption dar.

Um zu untersuchen, ob die Bestrahlung humaner Krebszellen im Zellkulturmodell einen Effekt auf das Überleben eben dieser Zellen hat, wurden die Zelllinien Hep3B, und U2OS definierten Strahlungsdosen ausgesetzt.

Dazu wurden die Zellen zunächst wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben in einer vorher festgelegten Zellzahl in fünf verschiedene 24-Well-Platten ausgesät. Anschließend erfolgte eine Inkubation in DMSO, 0,1µmol Selinexor oder 1µmol Selinexor über 24h. Die Zellen wurden dann mit Dosen von 2 – 8Gy bestrahlt. Zudem wurde eine unbestrahlte Kontrolle kultiviert.

Die Bestrahlung erfolgte mit dem Linearbeschleuniger Clinac DHX der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck (Direktor Prof. Dr. J. Dunst, Chefarzt Prof. Dr. D. Rades). Anschließend wurden die Zellen mittels der Reagenz Accutase aus den Wells gelöst und nach Zellzahlermittlung wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben in definierter Zellzahl (500 - 1000 Zellen/Well) in Triplikaten ausgesät. Es folgte eine Inkubationszeit von neun Tagen.

2.2.14 Bestimmung der klonogenen Überlebensfraktion nach Bestrahlung

Zur Bestimmung der klonogenen Überlebensfraktion stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Auswertung im Rahmen dieser Dissertation erfolgte nach der Methode von Franken *et al.* [84].

Nach der in Abschnitt 2.2.13 beschriebenen Inkubationszeit von neun Tagen wurden die Zellen gefärbt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Nun wurden alle mit dem bloßen Auge erkennbaren Kolonien gezählt. Anhand der jeweils unbehandelten und nicht bestrahlten Zellen wurde die Plattierungseffizienz (PE), also die Anzahl gebildeter Kolonien in Relation zu der Anzahl ausgezählter Zellen, wie folgt errechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der gebildeten Kolonien}}{\text{Anzahl der ausgesäten Zellen}} \times 100 \% = PE$$

Mit folgender Formel wurde die Anzahl der Kolonien nach Behandlung und / oder Bestrahlung auf die Plattierungseffizienz bezogen, um so die Überlebensfraktion (surviving fraction = SF) zu bestimmen:

$$\frac{\text{Anzahl der nach Behandlung gebildeten Kolonien}}{\text{Anzahl der ausgesäten Zellen} \times PE} = SF$$

Daraus ergab sich für jede Subgruppe der verschiedenen Behandlungen eine eigene Überlebensfraktion. Die Werte der Triplikate wurden jeweils gemittelt.

2.2.15 Statistische Auswertung

Zur Gewährleistung einer möglichst hohen Verlässlichkeit, also Reliabilität wurden die geschilderten Experimente jeweils drei- bis sechsmal durchgeführt ($n = 3 - 6$). Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Prism von Graphpad. Als statistische Tests wurden die einfaktorielle Varianzanalyse (*One-way-ANOVA*), bzw. bei den klonogenen Assays die zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two-way-ANOVA*) mit Tukey-Posttest oder Bonferroni-Posttest durchgeführt. Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,005$, *** = $P < 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Alamar-Blue Vitalitäts-Assay von Hep3B, MCF-7 und U2OS Zelllinien

Zur Überprüfung des Zellüberlebens unter Behandlung mit Selinexor wurde zunächst ein Zell-Vitalitäts-Assay durchgeführt.

Dazu wurden unter Behandlung mit Selinexor in Konzentrationen von 0,031 μM bis 1,0 μM Selinexor über 72h Untersuchungen mit dem Alamar-Blue Kit von Thermo Fisher Scientific Inc. nach Herstellerangaben durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen waren dabei passend zu denen in der aktuellen Literatur, sowohl verglichen zu anderen *in vitro* als auch *in vivo* Studien [71, 72, 74].

Es zeigte sich bei allen Zelllinien unter Behandlung mit 0,031 μM bis 0,5 μM Selinexor eine dosisabhängige Abnahme der Vitalität der Zellen (**Abbildung 6**). Diese war insbesondere bei der Zelllinie Hep3B stark ausgeprägt. Die Absorption als Korrelat der Zellvitalität sank für die hypoxischen Proben bei 0,5 μM Selinexor auf 0 verglichen zur Kontrolle. Für die normoxischen Proben nahm die Absorption bei gleicher Dosis um circa 85% ab und sank unter 1,0 μM Selinexor schließlich auf 0 ab.

Bei den MCF-7 sowie U2OS Zellen kam es unter 0,5 μM Selinexor zu einem Rückgang der Vitalität auf circa 50%. Höhere Konzentrationen als 0,5 μM Selinexor führten zu keinem weiteren relevanten Abfall der Zellvitalität.

Weiterhin wurden bei den Hep3B und U2OS Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen gezeigt.

Bei den MCF-7 Zellen hingegen zeigte sich unter Konzentrationen von 0,063 μM , 0,125 μM und 0,250 μM ein Unterschied zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die normoxischen Proben zeigten hier einen ausgeprägten Rückgang der Vitalität im Vergleich zu den hypoxischen Proben, was aber im Anova-Test als nicht signifikant bewertet wurde. Dieser Unterschied war bei Konzentrationen von mehr als 0,5 μM Selinexor nicht mehr nachweisbar.

Zuletzt zeigte sich ein leichter Anstieg der Vitalität der U2OS Zellen unter Behandlung mit 0,031 μM Selinexor unter Normoxie verglichen zu den hypoxischen Proben. Dieser Anstieg war nicht signifikant.

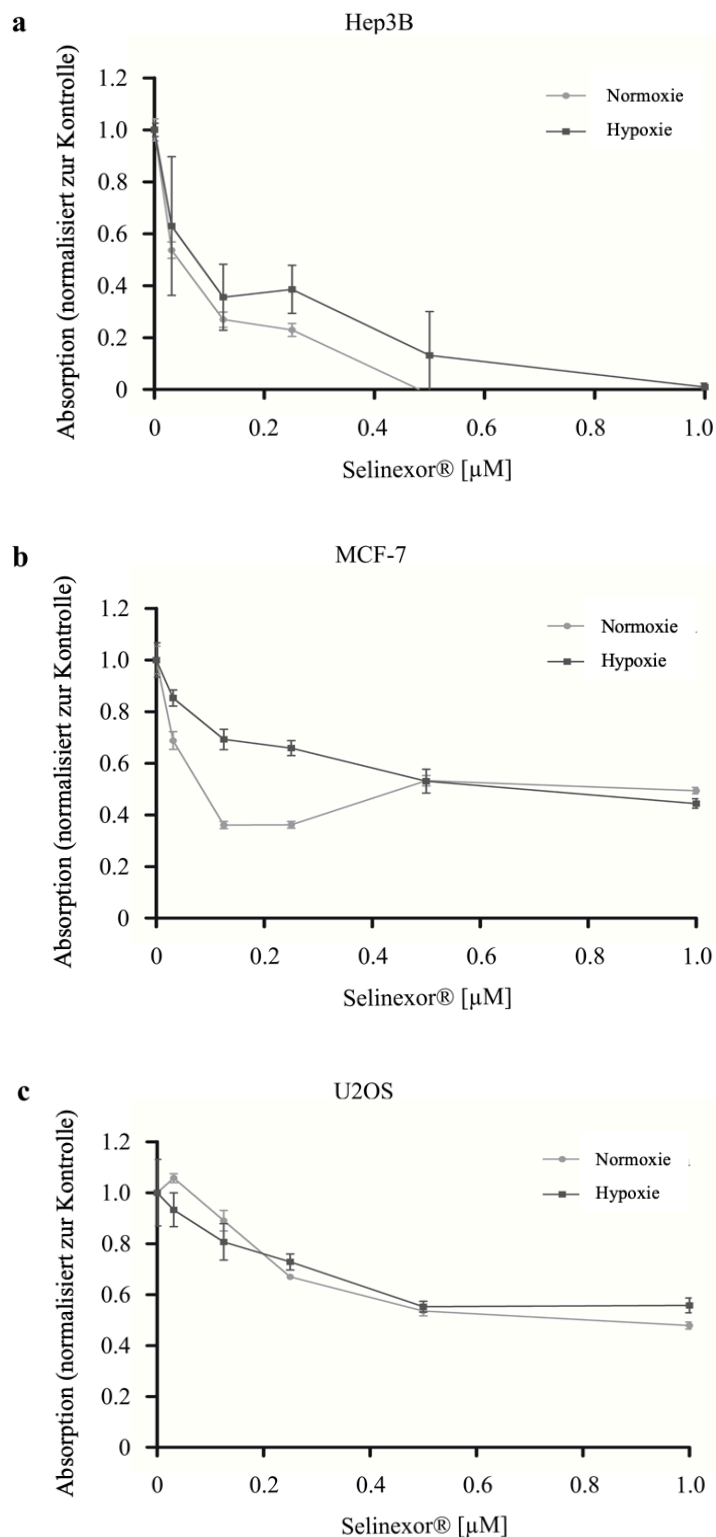


Abb. 6 Alamar-Blue-Vitalitätsassay von Hep3B (a), MCF-7 (b) und U2OS-Zellen (c). Die Zellen wurden unter Normoxie oder 1% Hypoxie für 72 Stunden mit 0,031µM – 1,000µM Selinexor inkubiert. Anschließend wurde der Assay nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dargestellt ist die Absorption als Korrelat der Vitalität aufgetragen entsprechend der verwendeten Konzentration Selinexor als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD). Die graue Linie mit Kreisen entspricht den normoxischen, die schwarze Linie mit Kästchen den hypoxischen Proben (n = 5).

3.2 Einfluss der CRM1-Inhibition auf die intranukleäre p53-Konzentration

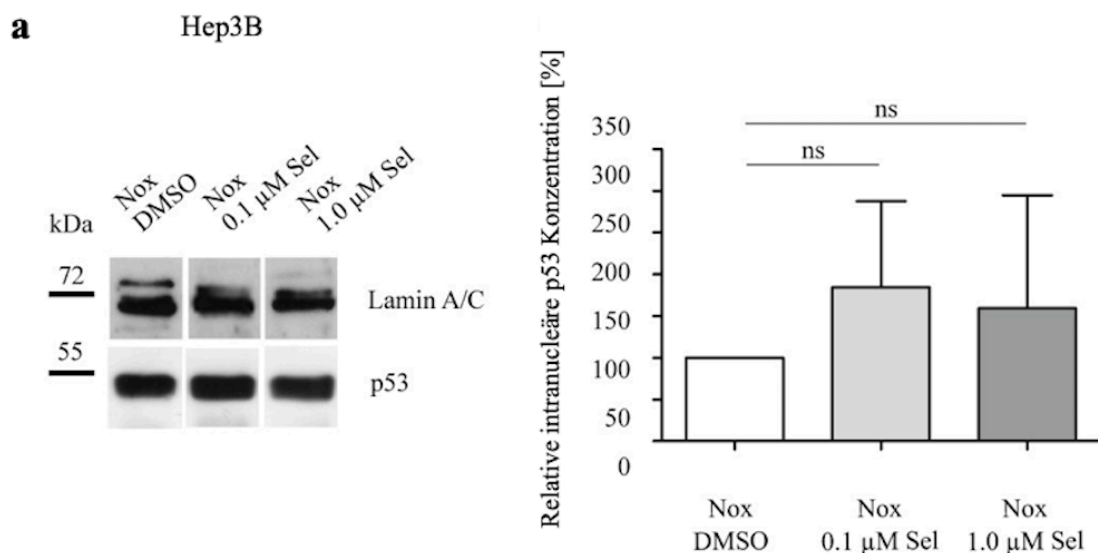
Grundlegend für diese Arbeit ist die Feststellung, dass CRM1 selektiv durch Selinexor inhibiert wird. Dies konnte in diversen Publikationen gezeigt werden.

