

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Die Rolle der Glyoxalase-I im hepatozellulären Karzinom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Maurice René Michel

geboren am 13.06.1990 in Wiesbaden

Betreuer: Prof. Dr. med. Alexander Zipprich

Gutachterin/Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Claudia Großmann

2. Prof. Dr. med. Jonel Trebicka (Frankfurt)

Eröffnung des Verfahrens: 03.09.2019

Datum der Verteidigung: 17.06.2020

Meinen Eltern gewidmet.

Referat

Die Glyoxalase-I (Glo-I) ist ein entscheidendes Enzym in der Detoxifikation von Methylglyoxal (MGO), einem zytotoxischen Stoffwechselprodukt der Glykolyse. Mehrere Studien konnten bei Neoplasien eine erhöhte Expression der Glo-I zeigen. Die Rolle der Glo-I im hepatozellulären Karzinom ist bisher nicht vollständig geklärt. Daher wurde die Glo-I zuerst in drei verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlicher Malignität (AML 12, HepG2 und Huh7) auf die Protein- und mRNA-Expression sowie die enzymatische Aktivität untersucht. Die Huh7-Zelllinie zeigte sowohl die höchste Expression als auch die höchste Aktivität der Glo-I. Folgend wurden die Huh7-Zellen für die weiteren Versuche verwendet, um den Zusammenhang zwischen der Glo-I und den malignitätsassoziierten Faktoren des HCC zu untersuchen. In den nachfolgenden Versuchen wurde die Glo-I mittels zwei Inhibitoren, Ethylpyruvat (EP) und S-p-bromobenzylglutathion cyclopentyl diester (BrBzGSHCp2), behandelt und die Proliferation sowie die Migration der Huh7-Zellen analysiert. Mit steigenden Konzentrationen nahm die Proliferation der Zellen ab. Um die tiefgreifenden Aspekte einer Glo-I-Inhibition zu verstehen, wurden zelluläre Signalmoleküle, die entscheidend am Wachstum des HCC beteiligt sind, wie die Wachstumsfaktoren VEGFR-2, PDGFR- β sowie deren intrazelluläre Transduktionssignale ERK/pERK, untersucht. Es konnte eine signifikante Abnahme der Expression mit steigender Glo-I-Inhibition festgestellt werden. Im weiteren Verlauf sollten die Ergebnisse der zellulären Proliferations- und Migrationsmarker mittels funktioneller Analysen, im Sinne eines Scratch- und eines Koloniebildenden-Assays, konsolidiert werden. Es konnte mit steigender Glo-I-Inhibition eine Abnahme der Migration und der Koloniebildung nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von Sorafenib auf die Glo-I-Expression und die enzymatische Aktivität untersucht. Sorafenib führte zu einer gesteigerten Glo-I-Protein-Expression und Kinetik. Die Koinkubation von Sorafenib und EP zeigte zudem eine höhere Abnahme der Proliferation als bei alleiniger Therapie mit Sorafenib. Die Ergebnisse belegen die Bedeutung der Glo-I für das Wachstum von HCC-Zellen. Erstmals konnte der Einfluss von Sorafenib auf die Glo-I analysiert werden. Die Therapie mit Glo-I-Inhibitoren und Sorafenib zeigte synergistische Effekte auf HCC-Zelllinien und stellt damit neue Ansätze für eine Kombinationstherapie des HCC dar.

Michel, Maurice: Die Rolle der Glyoxalase-I im hepatozellulären Karzinom, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 66 Seiten, 2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom	1
1.1.1	Inzidenz und Ätiologie	1
1.1.2	Molekulare Pathogenese	1
1.1.3	Molekulare Therapie und Prognose	2
1.2	Das Glyoxalase-Enzymsystem	3
1.2.1	Aufbau und Funktion der Glyoxalase	3
1.2.2	Methylglyoxal	4
1.3	Glyoxalase-I Expression in Krebszellen	5
1.4	Glyoxalase-I und Multidrugresistance (MDR)	6
1.5	Modulatoren der Glyoxalase-I	6
2	Zielstellung	8
3	Material und Methodik	9
3.1	Verwendete Chemikalien	9
3.2	Verwendete Puffer	10
3.3	Verwendete Materialien und Geräte	11
3.4	Zellkultur	12
3.4.1	Zelllinien	12
3.4.2	Ablauf	13
3.4.3	Die Behandlung der Zelllinien mittels Ethylpyruvat und BrBzGSHCp2	13
3.4.4	Die Behandlung der Zelllinien mittels Sorafenib	14
3.5	Gewinnung der Protein-Lysate und Proteinbestimmung	14
3.5.1	Probengewinnung von Protein-Lysaten	14
3.5.2	Proteinbestimmung mittels BCA-Methode nach Bradford	15
3.6	Gelelektrophorese, Western Blot und Antikörper-Chemilumineszenz	15
3.6.1	Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	15
3.6.2	Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	16
3.6.3	Western Blot	17
3.6.4	Antikörperdetektion mittels Chemilumineszenz	17
3.7	Messung der Glyoxalase-I-Aktivität (Enzymkinetik)	19
3.8	Gewinnung von RNA zur Polymeraseketten-Reaktion (PCR)	19
3.8.1	Probengewinnung von RNA-Lysaten	19
3.8.2	RNA-Isolierung	20
3.8.3	Reverse Transkriptase PCR	20

3.8.4	Agarose Gel-Elektrophorese	21
3.9	Proliferations-Assay	22
3.10	Analyse der Proliferation mittels Clonogenic Assay / Colony Forming Assay	22
3.11	Migrations-Analyse durch Wound Healing (Scratch) Assay	23
3.12	Messung von Methylglyoxal mittels ELISA	24
3.13	Statistik	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Die Expression der Glyoxalase-I in AML 12, HepG2 und Huh7 Zelllinien	25
4.1.1	Die Protein-Expression der Glyoxalase-I	25
4.1.2	Die mRNA-Expression der Glyoxalase-I	26
4.1.3	Die enzymatische Aktivität der Glyoxalase-I	27
4.2	Der Einfluss der Glyoxalase-I-Expression und Aktivität auf die Proliferation	28
4.3	Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf die Aktivität und die Protein-Expression	29
4.3.1	Der Effekt von Glo-I-Inhibitoren auf die enzymatische Aktivität	29
4.3.2	Der Effekt von Glo-I-Inhibitoren auf die Protein-Expression	31
4.4	Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf die Proliferation	31
4.5	Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf HCC-assoziierte Signalwege	33
4.5.1	PDGFR- β	33
4.5.2	VEGFR-2	35
4.5.3	ERK/pERK	36
4.5.4	Nrf-2	38
4.6	Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf die Koloniebildung und die Migration	39
4.6.1	Glo-I-Inhibition reduziert die Koloniebildung von Huh7-Zellen	40
4.6.2	Glo-I-Inhibition reduziert die Migration von Huh7-Zellen	41
4.7	Der Einfluss von Sorafenib auf die Glyoxalase-I in Huh7-Zellen	44
4.7.1	Der Einfluss von Sorafenib auf die Protein-Expression der Glo-I	44
4.7.2	Der Einfluss von Sorafenib auf die enzymatische Aktivität der Glo-I	45
4.8	Der Einfluss der Koinkubation von Sorafenib und EP auf die Proliferation	45
4.9	Der Einfluss von Sorafenib und EP auf die Bildung von Methylglyoxal (MGO)	46
5	Diskussion	48
5.1	Die Expression und kinetische Aktivität der Glyoxalase-I	48
5.2	Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf HCC-assoziierte Signalwege	48
5.3	Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf Proliferation, Migration und Koloniebildung	50
5.4	Die Induktion der Glyoxalase-I durch Sorafenib	51
5.5	Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf das Ansprechen von Sorafenib	53

6	Zusammenfassung	54
7	Literaturverzeichnis	55
8	Thesen	66

Abkürzungsverzeichnis

AGEs	Advanced glycation endproducts
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCA	Bicinonic Acid Solution
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BSA	Rinderserumalbumin
BrBzGSHCp ₂	S-p-bromobenzylglutathion cyclopentyl diester
CCVK-I	Colorimetric Cell Viability Kit I
Cu	Kupfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP	Ethylpyruvat
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
pERK	Phosphorylierte Extracellular-signal regulated kinase
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glo-I	Glyoxalase-I
Glo-II	Glyoxalase-II
h	Hour (Stunde)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
Kg	Kilogramm
l	Liter
M	Mol
mM	Millimol
mA	Mikroampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

MGO	Methylglyoxal
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
Nrf-2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PDGFR-β	Platelet derived growth factor β
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
ROS	Reactive oxygen species
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor Rezeptor-2
vs.	Versus
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

1 Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Inzidenz und Ätiologie

Lebereigene oder primäre Krebsformen sind weltweit als sechsthäufigste Krebsentitäten überhaupt sowie als vierthäufigste Krebs-assoziierte Todesursache aufgeführt (Bray et al. 2018). Die weltweite Inzidenz liegt bei 841.080 Fällen und die Mortalität beträgt 781.631 Todesfälle pro Jahr (Ferlay et al. 2018). Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist histologisch mit circa 80 % der Fälle der häufigste primäre Leberkrebs (McGlynn et al. 2015). Die häufigsten Fälle des HCC zeigten sich bisher vor allem in Ostasien und Südostasien sowie in Teilen Afrikas (Subsahara) (Torre et al. 2015). Dies ist durch pathogenetische Faktoren begründet, die in diesen Regionen häufiger vorkommen als in westlichen Ländern. Gründe dafür stellen größtenteils die höheren Infektionsraten an Hepatitis B sowie mit geringerem Anteil an Hepatitis C dar (Petruzzello 2018). Des Weiteren ist ein höheres Aufkommen von Schimmelpilzbefall durch *Aspergillus flavus* in Nahrungsmitteln in Südostasien als bedeutender Kofaktor beschrieben (Kensler et al. 2011). Die Pathogenese des HCC durch Schimmelpilze erklärt sich durch sezernierte Toxine wie das Aflatoxin B1, das ein deutliches karzinogenes Potenzial auf Hepatozyten besitzt (Zhang et al. 2017; Magnussen und Parsi 2013; Lunn et al. 1997). In den westlichen Ländern kommt als Ursache des HCC die äthyltoxische Leberzirrhose sowie die Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) in Betracht, die wesentlich durch entsprechende Lebensstandards begründet sind (White et al. 2012; Mittal et al. 2015). In den letzten Jahren suggerierten Makarova-Rusher et al., dass die steigende Inzidenz am häufigsten auf metabolische Ursachen zurückzuführen ist (Makarova-Rusher et al. 2016). Zunächst ist grundsätzlich darauf hinzuweisen, dass der größte Risikofaktor für ein HCC in der westlichen Welt zu 80 % die Leberzirrhose ist (Fattovich et al. 2004). Zusätzlich haben Patienten mit Leberzirrhose ein erhöhtes Risiko mit einer kumulativen 5-Jahresinzidenz zwischen 8-30 %, ein HCC im weiteren Krankheitsverlauf zu entwickeln (Fattovich et al. 2004). Daraus erklären sich einige Gemeinsamkeiten in veränderten Stoffwechselwegen, die zunächst zu einer Leberzirrhose führen und im weiteren Verlauf zu einem Karzinom bzw. dem HCC voranschreiten (Luedde et al. 2014).

1.1.2 Molekulare Pathogenese

Grundlage für die Entwicklung des HCC in den meisten Fällen ist eine inflammatorische Reaktion, wie sie bei der Leberzirrhose zu finden ist. Dass die Leberzirrhose zu einem HCC führen kann, ist durch die ständigen Umbauprozesse in einer inflammatorischen Leber begründet, die die

vermehrte Zellteilung anregen und dadurch eine Prädisposition für Mutationen darstellen (Ding und Wang 2014; Kiraly et al. 2015). Diese Umgebung („tumour microenvironment“) fördert eine maligne Transformation in primären Hepatozyten unter anderem durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) (Ramesh et al. 2016; Pikarsky et al. 2004). Ein weiterer Faktor, der zur molekularen Karzinogenese des HCC beiträgt, ist oxidativer Stress in Form von Reactive Oxygen Species (ROS), die während Entzündungsprozessen vermehrt anfallen (Hussain et al. 2003). Darüber hinaus gibt es mehrere identifizierte molekulare Signalwege, die im Verlauf der Entstehung des HCC ihre Funktion hingehend zu einem malignen Potenzial verändern können (Villanueva et al. 2007). Dies lässt sich auf molekularer Ebene in kleinere Teilgebiete aufteilen: In Wachstumsfaktoren, deren jeweilige Wachstumsfaktorrezeptoren, anliegende Rezeptor-Tyrosinkinasen und Signaltransduktionskaskaden sowie die im Nukleus zu aktivierenden Transkriptionsfaktoren. Eine Überexpression oder eine Veränderung dieser zellulären Signalwege hat wiederum eine unkontrollierte Proliferation, Angiogenese und Migration der betroffenen Hepatozyten zur Folge. Als bedeutende Wachstumsfaktorrezeptoren in diesem Kontext wurden unter anderem VEGFR-2, und PDGFR- β sowie deren Signaltransduktionsweg ERK/pERK identifiziert (Chu et al. 2013; Negri et al. 2015; Huynh et al. 2003).

1.1.3 Molekulare Therapie und Prognose

Aufbauend auf den molekularen Grundlagen des HCC wurden in den letzten Jahren mehrere Therapieansatzpunkte definiert. Die molekulare bzw. systemische Therapie hat sich größtenteils bei fortgeschrittenem HCC, d.h. mit makrovaskulärer Invasion und/oder Fernmetastasen bei zugrunde liegender Leberzirrhose der Child-Pugh-Klassifikation A und B (Barcelona Clinic liver cancer (BCLC)-Stadium C), etabliert (Heimbach et al. 2018). Die Prognose in einem fortgeschrittenen Stadium des HCC (BCLC-Stadium C) liegt bei etwa acht bis zehn Monaten, während im terminalen Stadium (BCLC-Stadium D) sich das Überleben auf circa drei Monate beläuft (Forner et al. 2018). Dies ist der Kombination aus zwei Erkrankungen geschuldet, da neben dem HCC auch ein fortgeschrittenes Stadium der Leberzirrhose (Child-Pugh-Klassifikation B und C) vorliegt (Ganten et al. 2017). Seit 2008 gilt Sorafenib (Nexavar®, BAY43–9006), ein Multityrosinkinase-Inhibitor, als molekulare Therapie mit einer verlängernden Überlebenswahrscheinlichkeit von circa 3,5 Monaten (Llovet et al. 2008). Der Wirkmechanismus von Sorafenib verläuft größtenteils über die drei folgenden Ansatzpunkte: PDGFR- β , VEGFR-2, Ras-Raf-MAPK/ERK (Wilhelm et al. 2004; Liu et al. 2006). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Sorafenib ebenfalls ROS induzieren und damit Tumorzellen in die Apoptose führen kann (Coriat

et al. 2012; Chiou et al. 2009). Erst seit Kurzem haben sich mit Regorafenib und Levantinib weitere Tyrosinkinase-Inhibitoren etabliert, die sich positiv auf das Überleben des Patienten auswirken (Bruix et al. 2017; Kudo et al. 2018).

1.2 Das Glyoxalase-Enzymsystem

1.2.1 Aufbau und Funktion der Glyoxalase

Das Glyoxalase-Enzymsystem besteht hauptsächlich aus zwei Enzymen: der Glyoxalase-I (Glo-I; EC 4.4.1.5) und Glyoxalase-II (Glo-II; EC 3.1.2.6). Die Glo-I und Glo-II stellen ein ubiquitär vorkommendes Enzymsystem in allen Zellen von Säugetieren dar, das größtenteils im Zytosol zu finden ist (Hopkins und Morgan 1945). Die Hauptfunktion dieses Enzymsystems besteht darin, Methylglyoxal (MGO) in einem Teilschritt über S-D-Laktoylglutathion in D-Laktat zu detoxifizieren. Methylglyoxal und das reduzierte Glutathion (GSH) bilden nicht-enzymatisch ein Hemithioacetal, das wiederum durch die Glyoxalase-I katalysierte Reaktion in S-D-Laktoylglutathion umgewandelt wird. In einem zweiten Schritt mittels der Glyoxalase-II wird S-D-Laktoylglutathion in D-Laktat unter der Verwendung von Wasser (H₂O) hydrolysiert. Das Glutathion wird durch die Glo-II regeneriert und steht für weitere Reaktionen der Glo-I zur Verfügung (Abbildung 1) (Thornalley 1990). Der Hintergrund für die Reaktion von Methylglyoxal in D-Laktat ist durch die Zytotoxizität von MGO begründet, auf die im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird. In der Literatur wird ferner eine Glyoxalase-III (Glo-III) beschrieben, die in dem Bakterium *E.coli* entdeckt wurde und MGO über einen direkten Schritt in D-Laktat umwandelt (Misra et al. 1995). D-Laktat wird wiederum zu Pyruvat verstoffwechselt (TUBBS und GREVILLE 1959). Die Glo-III wird als Teil der DJ-1 Superfamilie angesehen (Subedi et al. 2011). Auf Grund der ähnlichen Funktionen wird das Enzym DJ-1 bereits als eine neue Glyoxalase gehandelt (Lee et al. 2012). Neben der Glo-I wird Methylglyoxal auch in weitaus geringerem Umfang über die Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-(NADPH)-abhängige Aldo-Keto-Reduktase (AKR) und durch die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) verstoffwechselt (Vander Jagt et al. 1992; Yoshida et al. 1985). Ein Knockout-Modell der Glo-I zeigte, dass die AKR als Kompensationsmechanismus zur Detoxifikation von MGO hochreguliert wurde (Morgenstern et al. 2017).

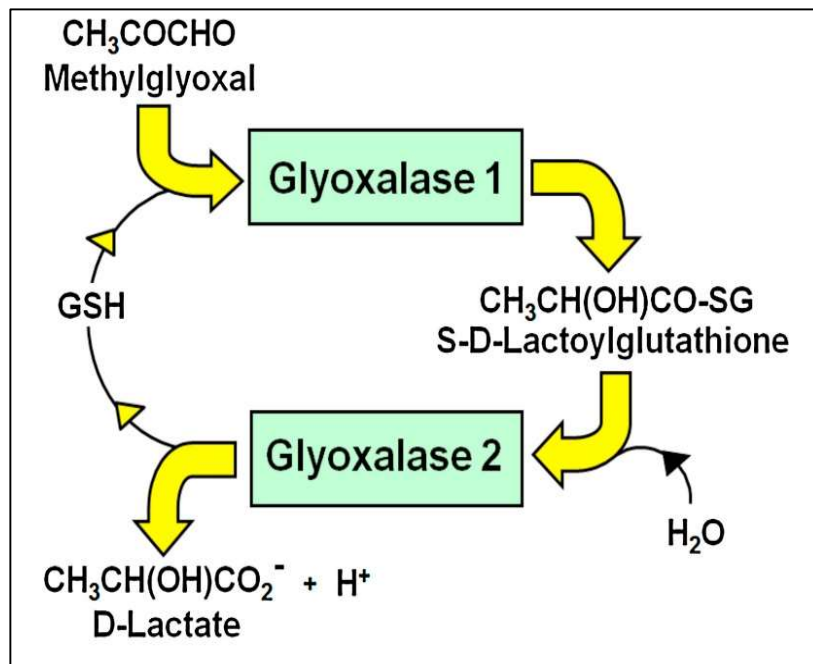


Abbildung 1: Das Glyoxalase-Enzymsystem (Rabbani et al. 2018).

1.2.2 Methylglyoxal

Methylglyoxal (MGO) gehört chemisch zu der Gruppe der Oxoaldehyde und bildet eine reaktive Carbonylverbindung. MGO fällt größtenteils nicht-enzymatisch während der Glykolyse an, hauptsächlich durch den Abbau der Triosephosphate Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GA3P) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) (Phillips und Thornalley 1993; Richard 1993), oder enzymatisch durch die Triosephosphat-Isomerase (TIM) und die Methylglyoxal-Synthase (Pompliano et al. 1990). Die Zytotoxizität von MGO lässt sich durch die modifizierenden bzw. glykierenden Eigenschaften auf Nukleinsäure (Genom), Proteine (Proteom) und Lipide bzw. basische Phospholipide erklären, die zu der Bildung von „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) führen (Thornalley 2003). Die AGEs binden wiederum an ihren Rezeptor RAGE und können dadurch inflammatorische Prozesse sowie maligne Transformationen induzieren (Piperi et al. 2017). Die Glykierung von Proteinen wurde bereits 1912 von Maillard beschrieben und ist bis heute unter der Maillard-Reaktion bekannt (Maillard 1912). Die Glykierung an Proteinen durch MGO findet größtenteils an Arginin-Resten statt, wodurch die AGEs Hydroimidazolone (MG-H1), Argpyrimidin und Tetrahydropyrimidin (THP) gebildet werden (Rabbani und Thornalley 2012). Der größte Anteil dabei ist auf das MG-H1 zurückzuführen, während das Argpyrimidin eine untergeordnete Rolle spielt (Rabbani und Thornalley 2012). In einem weitaus geringeren Umfang werden auch Lysin- und Zystein-Reste durch MGO glykiert, die in Anbetracht der Zytotoxizität eine untergeordnete Rolle spielen. Nukleinsäure assoziierte AGEs wie

Imidazapurinon MGdG-Addukte führen zu höheren Mutationsraten, DNA-Doppelstrangbrüchen und Zytotoxizität (Rabbani et al. 2018; Thornalley et al. 2010). In diesem Kontext führt eine Akkumulation von MGO zu oxidativem Stress durch die Induktion von ROS auf Grund von mitochondrialer Dysfunktion (Rabbani und Thornalley 2008; Rosca et al. 2002). Die Rolle von MGO in der Entstehung von Krankheiten kann von zwei Seiten betrachtet werden. In chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus zeigten sich höhere Konzentrationen an MGO (Kalapos 2013). Auf der anderen Seite - so z.B. in vielen Krebszellen - zeigte sich eine erhöhte Expression von Glo-I und geringere MGO Konzentrationen, da diese sonst für die Tumorzellen eine höhere Zytotoxizität bedeutet hätte. So können geringe Mengen an MGO zu Tumorprogression führen, während sehr hohe Mengen zur Inhibition des Tumorwachstums beitragen (Nokin et al. 2017).

