

**Zelltodresistenz maligner Gliomzellen:
Die Bedeutung p53-abhängiger metabolischer Prozesse**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Vorgelegt von Christina Nordhammer
Geb. 19.01.1980 in Casablanca, Marokko

Frankfurt, 2010

Gutachter: Prof. Eckhard Boles (FB 15 Biowissenschaften)
Prof. Joachim P. Steinbach (FB 16 Medizin)

Délaisse les grandes routes, prends les sentiers.

Pythagore, 500 av. J-C.

***Rien n'est impossible, seules les limites
de nos esprits définissent certaines choses
comme inconcevables.***

Marc Lévy, XX. siècle

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Zusammenfassung	3
1 Einleitung	5
1.1 Funktionen und Bedeutung von p53 in Tumoren	5
1.2 Das Mikromilieu des Tumors	8
1.2.1 Der Sauerstoffmangel: die Hypoxie.....	8
1.2.2 Der Nährstoffmangel: die Hypoglykämie	10
1.2.2.1 AMPK	10
1.2.2.2 Akt	11
1.3 Metabolismus in der Tumorzelle	12
1.3.1 Der Pasteur-Effekt	12
1.3.2 Der Warburg-Effekt oder die aerobe Glykolyse	13
1.3.3 Der Pentosephosphat-Weg in Tumorzellen	16
1.3.3.1 Allgemein	16
1.3.3.2 Die Rolle der TKTL1 im Tumormetabolismus.....	18
1.3.4 Die oxidative Phosphorylierung in Tumorzellen	19
1.3.4.1 SCO2	20
1.3.4.2 HIF-1 α	21
1.3.5 Der Umgang mit ROS in Tumorzellen	22
1.4 Zielsetzung	24
2 Materialien	25
2.1 Reagenzien	25
2.1.1 Allgemeine Chemikalien	25
2.1.2 Medien	25
2.1.3 Antibiotika	26
2.1.4 Inhibitoren, Zytostatika und Chemotherapeutika.....	26
2.1.5 Transfektionsreagenzien	27
2.1.6 Antikörper.....	27
2.1.7 RT-PCR-Primer	27
2.1.8 siRNA-Primer	29
2.1.9 Größenstandards.....	29
2.1.10 Vorgefertigte Systeme (Kits).....	30
2.2 Biologisches Material	30
2.2.1 Zelllinien	30
2.2.2 Bakterien	34
2.2.3 Vektoren.....	34

3	Methoden	36
3.1	Zellbiologische Methoden	36
3.1.1	Zellkultur.....	36
3.1.1.1	Handhabung der Zellen.....	36
3.1.1.2	Selektion	36
3.1.1.3	Einfrieren	37
3.1.1.4	Zellzahlbestimmung	37
3.1.1.5	Aussaat	37
3.1.1.6	Stabile Transfektion.....	38
3.1.1.7	Transiente Transfektion	38
3.1.2	FACS-Analysen	39
3.1.2.1	PI-FACS als Zelltod-Untersuchung	39
3.1.2.2	Messung von intrazellulären Reactive Oxygen Species (ROS)	40
3.1.3	Luziferase Transaktivität.....	40
3.1.4	Kristallviolett-Assay	42
3.2	Stoffwechsel-untersuchende Methoden	43
3.2.1	Hypoxie-Induktion	43
3.2.2	Hypoglykämie-Induktion	43
3.2.3	Sauerstoff-Messungen	43
3.2.4	Glukose- und Laktat-Messung.....	45
3.3	Molekularbiologische Methoden	45
3.3.1	Arbeiten mit Plasmid-DNA	45
3.3.1.1	Plasmid-DNA-Midipräparation.....	45
3.3.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	45
3.3.1.3	Transformation von Plasmid-DNA.....	45
3.3.2	Arbeiten mit RNA.....	46
3.3.2.1	RNA-Isolierung und cDNA-Herstellung	46
3.3.2.2	cDNA-Synthese	46
3.3.2.3	Real Time-PCR.....	46
3.4	Proteinanalytische Methoden	47
3.4.1	Proteinlysate.....	47
3.4.2	Konzentrationsbestimmung	47
3.4.3	SDS-PAGE.....	48
3.4.4	Western-Blot	49
4	Ergebnisse	51
4.1	p53-Regulierung unter Nährstoff- und Sauerstoffmangel	51
4.1.1	Vorstellung der verwendeten Systemen	51
4.1.2	p53-vermittelte Zelltod-Induktion.....	53

4.1.3	Regulation von p53 unter Nährstoff- und Sauerstoffmangel.....	53
4.1.4	Regulation von HIF-1 α	57
4.1.4.1	p53-bedingte Regulation von HIF-1 α in Gliomzellen	57
4.1.4.2	Regulation von HIF-1 α unter Nährstoffmangel und Hypoxie.....	59
4.2	Auswirkungen einer p53-Inaktivierung unter Tumormikromilieu-Bedingungen	60
4.2.1	Die Inaktivierung von p53 verstärkt die Sensibilität von Gliom- und Kolonkarzinomzellen gegenüber Nährstoffmangel- und Hypoxie-induziertem Zelltod	60
4.2.2	Sauerstoffmangel führt p53-abhängig zu steigenden intrazellulären ROS-Konzentrationen.....	63
4.2.3	p53-Inaktivierung führt zu verstärktem Zellwachstum in der hochgradigen Hypoxie..	64
4.2.4	p53-Inaktivierung führt zu einer verstärkte Glykolyse unter Nährstoffmangel und Hypoxie	65
4.2.5	p53-Inaktivierung korreliert mit einer verringerten Atmung.....	69
4.3	Untersuchung von SCO2, einem möglichen metabolischen Mediator	70
4.3.1	SCO2 <i>in silico</i> -Untersuchung	70
4.3.2	SCO2 ist ein Zielgen von p53 in Gliomzellen	70
4.3.3	SCO2 wird durch moderate Hypoxie induziert.....	71
4.3.4	Herstellung von SCO2-Transfektanten	72
4.3.5	SCO2 verstärkt die mitochondriale Atmung.....	74
4.3.6	Eine Restoration der SCO2-Expression in p53 ^{wt-defizient} -Zellen hat keinen Einfluss auf die Proliferation.....	76
4.3.7	SCO2 vermittelt einen geringeren Glukoseverbrauch unter moderater Hypoxie	77
4.3.8	SCO2 schützt Zellen vor Zelltod unter moderater Hypoxie (1% O ₂), nicht aber unter hochgradiger Hypoxie (0,1% O ₂)	80
4.3.9	SCO2-überexprimierende Zellen haben geringere intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter moderater Hypoxie.....	82
4.3.10	Die Hemmung der Atmungskette revertiert den Effekt von SCO2 unter 1% O ₂ in p53 ^{wt-defizient} -Zellen	83
4.3.11	HIF-1 α reguliert die Expression von Lon aber nicht von Cox4-2 in Gliomzellen	86
4.3.12	HIF-1 α reguliert die Expression von SCO2 unter moderater Hypoxie.....	87
4.4	TIGAR als möglicher metabolischer Mediator von p53-abhängigen Hypoxie-protectiven Effekten	89
4.4.1	TIGAR <i>in silico</i> -Untersuchung	90
4.4.2	TIGAR ist ein p53-Zielgen in Gliom-Zelllinien	90
4.4.3	Herstellung von TIGAR-Transfektanten.....	91
4.4.4	Untersuchungen von TIGAR unter Normoxie.....	93
4.4.4.1	TIGAR verstärkt die mitochondriale Atmung.....	93
4.4.4.2	TIGAR und die Glykolyse	95
4.4.4.3	HIF-1 α reguliert die Expression von TIGAR unter moderater Hypoxie	96
4.4.5	TIGAR reguliert die Aktivität von HIF-1 α unter moderater Hypoxie	98

4.4.6	TIGAR reguliert die Expression von Lon und SCO2 unter moderater Hypoxie (5% O ₂)	101
4.4.7	TIGAR schützt p53 ^{wt-defizient} -Zellen vor Nährstoffmangel- und Hypoxie-induziertem Zelltod	102
4.4.8	TIGAR vermittelt einen Schutz vor ROS-induziertem Zelltod (H ₂ O ₂)	105
4.4.9	TIGAR-exprimierende Zellen haben geringere intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter Hypoxie und Nährstoffmangel	107
4.4.10	Einfluss von TIGAR auf die Transaktivität von HIF-1 α in der hochgradigen Hypoxie	110
4.4.11	TIGAR-exprimierende Zellen haben geringere intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter exogen induziertem Stress (Adriamycin)	111
4.4.12	TIGAR reguliert ATG12	112
4.5	TKTL1: Ein p53- und TIGAR-reguliertes Gen	113
4.5.1	Die Expression von TKTL1, nicht jedoch von anderen Enzymen der Glykolyse- oder des PPP, ist in p53 ^{wt-defizient} -Zellen vermindert	114
4.5.2	TKTL1 ist ein über TIGAR induziertes p53-Zielgen	117
4.5.3	TKTL1 <i>in silico</i> -Untersuchung	121
4.5.4	Funktionelle Untersuchungen von TKTL1 in Gliom-Zelllinien	122
4.5.4.1	Herstellung von TKTL1-Transfektanten	122
4.5.4.2	TKTL1 kann Adriamycin-induzierte ROS vermindern	124
4.5.4.3	TKTL1 schützt vor Nährstoffmangel- und Hypoxie-induziertem Zelltod	125
4.5.4.4	TKTL1 vermittelt einen Schutz vor ROS-induziertem Zelltod (H ₂ O ₂)	127
4.5.4.5	TKTL1-Suppression sensibilisiert TIGAR-Zellen gegenüber ROS-induziertem Zelltod	128
4.5.4.6	TKTL1-Suppression führt zu erhöhten intrazellulären ROS-Konzentrationen unter Hypoxie und Nährstoffmangel	130
4.5.4.7	TKTL1-Suppression in TIGAR-Zellen erhöht intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter Hypoxie	131
4.5.4.8	Einfluss von TKTL1 auf die Transaktivität von HIF-1 α unter hochgradiger Hypoxie	132
4.5.4.9	HIF-1 α reguliert die TKTL1-Expression in der Hypoxie	134
4.5.4.10	TKTL1-Suppression in TIGAR-überexprimierenden Zellen verringert die Atmung	135
4.5.4.11	TKTL1-Suppression bewirkt eine Hemmung der HIF-1 α -Transaktivität unter moderater Hypoxie (5% O ₂)	136
4.5.4.12	HIF-1 α reguliert TKTL1 unter Normoxie und moderater Hypoxie	137
5	Diskussion	139
5.1	p53-Regulation unter Nährstoff- und Sauerstoffmangel in Gliomzellen	140
5.2	Auswirkungen einer p53-Inaktivierung in Gliomzellen	141
5.3	SCO2 schützt p53^{wt}-Zellen unter moderater Hypoxie	142
5.3.1	p53 und HIF-1 α regulieren die Atmung über SCO2	143
5.3.2	SCO2 schützt Gliomzellen vor moderater Hypoxie	146
5.4	TIGAR: ein vielseitiges p53-Zielgen	149
5.4.1	TIGAR vermittelt Tumorzellen einen Schutz gegenüber Nährstoffmangel- und Hypoxie-induziertem Zelltod	149

5.4.2	TIGAR steuert die Atmung über HIF-1 α	152
5.5	TKTL1: Ein über die Hemmung der Glykolyse induzierbares p53-Zielgen	155
5.5.1	TKTL1 wird über p53 und TIGAR reguliert.....	156
5.5.2	TKTL1 vermittelt TIGAR-Effekte in der Hypoxie	156
5.5.3	TIGAR, TKTL1 und die oxidative Phosphorylierung	157
5.6	Implikationen für die Entwicklung neuer Tumorthapien	160
6	Verzeichnisse	162
6.1	Abkürzungsverzeichnis	162
6.1.1	Allgemeine Abkürzungen	162
6.1.2	Zelllinien-, Protein- oder Gen-Namen	162
6.1.3	Materialien/Methoden.....	164
6.2	Abbildungverzeichnis	166
6.3	Tabellenverzeichnis	168
6.4	Pufferverzeichnis	168
6.5	Vektorenverzeichnis	169
6.6	Datenbankuntersuchungen	180
6.6.1	SCO2	180
6.6.2	TIGAR	182
6.6.3	TKTL1:	183
7	Literaturverzeichnis	185
8	Anhang	205

Abstract

Recent work has demonstrated that p53 plays an important role in the processing of starvation signals and that p53-dependent molecular mediators of the Warburg effect regulate glucose consumption and mitochondrial function. We therefore hypothesized that the common presence of wild-type p53 (p53^{wt}) in glioma cells serves to limit metabolic demands induced by deregulated signal transduction processes in the presence of hypoxia and nutrient depletion. This thesis reports that shRNA-mediated gene suppression of p53 as well as the mutant temperature-sensitive dominant-negative p53^{V135A} increased glucose consumption and lactate production, decreased oxygen consumption and enhanced hypoxia-induced cell death in p53^{wt} human malignant glioma cells. Similar results were obtained in HCT116 cells in which p53 is deleted by genetic homologous recombination. Furthermore, antagonism of p53 repressed *Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2* (SCO2), an effector necessary for respiratory chain function. A SCO2 transgene in p53^{wt-deficient} cells reconstituted glucose consumption, lactate production and oxygen consumption as well as resistance towards hypoxia in a sensitive fashion to rotenone, an inhibitor of complex I of the respiratory chain, demonstrating that this effect was dependent on intact oxidative phosphorylation. Finally, gene suppression of SCO2 in p53^{wt} glioma cells sensitized these cells towards moderate hypoxia.

It was also revealed that p53 and HIF-1 α cooperate to activate SCO2 under hypoxia, suggesting i) SCO2 as a new target gene for HIF-1 α and ii) a novel option to modulate respiration and ROS-prevention via HIF-1 α .

These findings suggest that glioma cells may benefit from retaining p53^{wt} status by reducing their vulnerability towards moderate tumor hypoxia and that SCO2 mediates this effect.

Notwithstanding the effects of SCO2, the sensitivity of p53^{wt-deficient} cells towards profound hypoxia-induced cell death could not be explained by SCO2, as this oxidase can only perform its function under oxygen availability. In order to elucidate the mechanisms governing protection against severe hypoxia in p53^{wt} cells, the role of TIGAR (*Tp53 Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*), another recently characterized p53 metabolic target gene, was analyzed. TIGAR shares similarity with the fructose-bisphosphatase-2 domain of the bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2 enzyme and reduces the level of fructose-2,6-bisphosphate (FBP-2). FBP-2 is a glycolysis regulator which at higher concentrations inhibits glycolysis and activates the pentose phosphate way (PPP), decreasing intracellular levels of reactive oxygen species (ROS). The overexpression of TIGAR in p53^{wt} cells enhanced glycolysis inhibition under normoxia and allowed oxidative phosphorylation as a compensatory metabolic mechanism. Furthermore, TIGAR potentiated expression of

Lon, a protease that modulates subunits of the respiration chain and acts as a ROS-scavenger, but decreased expression of SCO2.

Restoration of TIGAR in p53^{wt-deficient} cells could reverse sensitivity against severe hypoxia. TIGAR also lowered ROS levels and decreased sensitivity against oxidative stress. Additionally, gene suppression of TIGAR in p53^{wt} glioma cells sensitized these cells towards profound hypoxia. Expression of HIF-1 α also correlated with TIGAR-expression, suggesting a new role of HIF-1 α in the regulation of hypoxia-induced cell death and protection against ROS.

Transketolase-Like-1 (TKTL1), an isoenzyme of transketolase, an enzyme of the pentose phosphate way, is known to be upregulated in many tumors. It has been suggested that TKTL1 protects cells against oxidative stress and it is assumed to correlate with high phospho-Akt levels in Glioma. It is demonstrated herein that TKTL1 is an indirect p53 target gene that can be regulated via TIGAR. Suppressing TKTL1-expression in TIGAR-expressing cells also abolished the protecting effects of TIGAR towards endogenous ROS, oxidative stress and hypoxia-induced cell death.

We have therefore elucidated a hitherto unknown link between TIGAR, TKTL1 and HIF-1 α . Likewise, downregulation of TKTL1 by siRNA similar to TIGAR-suppression reduced HIF1- α -transactivation, suggesting a role of TKTL1 in the regulation of HIF1- α under hypoxia.

Taken together, the results presented in this thesis suggest that targeting p53-dependent metabolic regulators may be a valuable strategy to enhance glioma cell sensitivity towards hypoxia-induced cell death. This may be important for novel strategies to target the hypoxic tumor population that is known to drive the selection of therapy-resistant clones.

Zusammenfassung

Neuere Daten weisen p53 eine wichtige Rolle in der Verarbeitung von Mangelsignalen zu und deuten darauf hin, dass p53-abhängige molekulare Mediatoren des Warburg-Effektes Glukoseverbrauch und mitochondriale Funktion regulieren. Wir stellten deshalb die Hypothese auf, dass p53-wildtyp (p53^{wt}) in Gliomzellen den metabolischen Bedarf reduzieren kann, der durch deregulierte Signaltransduktionsprozessen unter Mangelbedingungen (Hypoxie und Nährstoffdepletion) zu Stande kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die shRNA-vermittelte p53-Gensuppression als auch die Temperatur-sensitive dominant-negative p53^{V135A} Mutante in humanen p53^{wt}-Gliomzellen Glukoseverbrauch und Laktatproduktion erhöht, den Sauerstoffverbrauch reduziert und den Hypoxie-induzierten Zelltod steigert. Ähnliche Ergebnisse wurden in HCT116-Zellen erzielt, in denen p53 durch homologe Rekombination entfernt wurde. Überdies konnte beobachtet werden, dass eine zelluläre p53-Suppression die Expression von *Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2* (SCO2), eines Effektors, der in der Atmungskette benötigt wird, reprimiert. Die Restoration von SCO2 in p53^{wt-defizient}-Zellen konnte Glukoseverbrauch, Laktatproduktion und Sauerstoffverbrauch wieder normalisieren, und vermittelte zugleich eine Resistenz gegenüber Hypoxie von Rotenone, einem Inhibitor des Komplex I der Atmungskette, abhängige Weise. Dies zeigte, dass die SCO2-vermittelten Effekte von einer intakten oxidativen Phosphorylierung abhängig waren. Schließlich vermittelte eine Gensuppression von SCO2 in p53^{wt}-Gliomzellen eine Sensibilisierung dieser Zellen gegenüber moderater Hypoxie.

Es konnte auch gezeigt werden, dass p53 und HIF-1 α miteinander kooperieren, um SCO2 unter Hypoxie zu induzieren, was suggeriert, dass i) SCO2 ein neues HIF-1 α Zielgen sein könnte und ii) SCO2 ein neues Zielprotein darstellen könnte, um Atmung und ROS-Prävention über HIF-1 α zu modulieren. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Gliomzellen einen Nutzen aus dem Aufrechterhalten eines p53^{wt}-Status erzielen können, da dies ihre Vulnerabilität gegenüber moderater Tumor-Hypoxie reduzieren kann, und dass dieser Effekt SCO2-vermittelt ist. Dennoch konnte die Sensitivität von p53^{wt-defizient}-Zellen gegenüber hochgradiger Hypoxie-induziertem Zelltod nicht über die Effekte von SCO2 erklärt werden, da diese Oxidase ihre Funktionen nur unter ausreichend oxyischen Bedingungen erfüllen kann.

Um die Mechanismen aufzuklären, die p53^{wt}-Zellen vor hochgradiger Hypoxie Schutz verleihen, wurde die Rolle von TIGAR (*Tp53 Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*), eines weiteren kürzlich charakterisierten metabolischen p53-Zielgens, untersucht. TIGAR zeigt Ähnlichkeit mit der Fruktose-Bisphosphatase-2-Domäne des bifunktionalen Enzyms 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase 2, und reduziert die intrazellulären

Konzentrationen von Fruktose-2,6-Bisphosphat (FBP-2). FBP-2 ist ein Glykolyse-Regulator, der in höheren Konzentrationen die Glykolyse hemmt und den Pentose-Phosphat-Weg (PPP) induziert, was zu einer Verringerung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies-Konzentrationen (ROS) führt.

Die Überexpression von TIGAR in p53^{wt}-Zellen verstärkte die Glykolyse-Hemmung unter normoxischen Bedingungen und erlaubte oxidative Phosphorylierung als kompensatorischen metabolischen Mechanismus. Zudem förderte TIGAR die Expression von Lon, einer Protease, die Untereinheiten der Atmungskette modulieren kann, und zugleich als Radikalfänger fungiert. Jedoch reduzierte TIGAR die Expression von SCO2.

Die Restoration von TIGAR in p53^{wt-defizient}-Zellen konnte die Sensibilität gegenüber hochgradiger Hypoxie aufheben. TIGAR reduzierte auch die ROS-Menge und verringerte die Sensitivität gegenüber oxidativen Stress. Zugleich sensibilisierte die Gensuppression von TIGAR in p53^{wt}-Gliomzellen diese Zellen vor hochgradiger Hypoxie. Zudem korrelierte die Expression von HIF-1 α mit der TIGAR-Expression, was eine neue Rolle von HIF-1 α in der Regulation des Hypoxie-induzierten Zelltodes und der Protektion vor ROS vermuten ließ.

Die Expression der *Transketolase-Like-1* (TKTL1), eines Isoenzym der Transketolase im Pentose-Phosphat-Weg, ist in vielen Tumoren hochreguliert. Es wurde spekuliert, dass TKTL1 Zellen Schutz vor oxidativem Zellstress vermitteln kann. Zugleich ist bekannt, dass TKTL1 mit hohen phospho-Akt-Mengen in Gliomen korreliert. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TKTL1 ein indirektes p53-Zielgen ist, welches über TIGAR reguliert werden kann. Eine Suppression der TKTL1-Expression in TIGAR-exprimierenden Zellen konnte die über TIGAR vermittelten protektiven Effekte gegenüber endogenen ROS, oxidativem Stress und Hypoxie-induziertem Zelltod aufheben. Folglich wurde hier ein bis jetzt unbekannter Zusammenhang zwischen TIGAR, TKTL1 und HIF-1 α entdeckt.

Ebenso konnte eine TKTL1-Suppression mittels siRNA wie die TIGAR-Suppression die HIF1- α -Transaktivierungsfähigkeit reduzieren, was zu der Vermutung Anlass gab, dass TKTL1 HIF1- α unter Hypoxie reguliert.

Zusammenfassend legen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse nahe, dass p53-abhängige metabolische Regulatoren interessante Ziele für neue Therapiestrategien darstellen könnten, weil ihre Blockade die Sensibilität von Gliomzellen gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod erhöhen kann. Dies könnte von Bedeutung für die Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung der hypoxischen Tumorphilpopulation sein, die von großer Bedeutung für die Selektion Therapie-resistenter Klone ist.

1 Einleitung

Bei der Krebsentstehung, auch Karzinogenese genannt, ist die Abstimmung von Wachstum, Teilung und Apoptose im Zellverband dereguliert. Durch genetische Defekte oder Einflüsse von Außen (z.B. ionisierende Strahlung oder mutagene Chemikalien) können Gene, die für die Überwachung oder Erhaltung der Vorgänge in der Zelle verantwortlich sind, beschädigt werden. Meist entstehen Veränderungen in den Signaltransduktionskaskaden durch Mutationen oder Defekte wichtiger Wächtergene (Tumorsuppressorgene), so dass regulierende Signale nicht mehr erkannt oder ausgeführt werden können. Die häufigsten Mutationen betreffen p53, eines der wichtigsten Tumorsuppressormoleküle (1-6).

1.1 Funktionen und Bedeutung von p53 in Tumoren

p53 hat in der Zelle multiple Funktionen: p53 wird als Wächter der Zelle betrachtet, da es an vielen zellerhaltenden Prozessen teilnimmt oder selbst reguliert wird (5, 7-9). So wird p53 u.a. unter Stressbedingungen aktiviert, was zu einem Zellzyklusarrest führen kann (10, 11), bis wieder genügend Energie vorhanden ist. Darüber hinaus spielt p53 eine Rolle in der Regulierung der Proliferation (12), der Signalweiterleitung und der Apoptose (13-16). Einige Studien veranschaulichten, dass p53 eine Rolle in der Regulierung der ROS-Konzentrationen in der Zelle inne hat und somit je nach Stresssituation Apoptose induzieren oder der Zelle Schutz vor ROS bieten kann (17-21). Eine weitere p53-Funktion wurde erst kürzlich entdeckt: In Stresssituationen kann p53 über DRAM (*Damage-Regulated Autophagy Modulator*) Autophagie induzieren (22, 23), einen Vorgang, bei dem es zum Abbau von nicht essentiellen Zellbestandteilen kommt. Hierbei werden überlebenswichtige Prozesse weiterhin mit Energie versorgt (24, 25). Über p53 erfolgt auch die Koordination von Stress-Response-Signalwegen (Nährstoffmangel (17, 26, 27), Sauerstoffmangel (28-30), Bestrahlungen (31, 32) und reaktive Sauerstoff-Spezies (33-35)). Seit wenigen Jahren ist zudem bekannt, dass p53 in den Zellmetabolismus eingreifen kann, wie z.B. in die Glykolyse über TIGAR (*Tp53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*) (33, 36, 37) und über PGM (Phosphoglycerate Mutase) (37, 38) oder in die oxidative Phosphorylierung über SCO2 (*Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2*) (39-41). (**Abbildung 1-1**).

In ca. 50% aller menschlichen Tumoren liegt p53 in seinem wildtyp-Genotyp (wt) vor (<http://p53.free.fr/>). Dennoch -oder vielleicht auch gerade deswegen- sind diese Tumore nicht minder überlebensfähig, aggressiv oder invasiv (42, 43). Es ist bekannt, dass es in einigen p53^{wt}-Tumoren zu einer Inaktivierung bzw. Deregulierung von bestimmten p53^{wt}-Funktionen bzw. Zielgenen kommt.

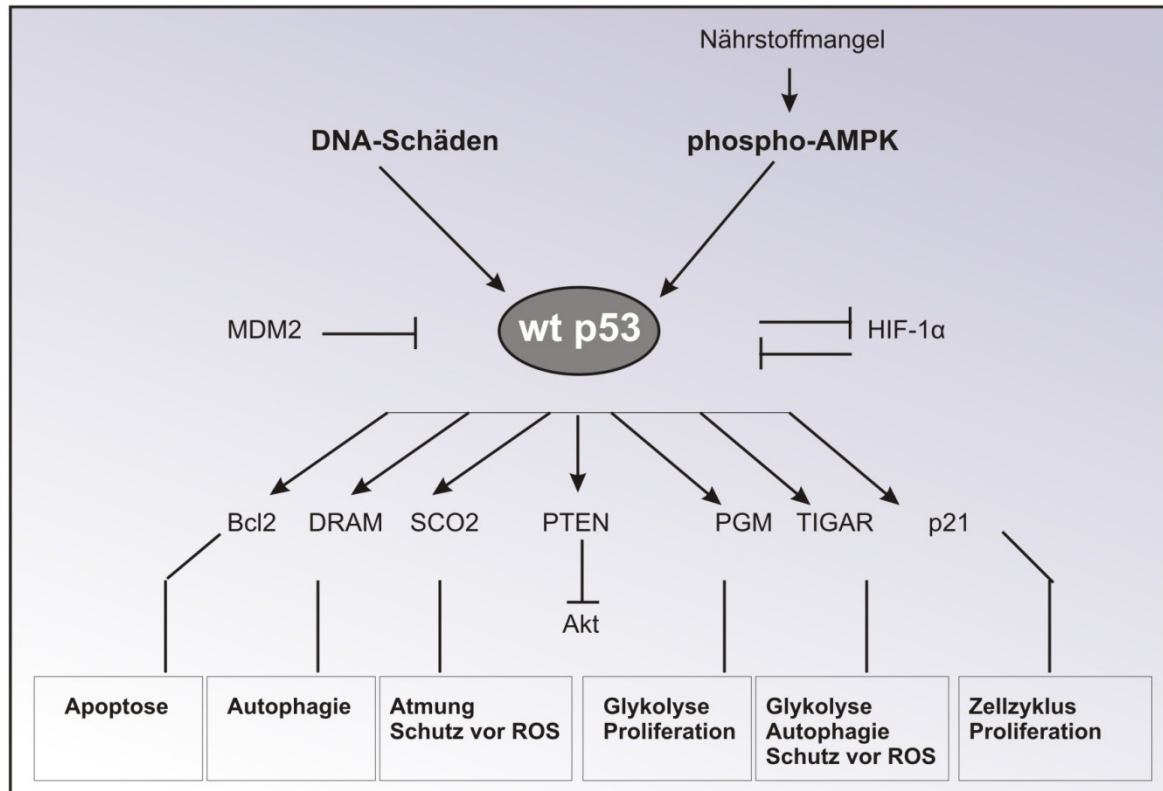


Abbildung 1-1: Das p53-Netzwerk

p53 spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung vieler Prozesse in der Zelle: p53 reguliert die Proliferation und die Signalweiterleitung (PTEN, Akt). Unter Stressbedingungen wird p53 aktiviert und kann den Zellzyklus arretieren, bis wieder genügend Energie vorhanden ist (z.B. über p21). Über DRAM (*Damage-Regulated Autophagy Modulator*) induziert p53 Autophagie, und hilft dabei, überlebenswichtige Prozesse weiterhin mit Energie zu versorgen. Ebenso kann p53 in den Zellmetabolismus eingreifen wie z.B. in die Glykolyse über TIGAR (*Tp53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*) und über PGM (*Phosphoglycerate Mutase*) oder in die oxidative Phosphorylierung über SCO2 (*Synthesis of Cytochrome c 2 Oxidase*). Kann die Zelle aufgrund von zu starken Schädigungen nicht überleben, so wird die Apoptose über p53 eingeleitet (z.B. über Bcl2).

So wird etwa MDM2 ungeachtet des p53^{wt}-Status in bestimmten Mamma- und Epithelialkarzinomen amplifiziert (44, 45). Dies hat jedoch, trotz des üblicherweise MDM2-vermittelten p53-Abbaus, keinen Einfluss auf die Stabilität von p53. Daten aus *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA) 2008, zeigten ebenfalls eine mutuelle Exklusivität zwischen p53^{wt}-Mutationen und MDM2-Amplifikationen (46). Auch ist bekannt, dass primäre (*de novo* entstehende) und sekundäre Glioblastome (die sich rezidiv aus vormals therapierte Astrozytome entwickeln), die beiden Prototypen des Glioblastoms, durch wechselseitig exklusive Alterationen von EGFR und p53 gekennzeichnet sind (47, 48). Bei primären Glioblastomen findet man überwiegend EGFR-Amplifikationen vor, während p53-Mutationen die Ausnahme sind. Sekundäre Glioblastome zeichnen sich wiederum durch eine hohe Frequenz an p53-Mutationen aus, schließen aber EGFR-Amplifikationen fast ausschließlich aus. Bislang ist diese ungewöhnliche Exklusivität verschiedener molekularer Alterationen bei diesen Glioblastom-Subtypen ungeklärt.

In vielen p53^{wt}-Tumoren findet man zudem eher p21/WAF1-Alterationen bzw. Varianten als in p53-mutierten Tumoren. Es wird vermutet, dass Varianten des p21-Protein einen direkten Effekt auf die Tumor-Entwicklung haben, diese aber inkompatibel mit p53-Mutationen sind (49, 50). Ein weiteres Beispiel für ein defektes p53-Zielgen in p53^{wt} Tumoren ist PTEN, ein wichtiges Signal-Transduktions-Zielgen. PTEN ist in einigen Tumoren mutiert und schließt gleichzeitige p53-Mutationen aus (51, 52). Ein defektes PTEN kann Akt/PKB nicht mehr inhibieren, was zu einer verstärkten Weiterleitung von Signalprozessen in der Akt/PKB-Signalkaskade führt (53, 54). Zudem kann es in PTEN-mutierten Tumoren zu einer Stabilisierung von p53 einer verbundenen Regulierung von p53-Zielgenen kommen, wie z.B. des p21, des *Growth differentiation factor 15* (GDF15), des *p53-inducible gene 3* (PIG3), des *proapoptotic protein of the Bcl-2 family* (NOXA) und der Serine/Threonine-Proteinkinase (PLK2) (55).

In vielen Tumoren werden somit selektiv einige p53^{wt}-Funktionen inaktiviert, andere wiederum können erhalten bleiben: Es wird vermutet, dass bestimmte p53^{wt}-gesteuerte Funktionen für das Überleben der Zelle unter bestimmten Mangelbedingungen nützlich sein könnten, die im Tumorgewebe häufig vorkommen (Hypoxie oder Nährstoffdepletion (56-62)). So könnte p53^{wt} z.B. über die Regulierung von SCO2 (39) oder TIGAR (33) metabolische Vorteile verschaffen.

In dieser Arbeit sollen diese Vorteile anhand des Glioblastom-Modells untersucht werden, da in der Mehrheit der primären Glioblastome keine p53-Mutationen vorliegt (42, 43, 48, 63). Das Glioblastom ist der häufigste bösartige hirneigene Tumor, mit einer Inzidenz von 2-3 jährlichen Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner in Europa und Nordamerika. Glioblastome werden aufgrund der hohen Mortalitätsrate nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation in Klasse IV eingestuft. Durch einen neurochirurgischen Eingriff kann zwar je nach Tumorlokalisierung die Hauptmasse des Tumors reduziert, das Tumorstadium aber nicht aufgehalten werden, da übriggebliebene einzelne Tumorzellen invasiv in das gesunde Gewebe eindringen. Der Operation folgt eine Chemotherapie und/oder Bestrahlung. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt dennoch bei unter 2%. Hauptziel in der Chemotherapie ist die Bekämpfung von Krebszellen ohne nicht-entartete Zellen in Mitleidenschaft zu ziehen. Hierfür muss auch der Metabolismus der Krebszellen verstanden werden. Viele Antiangiogenese-Therapien führen zwar zu einer Normalisierung der Blutgefäßbildung und somit zu einer verringerten Durchblutung der Tumorzellen, können aber auch Hypoxie verstärken (64). Hypoxie ist in der Resistenz gegenüber Antitumorthérapien eine wichtige Determinante, da viele Tumorregionen, in denen Hypoxie auftritt, Chemotherapeutika- und Strahlen-Resistenzen aufweisen (65-70).

Eine Untersuchung der metabolischen Vorgänge in Tumorzellen bezüglich des Nährstoffmangels erscheint aus vielerlei Hinsicht ebenfalls von Bedeutung: In wenig

durchbluteten Geweben oder okklusiven Gefäßen kommt es zusätzlich zu hypoxischen Erscheinungen zu einer Nährstoffdepletion. Diese führt zu einer Selektion von resistenten und aggressiven Zellen, auch weil die Hypoxie die Glukose-Aufnahme und -Weiterleitung in der Zelle reguliert (71-75). Viele dieser Prozesse werden über p53 gesteuert, bzw. werden p53 und somit seine regulatorischen Funktionen durch diese Prozesse gesteuert (26, 28-30, 38, 76-84). Im Folgenden wird deshalb zunächst auf das Tumormilieu und die möglichen metabolischen Wege in Tumorzellen eingegangen. Dabei werden die möglichen Rollen von p53 im Tumormetabolismus erläutert.

1.2 Das Mikromilieu des Tumors

Tumorzellen sind entartete Zellen, die nicht mehr die Fähigkeit zur Kontaktinhibition besitzen, und folglich die Integrität des umgrenzenden Gewebes durch Invasion zerstören (85-89). Darüber hinaus entwickeln die betroffenen Zellen die Fähigkeit, unter erschwerten Bedingungen, z.B. Sauerstoff- und Nährstoffmangel, zu überleben, indem sie sich z.B. metabolisch an diese erschwerten Bedingungen anpassen oder eine eigene Blutversorgung initiieren (Angiogenese (90-94)).

1.2.1 Der Sauerstoffmangel: die Hypoxie

Als Hypoxie wird eine Umweltbedingung bezeichnet, in der ein Abfall des Sauerstoff-Partialdruckes unter den standard Sauerstoffpartialdruck zu verzeichnen ist (meist wird ein Wert von $pO_2 \leq 7$ mmHg angenommen (60)). Tumore können stark hypoxisch werden, da es zu einer massiven Ausbreitung distal des nächsten Blutgefäßes kommt. So weisen Tumore oft größere Bereiche auf, in denen sehr geringe Sauerstoffkonzentrationen herrschen (95, 96). Im tumorösen Gewebe ist die Menge an verbrauchten Sauerstoff größer als die Menge, die durch Blutgefäße in das Gewebe transportiert wird (97). So wurde bei verschiedenen Tumoren oft ein pO_2 von weniger als 10 mmHg (=Torr) gemessen (60, 98) (1% Sauerstoff entspricht dabei einem Sauerstoffpartialdruck von 7,6 mmHg; in der Luft beträgt der Sauerstoffgehalt 20,95%, folglich 159,21 mmHg). Bestens untersucht sind die Zervixkarzinome, bei denen einen pO_2 von 10-16 mmHg gemessen wurde, während im normalen Gewebe Werte um 40 mmHg üblich sind (99). Dies führt sowohl räumlich als auch zeitlich zu starken Schwankungen in der Sauerstoffversorgung im Tumorgewebe, so dass es zu einem Sauerstoffgradienten innerhalb des Tumors kommt (**Abbildung: 1-2**).

Tumorhypoxie kann antiproliferative Effekte hervorrufen; so können die Zellproliferation eingeschränkt und die Apoptose induziert werden. Andererseits entstehen durch diese Sauerstoff-Selektion auch Klone, die durch Adaptation an lebensfeindliche Bedingungen zu einem aggressiven, Apoptose- und Therapie-resistenteren Phänotyp mutieren (99). Das hypoxische Umfeld induziert ebenso adaptive Veränderungen im Metabolismus der

betroffenen Zellen (z.B. auf transkriptionaler und/oder translationaler Ebene), dies wiederum kann zu noch stärkeren Alterationen führen (96, 100).

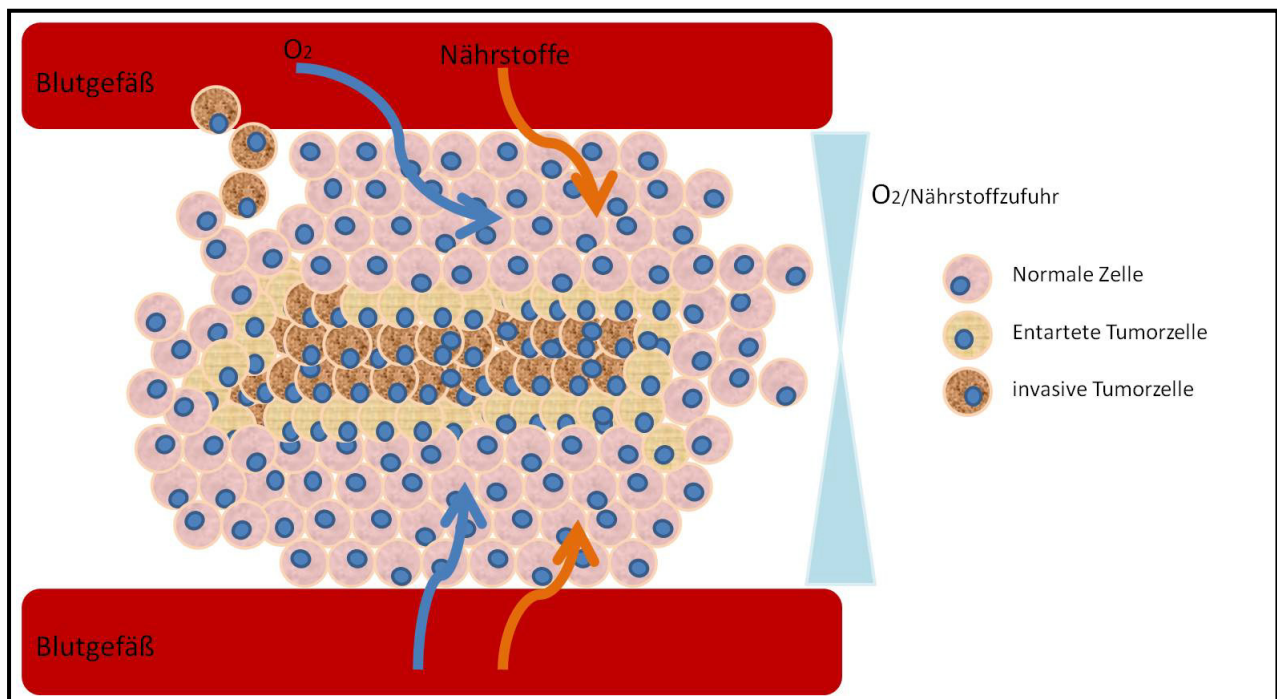


Abbildung: 1-2: Sauerstoff- und Nährstoffgradienten im Tumorgewebe

Tumorzellen werden über die Blutgefäße mit Nährstoffe und Sauerstoff unterschiedlich versorgt: Im Inneren des Tumorgebildes herrschen sauerstoffarme und hypoglykämische Bedingungen, während die äußeren Bereiche genügend versorgt werden.

Unter diesen Bedingungen aktivieren Tumorzellen u.a. den Hypoxie-abhängigen Transkriptionsfaktor, HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*). HIF-1 reguliert die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff, indem er für ein Gleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und -versorgung sorgt. Er besteht aus den zwei Untereinheiten α und β . Unter Normoxie wird die α -Untereinheit an zwei Prolyl-Resten hydroxyliert. Diese spezifische Hydroxylierung bewirkt die Erkennung und Bindung des von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-Proteins (pVHL). Diese Bindung ermöglicht die Anlagerung von Ubiquitin-Einheiten an HIF-1 α und markiert das Protein schließlich für den Abbau durch das Proteasom. Herrschen Sauerstoffmangelbedingungen, so wird die Hydroxylierung von HIF-1 α gehemmt, und HIF-1 α kann in den Zellkern eintreten. Dort komplexiert er mit der β -Untereinheit und dem Faktor p300/CPB (101). Dieser Komplex bindet an *Hypoxia-Responsive Elements* (HRE) auf der DNA und aktiviert das Ablesen von Zielgenen, die zur Anpassung der Zelle an eine mangelnde Sauerstoffversorgung erforderlich sind, wie z.B. Gene, die für metabolische Adaptation (81, 100, 102, 103) und Angiogenese sorgen (101, 104-106).

Hypoxie kann Einfluss auf die Stabilität von p53 nehmen: Sauerstoffmangel induziert in manchen Paradigmen eine p53-Akkumulierung durch negative Regulierung von MDM2. In der frühen Phase der Hypoxie hemmt p53 die HIF-1 α -Transaktivitätsfähigkeit. Diese Hemmung erfolgt über die Konkurrenz um die Bindung an der CH1-Domäne des Transkriptionsfaktors p300 (28).

1.2.2 Der Nährstoffmangel: die Hypoglykämie

1.2.2.1 AMPK

Nährstoffe können oft nicht durch das vielschichtige Tumorgewebe gelangen. Der Tumor bildet daher Mikrogefäße aus, die für den Nährstoff-Transport sorgen. Die Tumorzellen erschaffen sich dabei ihr eigenes Versorgungssystem. Dennoch kommen Mangelsignale bei der Tumorzelle an, die weitergeleitet werden und weitreichende Konsequenzen auf der molekularen Ebene haben. Zelluläre Energie-Sensoren leiten diese Signale intrazellulär weiter. Die AMP-aktivierte Protein Kinase (AMPK) ist ein solcher Sensor (107) und wird als Antwort auf Nährstoffmangel an Threonin-172 phosphoryliert (108). Durch diese Phosphorylierung werden ATP-verbrauchende Prozesse, wie die Synthese von Fettsäuren, Cholesterol und Proteinen gehemmt, während metabolische Wege, die zur katabolischen ATP-Freisetzung dienen, wie die Fettsäuren-Oxidierung, gefördert werden (109, 110). Die aktivierte AMPK kann sowohl als Verstärker wie auch als Hemmer der Apoptose wirken, je nach Energie-Stress in der Zelle und An- bzw. Abwesenheit bestimmter Tumorsuppressor-Gene. So ist die proapoptotische Wirkung der aktivierten AMPK mit der Aktivierung von Stress-Kinasen und Caspase-3 (111, 112) assoziiert. Die AMPK-Aktivierung führt zu mehreren Reaktionen in der Zelle. Unter Mangelbedingungen wird die AMP-Kinase durch ein hohes AMP (Adenosin Monophosphat)/ATP (Adenosin Triphosphat)-Verhältnis aktiviert. AMPK phosphoryliert und aktiviert p53 über einen noch unbekanntem Weg (27, 80, 113). Okoshi et al. (80) fanden, dass Hypoglykämie zu einer Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit α der AMP-aktivierten Protein-Kinase (AMPK α) führte und dies mit einer signifikanten Zunahme von p53 korrelierte (80). AMPK wird über Nährstoffmangel aktiviert und leitet das Signal an p53 weiter, damit die Zelle Energie einsparen kann, z.B. durch einen Zellzyklusarrest. Die Replikation ist ein sehr stark Energie-verbrauchender Prozess, der nur dann vollzogen werden kann, wenn die Zelle ausreichende metabolische Ressourcen hat. Es müssen folglich genügend Nährstoffe vorhanden sein, bevor die Zelle in die G1/S-Phase eintritt. Dieser *Checkpoint* wird durch die AMPK reguliert und findet stets statt, auch wenn genügend Nährstoffe zur Verfügung stehen. Dabei induziert AMPK eine p53-Ser15-Phosphorylierung, die für den Zellzyklusarrest benötigt wird (114). Sobald die Nährstoffverfügbarkeit über AMPK überprüft wurde, kann die Zelle mit dem Zellzyklus

fortfahren. Bei Nährstoffdepletion wird der Zellzyklus arretiert, bis wieder genügend Nährstoffe zur Verfügung stehen.

1.2.2.2 Akt

Eine erhöhte bzw. konstitutive Aktivität der Serin/Threonin-Kinase Akt wird in vielen malignen Zellen beobachtet (115-119). Akt stimuliert den Glukose-Verbrauch in transformierten Zellen, ohne die Rate der oxidativen Phosphorylierung zu beeinflussen. Elstrom et al. (120) stellten die Hypothese auf, dass die Aktivierung des Onkogens Akt ausreichend ist, um von der aeroben Atmung auf die aerobe Glykolyse umzuschalten. p53 kann Akt regulieren, da es PTEN induzieren kann, das dann wiederum die PI3K, und somit auch Akt hemmt (121). p53 bewirkt auch einen Caspasen-vermittelten Abbau von Akt (122). Akt kann wiederum p53 inhibieren, indem es die MDM2-Ubiquitinierung verstärken kann (123, 124). Unter Hungerbedingungen wird auch die Serin-Threonin Kinase 11 (LKB1) über abfallende Konzentrationen von Adenosintriphosphat und Aminosäuren in der Zelle aktiviert (125). LKB1 aktiviert AMPK, die wiederum den *Tuberus sclerosis complex 2* (TSC2) phosphoryliert und *mammalian target of rapamycin* (mTOR) über *Ras homolog enriched in brain* (Rheb)-Aktivierung hemmt. Eine Aktivierung von mTOR führt zur Phosphorylierung von 4E-BP1 (*Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein 1*) und S6K1 (Protein S6 Kinase 1), zwei Schlüsselproteinen, die die Zellproliferation kontrollieren und das Zellwachstum (4E-BP1), oder die Translation regulieren (S6K1) (77, 121, 126) (**Abbildung 1-3**).

Allgemein lässt sich sagen, dass bei Nährstoffmangel die Mehrheit der Stoffwechselprozesse gedrosselt wird. Tumorzellen besitzen jedoch meist die Fähigkeit, stärkere Hungersituationen zu ertragen und diese zu überleben. So können sie z.B. schneller ihren Stoffwechsel umschalten (Warburg-Effekt **1.3.2**) und haben eine bessere Zufuhr an Nährstoffen durch erhöhte Angiogenese.

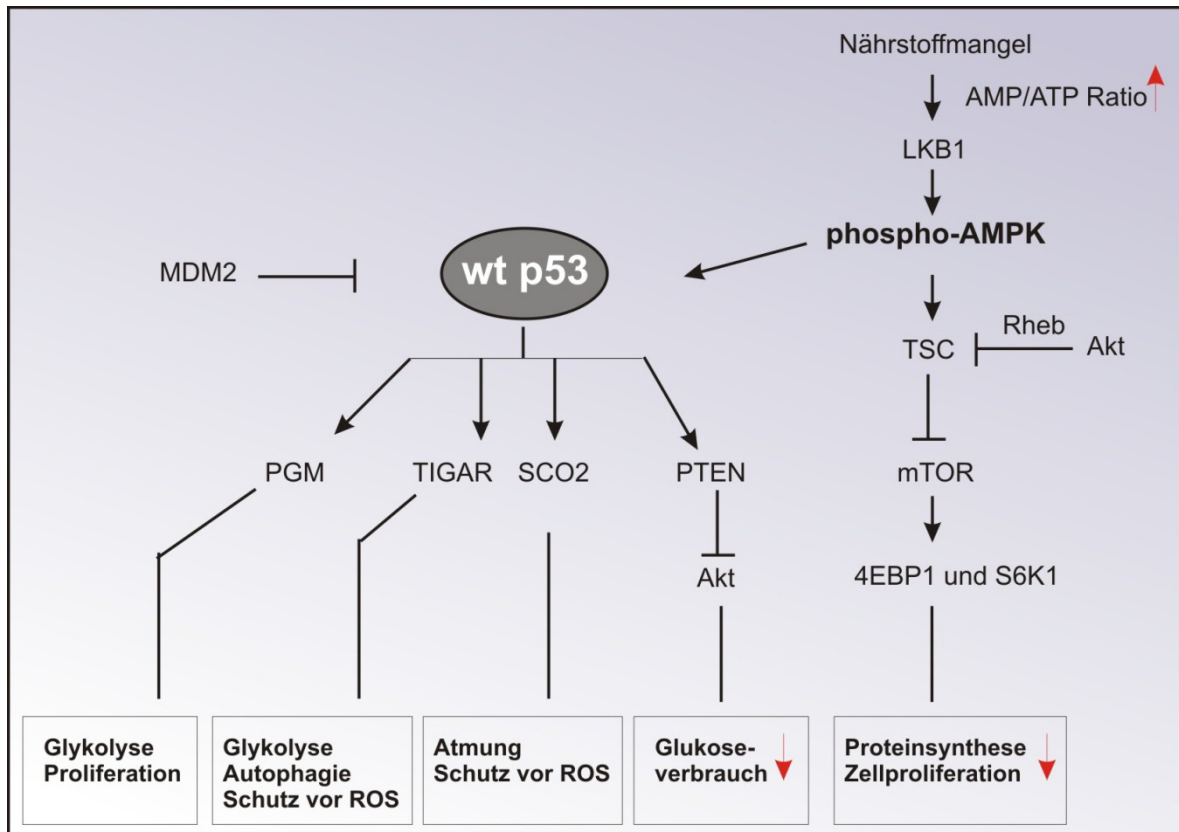


Abbildung 1-3: p53 im Metabolismus

Die AMP-aktivierte Protein Kinase (AMPK) wird als Antwort auf Nährstoffmangel an Threonin-172 phosphoryliert. Unter Hungerbedingungen wird die AMP-Kinase durch ein hohes AMP/ATP-Verhältnis aktiviert. AMPK phosphoryliert und aktiviert einerseits eine über p53 (1) und andererseits eine über mTOR (2) gesteuerte Signalkaskade.