Für die Immunoblot-Versuche sollte als Kontrolle der CRM1 Inhibition der Nachweis des Tumorsuppressorproteins p53 dienen, da dieses ausschließlich via CRM1 aus dem Nukleus exportiert wird [57, 85], sodass nach Behandlung mit Selinexor ein Anstieg der intranukleären p53-Konzentration zu erwarten war.

Humane Hepatoma Zellen Hep3B sind von Natur aus defizient für das Tumorsuppressorprotein p53. Daher wurden diese Zellen transient mit einem für p53 kodierenden pcDNA-Plasmid transfiziert [86].

Beide Zelllinien wurden für 24h wie beschrieben mit Selinexor unter normoxischen Bedingungen (21% O₂) behandelt. Anschließend wurden die Zellen fraktioniert und mittels Immunoblot-Analyse die relative intranukleäre p53-Konzentration untersucht.

Es zeigte sich in den Immunoblot-Analysen beider Zelllinien ein Anstieg der intranukleären p53-Proteinkonzentration nach Behandlung mit Selinexor (**Abbildung 7**).



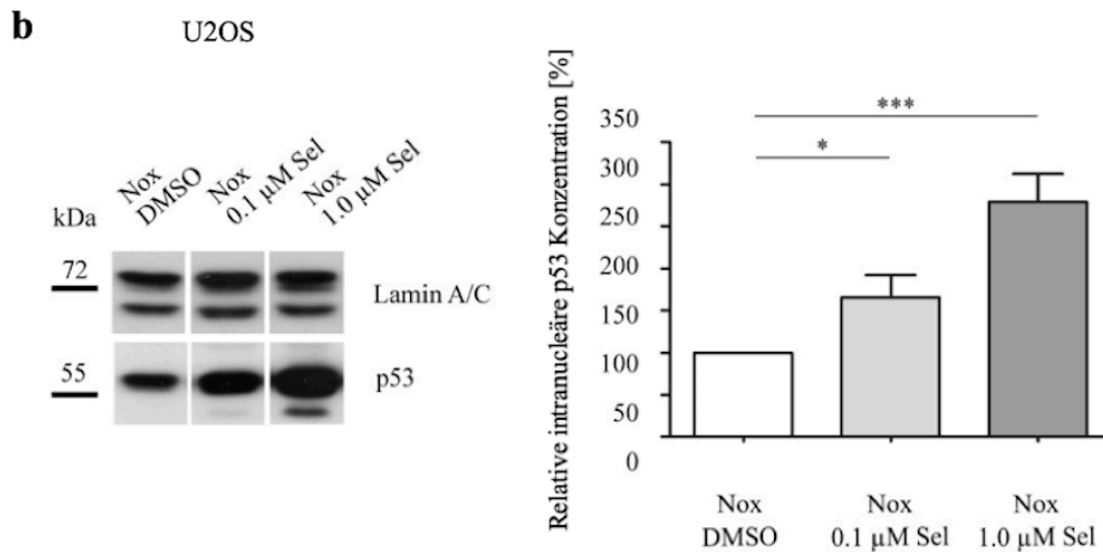


Abb. 7 Immunoblotanalyse der relativen p53-Konzentration in Hep3B (a) und U2OS Zellen (b). Ziel war es, zunächst zu zeigen, dass CRM-1 als Transporter für das Tumorsuppressorprotein p53 durch Selinexor inhibiert wird. Die Zelllinie Hep3B ist von Natur aus defizient für p53 und wurde daher vorab mit einem pcDNA-Plasmid für p53 transient transfiziert. Beide Zelllinien wurden für 24h mit 0,1 μ M oder 1,0 μ M Selinexor unter normoxischen Bedingungen (21% O₂) behandelt. Mittels Densitometrie wurde die relative p53-Konzentration verglichen zur DMSO-Kontrolle bestimmt. Als Ladekontrolle diente Lamin A/C. Auf der linken Seite sind exemplarisch Immunoblots dargestellt. In der Grafik auf der rechten Seite ist die relative intranucleäre p53 Konzentration in % gegen die einzelnen Untersuchungsbedingungen aufgetragen. Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung (MW \pm SD mit * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001) (n = 3).

Bei den Hep3B Zellen war dieser Anstieg nicht signifikant, und es bestand eine auffallend große Standardabweichung vom Mittelwert. Zudem konnte kein dosisabhängiger Effekt auf die intranucleäre p53-Konzentration gezeigt werden.

Für die U2OS Zellen konnte ein dosisabhängiger signifikanter Anstieg der intranucleären p53-Konzentration gezeigt werden. Unter Behandlung mit 0,1 μ M Selinexor zeigte sich eine signifikante Zunahme der intranucleären p53-Konzentration auf etwa 170% (* p < 0,05) und unter 1,0 μ M Selinexor eine hochsignifikante Zunahme auf etwa 280 % (** p < 0,001) verglichen zur DMSO-Kontrolle.

3.3 Einfluss der CRM1-Inhibition auf die intranucleäre HIF-1 α -Konzentration

Im nächsten Schritt sollte der Effekt der Inhibition von CRM1 durch Selinexor auf die intranucleäre Konzentration des Proteins HIF-1 α untersucht werden.

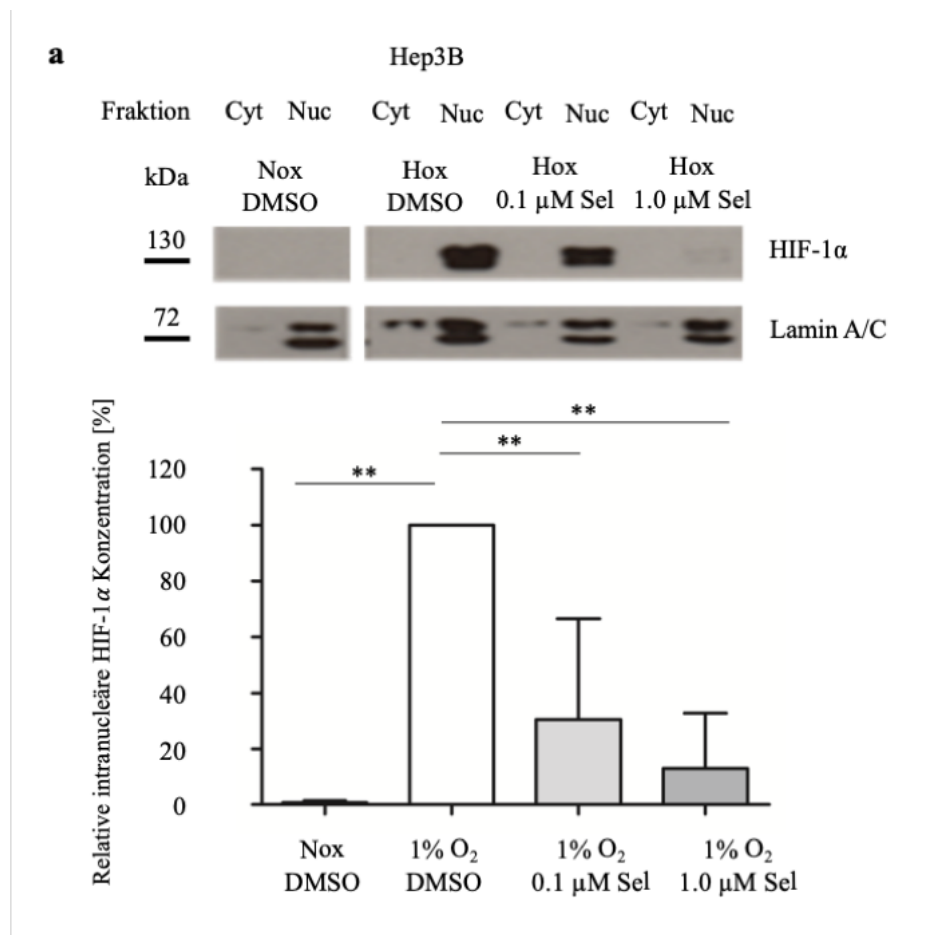
Hep3B und U2OS Zellen wurden für 24h mit 0,1 oder 1,0 μM Selinexor unter normoxischen (21% O_2) oder hypoxischen Bedingungen (1% O_2) behandelt. Nach Zellfraktionierung wurde die Konzentration von HIF-1 α im Zellkern mittels Immunoblot densitometrisch mit der normoxischen DMSO-Kontrolle verglichen.

Zunächst zeigte sich in beiden Zelllinien zwischen normoxischer und hypoxischer DMSO-Kontrolle eine hochsignifikante Induktion der intranukleären HIF-1 α -Konzentration ($p = 0,0029$) (**Abbildung 8**).

Unter Behandlung mit Selinexor kam es in beiden Zelllinien zu einer dosisabhängigen Abnahme der relativen intranukleären HIF-1 α -Konzentration verglichen zur hypoxischen DMSO-Kontrolle.

In den Hep3B Zellen war diese für beide Selinexor-Konzentrationen signifikant (** $p < 0,01$). Unter 0,1 μM Selinexor ging die HIF-1 α -Konzentration auf 30% und unter 1,0 μM Selinexor auf 15% zurück. Auffallend ist die große Standardabweichung unter 0,1 μM Selinexor.

Die U2OS Zellen zeigten nur unter der höheren Selinexor-Konzentration von 1,0 μM einen signifikanten Rückgang der intranukleären HIF-1 α -Konzentration auf circa 50% verglichen zur Kontrolle (* $p < 0,05$).