1.3 Glyoxalase-I Expression in Krebszellen

In vielen Krebsarten wurde die Glyoxalase-I analysiert und eine Überexpression festgestellt (Geng et al. 2014). In Biopsien von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx zeigte sich eine erhöhte Glo-I-Expression, die mit einer verschlechterten Prognose einherging (Kreycy et al. 2017). In dreifach negativen (keine Oberflächenrezeptoren) Brustkrebs-Histologien konnte eine verminderte Konzentration an MGO-Residuen (Argpyrimidin) sowie eine erhöhte Aktivität der Glo-I nachgewiesen werden (Chiavarina et al. 2014). In Her2neu-positivem Brustkrebs konnte durch proteomische Analysen ebenfalls eine gesteigerte Glo-I-Expression - neben Stoffwechselwegen der Glykolyse - identifiziert werden (Zhang et al. 2005). In genomischen Analysen von Magenkarzinomgewebe zeigte Glo-I das größte Potenzial zur Karzinogenese (Hosoda et al. 2014); eine weitere Arbeitsgruppe assoziierte eine Überexpression der Glo-I mit einem fortgeschrittenem Tumor-Stadium und einer gesteigerten Tumorprogression (Cheng et al. 2012). Neben den oben genannten Tumorgeweben wurden ähnliche Aspekte auch im Prostata-Karzinom (Baunacke et al. 2014; Burdelski et al. 2017), Nierenzellkarzinom (Antognelli et al. 2006), kolorektalen Karzinom (Ranganathan et al. 1993), Pankreaskarzinom (WANG et al. 2012), malignen Melanom (Bair et al. 2010) und im Plattenepithelkarzinom der Haut beschrieben (Zou et al. 2015). Der Grund für eine erhöhte Expression der Glyoxalase-I in Tumorgewebe wird in der Literatur hauptsächlich durch den höheren Energiebedarf von Tumorzellen erklärt, besser bekannt als der „Warburg-Effekt“ (WARBURG 1956). Durch die gesteigerte Glykolyse in Tumorzellen entsteht eine höhere Akkumulation von Methylglyoxal, das während dieser Stoffwechselwege als Nebenprodukt anfällt. Tumorzellen schützen sich durch ihr vermehrtes Wachstum mittels der Glo-I vor zytotoxischem Methylglyoxal.

1.4 Glyoxalase-I und Multidrugresistance (MDR)

Da sich eine erhöhte Expression der Glo-I in verschiedenen Tumorentitäten zeigte, wird auch darin eine Ursache in der Multidrugresistance (MDR) gegenüber zytotoxischer Chemotherapie gesehen (Thornalley und Rabbani 2011). Chemotherapien wirken in der Regel zytotoxisch, indem ROS-induziert und Teile der DNA beschädigt oder Mikrotubuli inhibiert werden und somit eine pro-apoptotische Wirkung haben (Kim et al. 2002). Daher ist es naheliegend, dass auch Tumorzellen durch die gesteigerte Glo-I-Aktivität und -Expression einen Verteidigungsmechanismus etabliert haben. Eine cDNA-Hybridisierung von Apoptose-resistenten Leukämie-Zelllinien gegenüber Chemotherapeutika wie Adriamycin und Etoposid zeigte eine Glo-I-Überexpression und eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zu den Wild-Typ-Zellen (Sakamoto et al. 2000). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Glo-I-überexprimierten Zelllinien gegenüber Mitomycin und Adriamycin gezeigt werden (Ranganathan et al. 1995). Eine Vincristin-resistente Magenkarzinom Zelllinie zeigte ebenfalls in einer proteomischen Analyse eine gesteigerte Glo-I-Expression (Yang et al. 2008). In einem Mausmodell konnten die zytotoxischen Effekte von Streptozocin, das bei neuroendokrinen Tumoren (NET) wie beim Insulinom eingesetzt wird, durch eine gesteigerte Expression der Glo-I vermindert werden (Kim et al. 2013). Die genauen Hintergründe, die zu MDR durch Glyoxalase-I-Expression führen, sind noch nicht ausreichend geklärt. Vermutet wird jedoch, dass durch die zytotoxischen Eigenschaften von Chemotherapeutika unter anderem auf die DNA durch Glykierung, die Glo-I-Expression als Schutzmechanismus aktiviert wird (Thornalley 2003; Thornalley et al. 2010). Erhöhte Konzentrationen an Methylglyoxal können zusätzlich durch Chemotherapeutika entstehen und eine höhere Aktivierung der Glo-I bewirken (Rabbani et al. 2018).

1.5 Modulatoren der Glyoxalase-I

Auf Grund der Datenlage bezüglich der Glo-I in Tumorzellen wurden mehrere Inhibitoren der Glo-I entwickelt und sowohl in in-vitro als auch in-vivo Studien analysiert. Eine Inhibition der Glo-I zeigte in mehreren in-vitro sowie in-vivo Analysen anti-proliferative sowie pro-apoptotische Effekte auf Tumorzellen, die im Folgenden erläutert werden. Zum Beispiel zeigte Ethylpyruvat (EP) durch Modulation der Glo-I anti-inflammatorische Effekte (Hollenbach et al. 2008). Die Glo-I Aktivität konnte mittels EP in Leukämie-Zellen reduziert werden, wodurch ein vermindertes Wachstum der Zellen beobachtet wurde (Birkenmeier et al. 2016). Ähnliche anti-proliferative Effekte stellten sich auch in S-p-bromobenzylglutathion cyclopentyl diester (BrBzGSHCp₂) behandelten Leukämie-Zellen dar (Thornalley et al. 1996a; Thornalley et al.

1996b). Des Weiteren führte der Einsatz von BrBzGSHCp₂ in Glo-I überexprimierten Leukämie-Zellen zu einer Sensitisierung gegenüber zytotoxischer Chemotherapie und führte bei anfangs resistenten Zellen zur Aktivierung der Apoptose (Sakamoto et al. 2000). In Stammzellen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) wurde durch BrBzGSHCp₂ ein anti-proliferativer Effekt sowie eine höhere Sensitivität gegenüber Tyrosinkinase-resistenten Zellen beschrieben (Takeuchi et al. 2010). In humanen Lungenkrebs-Zellen mit höherer Glo-I-Expression und Aktivität zeigte BrBzGSHCp₂ pro-apoptotische Effekte (Sakamoto et al. 2001). Neben den oben genannten bekannten Inhibitoren zeigten bereits etablierte Medikamente auch inhibitorische Effekte auf die Glo-I-Expression. Dazu gehört beispielsweise das weit verbreitete Antidiabetikum Metformin, das die Glo-I Expression in Endometriumkarzinom-Zellen verminderte und die Ansprechbarkeit von Chemotherapeutika verbesserte (Dong et al. 2012). Ähnliches gilt auch für Troglitazone, ebenfalls ein Antidiabetikum, das die Glo-I Expression in Glioma-Zellen inhibierte (Helgager et al. 2010).

2 Zielstellung

Eine erhöhte Expression der Glyoxalase-I konnte bisher in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Im HCC bleibt die Rolle der Glo-I noch unzureichend geklärt. Die Zusammenhänge der Glo-I auf molekulare Signalwege des HCC sind bisher nicht untersucht. Daher ist das Ziel dieser Versuche, die Bedeutung der Glo-I auf malignitätsassoziierte Faktoren des HCC zu untersuchen. Mittels zwei unabhängiger Inhibitoren der Glo-I, EP und BrBzGSHCp₂, soll der Einfluss auf die Proliferation, Migration sowie die HCC-assoziierten Signalwege PDGFR- β , VEGFR2 und ERK/pERK gezeigt werden. Diese Ergebnisse sollen in Kolonie- und Migrations-Assays weiter untersucht werden. Ebenfalls ist es Ziel, den Effekt von Sorafenib, ein Multi-Tyrosin-Kinase Inhibitor in der Erstlinien-Therapie des fortgeschrittenen HCC, auf die Expression und kinetische Aktivität der Glo-I zu untersuchen, was bisher unbekannt ist. Zudem werden die Effekte einer Koinkubation von Glo-I-Inhibitoren und Sorafenib auf die Proliferation von HCC-Zellen untersucht. Zusammenfassend soll in dieser Arbeit die Bedeutung der Glo-I für die Karzinogenese des HCC untersucht sowie der Einfluss einer systemischen Therapie mittels Sorafenib auf die Glo-I beschrieben werden. Dies passiert mit dem möglichen Hintergrund, die Glyoxalase-I als therapeutischen Ansatzpunkt des hepatozellulären Karzinoms in fortgeschrittenem Stadium zu identifizieren und um eine mögliche Kombinationstherapie mit Sorafenib zu etablieren.

3 Material und Methodik

3.1 Verwendete Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
3 MM Papier	Whatman, Maidstone, UK
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Albumin Standard	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau Na-Salz	Roth, Karlsruhe
S-p-bromobenzylglutathion cyclopentyl diester (BrBzGSHCp2)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomasie [®] Brilliantblau	AppliChem, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies, CA, USA
DMEM/F-12	Gibco Life Technologies, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Ethylpyruvat (EP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FKS), Gibco	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
Glutathion (GSH)	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immobilon P PVDF-Membran	Millipore/Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Molecular Weight Marker (Precision Plus Protein Kaleidoscope)	Bio Rad, CA, USA
Methylglyoxal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Polyacrylamide	Serva, Heidelberg
Proteinaseinhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pierce TM BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Sorafenib	Bayer, Leverkusen
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Boehringer, Mannheim
Tris/HCL	Roth, Karlsruhe

Trizol	Qiazol, Qiagen, Hilden
TEMED	Serva, Heidelberg (ODER Roth?)
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Western Bright™ Quantum	Advansta, Menlo Park, CA, USA

3.2 Verwendete Puffer

0,5 M Tris: 30,29 g auf 500 ml Aqua dest.; pH 6,8

1,5 M Tris: 90,86 g auf 500 ml Aqua dest.; pH 8,8

Blotto (10x):
 24,24 g Tris
 88,13 NaCl
 10 ml Tween 20
 Gelöst in 1 L Aqua dest.; pH = 7,5

Blocking-Solution:
 1x Blotto
 5% Milchpulver oder 5% BSA

Laufpuffer (10x):
 31,0 g Tris
 144,0 g Glycine
 10% SDS
 Gelöst in 1 L Aqua dest.

PBS:
 137 mM Natriumchlorid
 2.7 mM Kaliumchlorid
 8.4 mM Dinatriumhydrogenphosphat
 1.5 mM Kaliumdihydrogenphosphat
 gelöst in Aqua dest., pH = 7.4

RIPA-Puffer:
 150 mM NaCl
 10 mM Tris
 1% Nonidet P-40
 0,1 % SDS

1% Na-Deoxycholate
0,1% Triton X-100
1 mM EDTA
184 mg/l Na-Orthovanadate
Proteinaseinhibitor-Cocktail, Sigma

RPMI 1640:

RPMI 1640 Pulver (Biochrom)
3,7 g Natrium-Bikarbonat
Gelöst in 1 L Aqua dest., pH = 7,2
Steril filtriert

SDS-Probenpuffer (5x):

62,5 mM Tris/HCL pH 6,8
2 % SDS
10 % Glycerol
0,14 mM Bromphenolblau Na-Salz
Gelöst in 50 ml Aqua dest.

Transferpuffer (5x):

250 mM Tris
1920 mM Glycin
Gelöst in 2 L Aqua dest

Transferpuffer (1x):

400 ml 5x Transferpuffer
1200 ml Aqua dest.
400 ml Methanol

TBE (5x):

54,45 g Tris
27,5 g Borsäure
25 ml EDTA 0,5 M
Gelöst in 1 L Aqua dest.; pH 8,0

3.3 Verwendete Materialien und Geräte

100 mm Schalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
15 ml Tubes	Greiner Bio one, Kremsmünster, Österreich
50 ml Tubes	Greiner Bio one, Kremsmünster, Österreich

μ-dishes	Ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland
Brutschrank Hera cell	Heraeus, Hanau
Bio Rad PowerPac Basic	Life Science, München
Bio Doc Analyzer	Biometra, Göttingen
Blotkammer TE22 Mighty Small Transphor	Hoefer Inc., MA, USA
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
Imager Fusion Fx 7	Peqlab, Erlangen
Krystal Glas Küvette (10 mm)	Hellma, Berlin
Magnetischer Rühr Tisch MR 3001 K	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Keyence Biozero BZ 8000	Keyence, Osaka, Japan
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus Life Science, Hamburg
Mixing Block MB-102	Bioer, Hangzhou, China
Photometer Amersham ultrospec 2100 pro	Amersham pharmacia biotech, Cambridge, UK
pH Messgerät WTW inoLab Level 2	Xylem Analytics, Weilheim
Pipetten 10 ml, 25 ml	Cellstar, Greiner Bio one, Kremsmünster, Österreich
Schwenktisch	Rocky 3D,
Stromgenerator PowerPac Basic	Bio Rad, CA, USA
Stromgenerator EPS 2A200	Hoefer, Sulzbach
T75 Flaschen (75 cm ²)	Cellstar Greiner Bio One, Frickenhausen
Vortexer MS 2 Minishaker	IKA, Staufen
Waage Mettler AT261	Mettler Toledo, Lübeck
Waage CPA22025	Sartorius, Göttingen
Wasserbecken Makrolom-bath tank 19M	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zellbank	Heraeus, Hanau
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.4 Zellkultur

3.4.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien Huh7 (Human), HepG2 (Human) und AML 12 (Maus; ATCC R CRL-2254 TM) wurden mit ihren entsprechenden Medien in einem Brutschrank bei 37° C und 5 %

Kohlendioxid versetzten wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Huh7-Zelllinie erhielt das Kulturmedium DMEM, die HepG2 Zelllinie RPMI 1640 und die AML 12 DMEM/F12. Die verwendeten Kulturmedien erhielten zusätzlich 10 % FKS (fetales Kälberserum). Zusätzlich erfolgte in allen Zelllinien die Zugabe von 1 % Penicillin/Streptomycin, um mögliche Infektionen zu vermeiden.

3.4.2 Ablauf

Die Medien der einzelnen Zelllinien wurden alle drei Tage gewechselt. Vor jeder Verwendung der Medien erfolgte eine Erwärmung in einem Wasserbad bei 37 °C. Bei einer Konfluenz von ca. 70 % wurden die Zelllinien passagiert und in einem Verhältnis von 1:10 oder 1:20 in neue Kulturflaschen überführt. Zum Passagieren der Zellen wurde Trypsin (1 ml pro 75 cm² Kulturflasche) verwendet. Nach Zugabe von Trypsin wurden die Zellen für drei Minuten im Brutschrank inkubiert. Größere Volumina an Trypsin wurden vermieden, da dies zur Schädigung der Zellen führen kann. Die Kontrolle der „trypsinisierten“ und somit nicht-adhären Zellen erfolgte lichtmikroskopisch. Daraufhin wurde die Reaktion des Trypsins mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) terminiert, um die Zellen in ein 10 ml oder 50 ml Tube zu überführen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation entsprechend der verwendeten Zelllinie bei 1500 U/m (Huh7, AML 12) oder bei 600 U/m (HepG2) bei 4 °C für 5 min, und die Re-Suspension in frisches Kulturmedium. Die Zellen wurden wiederum in eine T75 Flasche zur weiteren Kultivierung im Brutschrank überführt und mit entsprechendem Medium versetzt. Abhängig von der Versuchsreihe wurden die Zellen nach Trypsinisierung in 100 mm Platten, 6 Well-Platten oder 96 Well-Platten ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer am Lichtmikroskop, um für die jeweiligen Versuchsreihen als Ausgangspunkt eine identische Zellanzahl zu verwenden. Die Zellzählung erfolgte anhand einer 1:5 Verdünnung (20 µl aus Zellsuspension und 80 µl PBS) aus einem 1,5 ml Eppendorf Tube. Die Zellzahl berechnete sich dabei als Zellen/Volumen.

3.4.3 Die Behandlung der Zelllinien mittels Ethylpyruvat und BrBzGSHCp2

Für die Versuchsreihen wurden die Zellen mit den Glyoxalase-I-Inhibitoren Ethylpyruvat (EP) oder S-p-bromobenzylglutathion cyclopentyl diester (BrBzGSHCp2) in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert. Für die Behandlung wurden die Zelllinien zunächst, wie oben beschrieben, in 10 cm Schalen mit 10 ml des entsprechenden Mediums und einer Zellzahl von 300.000 ausplattiert und inkubiert. Bei einer Konfluenz des Zellrasens von ca. 70 %

(lichtmikroskopisch ermittelt) wurde das Kulturmedium durch ein Medium mit EP oder BrBzGSHCp2 gewechselt.

Für die EP-Versuche wurde eine steigende Konzentration von unbehandelt, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM und 20 mM verwendet. Die Menge an EP berechnete sich dabei anhand des Molekulargewichts (476,342 g/mol) und des Zielvolumens (z.B. bei 10 cm Platten wurden 10 ml Medium verwendet).

Zur BrBzGSHCp2-Versuchsreihe wurde eine steigende Konzentration von unbehandelt, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M verwendet (Thornalley et al. 1996a). Eine Konzentration von 20 μ M stellte sich als zu toxisch für die Zelllinien heraus und fand daher in den folgenden Versuchen keine Berücksichtigung mehr. Die behandelten Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und anschließend mittels des Lyse-Puffers geerntet (dazu mehr unter Abschnitt 3.5 Gewinnung der Protein-Lysate und Proteinbestimmung).

3.4.4 Die Behandlung der Zelllinien mittels Sorafenib

Sorafenib ([N-(3-trifluoromethyl-4-chlorophenyl)-N-(4-(2methylcarbamoyl pyridin-4-yl)oxyphenyl)urea), ein Multityrosinkinase-Inhibitor, wurde ebenfalls in steigenden Konzentrationen zur Behandlung der Zelllinien verwendet. Die Versuchsreihen erhielten, die in der Literatur beschriebenen gängigen Konzentrationen, unbehandelt, 2,5 μ M, 5 μ M und 10 μ M (Liu et al. 2006). Die verwendete Menge an Sorafenib errechnete sich ebenfalls anhand des Molekulargewichts (464.829 g/mol) und des Zielvolumens (z.B. 10 ml Medium bei 10 cm Platten). Für die Koinkubationsversuche (Sorafenib und EP) wurden Konzentrationen von 10 μ M Sorafenib auf Grund der starken Zytotoxizität nicht verwendet.

3.5 Gewinnung der Protein-Lysate und Proteinbestimmung

3.5.1 Probengewinnung von Protein-Lysaten

Zur Herstellung von Protein-Lysaten wurden die Zellen zuvor für 24 h mit EP, BrBzGSHCp2 oder Sorafenib in serumfreien (d.h. ohne 10 % FKS) Medium inkubiert. Die in 10 cm Schalen ausgesäten Zellen wurden zunächst aus dem Inkubator entfernt und sofort auf Eis bei 4 °C gelagert. Danach wurde das entsprechende Medium abgesaugt und die Zellen mittels PBS zweimal gewaschen, um die Überreste des Mediums zu entfernen. Dies verhinderte, dass die Reaktionen des Lyse-Puffers in den folgenden Schritten gehemmt wurden. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit RIPA (Sigma-Aldrich) (ca. 50-100 ml pro 10 cm Platte), einem Lyse-Puffer, um die Zellen zu lysieren und somit Proteine-Lysate für die folgenden

Versuche zu gewinnen. Nachdem die Zellen mit RIPA behandelt wurden, konnten die Zellen mit Hilfe eines „Zell-Schabers“ geerntet und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt werden. Das Proteingemisch der Tubes wurde auf Eis für weitere 20 min inkubiert, damit die Lyse abgeschlossen werden konnte. Nach erfolgter Inkubation wurde die Zellsuspension bei 13.000 g/Umdrehungen und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Tubes überführt und bis zum Zeitpunkt der Proteinbestimmung in einem Tiefkühler bei -80 °C gelagert. Das übriggebliebene Pellet wurde verworfen.