- 1) p53 aktiviert PTEN, was zu einer Hemmung der PI3K führt. Akt kann nicht mehr phosphoryliert werden, es kommt zu einer Hemmung der Glykolysereaktionen und somit zu einem geringeren Glukoseverbrauch. Zugleich steuert p53 die Regulierung von metabolischen Zielgenen (SCO2, PGM und TIGAR).
- 2) Unter Hungerbedingungen (bei abfallenden Konzentrationen von Adenosintriphosphat und Aminosäuren in der Zelle) wird die Serin Threonin Kinase 11 (LKB1) aktiviert. LKB1 phosphoryliert und aktiviert wiederum AMPK, diese phosphoryliert TSC2 und hemmt über eine Rheb-Aktivierung mTOR. Über mTOR wird das Zellwachstum mit der Verfügbarkeit von Energie und Nahrungsstoffen über 4EBP1 und S6K1 koordiniert.

4EBP1: Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein 1; **Akt:** Proteinkinase B; **AMPK:** AMP-Kinase; **mTOR:** mammalian target of rapamycin; **PGM:** Phosphoglycerate Mutase; **PTEN:** Phosphatase and tensin homolog on chromosome ten; **Rheb:** ras-homolog enriched in brain; **S6K1:** p70 ribosomal protein S6 kinase 1; **SCO2:** Synthesis of Cytochrome c; **TIGAR:** Tp53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator; **TSC2:** Tuberous sclerosis complex 2

1.3 Metabolismus in der Tumorzelle

1.3.1 Der Pasteur-Effekt

Louis Pasteur beobachtete 1861, dass Hefen unter anaeroben Bedingungen mehr Glukose verbrauchen als unter aeroben Bedingungen und dass der Glukose-Influx durch Sauerstoff reduziert wird. Der Begriff Pasteur-Effekt wurde seitdem auch auf eukaryontische Zellen erweitert (127, 128). Hierbei wird Glukose, sofern der Zelle Sauerstoff zur Verfügung steht,

nach der Glykolyse in den Citrat-Zyklus und anschließend in die Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) eingeschleust. Herrschen sauerstoffarme Bedingungen, stellen Zellen ihren Stoffwechsel auf Glykolyse um, wobei als Endprodukt Laktat entsteht. Die Energiegewinnung ist viel geringer als in der oxidativen Phosphorylierung. So werden bei der anaeroben Glykolyse 2 Moleküle ATP je Glukosemolekül erzielt, im Vergleich zu 38 ATP bei vollständig aerobem Abbau von Glukose.

Tumorzellen können den Pasteur-Effekt dadurch umgehen, dass aerobe Abbauwege trotz des Vorhandenseins von Sauerstoff aufgrund einer Fehlregulation ausgeschaltet sind (Warburg-Effekt, (129, 130)). So stellen Tumorzellen bei ausreichenden Glukose- und Sauerstoffbedingungen zu 95% auf den (aeroben) Glykolyse-Stoffwechsel um. Der für die Energiegewinnung wesentlich effizientere Weg der oxidativen Phosphorylierung erfolgt in Tumorzellen nur in 5% der Fälle (131). Tumorzellen sind somit für ihre Energiegewinnung von der Anwesenheit von Sauerstoff weitestgehend unabhängig, im Gegensatz zu normalen Zellen, bei denen eine länger andauernde Hypoxie zu einem ATP-Entzug und folglich zum Zelltod führt.

1.3.2 Der Warburg-Effekt oder die aerobe Glykolyse

Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckte Otto Warburg, dass schnell proliferierende Zellen im Tumor mehr Glukose verbrauchen als normale Zellen, und auch mehr Laktat ausscheiden, anstatt in die oxidative Phosphorylierung zu investieren (**Abbildung 1-4**). Dieses Phänomen wurde in den nachfolgenden Jahren als Warburg-Effekt bekannt (129, 130). Diese Beobachtungen stellten natürlich ein Paradoxon dar: Wieso entscheiden sich proliferierende Zellen für einen Metabolismus, der scheinbar ineffizienter ist als die oxidative Phosphorylierung? Trotz des geringeren Gewinns an ATP in der Glykolyse wird dieser Weg eher eingeschlagen. Näher betrachtet ergeben sich hierfür einige Gründe für die Zelle: So ermöglicht dieser Metabolismus bei starkem glykolytischen Influx eine höhere Energie-Ausbeute als bei der oxidativen Phosphorylierung. Dies kann man dadurch erklären, dass bei der oxidativen Phosphorylierung der Import von Pyruvat in die mitochondriale Matrix, und somit auch die Aktivität von Enzymen wie der Pyruvat-Dehydrogenase, erfordert wird, deren Aktivität durch Phosphorylierung, CoA und das Verhältnis NAD^+/NADH reguliert wird. Diese Aktivität hängt wiederum vom glykolytischen Influx ab. Dieser Influx kann dann die V_{max} der Pyruvat-Dehydrogenase während der Zellproliferation übertreffen, so dass die Zelle eine Möglichkeit haben muss, eine zu starke Akkumulierung von Pyruvat zu verhindern (132). Dies wird durch die Laktat-Dehydrogenase A (LDHA) ermöglicht, die Pyruvat schnell abbauen und als Nebeneffekt NAD^+ regenerieren kann. Gleichfalls versorgt die Glykolyse die Zelle mit einigen Intermediat-Produkten, die bei vielen biosynthetischen Wegen benötigt werden (Ribose für den Aufbau von Nukleotiden, Glycerat und Citrat für die Lipidsynthese, etc.).

Über den oxidativen Pentosephosphat-Weg entstehen zusätzlich NADPH als Energiequelle für anti-oxidative Prozesse. Ein weiterer Vorteil erhöhter Glykolyse ist, dass Zellen eine Feinabstimmung in der Kontrolle von biosynthetischen Wegen ermöglicht wird, welche Intermediate aus dem Glukose-Stoffwechsel benötigen (133). Desweiteren ermöglicht eine erhöhte Glykolyse die Sicherung des Überlebens von Zellen unter Sauerstoffbedingungen, die normalerweise toxisch oder lethal für Zellen wären, die auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen sind. Zudem generieren Tumorzellen Laktat und Säuren als Ergebnisse der aeroben Glykolyse. Unter diesen sauren Bedingungen wird eine Tumorinvasion (134-136) oder eine Suppression von Immunoeffektoren (137) begünstigt. Gleichzeitig entwickeln die Zellen Resistenz gegenüber säureinduziertem Zelltod, da die Laktatbildung und die Kohlensäure-Produktion durch den Pentosephosphat-Weg zu einem pH-Abfall in der näheren Umgebung führen. Diese Ansäuerung führt bei gesunden Zellen zu p53-induziertem Zelltod (31). Auch wird HIF-1 α unter diesen Bedingungen hochreguliert und verstärkt so die Tumorinvasivität (z.B. über VEGF) (138, 139).

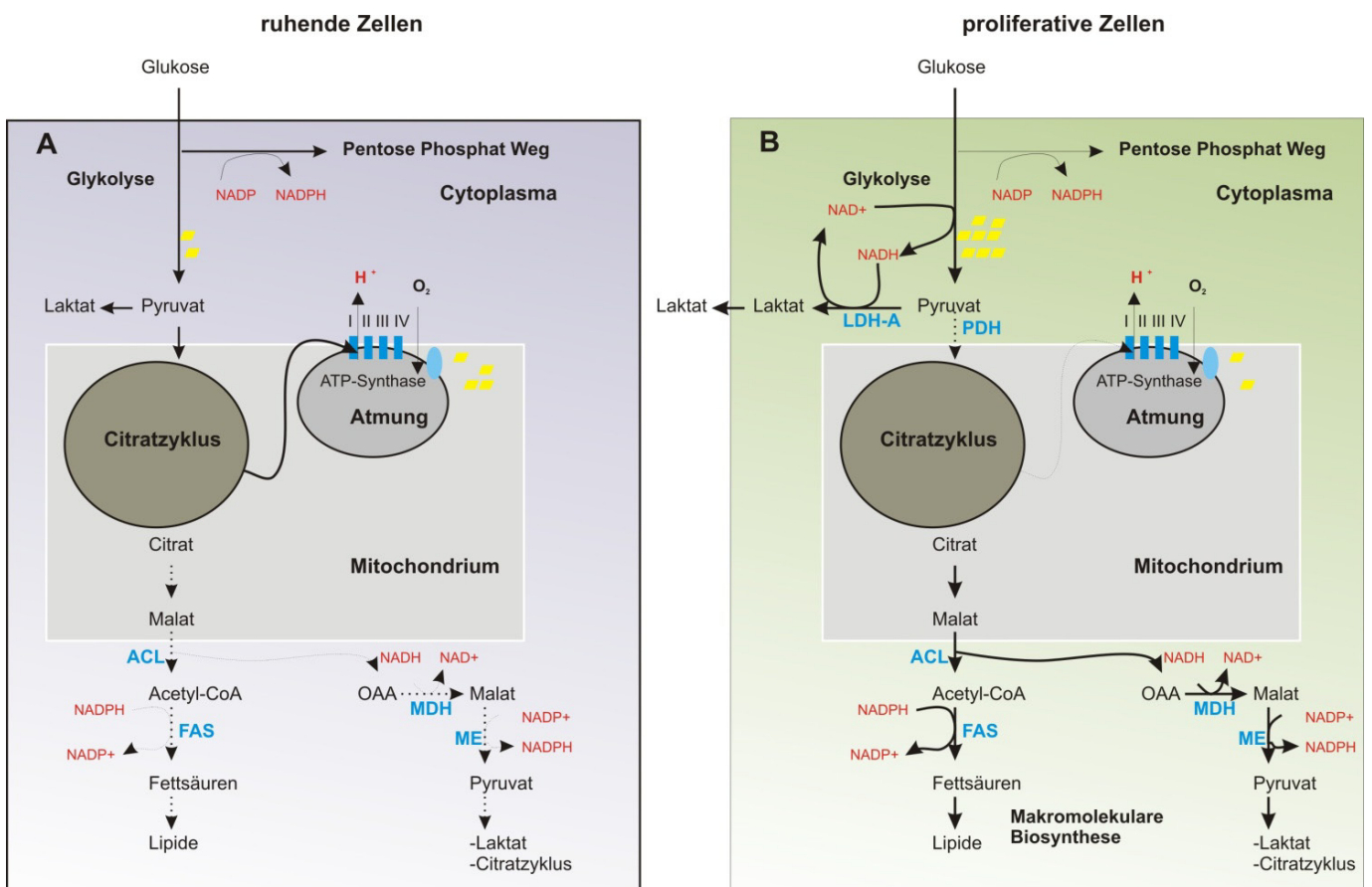


Abbildung 1-4: Metabolismus in normalen und proliferierenden Zellen

Zellen im Ruhestand (A) beziehen ihre Energie über die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung. Auch andere Substrate als Glukose können oxidiert werden (Aminosäuren, Fettsäuren), jedoch stammt das meiste ATP (gelbe Trapeze) aus der oxidativen Phosphorylierung.

In proliferierende Zellen (**B**) ist der Glukose-Influx verstärkt, es wird verstärkt ATP über die Glykolyse gebildet, was wiederum das cytoplasmatische Verhältnis NAD^+/NADH reduziert. Das meiste Pyruvat wird in Laktat umgewandelt, um NAD^+ aus NADH zu gewinnen. Geringere Mengen an Pyruvat werden über die Pyruvat-Dehydrogenase in Acetyl-CoA konvertiert und gehen in den Citratzyklus, wo Pyruvat zu verschiedenen Intermediärprodukten für die makromolekulare Biosynthese umgewandelt wird.

Auch andere Stoffwechselwege (Lipidsynthese, Pyruvatsynthese) werden in proliferierende Zellen verstärkt.

ACL: ATP Citrat Lyase; **FAS:** *Fatty Acid Synthase*; **LDH-A:** Laktat-Dehydrogenase A; **ME:** Malat-Enzym; **MDH:** Malat Dehydrogenase; **OAA:** Oxalacetat; **PDH:** Pyruvat Dehydrogenase

Ein Zusammenhang zwischen p53 und der Regulierung der aeroben Glykolyse wurde 2006 entdeckt: Über Microarray- und ChIP-Analysen identifizierten Jen et al. (140) und Bensaad et al. (33) *Tp53 Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator* (TIGAR) als ein p53-induziertes Gen. Das TIGAR-Gen ist auf Chromosom 12p13-3 lokalisiert und enthält sechs potentielle kodierende Exons mit zwei möglichen p53-Bindesequenzen. Bei der Untersuchung der DNA-Sequenz von TIGAR stellte sich heraus, dass diese eine hohe Similarität mit der DNA-Sequenz der Phosphoglycerat-Mutase-Familie (PGM), v.a. in den Sequenzen, die für die katalytischen Regionen kodieren, aufweist. Die größte Übereinstimmung fanden Bensaad et al. (33) in der Bisphosphatase-Domäne der 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2). Die DNA-Sequenz-Similarität von TIGAR und PFK-2/FBPase-2 beschränkt sich auf die Bisphosphatase-Domäne, und hier auch nur auf die katalytischen Zentren (katalytische Triade und die RHG-Sequenz (Arginin-Histidin-Glycin)) (33). PFK-2/FBPase-2 ist ein bifunktionales Enzym: Es weist sowohl Kinase- als auch Bisphosphatase-Aktivität auf. PFK-2/FBPase-2 reguliert die Synthese (über PFK-2) und den Abbau (über FBPase-2) von Fruktose-2,6-Bisphosphat (Fru-2,6-BP). Letzteres kann die 6-Phosphofrukto-1-Kinase (PFK-1) allosterisch induzieren und somit auch die Glykolyse aktivieren. Fru-2,6-BP wird aus Fruktose-6-Phosphat über die Katalyse der Phosphofruktokinase-2 gebildet. In hohen physiologischen Konzentrationen ($> 0,1 \mu\text{M}$) ist die Fru-2,6-BP ein allosterischer Aktivator der PFK-1 (141). Zusätzlich hebt Fru-2,6-BP die Wirkung der allosterischen Hemmer ATP und Citrat auf. Dadurch wird die Phosphorylierung von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-1,6-Bisphosphat (Fru-1,6-BP) aktiviert. Durch diese Aktivierung wird die Glykolyse stimuliert. Die Glukoneogenese wiederum wird von hohen Fru-2,6-BP-Konzentrationen unterdrückt, indem die Fruktose-1,6-Bisphosphatase allosterisch gehemmt wird (**Abbildung 1-5**).

Bensaad et al. (33, 35) zeigten, dass in TIGAR-überexprimierenden Zellen Apoptose weniger auftrat, und dass dieses Ergebnis mit einer Verminderung der glykolytischen Rate und einem verstärkten Schutz vor ROS korrelierte. Sie schlossen auf eine TIGAR-vermittelte Induktion alternativer Energie-Gewinnung über den Pentosephosphat-Weg. TIGAR senkt die Fruktose-2,6-Bisphosphat-Konzentration in der Zelle, was zu Inhibierung der Glykolyse, Aktivierung des PPP und Schutz vor ROS-vermittelter Apoptose führt. TIGAR scheint schnell unter niedrigen Stressbedingungen aktiviert zu werden, so dass es zu den Zielgenen von p53

gezählt werden kann, die das Überleben gegenüber milden oder transienten Stresssituationen erlauben (33, 36).

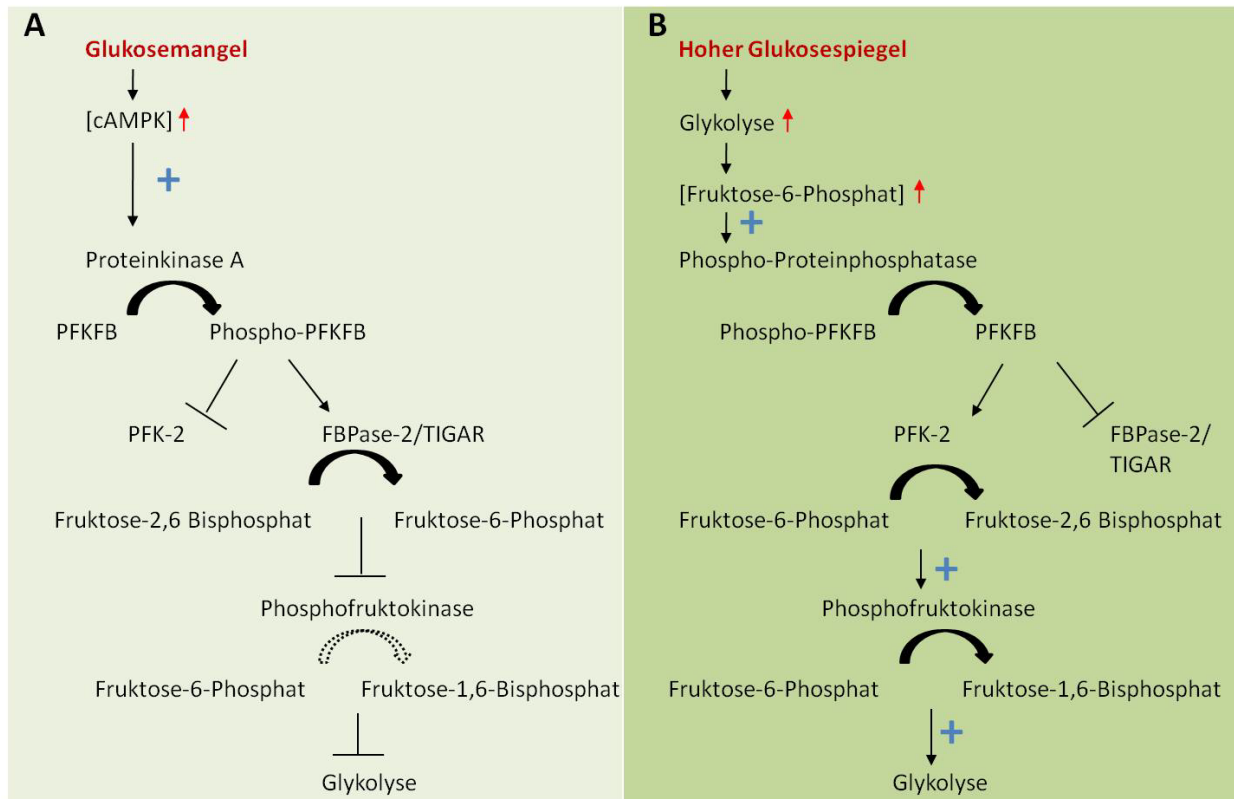


Abbildung 1-5: FBPase-2-Regulierung

A: Herrscht Glukosemangel, so steigt die cAMPK-Konzentration Glukagon-induziert an. Dadurch wird Proteinkinase A aktiviert, sie phosphoryliert die Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-Bisphosphatase. Durch die Phosphorylierung dieses bifunktionalen Enzyms wird die Phosphofruktokinase-2-Funktion inaktiviert und die der Fruktose-2,6-Bisphosphatase (FBPase-2) aktiviert. FBPase-2 katalysiert die Umwandlung von Fruktose-2,6-Bisphosphat zu Fruktose-6-Phosphat und anorganischen Phosphor. Durch hohe Konzentrationen an Fruktose-6-Phosphat wird die Phosphofruktokinase und somit die Glykolyse gehemmt.

B: Sind Nährstoffe vorhanden, so kann über die Glykolyse verstärkt Fruktose-6-Phosphat gebildet werden, welches wiederum als Aktivator der Phospho-Proteinphosphatase wirkt. Diese dephosphoryliert die PFKFB, aktiviert dadurch die PFK-2 und inaktiviert die FBPase-2. Fruktose-6-Phosphat wird zu Fruktose-2,6-Bisphosphat umgewandelt, das über die Umwandlung über die Phosphofruktokinase zu Fruktose-1,6-Bisphosphat die Glykolyse verstärkt. TIGAR weist Similaritäten mit der FBPase-2 Domäne der PFKFB auf. Durch den Abbau von Fruktose 2,6-Bisphosphat kann TIGAR ebenfalls die Glykolyse hemmen.

cAMPK: cyclisches Adenosinmonophosphat; **FBPase-2:** Fruktose-2,6-Bisphosphatase; **PFKFB:** Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-Bisphosphatase; **PFK-2:** Phosphofruktokinase-2; **TIGAR:** *Tp53 Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*

1.3.3 Der Pentosephosphat-Weg in Tumorzellen

1.3.3.1 Allgemein

Tumorzellen haben oft einen stark aktivierten Pentosephosphat-Weg. Man unterscheidet zwischen einem oxidativen und einem nicht-oxidativen Zweig des PPP. Im oxidativen Zweig wird Glukose-6-Phosphat (G6P) über die Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase und die 6-

Phosphoglukonat-Dehydrogenase zu Nicotinamidadenin-Dinukleotide (NADPH) und Ribulose-5-Phosphat abgebaut. Über den nicht-oxidativen Zweig wird Ribulose-6-Phosphat zunächst in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat umgewandelt, die wieder in die Glykolyse eintreten können (**Abbildung 1-6**). Der PPP dient folglich als alternativer Weg, um Glukose abzubauen und ist der effizienteste metabolische Weg, um Energiepotentiale in Form von NADPH zu synthetisieren. NADPH wird für reduktive biosynthetische Reaktionen und für den ROS-Abbau gebraucht. Eine hohe Konzentration an NADPH in der Zelle übernimmt somit eine Rolle in der Resistenz gegenüber Apoptose. Auch versorgt der PPP die Zelle mit Ribulose-5-Phosphat, das für die Synthese von Nukleotiden und Nucleinsäuren benötigt wird.

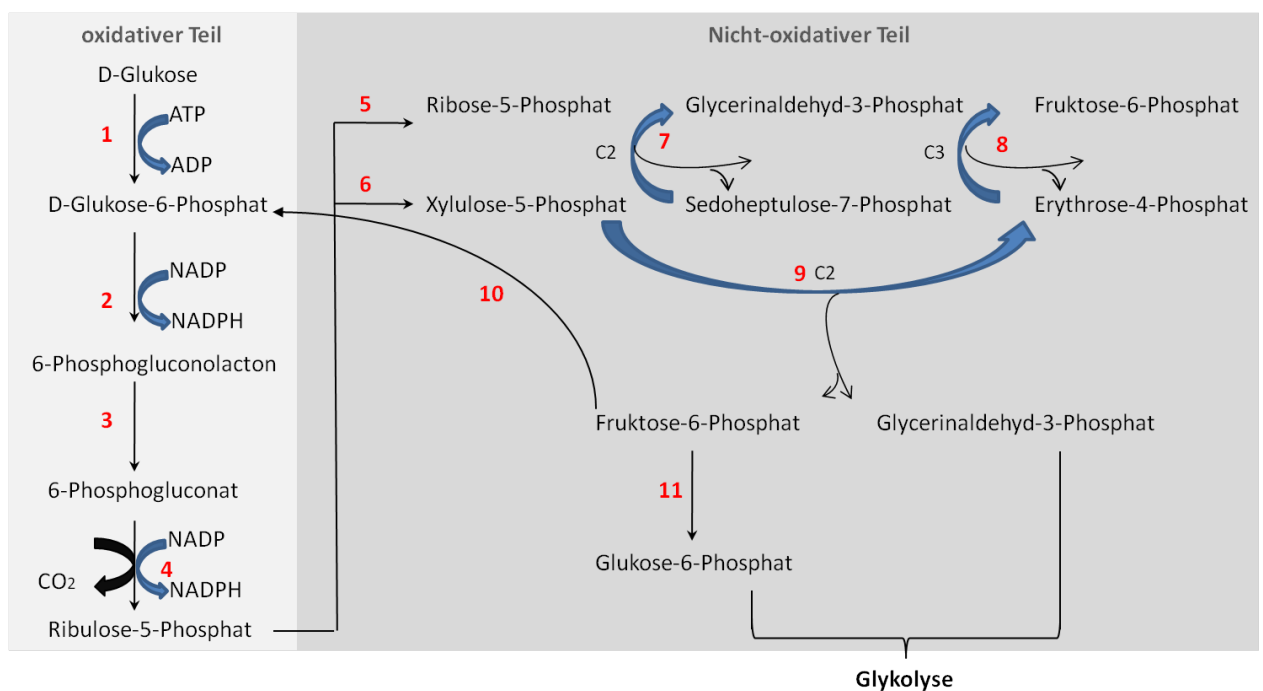
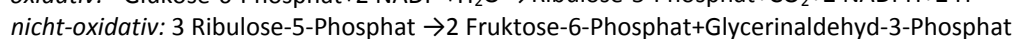
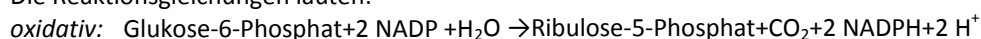


Abbildung 1-6: Der Pentosephosphat-Weg.

Im oxidativen Zweig des PPP wird Glukose sukzessiv über die Hexokinase 2 (HK-2) (**1**), die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (**2**), die 6-Phosphogluconolactonase (**3**) und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (**4**) zu 2 NADPH und Ribulose-5-Phosphat abgebaut. Über den nicht-oxidativen Zweig wird Ribulose-5-Phosphat zunächst durch die Ribulosephosphat-3-Epimerase (**5**) in Ribose-5-Phosphat und durch die Ribose-5-Phosphat-Isomerase (**6**) in Xylulose-5-Phosphat umgewandelt. Die Transketolase (**7**) überträgt dann eine C2-Einheit aus Xylulose-5-Phosphat auf Ribose-5-Phosphat, so dass Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Sedoheptulose-7-Phosphat entstehen. Anschließend wird von einer Transaldolase (**8**) eine C3-Einheit übertragen, wobei Glycerinaldehyd-3-Phosphat in Fruktose-6-Phosphat und Sedoheptulose-7-Phosphat in Erythrose-4-Phosphat umgewandelt werden. Schließlich transferiert eine Ketolase (**9**) zwei Kohlenstoffeinheiten von einem weiteren Molekül Xylulose-5-Phosphat auf Erythrose-4-Phosphat, so dass je ein weiteres Molekül Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat entstehen. Fruktose-6-Phosphat kann anschließend durch Glukose-6-Phosphat-Isomerase (**10** und **11**) wieder in Glukose-6-Phosphat umgewandelt werden, das anschließend in den oxidativen Teil des PPP oder in die Glykolyse eingeschleust werden kann.

Die Reaktionsgleichungen lauten:



Ein wichtiger Schritt des nicht-oxidativen PPP erfolgt über die Transketolase (TKT): Dieses Enzym überträgt eine C2-Einheit aus Xylulose-5-Phosphat auf Ribulose-5-Phosphat, so dass Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Sedoheptulose-7-Phosphat entstehen. Schließlich transferiert die Ketolase zwei Kohlenstoffeinheiten aus einem weiteren Molekül Xylulose-5-Phosphat auf Erythrose-4-Phosphat. Wie schon oben erwähnt, aktiviert p53 den PPP über TIGAR. 2009 konnte durch weitere Funktionsuntersuchungen von TIGAR gezeigt werden, dass TIGAR über den PPP die Menge an ROS in der Zelle zu reduzieren vermag, und, da ROS auch Autophagie einleiten können, wurde die Zusammenwirkung TIGAR/Stress/Autophagie untersucht (35). Dabei stellte sich heraus, dass TIGAR über die Verminderung von ROS, die durch Nährstoffmangel oder metabolischen Stress entstehen, Autophagie hemmen kann. Die Rolle der Autophagie in der Förderung des Zellüberlebens ist noch nicht vollständig verstanden. So konnte einerseits nachgewiesen werden, dass in einer verlängerten Hypoxie-Phase Autophagie das Überleben der betroffenen Zellen unterstützen kann, in dem es z.B. zu der Beseitigung defekter Mitochondrien kommt (142). Die mitochondriale Autophagie kann eine adaptive metabolische Antwort auf Stressbedingungen sein, die benötigt wird, um erhöhte ROS-Konzentrationen in der Zelle und somit auch den ROS-induzierten Zelltod zu verhindern. Andererseits konnten Crighton et al. (22, 23) zeigen, dass in bestimmten Systemen Autophagie dazu beiträgt, die apoptotische Antwort zu verstärken.

1.3.3.2 Die Rolle der TKTL1 im Tumormetabolismus

Die Überexpression eines TKT-Isoenzym, TKTL1 (*Transketolase-Like 1*) (143), in Tumorzellen ist häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert. TKT selbst und ein weiteres Isoenzym, TKTL2, werden in Tumorgewebe nicht überexprimiert (143). Die Sequenzen zwischen TKTL1 und TKT stimmen auf DNA-Ebene zu 66% und auf Proteinebene zu 63% übereinstimmen (144). Eine mögliche Erklärung für die selektive Überexpression dieser einen TKT-Isoform könnte die Lokalisation des TKTL1-Gens sein: Es befindet sich, anders als die TKT- und TKTL2-Gene (die sich auf Chromosome 3 bzw. 4 befinden), in der Region Xq28 (145), die zu den *common malignancy-associated regions of transcriptional activation* zählen, einer Region, die in vielen Malignomen aktiviert ist und Ort vieler Gen-Amplifikationen ist. TKTL1 ist eine Transketolase mit enzymatischen Eigenschaften, die sich etwas von denen der normalen TKT unterscheiden, und die auf das Fehlen eines Exons (Exon 3) zurückgeführt werden. Wikner et al. konnten in Hefen nachweisen, dass in Zellen, in denen eine Mutation in His103 im TKT-Gen auftrat, eine veränderte Transketolase-Aktivität mit einer Ein-Substrat-Nutzung zu verzeichnen war (146). Coy et al. untersuchten daraufhin in Tumorzellen das His103-Hefehomolog und konnten zeigen, dass durch die Deletion des Exons 3 ebenfalls eine Veränderung der Substratspezifität der TKTL1 auftritt: Xylulose-5-Phosphat wird als einziges

Substrat zu Erythrose-4-Phosphat und (wahrscheinlich) Glycerinaldehyd-3-Phosphat umgesetzt (144). So wird angenommen, dass die spezifischen Substratstellen und die Reaktionsvorgehensweise des Enzyms verändert sein könnten, was Veränderungen im Metabolismus nach sich zieht: Coy et al. (144) und Langbein et al. (143) konnten veranschaulichen, dass die TKTL1 in denjenigen Geweben aktiv ist, in denen bereits Warburg die Vergärung von Glukose zu Laktat in Anwesenheit von Sauerstoff beobachten konnte (129). Langbein et al. (143) stellten die Hypothese auf, dass eine TKTL1-Überexpression in Tumoren zu einem verstärkten, sauerstoffunabhängigen Glukoseverbrauch und durch die Ansäuerung durch Laktat zu einer Zerstörung der Matrix führen könnte. Eine Inhibierung der TKTL1-Aktivität könnte das Tumorwachstum inhibieren, und TKTL1 für neue Therapien interessant machen. Im Einklang hiermit konnten Xu et al. (147) nachweisen, dass eine Suppression der TKTL1-Expression zu einem reduzierten Glukose-Verbrauch und einer verminderten Laktat-Produktion führt. Die Proliferation der TKTL1-supprimierten Zellen wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert. Dies ließ sich auch in tumortherapeutischen Ansätze demonstrieren: Durch den Einsatz von PPP-Inhibitoren, wie z.B. Oxythiamin, konnte die Zellproliferation stark reduziert werden (148), während die Stimulierung mit Thiamin das Tumorwachstum förderte (149). Auch sind TKTL1-supprimierte Zellen sensibler gegenüber ROS und Reagenzien, die oxidativen Stress induzieren (147), was zu dem Schluss führt, dass der PPP im Tumormetabolismus eine wichtige Rolle einnimmt. Völker et al. (150) untersuchten die TKTL1-Expression in Glioblastomen und anderen astrocytischen Tumoren der Grade II und III. Sie konnten zeigen, dass im Vergleich zu anderen Hirntumoren in Glioblastomen eine verstärkte TKTL1-Expression zu beobachten ist. Auch in vielen anderen Tumorarten wird TKTL1 überexprimiert (143, 151-155). Langbein et al. (143) konnten in einer Untersuchung mit einer großen Anzahl an Tumoren zeigen, dass die Mehrzahl der untersuchten Tumoren eine verstärkte TKTL1-Expression und 70% eine Akt-Aktivierung (Akt-Phosphorylierung) aufwiesen. Es liegen zurzeit noch keine Ergebnisse vor, die den p53-Status mit der TKTL1-Expression vergleichen. Es ist aber bekannt, dass p53 über TIGAR den PPP aktivieren kann. Es stellte sich hierbei die Fragen nach einer möglichen TIGAR-vermittelten Regulierung von Enzymen des PPP und somit der TKTL1. Einen weiteren Hinweis hierfür lieferte zunächst auch die Beobachtung, dass die TKT zwei p53-Bindesequenzen besitzt (145), wobei weder Wechselwirkung mit noch Induktion von TKT durch p53 bekannt ist. Dies führte zu der Hypothese, dass TKT oder/und TKTL1 direkt oder indirekt metabolische Zielgene von p53 sein könnten.

1.3.4 Die oxidative Phosphorylierung in Tumorzellen

Bei ausreichendem Nährstoff- und Sauerstoffangebot stellen Tumore vermehrt auf Glykolyse um (129, 130, 156). Nur eine geringe Menge an ATP wird durch oxidative Phosphorylierung

gewonnen (131). So scheinen Tumoren weitestgehend unabhängig von der Sauerstoffzufuhr zu sein. Einige Gründe wurden bereits in **1.3.2** erwähnt. Auch Mutationen, die die Atmungskette betreffen, werden als ein Grund für den Warburg-Effekt betrachtet. So ist bekannt, dass die Cytochrom c Oxidase (COX) häufig Mutationen aufweist (157-161): Die Expression der Cytochrom c Oxidase Untereinheit 3 ist z.B. in Kolonadenome und -Karzinome verringert, in Glioblastomen ist COX signifikant überexprimiert (162-164).

Luziakova et al. zeigten 1992, dass in Hepatomkarzinome eine verstärkte Transkription von vier nuklearen Genen stattfindet, die für mitochondriale Membranproteinen kodieren (die β -F1 Untereinheit und das N,N'-Dicyclohexyl-Carbodiimid-bindende Protein der ATP-Synthase, sowie die Untereinheit IV der Cytochrom c Oxidase und die ADP/ATP Translokase) (159). Es wurde vermutet, dass die Regulierung der Atmung (bzw. Hemmung der Atmung) hier eher translational als transkriptional erfolgt, da die betroffenen Tumorzellen trotz der hohen Transkriptionsrate dieser Gene 5-mal weniger Mitochondrien besaßen. Auch unterscheiden sich Mitochondrien in Tumorzellen von denen in nicht-entarteten Zellen sowohl in Aussehen als auch in Größe und Zahl. Hierbei wurden sowohl Abnahmen (165) als auch Zunahmen der Mitochondrienanzahl (166) beobachtet. In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass in einigen Tumoren ein Zusammenhang zwischen p53 und der Regulierung von mitochondrialen Proteinen eine Rolle im Warburg-Effekt spielen könnte. So wurden Zusammenhänge zwischen p53 und der enzymatischen Aktivität der COX-Untereinheiten I und II (167, 168) beschrieben: Okamura et al. konnten 1999 durch einen *mRNA-screen* zwei metabolische Gene identifizieren, die über p53 reguliert werden, darunter das Isozym 6 der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH6) und die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase (167), während Zhou in p53^{-/-}-Zellen eine Reduktion der Aktivität der mitochondrialen COX I beobachteten, wobei dieses Protein auf post-transkriptionaler Ebene über p53 reguliert wurde (168). Zudem wurde ein Zusammenhang von p53 mit der mitochondrialen 16S ribosomalen DNA (169) beschrieben, die u.a. für die mitochondrialen COX-III Transkripte kodiert.

1.3.4.1 SCO2

In Tumorzellen ist die mitochondriale Atmungsaktivität vermindert, was einher geht mit einem veränderten Expressionsniveau der COX-Komplex-Untereinheiten. Der genetische Mechanismus hierfür war bis vor Kurzem noch unbekannt (158, 168). Matoba et al. (39) konnten 2006 zeigen, dass p53 direkt in die Regulierung der mitochondrialen Atmung eingreifen kann. Sie erkannten, dass Sauerstoffverbrauch und p53-Status miteinander korrelieren. So verminderte sich der Sauerstoffverbrauch in Abwesenheit von p53 um fast 25% im Vergleich zu p53^{wt}-Kontrollzellen. Die ATP-Konzentration änderte sich nicht signifikant, dennoch wurde die Atmungskette supprimiert und die Glykolyse induziert.

Matoba konnten zudem mittels Schwimmtest zeigen, dass die Ausdauer von Mäusen, die eine Deletion von p53 trugen, viel geringer war als die von Mäusen, die p53^{wt} waren.

Mittels SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) wurde das hierfür verantwortliche Protein *Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2* (SCO2) ermittelt, das für den Einbau der mitochondrialen COX II Untereinheiten (MTCO2 Gene) im COX-Komplex zuständig ist. Dabei agiert SCO2 als ein Kupfer-Chaperon, das Kupfer zu der Cytochrom c-Oxidase-Untereinheit COX II transportiert. Mutationen, die SCO2 inaktivieren, führen beim Menschen zu einer Kardioenzephalomyopathie, die durch den Ausfall der Atmung hervorgerufen wird (170-173). In p53^{wt-defizient}-Kolonkarzinom-Zellen (HCT116) wurde SCO2 vermindert induziert, wodurch die Atmungskette inhibiert wurde. Diese Zellen waren verstärkt auf die Glykolyse angewiesen. In SCO2-rescue-Experimenten in p53^{wt-defizient}-Zellen konnte die aerobe Atmung wieder hergestellt werden. Somit verbindet SCO2 p53 mit der mitochondrialen Atmung und ermöglicht Einblicke, inwiefern p53-Mutationen in den Warburg-Effekt verwickelt sein könnten. SCO2 hat jedoch noch weitere Funktionen: So konnten Sung et al. 2010 zeigen, dass ein vollständiges ausschalten von SCO2 durch homologe Rekombination in HCT116-Zellen die oxidative Phosphorylierung vollständig inaktivieren konnte und zu einer verstärkten Glykolyseaktivität führte. Durch die defektive oxidative Phosphorylierung wurden verstärkt ROS produziert und DNA-Schäden induziert. Zusätzlich konnten Rückschlüsse auf eine Sauerstoff-Toxizität in SCO2-defizienten Zellen gezogen werden: In Abwesenheit von Sauerstoff zeigten SCO2^{-/-}-Zellen eine bis zu 10x schnellere Proliferation als unter Normoxie, was auf verstärkte ROS-Konzentrationen unter Anwesenheit von Sauerstoff in SCO2-defizienten Zellen zurückzuführen war (174). Auch wird eine Rolle von SCO2 in der direkten Regulierung von ROS über eine Thioredoxin-ähnliche Funktion diskutiert (175).

1.3.4.2 HIF-1 α

Ein weiterer positiver Regulator der Atmung kann auch HIF-1 α sein. Dieser Faktor unterstützt die Anpassung der Mitochondrien an hypoxische Bedingungen, indem er unter reduzierten Sauerstoffbedingungen (10-1% O₂) den Austausch von Untereinheiten des Komplexes IV der Atmungskette reguliert (COX4-1 wird gegen seine effizientere Isoform COX4-2-Untereinheit getauscht), um eine höhere Effizienz der mitochondrialen Atmung zu erzielen. HIF-1 α fördert diesen Austausch der effizienteren Isoform in der Atmungskette auch über die Aktivierung des Lon-Gens, einer mitochondrialen Protease, die spezifisch COX4-1 abbaut (176).

Treten verstärkte hypoxische Bedingungen auf, so induziert HIF-1 α die Expression von glykolytischen Enzymen, wie der Aldolase A (ALDA), der Phosphoglycerat Kinase 1 (PGK1), der Pyruvat Kinase M, der Enolase 1, der Laktat Dehydrogenase A und der Phosphofruktokinase (177). Zusätzlich werden die mitochondrialen Funktionen und der

Sauerstoffverbrauch aktiv durch die Induktion der Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 1 gesteuert (178). So ermöglicht HIF-1 α eine Sauerstoff-abhängige Regulation des Metabolismus. Eine weitere Erklärung für die häufig ineffektive aerobe Atmung in Tumorzellen könnten die schwankenden Sauerstoffbedingungen, die in Tumorgewebe herrschen, geben: So werden bei plötzlich auftretender Hypoxie durch den Atmungskettenabbruch Sauerstoffradikale in das Cytoplasma entlassen, die dann Zellschäden hervorrufen. Je mehr Atmung betrieben wird, bzw. je mehr Mitochondrien aktiv sind, desto mehr ROS entstehen, wenn vorübergehend Sauerstoffmangel herrschen sollte. Tumorzellen könnten sich somit hiervor schützen, wenn sie Atmungsreaktionen eindämmen.

1.3.5 Der Umgang mit ROS in Tumorzellen

Unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies werden alle Radikale zusammen gefasst, die bei der Reaktion von Sauerstoff zu Wasser als Zwischenprodukten entstehen, z.B. über die Atmungskette. Ein freies Radikal ist definiert als ein Atom, eine Atomgruppe oder ein Molekül, das ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzt. In der Elektronentransportkette der Atmung können unter Umständen anstatt vier Elektronen nur zwei auf den Sauerstoff übertragen werden. In diesem Fall entsteht H_2O_2 , ein starkes Zellgift. Auch Ein-Elektronen-Transferreaktionen sind möglich, wobei Hydroxyl-Radikale ($\text{HO}\bullet$) oder Superoxid-Radikale ($\text{O}_2\bullet$) (179-181) entstehen. Ein-Elektronen-Transferreaktionen werden vor allem von Enzymen katalysiert, die Metallionen des Eisens oder Kupfers in ihrem aktiven Zentrum haben, wie z.B. die Cytochrom c Oxidase, die zwei Kupfer-Zentren (CuA und CuB) als Kofaktoren besitzt, die NADH-Dehydrogenase, die Eisen-Schwefel-Zentren als prosthetische Gruppe besitzt oder die Succinat-Dehydrogenase, die ebenfalls Eisen-Schwefel-Zentren trägt. Radikale haben eine hohe Reaktivität. Dies hat zur Folge, dass sie z.B. in Interaktion mit Enzymen treten können, so dass betroffene Enzyme einen Verlust ihrer katalytischen Funktion hinnehmen müssen (182). Ebenso sind freie Radikale in der Lage, Nukleinsäuren zu schädigen (183-186), was zu einer Tumorentstehung führen kann. Auch Organellen und Zellmembranen können beschädigt werden.

Unter hypoxischen Bedingungen (182, 187-189) oder bei Hemmung der Atmungskette (190-193) kommt es zu einer Steigerung der ROS-Konzentrationen, überwiegend bedingt durch die Freisetzung von Radikalen der Atmungskette bei Abbruch der Atmungsreaktionen (194-196). So ist auch bekannt, dass die Hemmung der mitochondrialen Komplexe II (192) und III (197), aber auch des Cytochroms c (198) zu einer Steigerung der ROS-Konzentrationen in der Zelle führt. Andererseits entstehen ROS auch durch intrazelluläre hohe O_2 -Konzentrationen. Dies geschieht in Zellen, die nicht in der Lage sind, den aufgenommenen Sauerstoff weiter zu verarbeiten. Hierbei werden auf noch unbekanntem Wege ROS generiert (174).

Im Laufe der Evolution haben Zellen verschiedene Mechanismen entwickelt, um ROS möglichst schnell und effektiv abbauen zu können. Hierbei wirken sogenannte Antioxidantien. Diese können nicht-enzymatischer (Vitamin E und C, Ubichinon, Glutathion (199-201) und enzymatischer Natur sein. Zu Letzteren gehören u.a.

- die Superoxid-Dismutasen (SOD), die die Umwandlung zweier Superoxide in Wasserstoff-Peroxide und Sauerstoff katalysieren
- die Katalase, ein Enzym, das H_2O_2 in O_2 und H_2O umwandeln kann
- die Glutathion Reduktase, die oxidiertes Glutathion (GSH) reduziert, und somit den GSH-Transport aus den Mitochondrien in das Cytosol erlaubt, wo es als Elektronen-Donor für Enzyme dienen kann, die in der ROS-Detoxifizierung eine Rolle spielen (202). Die Glutathion Reduktase verwendet intramitochondriales NADPH als Reduktionsäquivalent.
- die Glutathion Peroxidase katalysiert die Glutathion-abhängige Reduktion von organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid.
- die Thioredoxin-Reduktase (Trx-R), die die Reduktion von Thioredoxine mittels NADPH katalysiert. Thioredoxine sind kleine Proteine, die eine Disulfid-Brücke als aktives Zentrum enthalten und als elektronenübertragende Kofaktoren eine große Rolle spielen. Zusätzlich kann Trx-R als Antioxidanz dienen (203). So reduziert Trx-R Selen-enhaltende Gruppen und ROS-abbauende Enzymen (wie die Glutathion-Peroxidase) (204-207). Zusätzlich kann Trx-R Ascorbat (Vitamin C) in Zellen recyceln, das dann Peroxide und Superoxide reduzieren und damit unschädlich machen kann (208, 209). Auch wird ein Zusammenhang mit der Regenerierung der Ubichinone gesehen, die in niedriger Konzentration im Plasma und Zellmembranen als Antioxidantien wirken und vor Lipidperoxidierung schützen (210, 211).

Neben diesen enzymatischen Abbauwegen spielt auch p53 in der ROS-Regulierung vielschichtige und z.T. noch nicht vollständig verstandene Rollen (212, 213). So kann p53 z.B. über die Aktivierung von TIGAR die Glykolyse hemmen und den PPP aktivieren. Über den PPP wird wiederum die NADPH-Konzentration in der Zelle erhöht. NADPH wirkt dann als Reduktionsäquivalent für ROS-abbauende Enzyme. Einige p53-Funktionen bei der ROS-Regulation, wie z.B. die p53-Regulation der PGM, sind zusätzlich gewebespezifisch (38, 214). p53 kann andererseits auch einige Gene aktivieren, die zu einer vermehrten ROS-Bildung führen und zu einer Apoptoseeinleitung beitragen können (18, 161). Es scheint aber auch eine *feedback*-Reaktion stattzufinden: So können ROS auch p53 aktivieren. Chen et al. zeigten 2003, dass ROS-Induzierung über H_2O_2 zu einer erhöhten ATM-Kinase Aktivität führt, die wiederum mit einer Phosphorylierung der p53Ser-15 korreliert und eine funktionelle Aktivierung des p53-Zielgens p21CIP/WAF, und somit einen Zellzyklus-Arrest zur Folge hat (215). Auch gibt es Hinweise darauf, dass p53 die Expression von Proteinen stimulieren kann,

die die ROS-Mengen reduzieren und damit DNA-Schäden und Tumorentwicklung unter schwachen Stress-Bedingungen verhindern können (21). So konnten die Sestrine 1 und 2 (216) und ALHD4 (217) als p53-induzierbare Proteine identifiziert werden, die Zellen vor Schäden schützen können, die durch die Zugabe externer ROS wie H₂O₂ entstehen. Desweiteren konnte auf der DNA-Sequenz von SCO2 eine Thioredoxin-Domäne identifiziert werden (175).

1.4 Zielsetzung

Das Tumorsuppressor-Gen p53 ist in viele zellinterne Prozesse involviert: Die diversen Funktionen von p53 reichen von der Zellzyklus-Regulation bis zur Steuerung und Beeinflussung apoptotischer Signalwege. p53 übernimmt die Rolle eines zentralen Steuerelements in der Zelle, das Stresssituationen erkennen und je nach Intensität des Stresses oder der Fehlfunktion die Zelle in den Reparatur-, Arrest-, oder Apoptose-Modus dirigieren kann. p53 ist in vielen Tumoren mutiert. Durch das Fehlen bzw. die fehlerhafte Funktionalität von p53 können betroffene Zellen sich ungehindert vermehren, Angiogenese betreiben und benachbartes Gewebe infiltrieren. Dennoch haben geschätzte 50% der Tumorzellen einen p53^{wt}-Status (<http://p53.free.fr/>). In den letzten Jahren verstärkten sich die Hinweise auf eine komplexe Verflechtung von p53 in metabolische Prozesse. So konnte z.B. bewiesen werden, dass p53 sowohl die Atmung (über SCO2) als auch die Glykolyse (über TIGAR und die Phosphoglycerat-Mutase (PGM)) regulieren kann. Bei einer p53-Suppression würden dann auch diese Gene nicht mehr vollständig reguliert werden und diese Regulation könnte im Tumormikromilieu negative Auswirkungen haben. Im Kontext der neu charakterisierten metabolischen Funktionen von p53 und seiner Effektoren (SCO2, TIGAR) wird ein selektiver Vorteil für primäre Glioblastome im Tumormikromilieu (Nährstoff- und Sauerstoffmangel) in der Beibehaltung von p53^{wt} durch eine verbesserte metabolische Balance vermutet. Diese Erkenntnisse würden einen Beleg für eine negative Konsequenz eines p53-Verlustes für die Tumorzellen darstellen. Zielsetzung dieser Arbeit war daher die Untersuchung der metabolischen Rollen von p53 in Gliomzellen unter Tumormikromilieu-Bedingungen. Hierbei sollten zunächst die Regulation von p53 (**Abschnitte 4.1**), die metabolischen Auswirkungen einer p53-Deletion (**Abschnitt 4.2**) und anschließend die Funktionen von SCO2 (**Abschnitt 4.3**) und TIGAR (**Abschnitt 4.4**) im Glioblastom-Modell untersucht werden. Zusätzlich konnte im Verlauf dieser Arbeit eine Verbindung zwischen TIGAR und TKTL1 hergestellt werden, so dass auch Funktionen von TKTL1 untersucht wurden (**Abschnitt 4.5**).