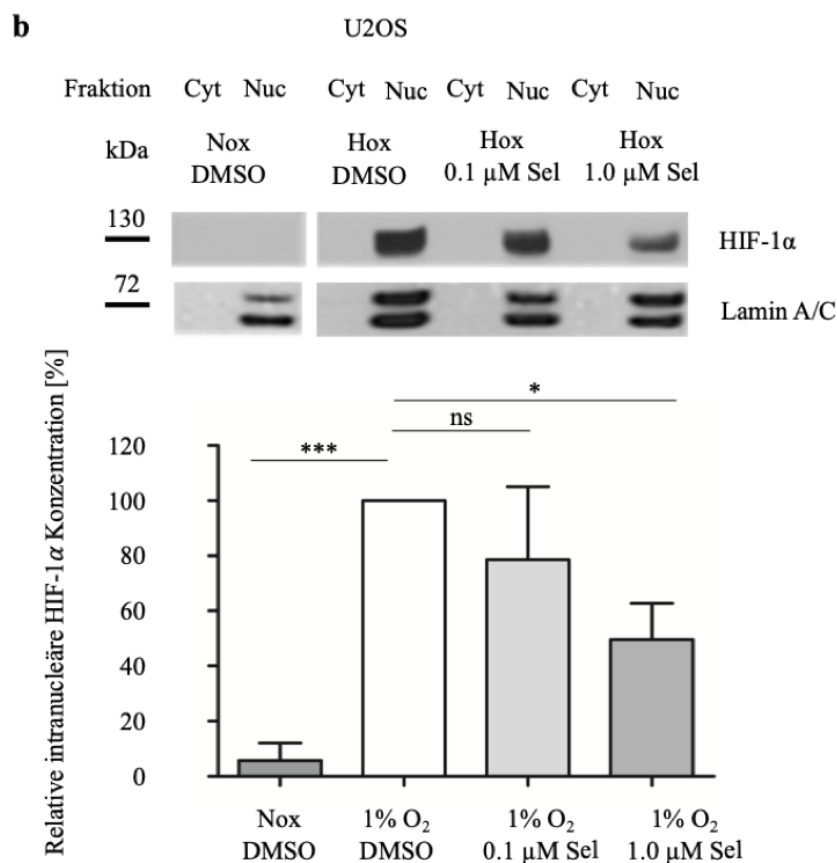


Abb. 8 Immunoblotanalyse der relativen intranucleären HIF-1 α Konzentration in Hep3B Zellen (a) und U2OS Zellen (b). Es wurde hier untersucht, wie sich die intranucleäre HIF-1 α Konzentration unter Inhibition von CRM-1 mittels Selinxor verändert. Beide Zelllinien wurden für 24h mit 0,1 μ M oder 1,0 μ M Selinxor unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) behandelt. Mittels Densitometrie wurde die relative intranucleäre HIF-1 α Konzentration verglichen zur normoxischen (21% O₂) DMSO-Kontrolle bestimmt. Als Ladekontrolle diente Lamin. Oben sind jeweils exemplarisch Immunoblots dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung ist die relative intranucleäre HIF-1 α Konzentration in % gegen die einzelnen Untersuchungsbedingungen graphisch aufgetragen. Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung (MW \pm SD mit * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001) (n = 3).

3.4 Einfluss der CRM1-Inhibition auf die Expression des HIF-1 α Zielgens *SLC2A1*

Als Reaktion auf Gewebshypoxie aktiviert HIF-1 α verschiedene Zielgene, darunter das für HIF-1 α spezifische Gen *SLC2A1*, welches für den Glucose-Transporter GLUT-1 kodiert.

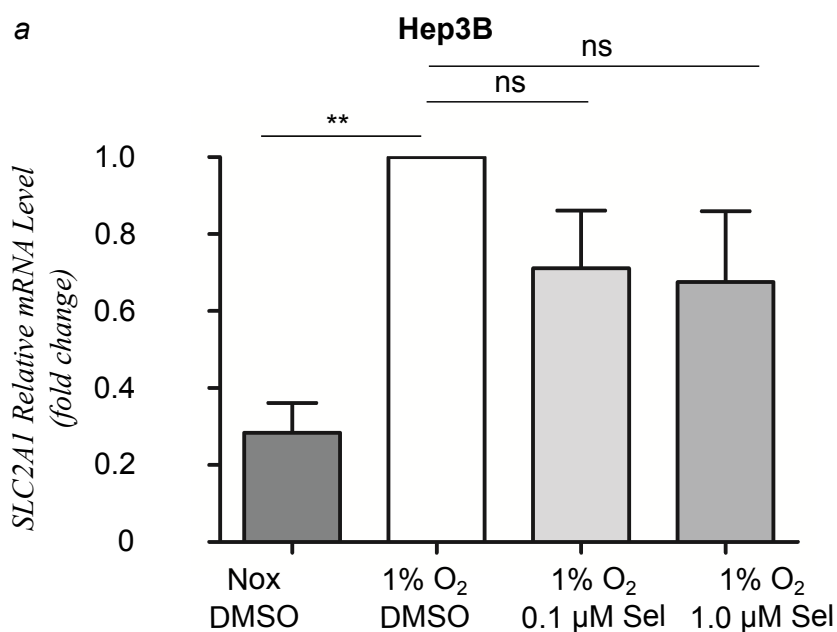
Nach vorheriger Behandlung mit DMSO, 0,1 μ M oder 1,0 μ M Selinxor unter Normoxie oder Hypoxie wurde die Gesamt-RNA aus Hep3B, MCF-7 und U2OS Zellen isoliert. Mittels quantitativer Realtime PCR wurde die relative Konzentration

der für *SLC2A1* kodierenden mRNA verglichen zur mRNA des ribosomalen Proteins L28 (*RPL28*) ausgewertet.

In allen Zelllinien kam es zu einer Induktion der Expression von *SLC2A1* unter Hypoxie verglichen zur normoxischen Kontrolle (**Abbildung 9**).

In den Versuchen mit Hep3B Zellen war nun unter Behandlung mit Selinexor unter Hypoxie eine relative Abnahme der *SLC2A1*-Expression zu beobachten. Die Expression betrug unter Behandlung mit 0,1µM etwa 70% und unter 1,0µM etwa 68%. Beide Effekte waren nicht signifikant.

Eine signifikante Abnahme der Expression von *SLC2A1* zeigte sich bei den MCF-7 Zellen und noch etwas ausgeprägter bei den U2OS Zellen. Eine Abhängigkeit von der Dosis bestand allerdings nicht, d.h. es zeigten sich in beiden Zelllinien keine relevanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Selinexor-Konzentrationen. In den MCF-7 Zellen kam es zu einem signifikanten Rückgang der *SLC2A1*-Expression auf etwa 65% unter 0,1 µM Selinexor (**p < 0,01) und circa 70% unter 1,0µM Selinexor (*p < 0,05). Die U2OS Zellen hingegen zeigten für beide Konzentrationen einen Rückgang der *SLC2A1*-Expression auf annähernd 45% verglichen zur Kontrolle (**p < 0,01).



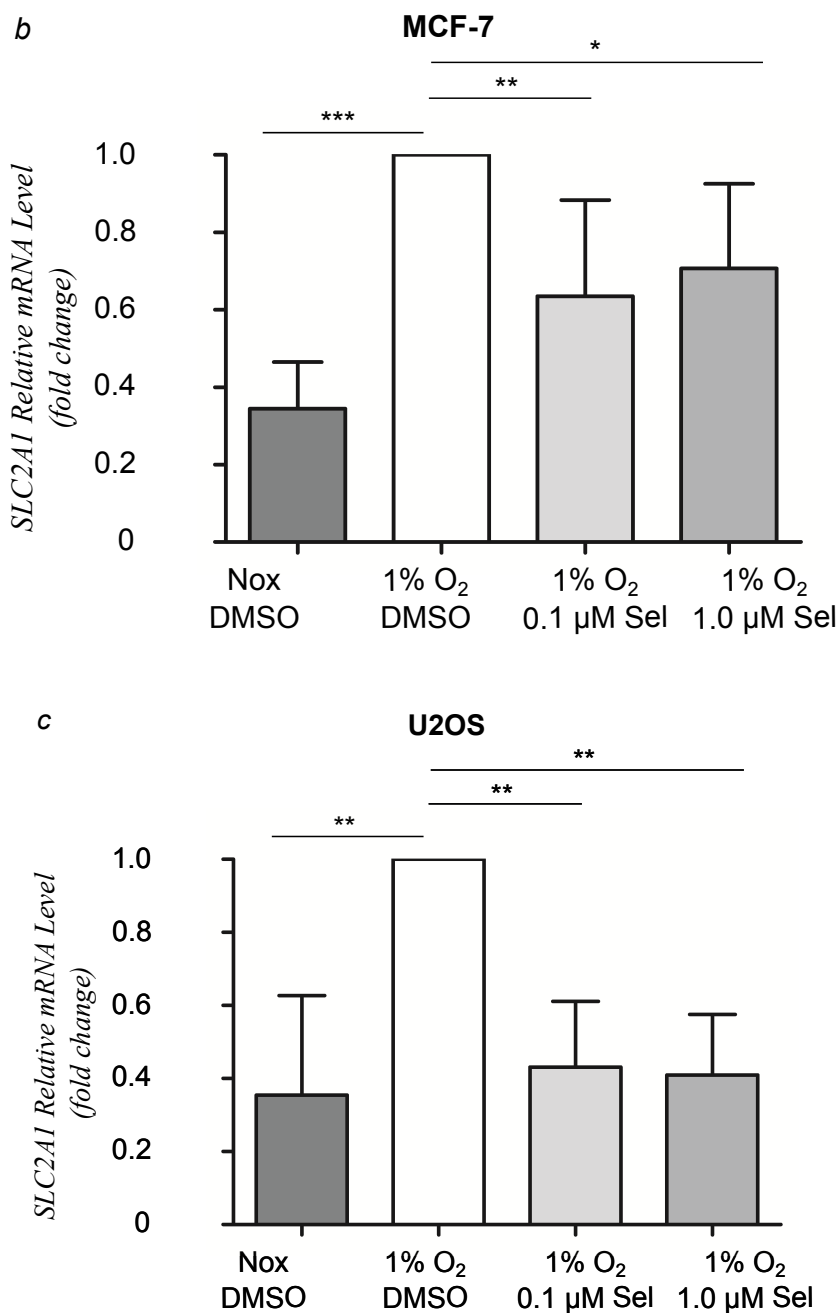


Abb. 9 qRT-PCR-Analyse der Genexpression des HIF-1 α Zielgens SLC2A1 in Hep3B (a), MCF-7 (b) und U2OS Zellen (c). Die Zellen wurden 1h mit DMSO, 0,1 μ M oder 1,0 μ M Selinexor behandelt und dann für 4h in Normoxie (21% O₂) oder Hypoxie (1% O₂) inkubiert. Mittels qRT-PCR wurde die SLC2A1 Expression analysiert. Die Ergebnisse wurden bezogen auf die Expression der für das Gen RPL28 kodierenden mRNA. Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung der relativen SLC2A1-Expression verglichen zur hypoxischen DMSO-Kontrolle (MW \pm SD mit * p <0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001) (n = 3-4).

3.5 Einfluss der CRM1-Inhibition auf die Strahlensensibilität von Hep3B und U2OS Zellen

Ströfer *et al.* konnten zeigen, dass der Knockout von HIF-1 α zu einer gesteigerten Strahlensensibilität im Modell mit U2OS, MCF-7, Hep3B sowie HEK-293 Zellen führte [87]. In Abschnitt 3.3 konnte gezeigt werden, dass es unter Behandlung mit Selinexor zu einer Degradierung der intranukleären HIF-1 α -Konzentration kommt. Unter gemeinsamer Betrachtung dieser Daten kann vermutet werden, dass eine Behandlung mit Selinexor über Inhibition von CRM1 mit konsekutiv abfallender HIF-1 α -Konzentrationen zu einer höheren Strahlensensibilität im Zellmodell führen könnte.