3.5.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Methode nach Bradford

Die Proteinbestimmung der RIPA-Zell-Lysate erfolgte anhand einer Standardreihe nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Hierzu wurde zunächst eine Standardreihe mit steigenden Konzentrationen an Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt. Dies bestand aus einer 1:10 Verdünnungsreihe aus BSA mit 0,9 % Natriumchlorid (NaCl). Die Ausgangslösungen betragen dabei die Konzentration an BSA von 0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 µg/µl. Die Protein-Lysate wurden ebenfalls mittels 0,9 % NaCl auf 1:10 verdünnt. Für die Messung wurden je 10 µl der Standardreihe sowie der verdünnten Protein-Proben in Doppelbestimmung auf eine 96 Well-Platte aufgetragen. Im nächsten Schritt wurde die Reaktionslösung aus BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A) und Cu²⁺ (Pierce™ BCA Protein Assay Reagent B) in einem Verhältnis von 1:50 zusammen gemischt. Das Grundprinzip dieser Methode liegt darin, dass Proteine konzentrationsabhängig das Cu²⁺ in Cu¹⁺ reduzieren. BCA wiederum bindet sehr spezifisch das Cu¹⁺ und formt einen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Der Komplex ist direkt proportional zur Protein-Konzentration (Smith et al. 1985). Pro Well wurden 200 µl der Reaktionslösung hinzu pipettiert und anschließend bei 37 °C für 20 min inkubiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte letztendlich mittels Photometer bei einem Absorptionsspektrum von 560 nm. Die Auswertung erfolgte am Computer mittels einer Excel Tabelle durch eine Eichkurve anhand der ermittelten Werte der Standardreihe.

3.6 Gelelektrophorese, Western Blot und Antikörper-Chemilumineszenz

3.6.1 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Das Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)-Polyacrylamidgel besteht aus zwei unterschiedlichen Gelen, einem 8 % Trenngel und einem 7 % Sammelgel. Folgend sind die einzelnen Bestandteile der Gel-Lösungen aufgeführt:

8 % Trenngel		7 % Sammelgel	
Aqua dest.	9,2 ml	Aqua dest.	6 ml
30 % Polyacrylamid	5,2 ml	30 % Polyacrylamid	1,3 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5,2 ml	0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	200 µl	10 % SDS	100 µl
TEMED	30 µl	TEMED	10 µl
10 % APS	150 µl	10 % APS	50 µl

Zur Herstellung der SDS-Gele wird eine Glasschablone (BioRad, CA, USA) mit einer Dicke von 1,5 mm entsprechend der eingesetzten Kammer verwendet. Zuvor erfolgte die Reinigung der Glasplatten mit Ethanol. Die Glasvorrichtung wird in die dafür entsprechende Halterung verankert. Das untere Ende des Glases auf der Halterung wurde mit flüssigem 1 % Agarose versiegelt, damit die Trenn- bzw. Sammelgel-Lösungen nicht ausliefen. Nachdem das Trenngel laut der oben beschriebenen Formel hergestellt wurde, konnte es in die Halterung mittels 5 ml oder 10 ml Pipette aufgetragen werden. Da das Gel einige Minuten bis zur vollständigen Polymerisation benötigte, wurde die obere Schicht mit Ethanol abgedeckt, damit das Gel nicht austrocknete. Nach einer Polymerisationszeit von 20 min, wurde das Ethanol mittels destilliertem Wasser abgewaschen. Anschließend erfolgte die Zubereitung des Sammelgels und das Pipettieren auf das zuvor aufgetragene Trenngel. Im letzten Schritt wurde der Kamm (15 Well, 1,5 mm Dicke) in das Sammelgel eingeführt ohne Luftblasen zu verursachen. Die Polymerisationszeit betrug ebenfalls 20 min. Danach konnte das fertige SDS-Gel entweder sofort für die Gelelektrophorese verwendet oder mit nassen Umschlägen bei 4 °C für maximal zwei Tage gelagert werden.

3.6.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Analyse der Protein Lysate wurden diese zunächst auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt (Laemmli 1970). Diese Methode basiert auf der Ladung der Proteine und einem elektrischen Gradienten, der über das Gel angelegt wird. Abhängig von der ermittelten Proteinkonzentration der zytosolischen Extrakte wurde eine Proteinmenge von 20 µg oder 30 µg verwendet.

Die Proteinextrakte, die bei -80 °C lagerten, wurden auf Eis bei -4 °C aufgetaut. Für die Gele wurde ein Kamm mit 15 Wells und eine Dicke von 1,5 mm pro Well genommen. Die Lysate (20 - 30 µg) wurden mit Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) in einem Verhältnis von ca. 1:3 gemischt. Vor

der Anwendung von SDS wurde dies noch mit 7,5 % Mercaptoethanol versetzt. Dies sorgt für eine gleichmäßige negative Ladung der Proteine. Nach der Herstellung des Protein-SDS-Gemisches wurde dieses bei 95 °C für 5 min erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Anschließend erfolgte nochmals eine Zentrifugation bei 13.000 g/Umdrehungen für 3 min. Während des Erhitzens der Proben konnte die Gelkammer vorbereitet werden. Hierzu wurden die zuvor hergestellten SDS-Gele in der dafür vorgesehenen Halterung befestigt. Die Gelkammer wurde mit 1x Laufpuffer in einer Verdünnung von 1:10 bis zur entsprechenden Markierung aufgefüllt. Nach Entfernen der Kämme aus den Gelen konnten die Proben auf die einzelnen Wells aufgetragen werden. In das erste Well kam bei jedem Western Blot ein Marker (Precision Plus Protein Kaleidoscope, Bio Rad, CA, USA), der das Molekulargewicht anhand farbkodierter Banden widerspiegelte. Das Elektrophorese-Gerät wurde anschließend bei 80 mV für die ersten 20 min bis die Proben das Trenngel erreichten und bei 110 mV für die restliche Zeit der Auftrennung an den Strom (PowerPac Basic, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) angeschlossen. Als die blaue Bande das untere Ende des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese beendet.

3.6.3 Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine anhand des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE, wurden diese anhand einer Transferkammer (TE22 Mighty Small Transphor, Serva, Heidelberg) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen (Burnette 1981). Hierzu wurden mehrere Schichten aus verschiedenen Bestandteilen in einer speziellen Transferkassette verwendet. Diese Schichten setzten sich aus den folgenden Materialien zusammen: Schwamm, Filterpapier, Trenngel, PVDF-Membran, Filterpapier, Schwamm. Während dieser Schritte war stets darauf zu achten, Luftblasen sowie das Austrocknen der Membran zu vermeiden. Die PVDF-Membran wurde zuvor in Methanol aktiviert. Die Transferkassette wurde entsprechend der Lage zu Anode und Katode in der Transferkammer befestigt sowie mit 1x Transferpuffer gefüllt und ein magnetischer Rührstab hinzugefügt. In einer Kühlzelle bei +4 °C wurde die Kammer auf einem magnetischen Rühr Tisch (MR 3001 K, Heidolph, Schwabach) platziert und für 3 Stunden mit 300 mA Strom (EPS 2A200, Hoefer) laufen gelassen.

3.6.4 Antikörperdetektion mittels Chemilumineszenz

Zur Visualisierung der gewünschten Proteine wurden die Membranen in zwei Schritten mit Antikörpern inkubiert. Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran in 5 % Milch oder 5 % BSA, jeweils in 1x Blotto gelöst, für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

Im nächsten Schritt wurden die Membranen mit dem primären Antikörper über Nacht bei +4 °C in der Kühlzelle inkubiert. Im Folgenden sind die verwendeten primären Antikörper sowie deren Verdünnungen, Spezies und Klonalität aufgeführt:

Primärer Antikörper	Verdünnung	Spezies	Klonalität
Glyoxalase I (SC-67351)	1:250 (5 % Milch)	Maus	monoklonal
PDGFR-β (CST-4564)	1:1000 (5 % BSA)	Kaninchen	polyklonal
P44/42 MAPK (Erk1/2) (CST-9102)	1:1000 (5 % BSA)	Kaninchen	polyklonal
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (CST-4370)	1:2000 (5 % BSA)	Kaninchen	monoklonal
VEGFR-2 (CST-9698)	1:1000 (5 % BSA)	Kaninchen	polyklonal
Nrf-2 (SC-722)	1:500 (5 % Milch)	Maus	monoklonal
GAPDH (MAB 374)	1:500 (5 % Milch)	Maus	monoklonal
Vinculin (ab129002)	1:10000 (5 % Milch)	Kaninchen	monoklonal

Nach erfolgter Inkubation wurden die Membranen mit 1x Blotto jeweils dreimal für 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die verwendeten sekundären Antikörper sind wie folgt aufgeführt:

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Spezies	Klonalität
Anti-Mouse (IgG-HRP*, 7076)	1:1000 (5 % Milch)	Pferd	monoklonal
Anti-Rabbit (IgG-HRP*, 7074)	1:1000 (5 % Milch)	Ziege	monoklonal

*Horseradish peroxidase

Nach der Inkubation des sekundären Antikörpers wurden die Membranen erneut mit 1x Blotto für jeweils dreimal 5 min gewaschen. Die Verwendung des sekundären Antikörpers (Anti-Maus oder Anti-Kaninchen) basierte auf der jeweiligen Spezies des primären Antikörpers (Maus oder Kaninchen). Sekundäre Antikörper weisen eine Besonderheit auf, indem sie mit Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP) konjugiert sind, das den Grundstein für die anschließende Visualisierung mittels Chemilumineszenz legt. Die Membranen wurden dafür mit einem Reaktionsgemisch, WesternBright™ Quantum (1:1), für 2 min auf einer Haushaltsfolie inkubiert (Bolt und Mahoney 1997). Überschüssiges Gemisch wurde danach soweit möglich wieder entfernt, sodass kein übermäßiger Film auf der Membran übrigblieb. Anschließend wurden die Membranen mit einem „Imager“ (Fusion Fx-7) detektiert und als digitale Bilddatei

(tagged image file format, TIF) abgespeichert. Das Reaktionsgemisch wurde durch die Horseradish-Peroxidase in ein Licht emittierendes Substrat umgewandelt, das mittels des Imager detektiert werden konnte. Die Quantifizierung der Protein-Expression wurde am Computer mit Image J durchgeführt und anschließend mit Graph Pad Prism statistisch ausgewertet. Als Referenz diente einerseits die unregulierte Kontrolle (sog. Housekeeping Gen) und die unbehandelte Kontrolle.

3.7 Messung der Glyoxalase-I-Aktivität (Enzymkinetik)

Die enzymatische bzw. kinetische Aktivität der Glyoxalase-I wurde in den mit EP, BrBzGSHCp2 und Sorafenib versetzten Zell-Lysaten ermittelt. Bei dieser Methode nach Mannervik et al. wird das Intermediär-Produkt S-D-Lactoylglutathion (siehe Abbildung 1), das als Endprodukt anfällt, photometrisch bei 240 nm ermittelt (Mannervik et al. 1982). Zur Durchführung wurde eine Lösung aus 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer (Na_2HPO_4 , pH 7.0), 2 mM MGO und 2 mM GSH in einer 10 mm Glas-Küvette (Hellma, Berlin, Germany) gemischt und 90 Sekunden inkubiert. Aus dieser Lösung wurde zunächst die Eichung vorgenommen und damit der Referenzwert berechnet. Im nächsten Schritt wurden 10 μl des Zell-Lysats hinzugegeben und mit der Lösung vermischt. Mittels des Photometers (Amersham Ultrospec 2001 pro, GE Healthcare, USA) konnte anschließend die Absorbanz bei 240 nm über 5 min bei Raumtemperatur gemessen werden. Der Ablauf war für alle Proben gleich und erfolgte jeweils dreimal. Als Referenz diente die oben genannte Lösung aus Na_2HPO_4 , MGO und GSH. Die Enzymkinetik berechnete sich als U (μmol Umsatz/min) mittels der folgenden Formel: $A = (\Delta E/\text{min} \times V) / (\epsilon \times d \times v)$; A ist gleich die Enzymaktivität in der Probe, d ist die Schichtdicke der durchstrahlten Lösung (Küvette), V bezieht sich auf das Gesamtvolumen des Testansatzes, v ist das Probevolumen im Testansatz, ϵ ist dabei äquivalent für S-D-Lactoylglutathion mit einem Wert von 2.86 ($\text{mol/l} \times \text{cm}$). Der Anstieg U wiederum wurde mit der Proteinkonzentration (Bestimmung durch BCA-Methode nach Bradford) des Lysats korreliert.

3.8 Gewinnung von RNA zur Polymeraseketten-Reaktion (PCR)

3.8.1 Probengewinnung von RNA-Lysaten

Vor der Probengewinnung der RNA-Lysate wurden die gewünschten Zellen in 100 mm Schalen ausplattiert und bei 70 % Konfluenz mit frischem Medium ohne 10 % FKS für 24 Stunden inkubiert. Als nächstes wurden die Schalen auf Eis gelagert, das Medium abgesaugt und mit PBS zweimal gewaschen. Es erfolgte die Behandlung der Zellen mit 500 μl Trizol. Anschließend

wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und in ein 1,5 ml Tube überführt und resuspendiert. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung. Aufgrund der Toxizität von Trizol erfolgte die Durchführung dieser Arbeiten immer unter einem Abzug.

3.8.2 RNA-Isolierung

Die Proben wurden zuvor auf Eis bei +4 °C aufgetaut. Anschließend wurden die Trizol-Lysate mit (0,1 ml) Chloroform behandelt und gründlich gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis und eine Zentrifugation bei 11.000 U für 15 min und 4 °C. Dadurch entstehen drei Phasen: Eine obere, wässrige Phase (klar, enthält RNA), eine mittlere Phase (trüb, enthält DNA) und eine phenolische Phase (enthält DNA und Protein). Davon wurde die wässrige Phase in ein neues Tube mit etwas Überstand überführt, sodass keine DNA mitpipettiert werden konnte. Die wässrige Phase wurde mit 0,5 ml Isopropanol weiterbehandelt und für 30 min bei -20 °C gelagert. Danach erfolgte nochmals eine Zentrifugation bei 11.000 U für 10 min und 4 °C. Es setzte sich die RNA als gelartiges Pellet ab. Der Überstand wurde abpipettiert, sodass nur noch das Pellet übrigblieb. Das Pellet konnte nun mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und bei 10.000 U für 5 min und 4 °C zentrifugiert werden. Der gesamte Ethanol-Überstand wurde abpipettiert und der Ethanol-Waschschritt wiederholt. Danach wurde das Pellet am Abzug der Steril-Werkbank für 5 bis 10 min getrocknet. Komplettes Austrocknen sollte vermieden werden, da sonst die Löslichkeit der RNA beeinträchtigt werden würde. Die Pellet-Menge wurde darauffolgend in 25 µl Diethylidcarbonat (DEPC)-Wasser gelöst. Zur Messung der RNA-Konzentration wurden die Proben auf 1:100 mit DEPC-Wasser verdünnt. Es folgte die Messung photometrisch bei 260 nm wobei eine DEPC-Probe als Referenz diente. Bei der Arbeit mit RNA wurde zu jeder Zeit mit RNase™ Away (Molecular BioProducts™, ThermoScientific, USA) die Oberfläche, Handschuhe, Pipetten, etc. behandelt sowie Filterspitzen (100ul Biosphere™ Filter Tips, Sarstedt, Nümbrecht; 10ul Biozym, Hannover) und Tubes mit Safelock benutzt, um Verunreinigungen mit RNase und DNA von Laborflächen zu verhindern.

3.8.3 Reverse Transkriptase PCR

Die Reverse Transkriptase (RT) unterteilte sich in drei Schritte: Verdau, RT-Ansatz und die PCR. Der Verdau dient zur Gewinnung isolierter RNA. Dafür wurde Promega RNase free DNase benutzt. Zunächst wurde die RNA in Puffer und DNase für 30 min bei 37 °C und anschließend in einer Stop solution (Promega Madison) für 10 min bei 65 °C erhitzt. Die erfolgreiche DNA-

Auflösung wurde mittels eines Kontroll-Gels untersucht. Nach der Reinigung der RNA von DNA, wurde einzelsträngige cDNA mit Hilfe des RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Rockford, USA) hergestellt. Zunächst wurde die RNA mit Oligo-(dT)-Primern und einem Mix aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) für 5 min bei 65 °C erhitzt. Danach erfolgte eine kurze Inkubation auf Eis und anschließend die Zugabe einer reversen Transkriptase sowie ein weiteres Erhitzen bei 50 °C für 30 min und 85 °C für 5 min. Die gewonnene cDNA konnte nun für die RT-PCR verwendet werden. Zur Amplifikation der cDNA Abschnitte wurden „Forward“, und „Reverse“-Primer sowie Wasser und Taq-Polymerase (Red PCR master mix, strateg, Berlin, Germany) vermischt. Die spezifischen Primer-Paare sind im Folgenden beschrieben (Quelle: Oligonukleotid Synthese Report, Eurofins MWG Operon, Ebersberg):

Oligoname	Sequenz (5' → 3')
Glo-I-human-ffw	CTTCTGGGGTTTCAATTCCTC (21)
Glo-I-human-rr	AATCCATTTACCCAAAAAGG (21)
Glo-I-mouse-ffw	GATTTGGTCACATTGGGATTG (21)
Glo-I-mouse-rr	AGAGAGCATAGGCCAGACTCC (21)
GAPDH-F	GACCCCTTCATTGACCTC (18)
GAPDH-R	GCAATGCCAGCCCCAG (18)

Für die Glo-I und GAPDH PCR wurden die folgenden Programme bzw. Zyklen mittels des Geräts Mastercycler personal (Eppendorf) laufen gelassen:

Glo-I Primer: 95 °C für 2 min, (95 °C für 30 s, 56 °C für 45 s, 72 °C für 45 s) x 30, 72 °C für 2 min für Humane-Primer und 95 °C für 2 min, (95 °C für 30 s, 60 °C für 45 s, 72 °C für 45 s) x 30, 72 °C für 2 min für Maus-Primer. GAPDH Primer: 95 °C für 2 min, (95 °C für 30 s, 58 °C für 45 s, 72 °C für 45 s) x 32, 72 °C für 2 min).

3.8.4 Agarose Gel-Elektrophorese

Zur Herstellung der 1,5 % Agarose-Gele wurde 1,5 g Agarose (Pulver, Carl Roth, Karlsruhe) in 100 ml TBE verdünnt und zum Lösen in einer Mikrowelle erhitzt. Nach Lösung des Agarose/TBE-Gemischs wurde dies kurz abgekühlt und 4 µl Ethidiumbromid (EtBr) hinzu pipettiert. Danach erfolgte das ausgießen in die entsprechende Form. Nach der Polymerisation des Gels konnten die Proben in die Wells aufgetragen werden. In das erste Well wurde 5 µl eines Markers (Mass Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific) gegeben, während die übrigen Wells jeweils 10 µl der

Proben erhielten. Die Gelkammer wurde an den Strom bei 100-120 V angeschlossen bis die Banden durchgelaufen waren. Anschließend wurden Bilder mithilfe eines Imagers (BioDoc Analyzer) aufgenommen und digital als Tif-Datei gespeichert. Die quantitative Ausmessung der Banden erfolgte mittels Image J.

3.9 Proliferations-Assay

Die Zellproliferation wurde mittels Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8) von Promokine ermittelt. Das Prinzip dahinter versteht sich durch die Bio-reduktion von WST-8 durch zelluläre Dehydrogenasen zu einem orangefarbenem Formazan, das in Zellmedium löslich ist. Die Menge an produzierten Formazan ist dabei direkt proportional zur Nummer der viablen Zellen (PromoCell GmbH 12/2016). Zur Messung wurden 96 Well Platten verwendet und 5000 Zellen der jeweiligen Zelllinien mit entsprechendem Medium (100 µl) pro Well ausplattiert. Nachdem die Zellen über Nacht adhären geworden waren, konnte das Medium zuzüglich steigender Konzentrationen an EP, BrBzGSHCp2 oder Sorafenib, 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin gewechselt werden. Die Inkubation erfolgte über verschiedene Zeitintervalle von 6 h, 12 h und 24 h. Anschließend erhielten die Zellen noch eine CCVK-I-Lösung, die weitere 3 h inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels eines Microplate-Readers (iMark™, Bio Rad, CA, USA) bei einer Absorbanz von 450 nm ermittelt. Die unbehandelte Kontrolle diente zur statistischen Auswertung als prozentualer (100 %) Referenzwert. Der oben genannte Ablauf richtete sich anhand der Anleitung des Herstellers PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany).

3.10 Analyse der Proliferation mittels Clonogenic Assay / Colony Forming Assay

Zur Analyse der Proliferation von Huh7-Zellen unter dem Einfluss von EP wurde ein Clonogenic-Assay durchgeführt (Rafehi et al. 2011). Für den Koloniebildungstest wurden 6 Well-Platten mit jeweils 2000 Zellen der Zelllinie Huh7 pro Well ausplattiert. Nachdem die Zellen über Nacht adhären geworden und nur einzelne Zellen sichtbar waren, konnte das Medium mit steigenden Konzentrationen an EP (1-20 mM), 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin gewechselt werden. Um die anti-proliferativen Eigenschaften von EP zu untersuchen, wurde das Medium sowie EP täglich gewechselt. Dadurch sollte eine kontinuierliche Anwesenheit von EP simuliert werden. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Zellen nur einmal mit EP behandelt und das Medium anschließend alle 2 Tage ohne EP gewechselt. Nach 7 Tagen waren Kolonien von über 50 Zellen/Kolonie zu sehen. Im nächsten Schritt wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Kolonien wurden anschließend mit Coomassie-Blau

gefärbt. Das Färbemittel wurde nach 20 min wieder entfernt und die 6 Well Platten mit destilliertem Wasser und Leitungswasser gewaschen. Durch das Coomassie Blau wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Somit konnten die Platten nun mit einem Scanner aufgenommen und als digitales Bild in Form von einer Tif-Datei abgespeichert werden. Die statistische Analyse erfolgte mittels „Colony Area“, ein Image J plugin, das die Fläche misst, die nicht von Zellen bedeckt ist (Guzman et al. 2014). Folgend ist die Rezeptur des Coomassie-Blau-Färbemittel genannt:

<u>Coomassie-Blau (500 ml):</u>	0,5 g Coomassie (0,1 %)
	35 ml Essigsäure
	250 ml Methanol
	215 ml Aqua dest.