2 Materialien

2.1 Reagenzien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Roth oder Sigma bezogen.

2-Mercaptoethanol	Luminol
Adenosin Triphosphat	Luziferin (Promega, E1605)
Agar	Magnesiumchlorid
Agarose	Magnesiumsulfat
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Magermilchpulver
Bovine Serum Albumin (BSA)	Mercapthoethanol
Bradford Reagenz	Methanol
Bromphenolblau	NP-40
Coelenterazin (Promega, S2001)	Natriumazid
Coenzym A	Natriumcitrat
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Natriumchlorid
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Natriumhydroxid
Dithiothreitol (DTT)	p-Hydroxycumarinsäure
Ethanol	p-coumaric acid
Ethylenendiamin Tetraacetat (EDTA)	Phosphorsäure
Ethylenglycol Tetraacetat (EGTA)	Propidium Iodid (PI)
Glukose 40% (Braun)	Salzsäure
Glycerol	Sekusept aktiv (Ecolab, SAX 817381)
Glycin	Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)
Glycylglycin	Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Hefeextrakt	Tricin
Hepes	Tris (Tris-hydroxymethylaminomethan)
Kaliumchlorid	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Trypanblau
Kaliumhydroxid	Tween 20
Kristallviolett	Wasserstoffperoxid

2.1.2 Medien

10% Fetales Kälber Serum (FCS)	PAA	A15-101
Accutase	PAA	L11-007

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Glucose free	PAA	E15-843
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA	E15-079
Phosphate Buffered Saline (PBS) without Mg and Ca	PAA	H15-002
Trypsin-EDTA (1x) 0,25% in PBS	PAA	L11-004

2.1.3 Antibiotika

Ampicillin	Roth	K029.2
Hygromycin	PAA	P05-014
Neomycin (G418)	PAA	P25-011
Penicillin/Streptomycin	PAA	P11-010
Puromycin	PAA	P15-019

2.1.4 Inhibitoren, Zytostatika und Chemotherapeutika

Tabelle 1: Inhibitoren, Zytostatika und Chemotherapeutika

Substanz	Funktion	Konz.	Lösungsreagenz	Firma	Kat.Nr.
AktVIII	Akt 1, 2 und 3 – Inhibitor	5 µM	DMSO	Calbiochem	124018
Apo2L/TRAIL	aktiviert Apoptose in Tumorzellen, aber nicht in normalen Zellen.	Ab 10 ng/µL	Wasser	Peprtech	310-04
Complete Mini	Proteinasen-Inhibitor	1 Tablette auf 10 mL Wasser	Wasser	Roche	11836153001
FasL/CD95	löst Apoptose aus	Ab 4 ng/mL	Wasser	Peprtech	310-03H
Oligomycin	ATP-Synthase-Inhibitor	100 nM	Ethanol	Calbiochem	495455
Rotenone	NADH-Dehydrogenase-Komplex-Inhibitor	100 nM	Ethanol	Sigma	R8875
Doxorubicin hydrochlorid (Adriamycin)	Interkaliert zwischen DNA-Strängen	50 mg/mL	Wasser	Sigma	D1515

2.1.5 Transfektionsreagenzien

Für alle Transfektionen wurde Metafectene Pro von Biontex (Kat. Nr. T040-1.0) oder Attractene von Qiagen (Kat.Nr. 301004) verwendet. Bitte s. Details unter **Tabelle 8** und **9**. Für siRNA-Transfektionen wurde Hiperfect von Qiagen (Kat.Nr. 301707) verwendet. Für Details s. **Tabelle 7**.

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2: Antikörper

Zielprotein	Sekundärer Antikörper	Konz. in TMBSA	Größe (KDa)	Firma	Katalog Nr.
Aktin	goat	1:10.000	42	Santa Cruz	SC-1616
GAPDH	mouse	1:10.000	40	Chemicon	MAB374
Goat anti- mouse IgG-HRP (2.Ak)		1:5.000		Santa Cruz	SC-2005
Goat anti rabbit IgG-HRP (2.Ak)		1:5.000		Santa Cruz	SC-2004
Donkey anti goat IgG-HRP (2.Ak)		1:5.000		Santa Cruz	sc-2020
HIF-1 α	mouse	1:5.000	120	Cell signaling	3716
p53 human (Ab4)	mouse	1:5.000	53	Calbiochem	OP32
p53 mouse	mouse	1:5.000	53	Santa Cruz	SC263
Phospho-p53 (Ser-15)	rabbit	1:5.000	53	Cell signaling	9284S

2.1.7 RT-PCR-Primer

RT-PCR-Primer wurden 100 nmolar in DNase/RNase-freies Wasser angesetzt und für die PCR-Reaktion 1:100 (Kontrollgene wie 18S und GAPDH) und 1:50 (übrigen Zielgene) eingesetzt. SDHA wurde als Kontrolle für Proben, die mit unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen behandelt wurden, verwendet (1:50).

Tabelle 3: RT-Primer

Primer	Sequenz	Gen	Funktion(en)
18S bw	GCTGGAATTACCGCGGCT	18S (ribosomale RNA)	Ribosomale Untereinheit, spielt eine Rolle in der Translation (218)
18S fw	CGGCTACCACATCCAAGGAA		
Cox4-2 bw	CATCTCCGCAAAGGTCTCAT	<i>Cytochrome c Oxidase subunit 4 isoform 2</i>	Trägt zum Elektronentransport in der Atmungskette bei (176)
Cox4-2 fw	GCTATGCCAGCGCTACTAC		
FBPase-2 bw	GCACCGCATGACAGCCTGGT	Fruktose 2,6-Bisphosphatase	Spielt eine Rolle in der Glykolyse (baut Fruktose-1,6-Bis-phosphat

FBPase-2 fw	TCAGAGGCCGCATCGGAGGT		zu Fruktose-6-Phosphat ab) (219)
HK 2 bw	GTCCGGACGGCGCACAAAGA	Hexokinase 2	Spielt eine Rolle in der Glykolyse (Umwandlung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat) und in der Apoptose (220)
HK 2 fw	CGCGAGCCGTGAGCGATGAT		
HIF-1α bw	GTTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG	<i>Hypoxia-inducible factor 1 α</i>	Multiple Funktionen in Angiogenese, Apoptose, ROS- und Metabolismus-Regulierung (101, 105, 176)
HIF-1α fw	GTCGGACAGCCTCACCAAACAGAGC		
G6PDH bw	CGGCCACATCATGGAAGT	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase	Enzym des oxidativen PPP, katalysiert die Umwandlung von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconolacton (221, 222)
G6PDH fw	GGCAAGGCCCTGAACGA		
LDHA bw	GGTGAAGTCCCAGCCTTTCC	Laktat Dehydrogenase A	Enzym, das Laktat zu Pyruvat oxidiert bzw. Dessen Rückreaktion katalysiert (223, 224)
LDHA fw	AAGTGGTTGCAATCTGGATTCAG		
Lon bw	ACGTCCAGGTAGTGGTCCAG	<i>ATP-stimulated mitochondrial matrix protein</i>	Schützt vor oxidative Zellschäden (225, 226), lysiert Cox4-2 (176), wirkt als Chaperon für die Zusammensetzung der inneren Membrankomplexe, partizipiert in der Regulierung mitochondrialer Gen-Expression (227)
Lon fw	CGGGAAGATCATCCAGTGTT		
p53 bw	AGGCAGTGCTCGCTTGGTAC	p53	Multiple Funktionen in Zellsignalwegen, Apoptose, ROS- und Metabolismus-Regulierung (21, 228)
p53 fw	CTGGCTAGACGAAGACTCAG		
PFKB1 bw	GCACCGCATGACAGCCTGGT	Phosphofruktokinase B1	Enzym der Glykolyse, katalysiert die Bildung des PFK-I-Effektors Fruktose-2,6-Bisphosphat (229, 230)
PFKB1 fw	TCAGAGGCCGCATCGGAGGT		
SCO2 bw 2	TGAGCAGGTAGATGGCAATG	<i>Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2</i>	Enzym aus der Atmungskette, baut Kupfer in den Cytochrom c Oxidase-Komplex ein (231, 232), Rolle in ROS-Abwehr (174)
SCO2 fw 2	CTTCACTCACTGCCTGACA		
SDHA bw	CCACCACTGCATCAAATTCATG	<i>Succinate-dehydrogenase complex subunit A</i>	Enzym aus dem Citrat-Zyklus. - Oxidiert Succinat zu Fumarat (233), wird unter Hypoxie oder Nährstoffmangel nicht reguliert
SDHA fw	TGGGAACAAGAGGGCATCTG		
TALDO1 bw	AATCCCCTCCCAGGTTGATGA	Transaldolase 1	Enzym des nicht-oxidativen PPP. Katalysiert die Reaktion Sedoheptulose-7-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Erythrose-4-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat) (234, 235)
TALDO1 fw	GATTCCAGGCCGTGTATCCAC		
TIGAR 2 bw	CCATGTGCAATCCAGAGATG	<i>Tp53 Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator</i>	Reguliert die Menge an Fruktose-2,6-Bisphosphat in der Zelle und leitet den PPP ein (33)
TIGAR 2 fw (erkennt endo- und exogenes TIGAR)	CCTTACCAGCCACTCTGAGC		
TKT bw	ACACTTCATACCCGCCTAG	Transketolase	Enzym aus dem nicht-oxidativen PPP. Katalysiert die Übertragung von Aldosen in Ketosen (Ribose-5-Phosphat und Xylulose-5
TKT fw	TGTGTCCAGTGCAGTAGTGG		

			Phosphat zu Sedoheptulose-7-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat) (234, 235)
TKTL1 bw	CATCCTAACAAGCTTTTCGCTG	<i>Transketolase like 1</i>	Isoenzym der TKT, katalysiert auch die Übertragung von Aldosen in Ketosen, allerdings mit einer Tendenz zu einer Ein-Substrat-Nutzung (62, 145, 146)
TKTL1 fw	TACACCATGACGCCTACTGC		

fw: forward Primer; bw: backward Primer

2.1.8 siRNA-Primer

Tabelle 4: siRNA-Sequenzen

siRNA-Name	Sequenz	Zielregion	Konzentration	Herkunft/Kat.Nr.
HIF-1α si as HIF-1α si s	UAGGCUCAGGUGAACUUUG CAAAGUUCACCUGAGCCUA	1801-1820	20 nM	SASI_Hs02_003320 63 Sigma Aldrich
SCO2si 1 as SCO2si 1 s	AAAGCCAGGACCUCAGAUG CAUCUGAGGUCCUGGCUUU	241-259	20 nM	Predesigned Qiagen
SCO2si 2 as SCO2si 2 s	GUAGUACACGCGUAACUG CAGUUACCGCGUGUACUAC	756-774	20 nM	Predesigned Qiagen
Scrambled si	Allstars negative siRNA Qiagen	-	20-100 nM	Predesigned Qiagen Kat. Nr. 1027280
TIGARsi 1 as TIGARsi 1 s	AUAUACCAGCAGCUGCUGC GCAGCAGCUGCUGGUUAUUA	115–133 in Exon 3	100 nM	Sequenz aus (33)
TIGARsi 2 as TIGARsi 2 s	AAUCGUCGGUCACAGAAUC UUAGCAGCCAGUGUCUUAG	565-583 in Exon 6	-	Sequenz aus (33)
TKTL1si 1 as TKTL1si 1 s	UAAAUACCAUAGUUUCUGGU ACCAGAAACUAUGGUUAUUUA	1406-1426 in Exon 9	20 nM	Sequenz aus (147)
TKTL1si 2 as TKTL1si 2 s	UUAUUCACGAAGGAAACACUU AAGUGUUUCCUUCGUGAAUAA	2175-2195 in der 3'-UTR Region	20 nM	Sequenz aus (147)

as: antisense, s: sense


Die SCO2siRNA-Sequenzen wurden von Qiagen predesigned, genauso wie die scrambledsiRNA. Die TIGARsiRNA-Sequenzen wurden Bensaad et al., 2006 (33), die TKTL1siRNA-Sequenzen Xu et al., 2009 (147) entnommen. Die HIF-1 α -siRNA-Sequenz wurde über die Sigma-Aldrich-siRNA-Datenbank ermittelt.

2.1.9 Größenstandards

Protein-Größenstandard:

Seablueplus2 prestained protein standard, Invitrogen, LC5925

Die Abbildung ist der Seite des Herstellers entnommen.

	Protein	Molekular Größe (kDa)
	Myosin	
	Phosphorylase	250
	BSA	148
		98
	Glutamic-Dehydrogenase	64
	Alcohol-Dehydrogenase	50
	Carbonic-Anhydrase	36
	Myoglobin Red	22
	Lysozyme	16
	Aprotinin	6
	Insulin, B Chain	4

2.1.10 Vorgefertigte Systeme (Kits)

- cDNA wurde mittels Superscript Vilo CDNA Synthesis Kit von Invitrogen (Kat.Nr. 11754050) hergestellt.
- O₂-Werte wurden mittels Sensorkassette (Radiometer, Kopenhagen, Niederlande, Kat.Nr. SC100BG) in einem ABL-80-Gerätes (Radiometer, Kopenhagen, Niederlande) gemessen. Siehe Hersteller-Protokoll für nähere Angaben.
- Plasmid-DNA wurde mittels Purelink hipure Plasmid filter midiprep kit (Invitrogen Kat.Nr. K210015) gewonnen.
- QRT-PCR wurden mittels Absolute Blue Q-PCR Mastermix mit SybrGreen Fluorescein (Thermo, Kat.Nr. AB-4219/b) in IQ5, Biorad durchgeführt.
- RNA wurde mittels Trizol (Invitrogen, Kat.Nr. 15596-018) und RNeasy Kit (Invitrogen, Kat.Nr. 12183-018A) isoliert.

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Zelllinien

LNT-229, T98G und LN-18 sind drei etablierte humane Gliom-Zelllinien, die freundlicherweise von Dr. N de Tribolet (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurden.

LNT-229 p53-herunterregulierende Zelllinien (LNT-229p53sh) wurden durch stabile Transfektion eines p53sh-Konstruktes in pSUPERpuro (sh = short hairpin) hergestellt (236) und wurden stets mit Zellen, die mit dem puromycin-scrambledsiRNA-Vektor transfiziert wurden, verglichen (LNT-229puro, M. Weller).

Die hygro/p53^{V135A}-Vektoren wurden durch Umklonierungen aus dem Vektor pLTRcG im Labor von Michael F. Clarke 1993 hergestellt (237, 238). Die p53 Mutante p53^{V135A} trägt eine Missense-Mutation der Aminosäurekette an Position 135, an dieser Stelle ist die Aminosäure

Alanin durch Valin ersetzt. Diese Veränderung verhindert die Bindung an die DNA (239). Diese Mutante nimmt bei 32,5°C die p53^{wt}-Konformation an, während sie bei 38,5°C eine dominant negative p53-Konformation annimmt. Bei 38,5°C unterbindet diese Mutante die p53^{wt}-Funktionen, indem sie mit einem Multiprotein-Komplex, der u.a. Hsp70 und Hsp90 beinhaltet, assoziiert. Dieser Komplex bewirkt eine Sequestrierung von p53^{wt} im Cytoplasma, so dass es im Nukleus nicht mehr aktiv werden kann. Diese Sequestrierung kommt zustande, da die Nuclear Localisation Signal (NLS)-Sequenz von p53 durch eine Konformationsänderung und/oder durch ein noch unbekanntes Protein maskiert wird. Bei einer Temperatur von 32,5°C kann p53^{V135A} aus dem Multikomplex dissoziieren und in den Nukleus eintreten, wo es wieder seine p53^{wt}-Funktionen ausüben kann (240). Die LNT-229 Temperatur-sensitiven Zellen (hygro/p53ts) wurden benutzt wie publiziert (241).

C. Depner (T. Acker, Universität Giessen) stellten die LN-229pLenti6/V5-DEST-SIMA und LN-229pLenti6/V5-DEST-HIFsh-Zellen zur Verfügung. Diese wurden mittels Lentiviren nach dem BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System von Invitrogen hergestellt (60 MOI). SIMA ist das Homologon zu HIF1α in *Drosophila melanogaster*, welches als Kontrolle dient. Das verwendete Plasmid, pLenti6/V5-DEST, ist ebenfalls aus diesem Invitrogen Kit.

LNT-229puro-, p53sh-, hygro- und p53ts-Zellen wurden mit verschiedenen Vektoren transfiziert (pcDNA3, pcDNA3-SCO2, pcDNA3-TIGAR, pcDNA3-TIGAR-TM, pDONR221 und pDONR221-TKTL1). Darüber hinaus wurde mit Zelllinien, die genotypisch p53^{wt-defizient} sind, gearbeitet (LN-18 und T98G). Diese wurden ebenfalls mit pcDNA3, pcDNA3-SCO2, pcDNA3-TIGAR- und pcDNA3-TIGAR-TM (T98G), oder mit pcDNA3 und pcDNA3-SCO2 (LN-18) stabil transfiziert.

Unter p53^{wt-defizient}-Zellen werden in Folge der Einfachheit halber alle Zellen in dieser Arbeit zusammengefasst, 1) die p53-mutant sind (p53^{mt}, wie LN-18-, T98G-, und LNT229p53ts-Zellen), 2) in denen p53 stabil durch homologe Rekombination entfernt wurde (wie die HCT116 p53^{-/-}-Zellen) und 3) in denen p53 supprimiert ist (wie LNT-229p53sh-Zellen), folglich alle Zelllinien, die keine p53^{wt}-Funktionen bzw. -Aktivitäten ausüben.

Die Expression von p53, TIGAR, SCO2 und TKTL1 in den verwendeten Zelllinien sowie Details zu den stabil transfizierten Vektoren sind in **Tabelle 5** wieder gegeben. Die Expression von TIGAR, SCO2 und TKTL1 wurde mittels QRT-PCR untersucht und die Ergebnisse zum allgemeinen Verständnis an dieser Stelle vorgezogen. Diese Daten werden im Ergebnis-Teil genauer erläutert. Zusätzlich wurde Versuche mit transienten Transfektanten (pcDNA3/pcDNA3-HIF-1α und pcDNA3/pcDNA3-TIGAR) in LNT-229-Zellen durchgeführt.

Tabelle 5: Stabile Zelllinien

Zelllinien	p53-Status	TIGAR	TIGAR-TM	SCO2	TKTL1	Vektor(en)	Jeweilige Resistenz-Gen(e)
HCT116 p53 ^{+/+}	wt	+	-	+	+	-	-
HCT116 p53 ^{-/-}	-/-	(+)	-	(+)	(+)	-	-
LN-18	mt	(+)	-	+	(+)	-	-
LN-18-pcDNA3	mt	(+)	-	+	ND	pcDNA3.1	neomycin
LN-18-pcDNA3-SCO2	mt	(+)	-	++	ND	pcDNA3.1-SCO2	neomycin
LN-229SIMA	wt	+	-	+	+	pLenti6/V5-DEST-SIMA	blasticidin
LN-229HIF-1ash	wt	-	-	-	-	pLenti6/V5-DEST-HIF-1ash	blasticidin
LNT-229	wt	+	-	+	+	-	-
LNT-229hygro	wt	+	-	+	+	pLTRcG-hygro	hygromycin
LNT-229hygro-pcDNA3	wt	+	-	+	+	-pLTRcG-hygro -pcDNA3.1	hygromycin neomycin
LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR	wt	++	-	+	++	-pLTRcG-hygro -pcDNA3.1-flag-TIGAR	hygromycin neomycin
LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-TM	wt	+	TM++	+	+	-pLTRcG-hygro -pcDNA3.1-flag-TIGAR-TM	hygromycin neomycin
LNT-229hygro-pDONR221	wt	+	-	+	+	-pLTRcG-hygro -pSUPERpuro -pDONR221	hygromycin puromycin -
LNT-229hygro-pDONR221-TKTL1	wt	+	-	+	++	-pLTRcG-hygro -pSUPERpuro -pDONR221-TKTL1	hygromycin puromycin -
LNT-229 38,5°C p53ts	wt	(+)	-	(+)	(+)	pLTRp53cG-hygro	hygromycin
LNT-229 38,5°C p53ts-pcDNA3	mt	(+)	-	(+)	(+)	-pLTRp53cG-hygro -pcDNA3.1	hygromycin neomycin
LNT-229 38,5°C p53ts-pcDNA3-SCO2	mt	(+)	-	++	(+)	-pLTRp53cG-hygro -pcDNA3.1-SCO2	hygromycin neomycin
LNT-229 38,5°C p53ts-pcDNA3-TIGAR	mt	++	-	(+)	++	-pLTRp53cG-hygro -pcDNA3.1-flag-TIGAR	hygromycin neomycin

Zelllinien	p53-Status	TIGAR	TIGAR-TM	SCO2	TKTL1	Vektor(en)	Jeweilige Resistenz-Gen(e)
LNT-229 38,5°C p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM	mt	(+)	TM++	(+)	ND	-pLTRp53cG-hygro -pcDNA3.1-flag-TIGAR-TM	hygromycin neomycin
LNT-229 38,5°C p53ts pDONR221	mt	(+)	-	(+)	(+)	-pLTRp53cG-hygro -pSUPERpuro -pDONR221	hygromycin puromycin -
LNT-229 38,5°C p53ts-pDONR221-TKTL1	mt	(+)	-	(+)	++	-pLTRp53cG-hygro -pSUPERpuro -pDONR221-TKTL1	hygromycin puromycin -
LNT-229puro	wt	+	-	+	+	pSUPERpuro-scrambledsh	puromycin
LNT-229puro-pcDNA3	wt	+	-	+	+	-pSUPERpuro-scrambledsh -pcDNA3.1	puromycin neomycin
LNT-229puro-pDONR221	wt	+	-	+	+	-pSUPERpuro-scrambledsh -pcDNA3.1 -pDONR221	puromycin neomycin -
LNT-229puro-pDONR221-TKTL1	wt	+	-	+	++	-pSUPERpuro-scrambledsh -pcDNA3.1 -pDONR221-TKTL1	puromycin neomycin -
LNT-229p53sh	sh	(+)	-	(+)	(+)	pSUPERpuro-p53sh	puromycin
LNT-229p53sh-pcDNA3	sh	(+)	-	(+)	(+)	-pSUPERpuro-p53sh -pcDNA3.1	puromycin neomycin
LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2	sh	(+)	-	++	ND	-pSUPERpuro-p53sh -pcDNA3.1-SCO2	puromycin neomycin
LNT-229p53sh-pDONR221	sh	(+)	-	(+)	(+)	-pSUPERpuro-p53sh -pcDNA3.1 -pDONR221	puromycin neomycin -
LNT-229p53sh-pDONR221-TKTL1	sh	(+)	-	(+)	++	-pSUPERpuro-p53sh -pcDNA3.1 -pDONR221-TKTL1	puromycin neomycin -
T98G	mt	(+)	-	(+)	(+)	-	-
T98G-pcDNA3	mt	(+)	-	(+)	(+)	pcDNA3.1	neomycin

Zelllinien	p53-Status	TIGAR	TIGAR-TM	SCO2	TKTL1	Vektor(en)	Jeweilige Resistenz-Gen(e)
T98G-pcDNA3-SCO2	mt	(+)	-	++	ND	pcDNA3.1-SCO2	neomycin
T98G-pcDNA3-TIGAR	mt	++	-	(+)	++	pcDNA3.1-flag-TIGAR	neomycin
T98G-pcDNA3-TIGAR-TM	mt	(+)	TM++	(+)	+	pcDNA3.1-flag-TIGAR-TM	neomycin

- : nicht exprimiert
 (+): schwach exprimiert
 +: exprimiert
 ++: überamplifiziert
 -/-: homolog rekombiniert
 wt: wildtyp
 mt: mutant
 sh: shRNA
 ND: *Non Determined* (Status ist unbekannt/unsicher)
 p53sh: stabile p53-knockdown- Zellen (*short hairpin*)
 p53ts: p53^{V135A}, p53-Mutante bei 38,5°C
 SCO2: *Synthesis of Cytochrome c Oxidase*
 TIGAR: *Tp53 Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*
 TIGAR-TM: TIGAR-Triplemutante Die katalytische Triade ist mutiert, die Mutante kann nicht mehr die Glykolyse hemmen
 TKTL1: *Transketolase-like 1*
 38,5°C: Status der angegebenen Genexpression nur bei dieser Temperatur

2.2.2 Bakterien

Für die Transformation und das Hochziehen aller Plasmiden bis auf pDONR221 wurden kompetente DH5α *subcloning efficiency cells* verwendet (Kat.Nr. 18265-017, Invitrogen). Für die Transformation des Plasmides pDONR221 wurden OminmaxTM 2 competent cells (Kat. Nr. 12535-029, Invitrogen) benutzt.

2.2.3 Vektoren

Kommerzielle Vektoren:

pSUPERpuro und pSUPERneo wurden von OligoEngine (Keystone PI North, Seattle, USA) bezogen. Die Kontrollvektoren pcDNA3 (Kat. Nr. V790-20) und pDONR221 (Kat. Nr. 12536-017) wurden von Invitrogen bezogen. Der p53-Luziferase-Reportergen-Vektor (p53-luc) wurde von Stratagene (PathDetects p53 Kat. Nr. 219092), pRL-CMV (Renilla)-Vektor von

Promega (Kat. Nr. E2261) Promega, Mannheim, Deutschland) bezogen. Der pcDNA3.1-HIF-1 α -Vektor wurde von Addgene bezogen (Nr. 18949).

Eigenlabor-Vektoren

pSUPERpurop53shRNA wurde verwendet wie publiziert in (236). pSUPERpuro-scrambled-sh wurde im Labor von M. Weller hergestellt.

Fremdbezogene Vektoren:

Der Vektor pcDNA3.1-SCO2 wurde freundlicherweise von Hwang P., National Institute of Health, Maryland, USA, zur Verfügung gestellt, die Vektoren pcDNA3.1-Flag-TIGAR und pcDNA3.1-Flag-TIGAR-TM von K. Bensaad / K. Vousden, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, England.

Die *hygro/p53^{V135A}*-Vektoren wurden durch Umklonierungen aus dem Vektor pLTRcG im Labor von M.F. Clarke 1993 hergestellt (237, 238).

Die TKTL1 F24L-pDONR221 (Plasmid Nr. 0934619) wurden freundlicherweise von M. Böhl (Tavargenix GmbH, Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

Der HIF-1 α Reporter Vektor (pRE-Dtk-LUC (242), in dieser Arbeit der Einfachheit halber HIF-1 α -Luc genannt) wurde freundlicherweise von J. Pouyssegur zur Verfügung gestellt.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 Handhabung der Zellen

Eukaryontische Zellen:

Bei allen verwendeten Zellen handelte es sich um adhärent wachsende Kulturen. Die Gliomzellen wurden bei feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂ bei 37°C (abgesehen von den p53^{V135A} und den hygro-Kontrollzellen, die bei 38,5°C gehalten wurden) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, PAA) gehalten, das zusätzlich noch 10% fetales Kälberserum (FCS), 100 IU/mL Penicillin und 100 mg/mL Streptomycin enthielt. In Experimenten, in denen Glukose-freies Medium oder determinierte Glukose-Bedingungen benötigt wurden, wurde Dulbecco's modified Eagle's Glukose free medium (PAA) ohne FCS und Antibiotika verwendet, und Glukose je nach Bedarf hinzugefügt. FCS enthält u.a. Pyruvat und Glukose, die in Metabolismus-Untersuchungen stören kann und darf folglich in diesen Versuchen nicht verwendet werden.

Prokaryontische Zellen:

Für die Kultivierung der Bakterien wurde LB-Medium verwendet:

LB-Puffer:

Hefeextrakt (5 g/L)

Trypton (10 g/L)

Natriumchlorid (5 g/L)

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Für Plattenkulturen wurde Agar (15 g/L) zugegeben. Das Medium wurde 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach Erkalten des Agar-Mediums auf ca. 60°C wurde das Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin **3.1.1.2**) hinzugegeben und in 10cm-Schalen ausplattiert, ÜN bei 37°C inkubiert und anschließend wurden Klone gepickt.

3.1.1.2 Selektion

Ampicillin: Bakterien, die mit einem Ampicillin-Resistenzgen-tragendes Plasmid transformiert wurden, wurden mit 1 µg/mL selektiert

Kanamycin: Bakterien, die mit einem Kanamycin-Resistenzgen-tragendes Plasmid transformiert wurden, wurden mit 5 µg/mL selektiert.

Stabile Pools oder Klone wurden regelmäßig (alle 4 Wochen) mit 5 µg/mL Hygromycin B oder Puromycin, oder 50 µg/mL G418 (Neomycin-Resistenz) gehalten, um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten (doppelte Menge, um stabile Zelllinien zu kultivieren).

Penicillin/Streptomycin: Dem Medium wurde stets 1% Penicillin/Streptomycin hinzugegeben, jedoch nicht während laufender Versuche.

3.1.1.3 Einfrieren

Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, mit PBS resuspendiert und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 90% FCS / 10% DMSO resuspendiert und in Kryofugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht oder länger in einen Kryofugenbehälter eingefroren (-80°C) und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.1.1.4 Zellzahlbestimmung

Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, mit PBS gewaschen, zentrifugiert und das Pellet in Medium resuspendiert. 10 µL der Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden je 4 Quadranten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zahl der Zellen in einem Quadranten entsprach $\times 10^4$ Zellen/ mL Medium.

Bei lebend/tot-Zählungen wurden die Zellen ebenso mit Trypsin gelöst und in 100 µL einer 90:10 PBS:Trypanblau-Lösung resuspendiert. Es wurden je 4 Quadranten ausgezählt. Die Zahl der Zellen in einem Quadranten entsprach $\times 10^3$ Zellen/ mL Medium.

3.1.1.5 Aussaat

Tabelle 6: Zellen-Aussaat

Well-Platte	6-Well	24-Well	96-Well	100 mm Schale
Durchmesser in mm	34,5	16,2	6,7	85
cm ²	9,34	2,06	0,35	56,74
Zellzahl	530.296	116.925	20.000	3.218.979
Zellzahl/cm ²	56.727	56.727	56.727	56.727

Wenn nicht anders angegeben, gelten diese Angaben für alle Versuche. Die Umrechnungen beziehen sich stets auf die Mengen im 96-Well-Platten Format (20.000 Zellen/0,35 cm²)

3.1.1.6 Stabile Transfektion

In einem 6-Well wurden 100.000 Zellen ausgesät, nach 24 h erfolgte die Transfektion nach einem Mediumwechsel (2 mL Vollmedium/Well). Die Transfektion hatte ein 6:1 Verhältnis (Metafectene Pro in μL zu DNA-Menge in μg): zu 50 μL serumfreiem Medium (SFM) wurden 6 μL Metafectene vorsichtig in einem einmaligen Resuspensionsschritt hinzugegeben. In weiteren 50 μL SFM wurde 1 μg Plasmid-DNA pipettiert, beide Lösungen wurden vorsichtig gemischt, 15-20 min bei RT inkubiert, anschließend auf die Zellen gegeben und vorsichtig geschwenkt. Die Selektion fand je nach transfiziertem Plasmid nach zwei Tagen mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum statt (**2.1.3**).

3.1.1.7 Transiente Transfektion

siRNA wurde in RNase freiem Wasser gelöst (Endkonzentration 20 μM) und nach Hiperfect-Protokoll transient in die Zellen transfiziert (Serum-freiem Medium+siRNA Hiperfect, 15 min bei RT, dann auf die frisch ausgesäten Zellen tropfen lassen). Zunächst wurde die ideale Konzentration ermittelt, um einen möglichst effizienten „Knock-down“ des Zielgens zu bewirken. Dabei wurde eine siRNA-Konzentrationsreihe von 0, 5, 20, 50 und z.T. 100 nM ausgetestet und die Expression des betroffenen Genes mittels QRT-PCR untersucht. Die Konzentration, die den effizientesten „Knock-down“ hervorrief, wurde anschließend in den Versuchen eingesetzt. Die siRNA-Konzentration für eine effiziente Herunterregulierung wurde für jede siRNA individuell ermittelt (s. **Tabelle 4**).

Tabelle 7: Transiente Transfektionsansätze siRNA

Well	Methode	Anzahl der Zellen	Menge des SFM [μL]	Menge an siRNA [nM]	Menge an Hiperfect [μL]
96-Well	Reporter-Assay	10.000	50	Je nach siRNA	1,5
24-Well	PI-und H ₂ DCFDA FACS, RNA	100.000	100	96-Well siRNA-Menge x2,41	3
6-Well	Atmungsversuche, RNA, Proteinlysate	200.000	260	96-Well siRNA-Menge x5,14	8

s. **Tabelle 4**

Transiente Transfektionen von Vektoren erfolgten mittels Metafectene Pro oder Attractene (Qiagen Kat.Nr. 301004).

Tabelle 8: Transiente Transfektionansätze für Plasmide mittels Metafectene

Well	Anzahl der Zellen	Menge des SFM [μL]	Menge an Plasmid [μg]	Menge an Metafectene Pro [μL]
96-Well	10.000	50	0,2	0,2
24-Well	100.000	100	0,5	0,5
6-Well	200.000	260	1	1

Tabelle 9: Transiente Transfektionansätze für Plasmide mittels Attractene

Well	Anzahl der Zellen	Menge des SFM [μL]	Menge an Plasmid [μg]	Menge an Attractene [μL]
96-Well	10.000	50	0,2	0,2
24-Well	100.000	60	0,4	1,5
6-Well	200.000	100	1,2	4,5

Es wurde zu der angegebenen Menge an Serumfreiem Medium (SFM) zunächst das Plasmid und anschließend das Transfektionsreagenz vorsichtig in einem einmaligen Resuspensionsschritt hinzugegeben. Nach 15-20 min bei RT wurde das Reaktionsgemisch auf die Zellen gegeben und vorsichtig geschwenkt.

3.1.2 FACS-Analysen

3.1.2.1 PI-FACS als Zelltod-Untersuchung

Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und wie im Ergebnisteil beschrieben behandelt. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium in ein Reagenzgefäß pipettiert, die Zellen mit PBS gewaschen, wobei das PBS dann auch in das dazu gehörige Reagenzgefäß gegeben wurde, anschließend wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und wieder in das betreffende Röhrchen gegeben, so dass sich alle Zellen, ob lebendig oder tot, eines jeweiligen Ansatzes, in demselben Reaktionsgefäß befanden. Danach erfolgte ein kurzer Zentrifugationsschritt (3 min, 1.000 rpm), das Pellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend in PBS/Propidium Iodid (PI) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resuspendiert und in ein BD-FACS-Röhrchen überführt. PI lagert sich in die DNA von Zellen ein, deren Membran löchrig geworden ist. Der PI-Gehalt und somit der Zelltod-Anteil kann dann mittels FACS (BD, FACS Canto) im FL2-A (lin)-Kanal für Propidiumiodid ermittelt und die Daten mit Hilfe des Programmes BDFACS Diva Software ausgewertet werden.

3.1.2.2 Messung von intrazellulären Reactive Oxygen Species (ROS)

2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA-AM) (Invitrogen, Kat.Nr.D-399) wurde zum Messen des intrazellulären oxidativen Stresses verwendet. Dabei handelt es sich um eine zellpermeable Substanz, die nach Eintritt in die Zellen durch Esterasen geschnitten wird. Hierbei entsteht das Zwischenprodukt H₂DCFDA, das die Zelle nicht mehr verlassen kann und das wiederum bei Induktion von Zellstress (z.B. durch Zugabe von Adriamycin oder Nährstoff/Sauerstoffmangel, H₂O₂) in der Gegenwart von ROS zu dem fluoreszierenden Produkt 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) oxidiert werden kann. Die dabei entstehende Fluoreszenz kann mittels Durchflußzytometrie detektiert werden. Somit ist die Zunahme an Fluoreszenz ein Indikator für die ROS-Entstehung.

Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und behandelt wie im Ergebnisteil beschrieben. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, das Pellet mit PBS gewaschen und mit 10 µM H₂DCFDA in PBS 30 min bei der entsprechenden Zelltemperatur (37°C/38,5°C) inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurde 2x mit PBS gewaschen, die Zellen mit Trypsin abgelöst, in PBS resuspendiert und mittels FACS (BD, FACS Canto) im FITC-Kanal ermittelt.

3.1.3 Luziferase Transaktivität

Beim dem Luziferase Transaktivitätsassay handelt es sich um eine Methode, die die Messung der Transaktivitätsfähigkeit eines Transkriptionsfaktors in der Zelle ermöglicht. Die Erkennungsbindesequenzen eines Transkriptionsfaktors (in dieser Arbeit p53, HIF-1α) sind einem Luziferase-Gen vorangestellt, sodass bei Bindung dieses Faktors an dieser Sequenz das Luziferase-Gen mit abgelesen wird. Luziferasen sind Enzyme, in deren Anwesenheit Luziferine mit Sauerstoff zu Dioxetanen reagieren, bei deren Zerfall es zu einer Biolumineszenz kommt. Die Reaktion läuft in 3 Stufen ab:

- Luziferin + O₂ → Oxyluziferin + Licht
- Luziferin + ATP → Luziferyladenylat + PPI
- Luziferyladenylat + O₂ → Oxyluziferin + AMP + Licht

Die Menge an Luziferase ist somit ein Maß für die Transaktivitätsfähigkeit des Transkriptionsfaktors. Um die Transfektionsrate zu ermitteln, wird neben dem Luc (Luziferase)-Plasmid auch pRL-CMV (Renilla-Luziferase) mit transfiziert und auf deren jeweilige Werte normiert. Das Verhältnis Luziferase-Wert/Renilla-Wert ist ein Maß für die Aktivität der Luziferase in der Zelle im Vergleich zur Transfektionseffizienz (Renilla) und somit für die Transaktivitätsstärke des Promotors des Zielgens. Die Biolumineszenz, die durch eine zweite Luziferase (*Renilla reniformis*) emittiert wird, basiert auf der Kalzium-vermittelten Freisetzung des Luziferins (Coelenterazin) aus dem Luziferin-bindenden Protein. Dieses Substrat wird anschließend durch die Luziferase oxidiert und zu Coelenteramid abgebaut, was zu einer Freisetzung von Energie führt.

- Coelenterazin+ O₂ → Coelenteramid + CO₂ + Photon

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät (10.000 Zellen/Well), nach 24 h mit Metafectene Pro (Biontex, Kat.Nr. T040-1.0) mit 150 ng/Well p53- oder HIF-1α-Luc-Reporter-Gen-Vektor und 20 ng/Well pRL-CMV-Vektor kotransfiziert und nach 36 h wie im Ergebnisteil beschrieben behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 50 µL Lyse-Puffer 15 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur lysiert. Die Platten wurden anschließend bei -20°C eingefroren. Der Einfrierschritt ist wichtig, weil die Zellen beim Auftauen vollständig lysiert sind und die Luziferase und Renilla freigegeben, die dann gemessen werden können. Nach dem Auftauen wurden 40 µL des Lysates in Luminometer-Platten überführt und im Luminometer (Mithras 940, Berthold) gemessen, wobei zuerst 100 µL Firefly-Puffer in das jeweilige Well gegeben wurden, um die Luziferase-Aktivität zu messen, und anschließend 100 µL des Renilla-Puffer, um die Renilla-Aktivität zu messen. Das Protokoll ist der Publikation Dyer et al. (243) entnommen.

Der p53-Luc-Reporter trägt 14x die folgende Enhancer Element Sequenz: TGCCTGGACTTGCCTGG (s. Herstellerseite- Stratagene). Der HIF-1α-Luc-Reporter (pRE-Dtk-LUC) enthält 3 Kopien vom HRE des Erythropoetin-Gens (242).

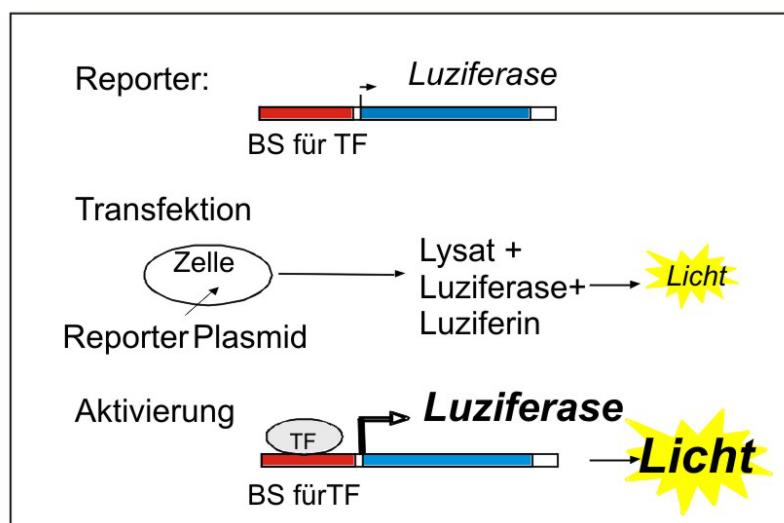


Abbildung 3-1 Funktionsweise des Luciferase-Assays

Zellen werden mit einem Reporter transfiziert, die Erkennungsbindesequenzen des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors (p53, HIF-1α) sind einem Luciferase-Gen vorangestellt, sodass bei Bindung dieses Faktors an dieser Sequenz das Luciferase-Gen mit abgelesen wird. Die Luciferase kann anschließend in der in 3.1.3 beschriebenen Reaktion das dazu gegebene Luciferin umwandeln. Die Menge an Luciferase ist ein Maß für die Transaktivitätsfähigkeit des Transkriptionsfaktors.

BS: Bindestelle(n); **TF:** Transkriptionsfaktor.

Luziferase-Lyse-Puffer (5x):

40 mM Tricin pH 7.8

50 mM NaCl

2 mM EDTA

1 mM EGTA

5 mM DTT

1% Triton X-100

Puffer Luziferin:

<u>Endkonz.</u>	<u>Stock</u>	<u>ad 10 mL</u>
25 mM Glycylglycin	500 mM	500 µL
15 mM K ₂ HPO ₄ (pH 8.0)	1 M	150 µL
4 mM EGTA	500 mM	80 µL
2 mM ATP	50 mM	400 µL
1 mM DTT	500 Mm	20 µL
15 mM MgSO ₄	1 M	150 µL
0,1 mM CoA	50 Mm	20 µL
75 µM Luziferin	20 mM	37,5 µL

CoA und Luziferin wurden erst nach der pH-Einstellung auf 8,0 mit KOH zugegeben.

Puffer Renilla (2x):

<u>Endkonz.</u>	<u>Stock</u>	<u>ad 50 mL</u>
1,1 M NaCl	5 M	22 mL
2,2 mM Na ₂ -EDTA	500 mM	440 µL
220 mM KH ₂ PO ₄ (pH 5.1)	1 M	22 mL
0,44 mg/mL BSA	10 mg/mL	4,4 mL
1,3 mM NaN ₃	500 mM	260 µL
1,43 µM Coelenterazin	1000x	15 µL

Coelenterazin wurde erst nach der pH-Einstellung auf 5,1 mit KOH zugegeben.

3.1.4 Kristallviolett-Assay

Kristallviolett färbt adhärenente Zellen an. Tote Zellen sind nicht adhärenent und werden daher ausgewaschen. Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät, nach 24 h wie im Ergebnisteil beschrieben behandelt. Für jede Bedingung wurde mindestens ein fünffacher Ansatz

eingepant. Nach der Behandlungszeit wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 50 µL/Well Kristallviolett 2-3 min gefärbt. Natriumcitrat löst die gefärbten Zellen und ermöglicht eine gleichmäßige Färbung im Well. Anschließend wurden die Platten 3-4x mit Wasser gewaschen und trocken gelassen. Die Zellen wurden danach mit 50 µL Natriumcitrat gelöst und in einem Multiscan Gerät (Thermo scientific) untersucht. Die Extinktion bei 550 nm ist proportional zur Zellzahl und wurde mit einem Multiscan Photometers bei 595 nm ermittelt.

Kristallviolett-Färbelösung

0,5% Kristallviolett

20% Methanol

Ad ddH₂O

Natriumcitrat-Lösung

0,1 M Natriumcitrat

50% Ethanol

Ad ddH₂O

3.2 Stoffwechsel-untersuchende Methoden

3.2.1 Hypoxie-Induktion

Die hochgradige Hypoxie-Induktion wurde wie in Steinbach et al. (58) beschrieben durchgeführt: Die Zellen wurden in Gas-Beuteln für anaerobe Kulturen (Becton- Dickinson, Kat.Nr. 260683) inkubiert, wobei der Sauerstoffanteil ca. 0,1% O₂ beträgt. Bei Versuchen, in denen ein höherer Sauerstoffanteil benötigt wurde (1%, 5% und 10% O₂), wurde ein Hypoxie-Schrank der Firma Labotech (C16) verwendet.

3.2.2 Hypoglykämie-Induktion

In Experimenten, in denen Glukose-freies Medium benötigt wurden, wurde Dulbecco's modified Eagle's Glucose free medium ohne FCS und Antibiotika (SFM) verwendet, und Glukose je nach Bedarf hinzugefügt.

3.2.3 Sauerstoff-Messungen

Der Sauerstoffpartialdruck wurde in luftdichten Glasschälchen mittels eines ABL-80-Gerätes (Radiometer, Willich) gemessen. Es handelt sich hierbei um eine Mess-Möglichkeit von gelösten Gasen mittels einer Clark-Elektrode. Für nähere Angaben sei auf das Hersteller Protokoll verwiesen.

- Aufbau einer luftdichten Kammer (Glasschälchen):

Herr Dipl. Biol. Daniel Brucker entwickelte ein luftdichtes System, um den Sauerstoffverbrauch von Zellen zu messen: Dabei wurden Zellen in Glasschälchen (Ø 6 cm, Steriplan Petri dish, Kat.Nr. 2375539, Schott, Mainz) inkubiert, die mit einem passenden Glasdeckel verschlossen wurden, in den ein passendes Dichtungsgummi eingelegt wurde.

Dieses System wurde luftdicht mit zwei Metall-Klemmen verschlossen und nach 48 h wurde der Sauerstoffgehalt mittels Radiometer gemessen. Die vollständige Funktionsweise und Aufbau der Sauerstoffmessung ist der Dissertation von D. Brucker zu entnehmen.

- Schälchen-Sterilisation:

Um eine Kontamination in den Schälchen zu verhindern, wurden diese folgendermaßen gereinigt: 30 mL Sekusept aktiv (Ecolab, SAX6 817381, ein Desinfektionsmittel, das in der Chirurgie zur Gerätesterilisation verwendet wird) wurden in 3 L Wasser gegeben und 10 min gerührt. Anschließend wurden Schälchen und Deckel 30 min in dieser Lösung inkubiert, 1 min unter laufendem Wasser abgewaschen und mit 70% Ethanol besprüht und mindestens ÜN unter der Zellkultursicherheitswerkbank ausdünsten gelassen.

- Vorinkubiertes Medium:

DMEM wurde in einer Zellkulturflasche ÜN im Brutschrank bei der entsprechenden Temperatur (37°C oder 38,5°C) inkubiert, damit der Sauerstoffpartialdruck einen Wert von ca. 159 mmHg erreichen kann, was einem pO_2 -Wert in der Atmosphäre auf Meereshöhe entspricht.

- Ermittlung des Sauerstoffwertes t_0

Um den Sauerstoffverbrauch der Zellen zu ermitteln, wurde zunächst die Menge an Sauerstoff gemessen, die nach der Inkubation mit dem vorinkubierten Medium vor der Schließung der Schälchen im Medium vorhanden war. Dieser Wert wurde als t_0 angesehen. Es wurden hierfür 300 μ L des Mediums mit einer kleinen Spritze abgenommen und der Sauerstoffwert bei Zeitpunkt 0 h gemessen. Die meisten Test-Messungen ergaben stets einen Wert um 155 mmHg, so dass dieser Wert anschließend für alle Versuchsauswertungen verwendet wurde. Dieser Wert liegt etwas niedriger als der Sauerstoffdruck, der normalerweise in der Atmosphäre herrscht (21% = 159 mmHg). Da alle gemessenen Werte nach 48 h (t_{48}) auf diesen Wert bezogen wurden, entstanden dabei keine Ungenauigkeiten.

- Versuchsdurchführung:

250.000 Zellen wurden auf Glas-6-Well ausgesät. Im Falle einer Transfektion (siRNA oder transiente Plasmid-Expression) wurden die Zellen 1 h nach Aussaat transfiziert (s. Protokoll **3.1.1.7**). Nach 24 h wurden die Zellen für 1 h mit 2 mL vorinkubierten Mediums inkubiert. Anschließend wurden die Glasschälchen mit Deckel und Klammern luftdicht verschlossen. Nach 48 h wurde der Sauerstoff mittels Radiometer gemessen, die Zellen mit Trypsin abgelöst, für die Proteinbestimmung lysiert (**3.4.1** und **3.4.2**) und die Gesamtmenge an Protein ermittelt (Konzentration in μ g/ μ L x Volumen des jeweiligen Proteinlysates). Der Sauerstoffverbrauch wurde anschließend auf die jeweilige Proteinmenge in mg normiert:

$$[(O_2 t_0 - O_2 t_{48})/\text{Gesamtmenge an Protein in } \mu\text{g}]/1000 = \Delta O_2\text{-Verbrauch in mmHg/mg Protein}$$

Viele Messungen ergaben, dass nach 48 h ca. noch etwa 10% Sauerstoff im Medium vorhanden waren. Es ist nicht auszuschließen, dass es aufgrund der Entstehung eines Gradienten am Schälchenboden noch geringere Mengen an Sauerstoff herrschen könnten. Aus diesem Grund wurde zusätzlich in bestimmten Versuchen zwischen 10% und 1% O₂ gearbeitet.