Um dies zu untersuchen wurden die Zelllinien Hep3B und U2OS für 24h mit Selinexor behandelt. In der Folge wurden diese mit 2, 4, 6 oder 8Gy in einem Linearbeschleuniger bestrahlt. Nach anschließendem Aussäen in Triplikaten und Inkubation für neun Tage wurde ein klonogener Assay durchgeführt.

Im Rahmen der statistischen Auswertung zeigten sich teilweise signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen (**Abbildung 10**).

In den Hep3B Zellen zeigte sich bereits ab einer Strahlendosis von 2Gy eine Abnahme der Überlebensfraktion unter Behandlung mit 1,0 μ M Selinexor gegenüber der DMSO-behandelten Kontrolle (* $p < 0,05$). Dieser Unterschied blieb auch unter höheren Strahlendosen bestehen und war unter Bestrahlung mit 6Gy noch etwas ausgeprägter ($p = 0,003$). Insgesamt kam es zu einer Abnahme der Überlebensfraktion um circa 96% verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle. Gleichzeitig zeigten die mit DMSO behandelten Kontrollen unter Bestrahlung mit 8Gy eine Abnahme der Überlebensfraktion von etwa 65%. Zwischen der Kontrolle und den mit 0,1 μ M Selinexor behandelten Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Erst unter der maximal verwendeten Strahlendosis von 8Gy zeichnete sich eine Tendenz ab, wonach es unter Behandlung mit 0,1 μ M Selinexor ebenfalls zu einer erhöhten Strahlensensibilität im Vergleich zur Kontrolle kam. Dieser Unterschied war im ungepaarten T-Test mit $p = 0,1005$ nicht signifikant.

Die U2OS Zellen boten unter einer Strahlendosis von 2Gy keinen Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungen ($p = 0,226$). Es zeigte sich aber bereits ein relativer dosisabhängiger Unterschied zwischen den verschiedenen Bedingungen. Unter 4Gy und 6Gy war dieser Unterschied für beide Selinexor-Konzentrationen signifikant (* $p < 0,05$) bzw. unter 1,0 μ M Selinexor und 6Gy sogar hochsignifikant

(*** $p < 0,001$). Dieser Trend setzte sich auch unter einer Strahlendosis von 8Gy fort, war hier aber für keine der Bedingungen signifikant. Die Überlebensfraktion der unbehandelten Kontrolle nahm insgesamt unter der maximalen Strahlendosis auf circa 98% ab. Die mit 1,0 μ M Selinexor behandelten Proben waren fast vollständig depletiert.

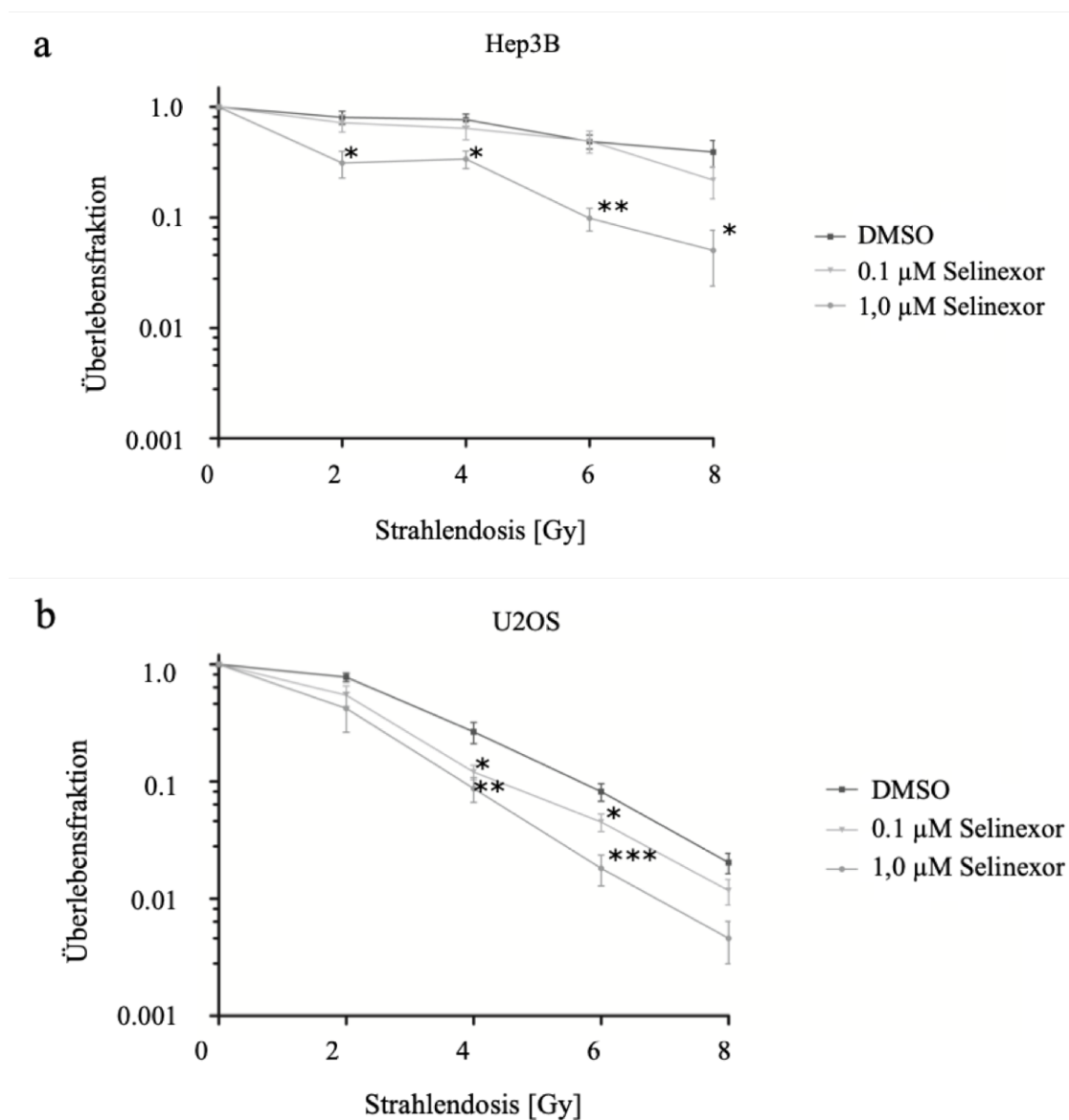


Abb. 10 Dosiswirkungskurven von DMSO / Selinexor-behandelten und bestrahlten Hep3B (a) und U2OS Zellen (b). Die Zellen wurden 24h mit DMSO oder Selinexor unter normoxischen Bedingungen behandelt und anschließend mit 2, 4, 6 oder 8 Gy bestrahlt. Nach Aussäen in Triplikaten und neuntägiger Inkubation folgte ein klonogener Assay. Gezeigt sind die Dosiswirkungskurven nach Behandlung mit DMSO (schwarze Linie mit Quadraten), 0,1 μ M Selinexor (graue Linie mit Dreiecken) und 1,0 μ M Selinexor (graue Linie mit Kreisen) als Mittelwerte \pm Standardabweichung (MW \pm SD mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$) (n = 6).

4 Diskussion

Die dargelegten Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert und in den Kontext der aktuellen Forschung gestellt werden. Dabei sollen die Ergebnisse als solche, aber auch die Methoden kritisch hinterfragt und – falls angebracht – Optimierungen vorgeschlagen werden. Schließlich werden die Ergebnisse dieser primär grundlagenwissenschaftlichen Arbeit in den Zusammenhang mit klinischen Studien aus dem Feld der Radioonkologie gebracht.

Diese Arbeit sollte zeigen, dass der HIF-Signalweg infolge einer selektiven Kernexportinhibition mit dem noch neuen Wirkstoff Selinexor gehemmt werden kann. Dies konnte hier in den Zelllinien Hep3B und U2OS durch Immunoblotanalyse bestätigt werden. Indirekte Indizien für die erfolgreiche Inhibition des HIF-Signalwegs konnten zudem über die verminderte Transkription des HIF-Zielgens *SLC2A1* nach Inhibierung von CRM1 in den beiden genannten Zelllinien sowie der Zelllinie MCF-7 gefunden werden.

Aufgrund des in der Literatur ausführlich dargelegten Zusammenhangs zwischen Hypoxie und Strahlensensibilität wurde die Hypothese aufgestellt, dass es infolge der CRM1-Inhibition zu einer erhöhten Strahlensensibilität im Zellkulturmodell kommt. Dies konnte in dieser Arbeit ebenso verifiziert werden.

4.1 Der Einfluss der selektiven Kernexport-Inhibition auf die intranukleäre Konzentration von p53

Das von Lane *et al.* als „Wächter des Genoms“ bezeichnete Tumorsuppressorprotein p53 ist ein wichtiger Regulator der Homöostase in Säugerzellen und hat einen wesentlichen Anteil an der Detektion von DNA-Schäden und der Einleitung der Apoptose [88]. Mutationen im p53-Gen mit konsekutivem Funktionsverlust dieses Enzyms sind mit einer erhöhten Malignität vergesellschaftet, da relevante Reparaturmechanismen gar nicht oder nur noch eingeschränkt funktionieren [89]. Insgesamt weisen etwa die Hälfte aller Krebsentitäten Störungen in der Funktion von p53 auf [90]. In Versuchen von Deng *et al.* konnte gezeigt werden, dass ein vollständiger p53-Knockout zu einem Verlust des G1-Checkpoints im Zellzyklus führt, wodurch eine verstärkte Proliferation der Zellen beobachtet werden konnte [91].

Bestärkt wird das Malignitätspotential vieler Tumorentitäten zudem durch Veränderungen im Kernexport und -import, was wiederum zu veränderten Konzentrationen von p53 im Zellkern führen kann. Kim *et al.* konnten in einigen Formen des Mamma-Karzinoms beispielsweise zeigen, dass eine verkürzte Form von Importin- α den Kernimport von p53 inhibiert. In der Folge war ein aggressiveres Tumorwachstum zu beobachten [92]. Auf Seite des Kernexports gilt als allgemein anerkannt, dass p53 über CRM1 aus dem Zellkern exportiert wird [70] und es konnte folgerichtig durch Subhash *et al.* dargelegt werden, dass es unter Behandlung mit Selinexor zu einer Akkumulation von p53 im Zellkern kommt [57].

Damit einhergehend konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass es unter Inhibition von CRM1 mittels Selinexor zu einem dosisabhängigen Anstieg der intranukleären p53-Proteinkonzentration in U2OS Zellen kommt. Dieser war in den Hep3B Zellen nicht signifikant. Allerdings muss hierbei auf die methodischen Limitationen der Versuche mit den Hep3B Zellen hingewiesen werden, da diese defizient für das Protein p53 sind. Sie wurden für diese Versuche daher transient mit einem p53-cDNA-Plasmid transfiziert. Bedingt durch den CMV-Promotor im pcDNA3 Vektor des Plasmids kommt es zu einer höheren p53-Expression, als unter physiologischen Bedingungen. Damit waren diese Experimente nur bedingt geeignet, um eine qualitative Aussage treffen zu können.

Der in den U2OS Zellen beobachtete Effekt der Behandlung mit Selinexor auf die intranukleäre p53-Konzentration hingegen war eindeutig und ist in Einklang mit den weiter oben beschriebenen Grundlagen schlüssig.