3.11 Migrations-Analyse durch Wound Healing (Scratch) Assay

Zur Analyse der Migration wurden „micro-dishes (μ -dishes)“ von der Firma ibidi verwendet (Culture-Insert 2 Well in u-Dish, 35mm high, ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland). Dazu wurden 300.000 Zellen (Huh7) in die jeweiligen μ -dishes ausgesät und für 24 h ruhen gelassen, bis sich eine konfluente Monoschicht bildete. Das „culture-insert“ wurde daraufhin mit einer sterilen Pinzette entfernt, sodass ein zellfreier Spalt von ca. 500 μ m zu sehen war. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen nochmals vorsichtig mit PBS gewaschen, um Zellreste zu entfernen. Danach wurde frisches Medium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin sowie steigenden Konzentrationen an EP (0-20 mM) hinzugefügt. Mittels eines Mikroskops (Keyence Bio Zero) wurden Bilder vor der EP sowie nach der EP Behandlung an unterschiedlichen Zeitintervallen von 6 h, 12 h und 24 h aufgenommen. Ein längerer Zeitpunkt über 24 h hinaus wurde nicht untersucht, da sonst die einsetzende Proliferation der Zellen, die Ergebnisse der Migration hätte verfälschen können. Zur Mikroskopie wurden die Objektive 4x/0.2 oder 20x/0.75 Plan Apo (Nikon, Japan) benutzt und die Bilder erstellt. Die Scratch-Fläche wurde mit Hilfe eines Image J Plugins, „MRI Wound Healing Tool“ (http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macos/wiki/Wound_Healing_Tool), gemessen und anschließend statistisch durch Graph Pad Prism ausgewertet.

3.12 Messung von Methylglyoxal mittels ELISA

Für die Analyse von Methylglyoxal in EP und Sorafenib behandelten Zellen wurde das „Human Methylglyoxal (MGO) ELISA Kit“ von MyBioSource (Kalifornien, USA) verwendet. Zur Messung wurden wiederum Zell-Lysate verwendet. Als Referenz diente eine Standardreihe, die vom Hersteller bereitgestellt wurde. Alle Schritte wurden entsprechend der Gebrauchsanweisung und in Doppelbestimmung mittels 48 Well Platten durchgeführt. Das Prinzip basierte auf vier Schritten: 1. Zugabe von untersuchten Proben in die bereits mit humanen MGO monoklonalen Antikörper bestückten Wells; 2. Biotin markierter Antikörper bindet die Proben; 3. Avidin-Peroxidase wird hinzugegeben; 4. Zugabe von TMB führte zu einem blauen und anschließend zu einem gelben Farbumschlag (Mybiosource). Die Messung des Farbumschlags erfolgte durch einen Microplate reader photometrisch bei 450 nm und basierte auf einer unterschiedlichen Farbtiefe (Optical Density, OD) der zu untersuchenden Zell-Lysate. Dabei kam eine positive Korrelation zwischen Farbtiefe und des zu untersuchenden Lysats zustande.

3.13 Statistik

Die Statistiken in dieser Arbeit wurden alle mittels Graph Pad Prism 5.0 erstellt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Analyse erfolgte per one-way-ANOVA und dem Bonferroni Post-hoc Test, um Unterschiede innerhalb der Gruppen zu untersuchen. Bei wiederholten Messungen erfolgte die Analyse per two-way-ANOVA mit wiederholten Messungen und dem Bonferroni Post-hoc Test, wie es der Fall bei der statistischen Auswertung des Scratch-Assay war

4 Ergebnisse

4.1 Die Expression der Glyoxalase-I in AML 12, HepG2 und Huh7 Zelllinien

Es wurde zunächst die mRNA- sowie Protein-Expression und die spezifische Aktivität der Glyoxalase-I in drei verschiedenen Zelllinien ermittelt: AML 12, HepG2 und Huh7. Die AML 12 gelten als eine immortalisierte Hepatozyten-Zelllinie und dienen daher als Kontrollgruppe (Wu et al. 1994). Die HepG2-Zelllinie wird generell als HCC-Zelllinie anerkannt und wurde ursprünglich als solche beschrieben (Knowles et al. 1980). In anderen Publikationen werden die HepG2-Zellen auch als eine Hepatoblastom-Zelllinie bezeichnet (López-Terrada et al. 2009). Die Huh7-Zelllinie wurde als eine invasive HCC-Zelllinie deklariert (Ao et al. 2017). Das Ziel war es zu identifizieren, inwieweit die Expression der Glo-I in diesen Zelllinien unterschiedlicher Malignität variiert.

4.1.1 Die Protein-Expression der Glyoxalase-I

Die höchste Protein-Expression der Glo-I im Western Blot zeigte sich in der Huh7-Zelllinie ($194,2 \pm 31,34 \%$, $p < 0,05$), die im Vergleich zur Expression in den AML 12-Zellen ($100,0 \pm 19,78 \%$) signifikant höher war. Im Vergleich von Huh7 zwischen HepG2 ($142,0 \pm 35,25 \%$, $p = 0,2207$) zeigte sich eine höhere Expression der Glo-I, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Zwischen den HepG2 und den AML12-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied in der Glo-I-Expression festgestellt werden ($p = 0,3954$) (Abbildung 2, Abbildung 3).

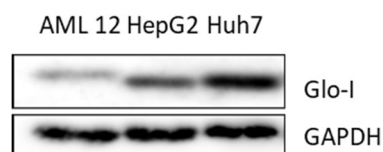


Abbildung 2: Repräsentativer Western Blot (Protein Expression) der Glo-I in den Zelllinien AML 12, HepG2 und Huh7.

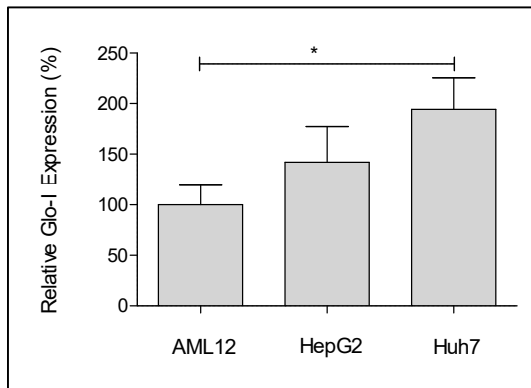


Abbildung 3: Protein Expression der Glo-I in den Zelllinien AML 12, HepG2 und Huh7. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.1.2 Die mRNA-Expression der Glyoxalase-I

Die höchste mRNA-Expression mittels RT-PCR konnte in den Huh7-Zellen ($282,7 \pm 48,40$ %, $p < 0.01$) ermittelt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, den AML 12-Zellen ($100,0 \pm 20,60$ %), war die Expression der Huh7 signifikant höher. Zwischen den HepG2-Zellen ($180,9 \pm 38,55$ %) und den Huh7 zeigte sich eine signifikant höhere Expression der Glo-I-mRNA (HepG2 vs. Huh7: $180,9 \pm 38,55$ % vs. $282,7 \pm 48,40$ %, $p < 0.05$). Die HepG2 zeigten ebenfalls im Vergleich zu den AML 12 eine höhere Expression der Glo-I (HepG2 vs. AML 12: $180,9 \pm 38,55$ % vs. $100,0 \pm 20,60$ %, $p < 0.05$) (Abbildung 4, Abbildung 5).

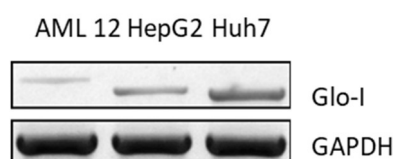


Abbildung 4: RT-PCR (mRNA Expression) der Glo-I in den Zelllinien AML 12, HepG2 und Huh7.

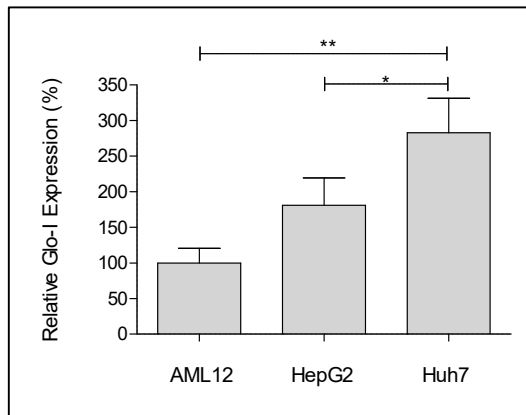


Abbildung 5: mRNA Expression der Glo-I in den Zelllinien AML 12, HepG2 und Huh7. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.1.3 Die enzymatische Aktivität der Glyoxalase-I

Die Huh-7 (0.6 ± 0.1 U/mg) zeigten die höchste spezifische Aktivität der Glo-I im Vergleich zu den AML 12 (0.4 ± 0.1 U/mg) und HepG2 (0.32 ± 0.1 U/mg) (Abbildung 6). Die enzymatische Aktivität der Glo-I war in den Huh7 ($159,6 \pm 25,55$ %, $p < 0.05$) signifikant höher als in den AML 12 ($100,0 \pm 14,76$ %) und in den HepG2 ($81,78 \pm 19,34$ %, $p < 0.05$). Zwischen den HepG2 und AML 12 zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der enzymatischen Aktivität ($p > 0.9$) (Abbildung 7).

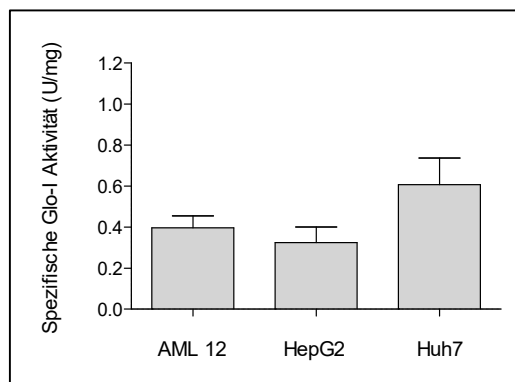


Abbildung 6: Die enzymatische Aktivität der Glo-I (U/mg) in AML 12, HepG2 und Huh7.

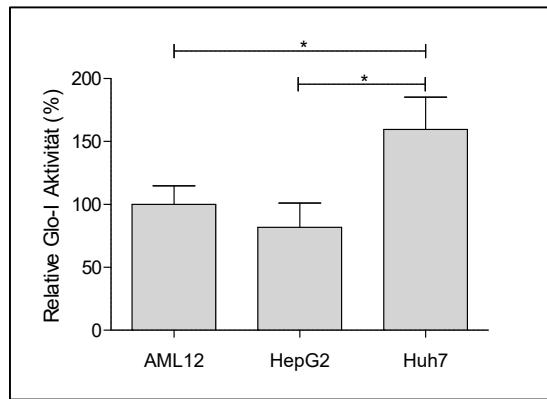


Abbildung 7: Enzymatische Aktivität der Glo-I (%) in AML 12, HepG2 und Huh7. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.2 Der Einfluss der Glyoxalase-I-Expression und Aktivität auf die Proliferation

Als nächstes wurde die Protein-Expression und die enzymatische Aktivität mit der Proliferation verglichen. Die Proliferation wurde durch das WST-8-Assay bei einem Absorptionsspektrum bei 450 nm photometrisch ermittelt. Die y-Achse repräsentiert bei einem Absorptionsspektrum bei 450 nm die Proliferation und die x-Achse jeweils die Glo-I Protein-Expression (prozentual; Abbildung 8) und die spezifische Glo-I-Aktivität (U/mg; Abbildung 9). Die Huh7-Zellen, welche die höchste Expression der Glo-I aufwiesen, zeigten ebenfalls die höchste Proliferationsrate. Insgesamt ist zu erkennen, dass mit steigender Glo-I-Expression die Proliferation von HepG2 und Huh7 zunimmt (Abbildung 8). Die Huh7 zeigten bei höchster spezifischer Aktivität der Glo-I eine höhere Proliferation. Bei den HepG2 war zu erkennen, dass trotz höherer Proliferation die Aktivität nicht erhöht war (Abbildung 9).

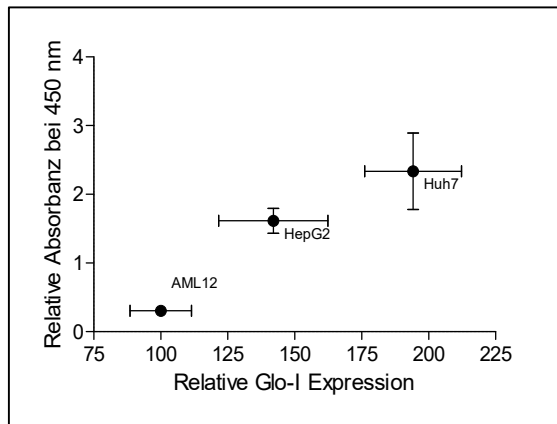


Abbildung 8: Korrelation von Proliferation (Relative Absorbanz bei 450 nm) mit der im Western Blot ermittelten Protein-Expression der Glo-I (%).

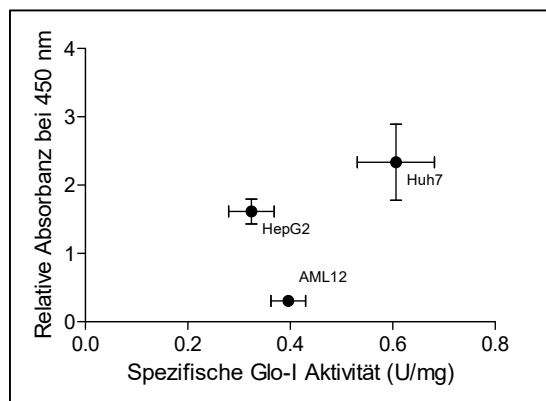


Abbildung 9: Korrelation von Proliferation (Relative Absorbanz bei 450 nm) mit der spezifischen kinetischen Aktivität der Glo-I (U/mg).

4.3 Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf die Aktivität und die Protein-Expression

Da die Huh7-Zelllinie die höchste Expression (Protein, mRNA) und spezifische Aktivität (U/mg) zeigte, wurde diese Zelllinie für die weiteren Versuchsreihen benutzt. Als nächstes wurden die Huh7-Zellen mit zwei in der Literatur bekannten Glo-I-Inhibitoren, EP und BrBzGSHCp2, behandelt (Hollenbach et al. 2008; Thornalley et al. 1996b). In den folgenden Kapiteln werden ausschließlich die Huh7 thematisiert.

4.3.1 Der Effekt von Glo-I-Inhibitoren auf die enzymatische Aktivität

Die Huh7-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an EP (1 mM – 20 mM) und BrBzGSHCp2 (1 μ M – 10 μ M) behandelt und für 24 h inkubiert. Anhand der Protein-Lysate wurde

die spezifische Aktivität (Enzymkinetik) gemessen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100,2 \pm 10,57 \%$) zeigte sich mit steigenden Konzentrationen von EP eine Inhibition der enzymatischen Aktivität der Glo-I. Bei 1 mM ($92,41 \pm 13,77 \%$, $p > 0,9$), 5 mM ($85,53 \pm 3,882 \%$, $p > 0,9$) und 10 mM ($61,58 \pm 7,822 \%$, $p = 0,1011$) konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe gesehen werden. Bei Konzentrationen von 15 mM ($50,63 \pm 15,28 \%$, $p < 0,05$) konnte die kinetische Aktivität signifikant gehemmt werden. Ab einer Konzentration von 20 mM ($64,62 \pm 14,99 \%$, $p = 0,1589$) EP war ebenfalls eine verminderte Aktivität zu messen, jedoch war diese nicht signifikant (Abbildung 10). Bei steigenden Konzentrationen von 1 μM ($39,77 \pm 11,18 \%$, $p < 0,05$), 5 μM ($21,77 \pm 4,582 \%$, $p < 0,01$) und 10 μM ($29,60 \pm 16,18 \%$, $p < 0,01$) BrBzGSHCp2 zeigte sich eine signifikante Abnahme der enzymatischen Aktivität der Glo-I im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 24,95 \%$) (Abbildung 11).

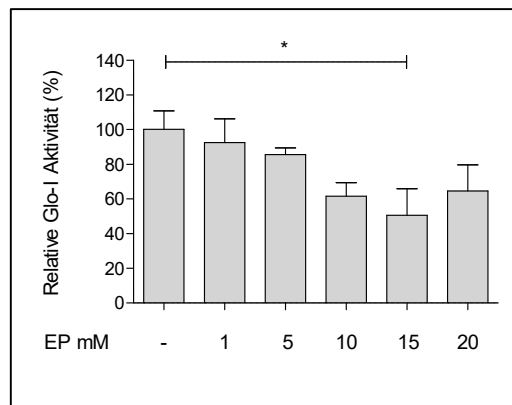


Abbildung 10: Die enzymatische Aktivität der Glo-I (%) nimmt bei steigenden Konzentrationen an EP (mM) bis 15 mM signifikant ab. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

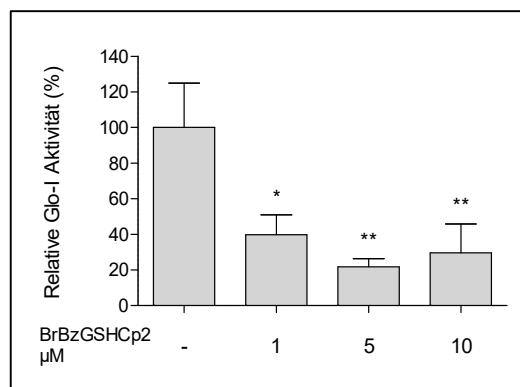


Abbildung 11: Die enzymatische Aktivität der Glo-I (%) nimmt bei steigenden Konzentrationen an BrBzGSHCp2 (μM) signifikant ab. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4.3.2 Der Effekt von Glo-I-Inhibitoren auf die Protein-Expression

Die Behandlung der Huh7-Zellen mit EP führte im Gegensatz zur enzymatischen Aktivität zu keiner Reduktion der Protein-Expression (Abbildung 12, Abbildung 13). Im Gegensatz zur Kinetik konnte kein Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 5,071\%$) und mit steigenden Konzentrationen an EP (1 mM: $111,5 \pm 24,17\%$, $p > 0,9$; 5 mM: $101,3 \pm 32,21\%$, $p > 0,9$; 10 mM: $94,09 \pm 21,44\%$, $p > 0,9$; 15 mM: $106,2 \pm 16,67\%$, $p > 0,9$; 20 mM: $106,7 \pm 10,92\%$, $p > 0,9$; alle $p > 0,05$) gemessen werden.

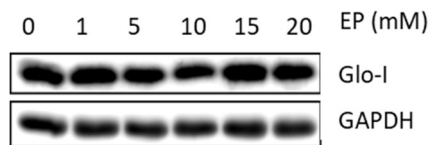


Abbildung 12: Western Blot (Protein Expression) der Glo-I in der Huh7-Zelllinie nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen an EP (0-20 mM).

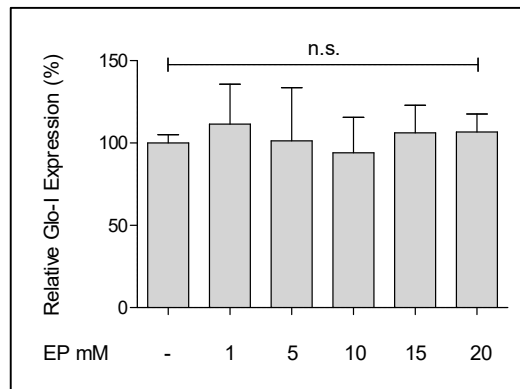


Abbildung 13: Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. $P > 0,05$ ist nicht signifikant (n.s.).