3.2.4 Glukose- und Laktat-Messung

Zellen wurden ausgesät und wie im Ergebnisteil beschrieben behandelt. Anschließend wurde das Medium in ein Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert und der ÜS in ein Messgefäß überführt (Kat.Nr. 729177, Roche). Glukose (in mg/dL gemessen, umgerechnet in mmol/L: mg/dL-Wert/18) und Laktat (in mmol/L) wurden mittels Hitachi 917-Messgerät in der Diagnostik der Neurologischen Abteilung in der Universitätsklinik Frankfurt am Main gemessen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Arbeiten mit Plasmid-DNA

3.3.1.1 Plasmid-DNA-Midipräparation

Plasmid DNA wurde mittels Midiprep-Kit (Kat. Nr. K210005, Invitrogen) aufgereinigt. 20 ng Plasmid wurden in 50 µL kompetente Bakterien transformiert (**3.3.1.3**) und anschließend auf Selektion-Agarplatten ausplattiert (**3.1.1.1**) und ÜN bei 37°C inkubiert. Nach ca. 16 h wurde ein Klon gepickt, in 3 mL Selektion-LB-Medium gegeben und wieder ÜN bei 37°C inkubiert. Diese Lösung wurde wiederum in 50 mL Selektion-LB-Medium ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufreinigung des Plasmids (**3.3.1**). Die Plasmid-DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde mittels Photometer (Biophotometer 6131, Eppendorf) ermittelt. 50 bzw. 10 µg DNA pro mL (je nach Verdünnung) ergibt einen OD-Wert von 1, folglich entspricht ein OD-Wert 0,1 einer Konzentration von $0,1 \times 50 = 5$ µg DNA bzw. $0,1 \times 10 = 1$ µg DNA.

3.3.1.3 Transformation von Plasmid-DNA

80 µl DH5α-Zellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut, 20 ng Plasmid-DNA vorsichtig zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 90 Sekunden bei 42°C inkubiert, dann 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend in 500 µl LB-Medium 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert und bis auf 50 µl wurde der

ÜS verworfen. Das Pellet wurde kurz resuspendiert und die Zellen auf Agar-Platten, die das Selektionsantibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3.2 Arbeiten mit RNA

3.3.2.1 RNA-Isolierung und cDNA-Herstellung

Zellen wurden auf 24-Well-Platten ausgesät, behandelt wie im Ergebnisteil beschrieben und das Medium abgesaugt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 600 µL Trizol, die Proben wurden 5 min bei RT inkubiert, in ein neues Gefäß überführt und 140 µL Chloroform dazu gegeben. Die Proben wurden per Hand 15 Sekunden kräftig geschüttelt und anschließend 2-3 min bei RT inkubieren. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm 15 min/ 4°C wurde die obere durchsichtige Phase vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Zu den Proben wurde 1:1 70% EtOH zupipettiert, geschüttelt und auf eine Qiagen-Säule (RNAeasy) überführt. Die Aufreinigung durch die Säule erfolgte nach Protokoll.

3.3.2.2 cDNA-Synthese

Nach der RNA-Aufreinigung wurde die RNA-Konzentration mittels Photometer ermittelt, und für jede Probe der cDNA-Synthese folgender Ansatz pipettiert:

- 15 ng RNA
- +4 µL Reaktionspuffer (Vilo-Kit, Invitrogen)
- +2 µL Reverse Transkriptase (Vilo-Kit, Invitrogen)
- Ad 15 µL Wasser

Die Proben wurden anschließend 10 min bei 25°C, 2 h bei 42°C und 10 min bei 85°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

3.3.2.3 Real Time-PCR

Die RT-PCR-Analysen wurden in ein MyQ5 QRT-PCR Gerät der Firma Biorad durchgeführt. Die Produkte wurden mittels SybrGreen Fluorescein (AB-4219/b, Thermo) ermittelt. Es wurden für die Kontrollgene 18S, GAPDH und SDHA 2µL 1:50 in Wasser cDNA/Well eingesetzt, für alle anderen Zielgene 1:20. Der Mix enthielt 7 µL Wasser, 12,5 µL SybrGreen und jeweils 1,75 µL 1 µM Primer. Das Gesamtvolumen betrug 25 µL/well. Alle Ansätze wurden in Tripletts pipettiert und die Expression der Zielgene anschließend mit der MyQ5-Software ermittelt und auf die Expression der Kontrollgene normiert.

3.4 Proteinanalytische Methoden

3.4.1 Proteinlysate

Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und nach 24 h wie im Ergebnisteil beschrieben behandelt. Das Medium in dem Zellkulturbehälter wurde abgesaugt und mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein Gefäß überführt und zentrifugiert (10 min, 2.000 rpm, 4°C). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in Protein-Lyse-Puffer P resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, 4°C) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Protein-Lysepuffer P:

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

120 mM NaCl

5 mM EDTA

0,5% NP-40

Bei 4°C aufbewahren

vor Gebrauch ad 1xcomplete Tablette/10 mL

3.4.2 Konzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Bradford-Methode. Eine Stammlösung BSA (Konz. 10 mg/mL) wurde zum Gebrauch 1:10 verdünnt. In einer 96-Well-Platte wurden pro Well 50 µL Wasser vorgelegt, dann wurden die Standards und Proben laut Pipettierschema als Triplets pipettiert. 150 µL Bradford-Reagenz je Well wurden zupipetiert. Nach kurzer Inkubationszeit (2-3 min) wurde die Platte in dem Multiscan-Photometer bei 570 nm gemessen.

Pipettierschema:

Standardreihe			Proben				
0 μL BSA	0 μL BSA	0 μL BSA	Probe 1 1 μL	Probe 1 1 μL	Probe 1 1 μL		
1 μL BSA	1 μL BSA	1 μL BSA	Probe 2 1 μL	Probe 2 1 μL	Probe 2 1 μL		
2 μL BSA	2 μL BSA	2 μL BSA	Probe 3 1 μL	Probe 3 1 μL	Probe 3 1 μL		
4 μL BSA	4 μL BSA	4 μL BSA	Probe 4 1 μL	Probe 4 1 μL	Probe 4 1 μL		
6 μL BSA	6 μL BSA	6 μL BSA		Usw.			
8 μL BSA	8 μL BSA	8 μL BSA					
10 μL BSA	10 μL BSA	10 μL BSA					
12 μL BSA	12 μL BSA	12 μL BSA					

3.4.3 SDS-PAGE

Eine SDS-PAGE ist eine diskontinuierliche SDS-Gel-Elektrophorese unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen. Dabei werden Proteinlysate auf einer Gelmatrix aufgetrennt. Die Proben (10-40 μg /Tasche) wurden zunächst in 2xSDS Lämmli-Ladepuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C denaturiert.

SDS Lämmli-Ladepuffer (2x)

100 mM Tris-HCl pH 6,8

4% SDS

0,2% Bromphenolblau

20% Glycerol

Ad ddH₂O

bei Raumtemperatur aufbewahren

frisch vor Gebrauch β -Methanol (1/10 Vol) hinzufügen.

Elektrophorese

Die Gelkammern wurden zusammengebaut, anschließend wurde das Trenngel gegossen, mit 1 mL Isopropanol überschichtet. Nach dem Durchpolymerisieren des Trenngels wurde der Isopropanol verworfen und anschließend das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Taschen-Kamm in das Sammelgel gesteckt. Nach dem Durchpolymerisieren des Sammelgels

wurden der Kamm vorsichtig gezogen und die Taschen mit Wasser ausgewaschen, um eventuelle Gelreste zu entsorgen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	<u>8% Trenngel</u>	<u>10% Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
30% Acrylamid mix	1,3 mL	1,7 mL	0,33 mL
1,5 M Tris-HCl, pH=8,8	1,3 mL	1,3 mL	-
0,5 M Tris-HCl, pH=6,8	-	-	0,5 mL
ddH ₂ O	2,3 mL	2 mL	1,15 mL
10% SDS	0,05 mL	0,05 mL	0,02 mL
TEMED	0,003 mL	0,002 mL	0,002 mL
10% APS	0,05 mL	0,05 mL	0,02 mL

Die Mini-PTOTEAN II Electrophoresis Cell wurde zusammengesetzt, die Gele eingeführt und die Kammer mit 1x SDS Laufpuffer gefüllt.

SDS Laufpuffer (5x)

25 mM

193 mM Glycin

0,5% SDS

ad ddH₂O

In die erste Tasche wurden 5 µL Marker (Seablue) gegeben, anschließend wurden die Proben in die jeweiligen Taschen geladen. Unmittelbar nach dem Laden der Proben wurde die Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 200 mA gestartet.

3.4.4 Western-Blot

Nach dem Lauf wurden die Gele auf eine Nitrozellulose-Membran mittels Western-Blot übertragen. Alle Schwämme und Membranen wurden zunächst 5 min in 1x Transfer-Puffer benetzt und dann laut Hersteller-Protokoll zusammengesetzt (Mini Transblot TC, Kat.Nr. 170-3930, Biorad). Das Kühlelement wurde in die Kammer transferiert, mit 1x kaltem Transfer-Puffer wurde die Kammer überschichtet, das Gerät verschlossen und die Proteine auf die Membran bei einer konstanten Spannung von 100 Volts 90 min übertragen.

WB-Laufpuffer(1x)	WB-Transfer-Puffer (10x)	WB-Transfer-Puffer(1x)
25 mM Tris	25 mM Tris-HCl	10% 10xTransfer-Puffer
250 mM Glycin	192 mM Glycine	20% Methanol
0,1% SDS	Ad ddH ₂ O	Ad ddH ₂ O
		Auf 4°C kühlen

Anschließend wurden die Membranen mit 5% Milchpulver/TBS geblockt (4°C ÜN oder 1 h RT) und mit dem Zielprotein-Antikörper inkubiert (gelöst in TS-TMBSA, 4°C ÜN oder 1,5 h RT, s.

Tabelle 2 für die jeweilige Erstantikörper-Konzentration).

TS-TMBSA	TBS (10x)
10 mM Tris-HCl	1,5 M NaCl
150 mM NaCl	77 mM Tris-HCl pH 7,5
0,1% Tween 20	Ad ddH ₂ O
5% Magermilchpulver	
2% BSA	
0,01% Natriumazid	
Ad ddH ₂ O	
pH 7,4-7,6 einstellen, bei -20°C aufbewahren	

Nach 3x waschen mit TBS-Tween (0,05%) wurden die Membranen mit dem Zweitantikörper (1:5.000) ÜN bei 4°C oder 1 h bei RT inkubiert, anschließend 3x mit TBS-Tween gewaschen und die Proteinbanden mittels Chemolumineszenz detektiert.

Chemolumineszenzpuffer:

Lösung A:	Lösung B:
200 mL 0,1 M Tris-HCl pH8,6	11 mg p-Hydroxycumarin
50 mg Luminol	-säure
	10 mL DMSO

Ansatz für eine Membran:

- 1 mL Lösung A
- 100 µL Lösung B
- 0,3 µL H₂O₂ (30%)

Gut mischen und 2 min auf der Membran inkubieren lassen

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die metabolischen Auswirkungen einer p53-Suppression unter Hypoxie und Nährstoffmangel in Gliomzellen untersucht. Im tumorösen Gewebe geht man von einem pO_2 von weniger als 10 mmHg aus, oft herrscht auch fast vollkommene Anoxie ($\leq 0,1\% O_2$) (95, 98). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Versuche u.a. unter verschiedenen Sauerstoff-Bedingungen durchgeführt (0,1%, 1%, 5%, 10% und 21% O_2). Gleichwohl wurde Nährstoffmangel induziert (2 mM Glukose in Serum-freien Medium (SFM)), um die Tumormikromilieu-Bedingungen im Gewebe möglichst zu simulieren. Vorrangig wurden dabei die Regulierung von p53 (**Abschnitt 4.1**), die Auswirkungen einer p53-Inaktivierung unter Tumormikromilieu-Bedingungen (**Abschnitt 4.2**) und die metabolischen Funktionen zweier bekannter p53-Zielgene, der *Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2* (SCO2) (**Abschnitt 4.3**) und des *Tp53-Induced Regulator of Glycolysis and Apoptosis* (TIGAR) (**Abschnitt 4.4**), untersucht. Beide Gene sind erst seit wenigen Jahren als p53-Zielgene bekannt (33, 39) und ihre jeweiligen Funktionen noch weitgehend unerforscht. Desweiteren wurde ein Zusammenhang zwischen TIGAR mit der *Transketolase-Like 1* (TKTL1), ein in Tumoren häufig vorkommendes Isoenzym der Transketolase entdeckt (151-154, 244), so dass hier weitere Untersuchungen stattfanden (**Abschnitt 4.5**).

4.1 p53-Regulierung unter Nährstoff- und Sauerstoffmangel

4.1.1 Vorstellung der verwendeten Systemen

Um zunächst Effekte einer p53-Suppression unter Tumormikromilieu-Bedingungen zu untersuchen, wurde mit drei verschiedenen p53-inaktivierenden Systemen gearbeitet. Im ersten System wurde eine Gensuppression von p53 mittels einer *short hairpin* RNA (shRNA) in LNT-229-Zellen erzielt (LNT-229pSUPERpuro-p53shRNA, oder kurz LNT-229p53sh). Als Kontrolle dienten LNT-229pSUPERpuro-scrambled-shRNA-Zellen (kurz: LNT-229puro). Im zweiten System wurde eine Temperatur-sensitive murine p53-Mutante eingesetzt (LNT-229pLTRcG-hygro-p53^{V135A}, LNT-229p53ts genannt). Als Kontrolle dienten hier LNT-229pLTRcG-hygro-Zellen (LNT-229hygro, p53^{wt}). Als drittes System wurden Kolonkarzinomzellen verwendet, in denen durch homologe Rekombination p53 deletiert wurde (HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}, Labor Vogelstein). Diese Zellen sind ein gut etabliertes System (245-247) und wurden bereits bei Matoba et al. (39) und Bensaad et al. im Jahre 2006 (33) verwendet und dienten somit als Kontrolle in den jeweiligen SCO2- und TIGAR-Experimenten.

Um die Effizienz der p53-Suppression in diesen Systemen zu überprüfen, wurde zunächst die Proteinexpression mittels Western-Blot untersucht. Der Nachweis erfolgte durch den p53-sc263-Antikörper für das humane p53 Protein sowie durch den p53-Ab4-Antikörper für das

murine p53-Protein in dem Temperatur-sensitivem System (s. Antikörper unter **2.1.6** und Protokolle unter **3.4.3** und **3.4.4**). Sowohl in dem shRNA- als auch in dem dominant negativen Temperatur-sensitiven System und dem p53-*Knockout*-System konnte eine starke bis gänzliche Suppression der endogenen p53-Expression erreicht werden. Bei den LNT-229p53ts-Zellen erkennt der p53sc263-Antikörper beide p53-Formen, so dass hier eine starke p53-Expression zu erkennen war. Die p53-Temperatur-sensitive Mutante war nur bei den LNT-229p53ts-Zellen zu erkennen (p53-Ab4). Bei den HCT116 p53^{-/-}-Zellen wurde eine vollständige p53-Deletion bestätigt (**Abbildung 4-1 A**). Um die Effektivität der Bindungsaffinität an p53-bindende Sequenzen und die transkriptionale Aktivität von p53 in den verwendeten Systemen zu ermitteln, wurden p53-Luziferase Untersuchungen (p53-Reportergen-Assay) durchgeführt (**3.1.3**). Hierbei bindet p53, falls es in der Zelle vorhanden und funktionsfähig ist, an spezifische p53-Bindesequenzen. Diese sind kurz vor einen Luziferase-Promotor platziert und werden bei p53^{wt}-Status gebunden und aktivieren den Luziferase-Promotor. Die Transkriptionsaktivität von p53 korreliert mit der Stärke des Lichtsignals der Luziferase.

Sowohl in LNT-229puro-, in LNT-229hygro- als auch in HCT116 p53^{+/+}-Zellen war eine starke p53-Transaktivität festzustellen, während in den jeweiligen p53-supprimierten Zellen (jeweils p53sh-, p53ts- bei 38,5°C und HCT116p53^{-/-}-Zellen) eine nahezu komplette Suppression der p53- Transaktivität zu verzeichnen war. (**Abbildung 4-1 B**).

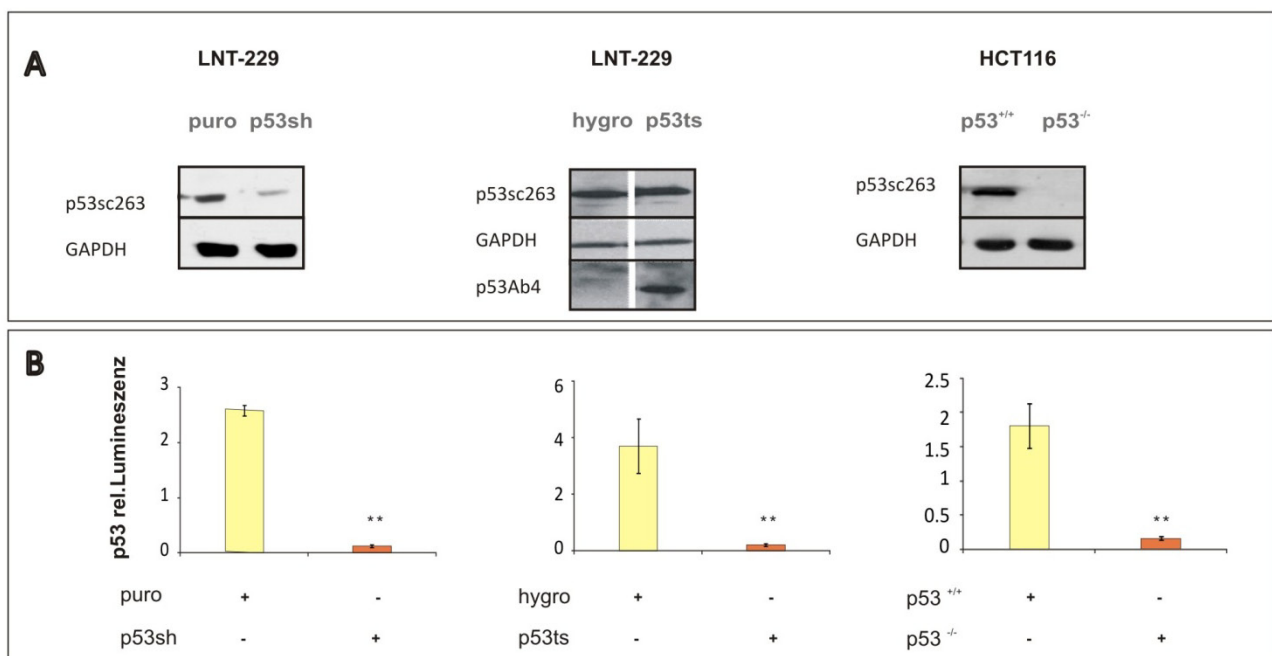


Abbildung 4-1: Expression (A) und funktionelle Suppression (B) von p53

Die Expression des endogenen (p53sc263) und exogenen p53-Proteins (Ab-4) wurde in LNT-229puro- und LNT-229p53sh-, LNT-229hygro- und LNT-229p53ts-, und in HCT116 p53^{+/+}- und HCT116 p53^{-/-}-Zellen mittels Western-Blot ermittelt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Der p53-sc263-Antikörper erkennt sowohl das endogene als auch das murine p53-Protein, der p53-Ab4-Antikörper nur das murine p53 (A). Antikörper s. unter 2.1.6.

Für die p53-Transaktivität wurden LNT-229puro- und LNT-229p53sh-, LNT-229hygro- und LNT-229p53ts und HCT116 p53^{+/+} - und HCT116 p53^{-/-}-Zellen 24 h nach Aussaat mit 150 ng p53-Luziferase-Reporter und 20 ng pRL-CMV (Renilla) mittels 0,2 μ L Metafectene Pro transfiziert (alle Werte für 96-Well Assay). 36 h nach Transfektion wurden die Zellen für 16 h mit VM unter 21% Sauerstoff behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert (B).

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.0001 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.1.2 p53-vermittelte Zelltod-Induktion

In vielen Paradigmen wird über p53^{wt} Apoptose eingeleitet. Es ist bekannt, dass p53^{wt} z.B. über CD95/FasL- (248-254) und TRAIL/Apo2L Zelltod (Apoptose) einleiten kann (255, 256). Es sollte im Folgenden überprüft werden, ob dies auch in dieser Arbeit verwendeten Gliomzellen der Fall ist. Hierfür wurden LNT-229puro- und LNT-229p53sh-Zellen in 24-Well ausgesät, nach 24 h für 24 h mit 0, 10 und 100 ng/ μ L Apo2L (Abbildung 4-2 A) oder mit 0, 4 und 20 ng/mL FasL (Abbildung 4-2 B) behandelt und anschließend der Zelltod mittels PI-FACS ermittelt. Es zeigte sich, dass p53^{mt}-Zellen weniger sensible auf Apo2L als auch auf TRAIL reagierten als p53^{wt}-Zellen.

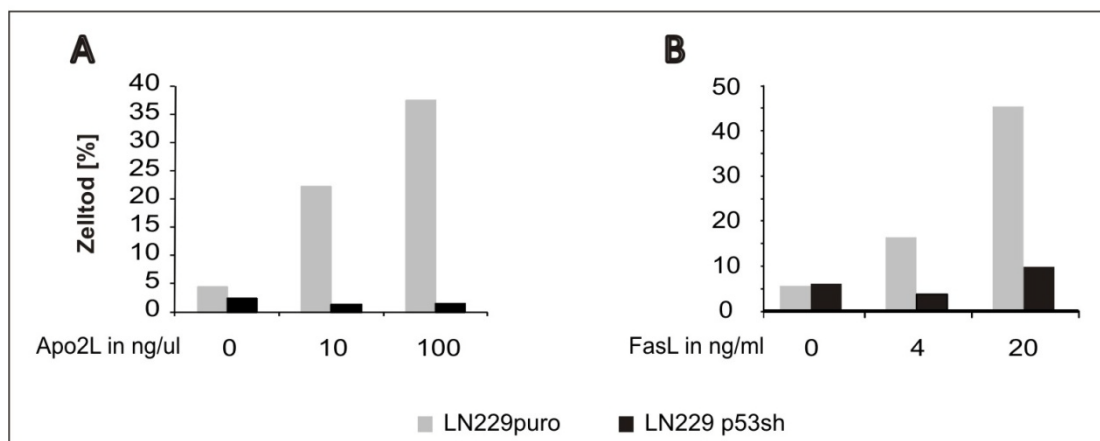


Abbildung 4-2: p53-vermittelter Apo2L- und FasL-Zelltod

LNT-229puro und LNT-229p53sh-Zellen wurden in 24-Well ausgesät, nach 24 h für 24 h mit 0, 10 und 100 ng/ μ L Apo2L (A) oder mit 0, 4 und 20 ng/mL FasL (B) behandelt. Der Zelltod wurde mittels PI-FACS ermittelt. Exemplarisches Beispiel von n=2.

4.1.3 Regulation von p53 unter Nährstoff- und Sauerstoffmangel

Die p53-Regulation unter hypoxischen Bedingungen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So wird sowohl eine transkriptionale Herunterregulierung als auch eine Hemmung der p53-Transaktivität durch HIF-1 α , aber zugleich auch eine Verstärkung der Transkription

beschrieben (29, 257-260). Die Regulation durch Nährstoffmangel ist noch unvollständig erforscht, überwiegend scheint hier die Aktivierung der AMPK über die AMP/ATP-Ratio eine Rolle zu spielen (26, 27, 80, 113). Auch scheinen p53 und seine Zielgene gewebe- oder zellspezifisch reguliert zu sein (121, 261-265).

Um die p53-Regulation in Gliomzellen unter Tumormikromilieu-Bedingungen zu untersuchen, wurden Expression und funktionelle Aktivität von p53 unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen verglichen. Hierfür wurden LNT-229puro- und LNT-229p53sh-, LNT-229hygro- und LNT-229p53ts-, und HCT116 p53^{+/+}- und HCT116 p53^{-/-}-Zellen mit 2 mM Glukose in SFM unter 21%, 1% bzw. 0,1% Sauerstoff für 24 h behandelt. Der Nachweis von p53 erfolgte durch den p53-sc263-Antikörper für das humane p53 und den p53-Ab4-Antikörper für das murine p53-Protein (**3.4.3** und **3.4.4**). Es zeigte sich, dass hypoglykämische (2 mM Glukose, SFM) und stark hypoxische Bedingungen (0,1% O₂) auf Proteinebene nur in den LNT-229puro-Zellen einen (geringen) Effekt auf die p53-Menge hatten: Je stärker die Hypoxie war, desto mehr p53-Protein war vorhanden. Dieser Effekt war jedoch nicht in den beiden anderen verwendeten Systemen LNT-229hygro/p53ts und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-} zu beobachten: Hier konnte keine p53-Induktion durch Hypoxie nachgewiesen werden (**Abbildung 4-3 A**), so dass hier keine einheitliche Regulierung der Proteinmenge gezeigt werden konnte. Gleichwohl wurde die p53-Transaktivitätsfähigkeit unter denselben Bedingungen mit dem p53-Luziferase-Reporter-Assay untersucht (**3.1.3**).

Für das Temperatur-sensitive System wurden die Experimente bei 38,5°C durchgeführt, um eine eventuelle Veränderung der Transaktivitätsfähigkeit von p53 unter hypoxischen Bedingungen zu analysieren. Auch hier zeigte sich bei den LNT-229puro-Zellen eine leichte, jedoch nicht signifikante Verminderung der p53-Aktivität in der Hypoxie im Vergleich zur Normoxie. In keinem der verwendeten Systeme war eine signifikante Veränderung bzw. Verstärkung der p53-Aktivität zu erkennen, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Transaktivität von p53 unter diesen Bedingungen weitestgehend erhalten bleibt (**Abbildung 4-3 B**), bzw. dass p53 je nach Stress-Bedingung unterschiedlich stark an DNA-Bindedomäne binden oder unterschiedliche Zielgene aktivieren könnte (82, 266, 267).

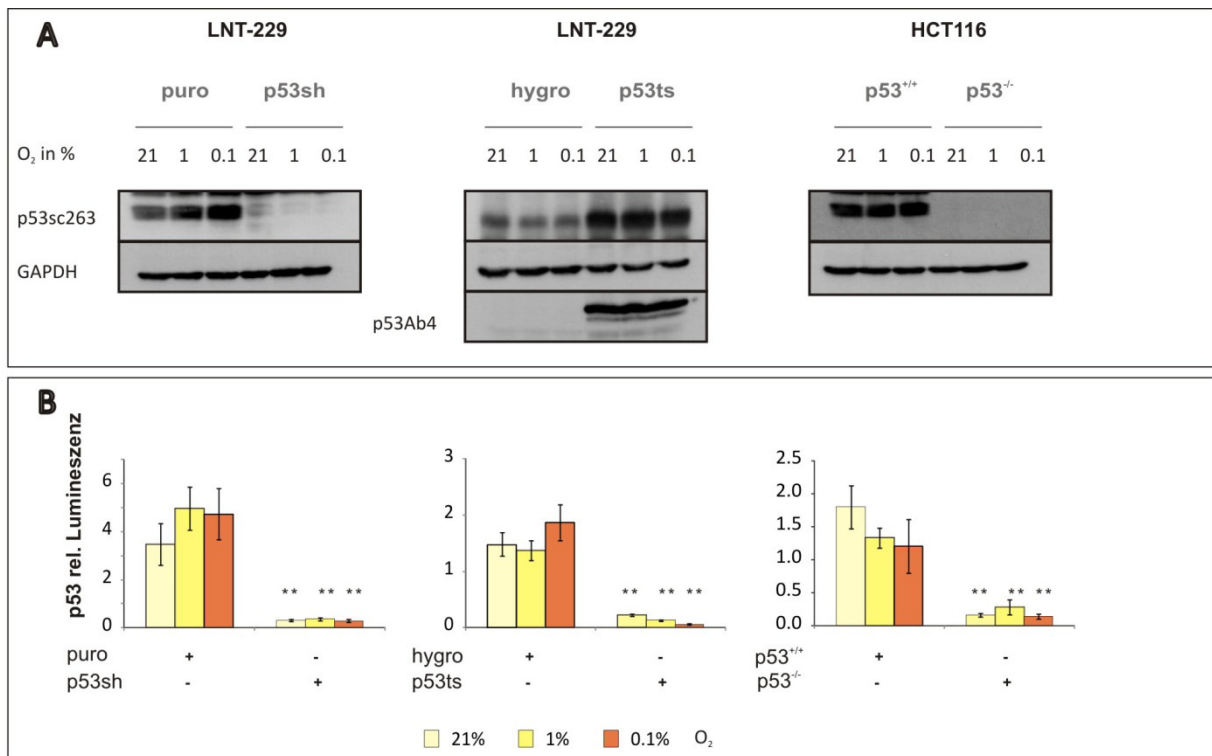


Abbildung 4-3: Proteinexpression und funktionelle Aktivität von p53 unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie

Die Expression des endogenen p53-Proteins wurde in LNT-229puro/p53sh-, LNT-229hygro/p53ts- und als zusätzliches System in HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}-Zellen mittels Western-Blot ermittelt. Der p53-Ab4-Antikörper erkennt das murine p53-Protein, der p53-sc263-Antikörper sowohl das endogene als auch das murine p53-Protein. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat nach Waschen mit 1xPBS mit 2 mM Glukose in SFM und für 24 h mit 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff behandelt (A).

Für die p53-Transaktivität wurden LNT-229puro/p53sh-, LNT-229hygro/p53ts- und HCT116 p53^{+/+} und p53^{-/-}-Zellen 24 h nach Aussaat mit je 150 ng p53-Luziferase-Reporter und je 20 ng pRL-CMV (Renilla) mittels 0,2 μ L Metafectene Pro transfiziert (Angaben für 96-Well-Ansatz). 36 h nach Transfektion wurden die Zellen nach Waschen mit PBS für 16 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 21%, 1% oder 0,1% O₂ behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert (B).

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.0001 (**) als hoch signifikant angesehen.

Im zeitlichen Verlauf der p53-Protein- und Transaktivitätsuntersuchungen (16, 24 und 36 h) in LNT-229-Zellen zeigte sich, dass unter Normoxie unter Nährstoffmangel zunächst die p53-Proteinkonzentration nicht beeinflusst war. Erst bei längerer Inkubation und vollständigem Verbrauch der Nährstoffe war eine reduzierte Proteinkonzentration festzustellen (Abbildung 4-4 A). Da nicht unbedingt die Proteinkonzentration entscheidend für die Aktivität eines Proteins ist, wurde der p53-Phosphorylierungsstatus an Ser15 ebenfalls mittels WB unter denselben Bedingungen untersucht (Abbildung 4-4 A).

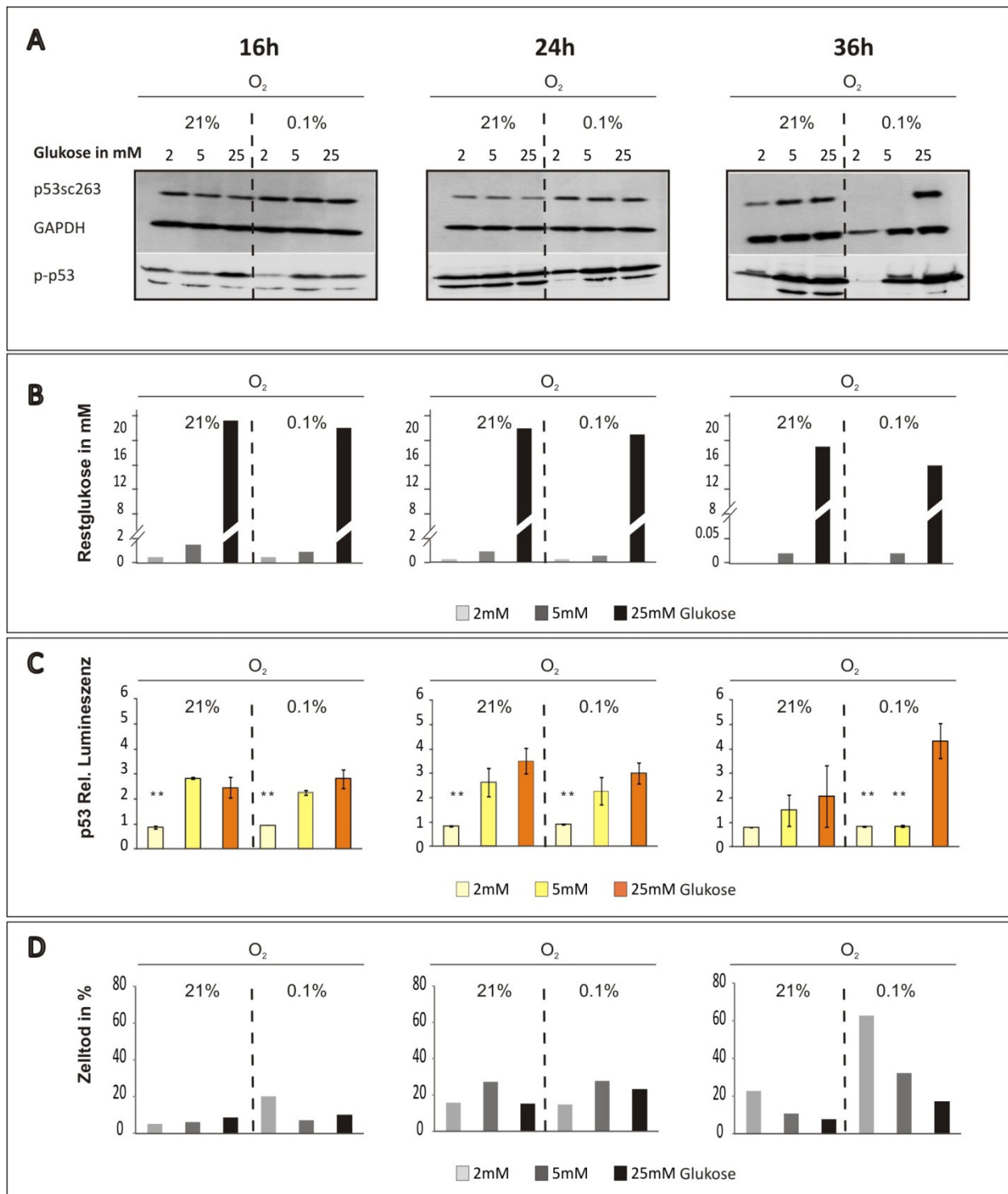


Abbildung 4-4: Zeitbedingte Proteinexpression, funktionelle Aktivität von p53 und Zelltod in Gliomzellen unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie

Die Proteinmenge des endogenen p53 und der Phosphorylierungsstatus von pSer15-p53 wurden in LNT-229-Zellen mittels Western-Blot ermittelt (Antikörper s. **Tabelle 2**). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Zellen wurden nach einmaligem PBS Waschen mit 2, 5 oder 25 mM Glukose in SFM und 21% oder 0,1% Sauerstoff für 16, 24 oder 36 h behandelt. (**A**).

Der Glukoseverbrauch wurde mittels HITACHI 917 gemessen (**3.2.4**), die Restglukose-Werte sind der Abb. **B** zu entnehmen. Für die p53-Transaktivität wurden LNT-229-Zellen 24 h nach Aussaat mit 150 ng p53-Luziferase-Reporter und 20 ng pRL-CMV (Renilla) mittels 0,2 μ L Metafectene Pro transfiziert (alle Werte für 96-Well Assay). 36 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 2, 5 oder 25 mM Glukose in SFM und 21% oder 0,1% Sauerstoff für 16, 24 oder 36 h behandelt.

Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert (**C**). Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. Bei Luziferase-Assay $n=4$, Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. $n=3$, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte $p < 0.0001$ (**) als hoch signifikant angesehen. Gleichzeitig wurde der Zelltod unter denselben Bedingungen mittels PI-FACS (s. 3.1.2.1) ermittelt (**D**).

Dieser Serinrest wird u.a. unter Nährstoffmangel phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt, dass p53 in den Zellzyklus eingreifen kann (114). Die Konzentration an p-Ser15 relativ zum endogenen Protein verstärkte sich je länger die Behandlung andauerte, wahrscheinlich auch bedingt durch den Serummangel. Nach 36 h ging die Phosphorylierung an p53Ser-15 zurück, wahrscheinlich auch bedingt durch den allgemeinen Protein-Abbau zu diesem Zeitpunkt.

Auch ließ sich beobachten, dass die p53-Transaktivität abhängig von der Glukosekonzentration war (**Abbildung 4-4 B**), die die Zellen noch zur Verfügung hatten. So war bei 2 mM Glukose in SFM p53 weniger transkriptionsaktiv als bei 5 oder 25 mM Glukose in SFM (**Abbildung 4-4 C**). Bei 36 h andauernder Hypoxie und Glukosedepletion (2 mM Glukose) waren ein Großteil der Zellen schon tot, und somit die Transaktivität nicht mehr messbar (**Abbildung 4-4 C und D**). Allgemein läßt sich sagen, dass die Stärke der Transaktivität nicht immer im Einklang stand mit der Menge an vorhandenem Protein (beim 24 h-Wert war die Proteinmenge ungeachtet der Glukose-Konzentration unverändert, während der Transaktivitätsassay ergab, dass die p53-Transaktivität sank, je geringer die Glukose-Konzentration war (**Abbildung 4-4 C**).

Waren keine Nährstoffe mehr vorhanden (ab 24 h bei 2 mM Glukose), so wurde der Zelltod eingeleitet (**Abbildung 4-4 D**).

4.1.4 Regulation von HIF-1 α

4.1.4.1 p53-bedingte Regulation von HIF-1 α in Gliomzellen

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α wird unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert (101, 106, 268) und kann Zielgene aktivieren, die z.B. eine verstärkte Glykolyse (81, 100, 102, 103) oder Angiogenese (269-272) induzieren. Unter hypoxischen Bedingungen kann HIF-1 α die p53-Transaktivität hemmen, da es zu einer Konkurrenz zwischen p53 und HIF-1 α um die Bindung an der CH1-Domäne des Transkriptionsfaktors p300 kommt (28). Um diesbezüglich die p53-Funktionalität unter hypoxischen Bedingungen in unseren Zellen zu überprüfen, wurde ein HIF-1 α -Transaktivitätsassay in stabilen LNT-229puro/p53sh- und LNT-229hygro/p53ts-Zellen unter Nährstoffmangel und variablen Sauerstoffbedingungen durchgeführt (2 mM Glukose in SFM unter 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 16 h).

HIF-1 α ist unter Normoxie (21% O₂) zumindest als Transkriptionsfaktor in den beschriebenen Zellsystemen nicht aktiv, was mit Ergebnissen in schon zuvor publizierten Daten übereinstimmt (101, 242). Es konnte hier die bekannte Dichotomie zwischen p53 und HIF-1 α (28, 273) demonstriert werden: In Abwesenheit von p53 wird HIF-1 α sowohl unter moderater (1% O₂) als auch hochgradiger Hypoxie (0,1% O₂) verstärkt transkriptionsaktiv (**Abbildung 4-5**).

Die HIF-1 α -Transaktivität war mindestens i) 3x stärker in LNT-229p53sh-Zellen im Vergleich zu den LNT-229p53^{wt}-Zellen (relative Lumineszenz-Werte unter 1% O₂ bei LNT-229puro:LNT-229p53sh=4:12, unter 0,1% O₂ =4:16) und ii) 2x stärker in LNT-229p53ts in Vergleich zu den LNT-229p53^{wt}-Zellen (relative Lumineszenz-Werte unter 1% O₂ bei LNT-229hygro:LNT-229p53ts =4:8, unter 0,1% O₂ =4:10).

War p53 supprimiert (LNT-229p53ts und LNT-229p53sh-Zellen), stieg die HIF-1 α -Transaktivität an, hierbei auch abhängig vom Hypoxiegrad: Je anoxischer die Milieubedingungen, desto verstärkter war die HIF-1 α -Transaktivität (relative Lumineszenzwerte 1% O₂:0,1% O₂ = 12:15 im LNT-229p53sh-System, und 8:10 im LNT-229p53ts-System).

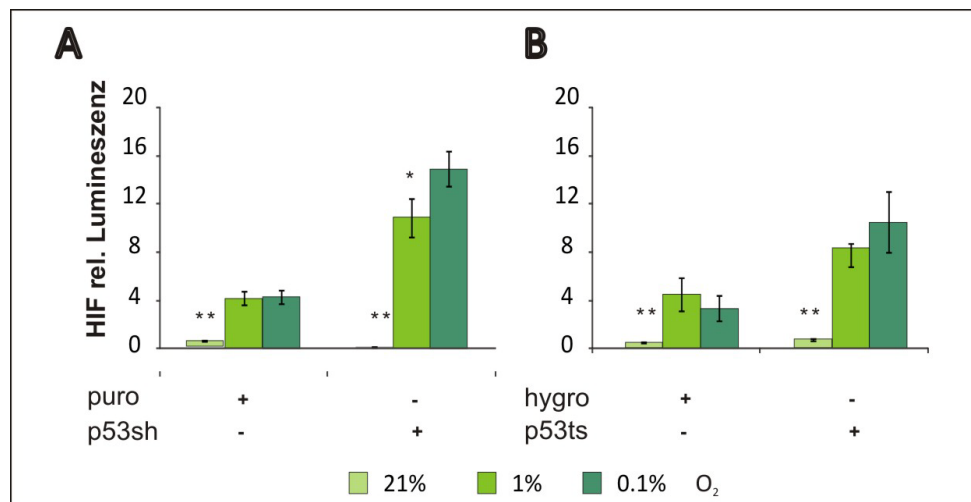


Abbildung 4-5: Funktionelle Aktivität von HIF-1 α unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie in Gliomzellen

Für die HIF-1 α -Transaktivität wurden LNT-229puro/p53sh- (A) und LNT-229hygro/p53ts-Zellen (B) 24 h nach Aussaat mit je 150 ng HIF-1 α -Luziferase-Reporter und je 20 ng pRL-CMV (Renilla) mittels 0,2 μ L Metafectene Pro transfiziert (Angaben für 96-Well-Ansatz). 36 h nach Transfektion wurden die Zellen nach Waschen mit PBS für 16 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 21%, 1% oder 0,1% O₂ behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die HIF-1 α -Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert.

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0,05 (*) wurden als signifikant, p < 0,0001 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.1.4.2 Regulation von HIF-1 α unter Nährstoffmangel und Hypoxie

Da p53 in der Hypoxie stark durch HIF-1 α reguliert wird (28), wurde die Transaktivität von HIF-1 α mittels HIF-1 α -Luziferase-Reporter unter den genannten Bedingungen ermittelt. Wie zu erwarten, war keine HIF-1 α -Transaktivität in der Normoxie zu erkennen, da die α -Untereinheit von HIF an zwei Prolyl-Resten unter diesen Bedingungen hydroxyliert und abgebaut wird (242). Da HIF-1 α unter Normoxie nicht stabilisiert wird, konnte es unter dieser Bedingung auch auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 4-6 A und B**). Unter Hypoxie war die HIF-1 α -Transaktivität abhängig von der vorhandenen Glukose; die Glukosekonzentration an sich schien keine Effekte auf die Transaktivität von HIF-1 α zu haben (**Abbildung 4-4 B** und **Abbildung 4-6 B**). Es konnte eine Verstärkung der HIF-1 α -Transaktivität unter Hypoxie nachgewiesen werden, die, je schwächer die Transaktivität von p53 wurde (**Abbildung 4-4 C**), zunahm. Bei 36 h andauernder Hypoxie und Glukosedepletion (2 mM Glukose) waren ein Großteil der Zellen schon tot, und somit die Transaktivität nicht mehr messbar (**Abbildung 4-4 D** und **Abbildung 4-6**).

Die Glukosedepletion bei 36h 2mM Glukose (**Abbildung 4-4 B**) korrespondierte mit einer Verstärkung des Zelltodes (**Abbildung 4-4 D**) und mit einer Suppression der HIF-1 α -Transaktivität unter diesen Bedingungen (**Abbildung 4-6 B**).

Für die nachfolgenden Untersuchungen der Zellen unter Hypoxie wurde der Zeitwert 24 h ausgewählt, da es hier noch zu keiner Veränderung der p53-Menge kam und der Hypoxie-induzierte Zelltod in der Kontrolle noch relativ gering war. Eine Glukosekonzentration von 2 mM wurde in den nachfolgenden Versuchen verwendet, da der Einfluss von Glukose-Mangel und Hypoxie in Bezug auf die metabolischen p53-Funktionen untersucht werden sollte.

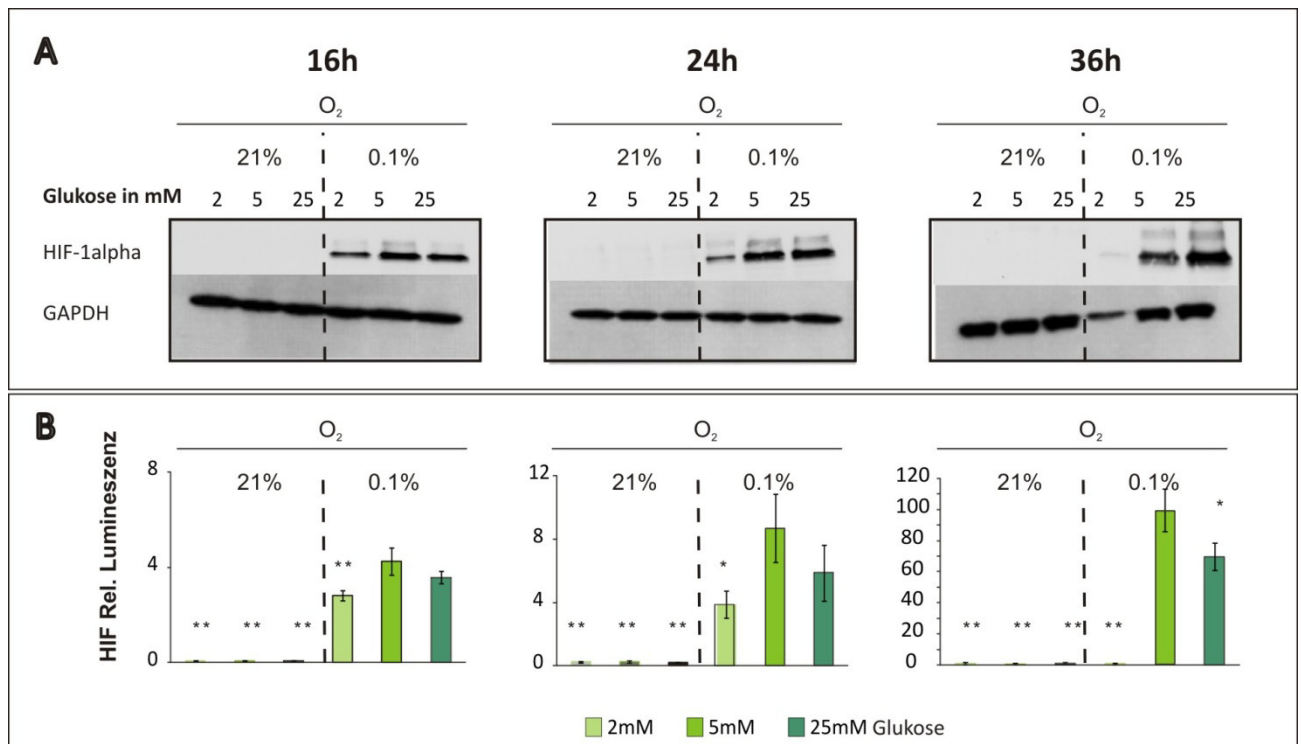


Abbildung 4-6: Zeitbedingte Proteinexpression und funktionelle Aktivität von HIF-1 α in Gliomzellen unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie

Die Proteinmenge von HIF-1 α wurden in LNT-229-Zellen mittels Western-Blot ermittelt (Antikörper s. **Tabelle 2**). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat nach einmaligem PBS Waschen mit 2, 5 oder 25 mM Glukose in SFM und 21% oder 0,1% Sauerstoff für 16, 24 oder 36 h behandelt (**A**). Für die HIF-1 α -Transaktivität wurden LNT-229-Zellen 24 h nach Aussaat mit 150 ng HIF-1 α -Luziferase-Reporter und 20 ng pRL-CMV (Renilla) mittels 0,2 μ L Metafectene Pro transfiziert (alle Werte für 96-Well Assay). 36 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 2, 5 oder 25 mM Glukose in SFM und 21% oder 0,1% Sauerstoff für 16, 24 oder 36 h behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zellysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die HIF-1 α -Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert (**B**). Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.2 Auswirkungen einer p53-Inaktivierung unter Tumormikromilieu-Bedingungen

4.2.1 Die Inaktivierung von p53 verstärkt die Sensibilität von Gliom- und Kolonkarzinomzellen gegenüber Nährstoffmangel- und Hypoxie-induziertem Zelltod

Die Zahl der Tumoren, die einen p53^{wt}-Status innehaben, schwankt je nach Literaturangaben um 30-70% (42, 43, 274). Primäre Gliome, die einen Großteil der Glioblastome ausmachen (42)) und einige Kolon- und Mammakarzinomzellen (247, 275) haben fast immer einen p53^{wt}-Status und sind nicht minder aggressiv oder invasiv als p53^{mt}-Tumoren. So wurde daher vermutet, dass p53 Funktionen ausüben könnte, die für den Tumor von Vorteil wären. Um den Effekt einer p53-Suppression auf die Sensitivität von Gliomzellen gegenüber

hypoxischen und Nährstoffmangel-Bedingungen zu untersuchen, wurde der Anteil vitaler und toter Zellen in LNT-229puro/p53sh-, LNT-229hygro/p53ts- und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}-Zellen unter Nährstoff- und Sauerstoffmangel (2 mM Glukose in SFM und 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 24 h) mittels PI-FACS-Analyse ermittelt (s. **3.1.2.1**). Unter normoxischen Bedingungen ließ sich kein Unterschied hinsichtlich des Zelltodes zwischen p53^{wt}- und -supprimierten Zellen erkennen. Die Suppression von p53 führte hingegen in allen drei Systemen sowohl unter moderater (1% O₂) als auch unter hochgradiger Hypoxie (0,1% O₂) zu einer signifikanten Steigerung des Zelltodes gegenüber p53^{wt}-Zellen (**Abbildung 4-7**). In der moderaten Hypoxie fand man:

- in LNT-229puro-Zellen 9,8% und in LNT-229p53sh-Zellen 29,1% Zelltod (**A**)
- in LNT-229hygro-Zellen 4,4% und in LNT-229p53ts-Zellen 14,2% Zelltod (**B**)
- in HCT116 p53^{+/+}-Zellen 17,7% und in HCT p53^{-/-}-Zellen 36,7% Zelltod (**C**)

In der hochgradigen Hypoxie wiederum:

- in LNT-229puro-Zellen 45,1% und in LNT-229p53sh-Zellen 67,2% Zelltod (**A**)
- in LNT-229hygro-Zellen 28,3% und in LNT-229p53ts-Zellen 53,7% Zelltod (**B**)
- in HCT116 p53^{+/+}-Zellen 26,7% und in HCT p53^{-/-}-Zellen 41,6% Zelltod (**C**)

p53^{wt}-Gliomzellen und die Kolonkarzinomzellen HCT116p53^{+/+} hatten folglich unter nährstoffarmen- und hypoxischen Bedingungen einen Vorteil gegenüber p53-mutierten Zellen, wobei das Ausmaß des Zelltodes allgemein unter 1% O₂ etwas schwächer war als unter Anoxie, dafür war aber der Unterschied zwischen p53^{wt} - und p53^{wt-defizient}-Zellen unter 1% O₂ stärker ausgeprägt. p53 konnte folglich diese Tumorzellen vor einem Hypoxie-induzierten Zelltod schützen.