Hintergrund dieses Versuchsaufbaus war es initial, mittels Immunoblot-Analyse nachzuweisen, dass die Inhibition von CRM1 mittels Selinexor tatsächlich gelingt. Hierbei muss nun einerseits kritisch hinterfragt werden, ob solch ein erneuter Nachweis zwingend notwendig ist, da der Wirkmechanismus von Selinexor hinlänglich belegt ist [93]. Andererseits kann man argumentieren, dass es aus grundlagenwissenschaftlicher Sicht durchaus sinnvoll erscheint, die Wirkung erneut zu überprüfen. Dann wäre allerdings zu erwägen, ein via CRM1 transportiertes Protein zu untersuchen, welches dann auch in allen hier untersuchten Zelllinien vorhanden und funktionsfähig ist. Hier wäre beispielsweise das Hitzeschockprotein Hsp90 ein sicherlich auch für weitere Fragestellungen interessantes Ziel-Protein [66].

4.2 Der Einfluss der selektiven Kernexport-Inhibition auf den HIF-Signalweg
Hypoxie ist ein in vielen soliden Tumoren zu beobachtendes Phänomen, welches mit einer erhöhten Malignität und einem gehäuften Therapieversagen assoziiert ist [94]. Daher stellt Hypoxie und der damit einhergehende HIF-Signalweg ein vielversprechendes therapeutisches Ziel dar.

Der wohl am besten untersuchte Hypoxie-induzierbare Faktor ist das Protein HIF-1 α , welches nach aktuellem Kenntnisstand durch die Familie der PHDs für den spezifischen Abbau markiert wird [95]. Über den detaillierten Transport von PHDs zwischen Zellkern und Zytoplasma liegen bislang nur wenig Daten vor. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass PHD2 an seinem N-terminalen Ende eine für den Kernexport typische, Leucin-reiche Domäne trägt. Yasumoto *et al.* konnten fluoreszenzmikroskopisch beobachten, dass sich PHD2 nach Inhibition von CRM1 mittels Leptomycin B im Zellkern anreichert. Dies wurde auch von Steinhoff *et al.* in Hep3B und U2OS Zellen beobachtet [29, 96, 97].

Anknüpfend an diese Daten liegt die Vermutung nahe, dass eine durch Selinexor vermittelte CRM1-Inhibition zu einem Anstieg der Konzentration von PHD2 im Zellkern führen könnte. Dazu waren im experimentellen Teil dieser Arbeit Immunoblot-Analysen mit verschiedenen gegen PHD2 gerichteten Antikörpern durchgeführt worden. Aufgrund methodischer Probleme mit den genutzten Antikörpern gelang in mehreren Versuchsabläufen kein eindeutiger Nachweis von PHD2 mittels Immunoblot-Analyse, da aus rein experimentell-technischer Sicht eine Auswertung dieser Immunoblot-Versuche nicht möglich war. Es konnte somit hier nicht gezeigt werden, welchen Effekt Selinexor auf die intranukleäre PHD2-Konzentration hat.

Hingegen konnte in dieser Arbeit für die Zelllinien Hep3B und U2OS eindeutig gezeigt werden, dass es infolge einer Inhibition von CRM1 mittels Selinexor zu einem Rückgang der relativen intranukleären HIF-1 α -Konzentration kommt. Diese Effekte waren in Hep3B Zellen für beide Selinexor-Konzentrationen signifikant, während sich in U2OS Zellen erst unter 1,0 μ M Selinexor ein signifikanter Effekt zeigte. Diese Unterschiede könnten zum einen auf Unterschieden in der jeweiligen Expression von CRM1 in den Zelllinien beruhen. Zum anderen ist bei jeweils drei Versuchsabläufen (n = 3) auch ein rein statistischer Effekt infolge einer relativ großen Streuung der Ergebnisse in Betracht zu ziehen. Nichtsdestotrotz zeigte sich

für beide Zelllinien ein klarer Effekt von Selnexor auf die intranukleäre HIF-1 α -Konzentration.

Darüber hinaus konnte in Hep3B, MCF-7 und U2OS Zellen gezeigt werden, dass Selnexor hier zu einer teilweise signifikant reduzierten Transkription des für den Glukosetransporter GLUT1 kodierenden Gens *SLC2A1* führt. Diese Daten stehen in Einklang mit dem beschriebenen Effekt auf die HIF-1 α -Konzentration.

Weiterhin werden die hier gezeigten Daten durch Reporterassays dieser Arbeitsgruppe unterstützt, welche ebenfalls eine Abnahme der HIF-1 α -Aktivität in den hier untersuchten Zelllinien zeigten [98].

Während in den Immunoblot-Analysen ein eindeutig dosisabhängiger Effekt von Selnexor auf die intranukleäre HIF-1 α -Konzentration nachgewiesen werden konnte, war dies in den qRT-PCR-Versuchen nicht zu beobachten, d.h. die Ergebnisse waren unter 0,1 und 1,0 μ M nahezu identisch. Dieser auf den ersten Blick irritierende Befund könnte auf biochemischer Ebene aber durchaus zweckmäßig sein: es erscheint sinnvoll, dass der HIF-Signalweg bereits auf diskrete Veränderungen in seiner Kaskade sensibel reagiert, sodass bereits geringe Schwankungen in der enzymatischen Aktivität zu transkriptionellen Veränderungen führen. Genauere experimentelle Daten, die diese Annahme eindeutig stützen oder widerlegen, liegen in der Literatur bislang nicht vor.

In Kontrast zu diesen Daten stehen Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Mylonis *et al.* sowie Shin *et al.* [99, 100]. Diese konnten Daten vorlegen, wonach der Kernexport von HIF-1 α von CRM1 abhängig ist. Einhergehend mit diesen Daten könnte man annehmen, dass eine Inhibition von CRM1 also auch zu einem Anstieg der intranukleären Konzentration von HIF-1 α führen würde, was sich mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten widerspricht. Um diese Frage zu klären, müsste man in weiteren Studien erneut untersuchen, wie sich die Familie der PHDs und insbesondere PHD2 als Regulator des HIF-Signalweges unter Inhibition von CRM1 verhalten. Denkbar wäre, dass unter Inhibition von CRM1 der enzymatische Effekt von PHD2 der HIF-1 α -Aktivität überlegen ist, sodass es trotzdem zu einem Abbau von HIF-1 α kommt, auch wenn dieses den o. g. Studien folgend wahrscheinlich auch CRM1-abhängig exportiert wird und so prinzipiell auch im Zellkern akkumulieren müsste.

Die hier postulierte Kausalkette aus CRM1-Inhibition, konsekutiver PHD2-Akkumulation und dadurch bedingtem Abbau von HIF-1 α konnte anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig belegt werden.

4.3 Der Einfluss der selektiven Kernexport-Inhibition auf die Strahlensensibilität

Ströfer *et al.* konnten zeigen, dass ein Knockout von HIF-1 α zu einer erhöhten Strahlensensibilität in U2OS und HEK-293 Zellen führt [87]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Selinexor die intranukleäre HIF-1 α Konzentration vermindert. In Zusammenschau dieser Daten wurde einleitend die Hypothese aufgestellt, dass Selinexor-behandelte Zellen verglichen zu unbehandelten Kontrollen potentiell strahlensensibler sind.

Dies konnte hier bestätigt werden. Sowohl in Hep3B als auch U2OS Zellen kommt es unter Behandlung mit Selinexor zu einer teilweise signifikanten Abnahme der Überlebensfraktion verglichen zur DMSO-behandelten Kontrolle unter Bestrahlung mit 2 – 8Gy.

Gleichwohl müssen die hier demonstrierten Daten aus mehreren Gründen kritisch hinterfragt werden.

Auffallend ist bei den Bestrahlungsversuchen, dass auch die DMSO-Kontrollen unter Bestrahlung bis 8Gy einen ausgeprägten Rückgang der Überlebensfraktion zeigen. Dies fällt vor allem bei den U2OS Zellen auf, bei denen ein Rückgang der Überlebensfraktion um circa 96% zu beobachten war, d.h., dass die alleinige Bestrahlung bereits einen ausgeprägten Effekt auf die Zellen hat. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die Zellen nach der Bestrahlung möglicherweise zu dicht ausgesät wurden und letztlich im Rahmen der neuntägigen Inkubationszeit aufgrund von Nährstoffmangel untergingen. Eine Optimierung könnte hier in erneuten Experimenten erstens durch einen zum Beispiel einmaligen Wechsel des Mediums während der Inkubationszeit erreicht werden. Zweitens muss die Anzahl der ausgesäten Zellen kritisch hinterfragt werden. Mit dem oben beschriebenen klonogenen Assay nach Franken *et al.* steht eine mathematische Lösung zur Verfügung, innerhalb einzelner Experimente bei erhaltener Vergleichbarkeit unterschiedliche Zellzahlen auszusäen [84]. Dies wurde hier bereits auch derart

genutzt, dass in den Selinexor-behandelten Proben zum Teil doppelt so viele Zellen wie in den Kontrollen ausgesät wurden. Es wäre für erneute Untersuchungen sinnvoll, in Vorexperimenten für die einzelnen Zelllinien optimale Zellzahlen zu ermitteln und die Versuche dann entsprechend zu modifizieren.

Eine andere mögliche Fehlerquelle kann gewissermaßen „im Auge des Betrachters“ liegen: Es ist eine allgemein anerkannte Methode, nach Abschluss der Inkubationszeit und Färbung alle mit dem bloßen Auge erkennbaren Zellkolonien auszuzählen. Hierbei kann allerdings ein Beobachtungsfehler unterlaufen, da möglicherweise Kolonien in einem dicht bewachsenen Reaktionsgefäß anders wahrgenommen werden, als in einem Gefäß, in dem sich insgesamt nur wenige Kolonien finden. Eine Abhilfe besteht darin, die Kulturplatten in Raster zu unterteilen. Eine technisch sicherlich bessere und dem menschlichen Auge überlegenere Herangehensweise wäre eine maschinelle Auszählung, wofür allerdings ein spezielles Analysegerät benötigt wird.

Zuletzt muss der hier angenommene direkte Zusammenhang zwischen pharmakologischer Inhibition des HIF-Signalwegs und konsekutiv erhöhter Strahlensensibilität nach Behandlung mit Selinexor kritisch hinterfragt werden. Zur Überprüfung der Inhibition des HIF-Signalwegs wurden die Zelllinien unter Normoxie und Hypoxie behandelt. Wie zu erwarten konnte eine Induktion von HIF-1 α unter Hypoxie verglichen zur Normoxie gezeigt werden. Unter Behandlung mit Selinexor kam es zu einer Depletion von HIF-1 α . Die Bestrahlungsversuche konnten aus technischen Gründen in dieser Arbeit hingegen nicht unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Hier wurden die Zellen unter Normoxie inkubiert und bestrahlt. Auch die weitere Inkubation bis zur Färbung nach neun Tagen erfolgte unter Normoxie. Nun besteht in normoxischen Zellen im Zellkern per se eine sehr niedrige Konzentration von HIF-1 α , d. h. ein Effekt von HIF-1 α unter Normoxie ist nahezu auszuschließen, trotzdem ist ein direkter Kausalzusammenhang anhand der durchgeführten Versuche nicht klar zu belegen.