4.4 Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf die Proliferation

Die Analyse der Proliferation der Huh7 erfolgte nach Behandlung mit EP an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten von 6 h und 24 h. Die Versuche wurden nach einem standardisierten Protokoll des Herstellers durchgeführt. Bereits nach 6 h konnte die Proliferation konzentrationsabhängig mit steigender Glo-I-Inhibition reduziert werden. Ab Konzentrationen von 10 mM ($77,44 \pm 5,894\%$, $p < 0,01$) über 15 mM ($64,74 \pm 9,878\%$, $p < 0,01$) bis 20 mM ($58,33 \pm 13,06\%$, $p < 0,001$) EP konnte eine signifikante Abnahme der Proliferation im

Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100,8 \pm 5,924$ %) gemessen werden (Abbildung 14). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch nach 24 h Inkubation. Die Proliferation blieb bei Konzentrationen ab 10 mM ($77,68 \pm 18,40$ %, $p < 0.05$), 15 mM ($68,43 \pm 16,06$ %, $p < 0.001$) und 20 mM ($57,54 \pm 12,17$ %, $p < 0.001$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 10,77$ %, $p < 0.001$) signifikant vermindert (Abbildung 14). Bei der Behandlung der Zellen mit dem zweiten Inhibitor, BrBzGSHCp2, zeigte sich ebenfalls eine dosisabhängige Abnahme der Proliferation. Ähnlich wie die EP-Ergebnisse zeigte die Behandlung mit BrBzGSHCp2 nach 6 h Inkubation eine Abnahme der Proliferation bei Konzentrationen von 1 μ M ($54,66 \pm 9,103$ %, $p < 0.001$), 5 μ M ($53,62 \pm 3,707$ %, $p < 0.001$) und 10 μ M ($27,87 \pm 5,156$ %, $p < 0.001$) gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($100 \pm 11,67$) (Abbildung 15). Nach 24 h konnte bei 1 μ M ($73,29 \pm 14,45$ %, $p < 0.05$), 5 μ M ($63,56 \pm 3,638$ %, $p < 0.01$) und 10 μ M ($32,34 \pm 1,570$ %, $p < 0.001$) eine signifikant geringere Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 10,45$ %) detektiert werden (Abbildung 15).

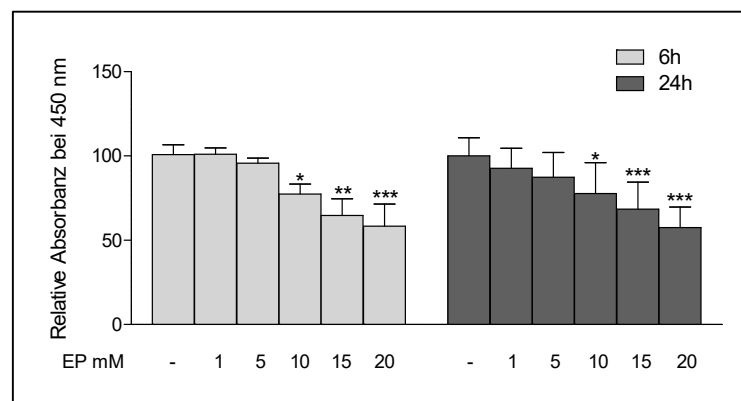


Abbildung 14: Die Proliferation der Huh7-Zellen (Relative Absorbanz bei 450 nm) nimmt bei steigenden Konzentrationen an EP bis 20 mM signifikant ab. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$.

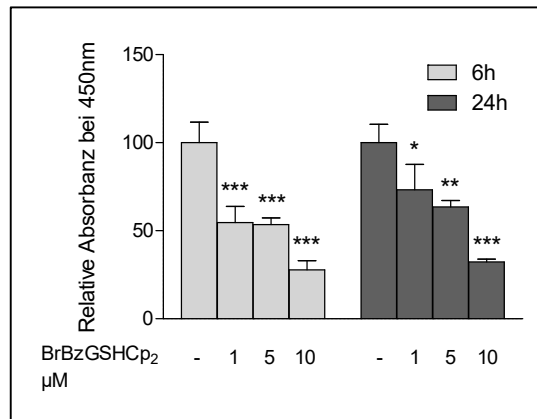


Abbildung 15: Die Proliferation der Huh7-Zellen (Relative Absorbanz bei 450 nm) nimmt bei steigenden Konzentrationen an BrBzGSHCp₂ bis 10 μM signifikant ab. Ergebnisse als Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

4.5 Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf HCC-assozierte Signalwege

Um die tiefgreifenderen Mechanismen der Ergebnisse des Proliferations-Assay zu untersuchen, wurden spezifische molekulare Signalwege analysiert, die maßgeblich am Tumorwachstum des HCC beteiligt sind. Darunter fallen zunächst die Wachstumsfaktor-Rezeptoren PDGFR-beta, VEGFR2 sowie die intrazellulären Signalkaskaden ERK/pERK (Spangenberg et al. 2009).

4.5.1 PDGFR-β

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100,0 ± 33,20 %) konnte eine dosisabhängige Abnahme der Expression von PDGFR-β bei 15 mM (44,44 ± 3,571 %, p<0.05) und 20 mM (17,45 ± 9,571 %, p<0.001) gemessen werden. Obwohl auch eine reduzierte Expression bei 10 mM (58,96 ± 4,598 %, p=0,1163) EP detektiert wurde, war diese jedoch nicht signifikant. Bei Konzentrationen von 1 mM (97,54 ± 13,11 %, p>0.9) und 5 mM (98,60 ± 9,415 %, p>0.9) EP blieb die Expression nahezu unverändert (Abbildung 16, Abbildung 17). Der zweite Inhibitor, BrBzGSHCp₂, zeigte ähnliche Ergebnisse (Abbildung 18). Ab höheren Konzentrationen bei 5 μM (57,40 ± 11,39 %, p<0.05) und 10 μM (43,12 ± 12,52 %, p<0.01) konnte die Protein-Expression im Vergleich zur Kontrolle (100,0 ± 13,89 %) signifikant reduziert werden (Abbildung 18, Abbildung 19). Eine Konzentration von 1 μM (70,56 ± 7,444 %, p=0,0855) hatten keinen signifikanten Einfluss auf die PDGFR-β Expression.

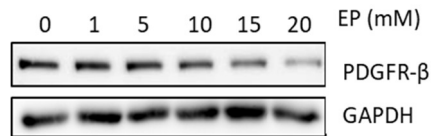


Abbildung 16: PDGFR-β Expression (Western Blot) nimmt mit steigender Glo-I Inhibition durch EP ab.

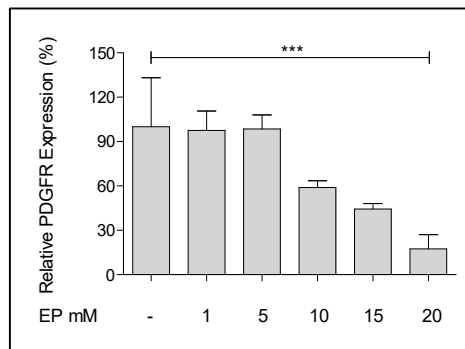


Abbildung 17: PDGFR-β Expression im Western Blot. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

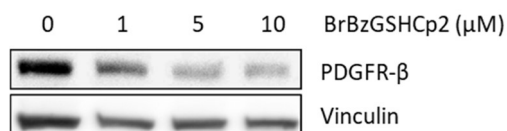


Abbildung 18: PDGFR-β Expression im Western Blot mit steigender Glo-I Inhibition durch BrBzGSHCp2.

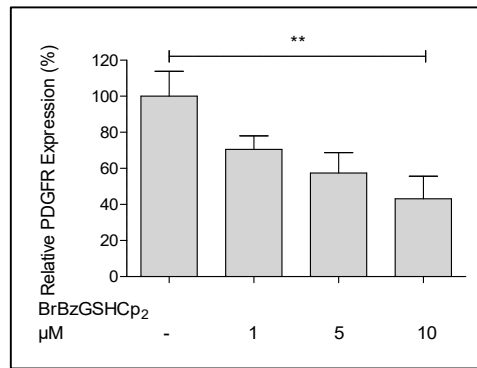


Abbildung 19: PDGFR- β Expression im Western Blot. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.5.2 VEGFR-2

Ähnlich wie der PDGFR- β -Rezeptor zeigte sich auch eine Reduktion der VEGFR-2-Expression bei steigender Glo-I-Inhibition durch EP und BrBzGSHCp₂. Ab Konzentrationen von 15 mM ($58,70 \pm 17,62$ %, $p < 0.05$) und 20 mM ($45,53 \pm 10,56$ %, $p < 0.01$) EP konnte eine signifikant verminderte Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 13,74$ %) gemessen werden. Unverändert zur Kontrolle blieb die Expression bei Konzentrationen von 1 mM ($100,1 \pm 2,878$ %, $p > 0.9$), 5 mM ($89,63 \pm 10,45$ %, $p > 0.9$) und 10 mM ($92,40 \pm 7,981$ %, $p > 0.9$) EP (Abbildung 20, Abbildung 21). Durch die Behandlung mit BrBzGSHCp₂ konnte eine dosisabhängige Abnahme der VEGFR-2-Expression bei 1 μM ($53,52 \pm 7,349$ %, $p < 0.05$), 5 μM ($31,81 \pm 23,94$ %, $p < 0.01$) und 10 μM ($23,85 \pm 10,32$ %, $p < 0.01$) im Vergleich zur Kontrolle ($100,0 \pm 18,97$ %) gesehen werden (Abbildung 22, Abbildung 23).

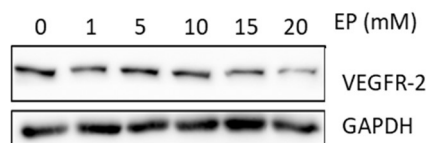


Abbildung 20: VEGFR-2-Expression im Western Blot mit steigender Glo-I-Inhibition durch EP.

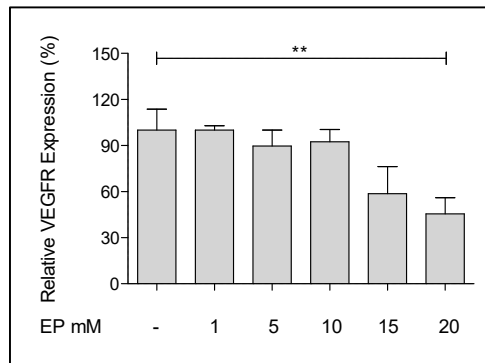


Abbildung 21: VEGFR-2-Expression im Western Blot. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

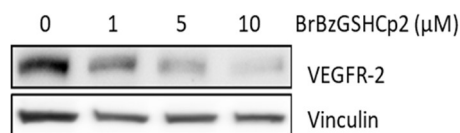


Abbildung 22: VEGFR-2-Expression im Western Blot mit steigender Glo-I-Inhibition durch BrBzGSHCp2.

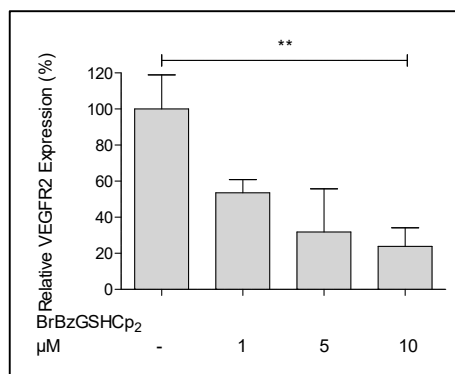


Abbildung 23: VEGFR-2-Expression im Western Blot. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.5.3 ERK/pERK

Eine steigende Hemmung der Glo-I hatte keine signifikante Veränderung der Expression des Signaltransduktionsmolekül ERK zur Folge. Vielmehr zeigte sich eine Auswirkung auf die phosphorylierte und damit aktivierte Form von ERK. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 4,868$ %) konnte eine dosisabhängige Reduktion der Expression von pERK bei 15 mM

($53,70 \pm 8,323 \%$, $p < 0.05$) und 20 mM ($62,08 \pm 6,033 \%$, $p < 0.05$) detektiert werden (Abbildung 24, Abbildung 25). Der Inhibitor BrBzGSHCp2 zeigte bei Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ ($56,06 \pm 4,959 \%$, $p < 0.05$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($101,9 \pm 3,881 \%$) eine signifikante Abnahme der Expression (Abbildung 26, Abbildung 27).

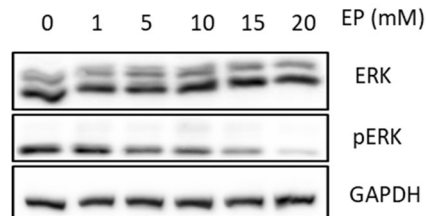


Abbildung 24: ERK und pERK-Expression im Western Blot mit steigender Glo-I-Inhibition durch EP.

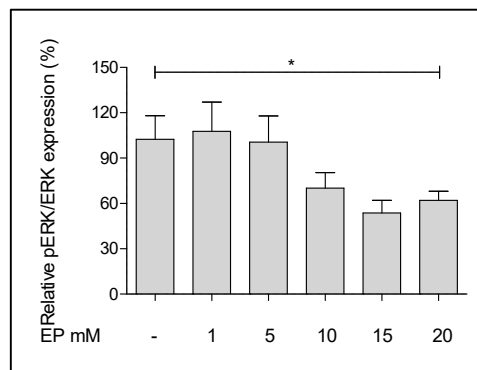


Abbildung 25: ERK und pERK im Western Blot. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

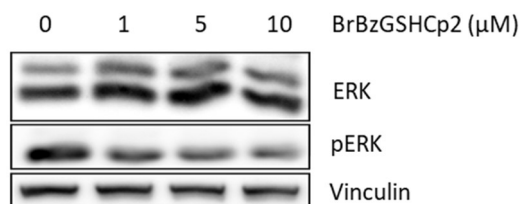


Abbildung 26: ERK und pERK-Expression im Western Blot mit steigender Glo-I-Inhibition durch BrBzGSHCp2.

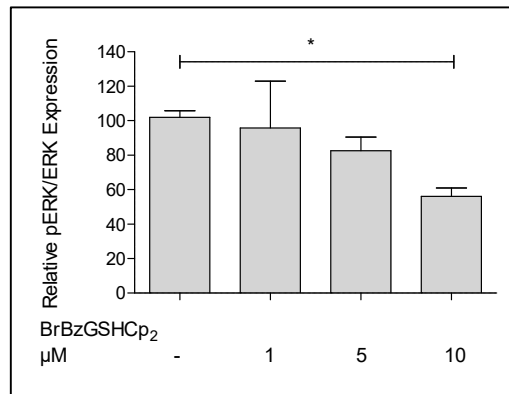


Abbildung 27: ERK und pERK-Expression im Western Blot. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.5.4 Nrf-2

Die enzymatische Inhibition der Glo-I durch EP und BrBzGSHCp2 zeigte eine signifikante Zunahme der Expression von Nrf-2. Ab EP-Konzentrationen von 5 mM ($191,2 \pm 17,39$ %, $p < 0.01$), 10 mM ($210,5 \pm 17,25$ %, $p < 0.01$), 15 mM ($207,5 \pm 11,91$ %, $p < 0.01$) und 20 mM ($242,7 \pm 36,40$ %, $p < 0.001$) kam es im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 27,24$ %) zu einer Steigerung der Expression (Abbildung 28, Abbildung 29). Eine Konzentration von 1 mM ($136,9 \pm 26,67$ %, $p > 0.9$) EP zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Ab einer Konzentration von 10 μ M ($176,7 \pm 30,79$ %, $p < 0.05$) BrBzGSHCp2 kam es zu einem signifikanten Anstieg der Nrf-2 Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 7,626$ %) (Abbildung 30, Abbildung 31). Konzentrationen von 1 μ M ($107,2 \pm 17,09$ %, $p > 0.9$) und 5 μ M ($114,1 \pm 20,42$ %, $p > 0.9$) hingegen zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

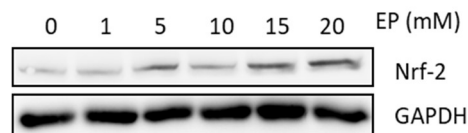


Abbildung 28: Zunahme der Nrf-2 Expression im Western Blot mit steigenden Konzentrationen an EP.

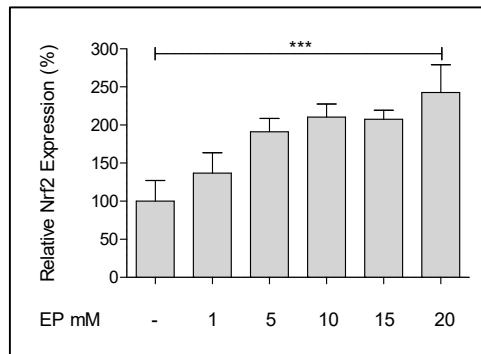


Abbildung 29: Nrf-2-Expression im Western Blot Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

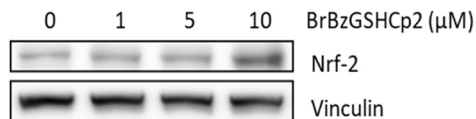


Abbildung 30: Zunahme der Nrf-2-Expression im Western Blot mit steigenden Konzentrationen an BrBzGSHCp2.

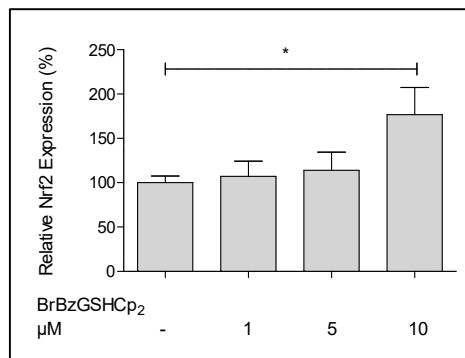


Abbildung 31: Nrf-2-Expression im Western Blot. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.6 Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf die Koloniebildung und die Migration

Nachdem die zellulären Signalmechanismen aufgedeckt wurden, sollten diese Ergebnisse mittels Funktionsanalysen in Form von Koloniebildungs- und Migrations-Assay konsolidiert werden.

4.6.1 Glo-I-Inhibition reduziert die Koloniebildung von Huh7-Zellen

Die Huh7-Zellen wurden für 7 Tage mit steigenden Konzentrationen an EP (1 mM bis 20 mM) täglich behandelt. Durch die tägliche Behandlung sollte eine kontinuierliche Anwesenheit einer Glo-I-Inhibition simuliert werden. Es zeigte sich eine dosisabhängige Verminderung der Koloniebildung ab Konzentrationen von 5 mM ($0,6960 \pm 0,7574$ %, $p < 0.001$), 10 mM ($0,4340 \pm 0,3843$ %, $p < 0.001$), 15 mM ($0,0800 \pm 0,09950$ %, $p < 0.001$) und 20 mM ($0,0940 \pm 0,2102$ %, $p < 0.001$) EP im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($14,80 \pm 8,011$ %) (Abbildung 32, Abbildung 33). Des Weiteren wurden die Huh7 ohne tägliche Behandlung, sondern mit der einmaligen Gabe an steigenden Konzentrationen von EP für 24 h untersucht. Das Medium wurde ebenfalls während dieser Zeit gewechselt, jedoch ohne den Zusatz von EP. Nach 7 Tagen der Koloniebildung wurden die Ergebnisse evaluiert. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Koloniebildung bei 1 mM ($1,460 \pm 0,1111$ %, $p > 0.9$), 5 mM ($1,845 \pm 0,4704$ %, $p > 0.9$), 10 mM ($1,243 \pm 0,5770$ %, $p > 0.9$), 15 mM ($1,313 \pm 0,6727$ %, $p > 0.9$) oder 20 mM ($1,095 \pm 0,5237$ %, $p > 0.9$) EP gegenüber zur unbehandelten Kontrolle ($1,195 \pm 0,3307$ %) (Abbildung 34, Abbildung 35).

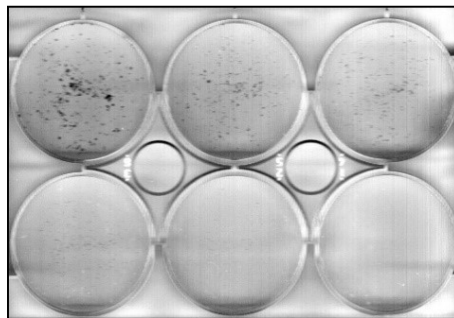


Abbildung 32: Eine Glo-I-Inhibition reduziert die Koloniebildung von Huh7-Zellen nach 7 Tagen Inkubation bei täglichem Mediumwechsel mit steigenden Konzentrationen an EP.

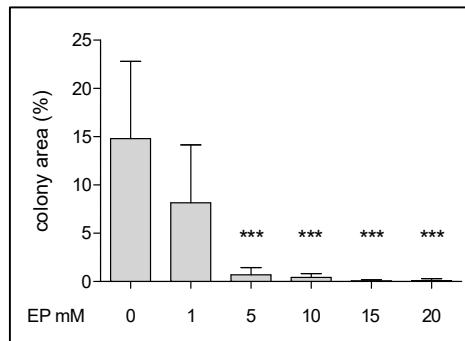


Abbildung 33: Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

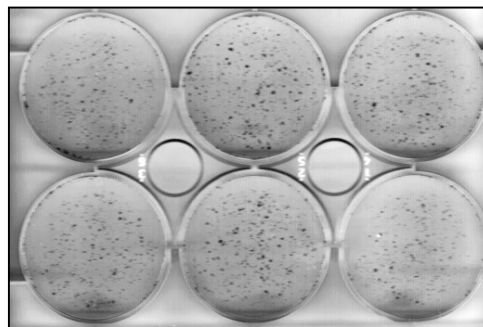


Abbildung 34: Bei einmaliger Behandlung mit EP für 24 h zeigte sich nach 7 Tagen kein signifikanter Unterschied in der Koloniebildung.

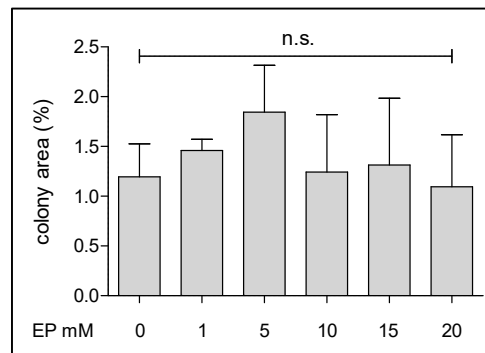


Abbildung 35: Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. $P > 0,05$ ist nicht signifikant (n.s.).