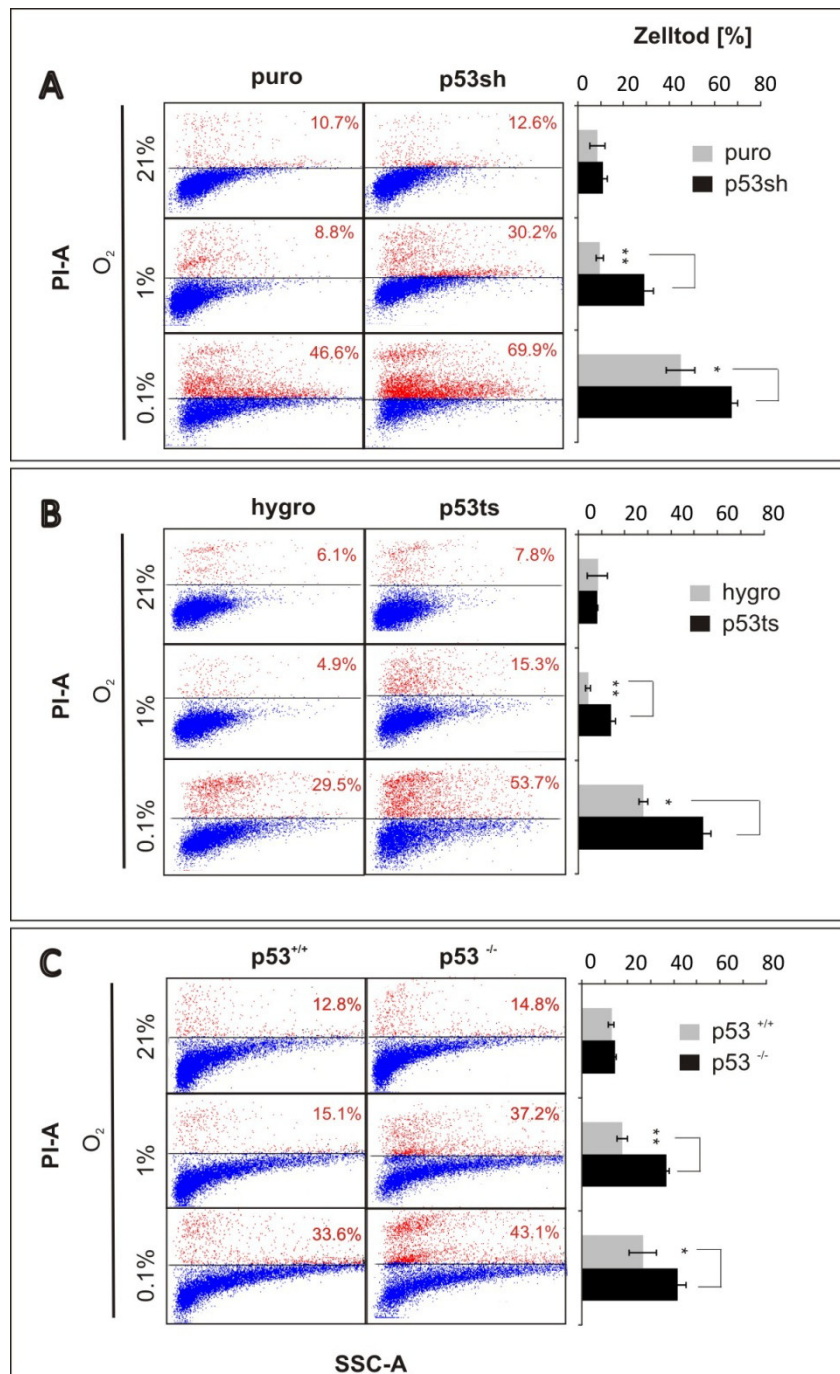


Abbildung 4-7: Zelltod in Abhängigkeit des p53-Status unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie

LNT-229puro/p53sh- (A), LNT-229hygro/p53ts- (B) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-} (C)-Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit PBS gewaschen, anschließend mit 2 mM Glukose in SFM und 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 24 h behandelt. Der Zelltod wurde danach mittels PI-FACS untersucht (s. 3.1.2.1). Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.2.2 Sauerstoffmangel führt p53-abhängig zu steigenden intrazellulären ROS-Konzentrationen

Viele ROS entstehen physiologischer Weise unter Normoxie durch das Enzym NADPH-Oxidase (276, 277) und durch die mitochondriale Atmungskette (199). Diese ROS-Entstehung ist aber gering, erst durch Abbrüche der Atmungskettenreaktionen, z.B. durch Hypoxie, entstehen erheblich vermehrt ROS. p53 spielt eine wichtige, z.T. umstrittene Rolle in der Entscheidung über Überleben oder Apoptose unter Stress-Bedingungen in Bezug auf die Regulation von ROS. So wiesen einige Publikationen darauf hin, dass p53 die Konzentrationen von ROS senken kann (33, 213), indem z.B. die Expression der Sestrine 1 und 2 induziert wird. Diese reduzieren die ROS-Menge und verhindern dadurch DNA-Schäden und Tumorentwicklung unter schwachen Stress-Bedingungen (21). Andere Autoren wiederum zeigten, dass p53 ROS-Konzentrationen verstärken kann und es dadurch zur Einleitung der Apoptose kommen kann (18, 161).

Um zu überprüfen, wie hoch die intrazellulären ROS-Konzentrationen in Gliomzellen in Abhängigkeit des p53-Status und unter Einfluss von Hypoxie sind, und somit auch einen Rückschluss auf die Sensibilität von p53^{wt-defizient}-Zellen gegenüber Hypoxie zu erlauben, wurden LNT-229puro/p53sh-, LNT-229hygro/p53ts- und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}-Zellen mit 5 mM Glukose in SFM und 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 24 h behandelt. Anschließend wurden die ROS-Konzentrationen mittels H₂DCFDA-FACS ermittelt (**3.1.2.2**). Unter Normoxie (21% O₂) und moderater Hypoxie (1% O₂) war kein Unterschied in der intrazellulären ROS-Menge zwischen p53^{wt} und p53^{wt-defizient}-Zellen zu erkennen. Es ließ sich hingegen nachweisen, dass p53^{wt-defizient}-Zellen unter 0,1% O₂ eine geringere intrazelluläre ROS-Konzentration hatten (LNT-229hygro- vs. LNT-229 p53ts-Zellen 533 zu 388 DCF [Mittelwert] und LNT-229puro- vs. LNT-229p53sh-Zellen 462:349 DCF [Mittelwert] (**Abbildung 4-8**).

Die ROS-Konzentrationen sind in der Hypoxie in p53^{wt}-Zellen höher als in p53^{wt-defizient}-Zellen, so dass eine erhöhte ROS-Konzentration nicht unbedingt die Ursache für den beobachteten erhöhten Zelltod in p53^{wt-defizient}-Zellen spricht.

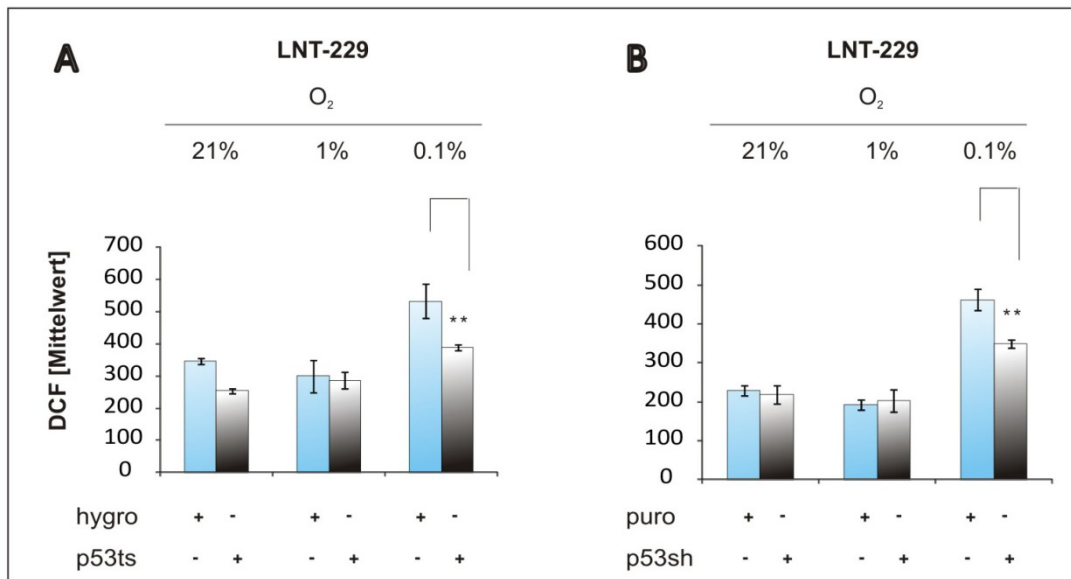


Abbildung 4-8: Intrazelluläre ROS-Konzentrationen in Abhängigkeit des p53-Status

LNT-229hygro/p53ts- (A) und LNT-229puro/p53sh-Zellen (B) wurden 24 h nach Aussaat mit PBS gewaschen, anschließend mit 5 mM Glukose in SFM und 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 24 h behandelt. Die ROS-Konzentrationen wurden mittels H₂DCFDA-FACS ermittelt.

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.2.3 p53-Inaktivierung führt zu verstärktem Zellwachstum in der hochgradigen Hypoxie

p53 kann unter Stressbedingungen einen Zellzyklus-Arrest induzieren und somit die Zellteilungsrate beeinflussen, was zu einem verstärkten Glukoseverbrauch und somit zu Nährstoffdepletion führen kann (10, 237, 278). Um zu überprüfen, ob der verstärkte Hypoxie-induzierte Zelltod u.a. auf ein verstärktes Wachstum unter den Versuchsbedingungen zurückzuführen war, wurde das Wachstumsverhalten von p53^{wt-defizient}-Zellen mit der von p53^{wt}-Zellen verglichen. Hierfür wurden LNT-229puro/p53sh- und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}-Zellen mit 2 mM Glukose in SFM und 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 4 und 8 h behandelt. Die Zellen wurden nach der Behandlungszeit mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert und das Pellet in 1 mL PBS aufgenommen. Anschließend wurde mittels Trypanblau die Zellen gezählt (3.1.1.4). Als Normierung wurde der Zeitpunkt 0 h (24 h nach Aussaat, vor Behandlung) verwendet.

Unter 21% O₂ war kein Unterschied im Wachstumsverhalten zu verzeichnen. Unter 1% O₂ ergab sich kein einheitliches Muster: Nur im hygro/p53ts-System wiesen die p53-mutierten Zellen ein leicht verstärktes Wachstum im Vergleich zur p53^{wt}-Kontrolle auf. Es zeigte sich, dass p53^{wt-defizient}-Zellen unter Sauerstoffmangelbedingungen (0,1% O₂) ein schnelleres Wachstumsverhalten aufwiesen als p53^{wt}-Zellen:

- LNT-229puro- vs. p53sh-Zellen: 1,5 vs. 2,2 (relative Zahlen) (**Abbildung 4-9 A**)
- HCT116 p53^{+/+} - vs. p53^{-/-}-Zellen: 1,4 vs. 1,6 (**Abbildung 4-9 B**)

Der beobachtete Zelltod-Phänotyp in der Hypoxie konnte deshalb nur bedingt in der moderaten Hypoxie mit einem verstärkten Zellwachstum in Verbindung gebracht werden.

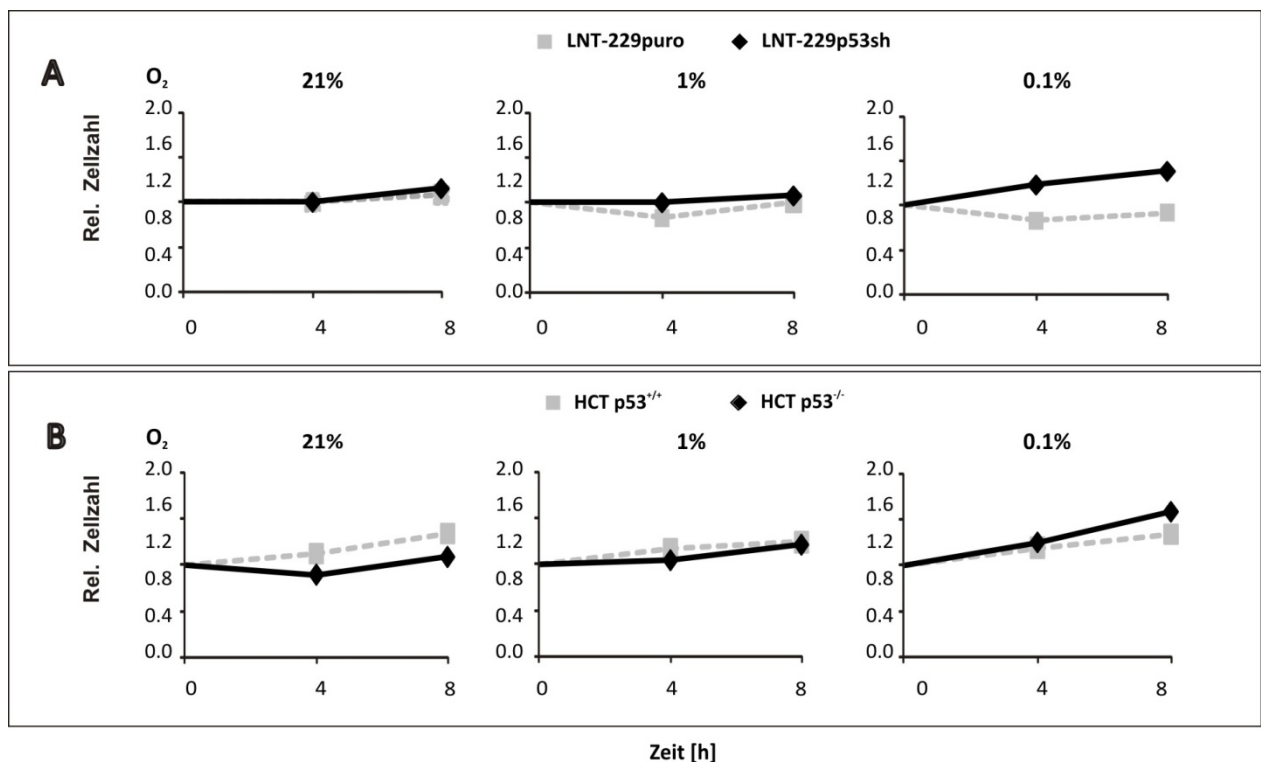


Abbildung 4-9: Relative Zellzahl in Abhängigkeit des p53-Status unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie

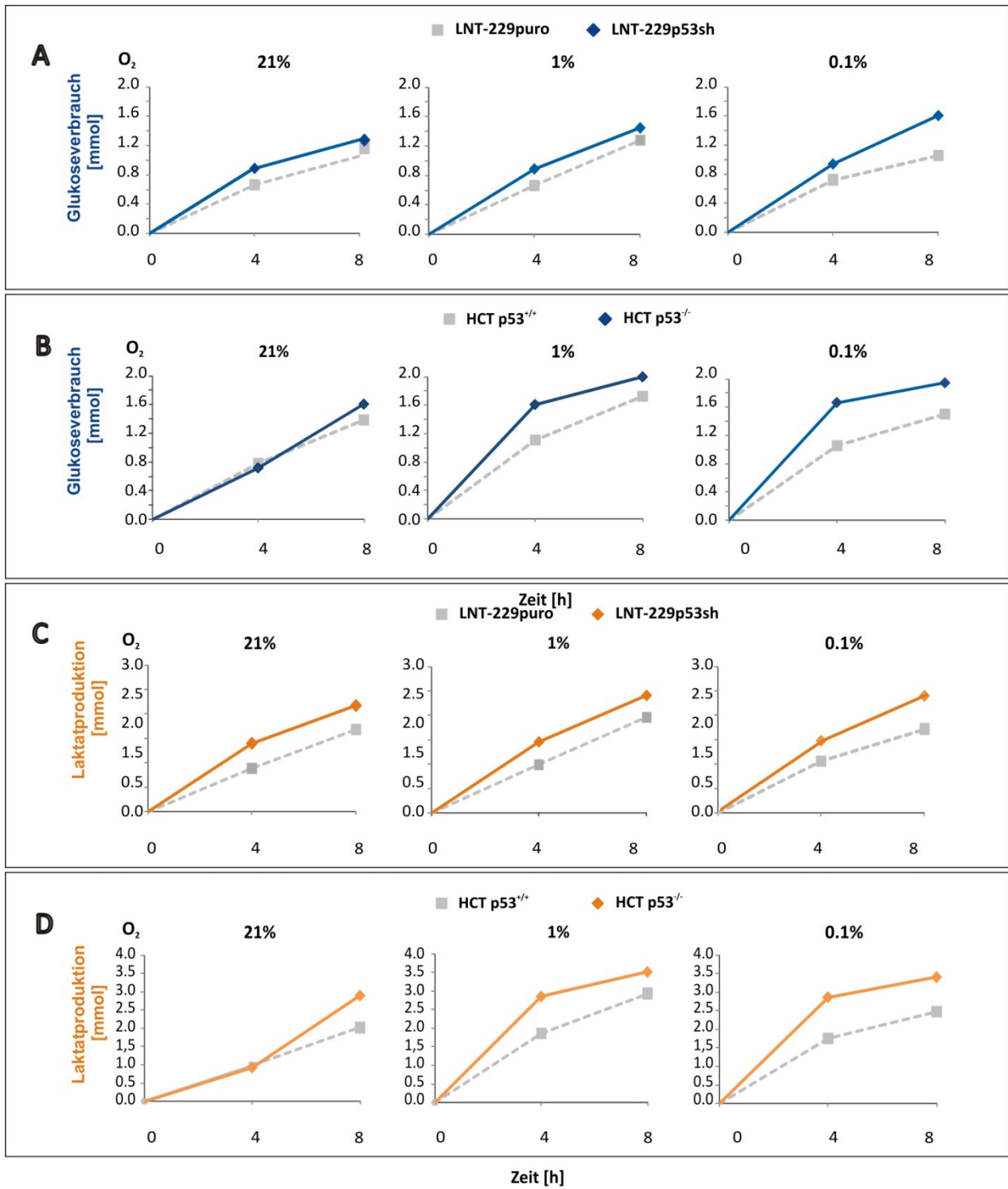
LNT-229puro/p53sh- (A) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}-Zellen (B) wurden 24 h nach Aussaat in 24-Well-Platten mit PBS gewaschen, anschließend mit 2 mM Glukose in SFM und 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff behandelt. Nach 4 und 8 h wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und die Zellzahl bestimmt. Normiert wurde auf die Zellzahl-Werte bei Zeitpunkt 0 h (24 h nach Aussaat). Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen.

4.2.4 p53-Inaktivierung führt zu einer verstärkte Glykolyse unter Nährstoffmangel und Hypoxie

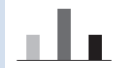

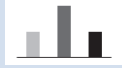

In Kapitel 4.1.4 konnte veranschaulicht werden, dass p53^{wt}-Zellen unter verstärkten Stressbedingungen (0,1% O₂) langsamer wachsen als p53^{wt-defizient}-Zellen. Folglich könnten p53^{wt-defizient}-Zellen mehr bzw. im Laufe der Zeit schneller Glukose verbrauchen als p53^{wt}-Zellen, und würden dann auch früher unter vollkommener Nährstoffdepletion leiden und sterben. Um dies zu überprüfen wurden der Glukoseverbrauch (Abbildung 4-10 A und B) und die Laktatproduktion (Abbildung 4-10 C und D) in LNT-229puro/p53sh- und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}-Zellen, die mit 2 mM Glukose in SFM und 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 4 h und 8 h behandelt wurden, mittels HITACHI 917 gemessen (3.2.4). Es konnte gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen eine p53-Suppression in diesen Zelllinien zu einem verstärkten Glukoseverbrauch und einer damit verbundenen erhöhten Laktatausschüttung in das Medium führte. Der Unterschied im Glukoseverbrauch und die einhergehende

verstärkte Laktatproduktion der p53-supprimierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen verstärkte sich, je geringer der Sauerstoffgehalt war, v.a. bei den 8 h-Werten. Unter 21% O₂ wurde in p53^{wt}-Zellen weniger Glukose verbraucht als in p53^{wt-defizient}-Zellen. Auch konnte eine höhere Laktatmenge in p53^{wt} als in p53^{wt-defizient}-Zellen gemessen werden (**Abbildung 4-10 E**).

Folglich zeigte der Phänotyp der p53^{wt-defizient}-Zellen ausgeprägtere glykolytische Eigenschaften auf als der der p53^{wt}-Zellen (Warburg-Effekt). Je sauerstoffärmer die Umgebung, desto mehr Glukoseverbrauch und Laktatproduktion fand in den p53^{wt-defizient}-Zellen statt. Die p53^{wt}-Zellen steigerten unter 1% O₂ zunächst ihren Glukoseverbrauch im Vergleich zu 21% O₂, aber unter hochgradiger Hypoxie (0,1% O₂) wurde der Glukoseverbrauch wieder verringert, die Laktatproduktion ging zurück, während p53^{wt-defizient}-Zellen (LNT-229p53sh- und HCT116 p53^{-/-}-Zellen) ihren Glukoseverbrauch verstärkten. Die Bildung des glykolytischen Indexes ergab, dass p53^{wt}-Zellen in der Hypoxie verhältnismäßig mehr Glykolyse betreiben als in der Normoxie: Der glykolytische Index verschob sich bei LNT-229puro-Zellen von 1,59 (unter 21% O₂) auf 1,62 (unter 0,1% O₂), bei HCT116 p53^{+/+}-Zellen von 1,51 (unter 21% O₂) auf 1,66 (unter 0,1% O₂), während in p53^{wt-defizient}-Zellen keine Veränderung des glykolytischen Indexes zu beobachten war (**Abbildung 4-10 F**) (Warburg-Effekt unter normoxischen Bedingungen).



E Tabelle 10: Glukose- und Laktatwerte in p53^{wt} und p53^{wt-defizient}-Zellen

	Zelllinie	Normoxie 21%	Hypoxie 1%	Hypoxie 0,1%	Δ Glukose- verbrauch
Δ Glukose in mmol	LNT-229puro	1,06	1,28	1,06	  21 1 0,1% O ₂
	LNT-229p53sh	1,28 +20,8%	1,44 +12,5%	1,61 +51,9%	
Δ Laktat in mmol	LNT-229puro	1,68	1,96	1,72	
	LNT-229p53sh	2,17 +29,2%	2,41 +23%	2,71 +57,6%	
Δ Glukose in mmol	HCT116 p53 ^{+/+}	1,39	1,72	1,5	  21 1 0,1% O ₂
	HCT116 p53 ^{-/-}	1,61 19,8%	2,00 +16,3%	1,94 +29,3%	
Δ Laktat in mmol	HCT116 p53 ^{+/+}	2,1	2,93	2,5	
	HCT116 p53 ^{-/-}	2,9 +30,6%	3,51 +19,8%	3,4 +37,1%	

F Tabelle 11 Glykolytischer Index in p53^{wt} und p53^{wt-defizient}-Zellen

	Zelllinie	Normoxie 21%	Moderate Hypoxie 1%	Hochgradige Hypoxie 0,1%
Glykolytischer Index	LNT-229puro	1,59	1,53	1,62
	LNT-229p53sh	1,69	1,67	1,68
	HCT116 p53 ^{+/+}	1,51	1,7	1,66
	HCT116 p53 ^{-/-}	1,8	1,75	1,75

Abbildung 4-10: Glukoseverbrauch, Laktatproduktion und glykolytischer Index in Abhängigkeit des p53-Status unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie

LNT-229puro/p53sh- (A) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}-Zellen (B) wurden 24 h nach Aussaat in 24-Well-Platten mit PBS gewaschen, anschließend mit 2 mM Glukose in SFM und 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 4 und 8 h behandelt. Danach wurde der Überstand abgenommen und Glukose (A und B) und Laktat (C und D) mittels HITACHI 917 (3.2.4) gemessen und der Glukoseverbrauch (Δ Glukose in mmol) und die Laktatproduktion (Δ Laktat in mmol) ermittelt. Die 8 h-Werte sind E zu entnehmen. Zusätzlich wurde der glykolytische Index gebildet (Laktat-Produktion/Glukoseverbrauch) (F). Dieser Wert liegt zwischen 1 (nur mitochondriale Atmung) und 2 (nur Glykolyse). Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen.

4.2.5 p53-Inaktivierung korreliert mit einer verringerten Atmung

Schon seit den Arbeiten von Otto Warburg in den 1930er Jahren ist bekannt, dass Tumorzellen die Fähigkeit zur Umschaltung von der mitochondrialen Atmung auf die Glykolyse besitzen (129, 130). Trotz suboptimaler Durchblutung und somit geringer Sauerstoffzufuhr können diese Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber nicht-entartete Zellen haben, da Tumorzellen nicht mehr auf eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff angewiesen sind, sondern über die Glykolyse ausreichend Energie für ihr Wachstum gewinnen können (129, 156, 279). Matoba et al. (39) zeigten 2006, dass p53^{wt-defizient}-Zellen eine etwa 25% geringere Atmungsrate haben als p53^{wt}-Zellen und stellten die Vermutung auf, dass eine p53-Inaktivierung eine Resistenz gegenüber Sauerstoffmangelbedingungen und somit Tumorgenese in hypoxischen Bereichen erlauben könnte. Es könnte aber auch sein, dass p53^{wt} einen Vorteil unter bestimmten Sauerstoff-Bedingungen vermitteln könnte, indem eine effizientere Sauerstoffnutzung über die oxidative Phosphorylierung stattfinden kann, bzw. indem intrazellulärer Sauerstoff über die Atmungskette abgebaut und somit die Bildung von ROS verhindert wird (174).

Um die p53-abhängige Atmung in den verwendeten Systemen zu messen, wurden LNT-229puro/p53sh-, LNT-229hygro/p53ts- und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}-Zellen in Glasschälchen ausgesät, nach 24 h mit 2 mL vorinkubiertem VM behandelt und die Schälchen luftdicht verschlossen. Nach 48 h wurde der Sauerstoffpartialdruck gemessen mit dem Blutanalysegerät ABL-80 (Radiometer, Willich) der Sauerstoffverbrauch ermittelt und auf die Proteinmenge normiert (3.2.3).

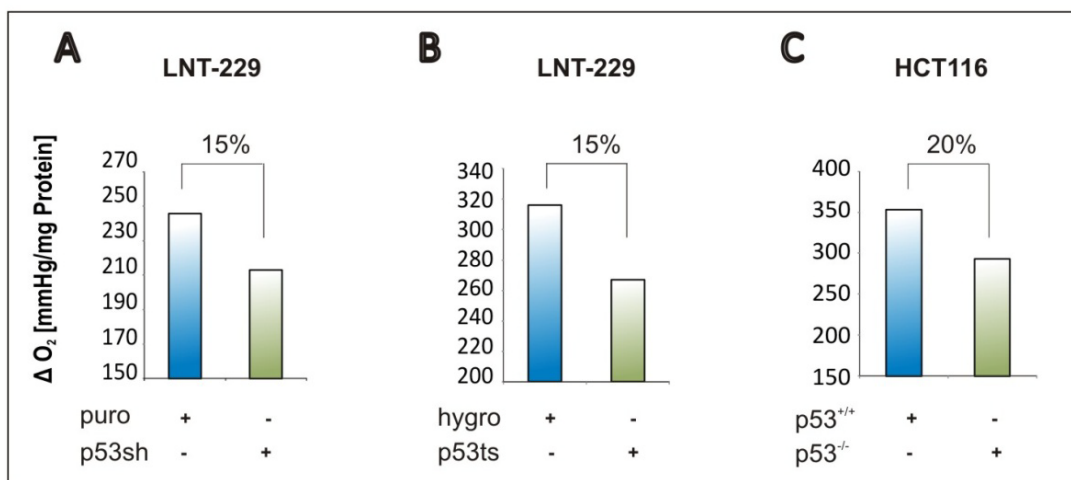


Abbildung 4-11: Mitochondriale Atmung in p53^{wt-defizient}-Zellen

LNT-229puro/p53sh- (A), LNT-229hygro/p53ts- (B) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}-Zellen (C) wurden 24 h nach Aussaat in Glasschälchen mit 2 mL vorinkubiertem VM für 1 h inkubiert und anschließend luftdicht verschlossen. Nach 48 h im Brutschrank wurde der Sauerstoff mittels Radiometer gemessen und der Sauerstoffverbrauch auf die Proteinkonzentration der Proben normiert (O₂ = 155 mmHg bei Zeitpunkt 0 h). Repräsentatives Experiment aus mind. 3 unabhängigen Versuchen.

Hierbei zeigte sich, dass p53^{wt-defizient}-Zellen in allen verwendeten Zellsystemen weniger Sauerstoff verbrauchten und folglich weniger atmeten als die jeweiligen p53^{wt}-Kontrollzellen (**Abbildung 4-11 A und B**). Dieser Unterschied betrug in Gliomzellen ca. 15%, im Kolonkarzinommodell 20% (**Abbildung 4-11 C**), was mit den Ergebnissen von Matoba et al. (39) übereinstimmte.

4.3 Untersuchung von SCO2, einem möglichen metabolischen Mediator

Matoba et al. identifizierten 2006 SCO2 als metabolisches Zielgen von p53 in Kolonkarzinom-Zelllinien (HCT116 / DLD-1 / SW-480) (39). SCO2 ist ein für die Funktion der Atmungskette notwendiges Protein, das als Kupfer-Chaperon fungiert, indem es mithilfe u.a. von SCO1 Kupfer in den Komplex IV der Atmungskette einbaut (232, 280, 281). Da in den verwendeten Systemen eine p53-Suppression zu einer geringeren Atmung (**4.2.5**) und einem höheren glykolytischen Index (**4.2.4**) führte, wurde untersucht, ob eine Herunterregulierung der SCO2-Expression in p53^{wt-defizient}-Zellen für den Hypoxie-induzierten Zelltod verantwortlich sein könnte.

4.3.1 SCO2 *in silico*-Untersuchung

Eine *in silico*-Analyse an drei großen Datensätzen mit Expressionsprofilen von malignen Gliomen (Sun et al., 2006, TCGA 2009, Philips et al. 2006) mittels der Oncomine-Datenbank (www.oncomine.org) ergab eine regelhafte, jedoch erheblich variierende Expression von SCO2-mRNA (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Rembrandt-Datenbank (<http://rembrandt.nci.nih.gov>) ergab bei der Analyse der Datensätze von 343 Gliomen interessanterweise eine Korrelation von SCO2-Expression mit ungünstigem Verlauf (s. Datenbank-Untersuchungen unter **6.6.1**).

4.3.2 SCO2 ist ein Zielgen von p53 in Gliomzellen

Da noch keine Daten über die SCO2-Expression/Regulierung in Glioma vorhanden waren, wurde zunächst überprüft, ob in den Gliom-Zelllinien LNT-229 SCO2 ebenfalls ein p53-Zielgen ist. Hierfür wurde die SCO2-Expression in stabilen LNT-229puro/p53sh- und LNT-229hygro/p53ts-Zellen mittels QRT-PCR überprüft (**3.3.2.1**, **3.3.2.2** und **3.3.2.3**). Um die Spezifität der verwendeten Primer zu kontrollieren, wurde ebenso die SCO2-Expression in HCT116-Zellen ermittelt, die in Matoba et al. schon auf den SCO2-Status hin untersucht wurden (39). Es zeigte sich, dass eine p53-Suppression zu einer stark verminderten SCO2-Expression führte:

- LNT-229puro:LNT-229p53sh = 6:2 (3-fache SCO2-Expression) (**Abbildung 4-12 A**)
- LNT-229hygro:LNT-229p53ts = 5:0,5 (10-fache SCO2-Expression) (**Abbildung 4-12 B**)
- HCT116 p53^{+/+}:HCT116 p53^{-/-} = 2,5:1 (2,5-fache SCO2-Expression) (**Abbildung 4-12 C**).

Eine Rest-Expression von SCO2 ist in $p53^{\text{wt-defizient}}$ -Zellen noch zu erkennen, was mit den Ergebnissen von Matoba et al. übereinstimmt, dass SCO2 nicht alleine über p53 reguliert wird (in HCT116 $p53^{-/-}$ -Zellen war eine Restaktivität von SCO2 zu beobachten (39)).

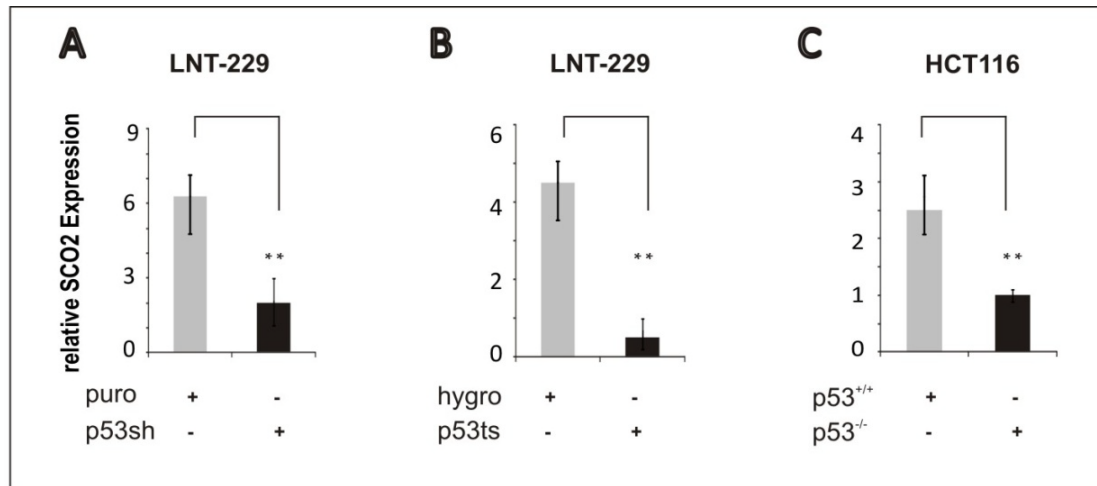


Abbildung 4-12: Relative Expression von SCO2 unter Normoxie in $p53^{\text{wt-defizient}}$ -Zellen

Die SCO2-Expression in LNT-229puro/p53sh- (A), LNT-229hygro/p53ts- (B) und HCT116 $p53^{+/+}/p53^{-/-}$ -Zellen (C) wurde mittels QRT-PCR ermittelt und auf 18S normiert.

Repräsentatives Experiment aus mind. 2 unabhängigen Versuchen. $n=3$, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte $p < 0.01$ (**) als hoch signifikant angesehen.

4.3.3 SCO2 wird durch moderate Hypoxie induziert

In 4.1.3 wurde gezeigt, dass p53 durch Sauerstoffmangel keine verstärkte Transaktivität aufweist. Dennoch wäre es möglich, dass die Expression von SCO2 sauerstoffabhängig reguliert wird, und dies vielleicht auch p53(un)-abhängig. So wurden LNT-229puro/p53sh-, LNT-229hygro/p53ts- und HCT116 $p53^{+/+}/p53^{-/-}$ -Zellen in 25mM VM unter 21% und 1% O_2 für 24 h inkubiert und die Expression von SCO2 unter diesen Bedingungen mittels QRT-PCR ermittelt. Normiert wurde auf die Succinat-Dehydrogenase Komplex Untereinheit A (SDHA), ein bekanntes *housekeeping* Gen (282), dessen Expression nicht durch Glukose- oder Sauerstoffmangel reguliert wird (3.3.2.1, 3.3.2.2 und 3.3.2.3). Die Expression von SCO2 stieg in der moderaten Hypoxie in $p53^{\text{wt}}$ -Zellen stark an (bei LNT-229puro-Zellen stieg die relative Expression Sauerstoff-abhängig von 2 auf 12,8 (Faktor x 6,4) (Abbildung 4-13 A); bei LNT-229hygro-Zellen von 1,7 auf 6,3 (Faktor x 3,7) (Abbildung 4-13 B), und bei HCT116 $p53^{+/+}$ -Zellen von 2 auf 4,7 (Faktor x 2,3) (Abbildung 4-13 C). In den $p53^{\text{wt-defizient}}$ -Zellen stieg die SCO2-Expression unter moderater Hypoxie nur gering an, auch wenn hier keine Signifikanz zu beobachten war.

Da in **Abbildung 4-3** gezeigt werden konnte, dass p53 keine veränderte Transaktivierungsfähigkeit in der Hypoxie im Vergleich zur Normoxie aufwies, wurde

vermutet, dass p53 nicht alleine imstande ist, SCO2 zu regulieren, sondern einen Kofaktor benötigt.

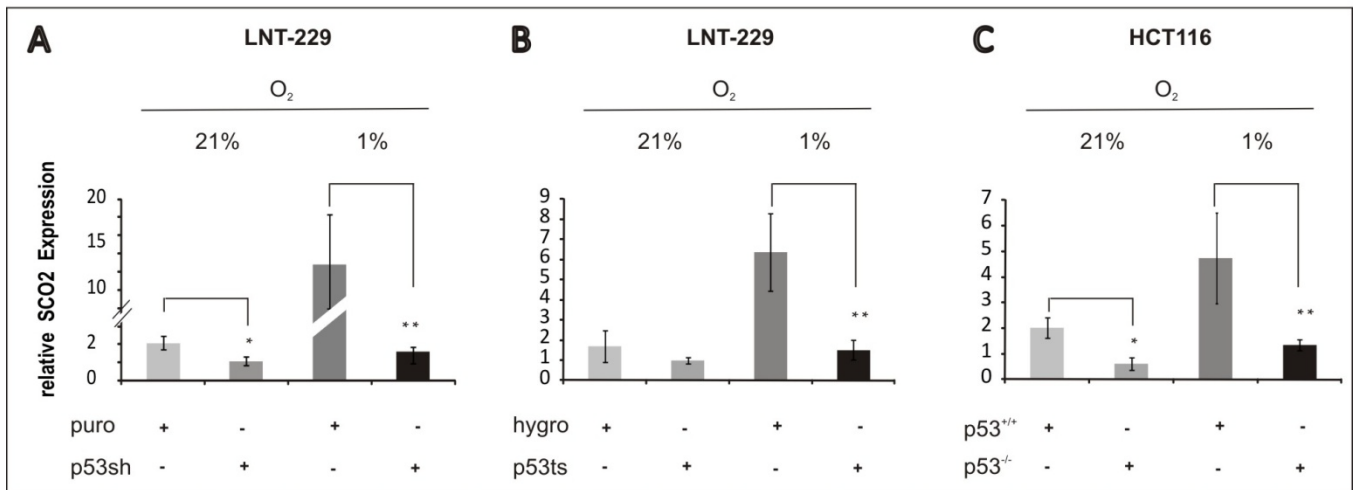


Abbildung 4-13: Relative Expression von SCO2 unter Normoxie (21% O₂) und moderater Hypoxie (1% O₂)

Die SCO2-Expression in LNT-229puro/p53sh⁻ (A), LNT-229hygro/p53ts⁻ (B) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-}-Zellen (C) in VM unter 21 bzw. 1% O₂ wurde mittels QRT-PCR ermittelt und auf SDHA normiert.

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.3.4 Herstellung von SCO2-Transfektanten

Bis heute gibt es nur eine Publikation, in der ein Zusammenhang zwischen SCO2 und p53 beschrieben wurde (39) und bisher ist die Bedeutung von SCO2 für viele Aspekte der Tumorbilogie noch unerforscht. Um Funktionen von SCO2 im Gliom-Modell zu studieren, wurden zunächst stabile SCO2-Transfektanten hergestellt und metabolisch untersucht. Hierbei wurde SCO2 mittels stabiler Transfektion des Plasmids pcDNA3.1-SCO2 in LNT-229-, T98G-, LN-18-, LNT-229p53sh- und LNT-229p53ts-Zellen transfiziert (**Abbildung 4-14 A, B, C, D und E**). Als allgemeine Kontrolle für diese Transfektanten diente pcDNA3.1 (dieser Vektor wurde auch in die p53^{wt}-Kontrollen transfiziert: LNT-229-parental, -puro und -hygro). Nach drei Wochen Selektion mit G418 wurden die Pools mittels QRT-PCR überprüft (**3.1.1.6 und 3.3.2**). In LNT-229-, T98G-, LN-18-, LNT-229p53sh- und LNT-229p53ts-SCO2-Zellen konnte eine stabile Überexpression von SCO2 erreicht werden:

- LNT-229pcDNA3 vs. LNT-229pcDNA3-SCO2: 10-fache SCO2-Expression (A)
- T98G-pcDNA3 vs. T98G- pcDNA3-SCO2: 6-fache SCO2-Expression (B)
- LN-18pcDNA3 vs. LN-18- pcDNA3-SCO2: 22,5-fache SCO2-Expression (C)
- LNT-229p53ts-pcDNA3 vs. LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2: 5-fache SCO2-Expression (D)
- LNT-229p53sh-pcDNA3 vs. LNT-229p53sh-pcDNA3SCO2: 25-fache SCO2-Expression (E)

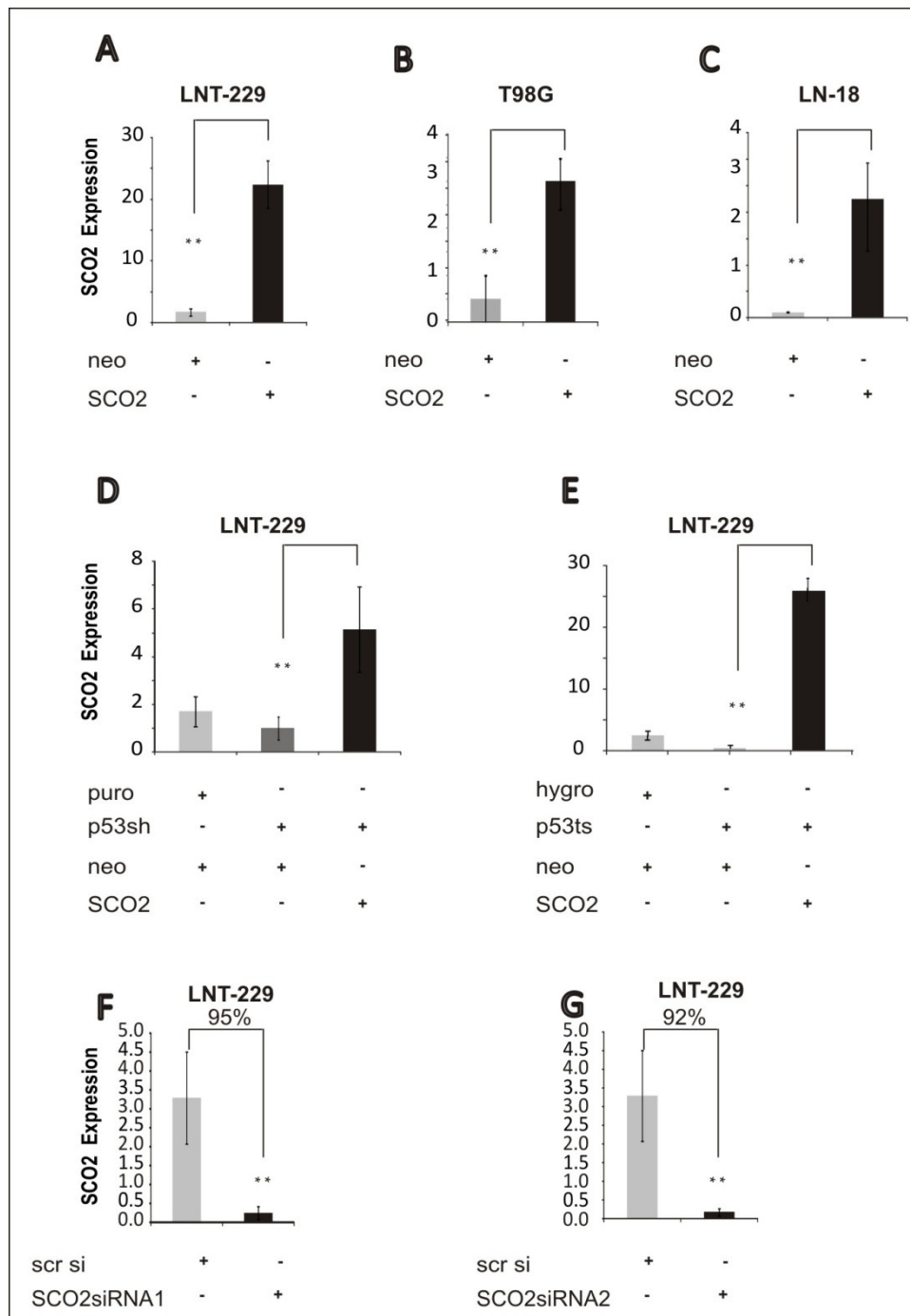


Abbildung 4-14: Relative Expression von SCO2 in SCO2-überexprimierenden - und supprimierten Zellen

Die SCO2-Expression wurde in folgenden Zellen mittels QRT-PCR ermittelt. Als Kontrollgene wurden 18S und GAPDH verwendet:

A LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-SCO2

B T98G-pcDNA3 und T98G-pcDNA3-SCO2

C LN-18-pcDNA3 und LN-18-pcDNA3-SCO2

D LNT-229puro-pcDNA3, LNT-229p53sh-pcDNA3 und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2

E LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2

F LNT-229, die transient mit 20 nM SCO2siRNA1 transfiziert wurden, und

G LNT-229, die transient mit 20 nM SCO2siRNA2 transfiziert wurden

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte $p < 0.01$ (**) als hoch signifikant angesehen.

Zusätzlich wurde die endogene SCO2-Expression in LNT-229-Zellen mittels siRNA herunterreguliert. Hierfür wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland) zwei SCO2-siRNA-Sequenzen bezogen (**2.1.8**). Diese zwei Sequenzen wurden in der Zellkultur in verschiedenen Konzentrationen (0, 5, 20, 50 oder 100 nM) getestet. Hierfür wurden die siRNAs mittels HiPerfect (Qiagen, Hilden, Deutschland) in LNT-229 Zellen transfiziert, die 30 min zuvor in eine 24-Well-Platte ausgesät wurden. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, RNA gewonnen und die Expression von SCO2 mittels QRT-PCR untersucht. Es wurde auf den 18S und GAPDH-mRNA-Level normiert. Mittels 20 nM SCO2siRNA1 konnte eine Herunterregulierung des Zielgens um 95% erreicht werden (**Abbildung 4-14 F**), mit der SCO2siRNA2 um 92% (**Abbildung 4-14 G**). Die Versuche wurden bevorzugt mit SCO2siRNA2 durchgeführt.

4.3.5 SCO2 verstärkt die mitochondriale Atmung

SCO2 ist ein Enzym, das in der Atmungskette Kupfer von Cox17 auf SCO1 und schließlich auf Cox III überträgt (280) und dementsprechend positiv die Atmungsprozesse regulieren kann. Um zu überprüfen, ob SCO2 in den verwendeten Zellsystemen diese Funktion innehat und somit eine verstärkte Atmung ermöglichen könnte, wurde in den in **Abschnitt 4.2.2** beschriebenen stabilen SCO2-Transfektanten der Sauerstoff mittels ABL-80 (Radiometer, Willich) gemessen und auf die Proteinmenge normiert (**3.2.3**). Eine Überexpression von SCO2 in LNT-229-Zellen führte zu einer Zunahme des Sauerstoffsverbrauchs um ca. 45% im Vergleich zu LNT-229-Zellen (**Abbildung 4-15 A**). Auch in p53^{wt-defizient}-Zelllinien ermöglichte die Restoration von SCO2 eine verstärkte Atmung. So war in T98G-pcDNA3-SCO2- und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2-Zellen eine Atmungszunahme von 15%, in LN-18-pcDNA3-SCO2-Zellen von 10% und in LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2-Zellen von 35% gegenüber den jeweiligen Kontrollen T98G-pcDNA3-, LNT-229p53sh-pcDNA3-, LN18-pcDNA3- und LNT-229p53ts-pcDNA3-Zellen zu beobachten. (**Abbildung 4-15 A, C, D, E und F**). Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass die Suppression von SCO2 mittels SCO2siRNA2 in LNT-229-Zellen zu einer Abnahme der Atmung um ca. 15% führte (**Abbildung 4-15 B**).