Aus methodischer Sicht wären hier weitere Bestrahlungsversuche unter hypoxischen Bedingungen sinnvoll. Man könnte dazu prinzipiell entsprechende luftdicht verschließbare Reaktionsgefäße verwenden, um so auch während der Bestrahlungsversuche hypoxische Bedingungen gewährleisten zu können. Alternativ besteht die Möglichkeit, Zellen soweit konfluent wachsen zu lassen, dass

sie aufgrund ihrer räumlichen Dichte hypoxisch werden. Diese gewissermaßen biologische Hypoxie-Induktion ist allerdings schwerer zu standardisieren als eine materialtechnische Optimierung dieser Versuche.

Nichtsdestotrotz legen die hier gezeigten Versuche die Annahme nahe, dass eine Inhibition des HIF-Signalwegs zu einer Erhöhung der Strahlensensibilität beitragen kann. Dies wird auch durch weitere Erkenntnis zum Glukosetransporter GLUT1 gestützt. In einer ausführlichen Übersichtsarbeit beleuchten Tang *et al.* die Zusammenhänge zwischen Zellmetabolismus und Strahlenresistenz, wobei insbesondere die Ausführungen zu GLUT1 für die hier vorliegenden Daten von Interesse sind [101]. Es konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Überexpression von GLUT1 mit einer erhöhten Strahlenresistenz vergesellschaftet ist [102, 103]. Dies konnte speziell für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs gezeigt werden, wodurch GLUT1 und seine assoziierten Signalwege bei diesen Entitäten ein potentielles therapeutisches Ziel sind [104].

Man kann also zusammenfassend festhalten, dass sowohl die Inhibition von HIF-1 α als auch die konsekutive Depletion von GLUT1 nachgewiesene Effekte auf die Strahlensensibilität haben. Ein direkter Zusammenhang ist aber allein anhand der hier dargestellten Daten aus genannten Gründen nicht sicher zu belegen.

Als alternativer Mediator für die erhöhte Strahlensensibilität muss in der vorliegenden Arbeit zumindest für die Zelllinie U2OS zuletzt auch das Tumorsuppressorprotein p53 diskutiert werden. Aufgrund der genannten Defizienz der Hep3B Zellen für dieses Protein ist ein strahlenbiologischer Effekt in diesen Zellen mit Blick auf die hier durchgeführten Versuche auszuschließen. Die Bestrahlungsversuche erfolgten im Gegensatz zu den Immunoblot-Analysen der intranukleäre p53-Konzentration an Wildtyp Hep3B Zellen ohne vorherige Transfektion.

Man nimmt heute an, dass p53 je nach Zell-, bzw. Gewebeart sehr unterschiedliche Funktionen aufweist. In gesundem Gewebe scheint p53 einen strahlenprotektiven Effekt zu besitzen. Bei geringen Strahlenschäden übt p53 in erster Linie einen regenerativen Effekt aus, während unter ausgeprägten DNA-Schäden gezeigt werden konnte, dass p53 die irreparable Zelle in die Apoptose führt [90].

Es erscheint somit möglich, dass in den U2OS Zellen auch ein anteiliger Effekt der

intranukleären p53-Konzentration zur erhöhten Strahlensensibilität beiträgt. Klarheit könnten hier Experimente mit einem p53-Knockout schaffen, da so etwaige strahlensensibilisierende Effekte von Selinexor ausgeschlossen werden könnten.

4.4 Resümee und Ausblick

Die in der Einleitung aufgestellten Hypothesen konnten im Rahmen dieser Dissertation teilweise belegt werden. Selinexor hemmt als selektiver Inhibitor des Kernexportproteins CRM1 den HIF-Signalweg durch Depletion von HIF-1 α und sequentielle Inhibition der Expression des für GLUT1 kodierenden Gens *SLC2A1*.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass Selinexor zu einer erhöhten Strahlensensibilität im Zellkulturmodell führt. Ob dies auf die Effekte auf den HIF-Signalweg zurückzuführen ist, konnte nicht eindeutig belegt werden.

Dass Tumorphoxie und Radiosensitivität in direktem Zusammenhang miteinander stehen, ist ein bekannter und für die Etablierung neuer Radiochemotherapien vielversprechender Ansatz. Die hier gezeigten Daten unterstützen diese Sicht und liefern weitere Ansätze, durch welche auch Selinexor als potentielles Medikament einer kombinierten Radiochemotherapie infrage kommen könnte.

Für *in vitro* Analysen in Rektum-Karzinom Modellen konnten Ferreira-Neira *et al.* eine erhöhte Strahlensensibilität unter Behandlung mit Selinexor nachweisen. Allerdings fokussierte diese Arbeitsgruppe nicht auf die Hypoxie als möglichen Ansatz der Therapie, sondern hatte das Protein Survivin, welches ebenfalls durch CRM1 transportiert wird, im Blick [105]. Wahba *et al.* beobachteten in Glioblastom-Modellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter Behandlung mit Selinexor eine Inhibition von DNA-Reparatur-Prozessen. Dies schien durch einen fehlenden Export von 5S und 18S rRNA via CRM1 bedingt zu sein. In der Folge war eine erhöhte Strahlensensibilität zu beobachten [106]. Eine Studie von Muz *et al.* konnte an Zellkultur- und Xenotransplantat-Mausmodellen zeigen, dass Selinexor zu einer gesteigerten Apoptose, bzw. verlängerten Überleben der Mäuse führte. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine zuvor bestehende Hypoxie-induzierte Resistenz gegen Bortezomib durch Selinexor aufgehoben wurde [107].

Die genannten Studien stellten allesamt keinen direkten Bezug zur Hypoxie her, aber sie liefern teilweise Indizien, wonach Selinexor als möglicher Radiosensitizer infrage kommen könnte.

In der klinischen Forschung wiederum ist die Hypoxie als potentiell Ziel klar erkannt. Die DAHANCA 5-, ARCON- und TASMAR 92.02-Studien konnten zeigen, dass diejenigen Patienten, bei denen die Tumore hypoxische Areale aufwiesen, im Vergleich zu den anderen Patienten von einer Therapie mit einem Radiosensitizer wie zum Beispiel Nimorazol profitierten [108-110].

Zwei klinische Studien aus Leuven, bzw. Tübingen konnten an kleinen Patientenkollektiven mittels [¹⁸F]-Fluoromisonidazol-Positronen-Emissions-Tomographie (FMISO-PET/CT) zeigen, dass ein Rückgang der Tumorphoxie mit einem verlängerten krankheitsfreien Überleben assoziiert ist [111] oder dass unter Radiotherapie zumindest ein Rückgang der Tumorphoxie beobachtet werden kann [112].

Zips *et al.* untersuchen aktuell in einer laufenden klinischen Studie an 50 Patienten, ob mittels PET-Bildgebung unter Radiochemotherapie solche Patienten selektiert werden können, welche von einer therapeutischen Modifikation mittels Radiosensitizer bzw. aggressiverer Radiotherapie profitieren könnten [113]. Sie kamen bislang zu dem Ergebnis, dass eine FMISO-PET/CT-Bildgebung zu Beginn einer Therapie als prognostischer Marker dienen kann. Eine erneute Bildgebung nach ein- oder zweiwöchiger Therapie könnte möglicherweise weitere Daten für eine Therapiemodifikation bieten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hier gezeigten Daten erstmals für den Wirkstoff Selinexor einen relevanten Effekt auf den HIF-Signalweg zeigen konnten. In zukünftigen Experimenten bleibt zu untersuchen, inwieweit die intranukleäre Konzentration von PHD2 durch CRM1-Inhibition mittels Selinexor beeinflusst wird. Ergänzend zu den Immunoblot-Analysen könnten in einem weiteren Schritt beispielsweise Immunfluoreszenz-Analysen zur Lokalisation von PHD2 erfolgen.

Um die hier gezeigten Daten zu untermauern, sollten die Studien mit weiteren Zelllinien und Xenograft-Modellen wiederholt werden. Dabei sollte man sich zum Beispiel auf die Tumorentitäten des Kopf-Hals-Bereichs konzentrieren. Diese Entitäten sind bekanntermaßen besonders der Radioonkologie gut zugänglich.

Gleichzeitig existieren gerade im skandinavischen Raum für diese Tumore umfassende Daten, sodass auch für mittelfristige klinische Studien gute Bedingungen vorliegen, um neue Erkenntnisse korrekt einordnen zu können. Dadurch könnte Selinexor im Kombination mit weiteren Bestrahlungsexperimenten und möglicherweise eines Tages in klinischen Studien eine Rolle als potentieller Radiosensitizer bekommen. Insbesondere jene Tumorentitäten, die gerade bei Vorhandensein von hypoxischen Arealen ein besonders aggressives Malignitätspotential zeigen, könnten so der Strahlentherapie zugänglicher gemacht werden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es, zu zeigen, dass eine selektive Inhibition von CRM1 mittels des neueren Wirkstoffs Selinexor zu einer Inhibition des HIF-Signalwegs führt und inwieweit es infolge einer CRM1-Inhibition zu einer gesteigerten Strahlensensibilität im Zellkulturmodell kommt.

Zunächst wurden mit humanen Hepatoma Zellen (Hep3B), Mamma-Karzinom Zellen (MCF-7) und Osteosarkom Zellen (U2OS) Vitalitätstests mit verschiedenen Selinexor-Konzentrationen durchgeführt. In Immunoblot-Analysen mit Hep3B und U2OS Zellen wurde zur Kontrolle der Inhibition von CRM1 die relative intranukleäre Konzentration des über CRM1 transportierten Proteins p53 überprüft. In weiteren Immunoblot-Analysen wurde die relative intranukleäre Konzentration von HIF-1 α untersucht. Zur indirekten Messung der HIF-1 α -Aktivität erfolgte eine qRT-PCR-Analyse der Expression des für den Glucose-Transporter GLUT1 kodierenden Gens *SCL2A1* in den drei Zelllinien. In abschließenden Bestrahlungsexperimenten wurden Hep3B und U2OS Zellen unter Selinexor-Behandlung mit 2 – 8Gy bestrahlt und ein klonogener Assay durchgeführt.

Sowohl in Hep3B als auch in U2OS Zellen konnte ein Anstieg der relativen intranukleären Konzentration von p53 unter Inhibition von CRM1 mittels Selinexor beobachtet werden. Erstmals konnte demonstriert werden, dass die Inhibition von CRM1 zu einer Abnahme der intranukleären Konzentration von HIF-1 α führt. qRT-PCR Experimente zeigten, dass es unter Behandlung mit Selinexor konsekutiv zu einer verminderten Aktivierung des für den Glucose-Transporter GLUT1 kodierenden HIF-1 α -Zielgens *SLC2A1* kommt. Schließlich wurde hier demonstriert, dass die Behandlung mit Selinexor zu einer gesteigerten Strahlensensibilität im Zellkulturmodell führt.