4.6.2 Glo-I-Inhibition reduziert die Migration von Huh7-Zellen

Die Huh-7-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen an EP (1 mM bis 20 mM) behandelt und die Migration mittels „Ibidi 5 μ m dishes der Firma Ibidi“ anhand eines

standardisierten Protokolls des Herstellers untersucht. Das Ergebnis bezieht sich auf die prozentuale Wundfläche (%), die bei steigenden Konzentrationen an EP unverändert oder vermindert ist. Die Versuche erstreckten sich über mehrere Zeitpunkte von 6 h bis 24 h. Eine signifikante Abnahme der Migration zeigte sich erst nach 24 h und bei einer Glo-I-Inhibition durch steigende Konzentrationen ab 10 mM ($7,539 \pm 1,136 \%$, $p < 0.05$), 15 mM ($7,3 \pm 1,891 \%$, $p < 0.05$) und 20 mM ($9,035 \pm 0,684 \%$, $p < 0.001$) EP im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 24 h ($4,740 \pm 1,078 \%$) (Abbildung 36). Abbildung 37 und Abbildung 38 zeigen den Verlauf der Wundfläche über 24 h bei einer Konzentration von 20 mM EP (Abbildung 37, Abbildung 38). Verdeutlicht wird dies nochmal in der Einzelstatistik bei 20 mM EP gegenüber der Kontrollgruppe, wo die Wundfläche unverändert bleibt (Abbildung 39).

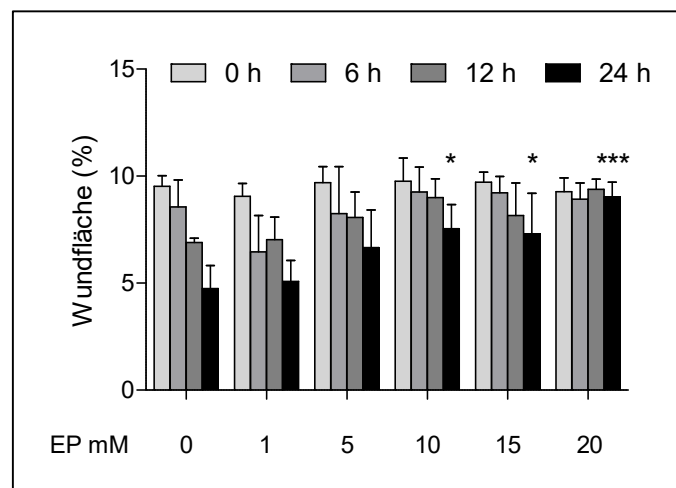


Abbildung 36: Statistische Auswertung der gemessenen Wundfläche in Prozent mit steigenden Konzentrationen an EP nach unterschiedlichen Zeitpunkten (6 h, 12 h und 24 h). Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Nach 24 h Behandlung mit 10 mM, 15 mM und 20 mM EP bleibt die Wundfläche nahezu unverändert und spricht somit für eine verminderte Migration. Bei der unbehandelten Kontrolle sowie 1 mM und 5 mM EP ist eine Abnahme der Wundfläche zu sehen, da die Migration der Zellen noch erhalten ist. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

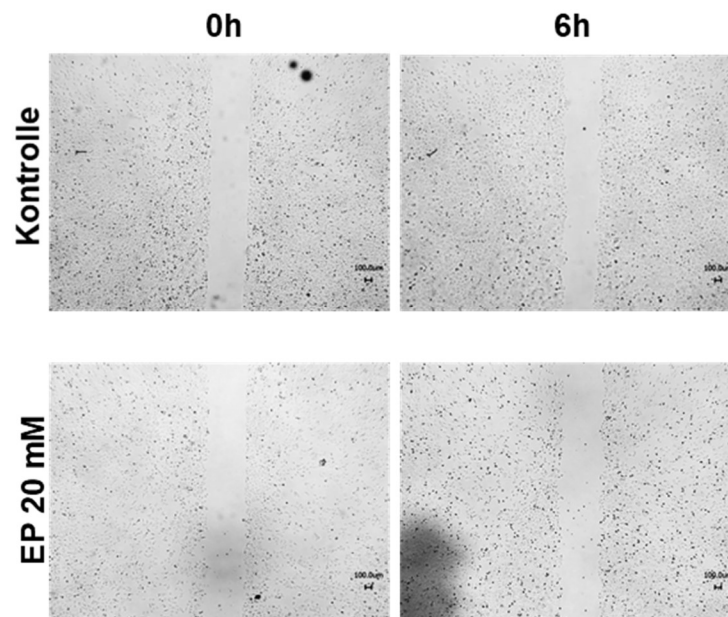


Abbildung 37: Repräsentative Bilder des Scratch-Assay nach 0 h und 6 h bei Behandlung mit 20 mM EP. Bisher ist noch kein großer Unterschied in der Wundfläche zusehen.

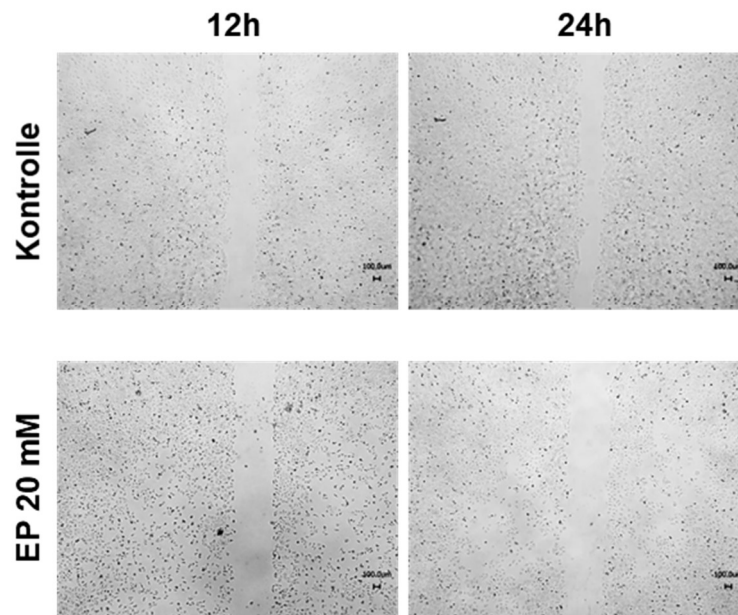


Abbildung 38: Repräsentative Bilder des Scratch Assay nach 12h und 24h bei Behandlung mit 20 mM EP. Bei Konzentration von 20 mM EP bleibt die Wundfläche („Scratch-Fläche“) nahezu unverändert. Dagegen zeigt sich eine Abnahme der Wundfläche in der Kontrollgruppe.

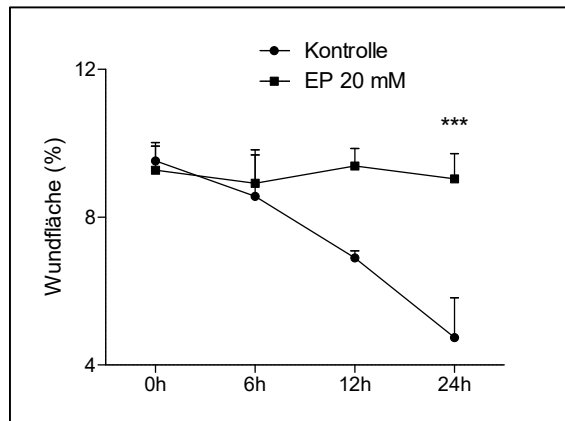


Abbildung 39: Zeigt die Veränderung der prozentualen Wundfläche (%) nach 6 h, 12 h und 24 h bei einer Konzentration von 20 mM EP. Während die Wundfläche der unbehandelten Kontrolle kleiner wird, bleibt die Größe der Wundfläche bei 20 mM EP unverändert. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.7 Der Einfluss von Sorafenib auf die Glyoxalase-I in Huh7-Zellen

Die Glyoxalase-I, als Enzym zur Detoxifikation, wird in der Literatur als möglicher Mechanismus zur Resistenzbildung bei systemischer Chemotherapie propagiert (Thornalley und Rabbani 2011). Daher wurde in den nächsten Versuchen der Effekt von Sorafenib, einem Multi-Tyrosin-Kinase Inhibitor in der Therapie des fortgeschrittenen HCC, auf die Glo-I untersucht. Die Huh-7-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Sorafenib (5 μ M bis 10 μ M) für 24 h inkubiert.

4.7.1 Der Einfluss von Sorafenib auf die Protein-Expression der Glo-I

Die Behandlung der Zellen mit Sorafenib führte zu einer signifikanten Steigerung der Expression bei 5 μ M ($194,7 \pm 18,29$ % $p < 0.01$) und 10 μ M ($209,0 \pm 25,28$ %, $p < 0.001$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 14,84$ %) (Abbildung 40, Abbildung 41). Eine Konzentration von 2,5 μ M ($143,3 \pm 15,38$ %, $p = 0,1385$) zeigte keinen signifikanten Unterschied.

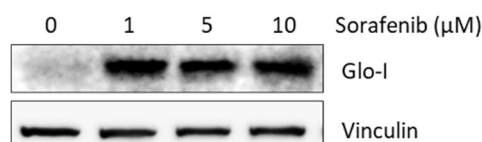


Abbildung 40: Die Glo-I-Expression im Western Blot nimmt mit steigenden Konzentrationen an Sorafenib zu.

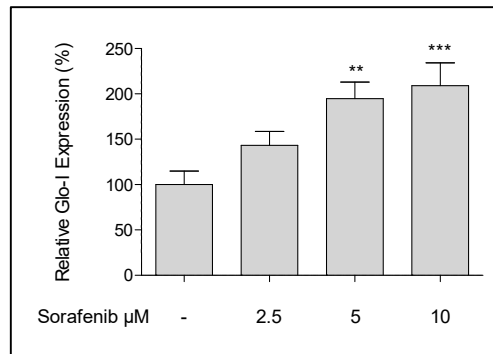


Abbildung 41: Glo-I-Expression und Sorafenib. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.7.2 Der Einfluss von Sorafenib auf die enzymatische Aktivität der Glo-I

Als nächstes wurde die enzymatische Aktivität der Glo-I nach Behandlung mit Sorafenib untersucht. Neben einer Steigerung der Glo-I-Expression, wie oben gezeigt, kam es ebenfalls zu einer Zunahme der enzymatischen Aktivität bei Konzentration von 5 μM ($158,9 \pm 22,53\%$ $p < 0.05$) und 10 μM ($223,5 \pm 58,24\%$ $p < 0.01$) Sorafenib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 8,716\%$) (Abbildung 42).

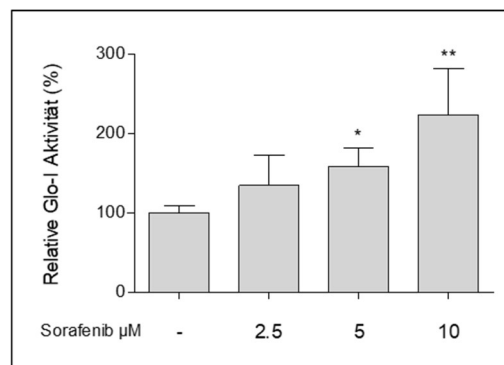


Abbildung 42: Die enzymatische Aktivität der Glo-I (%) nimmt bei steigenden Konzentrationen an Sorafenib (μM) signifikant zu. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.8 Der Einfluss der Koinkubation von Sorafenib und EP auf die Proliferation

Wie die vorherigen Versuche bereits zeigten, führt Sorafenib zu einer Zunahme der Glo-I-Expression und Aktivität. Ethylpyruvat ist als Hemmstoff der Glo-I bekannt. Daher sollte in einem

nächsten Schritt die gleichzeitige Behandlung der Huh-7-Zellen mit Sorafenib und EP untersucht werden. Dadurch sollte die Suszeptibilität der Zellen auf die zytotoxische Therapie mit Sorafenib sowie die anti-proliferativen Effekte von EP gesteigert werden. Zunächst wurde die Proliferation unter der Sorafenib-Behandlung untersucht. Im Proliferations-Assay zeigte sich eine signifikante Abnahme der Proliferation bei 2,5 μM ($81,93 \pm 2,648 \%$, $p < 0.001$) und 5 μM ($50,41 \pm 5,313 \%$, $p < 0.001$) Sorafenib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100,0 \pm 2,141 \%$) (Abbildung 43). Eine Koinkubation mit steigenden Konzentrationen an EP führte zu einer weiteren signifikanten Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Behandlung mit 2,5 μM und 5 μM Sorafenib ohne EP (2,5 μM Sorafenib vs. 2,5 μM Sorafenib + 15mM EP: $57,30 \pm 0,4696 \%$, $p < 0.001$; 5 μM sorafenib vs. 5 μM + 15mM EP: $37,16 \pm 0,5870$ $p < 0.001$) (Abbildung 43). Interessanterweise zeigten niedrige Konzentrationen an Sorafenib und hohe Konzentrationen an EP sowie hohe Konzentrationen an Sorafenib und niedrige Konzentrationen an EP ähnliche Resultate.

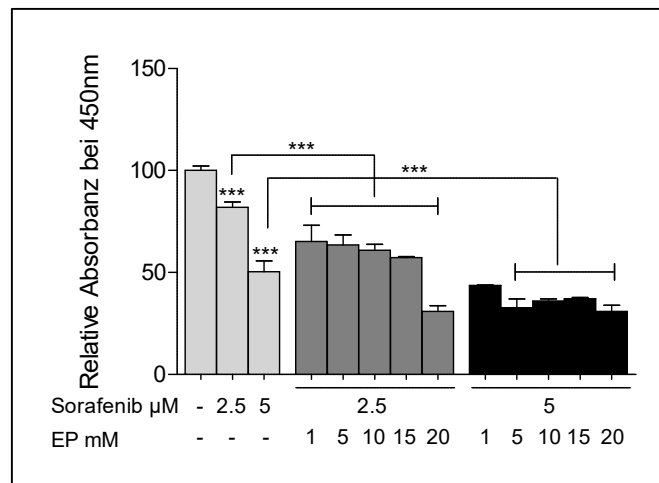


Abbildung 43: Proliferation (Relative Absorbanz bei 450 nm) von Huh7-Zellen nach Sorafenib- sowie Sorafenib- und EP-Behandlung. Mit steigenden Konzentrationen an Sorafenib allein und in Koinkubation mit Sorafenib und EP konnte eine signifikante Reduktion der Proliferation gemessen werden. Gegenüber den Konzentrationen von 2,5 μM und 5 μM Sorafenib zeigte die Koinkubation mit EP ebenfalls eine signifikante Abnahme der Proliferation. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.9 Der Einfluss von Sorafenib und EP auf die Bildung von Methylglyoxal (MGO)

Um die Hintergründe der Steigerung der Expression und spezifischen Aktivität von Glo-I zu analysieren, wurde die MGO-Konzentration mittels ELISA-Assay in den behandelten Lysaten gemessen. Die Messung verlief nach einem standardisierten Protokoll des Herstellers. Sorafenib ist bekannt durch seine zytotoxische Wirkung auf Zellen durch die Induktion von Reactive

Oxygen Species (ROS) (Coriat et al. 2012). Inwieweit Sorafenib auch Methylglyoxal induzieren kann, ist bisher unbekannt und noch nicht untersucht worden. Der Anteil an MGO (ng/ml / mg Protein) war bei steigender Konzentration an Sorafenib von 10 μ M ($2,614 \pm 0,1030$ %, $p < 0.01$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($1,564 \pm 0,1072$ %) signifikant erhöht (Abbildung 44). Da die Behandlung mit Sorafenib zu einer höheren Konzentration an MGO führte, sollte auch der Effekt einer Glo-I-Inhibition durch EP auf die MGO-Spiegel untersucht werden. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung von MGO bei 10 mM ($2,7 \pm 0,02049$ %, $p < 0.01$) EP. Ebenfalls höhere MGO-Spiegel waren bei EP-Konzentrationen von 20 mM ($2,329 \pm 0,6528$ %, $p = 0,247$) zu sehen, obwohl diese nicht signifikant waren. Des Weiteren zeigte eine Koinkubation von 5 μ M Sorafenib und 10 mM EP eine signifikante Steigerung der MGO-Konzentration ($3,385 \pm 0,4157$ %, $p < 0.05$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($1,564 \pm 0,1072$ %) (Abbildung 44).

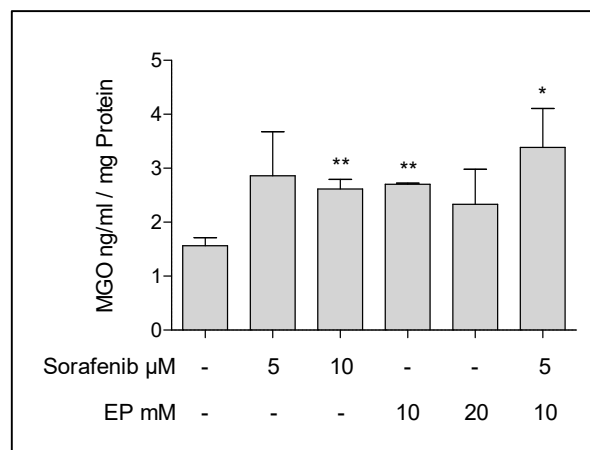


Abbildung 44: Die gemessene Menge an MGO (ng/ml / mg Protein) in den Huh7 Protein-Lysaten bei steigenden Konzentrationen an Sorafenib (μ M) und EP (mM) sowie bei Koinkubation von 5 μ M Sorafenib und 10 mM EP. Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

5 Diskussion

5.1 Die Expression und kinetische Aktivität der Glyoxalase-I

In vielen Studien konnte eine höhere Expression der Glo-I in Tumorzellen bzw. -gewebe gezeigt werden (Thornalley und Rabbani 2011). Die allgemeine Erklärung dieses Mechanismus besteht darin, dass Krebszellen eine höhere glykolytische Aktivität besitzen, daher mehr MGO produzieren und sich somit durch die Glyoxalase-I vor dem eigenen zytotoxischen Zelltod schützen. In dieser Arbeit wurde daher die Expression und Aktivität der Glo-I in zwei HCC-Zelllinien (Huh7, HepG2) sowie in einer Hepatozyten-Zelllinie (AML 12) verglichen. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant höhere Expression (mRNA, Protein) und kinetische Aktivität von Huh7-Zellen im Vergleich zu AML 12 Zellen. Dies lässt sich einerseits durch die Tatsache begründen, dass Huh7-Zellen einem sehr invasiven und fortgeschrittenem Tumorstadium mit einem hohen Potenzial zu metastasieren entsprechen (Ao et al. 2017). Um diese Annahme zu bestätigen, untersuchten wir die Proliferationsrate der Zelllinien. Dabei zeigte sich, dass die Huh7 ebenfalls mit einer gesteigerten Proliferation einhergehen und dies im Zusammenhang zur Expression und Aktivität der Glo-I steht. Unterstützt wird diese Hypothese von DeWaal et al., die eine vermehrte Aktivität der Hexokinase II (HK II) in Huh7 ermittelten und somit eine höhere Stoffwechselaktivität beschreiben konnten (DeWaal et al. 2018). Insgesamt zeigte sich in HCC-Gewebsproben eine erhöhte Stoffwechselaktivität in Form einer gesteigerten Glykolyse sowie eine erhöhte Expression von anti-oxidativen Mechanismen im Vergleich zu nicht-tumorösem Gewebe (Huang et al. 2013). Die Rolle von HepG2-Zellen in diesem Kontext ist nicht ausreichend geklärt, der eigentliche Ursprung dieser Zellen ist aus einem Hepatoblastom eines 12-jährigen kaukasischen Jungen (Aden et al. 1979). Daher ist zu vermuten, dass HepG2-Zellen die Stellung als eine „Intermediär“-Zelllinie zwischen HCC und Hepatozyt einnehmen. Dies wird ebenfalls in den Untersuchungen von Ao et al. angemerkt, obwohl in deren Ergebnissen die HepG2 ähnlich wie die Huh7 Zellen als invasivere HCC-Zelle eingestuft wurden (Ao et al. 2017). In dieser Arbeit zeigt sich dies in einer höheren Expression auf Protein- und mRNA-Ebene der Glo-I gegenüber den AML 12-Zellen. Somit belegen unsere Ergebnisse, dass die Glo-I-Expression in Zellen mit höherer Malignität gesteigert ist.