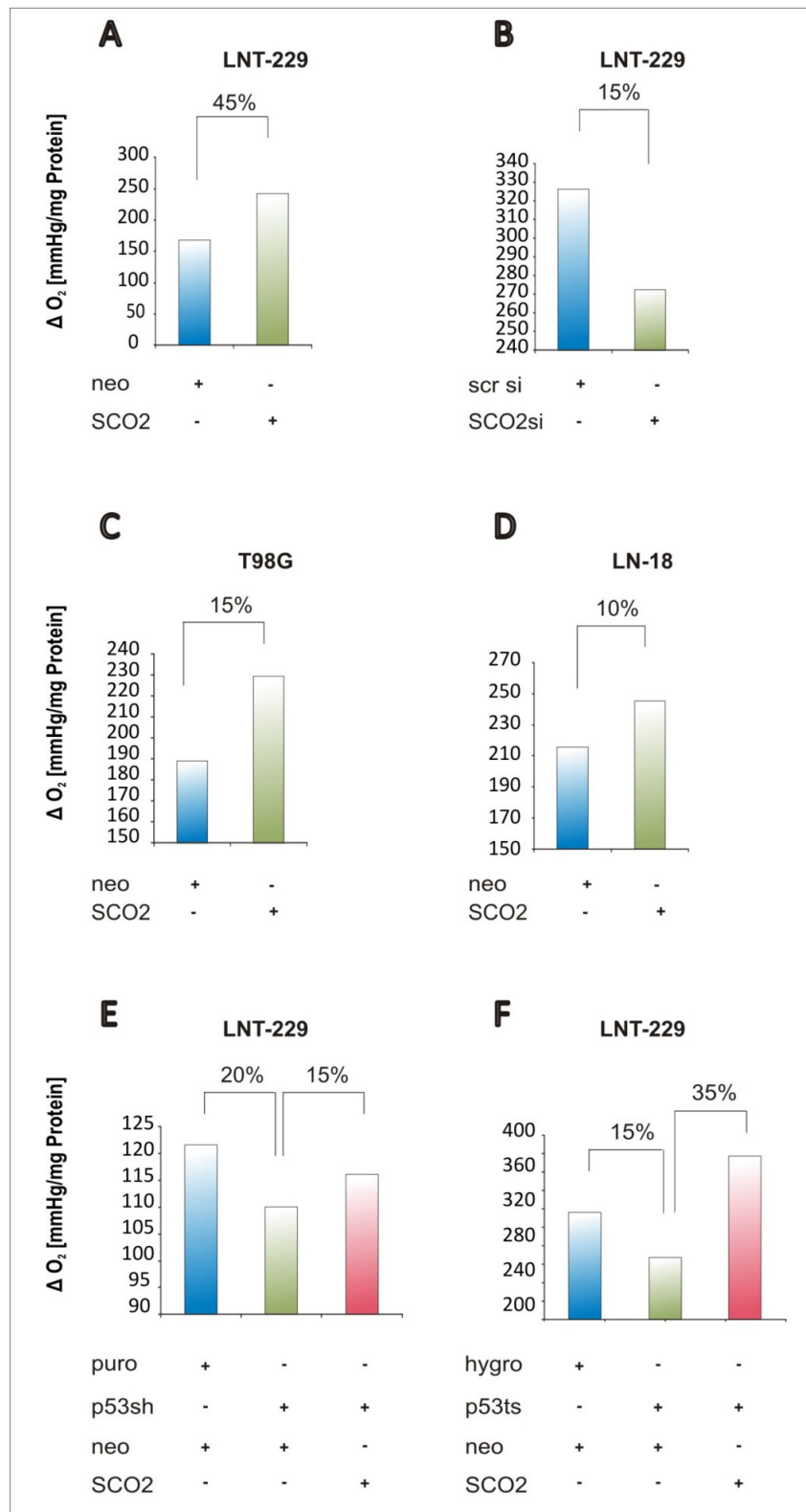


Abbildung 4-15: Einfluss von SCO2 auf den Sauerstoff-Verbrauch

Die Zellen wurden in Glasschälchen ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen 1h mit 2 mL vorinkubierten VM behandelt und die Glasschälchen anschließend luftdicht verschlossen. Nach 48 h wurde der Sauerstoff mittels Radiometer gemessen und der Sauerstoffverbrauch auf die jeweilige Proteinmenge normiert. Die mitochondriale Atmung wurde in **A** LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-SCO2, **B** LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. SCO2siRNA2 (20 nM) transfiziert wurden,

C T98G-pcDNA3 und T98G-pcDNA3-SCO2,
 D LN-18-pcDNA3 und LN-18-pcDNA3-SCO2,
 E LNT-229puro-pcDNA3, LNT-229p53sh-pcDNA3 und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2 und
 F LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2 untersucht.
 Repräsentatives Experiment aus mind. 3 unabhängigen Versuchen.

4.3.6 Eine Restoration der SCO2-Expression in p53^{wt-defizient}-Zellen hat keinen Einfluss auf die Proliferation

Um die Auswirkungen einer SCO2-Restoration auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden Wachstumskurven von stabilen LNT-229puro-pcDNA3-, LNT-229p53sh-pcDNA3- und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2 (**Abbildung 4-16 A**), T98G-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-SCO2- (**Abbildung 4-16 B**) und LN-18pcDNA3- und LN-18-pcDNA3-SCO2-Zellen (**Abbildung 4-16 C**), die mit 2 mM Glukose in SFM unter 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 4 bzw. 8 h behandelt wurden, erstellt. Die Zellen wurden nach der Behandlungszeit mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert und das Pellet in 1 mL PBS aufgenommen und die Zellen gezählt (**3.1.1.4**). Normiert wurde auf den Zeitpunkt 0 h (24 h nach Aussaat). In der Normoxie war (bis auf LN-18-Zellen) kein Unterschied im Wachstum zu beobachten. Anders verhielt es sich in der Hypoxie: wie schon in **Abbildung 4-9** veranschaulicht, führte eine p53-Suppression zu einem verstärkten Wachstumsverhalten im Vergleich zu p53^{wt}-Zellen, sowohl unter moderaten (1% O₂) als auch hochgradigen (0,1% O₂) hypoxischen Bedingungen. Die Überexpression von SCO2 in p53^{wt-defizient}-Zellen führte unter moderaten Hypoxie-Bedingungen zu einer Verlangsamung der Proliferation im Vergleich zur jeweiligen p53^{wt-defizient}-Kontrolle, und glich sich im Falle der LNT-229p53sh-Zellen der Proliferationsgeschwindigkeit der LNT-229p53^{wt}-puro-Zellen an. Dieser Unterschied war nur bei 4h zu erkennen, bei 8h zeigten die Zellen fast keinen Unterschied in der Proliferation mehr auf. So sollte dieser Befund mit weiteren Untersuchungen, wie Zellzyklus-FACS und BRDU-Assay, überprüft werden. Auch konnte kein Unterschied unter 1% O₂ in LN-18-Zellen beobachtet werden, was vermuten lässt, dass SCO2-vermittelte Proliferation Zelllinien-abhängig sein könnte. Unter hochgradiger Hypoxie bestand dieser Unterschied nicht mehr; eine SCO2-Überexpression in p53^{wt-defizient}-Zellen ermöglichte nur unter moderater Hypoxie ein etwas langsames Zellwachstum.

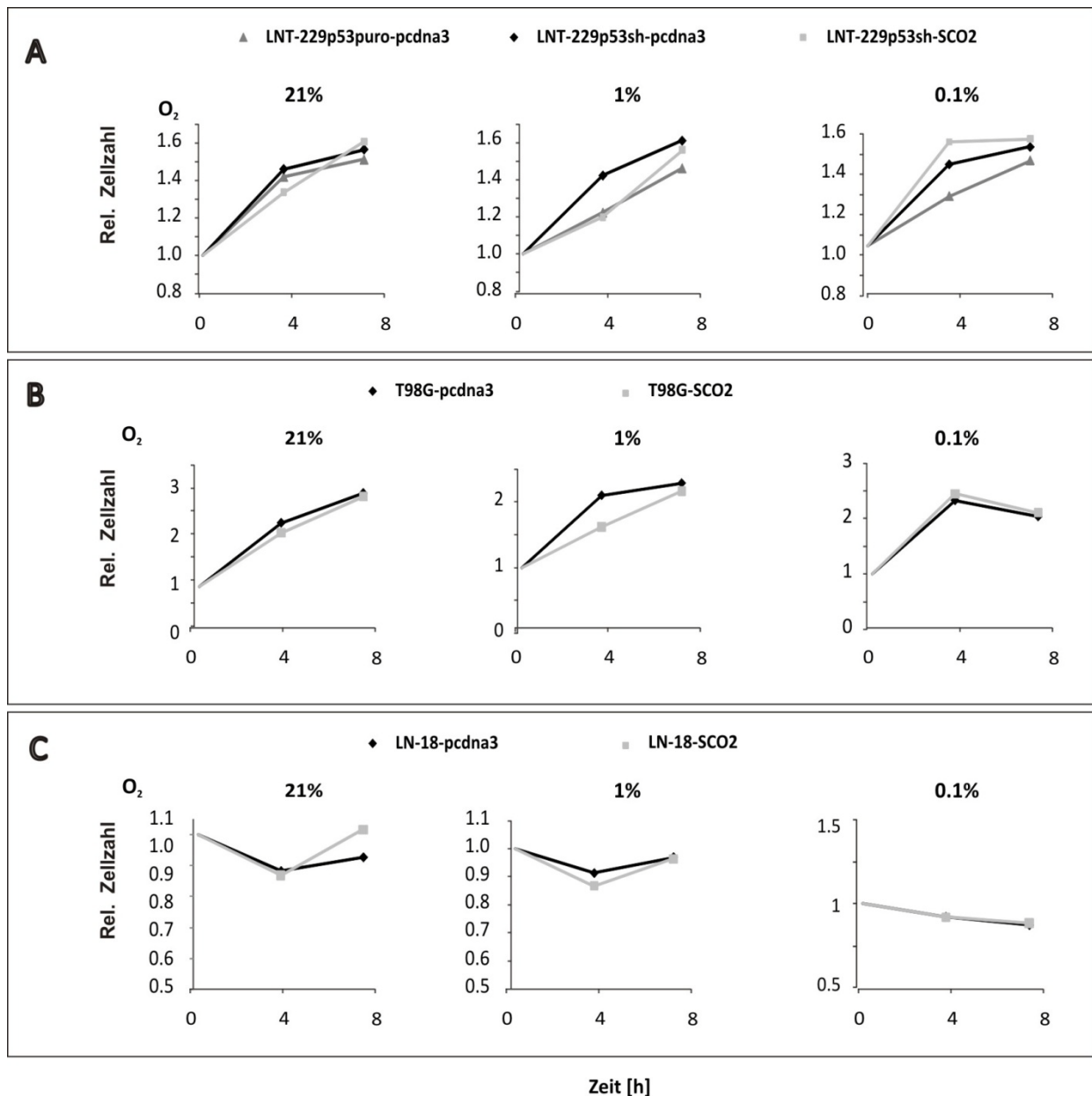


Abbildung 4-16: Wachstum in SCO2-restorierte-p53^{wt-defizient}-Zellen

Die Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 2 mM Glukose in SFM und unter 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 4 bzw. 8 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und die Zellzahl bestimmt. Normiert wurde auf den Zeitpunkt 0 h (24 h nach Aussaat). Das Wachstum unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen wurde in folgenden Zelllinien untersucht:

A LNT-229puro-pcDNA3-, LNT-229p53sh-pcDNA3- und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2-Zellen,

B T98G-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-SCO2-Zellen und

C LN-18pcDNA3- und LN-18-pcDNA3-SCO2-Zellen

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen.

4.3.7 SCO2 vermittelt einen geringeren Glukoseverbrauch unter moderater Hypoxie

In 4.3.6 wurde gezeigt, dass die Expression von SCO2 in p53^{wt-defizient}-Zellen unter moderater Hypoxie zu einer Verlangsamung der Proliferation führte. Um die Frage zu klären, ob diese Wachstumsinhibierung auch Konsequenzen für den Glukoseverbrauch haben könnte,

wurden folgende Zellen in 24-Well-Platten ausgesät: LNT-229pcdna3 und LNT-229SCO2-Zellen (**Abbildung 4-17 A**), LNT-229scrambledsi bzw. SCO2siRNA2 (**Abbildung 4-17 B**), T98G-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-SCO2-Zellen (**Abbildung 4-17 C**), LN-18-pcDNA3- und LN-18-pcDNA3-SCO2-Zellen (**Abbildung 4-17 D**), LNT-229puro-pcDNA3-, LNT-229p53sh-pcDNA3- und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2-Zellen (**Abbildung 4-17 E**) und LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3- und LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2-Zellen (**Abbildung 4-17 F**). Nach 24 h wurden diese Zellen mit 2 mM Glukose in SFM für 8 h (LNT-229-Zellen) oder mit 5 mM für 16 h (T98G- und LN-18-Zellen. Diese Zelllinien reagieren empfindlicher auf Glukosemangel) bei 21%, 1% und 0,1% Sauerstoff behandelt. Der Überstand wurde abgenommen, Glukose und Laktat wurden mit HITACHI 917 gemessen (**3.2.4**) und der glykolytische Index gebildet (Laktat [mmol]/ Glukoseverbrauch [mmol]), dieser Wert liegt üblicherweise zwischen 1 (nur mitochondriale Atmung) und 2 (nur Glykolyse); die Messung in LNT-229scrambledsiRNA und SCO2siRNA ergab unter hochgradiger Hypoxie einen etwas höheren Wert, vermutlich aufgrund des zu diesem Zeitpunkt einsetzenden Zelltodes und der damit verbundenen Laktatfreisetzung in das Medium). Die Überexpression von SCO2 führte in allen Zellen zu einem geringeren glykolytischen Index, während die SCO2-Suppression in LNT-229-Zellen zu einer Verschiebung gen Glykolyse führte:

- LNT-229pcDNA3- vs. LNT-229pcDNA3-SCO2-Zellen = 1,5:1,3 (glykol. Index sinkt)
- LNT-229scrambledsiRNA vs. LNT-229-SCO2siRNA = 1,9:2 (glykol. Index steigt)
- T98G-pcDNA3- vs. T98G-pcDNA3-SCO2-Zellen = 1,7:1,6 (glykol. Index sinkt)
- LN-18-pcDNA3- vs. LN-18-pcDNA3-SCO2-Zellen = 1,7:1,5 (glykol. Index sinkt)
- LNT-229-puro-pcDNA3-:LNT-229-p53sh-pcDNA3-:LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2-Zellen= 1,7:1,8:1,7
- LNT-229-hygro-pcDNA3-:LNT-229-p53ts-pcDNA3-:LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2-Zellen =1,3:1,4:1,3

Die Überexpression oder die Restoration von SCO2 in p53^{wt-defizient}-Zellen führte zu keinem veränderten Glukoseverbrauch sondern nur zu einer geringeren Laktatproduktion. Zusammen mit den Ergebnissen in **4.3.5** läßt sich auf eine SCO2-vermittelte verstärkte oxidative Phosphorylierung in diesen Zellen schließen.

Unter hochgradigen Sauerstoff-Mangelbedingungen (0,1% O₂) kam es zu keiner einheitlichen Veränderung in Glukoseverbrauch oder Laktatproduktion.

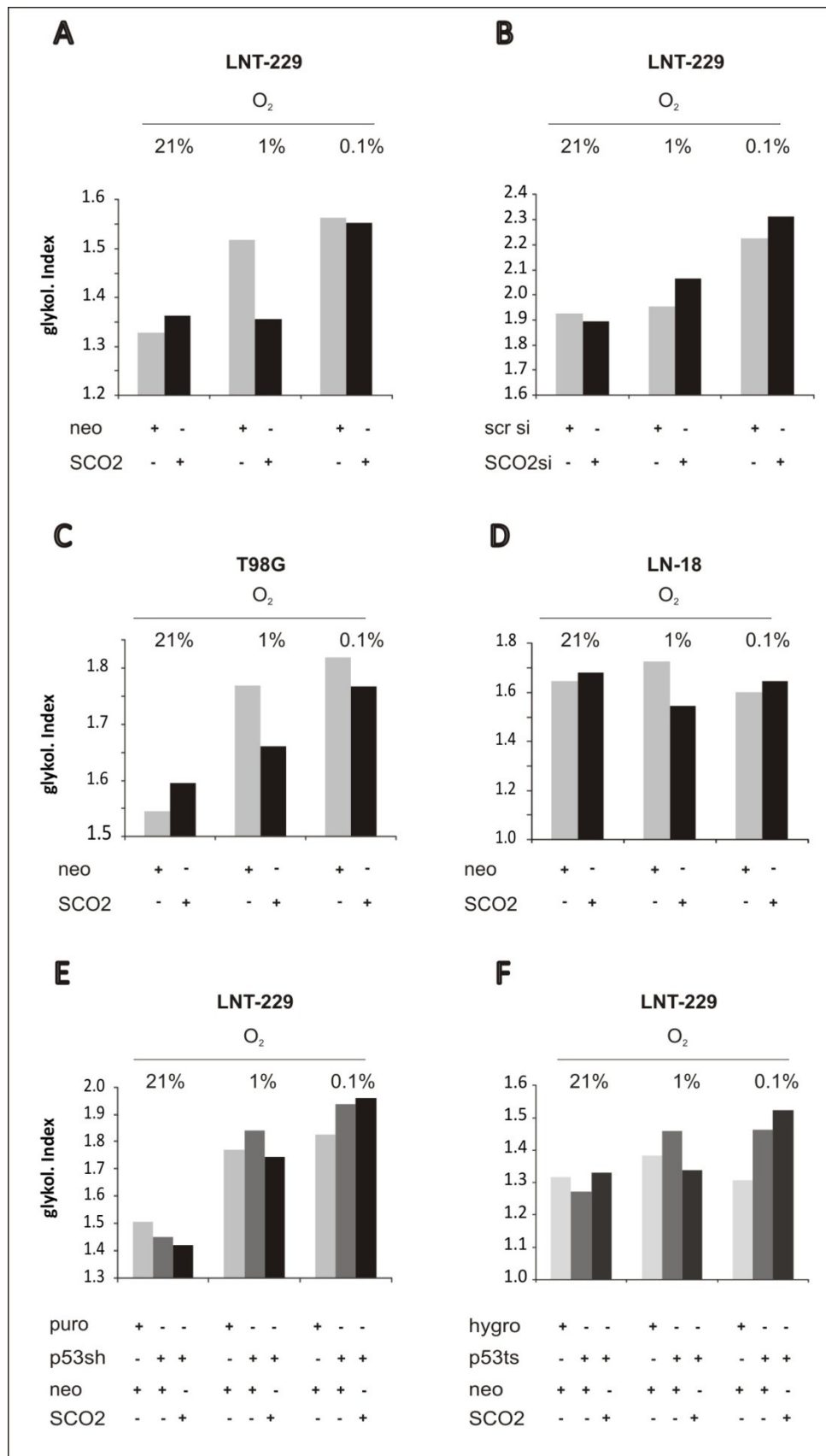


Abbildung 4-17: Glykolytischer Index unter Tumormikromilieu.

Die Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 h mit 2 mM Glukose in SFM für 8 h (LNT-229-Zellen) oder 5 mM Glukose in SFM für 16 h (T98G- und LN-18-Zellen) unter 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff behandelt. Glukose und Laktat wurden mit HITACHI 917 (3.2.4) gemessen und der glykolytische Index gebildet (=Laktatproduktion/Glukoseverbrauch):

- A** LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-SCO2
B LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. SCO2siRNA2 (20 nM) transfiziert wurden
C T98G-pcDNA3 und T98G-pcDNA3-SCO2
D LN-18-pcDNA3 und LN-18-pcDNA3-SCO2
E LNT-229puro-pcDNA3, LNT-229p53sh-pcDNA3 und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2 und
F LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2.
 Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen.

4.3.8 SCO2 schützt Zellen vor Zelltod unter moderater Hypoxie (1% O₂), nicht aber unter hochgradiger Hypoxie (0,1% O₂)

In 4.3.7 konnte gezeigt werden, dass die Expression von SCO2 in p53^{wt-defizient}-Zellen Auswirkungen auf den Metabolismus der Zellen hat. Um zu überprüfen, ob die Restoration von SCO2 den Zellen gegenüber hypoxischem Zelltod einen Vorteil bringen könnte, wurde der Zelltod mittels PI-FACS (3.1.2.1) in folgenden Zelllinien untersucht: LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-SCO2 (**Abbildung 4-18 A**), T98G-pcDNA3 und T98G-pcDNA3-SCO2 (**Abbildung 4-18 C**), LN-18-pcDNA3 und LN-18-pcDNA3-SCO2 (**Abbildung 4-18 D**), LNT-229puro-pcDNA3, LNT-229p53sh-pcDNA3 und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2 (**Abbildung 4-18 E**) und LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2 (**Abbildung 4-18 F**).

Es stellte sich heraus, dass SCO2 p53-unabhängig unter moderater Hypoxie (1% O₂) die Zellen vor Hypoxie-induziertem Zelltod zu schützen vermag. Eine zusätzliche Expression von SCO2 in LNT-229-Zellen schützte die Zellen unter diesen Bedingungen (LNT-229pcDNA3:LNT-229pcDNA3-SCO2 = 29,2%:2,9% Zelltod). Die Restoration von SCO2 in p53^{wt-defizient}-Systemen führte unter 1% O₂ zu einer geringeren Sensibilität gegenüber hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle:

- LNT-229puro-pcDNA3:LNT-229p53sh-pcDNA3:LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2= 19,6%:37,2%:16,6% Zelltod
- LNT-229hygro-pcDNA3:LNT-229p53ts-pcDNA3:LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2 =11,0%:24,9%:11,3% Zelltod.
- T98G-pcDNA3:T98G-pcDNA3-SCO2 = 45,6%:28,5% Zelltod
- LN-18-pcDNA3:LN-18-pcDNA3-SCO2 = 29,3%:16,6% Zelltod

Unter hochgradiger Hypoxie (0,1% O₂) konnte eine SCO2-Überexpression allerdings p53^{wt-defizient}-Zellen nicht schützen. Wahrscheinlich ist unter diesen Bedingungen unabhängig von SCO2 keine ausreichende Funktion der Atmungskette möglich. Unter Normoxie brachte die SCO2-Restoration in p53^{wt-defizient}-Zellen ebenfalls keinen Vorteil.

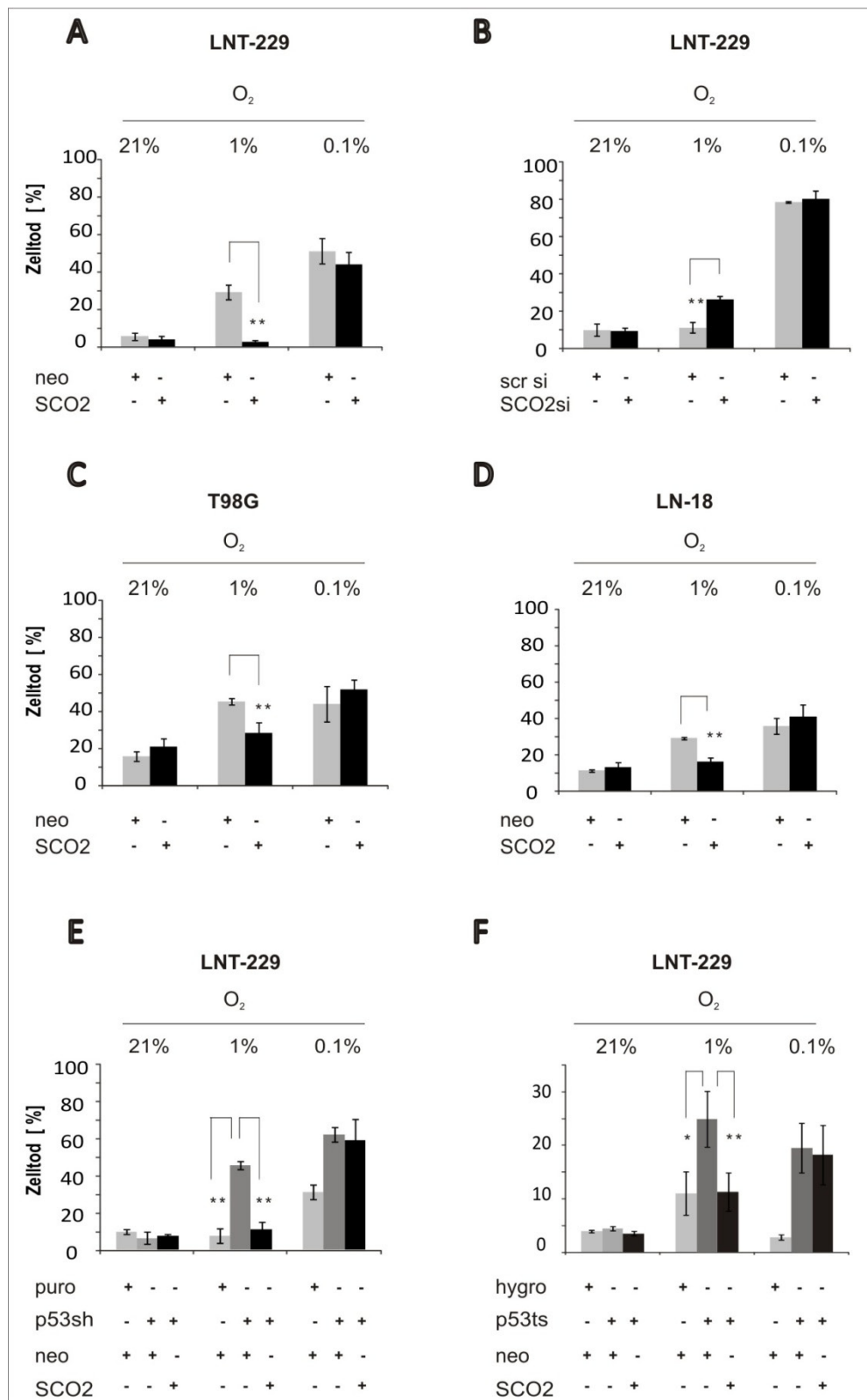


Abbildung 4-18: Zelltodanalyse unter Nährstoff- und Sauerstoffmangelbedingungen

Die Zellen wurden ausgesät, nach 24 h mit PBS gewaschen, mit 2 mM Glukose in SFM (LNT29-Zellen) oder 5 mM Glukose in (T98G und LN-18-Zellen) unter 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 24 h behandelt. Die Zelltodanalyse erfolgte mittels PI-FACS.

A LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-SCO2

B LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. SCO2siRNA2 (20 nM) transfiziert wurden

C T98G-pcDNA3 und T98G-pcDNA3-SCO2

D LN-18-pcDNA3 und LN-18-pcDNA3-SCO2

E LNT-229puro-pcDNA3, LNT-229p53sh-pcDNA3 und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2 und

F LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2.

Repräsentatives Experiment aus mind. 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

Zudem wurde überprüft, ob die Suppression von SCO2 in p53^{wt}-Zellen zu einer verstärkten Sensibilität gegenüber Hypoxie führt. Hierfür wurden LNT-229-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät, mit 20 nM scrambledsiRNA bzw. SCO2siRNA2 mittels Hiperfect transfiziert (**3.1.1.7**). Nach 24 h wurden die Zellen mit 2 mM Glukose in SFM unter 21%, 1% oder 0,1% Sauerstoff für 24 h behandelt. Nach weiteren 24 h wurde der Zelltod mittels PI-FACS untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Suppression von SCO2 in LNT-229-Zellen den durch moderate Hypoxie-induzierten Zelltod erheblich verstärken konnte (LNT-229scrambledsiRNA:LNT-229SCO2siRNA2 = 11,2%:26,2% Zelltod (**Abbildung 4-18 B**)). Unter 0,1% O₂ konnte auch hier wieder keine Veränderung im Zelltodverhalten festgestellt werden.

4.3.9 SCO2-überexprimierende Zellen haben geringere intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter moderater Hypoxie

Unter hypoxischen Bedingungen (182, 187-189) oder bei Hemmung der Atmungskette (190-193) nehmen die ROS-Konzentrationen zu, überwiegend bedingt durch die Freisetzung von Radikalen der Atmungskette bei Abbruch der Atmungsreaktionen (194-196) oder Hemmung der mitochondrialen Komplexe II (192) und III (197), aber auch des Cytochroms c (198). Folglich sollte untersucht werden, ob durch eine SCO2-Restoration in p53^{wt-defizient}-Zellen die ROS-Konzentrationen in der Zelle vermindert werden könnten, und ob durch eine SCO2siRNA-vermittelte Hemmung der Atmungskette die ROS-Konzentrationen in der Zelle wiederum steigen und für eine höhere Sensitivität von p53^{wt-defizient}-Zellen unter 1% O₂ verantwortlich sein könnten. Hierfür wurden mittels H₂DCFDA-FACS (**3.1.2.2**) die ROS-Konzentrationen in folgenden Zellsystemen untersucht: LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-SCO2 (**Abbildung 4-19 A**), T98G-pcDNA3 und T98G-pcDNA3-SCO2 (**Abbildung 4-19 B**) und LNT-229scrambledsiRNA und LNT-229SCO2siRNA2 (**Abbildung 4-19 C**).

Die Zellen wurden mit 5 mM Glukose in SFM unter 21% und 1% O₂ für 24 h behandelt (im Gegensatz zu den Zelltod-Untersuchungen wurde 5 mM anstatt 2 mM Glukose verwendet, da für diesen Assay die Zellen zwar schon auf die Mangelbedingungen reagieren, aber noch nicht sterben sollten). Die ROS-Konzentrationen wurden mittels H₂DCFDA-FACS ermittelt. Es stellte sich heraus, dass die Überexpression von SCO2 in LNT-229- und T98G-Zellen unter 21% O₂ und 1% O₂ die ROS-Konzentrationen in den Zellen vermindern konnte:

- LNT-229pcDNA3:LNT-229pcDNA3-SCO2 unter 21% O₂ = 300:150 DCF [Mittelwert]
- LNT-229pcDNA3:LNT-229pcDNA3-SCO2 unter 1% O₂ = 400:200 DCF [Mittelwert]
(Abbildung 4-19 A)
- T98G-pcDNA3:T98G-pcDNA3-SCO2 unter 21% O₂ 140 :110 DCF [Mittelwert]
- T98G-pcDNA3:T98G-pcDNA3-SCO2 unter 1% O₂ = 250:150 DCF [Mittelwert]
(Abbildung 4-19 B).

Zusätzlich vermittelte die SCO2-Hemmung über SCO2siRNA2 (20 nM) eine Erhöhung der ROS-Konzentrationen:

- LNT-229scrambledsiRNA vs LNT-229SCO2siRNA2 unter 21% O₂: 205:230 DCF [Mittelwert]
- LNT-229scrambledsiRNA vs LNT-229SCO2siRNA2 unter 1% O₂ = 270:300 DCF [Mittelwert] (Abbildung 4-19 C).

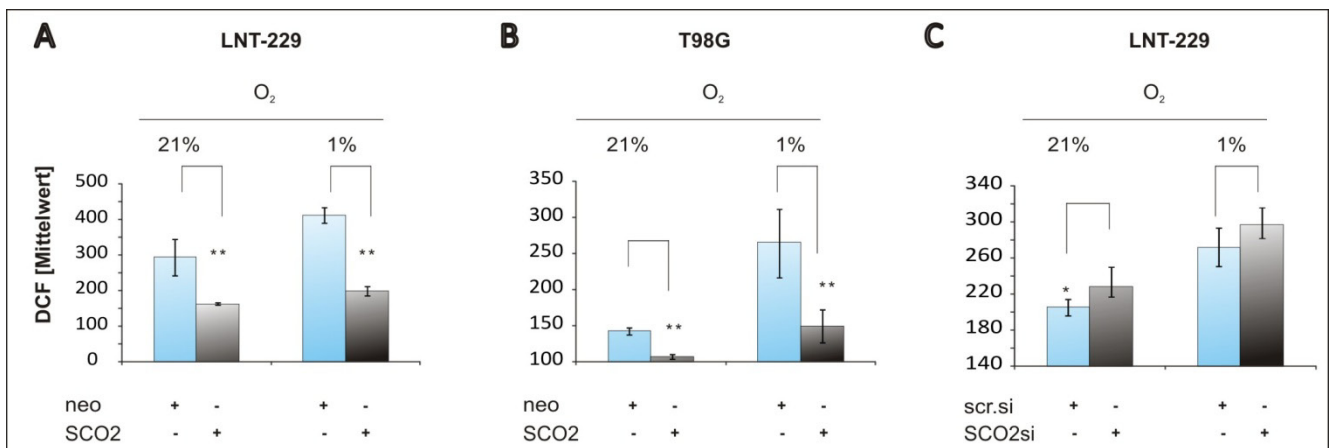


Abbildung 4-19: Intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter moderater Hypoxie und Nährstoffmangel

Zellen wurden mit 5 mM Glukose in SFM unter 21 und 1% O₂ für 24h behandelt und die ROS-Konzentrationen mittels H₂DCFDA-FACS ermittelt:

A LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-SCO2

B T98G-pcDNA3 und T98G-SCO2 und

C LNT-229scrambledsiRNA und LNT-229SCO2siRNA2 (20 nM).

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.3.10 Die Hemmung der Atmungskette revertiert den Effekt von SCO2 unter 1% O₂ in p53^{wt-defizient}-Zellen

Um zu untersuchen, ob der beschriebene SCO2-protective Phänotyp unter moderater Hypoxie (4.3.8) von einer funktionellen Atmungskette abhängt, wurde der Komplex I der Atmungskette mittels Rotenone inhibiert, der Rotenone-Effekt auf die mitochondriale Atmung gemessen (Abbildung 4-20 I), und der Rotenone-induzierte Zelltod mittels PI-FACS ermittelt (Abbildung 4-20 II). LNT-229p53ts-pcDNA3- und LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2-

(**Abbildung 4-20 I A**), T98-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-SCO2- (**Abbildung 4-20 I B**) und LNT-229p53sh-pcDNA3- und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2-Zellen (**Abbildung 4-20 I C**) wurden hierfür in Glasschälchen ausgesät (250.000 Zellen/Schale), nach 24 h für 1 h mit vorinkubiertem Medium +/- 100 nM Rotenone inkubiert und anschließend luftdicht verschlossen. Nach 48 h wurde der Sauerstoffverbrauch mittels HITACHI 917 gemessen und auf die Proteinkonzentration normiert (**3.2.3**). Zellen, die mit Rotenone behandelt wurden, wiesen einen geringeren Sauerstoffverbrauch auf als die Kontrollzellen:

- LNT-229p53ts-pcDNA3 +/- 100 nM Rotenone = 230:110 [mmHg/mg Protein]
- LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2 +/- 100 nM Rotenone = 250:215 [mmHg/mg Protein]
- T98G-pcDNA3 +/- 100 nM Rotenone = 360:185 [mmHg/mg Protein]
- T98G-pcDNA3-SCO2 +/- 100 nM Rotenone = 210:65 [mmHg/mg Protein]
- LNT-229p53sh-pcDNA3 +/- 100 nM Rotenone = 210:90 [mmHg/mg Protein]
- LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2 +/- 100 nM Rotenone = 250:75 [mmHg/mg Protein]

Es könnte sein, dass Rotenone unter 38,5°C weniger stabil (LNT-229p53ts-Zellen) oder nicht so effizient auf die Atmungskette wirken kann wie bei 37°C, was die niedrigen Werte bei LNT-229p53ts-Zellen erklären könnte. Dieselben Versuche wurden auch mit Oligomycin durchgeführt und lieferten ähnliche Ergebnisse. Oligomycin inhibiert die F₀-Untereinheit der ATP-Synthase und hemmt somit ebenfalls die Atmung.

Für die Zelltoduntersuchung wurden LNT-229p53ts-pcDNA3- und LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2- (**Abbildung 4-20 II A**), T98-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-SCO2- (**Abbildung 4-20 II B**) und LNT-229p53sh-pcDNA3- und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2-Zellen (**Abbildung 4-20 II C**) in 24-Well-Platten ausgesät und mit VM behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 2 mM Glukose in SFM, +/- 100 nM Rotenone unter 1% Sauerstoff für 24 h behandelt. Anschließend wurde der Zelltod mittels PI-FACS untersucht (**3.1.2.1**).

Durch die Zugabe von Rotenone wurde der protektive Effekt von SCO2 unter moderater Hypoxie aufgehoben:

- LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2 +/- 100 nM Rotenone = 30%:60% Zelltod
- T98G-pcDNA3-SCO2 +/- 100 nM Rotenone = 20%:40% Zelltod
- LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2 +/- 100 nM Rotenone = 5%:20% Zelltod

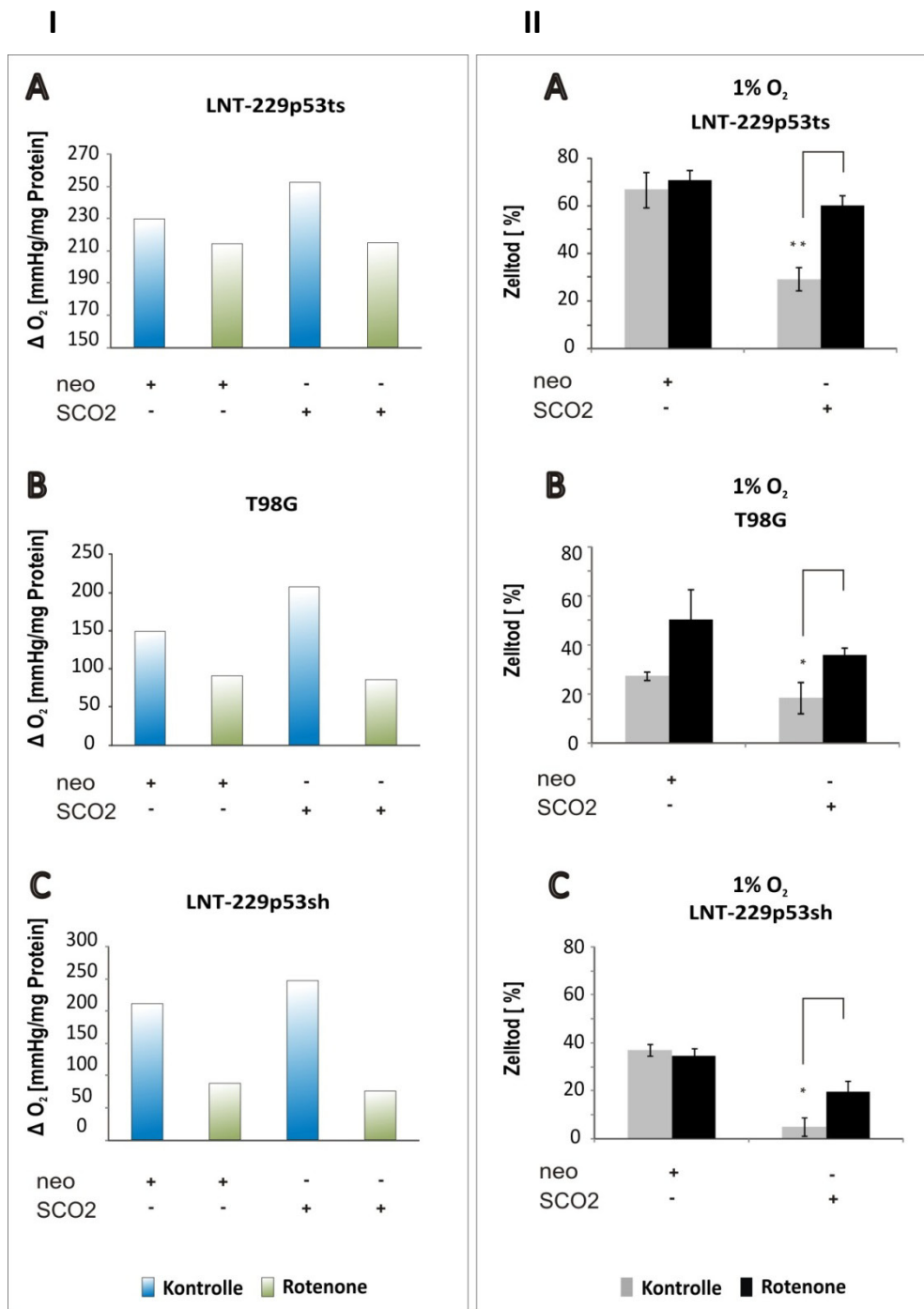


Abbildung 4-20: I- Blockade des Atmungskettenkomplexes I durch Rotenone und II- Rotenone-Effekt auf den Hypoxie-vermittelten Zelltod

- I Zellen wurden in Glasschälchen ausgesät (250.000 Zellen/Schale), nach 24 h für 1 h mit vorinkubiertem Medium +/- 100 nM Rotenone inkubiert und anschließend luftdicht verschlossen. Nach 48 h wurde der Sauerstoffverbrauch mittels Radiometer ermittelt und auf die jeweilige Proteinmenge normiert.
- A** LNT-229p53ts-pcDNA3- und LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2,
B T98-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-SCO2 und
C LNT-229p53sh-pcDNA3- und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2-Zellen
 Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen.
- II Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit 2 mM Glukose in SFM (LNT-229-Zellen) oder 5 mM Glukose in SFM (T98G-Zellen) +/-100 nM Rotenone, 1% O₂ für 24 h behandelt. Die Zelltodanalyse erfolgte mittels PI-FACS.
- A** LNT-229p53ts-pcDNA3- und LNT-229p53ts-pcDNA3-SCO2,

B T98-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-SCO2 und

C LNT-229p53sh-pcDNA3- und LNT-229p53sh-pcDNA3-SCO2-Zellen

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.3.11 HIF-1 α reguliert die Expression von Lon aber nicht von Cox4-2 in Gliomzellen

Fukuda et al. (176) konnten 2007 in Säugerzellen (HeLa- und 293-Zellen) zeigen, dass HIF-1 α unter reduzierten Sauerstoff-Bedingungen (10-1% O₂) die Expression der COX4-Untereinheiten in der Atmungskette steuert: COX4-1 wird gegen seine effizientere Isoform COX4-2 getauscht, um eine höhere Effizienz der mitochondrialen Atmung zu erzielen. Neben der positiven transkriptionalen Regulation der COX4-2 fördert HIF-1 α auch den Austausch der effizienteren COX4-Isoform in der Atmungskette über die Aktivierung von Lon, einer mitochondrialen Protease, die spezifisch COX4-1 degradiert (176). Darüber hinaus wurde von den Autoren auch die Expression von Lon und Cox4-2 in verschiedenen Geweben untersucht (Hirn, Herz, Lunge, Leber und Niere), aus Mäusen isoliert wurden, die drei Wochen mit 10% Sauerstoff behandelt wurden. Eine Steigerung der Lon-Expression konnte unter diesen Bedingungen im Mäusehirn nachgewiesen werden, eine Steigerung der Cox4-2-Expression allerdings nicht. Cox4-1 bzw. Cox4-2 werden vermutlich nur auf Proteinebene reguliert. Da es aber bis jetzt keinen Antikörper für diese Proteine gibt, kann noch kein direkter Proteinnachweis erbracht werden. Darüber hinaus hat Lon noch eine ROS-regulierende Funktion (226, 283), so dass auch ein protektiver Effekt gegenüber oxidativen Stress der Lon zugeschrieben werden kann. Es liegen noch keine Daten über eine Lon-Expression bzw. Regulierung in menschlichen Tumoren vor. Daher sollte zunächst in Gliomzellen untersucht werden, ob HIF-1 α die Expression von Lon oder Cox4-2 reguliert. Hierfür wurden LNT-229 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, nach 1 h transient mit pSUPERpuro-scrambled-shRNA bzw. pSUPERpuro-HIF-1 α shRNA mittels Metafectene Pro transfiziert (**3.1.1.7**), und 24 h nach Aussaat mit 500 μ L VM unter 5% O₂ für weitere 20 h behandelt. Anschließend wurde die Expression mittels RT-QPCR überprüft (**3.3.2**). Analog zu den Aussagen von Fukuda et al. konnten gezeigt werden, dass in den in dieser Arbeit verwendeten Gliomzellen HIF-1 α die Expression von Lon, aber nicht von Cox4-2 reguliert (**Abbildung 4-21**).

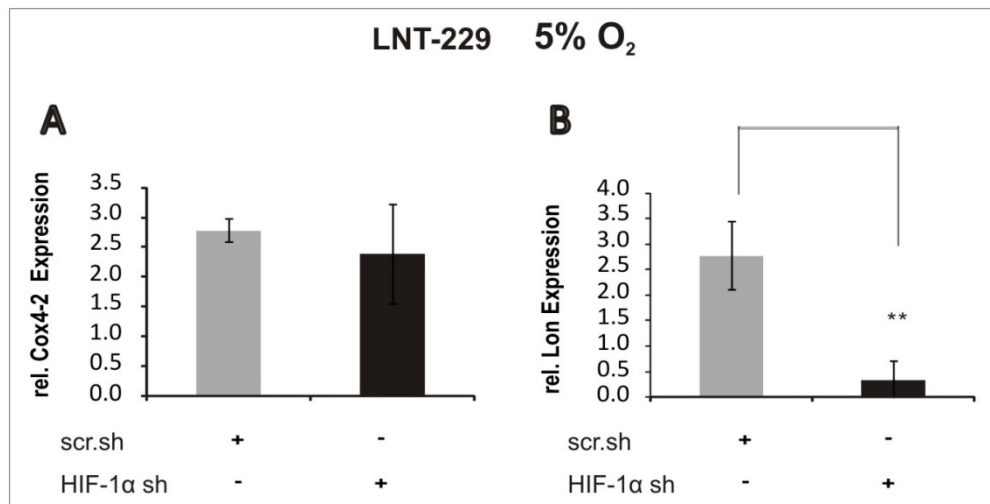


Abbildung 4-21: Regulierung der Cox4-2- und Lon-Expression unter moderater Hypoxie durch HIF-1 α

LNT-229-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, nach 1 h transient mit pSUPERpuro-scrambled-shRNA oder pSUPERpuro-HIF-1 α shRNA mittels Metafectene Pro transfiziert, und nach 24 h mit VM unter 5% O₂ für weitere 20 h behandelt. Anschließend wurde die Expression von Cox4-2 (A) und Lon (B) mittels RT-QPCR überprüft und auf SDHA normiert.

n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.3.12 HIF-1 α reguliert die Expression von SCO2 unter moderater Hypoxie

Um die Mechanismen der HIF-1 α -abhängigen Regulation der mitochondrialen Atmung weiter zu analysieren, wurde überprüft, ob auch SCO2 als mitochondriales Protein über HIF-1 α regulierbar sein könnte. Hierfür wurden LN229-Zellen, die stabil mit HIF-1 α bzw. mit dem Kontrollvektor SIMA transfiziert wurden, sowie LNT-229-Zellen, die transient mit dem Vektor pcDNA3 bzw. pcDNA3-HIF-1 α transfiziert wurden, unter 1% bzw. 5% O₂ für 24 h VM behandelt. Anschließend wurde die Expression von HIF-1 α , SCO2 und Lon in diesen Zellen mittels Q-RT-PCR überprüft (3.3.2). Es stellte sich heraus, dass SCO2 bei allen untersuchten Sauerstoffpartialdrucken über HIF-1 α reguliert wurde: Die Überexpression von HIF-1 α steigerte die Expression von SCO2:

- unter 5% O₂ um 2.400% (**Abbildung 4-22 B**)
- unter 1% O₂ um 85% (**Abbildung 4-23 B**)

Eine Herunterregulierung der SCO2-Expression konnte in LN-229HIF-1 α -supprimierten Zellen beobachtet werden:

- unter 5% O₂ um -325% (**Abbildung 4-22 E**)
- unter 1% O₂ um -150% (**Abbildung 4-23 E**)

Unter 5% O₂ wurde die Lon-Expression HIF-1 α -vermittelt reguliert: Eine HIF-1 α -Suppression reduzierte die Lon-Expression um 625%, und durch eine HIF-1 α -Überexpression wurde die Lon-Expression um 900% verstärkt. Es konnte allerdings keine Lon-Regulation bei 1% O₂

beobachtet werden, es erfolgt demnach eine unterschiedliche, sauerstoffabhängige Regulierung der Lon-Expression, nicht aber der SCO2-Expression über HIF-1 α .