Hypoxie und der damit verknüpfte HIF-Signalweg gelten in Neoplasien unbestritten als wichtige Faktoren für Malignität und Therapieresistenz. Die hier gezeigten Daten weisen im Zellkulturmodell auf den vielversprechenden therapeutischen Ansatz hin, den HIF-Signalweg indirekt zu inhibieren und so die Strahlensensibilität zu erhöhen. Der Zusammenhang zwischen CRM1-Inhibition und Inhibition des HIF-Signalwegs ist auf molekularbiologischer Ebene noch nicht vollständig verstanden und sollte ebenso wie die Übertragung der Experimente auf weitere Zelllinien Grundlage weiterer Untersuchungen sein. Ergänzend sollten dann im Verlauf Untersuchungen

im Tierexperiment folgen, um zu untersuchen, ob Selinexor auch *in vivo* als Bestandteil einer Radiochemotherapie eine prognostische Relevanz hat. Hier wären beispielsweise Krebsentitäten des Kopf-Hals-Bereiches von großem Interesse, da in diesen zum einen Hypoxie nachweislich eine Rolle als Malignitätskriterium spielt. Zum anderen sind Tumore dieser Region der Strahlentherapie gut zugänglich, sodass auch die experimentelle Untersuchung kombinierter Radiochemotherapien in diesem Bereich von großem Interesse ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Bundesamt für Statistik. Abgerufen am 06.04.2021 von https://www.destatis.de/DE/Home/_inhalt.html
2. Weltgesundheitsorganisation (WHO). Abgerufen am 06.04.2021 von https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/
3. National Research Council Committee on, A.F.f.D.a.N.T.o.D., *The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health, in Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and a New Taxonomy of Disease*. 2011, National Academies Press (US) Copyright © 2011, National Academy of Sciences.: Washington (DC).
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Pariset, E., et al., *DNA Damage Baseline Predicts Resilience to Space Radiation and Radiotherapy*. Cell Rep, 2020. **33**(10): p. 108434.
7. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
8. Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis*. Cancer Lett, 2013. **332**(2): p. 237-48.
9. Overgaard, J., et al., *Misonidazole combined with split-course radiotherapy in the treatment of invasive carcinoma of larynx and pharynx: report from the DAHANCA 2 study*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1989. **16**(4): p. 1065-8.
10. Overgaard, J., et al., *A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85*. Radiother Oncol, 1998. **46**(2): p. 135-46.

11. Kreuzer, F., *Oxygen supply to tissues: the Krogh model and its assumptions*. Experientia, 1982. **38**(12): p. 1415-26.
12. Klinke R, Pape H.-K, Kurtz A, Silbernagel S, *Physiologie*. Vol. 5. 2005.
13. Brandes R, Lang F, Schmidt RF, *Physiologie des Menschen*. ed. 32 Springer-Verlag, 2019.
14. Wagener C, Müller O, *Molekulare Onkologie*. ed. 3 Georg Thieme Verlag, 2009.
15. Vaupel, P. and A. Mayer, *Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance*. Transfus Clin Biol, 2005. **12**(1): p. 5-10.
16. Vaupel, P., O. Thews, and M. Hoeckel, *Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia*. Med Oncol, 2001. **18**(4): p. 243-59.
17. Jögi, A., et al., *Expression of HIF-1 α is related to a poor prognosis and tamoxifen resistance in contralateral breast cancer*. PLoS One, 2019. **14**(12): p. e0226150.
18. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1230-7.
19. Yang, S.L., et al., *Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review)*. Mol Med Rep, 2015. **12**(2): p. 2411-6.
20. Depping, R., W. Jelkmann, and F.K. Kosyna, *Nuclear-cytoplasmatic shuttling of proteins in control of cellular oxygen sensing*. J Mol Med (Berl), 2015. **93**(6): p. 599-608.
21. Makino, Y., et al., *Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression*. Nature, 2001. **414**(6863): p. 550-4.
22. Maynard, M.A., et al., *Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression*. Cell Cycle, 2007. **6**(22): p. 2810-6.

23. Lisy, K. and D.J. Peet, *Turn me on: regulating HIF transcriptional activity*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 642-9.
24. Epstein, A.C., et al., *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. Cell, 2001. **107**(1): p. 43-54.
25. Wotzlaw, C., et al., *Nanoscopy of the cellular response to hypoxia by means of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and new FRET software*. PMC Biophys, 2010. **3**(1): p. 5.
26. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
27. Ohh, M., et al., *Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(7): p. 423-7.
28. Tanimoto, K., et al., *Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*. EMBO J, 2000. **19**(16): p. 4298-309.
29. Pientka, F.K., et al., *Oxygen sensing by the prolyl-4-hydroxylase PHD2 within the nuclear compartment and the influence of compartmentalisation on HIF-1 signalling*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 21): p. 5168-76.
30. Ratcliffe, P.J., *Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer*. J Physiol, 2013. **591**(8): p. 2027-42.
31. Berchner-Pfannschmidt, U., et al., *Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing*. Eur Respir J, 2008. **32**(1): p. 210-7.
32. Taylor, S.E., et al., *Differential sub-nuclear distribution of hypoxia-inducible factors (HIF)-1 and -2 alpha impacts on their stability and mobility*. Open Biol, 2016. **6**(9).

33. Bergers, G., *HIF alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis*. *Faseb Journal*, 2008. **22**.
34. Maxwell, P.H., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(15): p. 8104-9.
35. Nauta, T.D., et al., *Identification of HIF-2 α -regulated genes that play a role in human microvascular endothelial sprouting during prolonged hypoxia in vitro*. *Angiogenesis*, 2017. **20**(1): p. 39-54.
36. Denko, N.C., *Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(9): p. 705-13.
37. Kim, J.W., et al., *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. *Cell Metab*, 2006. **3**(3): p. 177-85.
38. Choi, S.H., et al., *Silencing of hypoxia-inducible factor-1beta induces anti-tumor effects in hepatoma cell lines under tumor hypoxia*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e103304.
39. D'Angelo, M.A. and M.W. Hetzer, *Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes*. *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(10): p. 456-66.
40. Matsuura, Y., *Mechanistic Insights from Structural Analyses of Ran-GTPase-Driven Nuclear Export of Proteins and RNAs*. *J Mol Biol*, 2016. **428**(10 Pt A): p. 2025-39.
41. Raices, M. and M.A. D'Angelo, *Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(11): p. 687-99.
42. Denning, D.P., et al., *Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(5): p. 2450-5.

43. Frey, S. and D. Görlich, *A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes*. Cell, 2007. **130**(3): p. 512-23.
44. Mohr, D., et al., *Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes*. EMBO J, 2009. **28**(17): p. 2541-53.
45. Stelma, T., et al., *Targeting nuclear transporters in cancer: Diagnostic, prognostic and therapeutic potential*. IUBMB Life, 2016. **68**(4): p. 268-80.
46. Fischer, U., et al., *The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs*. Cell, 1995. **82**(3): p. 475-83.
47. Kutay, U. and S. Guttinger, *Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(3): p. 121-4.
48. Bogerd, H.P., et al., *Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4207-14.
49. Turner, J.G., et al., *Human topoisomerase IIalpha nuclear export is mediated by two CRM-1-dependent nuclear export signals*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 14): p. 3061-71.
50. Matsuyama, A., et al., *ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(7): p. 841-7.
51. Clarke, P.R. and C. Zhang, *Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(6): p. 464-77.
52. Wang, H., et al., *High Kpn β 1 expression promotes non-small cell lung cancer proliferation and chemoresistance via the PI3-kinase/AKT pathway*. Tissue Cell, 2018. **51**: p. 39-48.

53. van der Watt, P.J., et al., *The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation*. Int J Cancer, 2009. **124**(8): p. 1829-40.
54. Saulino, D.M., et al., *CRM1/XPO1 expression in pancreatic adenocarcinoma correlates with survivin expression and the proliferative activity*. Oncotarget, 2018. **9**(30): p. 21289-21295.
55. Gupta, A., et al., *Therapeutic Targeting of Nuclear Export Inhibition in Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2017. **12**(9): p. 1446-1450.
56. Gravina, G.L., et al., *KPT-330, a potent and selective exportin-1 (XPO-1) inhibitor, shows antitumor effects modulating the expression of cyclin D1 and survivin [corrected] in prostate cancer models*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 941.
57. Subhash, V.V., et al., *Anti-tumor efficacy of Selinexor (KPT-330) in gastric cancer is dependent on nuclear accumulation of p53 tumor suppressor*. Scientific Reports, 2018. **8**.
58. Noske, A., et al., *Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer*. Cancer, 2008. **112**(8): p. 1733-43.
59. Nachmias, B. and A.D. Schimmer, *Targeting nuclear import and export in hematological malignancies*. Leukemia, 2020.
60. Sexton, R., et al., *Targeting Nuclear Exporter Protein XPO1/CRM1 in Gastric Cancer*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(19).
61. Ishizawa, J., et al., *Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein*. Pharmacol Ther, 2015. **153**: p. 25-35.
62. Kojima, K., et al., *Prognostic impact and targeting of CRM1 in acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **121**(20): p. 4166-74.

63. Schaumberg, J.H., GC. French, JC., *The structures of the anti-tumour antibiotics PD 114,720 and PD 114,721*. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1984: p. 21, 1450- 1452.
64. Hamamoto, T., H. Seto, and T. Beppu, *Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. II. Structure elucidation*. J Antibiot (Tokyo), 1983. **36**(6): p. 646-50.
65. El-Tanani, M., et al., *Mechanisms of Nuclear Export in Cancer and Resistance to Chemotherapy*. Cancers, 2016. **8**(3).
66. Turner, J.G., J. Dawson, and D.M. Sullivan, *Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer*. Biochem Pharmacol, 2012. **83**(8): p. 1021-32.
67. Komiyama, K., et al., *Antitumor activity of leptomycin B*. J Antibiot (Tokyo), 1985. **38**(3): p. 427-9.
68. Newlands, E.S., G.J. Rustin, and M.H. Brampton, *Phase I trial of elactocin*. Br J Cancer, 1996. **74**(4): p. 648-9.
69. Mutka, S.C., et al., *Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity in vivo*. Cancer Res, 2009. **69**(2): p. 510-7.
70. Fung, H.Y. and Y.M. Chook, *Atomic basis of CRM1-cargo recognition, release and inhibition*. Semin Cancer Biol, 2014. **27**: p. 52-61.
71. Gounder, M.M., et al., *Phase IB Study of Selinexor, a First-in-Class Inhibitor of Nuclear Export, in Patients With Advanced Refractory Bone or Soft Tissue Sarcoma*. J Clin Oncol, 2016. **34**(26): p. 3166-74.
72. Abdul Razak, A.R., et al., *First-in-Class, First-in-Human Phase I Study of Selinexor, a Selective Inhibitor of Nuclear Export, in Patients With Advanced Solid Tumors*. J Clin Oncol, 2016. **34**(34): p. 4142-4150.
73. Sun, H., et al., *KPT-330 has antitumour activity against non-small cell lung cancer*. Br J Cancer, 2014. **111**(2): p. 281-91.
74. Chari, A., et al., *Oral Selinexor-Dexamethasone for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma*. N Engl J Med, 2019. **381**(8): p. 727-738.