5.2 Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf HCC-assoziierte Signalwege

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen der Glyoxalase-I und HCC-assoziierten Signalwegen untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression von den Wachstumsfaktorrezeptoren PDGFR- β , VEGFR-2 sowie dessen

Signaltransduktionsmolekül ERK/ pERK. Die Hauptfunktion dieser Rezeptoren in Krebszellen ist die Förderung der Proliferation, Migration und Angiogenese (Spangenberg et al. 2009). Besonders in HCC-Gewebe im fortgeschrittenem Stadium zeigten diese Faktoren eine höhere Expression und gingen mit einer schlechteren Prognose einher (Chu et al. 2013). Die genauen Mechanismen, wie die Glo-I diese Wachstumsfaktoren beeinflusst, ist noch nicht ausreichend geklärt. Jedoch spricht vieles dafür, dass durch eine Glo-I-Inhibition höhere und damit toxische Konzentrationen an MGO entstehen können, die durch die Bildung von AGEs die Funktion der Rezeptoren und deren Liganden beeinträchtigen (Rabbani und Thornalley 2012). Es zeigte sich nach Glo-I-Inhibition eine Reduktion der Expression von den oben genannten Rezeptoren und dessen Signaltransduktionskaskade. Ebenfalls konnten nach einer Hemmung der Glo-I höhere Konzentrationen an MGO gemessen werden. PDGFR- β und sein Ligand PDGF steigern den Metabolismus in Zellen durch einen gesteigerten Warburg Effekt (Xiao et al. 2017). In Kolonkarzinom-Zelllinien wurde gezeigt, dass durch PDGF-Stimulation die Glykolyse gesteigert werden kann (Moench et al. 2016). Dies verdeutlicht nochmals den Effekt von Wachstumsfaktoren auf die Glykolyse in den Zellen, was wiederum höhere MGO-Konzentrationen nach sich zieht. In diesem Kontext konnten Cantero et al. in Mesenchymal-Zellen (glatte Muskelzellen sowie Fibroblasten) zeigen, dass MGO die Aktivierung bzw. Phosphorylierung des PDGFR- β Rezeptors und somit dessen Aktivierung sowie die Signalkaskade entlang des Faktors pERK inhibiert (Cantero et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse zeigten Nass et al. mittels MGO/AGE-modifiziertem PDGF, wodurch eine geringere Phosphorylierung von Akt und ERK in einer Fibroblasten-Zelllinie erreicht wurde (Nass et al. 2014). In einer anderen Untersuchung resultierte ein Knockdown der Glo-I durch Methotrexat und siRNA in einer verminderten Proteinexpression von VEGFR-2 durch eine MGO gesteigerte Autophagie (Liu et al. 2012). Eine weitere Studie zeigte, dass mittels MGO modifiziertem Vibronectin, ein Regulator von VEGFR-2, die Phosphorylierung von VEGFR-2 sowie dessen Signalkaskaden pAKT und pERK in HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cell) reduziert werden konnte (Wang et al. 2015). Ein anderer Mechanismus, der die verminderte Expression von VEGFR-2 erklären könnte, ist dessen Ligand VEGF-A sowie der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie induzierender Faktor-1) und die modifizierenden Eigenschaften durch MGO (Thangarajah et al. 2009; Ceradini et al. 2008). In einer Untersuchung von Bento et al. führten hohe Konzentrationen an MGO zu einer proteosomalen Degradation von HIF-1 α und somit einer geringen Aktivität des Transkriptionsfaktor HIF-1, was wiederum durch eine induzierte Überexpression der Glo-I reversibel war (Bento et al. 2010b). In einer weiteren Studie von Bento et al. konnte darüber hinaus festgehalten werden, dass eine verminderte HIF-1-Aktivität durch MGO mit einer reduzierten Proteinexpression von VEGF in RPE-Zellen (Retinal Pigment Epithelzellen)

einherging (Bento et al. 2010a). Eine verminderte Expression von VEGF-A bei steigender Glo-I-Inhibition konnten wir ebenfalls in weiteren Versuchen erkennen (Ergebnisse nicht gezeigt). Gemäß den Ergebnissen der Wachstumsfaktorrezeptoren konnte die weitere Signaltransduktionskaskade über pERK ebenfalls durch Glo-I-Inhibitoren gehemmt werden. Chen et al. konnten darstellen, dass durch eine Inhibition des Ras/Raf/ERK Signalweges, die Expression der Glyoxalase-I abnimmt, allerdings ohne auf die Effekte von MGO einzugehen (Chen et al. 2015).

Inwieweit die MGO-Konzentrationen zu der verminderten Expression der untersuchten Signaltransduktionskaskade in dieser Arbeit beitragen, ist nicht abschließend geklärt. So können zum Beispiel geringere Konzentrationen an MGO zum Tumorwachstum beitragen, während zu hohe Konzentrationen an MGO pro-apoptotische und anti-proliferative Eigenschaften haben (Nokin et al. 2017). An Inkubationsversuchen mit MGO wurde dieser Effekt in einem weiteren Projekt unserer Laborgruppe an einem Modell der Leberzirrhose bestätigt (unveröffentlichte Daten). Übereinstimmend mit den Untersuchungen sind die hier vorgestellten Ergebnisse, indem eine verminderte Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren in Glo-I-inhibierten Zellen zu einer verminderten Phosphorylierung der intrazellulären Signalkaskade führt und dadurch die Proliferation sowie Migration der Huh-7-Zellen reduziert. Dies wird ebenfalls durch die Migrations- sowie die Koloniebildenden-Assays verdeutlicht.

5.3 Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf Proliferation, Migration und Koloniebildung

Um die intrazellulären Ergebnisse zu konsolidieren, wurden funktionale Analysen wie Migrations- und Koloniebildende-Assays (Clonogenic-Assay) durchgeführt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Migration von Huh-7-Zellen durch die Glo-I-Inhibition vermindert werden konnte. Dies wird durch die Ergebnisse der Signalkaskaden-Versuche verdeutlicht. Durch verminderte Expression von Proliferations- sowie Migrationsmarker im Western-Blot wurde auch die Migration in dem hier durchgeführten „Scratch-Assay“ signifikant reduziert. Eine weitere Erklärung liefern Loarca et al., die darstellen konnten, dass MGO die Translokation von p53, einem Tumorsuppressor-Gen, in den Nukleus in Huh-7- und HepG2-Zellen steigert und dadurch die Migration hemmt (Loarca et al. 2013). Ähnliche Ergebnisse bestätigten sich in Kolorektal-Karzinom-Zelllinien, die nach Glo-I-Knockdown eine höhere Expression von p53 zeigten und mit einer verminderten Proliferation, Migration und Koloniebildung einhergingen (Chen et al. 2017). Obwohl p53 in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, konnten hier weitere Mechanismen aufgedeckt werden, die ebenfalls zu einer verminderten Migration sowie Proliferation beitragen.

Im Clonogenic-Assay zeigte sich ein vermindertes Wachstum von Huh7-Zellen bei kontinuierlicher Behandlung mit EP. Bei einmaliger Behandlung mit EP konnte kein signifikanter Unterschied des Wachstums gemessen werden. Dies deutet daraufhin, dass Kompensationsmechanismen existieren, um das angefallene MGO zu verstoffwechseln. Ein Mechanismus dafür kann über das Enzym Aldose-Reduktase vermittelt sein, dessen Expression bei einem Glo-I-Knockout in Schwann Zellen erhöht war (Morgenstern et al. 2017). Ein anderer Kompensationsmechanismus kann durch Nrf-2, ein Transkriptionsfaktor der Glo-I, mediiert werden (Xue et al. 2012). Interessanterweise zeigten die Untersuchungen an Huh7-Zellen, dass nach Glo-I-Inhibition die Expression von Nrf-2 signifikant erhöht war. Die Rolle von Nrf-2 in diesem Kontext kann einen Kompensationsmechanismus vermuten lassen. Dennoch ist dessen Rolle noch nicht abschließend geklärt. Eine Aktivierung von Nrf-2 zeigte sich auch in einer in vivo Untersuchung an EP behandelten Mäusen, jedoch wurde hier kein Bezug zu Glo-I-Inhibition und gesteigerter MGO-Spiegel gezogen (Di Paola et al. 2010). Die Induktion von Nrf-2 anhand steigender MGO-Konzentrationen scheint plausibel, wie durch eine Studie von Bollong et al. verdeutlicht (Bollong et al. 2018). Daher spielt Nrf-2 als weiterer resistenzfördernder Mechanismus eine entscheidende Rolle und ist Ziel weiterer Untersuchungen.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass EP kontinuierlich appliziert werden sollte, um längerfristig die anti-proliferativen Effekte zu nutzen. Dies lässt sich auch in einen klinischen Kontext übertragen, indem bei vielen Therapieschemata die Medikamentendosis täglich appliziert wird. Dass Kompensationsmechanismen bei einer Glo-I-Inhibition existieren, verdeutlichen ebenfalls die Proliferations-Assay. Eine Inkubationszeit von 6 h und 24 h an EP oder BrBzGSHCp₂ zeigte einen ähnlichen Verlauf. Bereits nach 6 h zeigte sich bei beiden Inhibitoren eine signifikante Reduktion der Proliferation, die nach 24 h ebenfalls zu sehen war. Dennoch war der Unterschied der Abnahme der Proliferation nach 6 h oder 24 h auf einem relativ gleichen Niveau und unterschied sich nicht wesentlich untereinander, trotz längerer Inkubationszeit nach 24 h. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass mit zunehmender Inkubationszeit, andere Mechanismen den Ausfall der Glo-I kompensieren. In der Zusammenschau unserer Ergebnisse betont dies nochmals, dass Kompensationsmechanismen der Glo-I existieren und dass bei möglichen zukünftigen Therapieschemata eine kontinuierliche Applikation der Glo-I-Inhibitoren Anwendung finden sollte.

5.4 Die Induktion der Glyoxalase-I durch Sorafenib

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Sorafenib die Protein-Expression sowie die kinetische Aktivität der Glo-I signifikant steigert. Diese Ergebnisse unterstützen die allgemeine

These, dass die Glo-I zu Multi Drug Resistance (MDR) gegenüber systemischer Therapie führen kann (Rabbani et al. 2018). Dennoch ist noch nicht ausreichend geklärt, welche Mechanismen für die Induktion der Glo-I durch Sorafenib verantwortlich sind. Es ist naheliegend, dass Sorafenib eine zytotoxische Verbindung darstellt und ROS induziert (Coriat et al. 2012). Daraus würde sich die Annahme erschließen, dass ROS auch die MGO-Konzentrationen steigern könnte. Umgekehrt ist es wahrscheinlicher, dass höhere MGO-Konzentrationen zu mitochondrialer Dysfunktion führen und somit die Menge an ROS steigert (Rabbani et al. 2016). Unsere Untersuchungen zeigen, dass mit steigenden Konzentrationen an Sorafenib die Menge an MGO zunimmt. Daher könnte die gesteigerte Aktivität der Glo-I einen kompensatorischen Mechanismus durch die Zytotoxizität von Sorafenib darstellen. In diesem Zusammenhang konnten Tesori et al. zeigen, dass Sorafenib die Glykolyse fördert, was wiederum höhere MGO-Mengen nach sich ziehen würde (Tesori et al. 2015). Eine weitere Erklärung ist, dass Sorafenib zu Hypoxie in Huh-7 und HepG2-Zellen führt und dadurch HIF-1a aktiviert, was wiederum die Transkription von Glukose-Metabolismus fördernden Proteinen wie GLUT-1 und damit die Glykolyse steigert (Liang et al. 2013). Ein weiterer Aspekt wird in einer Studie von Xu et al. beschrieben, indem HCC-Zelllinien eine erhöhte Expression der Transketolase (TKT) des Pentosephosphatwegs (PPP) zeigten, was die Menge an NADPH zur Rückgewinnung von GSH aktiviert. Interessanterweise konnte in der gleichen Untersuchung ein Knockdown der TKT in HCC-Zellen die ROS-Menge nach Sorafenibtherapie signifikant vermehren, verglichen mit alleiniger Sorafenibbehandlung (Xu et al. 2016). Ein weiterer Aspekt unserer Ergebnisse ist, dass neben der enzymatischen Aktivität auch die Protein-Expression gesteigert werden konnte. Dies impliziert, dass Sorafenib auf Transkriptions- (mRNA) bzw. Translationsebene (Proteine) die Expression hochregulieren kann. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob dies über direkte oder indirekte Mechanismen geschieht. Ein direkter Mechanismus durch Sorafenib erscheint unwahrscheinlich, da gezielt Rezeptor-Tyrosinkinasen blockiert werden. Als indirekter Mechanismus ist eine Induktion durch MGO wahrscheinlich, da dadurch Nrf-2, ein Transkriptionsfaktor, aktiviert wird. Xue et al. konnten zeigen, dass Nrf-2 die mRNA und Proteinexpression sowie die Aktivität der Glo-I über die Bindungsstelle ARE (antioxidant-response element) in Exon 1 des Glo-I Gens während gesteigerter MGO-Konzentrationen hochregulieren kann (Xue et al. 2012). Dies lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass ROS zur Deaktivierung von KEAP-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), einem post-translationalem Repressor von Nrf-2, führt und dadurch Nrf-2 zur Translokation in den Nukleus freigesetzt wird (Itoh et al. 1999). Die Reaktivität von KEAP-1 mit oxidativen Stressoren erklärt sich durch die vielen Zystein-Reste (Dinkova-Kostova et al. 2002). Da MGO ebenfalls dafür bekannt ist, Zystein-Reste zu modifizieren, könnte dieser Zusammenhang naheliegend sein (Bollong et al. 2018). In

diesem Kontext konnten Sun et al. zeigen, dass durch Sorafenib die Expressionen von Nrf-2 gesteigert und von KEAP-1 vermindert wurden (Sun et al. 2016). Daher ist ein Nrf-2 medierter Glo-I Mechanismus, der zur Überexpression während der Behandlung mit Sorafenib führte, naheliegend. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die These, dass die Glo-I zu MDR gegenüber Sorafenib führen kann.

5.5 Der Einfluss von Glo-I-Inhibitoren auf das Ansprechen von Sorafenib

Um den Zusammenhang zwischen Glo-I und Sorafenib näher zu erläutern, wurde im nächsten Schritt die Glo-I in den Huh7 Zellen enzymatisch durch EP inhibiert und in einer Koinkubation mit Sorafenib behandelt. Die Wirkung von Sorafenib konnte nach Glo-I-Inhibition signifikant gesteigert werden, was sich durch eine verminderte Proliferation äußerte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Glo-I-Überexpression als Gegenmechanismus ausfällt und MGO zytotoxische Konzentrationen erreicht, die nur noch schwer von der Zelle kompensiert werden können. Diese Ergebnisse werden besonders durch einen anderen Inhibitor der enzymatischen Aktivität der Glo-I, Kurkuma, unterstützt (Santel et al. 2008). In einer Untersuchung von Larasati et al. an Zelllinien einer Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) wurde gezeigt, dass durch Kurkuma ROS-spezifische Enzyme wie die Glo-I inhibiert und durch die gesteigerte intrazelluläre Menge an ROS bzw. MGO Apoptose induziert wurde (Larasati et al. 2018). In den hier vorliegenden Ergebnissen ist ein ähnlicher Zusammenhang zu erkennen: Durch die ELISA-Ergebnisse wird bestätigt, dass sowohl nach EP sowie nach EP und Sorafenibgabe signifikant höhere Konzentrationen an MGO im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe gemessen wurden. Andere Studien belegen diese Ergebnisse, indem eine Glo-I-Inhibition durch BrBzGSHCp₂ das Ansprechen von Imatinib in einer Koinkubation auf Zelllinien der CML verbesserte (Takeuchi et al. 2010). Ebenso konnte in Chemotherapeutika resistenten Leukämiezellen, Apoptose-Mechanismen durch eine BrBzGSHCp₂ vermittelte Glo-I-Inhibition gesteigert werden (Sakamoto et al. 2000). Darüber hinaus zeigte eine verminderte Glo-I-Expression in Endometriumkarzinom-Zelllinien durch Metformin höhere anti-proliferative Effekte von den Chemotherapeutika Cisplatin und Paclitaxel (Dong et al. 2012). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine systemische Therapie durch Sorafenib und Glo-I-Inhibitoren beim HCC, insbesondere im fortgeschrittenen Stadium, einen synergistischen Effekt erzielt.

6 Zusammenfassung

Die Glyoxalase-I ist ein entscheidendes Enzym in der Detoxifikation von Methylglyoxal. In dieser Arbeit konnte die Rolle der Glyoxalase-I im hepatozellulären Karzinom weiter aufgeklärt werden. Es zeigte sich, dass invasivere Karzinomzellen, wie die Huh7, mit einer höheren Expression und Aktivität der Glo-I assoziiert sind und dies mit einer gesteigerten Proliferation korreliert. Durch zwei bekannte Glo-I-Inhibitoren konnte die Proliferation, Migration und Koloniebildung der Huh7 signifikant reduziert werden. Die Analyse von molekularen Signalmolekülen zeigte, dass durch die Inhibition der Glo-I entscheidende Signalwege wie PDGFR- β , VEGFR-2 und pERK gehemmt werden konnten. Der genaue Mechanismus dafür ist noch unklar, jedoch spricht vieles dafür, dass durch eine Hemmung der Glo-I zytotoxische Konzentrationen an MGO erreicht werden. Sorafenib auf der anderen Seite führte zu einer signifikanten Zunahme der Expression und Aktivität der Glo-I. Eine Koinkubation von EP und Sorafenib hatte synergistische Effekte und verminderte die Proliferation zusätzlich im Vergleich zu einer Behandlung mit EP oder Sorafenib. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die Bedeutung der Glo-I für das Wachstum von invasiven Tumorzellen und erklärt darüber hinaus die Rolle als entscheidendes Enzym zur Förderung von Resistenzmechanismen gegenüber systemischer Antitumor-Therapie wie das Sorafenib. Daher bleibt die Glo-I ein relevanter Ansatzpunkt für die Entwicklung zukünftiger Therapiekonzepte, insbesondere für die Kombination von mehreren Agenzien, wie die Ergebnisse der Koinkubation von Sorafenib und EP verdeutlicht.

7 Literaturverzeichnis

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282:615–616.

Antognelli C, Baldracchini F, Talesa VN, Costantini E, Zucchi A, Mearini E (2006) Overexpression of glyoxalase system enzymes in human kidney tumor. *Cancer J* 12:222–228.

Ao L, Guo Y, Song X, Guan Q, Zheng W, Zhang J, Huang H, Zou Y, Guo Z, Wang X (2017) Evaluating hepatocellular carcinoma cell lines for tumour samples using within-sample relative expression orderings of genes. *Liver Int* 37:1688–1696.

Bair WB, Cabello CM, Uchida K, Bause AS, Wondrak GT (2010) GLO1 overexpression in human malignant melanoma. *Melanoma Res* 20:85–96.

Baunacke M, Horn L-C, Trettner S, Engel KMY, Hemdan NYA, Wiechmann V, Stolzenburg J-U, Bigl M, Birkenmeier G (2014) Exploring glyoxalase 1 expression in prostate cancer tissues: Targeting the enzyme by ethyl pyruvate defangs some malignancy-associated properties. *Prostate* 74:48–60.

Bento CF, Fernandes R, Matafome P, Sena C, Seica R, Pereira P (2010a) Methylglyoxal-induced imbalance in the ratio of vascular endothelial growth factor to angiopoietin 2 secreted by retinal pigment epithelial cells leads to endothelial dysfunction. *Exp Physiol* 95:955–970.

Bento CF, Fernandes R, Ramalho J, Marques C, Shang F, Taylor A, Pereira P (2010b) The chaperone-dependent ubiquitin ligase CHIP targets HIF-1 α for degradation in the presence of methylglyoxal. *PLoS one* 5:e15062.

Birkenmeier G, Hemdan NYA, Kurz S, Bigl M, Pieroh P, Debebe T, Buchold M, Thieme R, Wichmann G, Dehghani F (2016) Ethyl Pyruvate Combats Human Leukemia Cells but Spares Normal Blood Cells. *PLoS one* 11:e0161571.

Bollong MJ, Lee G, Coukos JS, Yun H, Zambaldo C, Chang JW, Chin EN, Ahmad I, Chatterjee AK, Lairson LL, Schultz PG, Moellering RE (2018) A metabolite-derived protein modification integrates glycolysis with KEAP1-NRF2 signalling. *Nature* 562:600–604.

Bolt MW, Mahoney PA (1997) High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 247:185–192.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424.

Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang Y-H, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V, Gerolami R, Masi G, Ross PJ, Song T, Bronowicki J-P, Ollivier-Hourmand I, Kudo M, Cheng A-L, Llovet JM, Finn RS, Leberre M-A, Baumhauer A, Meinhardt G, Han G (2017) Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE); A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 389:56–66.

Burdelski C, Shihada R, Hinsch A, Angerer A, Göbel C, Friedrich E, Hube-Magg C, Burdak-Rothkamm S, Kluth M, Simon R, Möller-Koop C, Sauter G, Büscheck F, Wittmer C, Clauditz TS, Krech T, Tsourlakis MC, Minner S, Graefen M, Schlomm T, Wilczak W, Jacobsen F (2017) High-Level Glyoxalase 1 (GLO1) expression is linked to poor prognosis in prostate cancer. *Prostate* 77:1528–1538.

Burnette WN (1981) “Western Blotting”; Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195–203.

Cantero AV, Portero-Otin M, Ayala V, Auge N, Sanson M, Elbaz M, Thiers JC, Pamplona R, Salvayre R, Negre-Salvayre A (2007) Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor-beta: implications for diabetic atherosclerosis. *FASEB J* 21:3096–3106.

Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH, Callaghan MJ, Edelstein D, Brownlee M, Gurtner GC (2008) Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem* 283:10930–10938.