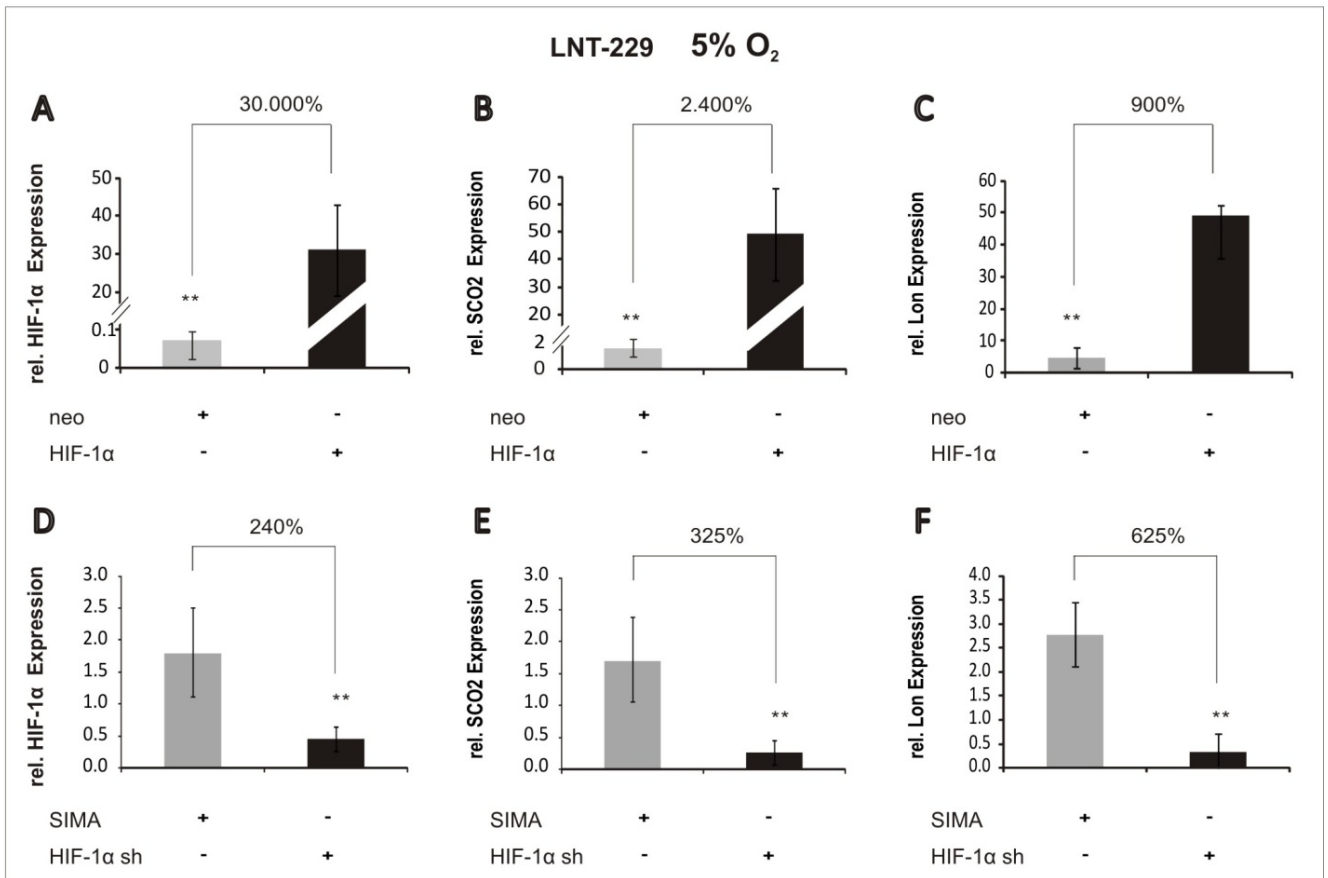


Abbildung 4-22: Regulierung der SCO2- und Lon- Expression durch HIF-1 α unter moderater Hypoxie (5% O₂)

Stabile LN-229-SIMA und - HIF-1 α -Zellen (A-C) und LNT-229-Zellen, die transient mit pcDNA3 bzw. pDNA3-HIF-1 α transfiziert wurden (D-F), wurden in 6-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit VM unter 5% O₂ für 24 h behandelt. Danach wurde die HIF-1 α -, die SCO2- und die Lon-Expression mittels Q-RT PCR überprüft und auf SDHA normiert.

n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

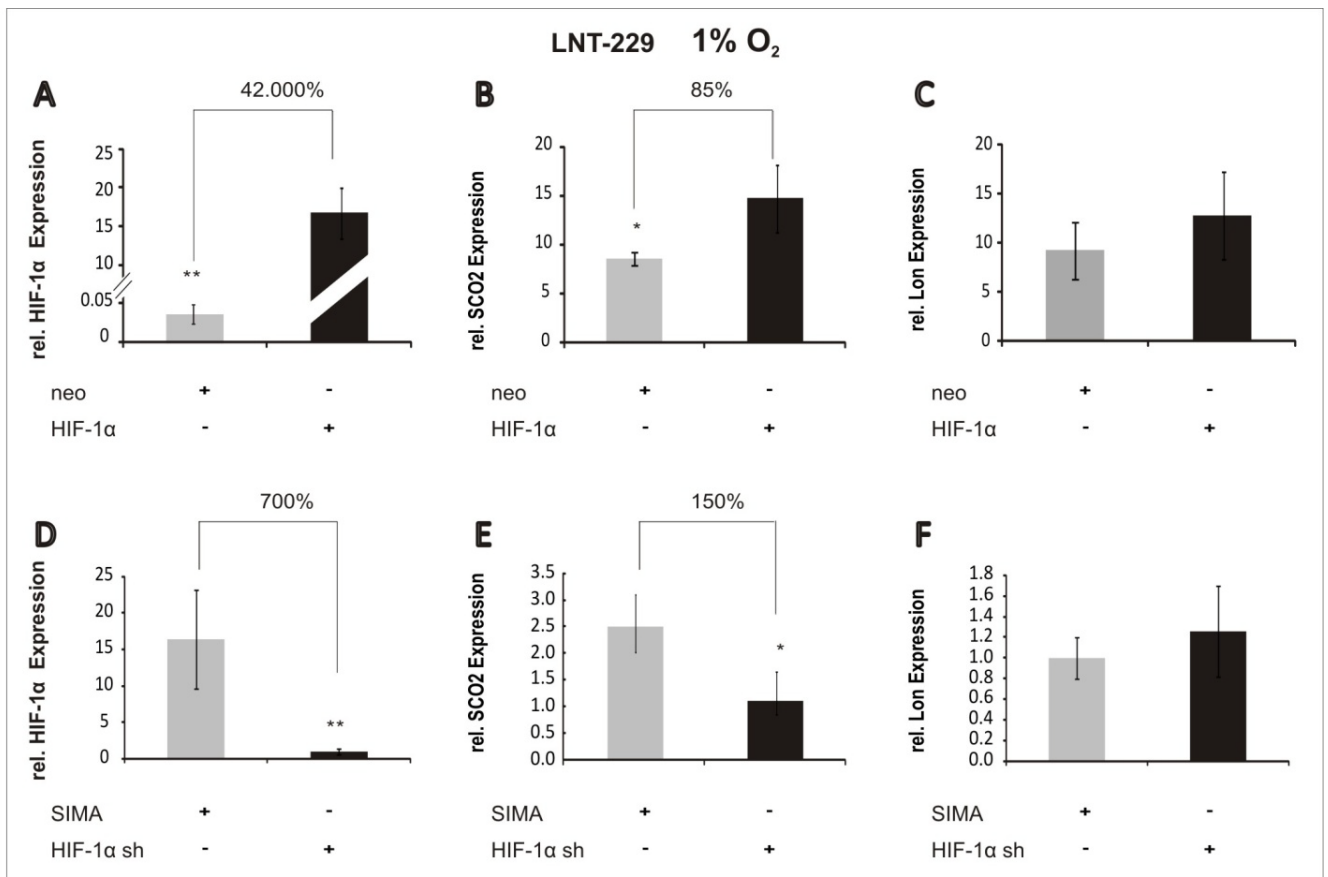


Abbildung 4-23: Regulierung der SCO2- und Lon- Expression durch HIF-1α unter moderater Hypoxie (1% O₂)

Stabile LN-229-SIMA und - HIF-1α-Zellen (A-C) und LNT-229-Zellen, die transient mit pcDNA3 bzw. pcDNA3-HIF-1α transfiziert wurden (D-F), wurden in 6-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit VM unter 1% O₂ für 24 h behandelt. Danach wurde die HIF-1α-, die SCO2- und die Lon - Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf SDHA normiert.

n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.4 TIGAR als möglicher metabolischer Mediator von p53-abhängigen Hypoxie-protectiven Effekten

Für den Schutz von p53^{wt}-Zellen vor moderater Hypoxie konnte SCO2 als protektives Protein identifiziert werden. Unter hochgradiger Hypoxie (0,1% O₂) spielte SCO2 allerdings keine signifikante Rolle: Weder Überexpression noch Suppression mittels siRNA hatten einen Effekt auf den durch hochgradige Hypoxie vermittelten Zelltod. Wir vermuteten daher, dass andere, in der Hypoxie aktive metabolische Zielgene von p53 hierbei von Bedeutung sein könnten.

Bensaad et al. (33) identifizierten TIGAR im Jahre 2006 als metabolisches Zielgen von p53 in Lungenkarzinom- (H1299/MRC-5), in Osteosarcom- (U2OS), in Kolonkarzinom- (RKO/HCT116) und in Mammakarzinom-Zellen (MCF-7). TIGAR ist ein Glykolyse-Inhibitor und Pentosephosphat-Weg-Aktivator. Dadurch wird die NADPH-Konzentration in den Zellen erhöht, was zu einem verstärkten Schutz vor ROS und vor Autophagie führt (33, 35). Diese

Eigenschaften könnten zu einem Schutz vor Hypoxie-induziertem Zelltod führen, da die ROS, die beim Atmungskettenabbruch entstehen, schneller abgebaut werden können. Im nachfolgenden Teil wurde diese Hypothese in Gliomzellen überprüft. Ebenso wurden mögliche Funktionen von TIGAR unter normoxischen Bedingungen untersucht.

4.4.1 TIGAR *in silico*-Untersuchung

Eine *in silico*-Analyse an drei großen Datensätzen mit Expressionsprofilen von malignen Gliomen (Sun et al., 2006, TCGA 2009, Philips et al. 2006) mittels der Oncomine-Datenbank (www.oncomine.org) ergab eine regelhafte, jedoch erheblich variierende Expression von TIGAR-mRNA. Die Analyse der Rembrandt-Datenbank (<http://rembrandt.nci.nih.gov>) ergab bei der Analyse der Datensätze von 343 Gliomen interessanterweise eine Korrelation von TIGAR-Überexpression mit ungünstigem Verlauf (s. Datenbank-Untersuchungen unter 6.6.2).

4.4.2 TIGAR ist ein p53-Zielgen in Gliom-Zelllinien

Da noch keine Daten über die TIGAR-Expression bzw. -Regulierung in Gliomen vorhanden waren, wurde zunächst überprüft, ob in der Gliom-Zelllinie LNT-229 TIGAR ebenfalls ein p53-Zielgen ist. Hierfür wurde die TIGAR-Expression in LNT-229puro/p53sh (A) und LNT-229hygro/p53ts- (B) Zellen mittels QRT-PCR ermittelt (3.3.2). Ebenso wurde, um die Spezifität der verwendeten Primer zu kontrollieren, die TIGAR-Expression in HCT116-Zellen überprüft ((33) und **Abbildung 4-24 C**).

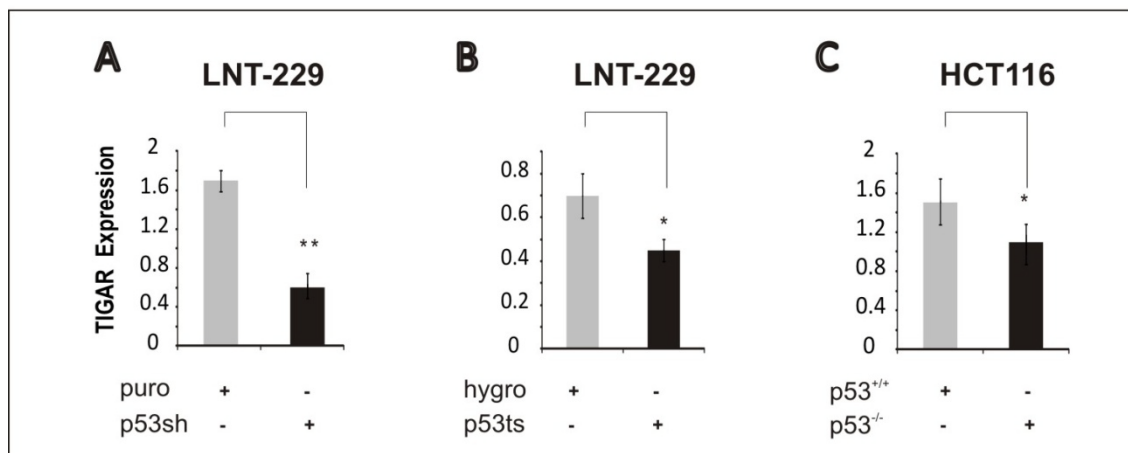


Abbildung 4-24: Relative Expression von TIGAR in p53^{wt-defizient}-Zellen

Die TIGAR-Expression wurde in folgenden Zelllinien mittels QRT-PCR ermittelt:

A LNT-229puro- und p53sh-,

B LNT-229hygro- und p53ts- und

C HCT116 p53^{+/+}- und HCT116 p53^{-/-}-Zellen.

Normiert wurde auf 18S und GAPDH. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

Die Analyse ergab, dass auch in dieser Zelllinie TIGAR ein p53-Zielgen ist: In allen untersuchten Systemen war die TIGAR-Expression in p53^{wt-defizient}-Zellen im Vergleich zur jeweiligen p53^{wt}-Kontrolle signifikant vermindert: Bei den LNT-229p53sh vs. LNT-229puro war die TIGAR-Expression um 70% vermindert; bei LNT-229p53ts vs. LNT-229hygro um 40%; bei HCT116 p53^{-/-} vs. HCT116 p53^{+/+} um 30%).

4.4.3 Herstellung von TIGAR-Transfektanten

TIGAR wurde als p53-Zielgen beschrieben, obwohl TIGAR auch in p53^{wt-defizient}-Zellen vorkommen kann (33). Um die Funktionen von TIGAR in Bezug auf den p53-Status in Gliomzellen zu überprüfen und später die metabolischen Eigenschaften von TIGAR zu untersuchen, wurden pcDNA3.1-TIGAR und pcDNA3.1 transient in LNT-229-Zellen transfiziert und die TIGAR-Expression mittels QRT-PCR überprüft (**Abbildung 4-25 A**), wobei die Transfektionseffizienz bei den transienten Pools nicht immer sehr hoch und die TIGAR-Expression in diesen Zellen instabil war. Aus diesem Grund wurden die meisten Versuche überwiegend mit stabilen Systemen durchgeführt. Zusätzlich wurde mittels siRNA die Expression von TIGAR in LNT-229 transient supprimiert. Hierfür wurden zunächst zwei Sequenzen, die aus Bensaad et al 2006 (33) entnommen wurde, auf ihre Effizienz hin untersucht. Die Positionen der verschiedenen siRNAs sind dem Methodenteil zu entnehmen, (s. **Tabelle 4**). Die siRNAs wurden mittels HiPerfect (Qiagen, Hilden) in LNT-229-Zellen transfiziert, die 30 min zuvor in eine 24-Well-Platte ausgesät wurden. Zu jedem Well wurden 5, 20, 50 oder 100 nM siRNA hinzugegeben. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und RNA wurde mittels Trizol-Aufreinigung gewonnen, cDNA hergestellt, diese in der QRT-PCR untersucht und die Expression von TIGAR auf die 18S- und GAPDH-mRNA normiert. Nur die siRNATIGAR1 vermochte es, in einer Konzentration von 100 nM die Expression von TIGAR zu supprimieren (-85%, **Abbildung 4-25 B**), die siRNA2 hatte keinen Einfluss auf die Expression von TIGAR (hier nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde TIGAR stabil in p53^{wt}- und p53^{wt-defizient}-Zelllinien transfiziert. Hierfür wurden T98G- und LNT-229hygro/p53ts-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und 24 h mit VM behandelt. Anschließend wurde TIGAR mit dem Plasmid pcDNA3.1-TIGAR stabil transfiziert (**3.1.1.6**). Als allgemeine Kontrolle für diese Transfektanten diente der Vektor pcDNA3.1. Als weitere Kontrolle wurde der Vektor pcDNA3.1-TIGAR-TM in LNT-229hygro/p53ts- und T98G-Zellen transfiziert: TIGAR-TM kodiert ebenfalls für TIGAR, allerdings sind drei Aminosäuren in der enzymatischen Tasche mutiert, die für die Glykolyse-Hemmung essentiell sind (H11A/E102A/H198A (33)). Nach drei Wochen Selektion mit G418 wurde die TIGAR-Expression in den Pools mittels QRT-PCR überprüft (**3.1.1.2** und **3.3.2**). Es konnte in T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen eine 3-fache TIGAR-Überexpression erreicht werden. Auch bei den

T98G-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen konnte eine 2,5-fache Expression erreicht werden (**Abbildung 4-25 C**). In LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-TM, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM konnte ebenfalls eine hohe Expression von TIGAR festgestellt werden (**Abbildung 4-25 D**). Die verwendeten Primer erkennen sowohl TIGAR als auch TIGAR-TM (s. **Tabelle 3**)

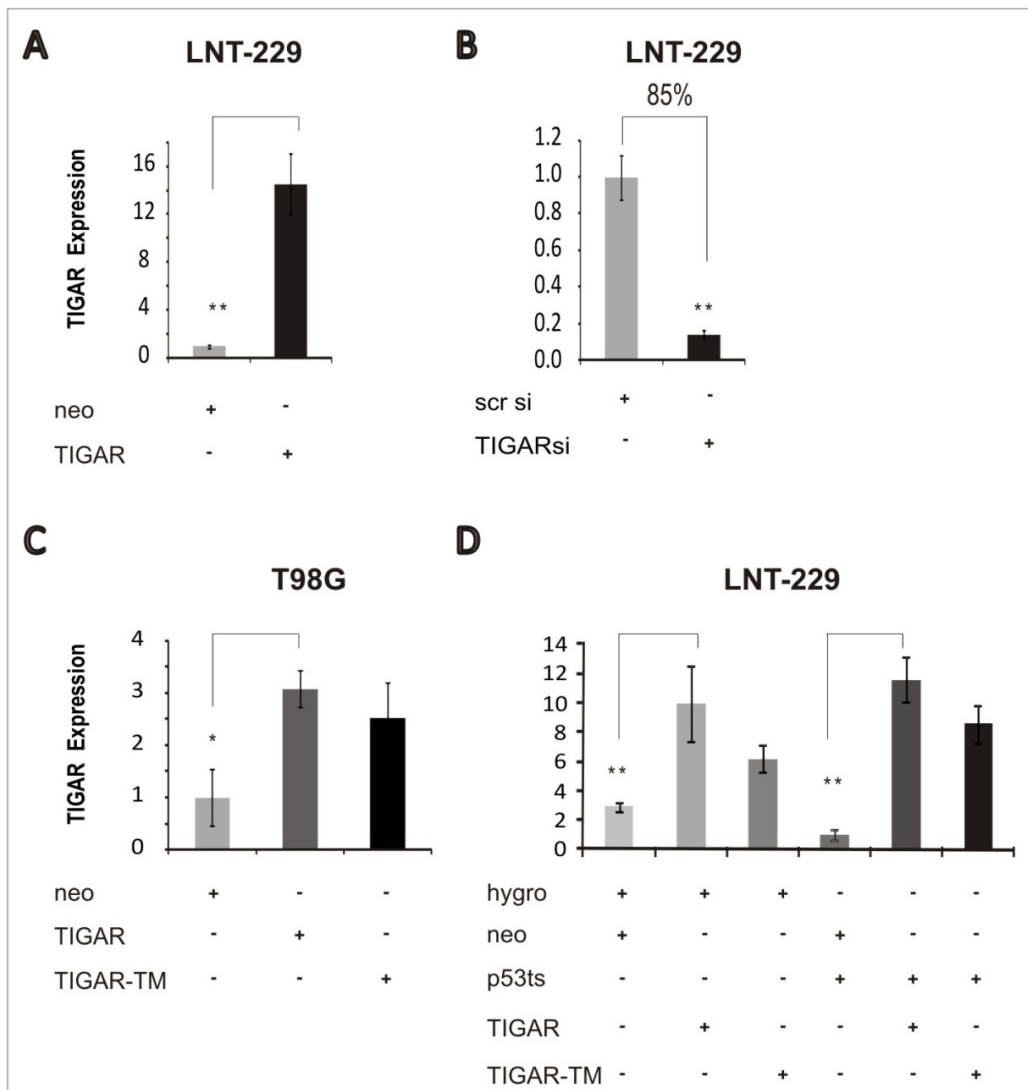


Abbildung 4-25: Relative Expression von TIGAR in den verwendeten TIGAR-Zellsystemen

Die TIGAR-Expression wurde in folgenden Zelllinien mittels QRT-PCR ermittelt:

A transiente LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-TIGAR,

B LNT-229scrambledsiRNA und LNT-229TIGARsiRNA1 (100 nM),

C T98G-pcDNA3, T98-pcDNA3-TIGAR und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM und

D LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR und LNT-229p53tspcdna3-TIGAR-TM.

Als Kontrollgenen wurden 18S und GAPDH verwendet. TM ist eine TIGAR-Mutante, die die Funktion von TIGAR als Glykolyse-Hemmer nicht mehr erfüllen kann. Das TIGAR-Primerpaar 2 erkennt sowohl TIGAR als auch die TM-Mutante. p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.4.4 Untersuchungen von TIGAR unter Normoxie

4.4.4.1 TIGAR verstärkt die mitochondriale Atmung

Es ist bekannt, dass TIGAR über seine FBPase-2-Domäne die Glykolyse hemmt, indem es die intrazelluläre Fru-2,6-BP-Konzentration reguliert (33). Um zu überprüfen, ob TIGAR dadurch zu einer kompensatorischen Verstärkung der oxidativen Phosphorylierung in Gliomzellen führen kann, wurde der Sauerstoffverbrauch in folgenden Zelllinien gemessen (**3.2.3**): transiente LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-TIGAR (**Abbildung 4-26 A**), LNT-229scrambledsi und LNT-229TIGARsiRNA1 (100 nM) (**Abbildung 4-26 B**), T98G-pcDNA3, T98G-pcDNA3-TIGAR und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM (**Abbildung 4-26 C**) und LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-TM, LNT-229p53ts-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM (**Abbildung 4-26 D**). Hierfür wurden diese Zellen in Glasschälchen ausgesät (250.000 Zellen/Schälchen) und nach 24 h mit 2 mL vorinkubierten VM für 1 h behandelt. Anschließend wurden die Schälchen luftdicht mit Klammern verschlossen. 48 h nach Schließen der Schälchen wurden die Klammern entfernt und der Sauerstoff mittels ABL-80 (Radiometer, Willich) gemessen. Im Falle der transienten Transfektion wurden die Zellen 24 h nach Aussaat mit Metafectene Pro jeweils die Vektoren pcDNA3 oder pcDNA3.1-TIGAR transfiziert (**3.1.1.7**). Danach wurden die Zellen für die Proteinbestimmung mit Trypsin gelöst und in Proteinlysepuffer aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay analysiert. Die Gesamtmenge an Protein wurde aus Proteinkonzentration $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ x Gesamtvolumen der Proteinprobe ermittelt.

Eine Überexpression von TIGAR in LNT-229p53^{wt} (**Abbildung 4-26 A und D**)-Zellen führte zu einer Zunahme der Atmung von ca. 10-15%. Auch in den p53^{wt-defizient}-Systemen ermöglichte eine TIGAR-Expression eine verstärkte Atmung: LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen wiesen eine Zunahme der Atmung von 10% im Vergleich zu LNT-229p53ts-Zellen auf (**Abbildung 4-26 D**). In T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen war sogar eine Zunahme von ca. 50% im Vergleich zu T98G-pcDNA3 zu beobachten (**Abbildung 4-26 C**). Die Expression von TIGAR verursacht daher eine Zunahme der Atmung und eröffnet folglich die Möglichkeit, oxidative Phosphorylierung als alternative Energie-Quelle zur Glykolyse zu benutzen.

Um zu überprüfen, ob die Expression von TIGAR und nicht von TIGAR-TM zu einer verstärkten mitochondrialen Atmung führt, also ob eine Zunahme der Atmung direkt mit der Glykolyse-Hemmung zusammenhängt, und nicht von einer bis jetzt unbekannt anderen Funktion von TIGAR, wurde der Sauerstoffverbrauch in **C** LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-TM-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM- und **D** T98G-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen ermittelt. Die Expression von TIGAR-TM sowohl in T98G- als auch in LNT-229hygro- und LNT-229p53ts-Zellen führte zu keiner Zunahme der Atmung. Diese Beobachtungen führten zu der

Annahme, dass die Zunahme der Atmung auf der TIGAR-Funktion in der Glykolysehemmung beruht.

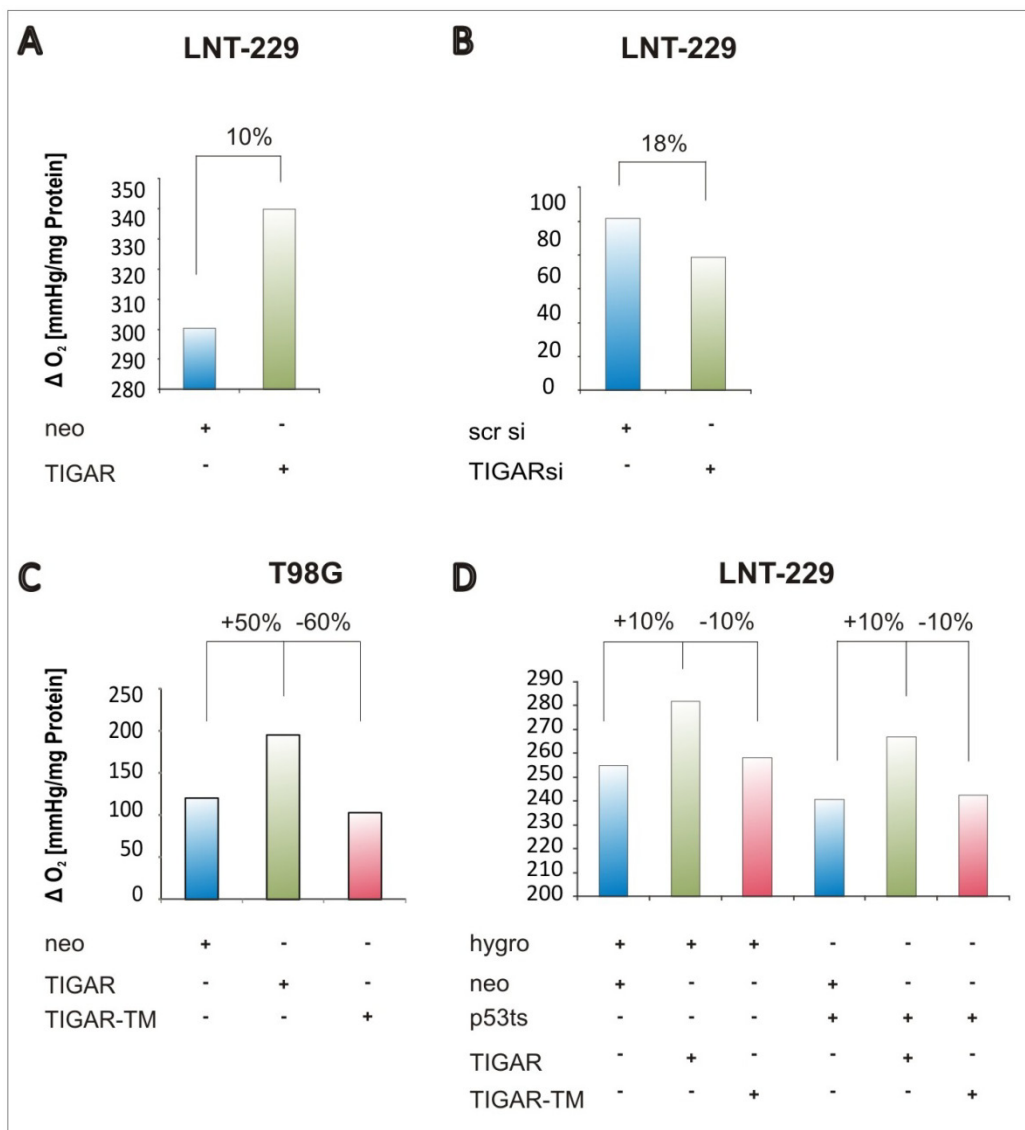


Abbildung 4-26: Der Effekt von TIGAR auf den zellulären Sauerstoffverbrauch

Die Zellen wurden in Glasschälchen ausgesät (250.000 Zellen/Schälchen), nach 24 h mit 2 mL vorinkubiertem Medium inkubiert und anschließend luftdicht verschlossen. Nach 48 h wurde der Sauerstoff mittels Radiometer gemessen und auf die jeweilige Proteinmenge normiert (3.2.3).

A transiente LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-TIGAR,

B LNT-229scrambledsi und LNT-229TIGARsiRNA1 (100 nM)

C T98G-pcDNA3, T98G-pcDNA3-TIGAR und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM und

D LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-TM, LNT-229p53ts-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM.

Repräsentatives Experiment aus mind. 3 unabhängigen Versuchen.

Da eine TIGAR-Überexpression zu verstärkter Atmung führte, wurde anschließend verifiziert, ob eine TIGAR-Suppression verminderte Zellatmung zur Folge hat. Hierfür wurden LNT-229-Zellen in Glasschälchen ausgesät und mit TIGARsiRNA1 (100 nM) mittels HiPerfect transfiziert (3.1.1.7). Als Kontrolle wurde scrambledsiRNA (100 nM) transfiziert. 24 h nach

Transfektion wurden die Zellen mit 2 mL vorinkubierten Medium (VM) 1 h lang behandelt und die Glasschälchen anschließend mit Klammern luftdicht verschlossen. Nach 48 h wurde der Sauerstoff gemessen und der Sauerstoffverbrauch/Proteinkonzentration ermittelt. Es stellte sich heraus, dass eine TIGAR-Suppression eine verminderte mitochondrialen Atmung zur Folge hat (-18%) (**Abbildung 4-26 B**). Damit konnten Daten von Bensaad et al. (33) bestätigt werden, die in U2OS- und FL5.12-Zellen über die Umwandlung von 5-³H-Glukose zu ³H-H₂O zeigen konnten, dass TIGAR die glykolytische Rate vermindert.

4.4.4.2 TIGAR und die Glykolyse

TIGAR weist hohe Similarität mit der FBPase-2 auf, die die Glykolyse über die Regulierung des Fruktose-2,6-Bisphosphat-Levels beeinflussen kann. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass TIGAR die Atmung verstärken kann (**4.4.4.1**). Über den PPP werden z.T. Metabolite (FBP-2 und G3P) wieder zurück in die Glykolyse geschleust (62). Diese können dann weiter zu Pyruvat und Laktat abgebaut werden. Dies erscheint auch im Hinblick auf die Hypoxie wichtig, da diese Metabolite HIF-1 α stabilisieren (284, 285) und Einfluss auf den Metabolismus haben. Um zu überprüfen, ob die PPP-Aktivierung über TIGAR ebenfalls zu einer solchen erhöhten Laktatproduktion führt, wurde die Laktatproduktion in TIGAR-überexprimierenden Zellen untersucht. Gleichzeitig wurde auch der Glukoseverbrauch ermittelt, um die Glykolyse-Rate zu berechnen. Hierfür wurden LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h für 24 h mit 500 μ L 25 mM 21% und 0,1% O₂ behandelt und die Glukose- und Laktat-Werte mittels HITACHI 917 ermittelt (**3.2.3**). Eine TIGAR-Überexpression führte in der Normoxie zu einer Zunahme des Glukoseverbrauchs (**Abbildung 4-27 A**), aber nicht der Laktatproduktion (**Abbildung 4-27 B**), was auf eine erhöhte oxidative Phosphorylierungsaktivität schließen lässt. Unter hypoxischen Bedingungen hingegen wurden der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion verstärkt. Dies könnte aber daran liegen, dass über den PPP Metabolite zurück in die Glykolyse geschleust werden und die Endprodukte aufgrund einer Atmungshemmung unter diesen Bedingungen fast ausschließlich in Laktat umgewandelt werden. Die Ermittlung des glykolytischen Index (Laktat-Produktion/Glukose-Verbrauch) ergab, dass in p53^{wt}-Zellen eine Überexpression von TIGAR die Glykolyse sowohl in der Normoxie (-15%) als auch in der Hypoxie (-10%) hemmt, bzw. dass die Glukose andersweitig eingesetzt wurde (vermutlich über den PPP) (**Abbildung 4-27 C und D**). Dies steht im Einklang mit Bensaad et al. (33). Die Restoration von TIGAR in p53^{wt-defizient}-Zellen konnte allerdings weder in der Normoxie noch in der Hypoxie den glykolytischen Index beeinflussen.

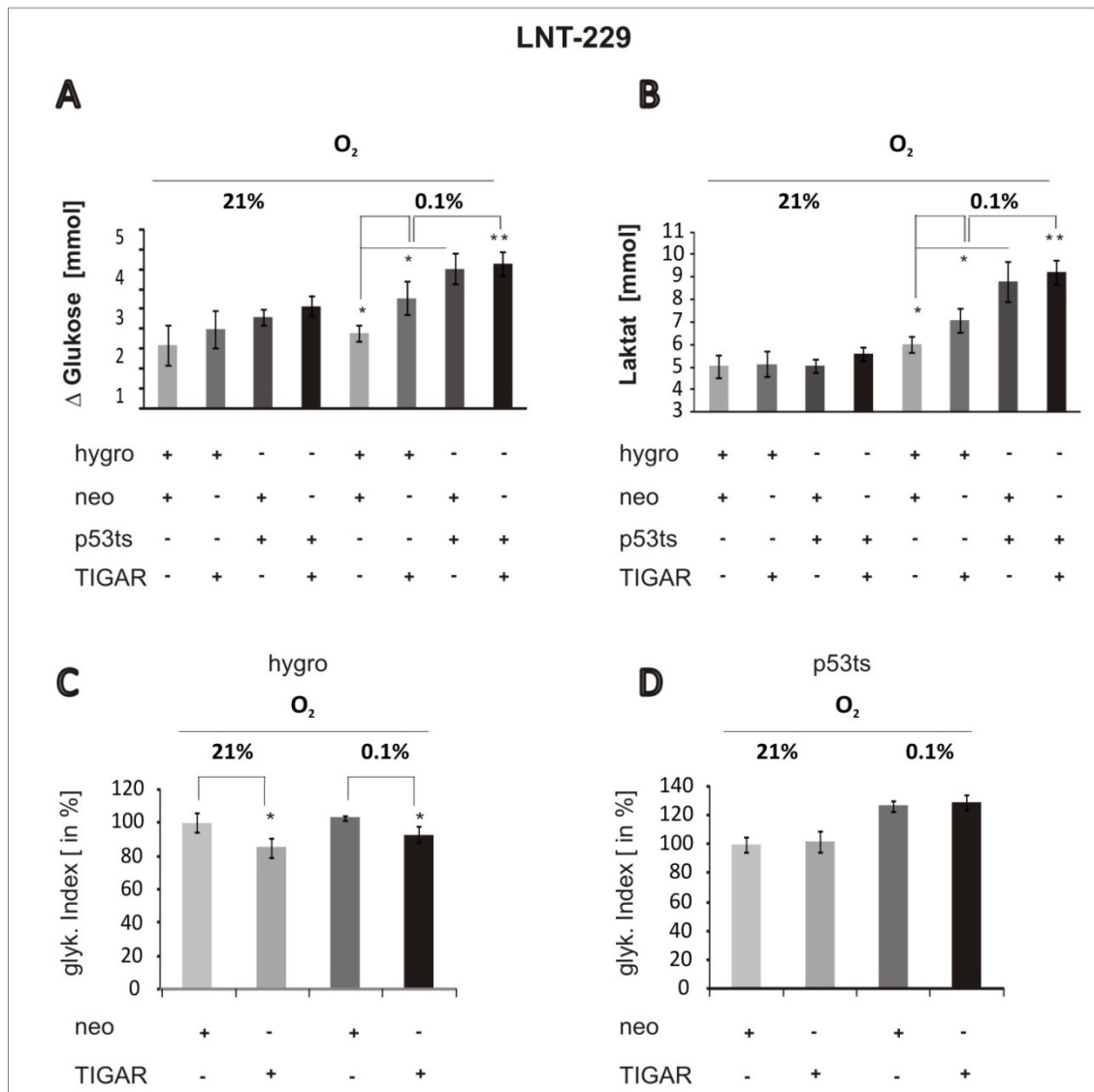


Abbildung 4-27: Glykolyse-Hemmung in TIGAR-überexprimierenden Zellen

LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229hygro-pcdna3-TIGAR-, LNT-229p53ts-pcDNA3- und LNT-229pcDNA3-TIGAR-Zellen wurden ausgesät und nach 24 h mit 5mM Glukose in SFM und 21% bzw. 0,1% O₂ für 16 h behandelt. Der Glukoseverbrauch (A) und die Laktatproduktion (B) wurden mittels HITACHI 917 gemessen, und der glykolytische Index ermittelt (C und D). Der glykolytische Index berechnet sich zu: Laktatproduktion in mmol/ Glukoseverbrauch in mmol. Dieser Wert befindet sich stets zwischen 1 (die Zellen betreiben nur oxidative Phosphorylierung) und 2 (die Zellen betreiben nur Glykolyse).

Mittelwert aus n=5 unabhängigen Versuchen, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.4.4.3 HIF-1 α reguliert die Expression von TIGAR unter moderater Hypoxie

Da HIF-1 α die Expression von SCO2 und Lon in Gliomzellen reguliert (Abbildung 4-22 und Abbildung 4-23) und somit vielleicht auch die Atmung unter moderater Hypoxie (1-5% O₂) steigern kann (Abbildung 4-15), wurde überprüft, ob unter diesen Bedingungen auch TIGAR über HIF-1 α regulierbar ist und somit die Atmung beeinflussen kann. Hierfür wurden LNT-229-Zellen transient mit pcDNA3- bzw. pcDNA3-HIF-1 α transfiziert (A-C) und LN229-Zellen,

die stabil mit HIF-1 α -sh bzw. mit dem Kontrollvektor SIMA transduziert wurden (**D-F**) mit 21%, 5% bzw. 1% O₂ für 24 h mit VM behandelt und anschließend die Expression von TIGAR mittels QRT-PCR überprüft (**3.3.2**). Es konnte eine positive Korrelation zwischen HIF-1 α - und TIGAR-Expression hergestellt werden:

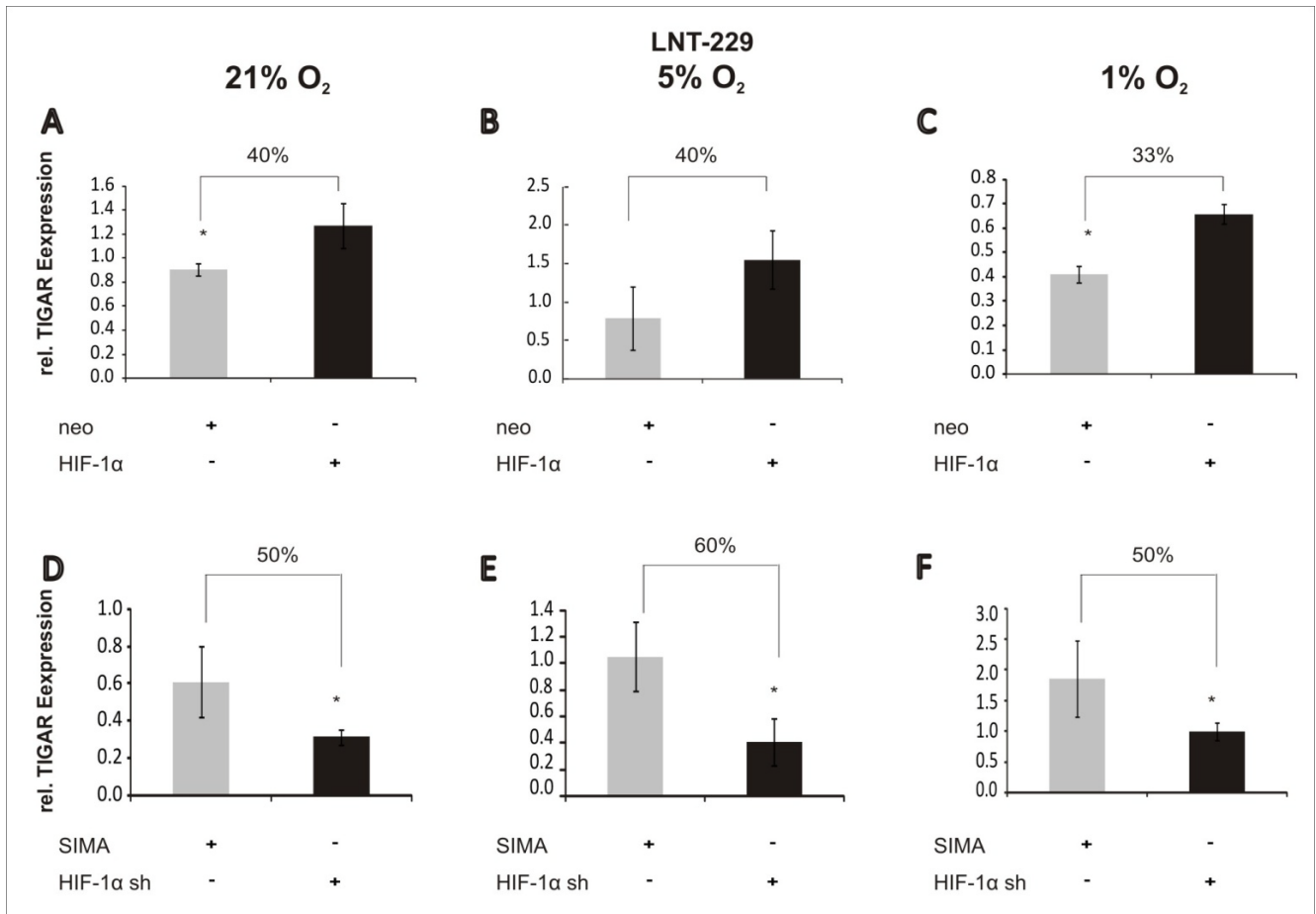


Abbildung 4-28: HIF-1 α -Regulierung der TIGAR-Expression

Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit VM unter 21%, 5% bzw. 1% O₂ für 24 h behandelt. Nach RNA-Aufreinigung dieser Zellen und anschließender cDNA-Herstellung wurde die TIGAR-Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf SDHA normiert.

A-C LNT-229-Zellen, die transient mit pcDNA3 bzw. pcDNA3-HIF-1 α transfiziert wurden, und

D-F Stabile LN-229-SIMA- und -HIF-1 α Zellen.

n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

Eine Überexpression von HIF-1 α führte unter allen untersuchten Sauerstoffbedingungen zu Expressionssteigerung von TIGAR:

- unter 21% O₂ konnte eine Expressionssteigerung von TIGAR von 40% beobachtet werden (**Abbildung 4-28-A**).
- unter 5% O₂ von 40% (**Abbildung 4-28-B**).
- unter 1% O₂ von 33% (**Abbildung 4-28-C**).

Eine HIF-1 α -Suppression führte zu einer verminderten Expression von TIGAR, auch unter allen genannten Sauerstoffbedingungen:

- unter 21% O₂ konnte eine Expressionsverminderung von TIGAR von 50% beobachtet werden (**Abbildung 4-28-D**).
- unter 5% O₂ von 60% (**Abbildung 4-28-E**).
- unter 1% O₂ von 50% (**Abbildung 4-28-F**).

4.4.5 TIGAR reguliert die Aktivität von HIF-1 α unter moderater Hypoxie

Die Expression von TIGAR korrelierte positiv mit einer Verstärkung der oxidativen Phosphorylierung (**4.4.4.1**). Da in **4.3.12** auch gezeigt werden konnte, dass HIF-1 α die Expression von SCO2 zu regulieren vermag, wurde postuliert, dass TIGAR die Atmung über die Stabilisierung oder Transaktivierung von HIF-1 α , und somit vielleicht über die Induzierung der SCO2-Expression regulieren könnte. Um zunächst eine mögliche TIGAR-vermittelte HIF-1 α -Regulierung zu überprüfen, wurde die HIF-1 α -Transaktivität TIGAR-abhängig mittels HIF-1 α -Reporter-Gen-Assay in Gliomzellen untersucht.

Hierfür wurden LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR in 96-Well-Platten ausgesät (10.000 Zellen), nach 24 h mit 150 ng HIF-1 α -Reportervektor und 20 ng Renilla-Plasmid/Well mittels Metafectene Pro transfiziert (**3.1.3**), nach 36 h wurden die Zellen für 8 h mit 5 mM Glukose in SFM unter 10% bzw. 5% O₂ behandelt. Anschließend wurde verfahren wie in **3.1.1.7** beschrieben (**Abbildung 4-29 A und B**). Die Reporter-Untersuchungen zeigten, dass unter moderater Hypoxie (5% O₂) die Restoration von TIGAR in p53^{wt-defizient}-Zellen HIF-1 α unter dieser Behandlung aktivieren kann (**B**), unter 10% O₂ dennoch noch keine Regulierung von HIF-1 α zu beobachten war (**A**). Auch wurde die HIF-1 α -Proteinmenge mittels WB (**3.4**) ermittelt (**C und D**): Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, nach 24 h für 24 h mit 5 mM Glukose in SFM 10% bzw. 5% O₂ behandelt. Eine Regulierung auf der Protein-Ebene konnte nicht beobachtet werden (**Abbildung 4-29 C und D**).

Zugleich konnte eine erhöhte HIF-1 α -Transaktivität und eine erhöhte Proteinmenge unter 5% O₂ in p53ts-Zellen im Vergleich zur p53^{wt}-Kontrolle beobachtet werden.

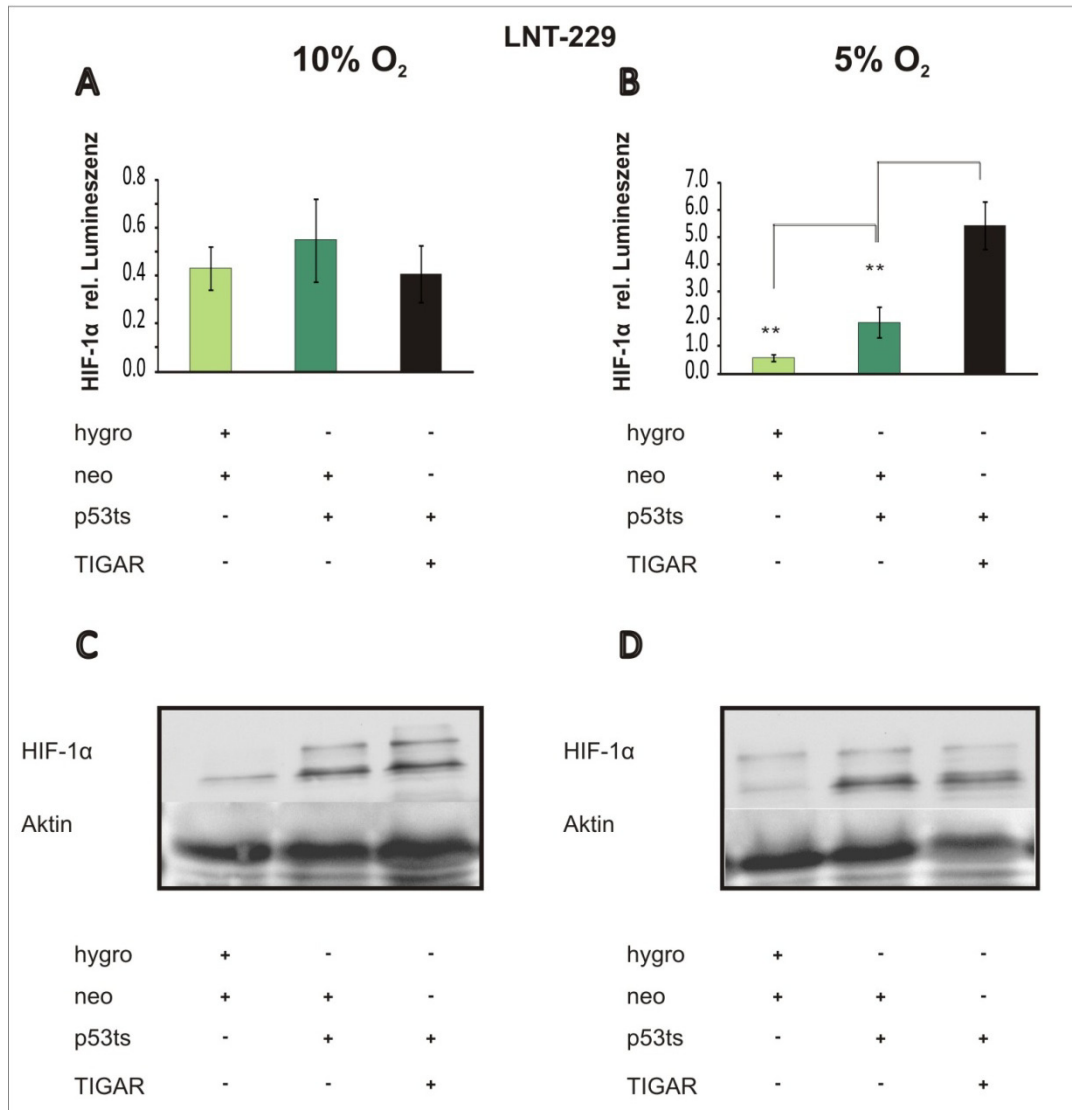


Abbildung 4-29: Regulierung von HIF-1 α durch TIGAR-Überexpression unter moderater Hypoxie

LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen wurden in 96-Well ausgesät, nach 24 h mit 150 ng HIF-1 α -Reportervektor und 20 ng Renilla-Plasmid/Well mittels Metafectene Pro transfiziert, nach 36 h wurden die Zellen 8 h mit 5 mM Glukose in SFM 10% (A) bzw. 5% O₂ (B) behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert. Repräsentatives Experiment aus 3 unabhängigen Versuchen. n=5, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, nach 24 h für 24 h mit 5 mM Glukose in SFM 10% (C) bzw. 5% O₂ (D) behandelt. Der Nachweis von HIF-1 α und Aktin erfolgte mittels WB (s. Anhang unter 2.1.6).

Zusätzlich wurden LNT-229-Zellen 24 h nach Aussaat in 96-Well (10.000 Zellen) mit 150 ng HIF-1 α -Reportervektor und 20 ng Renilla-Plasmid/Well mittels Metafectene Pro transfiziert (3.1.3), nach 36 h wurden die Zellen mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) mittels

Hiperfect transfiziert und nach 20 h mit 5 mM Glukose in SFM unter 10% bzw. 5% O₂ für 8 h behandelt. Anschließend wurde verfahren wie in 3.1.1.7 beschrieben. (**Abbildung 4-30 A und B**). Diese Reporter-Untersuchungen zeigten, dass unter moderater Hypoxie (5% O₂) eine Suppression von TIGAR in LNT-229-Zellen auch eine Suppression der HIF-1 α -Aktivität zur Folge hatte, unter 10% O₂ dennoch noch keine Regulierung von HIF-1 α zu beobachten war (**A**). Eine Regulierung auf der Protein-Ebene konnte nicht beobachtet werden (**Abbildung 4-30 C und D**).

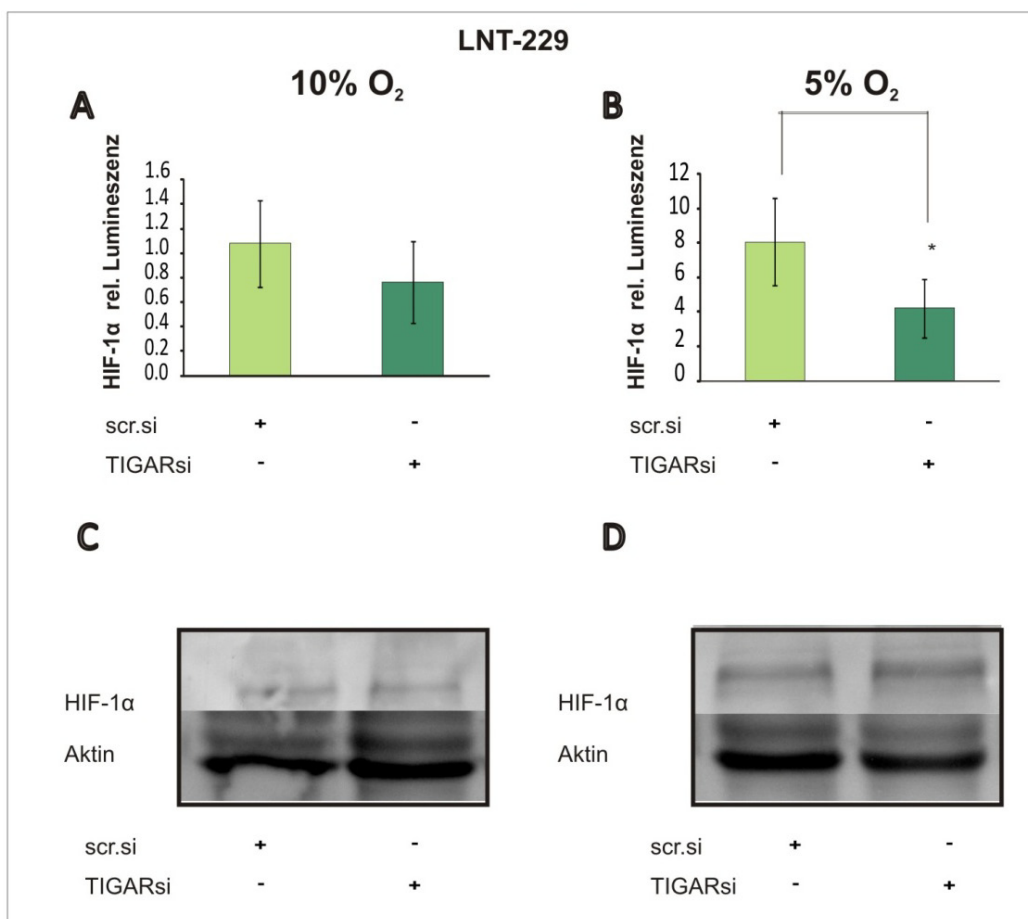


Abbildung 4-30: Regulierung von HIF-1 α durch TIGAR-Suppression unter moderater Hypoxie

LNT-229-Zellen wurden in 96-Well ausgesät, nach 24 h mit 150 ng HIF-1 α -Reportervektor und 20 ng Renilla-Plasmid/well mittels Metafectene Pro transfiziert, nach 36 h wurden die Zellen mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA (100 nM) transfiziert, nach 20 h für 8 h mit 5 mM Glukose in SFM 10% O₂ (**A**) oder 5% O₂ (**B**) behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert. Repräsentatives Experiment aus 3 unabhängigen Versuchen. n=5, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

LNT-229-zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, nach 30 min mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert, nach 24 h für 24 h mit 5 mM Glukose in SFM 10% (**C**) bzw. 5% O₂ (**D**) behandelt. Der Nachweis des HIF- α -Proteins erfolgte mittels WB (s. Antikörper unter 2.1.6) (**C und D**). Normiert wurde auf Aktin.