75. Röntgen, W.C., *Ueber eine neue Art von Strahlen*. 1895.
76. Freund, L., *Ein mit Röntgenstrahlen behandelter Fall von Naevus pigmentosus piliferus*. Wiener Medizinische Wochenschrift, 1897.
77. Cornforth, M.N. and J.S. Bedford, *X-ray--induced breakage and rejoining of human interphase chromosomes*. Science, 1983. **222**(4628): p. 1141-3.
78. Hutchinson, M.N.D., M. Mierzwa, and N.J. D'Silva, *Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer*. Oncogene, 2020. **39**(18): p. 3638-3649.
79. Ogawa, Y., *Paradigm Shift in Radiation Biology/Radiation Oncology- Exploitation of the "H(2)O(2) Effect" for Radiotherapy Using Low-LET (Linear Energy Transfer) Radiation such as X-rays and High-Energy Electrons*. Cancers (Basel), 2016. **8**(3).
80. Hall, E.J. and A.J. Giaccia, *Radiobiology for the radiologist*. Eighth edition. ed. 2019, Philadelphia: Wolters Kluwer. vii, 597 pages.
81. Arscott, W.T., et al., *Palliative Radiotherapy: Inpatients, Outpatients, and the Changing Role of Supportive Care in Radiation Oncology*. Hematol Oncol Clin North Am, 2020. **34**(1): p. 253-277.
82. Qiu, G.H., et al., *Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B*. Cytotechnology, 2015. **67**(1): p. 1-12.
83. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
84. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2315-9.
85. Silva, G., et al., *Trans-chalcone increases p53 activity via DNAJB1/HSP40 induction and CRM1 inhibition*. Plos One, 2018. **13**(8).

86. Loughery, J., et al., *Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(12): p. 7666-80.
87. Strofer, M., et al., *Stabilisation and knockdown of HIF--two distinct ways comparably important in radiotherapy*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(5): p. 805-12.
88. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
89. Nguyen, K.T., M.P. Holloway, and R.A. Altura, *The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease*. Int J Biochem Mol Biol, 2012. **3**(2): p. 137-51.
90. Ochi, S., Y. Nishiyama, and A. Morita, *Development of p53-targeting drugs that increase radioresistance in normal tissues*. J Med Invest, 2019. **66**(3.4): p. 219-223.
91. Deng, C., et al., *Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control*. Cell, 1995. **82**(4): p. 675-84.
92. Kim, I.S., et al., *Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23139-45.
93. Azizian, N.G. and Y. Li, *XPO1-dependent nuclear export as a target for cancer therapy*. J Hematol Oncol, 2020. **13**(1): p. 61.
94. Joiner, M. and A.v.d. Kogel, *Basic clinical radiobiology*. 4th ed. 2009, London: Hodder Arnold ;. vi, 375 p.
95. Koyasu, S., et al., *Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge*. Cancer Sci, 2018. **109**(3): p. 560-571.
96. Steinhoff, A., et al., *Cellular oxygen sensing: Importins and exportins are mediators of intracellular localisation of prolyl-4-hydroxylases PHD1 and PHD2*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **387**(4): p. 705-11.

97. Yasumoto, K., et al., *Role of the intracellular localization of HIF-prolyl hydroxylases*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(5): p. 792-7.
98. Depping, R., et al., *The Nuclear Export Inhibitor Selinexor Inhibits Hypoxia Signaling Pathways And 3D Spheroid Growth Of Cancer Cells*. *Onco Targets Ther*, 2019. **12**: p. 8387-8399.
99. Mylonis, I., et al., *Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(41): p. 27620-7.
100. Shin, D., et al., *VDUP1 mediates nuclear export of HIF1alpha via CRM1-dependent pathway*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(5): p. 838-48.
101. Tang, L., et al., *Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018. **37**(1): p. 87.
102. Kunkel, M., et al., *Overexpression of GLUT-1 is associated with resistance to radiotherapy and adverse prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity*. *Oral Oncol*, 2007. **43**(8): p. 796-803.
103. De Schutter, H., et al., *The prognostic value of the hypoxia markers CA IX and GLUT 1 and the cytokines VEGF and IL 6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy +/- chemotherapy*. *BMC Cancer*, 2005. **5**: p. 42.
104. Luo, X.M., S.H. Zhou, and J. Fan, *Glucose transporter-1 as a new therapeutic target in laryngeal carcinoma*. *J Int Med Res*, 2010. **38**(6): p. 1885-92.
105. Ferreiro-Neira, I., et al., *XPO1 Inhibition Enhances Radiation Response in Preclinical Models of Rectal Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(7): p. 1663-73.
106. Wahba, A., et al., *The XPO1 Inhibitor Selinexor Inhibits Translation and Enhances the Radiosensitivity of Glioblastoma Cells Grown In Vitro and In Vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2018. **17**(8): p. 1717-1726.

107. Muz, B., et al., *Selinexor Overcomes Hypoxia-Induced Drug Resistance in Multiple Myeloma*. *Transl Oncol*, 2017. **10**(4): p. 632-640.
108. Janssens, G.O., et al., *Accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide for laryngeal cancer: results of a phase III randomized trial*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(15): p. 1777-83.
109. Rischin, D., et al., *Prognostic significance of [18F]-misonidazole positron emission tomography-detected tumor hypoxia in patients with advanced head and neck cancer randomly assigned to chemoradiation with or without tirapazamine: a substudy of Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study 98.02*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(13): p. 2098-104.
110. Toustrup, K., et al., *Gene expression classifier predicts for hypoxic modification of radiotherapy with nimorazole in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Radiother Oncol*, 2012. **102**(1): p. 122-9.
111. Dirix, P., et al., *Dose painting in radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma: value of repeated functional imaging with (18)F-FDG PET, (18)F-fluoromisonidazole PET, diffusion-weighted MRI, and dynamic contrast-enhanced MRI*. *J Nucl Med*, 2009. **50**(7): p. 1020-7.
112. Eschmann, S.M., et al., *Hypoxia-imaging with (18)F-Misonidazole and PET: changes of kinetics during radiotherapy of head-and-neck cancer*. *Radiother Oncol*, 2007. **83**(3): p. 406-10.
113. Zips, D., et al., *Exploratory prospective trial of hypoxia-specific PET imaging during radiochemotherapy in patients with locally advanced head-and-neck cancer*. *Radiother Oncol*, 2012. **105**(1): p. 21-8.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Dunst und Herrn Dr. Reinhard Depping für die Bereitstellung dieses Themas und die Begleitung mit vielen Anregungen und Ratschlägen. Beiden danke ich sehr für die kritische und konstruktive Korrektur des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Dunst danke ich für die Möglichkeit der Kooperation zwischen dem Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck und der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck. Ferner danke ich für die stets verbindliche Begleitung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Reinhard Depping bedanke ich mich für die vertrauensvolle und freundschaftliche Begleitung der Dissertation sowie die Freiheiten, die ich im Labor genießen durfte. Dadurch war ein Raum geschaffen worden, in dem ich durch viele Erfahrungen eine klare eigene Fragestellung entwickeln konnte.

Herrn Dr. Markus Mandl und Frau Dr. Friederike-Katharina Kosyna danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen der Publikationen sowie die hilfreichen Anregungen während der gesamten Arbeit.

Mein ausgesprochener Dank gilt Susann Schindler, Tanja Svensson und Bettina Rudzewski für die gute Einarbeitung und Unterstützung bei der experimentellen Arbeit im Labor. Allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie danke ich für die freundliche Aufnahme ins Labor und den stets freundlichen Kontakt.

Den Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck danke ich für den unkomplizierten Kontakt während der Durchführung der Bestrahlungsversuche.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern für die Freiheit und Herzensbildung, die ich in meinem Elternhaus geschenkt bekommen habe und durch die ich mich frei nach meinen Gaben entwickeln konnte.

Meiner Schwester Bettina Meyfeld danke ich für die kritische Korrektur des Manuskripts.

Der größte Dank gilt meiner Frau Bernadette, die mir neben der Beendigung ihres eigenen Medizinstudiums und den Anforderungen des Alltags mit zwei Kleinkindern immer wieder Freiraum gegeben hat, diese Arbeit fertigzustellen. Du bist einzigartig!

8 Curriculum Vitae

Name, Vorname: von Fallois, Moritz
Geburtsdatum/-ort: 02.10.1991 / Preetz
Familienstand: verheiratet, zwei Töchter

Beruflicher Werdegang

Seit 01.01.2019 **Schön Klinik SE Standort: Neustadt/Holstein**
 Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin und Kardiologie

Studium

2014 - 2018 **Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland**
 Studiengang: Humanmedizin - Klinischer Studienabschnitt
 10/2017: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 11/2018: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
07.11.2018: Approbation als Arzt

2013 – 2014 **Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Deutschland**
 Studiengang: Humanmedizin – Vorklinischer Studienabschnitt
 03/2014: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2011 – 2013 **Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Deutschland**
 Studiengang: Zahnmedizin - Vorklinischer Studienabschnitt

Dissertation

2015 – 2021 Doktorand in der Arbeitsgruppe Hypoxie des Instituts für
 Physiologie der Universität zu Lübeck in Kooperation mit der
 Klinik für Strahlentherapie – UKSH Campus Lübeck
Doktorvater: Prof. Dr. med. J. Dunst

2015/16: Annahme als Doktorand
 Durchführung der Vorversuche

2016: Promotionsstipendium „Exzellenzmedizin“

2016 - 2017: Ausarbeitung experimenteller Teil

2018: Datenauswertung

2017, 2019 Publikation der Ergebnisse
 und 2021

Publikationen

Selinexor decreases HIF-1 α via inhibition of CRM1 in human osteosarcoma and hepatoma cells associated with an increased radiosensitivity.

von Fallois M, Kosyna FK, Mandl M, Landesman Y, Dunst J, Depping R.

J Cancer Res Clin Oncol 2021 Apr 15. doi: 10.1007/s00432-021-03626-2

The Nuclear Export Inhibitor Selinexor Inhibits Hypoxia Signaling Pathways And 3D Spheroid Growth Of Cancer Cells.

Depping R, von Fallois M, Landesman Y, Kosyna FK.

Onco Targets Ther. 2019 Oct 11;12:8387-8399. doi: 10.2147/OTT.S213208

Genom-Editierung in der Humanmedizin: Ethische und rechtliche Aspekte von Keimbahneingriffen beim Menschen.

Drucksache 4 des Centrums für Bioethik der Universität Münster zusammen mit Teilnehmern der Klausurtagung „Genom- Editierung in der Humanmedizin? Ethische und rechtliche Probleme der Anwendung am Menschen“ im März 2017

Radiation response enhanced by inhibition of XPO1 in preclinical rectal cancer models. Literaturkommentar.

von Fallois M. & Depping R.

Strahlenther Onkol. 2016 Dec;192(12):961-962. doi: 10.1007/s00066-016-1060-2.

Selinexor® enhances radiation response in cancer cells: a putative role of HIF?

von Fallois M, Mandl M, Depping R, Dunst J.

Poster auf dem Kongress der deutschen Gesellschaft für Radioonkologie in Berlin 2017

Inhibition of CRM1 enhances radiation response in preclinical cancer cell model

von Fallois M, Mandl M, Dunst J, Depping R.

Abstract für die Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Physiologie in Greifswald 2017