Chen Y, Fang L, Zhang J, Li G, Ma M, Li C, Lyu J, Meng QH (2017) Blockage of Glyoxalase I Inhibits Colorectal Tumorigenesis and Tumor Growth via Upregulation of STAT1, p53, and Bax and Downregulation of c-Myc and Bcl-2. *Int J Mol Sci* 18:570.

Chen CC, Wu ML, Ho CT, Huang TC (2015) Blockade of the Ras/Raf/ERK and Ras/PI3K/Akt Pathways by Monacolin K Reduces the Expression of GLO1 and Induces Apoptosis in U937 Cells. *J Agric Food Chem* 63:1186–1195.

Cheng W-L, Tsai M-M, Tsai C-Y, Huang Y-H, Chen C-Y, Chi H-C, Tseng Y-H, Chao I-W, Lin W-C, Wu S-M, Liang Y, Liao C-J, Lin Y-H, Chung I-H, Chen W-J, Lin PY, Wang C-S, Lin K-H (2012) Glyoxalase-I is a novel prognosis factor associated with gastric cancer progression. *PloS one* 7:e34352.

Chiavarina B, Nokin M-J, Durieux F, Bianchi E, Turtoi A, Peulen O, Peixoto P, Irigaray P, Uchida K, Belpomme D, Delvenne P, Castronovo V, Bellahcène A (2014) Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes. *Oncotarget* 5:5472–5482.

Chiou J-F, Tai C-J, Wang Y-H, Liu T-Z, Jen Y-M, Shiau C-Y (2009) Sorafenib induces preferential apoptotic killing of a drug- and radio-resistant hep G2 cells through a mitochondria-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Biol Ther* 8:1904–1913.

Chu JS, Ge FJ, Zhang B, Wang Y, Silvestris N, Liu LJ, Zhao CH, Lin L, Brunetti AE, Fu YL, Wang J, Paradiso A, Xu JM (2013) Expression and prognostic value of VEGFR-2, PDGFR-beta, and c-Met in advanced hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 32:16.

Coriat R, Nicco C, Chéreau C, Mir O, Alexandre J, Ropert S, Weill B, Chaussade S, Goldwasser F, Batteux F (2012) Sorafenib-induced hepatocellular carcinoma cell death depends on reactive oxygen species production in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 11:2284–2293.

DeWaal D, Nogueira V, Terry AR, Patra KC, Jeon S-M, Guzman G, Au J, Long CP, Antoniewicz MR, Hay N (2018) Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin. *Nat Commun* 9:446.

Di Paola R, Mazzon E, Galuppo M, Esposito E, Bramanti P, Fink MP, Cuzzocrea S (2010) Ethyl pyruvate therapy attenuates experimental severe arthritis caused by type II collagen (CII) in the mouse (CIA). *Int J Immunopathol Pharmacol* 23:1087–1098.

Ding J, Wang H (2014) Multiple interactive factors in hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 346:17–23.

Dong L, Zhou Q, Zhang Z, Zhu Y, Duan T, Feng Y (2012) Metformin sensitizes endometrial cancer cells to chemotherapy by repressing glyoxalase I expression. *J Obstet Gynaecol Res* 38:1077–1085.

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F (2004) Hepatocellular carcinoma in cirrhosis; Incidence and risk factors. *Gastroenterology* 127:35–50.

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2018) Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today>. Zugegriffen: 06. Dezember 2018.

Forner A, Reig M, Bruix J (2018) Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 391:1301–1314.

Ganten TM, Stauber RE, Schott E, Malfertheiner P, Buder R, Galle PR, Göhler T, Walther M, Koschny R, Gerken G (2017) Sorafenib in Patients with Hepatocellular Carcinoma-Results of the Observational INSIGHT Study. *Clin Cancer Res* 23:5720–5728.

Geng X, Ma J, Zhang F, Xu C (2014) Glyoxalase I in tumor cell proliferation and survival and as a potential target for anticancer therapy. *Oncol Res Treat* 37:570–574.

Guzman C, Bagga M, Kaur A, Westermarck J, Abankwa D (2014) ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS one* 9:e92444.

Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, Zhu AX, Murad MH, Marrero JA (2018) AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 67:358–380.

Helgager J, Li J, Lubensky IA, Lonser R, Zhuang Z (2010) Troglitazone reduces glyoxalase I protein expression in glioma and potentiates the effects of chemotherapeutic agents. *J Oncol* 2010:373491.

Hollenbach M, Hintersdorf A, Huse K, Sack U, Bigl M, Groth M, Santel T, Buchold M, Lindner I, Otto A, Sicker D, Schellenberger W, Almendinger J, Pustowoit B, Birkemeyer C, Platzer M, Oerlecke I, Hemdan N, Birkenmeier G (2008) Ethyl pyruvate and ethyl lactate down-regulate the production of pro-inflammatory cytokines and modulate expression of immune receptors. *Biochem Pharmacol* 76:631–644.

Hopkins FG, Morgan EJ (1945) On the distribution of glyoxalase and glutathione. *Biochem J* 39:320–324.

Hosoda F, Arai Y, Okada N, Shimizu H, Miyamoto M, Kitagawa N, Katai H, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Ohki M, Shibata T (2014) Integrated genomic and functional analyses reveal glyoxalase I as a novel metabolic oncogene in human gastric cancer. *Oncogene* 34:1196–1206.

Huang Q, Tan Y, Yin P, Ye G, Gao P, Lu X, Wang H, Xu G (2013) Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics. *Cancer Res* 73:4992–5002.

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC (2003) Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 3:276–285.

Huynh H, Nguyen TTT, Chow K-HP, Tan PH, Soo KC, Tran E (2003) Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma; Its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol* 3:19.

Kalapos MP (2013) Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Res Clin Pract* 99:260–271.

Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD (2011) Aflatoxin; A 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicol Sci* 120 Suppl 1:S28-48.

Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T (2002) Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 50:343–352.

Kim MJ, Kim DW, Lee BR, Shin MJ, Kim YN, Eom SA, Park B-J, Cho YS, Han KH, Park J, Hwang HS, Eum WS, Choi SY (2013) Transduced Tat-glyoxalase protein attenuates streptozotocin-induced diabetes in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 430:294–300.

Kiraly O, Gong G, Olipitz W, Muthupalani S, Engelward BP (2015) Inflammation-induced cell proliferation potentiates DNA damage-induced mutations in vivo. *PLoS Genet* 11:e1004901.

Knowles B, Howe C, Aden D (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209:497–499.

Kreycy N, Gotzian C, Fleming T, Flechtenmacher C, Grabe N, Plinkert P, Hess J, Zaoui K (2017) Glyoxalase 1 expression is associated with an unfavorable prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC cancer* 17:382.

Kudo M, Finn RS, Qin S, Han K-H, Ikeda K, Piscaglia F, Baron A, Park J-W, Han G, Jassem J, Blanc JF, Vogel A, Komov D, Evans TRJ, Lopez C, Dutcus C, Guo M, Saito K, Kraljevic S, Tamai T, Ren M, Cheng A-L (2018) Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 391:1163–1173.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

Larasati YA, Yoneda-Kato N, Nakamae I, Yokoyama T, Meiyanto E, Kato J-Y (2018) Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth. *Sci Rep* 8:2039.

Lee J-y, Song J, Kwon K, Jang S, Kim C, Baek K, Kim J, Park C (2012) Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases. *Hum Mol Genet* 21:3215–3225.

Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C (2006) Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 66:11851–11858.

Liu H, Yu S, Zhang H, Xu J (2012) Angiogenesis impairment in diabetes: role of methylglyoxal-induced receptor for advanced glycation endproducts, autophagy and vascular endothelial growth factor receptor 2. *PloS one* 7:e46720.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, Oliveira AC de, Santoro A, Raoul J-L, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz J-F, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J (2008) Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 359:378–390.

Loarca L, Sassi-Gaha S, Artlett CM (2013) Two α -dicarbonyls downregulate migration, invasion, and adhesion of liver cancer cells in a p53-dependent manner. *Dig Liver Dis* 45:938–946.

López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB (2009) Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol* 40:1512–1515.

Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF (2014) Cell death and cell death responses in liver disease: Mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* 147:765-783.e4.

Lunn RM, Zhang YJ, Wang LY, Chen CJ, Lee PH, Lee CS, Tsai WY, Santella RM (1997) p53 mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res* 57:3471–3477.

Magnussen A, Parsi MA (2013) Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. *World J Gastroenterol* 19:1508–1512.

Maillard LC (1912) Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. *Comp Rend* 154:66–68.

Makarova-Rusher OV, Altekruse SF, McNeel TS, Ulahannan S, Duffy AG, Graubard BI, Greten TF, McGlynn KA (2016) Population attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. *Cancer* 122:1757–1765.

Mannervik B, Aronsson AC, Tibbelin G (1982) Glyoxalase I from human erythrocytes. *Methods Enzymol* 90 Pt E:535–541.

McGlynn KA, Petrick JL, London WT (2015) Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis* 19:223–238.

Misra K, Banerjee AB, Ray S, Ray M (1995) Glyoxalase III from *Escherichia coli*: A single novel enzyme for the conversion of methylglyoxal into D-lactate without reduced glutathione. *Biochem J* 305 (Pt 3):999–1003.

Mittal S, Sada YH, El-Serag HB, Kanwal F, Duan Z, Temple S, May SB, Kramer JR, Richardson PA, Davila JA (2015) Temporal trends of nonalcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma in the veteran affairs population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13:594-601.e1.

Moench R, Grimmig T, Kannen V, Tripathi S, Faber M, Moll E-M, Chandraker A, Lissner R, Germer C-T, Waaga-Gasser AM, Gasser M (2016) Exclusive inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling is not sufficient to prevent PDGF-mediated effects on glycolysis and proliferation in colorectal cancer. *Oncotarget* 7:68749–68767.

Morgenstern J, Fleming T, Schumacher D, Eckstein V, Freichel M, Herzig S, Nawroth P (2017) Loss of Glyoxalase 1 Induces Compensatory Mechanism to Achieve Dicarbonyl Detoxification in Mammalian Schwann Cells. *J Biol Chem* 292:3224–3238.

Mybiosource Human Methylglyoxal(MGO) ELISA Kit Manual, Cat No. MBS2602652, Instructions version :09.3.1. <https://www.mybiosource.com/mgo-human-elisa-kits/methylglyoxal-mgo/2602652>. Zugegriffen: 07. März 2019.

Nass N, Bromme H-J, Hartig R, Korkmaz S, Sel S, Hirche F, Ward A, Simm A, Wiemann S, Lykkesfeldt AE, Roessner A, Kalinski T (2014) Differential response to alpha-oxoaldehydes in tamoxifen resistant MCF-7 breast cancer cells. *PloS one* 9:e101473.

Negri FV, Dal Bello B, Porta C, Campanini N, Rossi S, Tinelli C, Poggi G, Missale G, Fanello S, Salvagni S, Ardizzoni A, Maria SE (2015) Expression of pERK and VEGFR-2 in advanced hepatocellular carcinoma and resistance to sorafenib treatment. *Liver Int* 35:2001–2008.

Nokin M-J, Durieux F, Bellier J, Peulen O, Uchida K, Spiegel DA, Cochrane JR, Hutton CA, Castronovo V, Bellahcène A (2017) Hormetic potential of methylglyoxal, a side-product of glycolysis, in switching tumours from growth to death. *Sci Rep* 7:11722.

PetruzzIELLO A (2018) Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV) Related Hepatocellular Carcinoma. *Open Virol J* 12:26–32.

Phillips SA, Thornalley PJ (1993) The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem* 212:101–105.

Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y (2004) NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431:461–466.

Piperi C, Adamopoulos C, Papavassiliou AG (2017) Potential of glycative stress targeting for cancer prevention. *Cancer Lett* 390:153–159.

Pompliano DL, Peyman A, Knowles JR (1990) Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device; Definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 29:3186–3194.

PromoCell GmbH (12/2016) PromoCell Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8) Cat. No. PK-CA705-CK04, instruction manual. <https://www.promocell.com/app/uploads/2018/01/PK-CA705-CK04.pdf>. Zugegriffen: 07. März 2019.

Rabbani N, Thornalley PJ (2008) Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse; Glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 36:1045–1050.

Rabbani N, Thornalley PJ (2012) Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino acids* 42:1133–1142.

Rabbani N, Xue M, Thornalley PJ (2016) Methylglyoxal-induced dicarbonyl stress in aging and disease; First steps towards glyoxalase 1-based treatments. *Clin Sci (Lond)* 130:1677–1696.

Rabbani N, Xue M, Weickert MO, Thornalley PJ (2018) Multiple roles of glyoxalase 1-mediated suppression of methylglyoxal glycation in cancer biology-Involvement in tumour suppression, tumour growth, multidrug resistance and target for chemotherapy. *Semin Cancer Biol* 49:83–93.

Rafehi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC (2011) Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp*:e2573.

Ramesh V, Selvarasu K, Pandian J, Myilsamy S, Shanmugasundaram C, Ganesan K (2016) NFκB activation demarcates a subset of hepatocellular carcinoma patients for targeted therapy. *Cell Oncol (Dordr)* 39:523–536.

Ranganathan S, Walsh ES, Godwin AK, Tew KD (1993) Cloning and characterization of human colon glyoxalase-I. *J Biol Chem* 268:5661–5667.

Ranganathan S, Walsh ES, Tew KD (1995) Glyoxalase I in detoxification: studies using a glyoxalase I transfectant cell line. *Biochem J* 309:127–131.

Richard JP (1993) Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem Soc Trans* 21:549–553.

Rosca MG, Monnier VM, Szweda LI, Weiss MF (2002) Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F52-9.

- Sakamoto H, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Hashimoto Y, Naito M, Tsuruo T (2000) Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood* 95:3214–3218.
- Sakamoto H, Mashima T, Sato S, Hashimoto Y, Yamori T, Tsuruo T (2001) Selective activation of apoptosis program by S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase I-overexpressing human lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 7:2513–2518.
- Santel T, Pflug G, Hemdan NYA, Schäfer A, Hollenbach M, Buchold M, Hintersdorf A, Lindner I, Otto A, Bigl M, Oerlecke I, Hutschenreuther A, Hutschenreuter A, Sack U, Huse K, Groth M, Birkemeyer C, Schellenberger W, Gebhardt R, Platzer M, Weiss T, Vijayalakshmi MA, Krüger M, Birkenmeier G (2008) Curcumin inhibits glyoxalase 1: A possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity. *PLoS one* 3:e3508.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85.
- Spangenberg HC, Thimme R, Blum HE (2009) Targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6:423–432.
- Subedi KP, Choi D, Kim I, Min B, Park C (2011) Hsp31 of *Escherichia coli* K-12 is glyoxalase III. *Mol Microbiol* 81:926–936.
- Takeuchi M, Kimura S, Kuroda J, Ashihara E, Kawatani M, Osada H, Umezawa K, Yasui E, Imoto M, Tsuruo T, Yokota A, Tanaka R, Nagao R, Nakahata T, Fujiyama Y, Maekawa T (2010) Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl⁺ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment. *Cell Death Differ* 17:1211–1220.
- Thangarajah H, Yao D, Chang EI, Shi Y, Jazayeri L, Vial IN, Galiano RD, Du X-L, Grogan R, Galvez MG, Januszyk M, Brownlee M, Gurtner GC (2009) The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13505–13510.
- Thornalley PJ (2003) Protecting the genome: defence against nucleotide glycation and emerging role of glyoxalase I overexpression in multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Biochem Soc Trans* 31:1372–1377.
- Thornalley PJ, Rabbani N (2011) Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Semin Cell Dev Biol* 22:318–325.

- Thornalley PJ, Ladan MJ, Ridgway SJ, Kang Y (1996a) Antitumor activity of S-(p-bromobenzyl)glutathione diesters in vitro: a structure-activity study. *J Med Chem* 39:3409–3411.
- Thornalley PJ, Edwards LG, Kang Y, Wyatt C, Davies N, Ladan MJ, Double J (1996b) Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 51:1365–1372.
- Thornalley PJ, Waris S, Fleming T, Santarius T, Larkin SJ, Winklhofer-Roob BM, Stratton MR, Rabbani N (2010) Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucleic Acids Res* 38:5432–5442.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108.
- TUBBS PK, GREVILLE GD (1959) Dehydrogenation of D-lactate by a soluble enzyme from kidney mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 34:290–291.
- Vander Jagt DL, Robinson B, Taylor KK, Hunsaker LA (1992) Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J Biol Chem* 267:4364–4369.
- Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM (2007) Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 27:55–76.
- Wang L, Zhang X, Pang N, Xiao L, Li Y, Chen N, Ren M, Deng X, Wu J (2015) Glycation of vitronectin inhibits VEGF-induced angiogenesis by uncoupling VEGF receptor-2- α v β 3 integrin cross-talk. *Cell Death Dis* 6:e1796.
- WANG Y, KURAMITSU Y, UENO T, SUZUKI N, YOSHINO S, Iluzka N, AKADA J, KITAGAWA T, OKA M, NAKAMURA K (2012) Glyoxalase I (GLO1) is Up-regulated in Pancreatic Cancerous Tissues Compared with Related Non-cancerous Tissues. *Anticancer Res* 32:3219–3222.
- WARBURG O (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124:269–270.
- White DL, Kanwal F, El-Serag HB (2012) Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10:1342–1359.e2.
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair

- D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64:7099–7109.
- Wu JC, Merlino G, Fausto N (1994) Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:674–678.
- Xiao Y, Peng H, Hong C, Chen Z, Deng X, Wang A, Yang F, Yang L, Chen C, Qin X (2017) PDGF Promotes the Warburg Effect in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via Activation of the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* 42:1603–1613.
- Xue M, Rabbani N, Momiji H, Imbasi P, Anwar MM, Kitteringham N, Park BK, Souma T, Moriguchi T, Yamamoto M, Thornalley PJ (2012) Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. *Biochem J* 443:213–222.
- Yang Y-X, Chen Z-C, Zhang G-Y, Yi H, Xiao Z-Q (2008) A subcellular proteomic investigation into vincristine-resistant gastric cancer cell line. *J Cell Biochem* 104:1010–1021.
- Yoshida A, Ikawa M, Hsu LC, Tani K (1985) Molecular abnormality and cDNA cloning of human aldehyde dehydrogenases. *Alcohol* 2:103–106.
- Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu L-L, Sethi SK, Koay ESC (2005) Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 4:1686–1696.
- Zhang W, He H, Zang M, Wu Q, Zhao H, Lu L-L, Ma P, Zheng H, Wang N, Zhang Y, He S, Chen X, Wu Z, Wang X, Cai J, Liu Z, Sun Z, Zeng Y-X, Qu C, Jiao Y (2017) Genetic Features of Aflatoxin-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 153:249-262.e2.
- Zou X-Y, Ding D, Zhan N, Liu X-M, Pan C, Xia Y-M (2015) Glyoxalase I is differentially expressed in cutaneous neoplasms and contributes to the progression of squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 135:589–598.

8 Thesen

1. Die Glyoxalase-I ist das bedeutendste Enzym zur Detoxifikation von zytotoxischem Methylglyoxal und dient als Schutzmechanismus besonders maligner Zellen.
2. Die Expression der Glyoxalase-I ist in HCC-Zellen mit vermehrter Malignität und Invasivität erhöht und mit einer größeren Proliferationsrate assoziiert.
3. Die Glo-I-Inhibitoren EP und BrBzGSHCp2 hemmen die Proliferation in Huh7-Zellen.
4. Die Glo-I-Inhibitoren EP und BrBzGSHCp2 hemmen HCC-assoziierte Signalwege in Huh7-Zellen.
5. Der Glo-I-Inhibitor EP hemmt die Migration und Koloniebildung in Huh7-Zellen.
6. Sorafenib ist ein Multi-Tyrosin-Kinase Inhibitor in der Therapie des fortgeschrittenen HCC.
7. Sorafenib führt zu einer Steigerung der Glo-I-Expression und -Aktivität.
8. Sorafenib und EP führt zu einer höheren MGO-Akkumulation.
9. Sorafenib und EP in einer Koinkubation hemmt die Proliferation mehr, als bei alleiniger Behandlung.
10. Glo-I-Inhibitoren und Sorafenib zeigen synergistische Effekte auf die Proliferation von Huh7-Zellen und stellen damit einen möglichen Ansatzpunkt für zukünftige Therapieschemata des HCC dar.

Anhänge

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Alexander Zipprich, für die Möglichkeit dieser Dissertation in seiner Laborgruppe „Molekulare Hepatologie“ sowie die hervorragende fachliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen und die gute Zusammenarbeit zutiefst bedanken.

Ein ganz großer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Marcus Hollenbach für die tolle Unterstützung und die Einarbeitung verschiedener Labormethoden, die vielen wertvollen Ratschläge und die stets große Hilfe bei jeglichen Fragen.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich mich ebenfalls für die Hilfe beim Erlernen der Labormethoden bedanken.

Außerdem gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meiner Freundin, die mich ständig unterstützt, motiviert und auf diesem Weg begleitet haben. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir jeden Freiraum gegeben haben, meine akademische Ausbildung und das Medizinstudium zu bestreiten.

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe. / I declare that I have not completed or initiated a doctorate procedure at any other university.

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben / Declaration concerning the truth of information given

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben. / I declare that all information given is accurate and complete. The thesis has not been used previously at this or any other university in order to achieve an academic degree.

(3) Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

I declare under oath that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I met all regulations of good scientific practice and I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.

Halle (Saale), 18.06.2020

Maurice Michel

M. Michel