Reporter und Proteinuntersuchungen wichen voneinander ab: So war kein Unterschied auf der HIF-1 α -Proteinebene unter 5% O₂ zu beobachten, dafür eine Regulierung im Aktivitätsassay unter diesen Bedingungen. Dies spricht dafür, dass die TIGAR-Regulierung von HIF-1 α nicht über die Proteinmenge, sondern über einen anderen Mechanismus, wie z.B. Kofaktorenbeeinflussung vermittelt wird.

4.4.6 TIGAR reguliert die Expression von Lon und SCO2 unter moderater Hypoxie (5% O₂)

Um zu überprüfen, ob TIGAR über die HIF-1 α -Aktivierung auch die Expression von Lon und/oder SCO2 verstärkt, was die erhöhten Atmungsreaktionen erklären würde, wurde in **A** LNT-229-Zellen TIGAR mittels siRNA (100 nM) supprimiert und die Expression dieser Gene unter 5% O₂ mittels QRT-PCR ermittelt (**3.3.2**). Gleichzeitig wurde dies in **B** LNT-229hygro-pcDNA3- und LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-Zellen überprüft. Es stellte sich heraus, dass zwar eine Suppression von TIGAR zu einer starken Reduzierung (-90%), eine TIGAR-Überexpression aber zu keiner Veränderung der Lon-Expression führte (**Abbildung 4-31**).

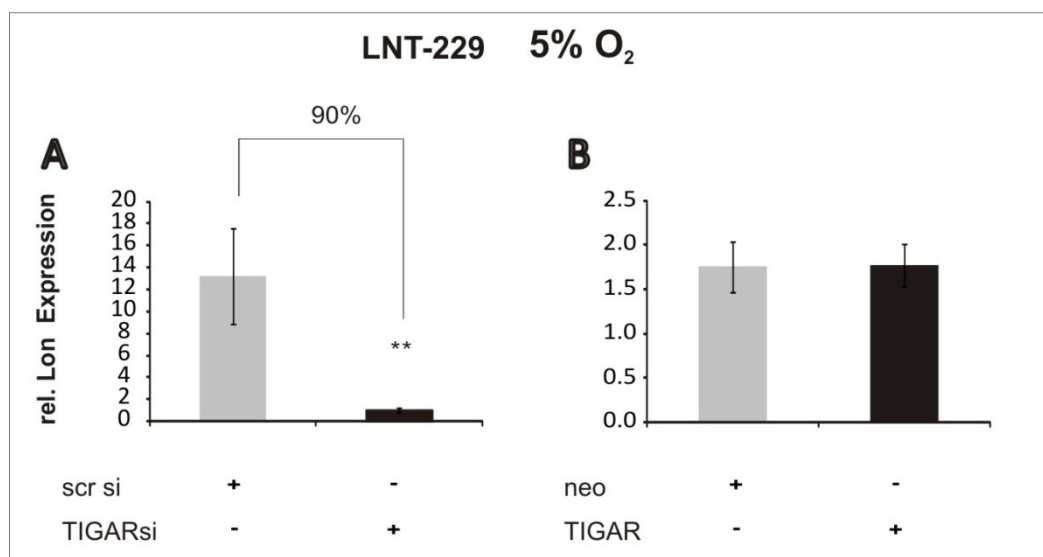


Abbildung 4-31: Einfluss von TIGAR auf die Expression von Lon unter moderater Hypoxie

Die Expression von Lon wurde in LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden (**A**), und in LNT-229hygro-pcDNA3- und LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-Zellen (**B**) unter 5% O₂ VM 20 h mittels QRT-PCR ermittelt. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

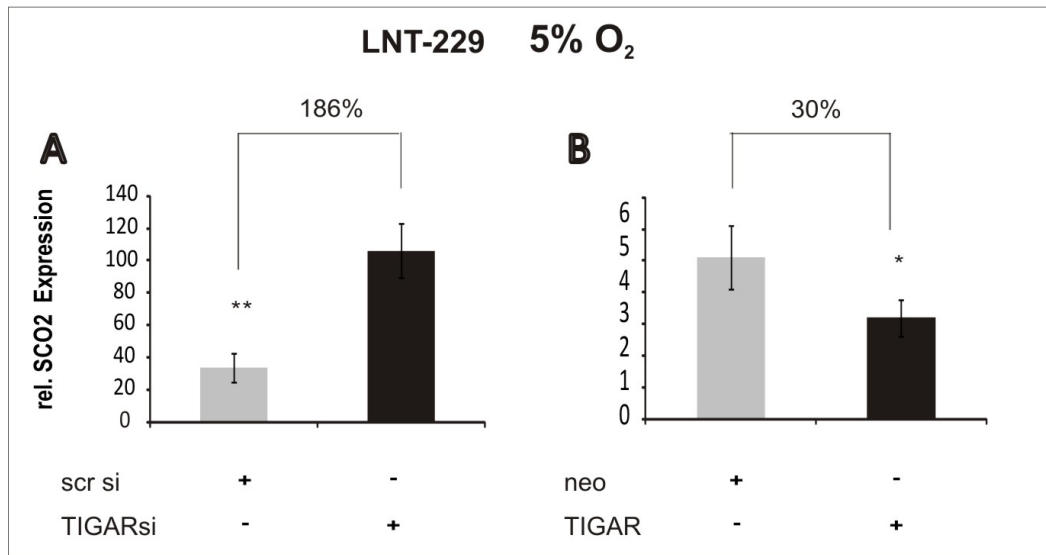


Abbildung 4-32: Einfluss von TIGAR auf die Expression von SCO2 unter moderater Hypoxie (5% O₂)

Die Expression von SCO2 wurde in LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambled siRNA bzw. TIGAR siRNA1 (100 nM) transfiziert wurden (A), und in LNT-229hygro-pcDNA3 und LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-Zellen (B) unter 5% O₂ VM 20 h mittels QRT-PCR ermittelt. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

Für SCO2 ergab sich ein anderes Muster der Regulation der Expression: So verstärkte eine TIGAR-Suppression die SCO2-Expression (+186%), und eine Überexpression von TIGAR kehrte diesen Effekt um (-30%). (Abbildung 4-32). Dies steht etwas in Widerspruch mit den Atmungsdaten in **Abbildung 4-26**, da gezeigt werden konnte, dass eine TIGAR-Suppression zu einer geringeren Atmungsrate führte, und eine TIGAR-Überexpression zu einer verstärkten Respiration. Allerdings wurde bislang nur die Regulation auf RNA-Ebene untersucht.

4.4.7 TIGAR schützt p53^{wt-defizient}-Zellen vor Nährstoffmangel- und Hypoxie-induziertem Zelltod

Um zu überprüfen, ob der von uns beobachtete Schutz von p53^{wt}-Zellen gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod im Vergleich zu p53^{wt-defizient}-Zellen von TIGAR vermittelt wird, wurden LNT-229hygro-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen (**Abbildung 4-33 A**) und T98G-pcDNA3, T98G-pcDNA3-TIGAR und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen (**Abbildung 4-33 B**) in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit PBS gewaschen und mit 2 mM (LNT-229-Zellen) bzw. 5 mM Glukose (T98G-Zellen) in SFM für 24 h behandelt. Die Zelltod-Analyse erfolgte mittels PI-FACS (**3.1.2.1**). Es konnte gezeigt werden, dass eine TIGAR-Überexpression in p53^{wt-defizient}-Zellen zu einem starken Schutz vor Zelltod (induziert durch hochgradige Hypoxie) führte:

- LNT-229p53ts-pcDNA3:LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR = 56,6%:21,6% Zelltod (60% weniger Zelltod) (**Abbildung 4-33 A**)

- T98G-pcDNA3:T98G-pcDNA3-TIGAR = 49,2%:9,9% Zelltod (80% weniger Zelltod) **(Abbildung 4-33 B)**

Eine TIGAR-TM-Überexpression in $p53^{\text{wt-defizient}}$ -Zellen (LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM- und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen) konnte diese nicht vor Hypoxie-induziertem Zelltod schützen. Der Schutz war folglich abhängig von der TIGAR-Funktion als Glykolyse-Hemmer.

Um zu überprüfen, ob komplementär dazu eine TIGAR-Suppression zu verstärkter Sensibilisierung gegenüber Hypoxie führt, wurde TIGAR mittels scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) supprimiert. Die siRNAs (TIGARsiRNA1 und scrambledsiRNA) wurden mittels HiPerfect in LNT-229- und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2 mM Glukose in SFM unter 21% bzw. 0,1% Sauerstoff für 24 h behandelt. Anschließend erfolgte eine Zelltod-Analyse mittels PI-FACS (**3.1.2.1**). Die Suppression der TIGAR-Expression in LNT-229p53^{wt}-Zellen sensibilisierte gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod (26,8%:41,7% Zelltod (+55%) **Abbildung 4-33 C**), in T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen konnte eine TIGAR-Suppression ebenfalls die Zellen sensibilisieren (32,7%:65,3% Zelltod (+100%) **Abbildung 4-33 D**).

Dieses Ergebnis zeigte, dass nicht ausschließlich der Glukosemangel für einen früheren Zelltod unter Hypoxie verantwortlich gemacht werden konnte, da LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen gleich viel Glukose verbrauchten wie LNT-229p53ts-pcDNA3-Zellen (**4.4.4.2**) und gegenüber Hypoxie weniger sensibel waren (**4.4.6**). Um den TIGAR-vermittelten Schutzmechanismus unter hochgradiger Hypoxie aufzuklären, wurden im Folgenden die intrazellulären ROS-Konzentrationen untersucht, da TIGAR eine antioxidative Funktion inne hat (35).

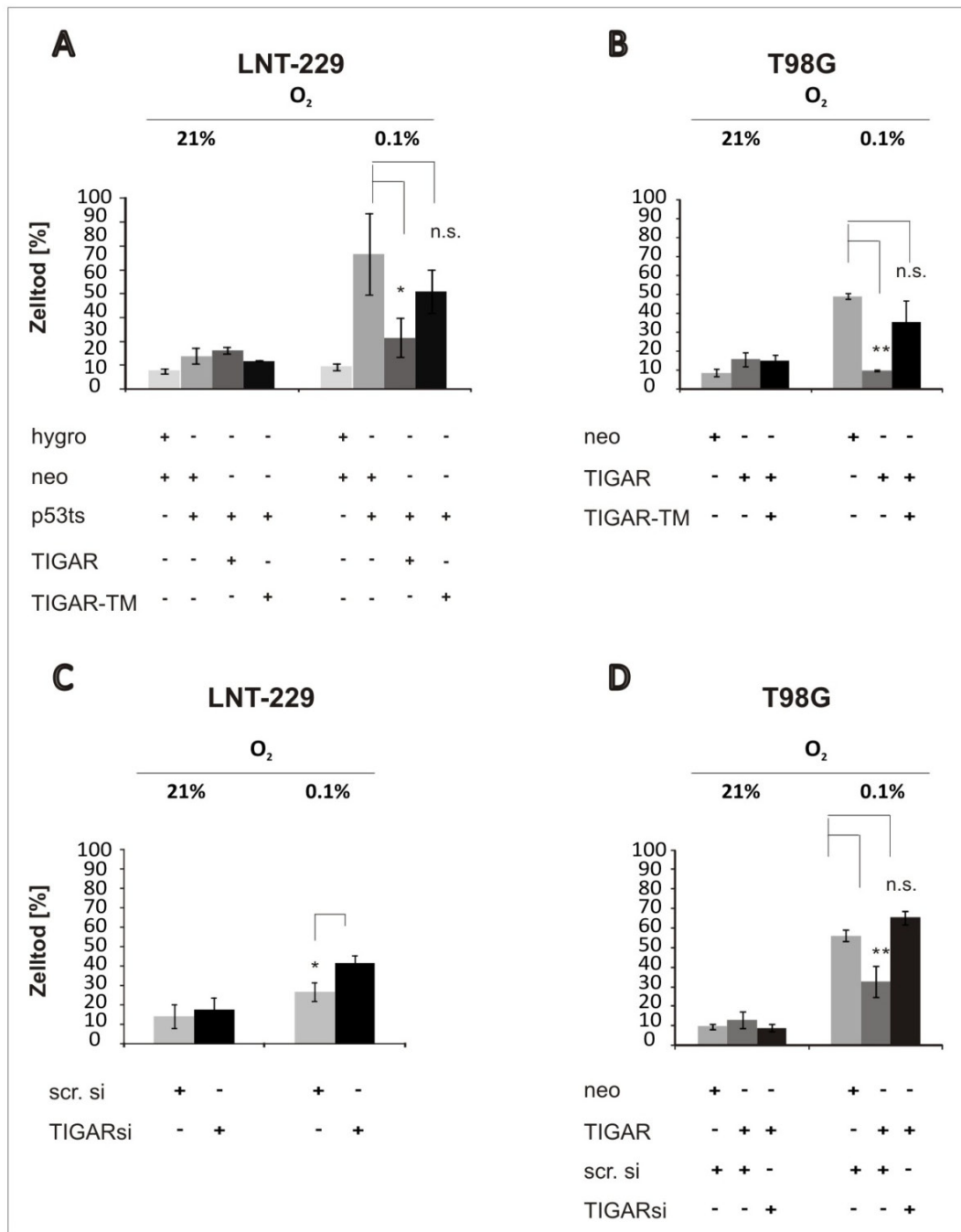


Abbildung 4-33: Zelltod-Sensitivität bei TIGAR-Überexpression und -Suppression in der hochgradigen Hypoxie (0,1% O_2)

Folgende Zelllinien wurden in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit 2 mM Glukose in SFM (LNT-229) bzw. 5 mM Glukose in SFM (T98G) unter 21% bzw. 0,1% O_2 für 20 h behandelt. Die Zelltod-Analyse erfolgte mittels PI-FACS:

A LNT-229hygro, LNT-229p53ts-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM,

B T98G-pcDNA3, T98G-pcDNA3-TIGAR und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM,

C LNT-229 transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) und

D T98G-pcDNA3, T98G-pcDNA3-TIGAR, letztere mit scrambledsiRNA bzw. mit TIGARsiRNA1 (100 nM) transient transfiziert.

Repräsentatives Experiment aus mind. 3 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen. n.s.: nicht signifikant

4.4.8 TIGAR vermittelt einen Schutz vor ROS-induziertem Zelltod (H₂O₂)

Bensaad et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von TIGAR über die Aktivierung des PPP zu einem Schutz gegenüber oxidativem Stress führt (35). Um hier diese Funktion von TIGAR in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modellen zu überprüfen, wurden LNT-229hygro-pcdna3-, LNT-229hygro-pcdna3-TIGAR und LNT-229hygro-pcdna3-TIGAR-TM-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen (**Abbildung 4-34 A**), T98G-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen (**Abbildung 4-34 B**), LN-18pcDNA3- und LN-18-pcDNA3-TIGAR-Zellen (**Abbildung 4-34 C**), LNT-229pcDNA3- und LNT-229pcDNA3-TIGAR-Zellen (**Abbildung 4-34 D**), T98G-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden (**Abbildung 4-34 E**), und LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden (**Abbildung 4-34 F**), in 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 h mit 1 mM H₂O₂ für weitere 4 h (LNT-229- und LN-18-Zellen) bzw. 24 h (T98G-Zellen) behandelt. Anschließend wurde der Zelltod mittels PI-FACS untersucht (**3.1.2.1**). TIGAR-Überexpression führte sowohl in p53^{wt} als auch in p53^{wt-defizient}-Zellen zu einem Schutz vor H₂O₂. Zusätzliche Expression von TIGAR in LNT-229-Zellen schützte die Zellen auch unter diesen Bedingungen (LNT-229hygro-pcDNA3:LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR:LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-TM=30,3%:17,3%:27,8% Zelltod). Die Restoration von TIGAR in p53-mutierten Systemen (p53ts und T98G) führte zu einer geringeren Sensibilität gegenüber H₂O₂-induzierten Zelltod im Vergleich zur p53-mutierten Kontrolle:

- LNT-229hygro-pcDNA3:LNT-229p53ts-pcDNA3:LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR:LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM = 30,3%:49,7%:19,9%:55,6% Zelltod (**Abbildung 4-34 A**)
- T98G-pcDNA3:T98G-pcDNA3-TIGAR = 29,5%: 18,8% Zelltod (-36%) (**Abbildung 4-34 B**).

Auch in transienten Systemen (LNT-229- und LN-18-Zellen) konnte die Restoration von TIGAR die Zellen vor H₂O₂ schützen:

- LNT-229pcDNA3:LNT-229pcDNA3-TIGAR = 22,8%:6,7% Zelltod (70% weniger Zelltod) (**Abbildung 4-34 D**)
- LN-18-pcDNA3:LN-18-pcDNA3-TIGAR = 63,4%:53,6% Zelltod (15% weniger Zelltod) (**Abbildung 4-34 C**)

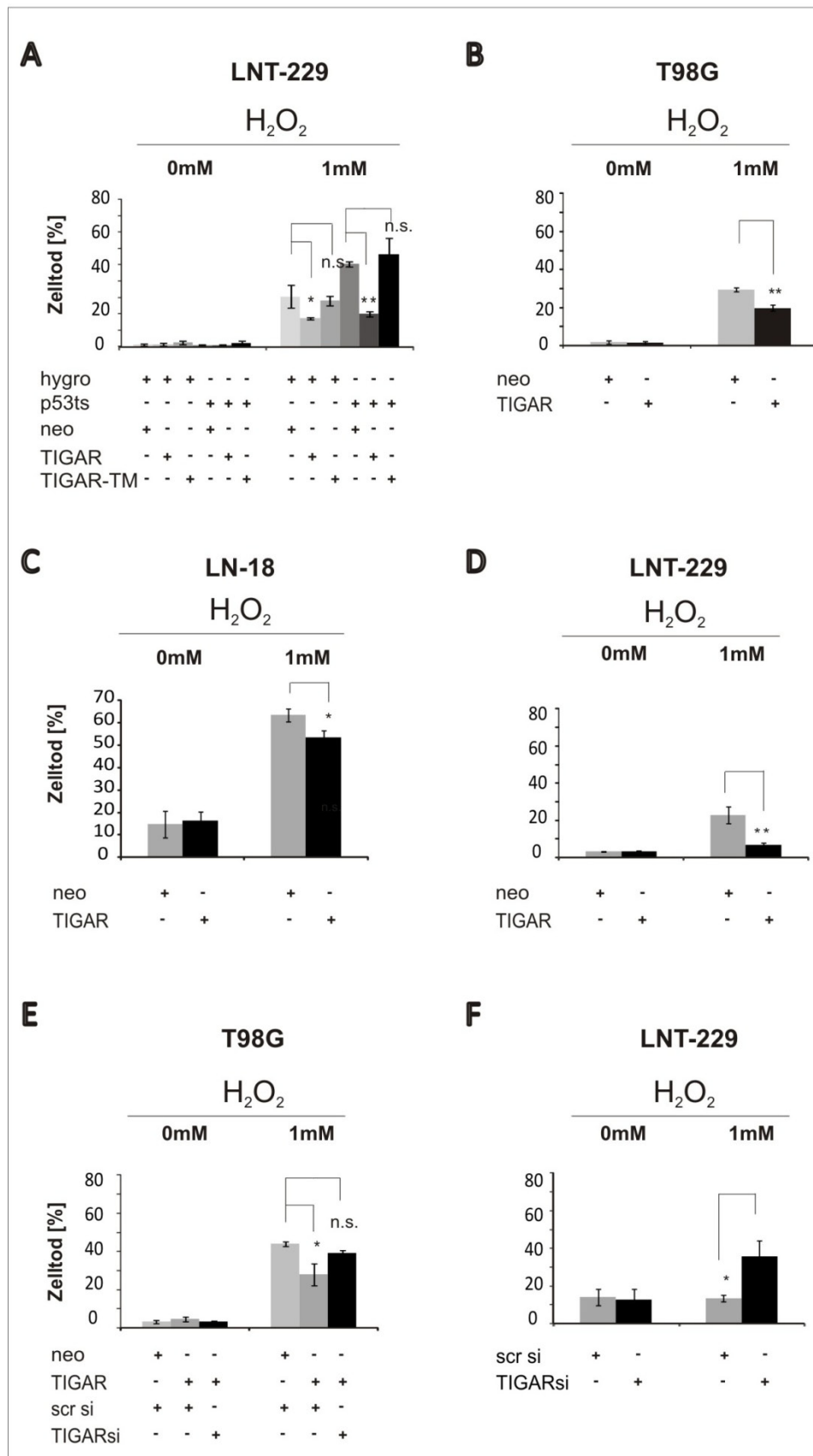


Abbildung 4-34: H_2O_2 -Sensitivität bei TIGAR-Überexpression und -Suppression

Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 h mit 1 mM H_2O_2 für weitere 4 h (LNT-229/LN-18) bzw. 24 h (T98G) behandelt (21% O_2). Die Zelltod-Analyse erfolgte mittels PI-FACS.

A LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-TM-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen,

B T98G-pcDNA3 und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen,

C LN-18-pcDNA3 und LN-18-pcDNA3-TIGAR-Zellen,

D LNT-229pcDNA3 und LNT-229pcDNA3-TIGAR-Zellen,

E T98G-pcDNA3 und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden, und

F LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden.

Repräsentatives Experiment aus 3 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen. n.s.: nicht signifikant.

Um zu überprüfen, ob der Schutz durch TIGAR gegenüber ROS-induziertem Zelltod auf die Glykolyse-Hemmung-Funktion durch TIGAR zurückzuführen ist, wurden die Sensibilität gegenüber externen ROS auch in LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-TM- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen untersucht. TIGAR-TM-Überexpression führte zu keinem Schutz vor H₂O₂. Zusätzlich wurde die TIGAR-Expression mittels TIGARsiRNA1 (100 nM) (**3.1.1.7**) in T98G-pcDNA3-TIGAR- und in LNT-229-Zellen supprimiert, die Zellen mit 1 mM H₂O₂ für weitere 4 h mit 1 mM H₂O₂ behandelt und der Zelltod untersucht (TIGAR wurde in T98G-pcDNA3-TIGAR herunterreguliert, da T98G-Zellen fast keine TIGAR-Expression aufweisen). Eine TIGAR-Suppression führte sowohl in p53^{wt-defizient}- als auch p53^{wt}-Zellen zu einer Sensitivierung gegenüber H₂O₂:

- T98G-pcDNA3:T98GpcDNA3-TIGAR-scrambledsi:T98G-pcDNA3-TIGAR-TIGARsi = 44%:28%:39,3% Zelltod (**Abbildung 4-34 E**)
- LNT-229scrambledsiRNA:LNT-229-TIGARsiRNA = 13,5%:35,9% Zelltod (**Abbildung 4-34 F**)

4.4.9 TIGAR-exprimierende Zellen haben geringere intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter Hypoxie und Nährstoffmangel

Bensaad et al. zeigten 2006, dass TIGAR den PPP verstärkt und somit für eine verstärkte NADPH-Produktion sorgt (33). Unter Hypoxie entstehen verstärkt reaktive Sauerstoffspezies, da die Atmungskette unterbrochen wird und Radikale freigegeben werden. Einige enzymatischen Antioxidantien, zu denen u.a. die Peroxiredoxine und die Gluthation-Reduktase zählen, benötigen NADPH als Reduktionsäquivalente, um ROS abzubauen. Um zu überprüfen, ob TIGAR in den Gliomzellen geringere intrazelluläre ROS-Konzentrationen bewirkt, wurden LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM- Zellen (**Abbildung 4-35 A**) und T98G-pcDNA3-, T98G-pcDNA3-TIGAR- und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen (**Abbildung 4-35 B**) in 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 h mit 5 mM Glukose in SFM für weitere 24 h behandelt. Anschließend wurde 30 min mit 10 µM H₂DCFDA bei 38,5°C bzw. 37°C inkubiert und die ROS-

Konzentrationen mittels H₂DCFDA-FACS ermittelt (**3.1.2.2**). Die Überexpression von TIGAR führte zu einer geringeren Menge an ROS unter Hypoxie und Nährstoffmangel-Bedingungen:

- LNT-229p53ts-pcDNA3:LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR:LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM=778:566:726 DCF [Mittelwert] (**Abbildung 4-35 A**)
- T98G-pcDNA3:T98G-pcDNA3-TIGAR:T98G-TIGAR-TM=773:552:898 DCF [Mittelwert] (**Abbildung 4-35 B**).

Es wurde ebenfalls überprüft, ob diese verringerte ROS-Konzentrationen über die Hemmung der Glykolyse oder eine andere Funktion von TIGAR zustande kamen, indem die ROS-Konzentrationen unter denselben Bedingungen in LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM- und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen ermittelt wurden. Die Überexpression von TIGAR-TM führte unter Hypoxie und Nährstoffmangel-Bedingungen zu keiner ROS-Konzentrationsänderung. Zusätzlich wurde die TIGAR-Expression mittels TIGARsiRNA1 in LNT-229-Zellen supprimiert, die Zellen nach 24 h für 20 h mit 5 mM Glukose in SFM und die ROS mittels H₂DCFDA-FACS untersucht. TIGAR-Suppression führte zu erhöhten intrazellulären ROS-Konzentrationen: In LNT-229 konnte eine Suppression von TIGAR den DCF-Wert [Mittelwert] um 10% erhöhen (**Abbildung 4-35 C**), in T98G-pcDNA3-TIGAR um 30% (**Abbildung 4-35 D**). Unter Normoxie konnte kein einheitliches bzw. signifikantes Muster beobachtet werden.

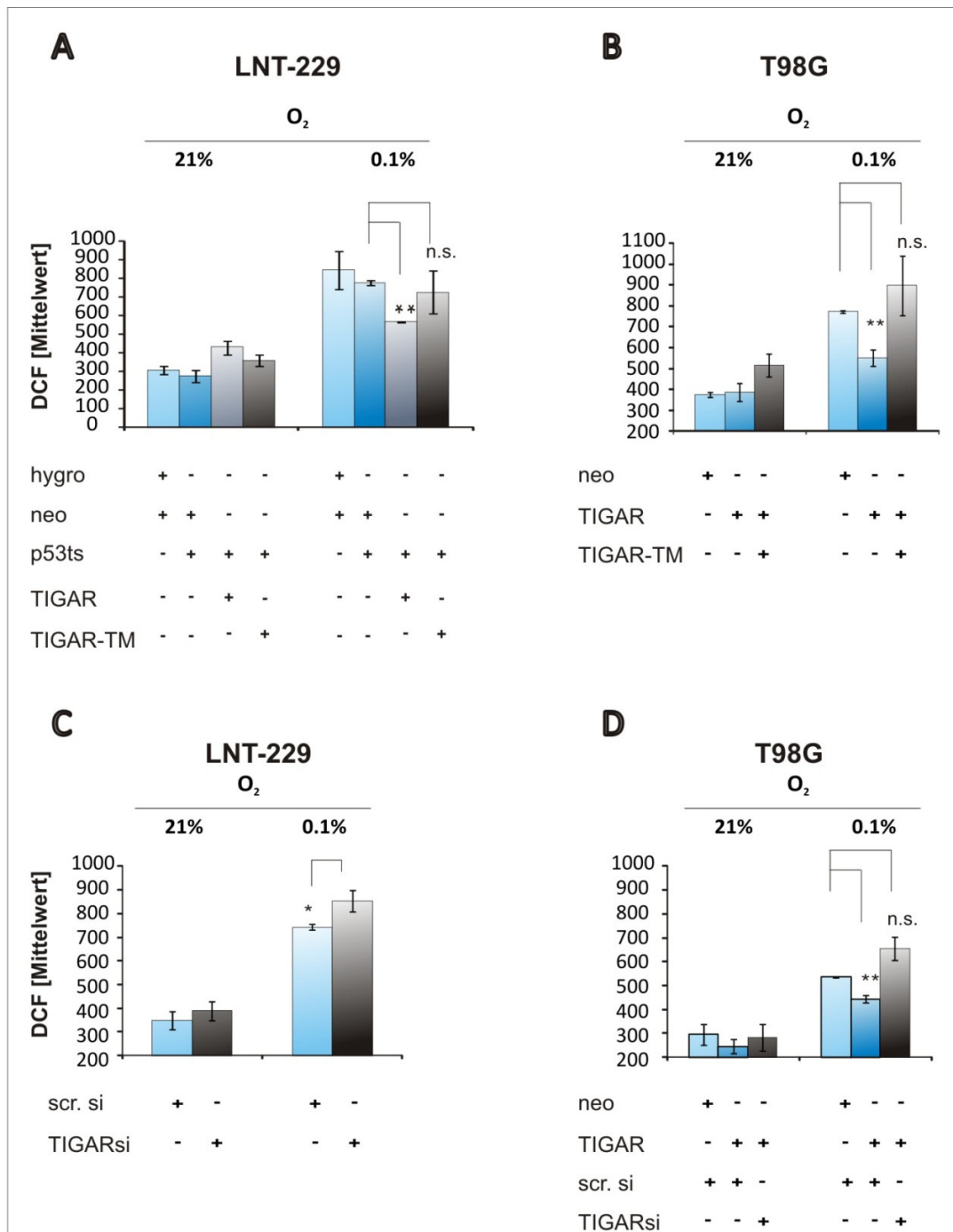


Abbildung 4-35: Intrazelluläre ROS-Konzentrationen bei TIGAR-Überexpression und Suppression unter Hypoxie und Nährstoffmangel

Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit 5 mM Glukose in SFM unter 21% bzw. 0,1% O₂ für weitere 20 h behandelt. Die ROS-Analyse erfolgte mittels H₂DCFDA-FACS.

A LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM,

B T98G-pcDNA3, T98G-pcDNA3-TIGAR und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM,

C LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scramblesiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden und

D T98G-TIGAR-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scramblesiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden.

Repräsentatives Experiment aus 3 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen. n.s.: nicht signifikant

4.4.10 Einfluss von TIGAR auf die Transaktivität von HIF-1 α in der hochgradigen Hypoxie

In Kapitel 4.4.5 wurde gezeigt, dass die Expression von TIGAR unter schwachen hypoxischen Bedingungen die Transaktivierung von HIF-1 α reguliert. Da TIGAR Funktionen in der Glykolyse ausübt (Glykolyse-Hemmung, Induzierung des PPP), und diese unter Hypoxie u.a. über HIF-1 α reguliert wird (71, 102, 139, 286), sollte überprüft werden, ob eine TIGAR-Suppression Einfluss auf die HIF-1 α -Transkriptionsaktivität auch unter hochgradiger Hypoxie hat. Hierfür wurden LNT-229-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät (10.000 Zellen pro Well), nach 24 h mit HIF-1 α -Reporter-Plasmid (150 ng) und pRL-CMV (Renilla, 20 ng) transfiziert (Angaben pro Well), anschließend 36 h nach Transfektion mit 100 nM scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 mittels Hiperfect transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen für weitere 8 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 0,1% O₂ behandelt und die Luziferase-Lumineszenz mittels Luminometer ermittelt und auf das jeweilige Renilla-Signal normiert (3.1.3). TIGAR-Suppression führte unter Hypoxie zu geringerer HIF-1 α -Reporter-Aktivität (-50%) (Abbildung 4-36 A), jedoch führte dies zu keiner Veränderung in der Gesamtproteinmenge von HIF-1 α (Abbildung 4-36 B).

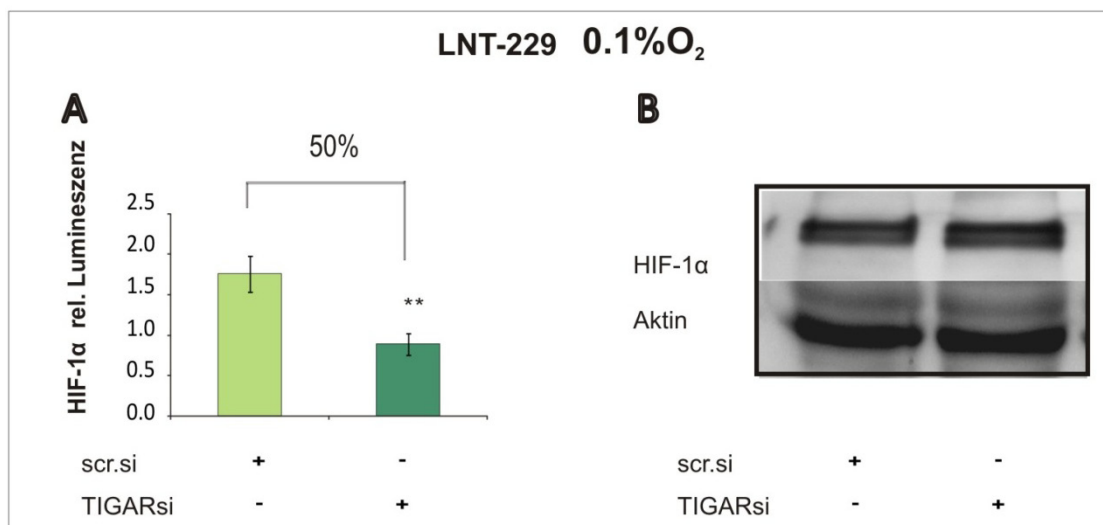


Abbildung 4-36: Einfluss einer TIGAR-Suppression auf die funktionelle Aktivität von HIF-1 α in Gliomzellen unter Nährstoffmangel-Bedingungen und Hypoxie

LNT-229-Zellen wurden ausgesät und nach 24 h mit 150 ng HIF-1 α -Luziferase-Reporter und 20 ng pRL-CMV (Renilla) transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit 100 nM scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 transfiziert. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen für weitere 8 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 0,1% O₂ behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert. (A).

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3 (Luziferase), p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen. Der Nachweis des HIF-1 α -Proteins erfolgte mittels WB (s. Antikörper unter 2.1.6) (B).

Zusätzlich wurde in TIGAR-überexprimierenden Zelllinien die HIF-1 α -Transaktivität gemessen. LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen wurden nach Aussaat und 36 h nach Transfektion (wie oben beschrieben) für 16 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 0,1% O₂ behandelt und die HIF-1 α -Reporteraktivität gemessen. Gleichzeitig wurde die HIF-1 α Proteinmenge unter denselben Bedingungen mittels Western-Blot ermittelt (s. Antikörper unter **2.1.6** und WB-Protokoll unter **3.4**). Eine TIGAR-Überexpression bewirkte unter 0,1% O₂ weder im Reporter-Assay eine zusätzliche Erhöhung der HIF-1 α -Aktivität, noch im WB eine Änderung der HIF-1 α -Proteinmenge. (**Abbildung 4-37**).

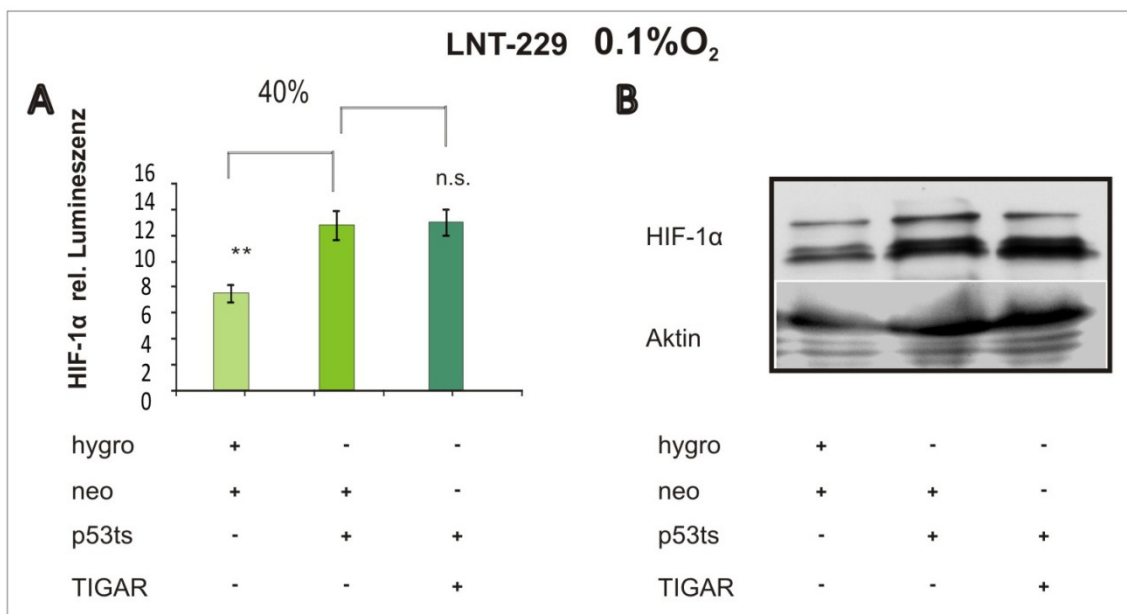


Abbildung 4-37: Einfluss von TIGAR auf die funktionelle Aktivität von HIF-1 α in Gliomzellen unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie

LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen wurden ausgesät und nach 24 h mit 150 ng HIF-1 α -Luziferase-Reporter und 20 ng pRL-CMV (Renilla) transfiziert. Nach weiteren 36 h wurden die Zellen für weitere 16 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 0,1% O₂ behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert (**A**). Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen. n.s.: nicht signifikant. Der Nachweis des HIF-1 α -Proteins erfolgte mittels WB (**B**). s. Antikörper unter **2.1.6**.

4.4.11 TIGAR-exprimierende Zellen haben geringere intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter exogen induziertem Stress (Adriamycin)

Bensaad et al. beschrieben 2006 TIGAR als ein über Adriamycin induziertes Zielgen von p53. Zudem beobachteten diese Autoren eine geringere Empfindlichkeit gegenüber einer Adriamycin-Behandlung (33). Adriamycin ist ein Chemotherapeutikum, das in

unterschiedlichen Tumorerkrankungen zum Einsatz kommt. Adriamycin induziert DNA-Schäden und somit ROS. Um diesen TIGAR-vermittelten Vorteil gegenüber Adriamycin in Gliomzellen zu überprüfen, wurden LNT-229-Zellen 24 h nach Aussaat transient mittels Metafectene Pro mit pcDNA3 bzw. pcDNA3-TIGAR transfiziert, nach 24 h für weitere 24 h mit 345 ng/mL Adriamycin behandelt (**Abbildung 4-49**) für die Ermittlung der Konzentrationen), und anschließend die Konzentrationen der intrazellulären ROS mittels H₂DCFDA-FACS ermittelt (**3.1.2.2**). TIGAR-Überexpression konnte vor ROS-Bildung in der Zelle schützen (Abbildung 4-38). Dies könnte einen Resistenz-Vorteil TIGAR-positiver Tumoren gegenüber Adriamycin-Therapie und anderen ROS-induzierenden Zytostatika bedeuten.

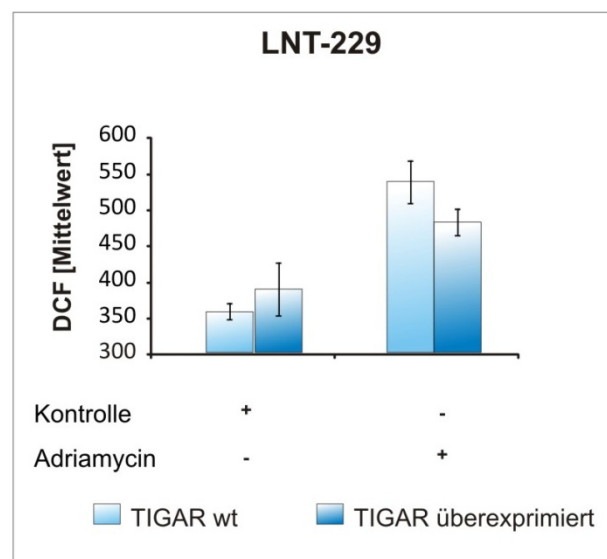


Abbildung 4-38: Intrazelluläre ROS-Konzentrationen in Abhängigkeit des TIGAR-Status unter Adriamycin-Behandlung

LNT-229-Zellen wurden transient mittels Metafectene Pro mit pcDNA3- bzw. pcDNA3-TIGAR transfiziert und nach 24 h mit 345 ng/mL Adriamycin für 20 h behandelt. Die ROS-Analyse erfolgte mittels H₂DCFDA-FACS. Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3. p=0,061.

4.4.12 TIGAR reguliert ATG12

Bensaad et al. konnten 2009 zusätzlich zeigen, dass TIGAR über die Aktivierung des PPP und NADPH-Produktion Autophagie hemmen kann und somit der Zelle unter temporären Stressbedingungen einen Vorteil bringen könnte (35). Um zu überprüfen, ob TIGAR in den in dieser Arbeit untersuchten Zellen in Stande ist, Autophagie zu regulieren, wurden **A** LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen sowie **B** T98G-pcDNA3 und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 h für RNA/cDNA geerntet. Anschließend wurde die Expression von ATG12, ein Autophagie-induziertes Gen, mittels QRT-PCR untersucht (**3.3.2**).

Die Überexpression von TIGAR bewirkte in beiden Systemen eine Herunterregulierung von ATG12-Expression, auch wenn endogenes p53 und folglich endogenes TIGAR vorhanden war: In den LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-Zellen konnte eine Verringerung der ATG12-Expression von ca. 70% erreicht werden (im Vergleich zu LNT-229hygro-pcDNA3), in den LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR eine Suppression von 60% im Vergleich zu LNT-229p53ts-pcdna3 (**Abbildung 4-39**). Ein Teil des in **4.2.1** beobachteten Phänotyps könnte auf diesem TIGAR-vermittelten Schutz gegenüber Autophagie beruhen. Zur genauen Charakterisierung wären Experimente unter Stressbedingungen und funktionelle Autophagie-Assays notwendig.

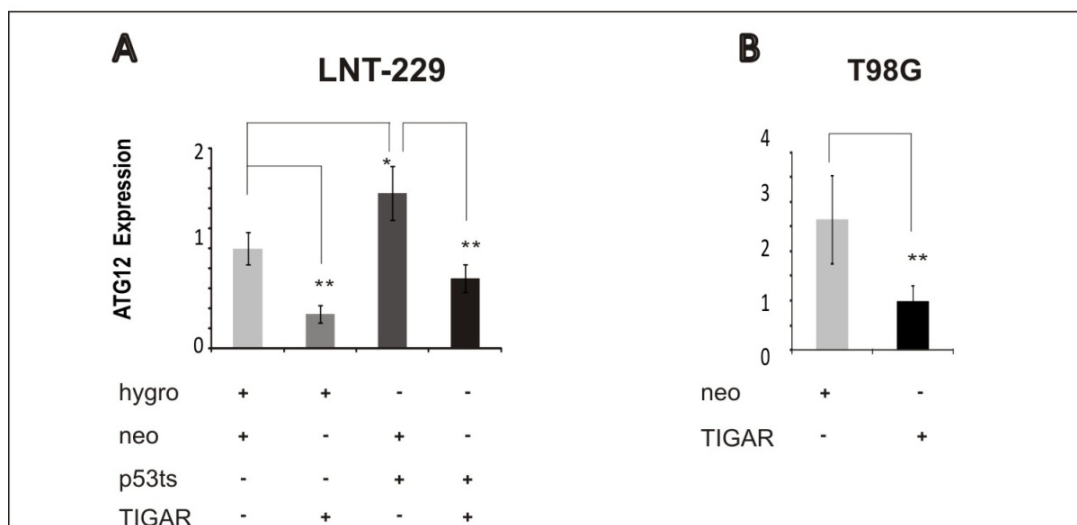


Abbildung 4-39: Expression von ATG12 in Abhängigkeit der TIGAR-Status

LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3 und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen (**A**) und T98G-pcDNA3 und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen (**B**) wurden in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h RNA und cDNA gewonnen. Die Expression von ATG12 wurde mittels QRT-PCR untersucht. Normiert wurde auf 18S. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.5 TKTL1: Ein p53- und TIGAR-reguliertes Gen

TIGAR, ein bekanntes p53-Zielgen, aktiviert den PPP und vermittelt durch diese Aktivierung einen Schutz vor ROS über die Produktion von NADPH (33). Seit Neuerem ist bekannt, dass dadurch auch Autophagie unter Stressbedingungen gehemmt werden kann (35), was den Zellen einen Vorteil gegenüber Stress-induziertem Zelltod bringt. Da TIGAR den PPP aktiviert und die Glykolyse beeinflusst, wurde in $p53^{wt}/p53^{wt-defizient}$ -Zellen die Expression verschiedener Enzyme der Glykolyse (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Phosphofruktokinase 1 (PFKB1), Laktat-Dehydrogenase A (LDHA), und des PPP (Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH), Transketolase (TKT) und Transaldolase (TALDO1)) überprüft (Details zu diesen Enzyme finden sich unter **2.1.7**). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TKTL1, ein Isoenzym der TKT, in vielen Tumoren überexprimiert ist, und dass ihre Überexpression mit einer schlechteren Prognose für die Patienten korreliert (143, 144,

151, 152, 154), auch bei Patienten mit malignen Gliomen (150). Durch Deletion des Exons 3 tritt eine Veränderung der Substratspezifität der TKTL1 im Vergleich zu der der TKT auf: Xylulose-5-Phosphat wird als einziges Substrat zu Erythrulose und Glycerinaldehyd-3-Phosphat umgesetzt (144). Xu et al. konnten zeigen, dass eine TKTL1-Suppression zu einer Verminderung der NADPH-Konzentration in der Zelle führt, und dass dies mit einer Sensibilisierung gegenüber externen ROS einhergeht (147). Auch wurde die Hypothese aufgestellt, dass die TKT ein p53-Zielgen sein könnte (145). Es stellte sich folglich die Frage, welcher Mechanismus beide Befunde erklären könnte. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft, ob in Glioblastom-Zelllinien und in den Kolonkarzinomzellen HCT116 TKT oder/und TKTL1 p53-Zielgene sein könnten.

4.5.1 Die Expression von TKTL1, nicht jedoch von anderen Enzymen der Glykolyse- oder des PPP, ist in p53^{wt-defizient}-Zellen vermindert

Es wurde zunächst die Expression der oben genannten Enzyme mittels QRT-PCR in Abhängigkeit des p53^{wt}-Status untersucht. LNT-229puro/LNT-229p53sh- (A), LNT-229hygro/LNT-229p53ts- (B) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-} (C) -Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, mit VM behandelt und nach 24 h wurde RNA isoliert und cDNA hergestellt und die Expression nachgewiesen (3.3.2). Als Kontrolle diente SDHA (*Succinate Dehydrogenase Complex Subunit A*). Es konnte kein einheitliches Expressionsmuster für alle getesteten Enzyme aus der Glykolyse beobachtet werden (GAPDH **Abbildung 4-40**, PFKB1 **Abbildung 4-41**, LDHA **Abbildung 4-42**).

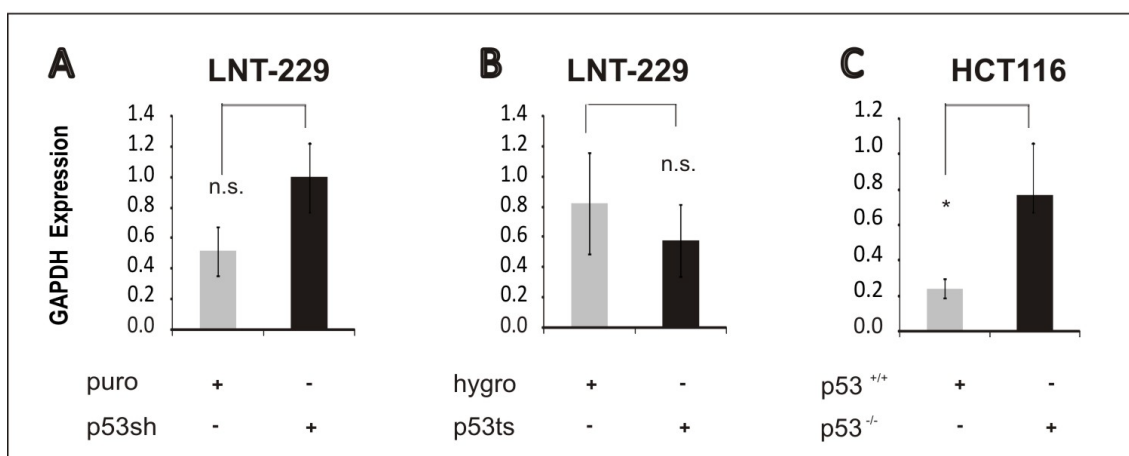


Abbildung 4-40: GAPDH-Expression in p53^{wt-defizient}-Systemen

LNT-229puro/p53sh- (A), LNT-229hygro/p53ts- (B) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-} (C) -Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, mit VM behandelt und nach 24 h geerntet. Die RNA wurde isoliert, die cDNA hergestellt und die GAPDH-Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf SDHA normiert. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

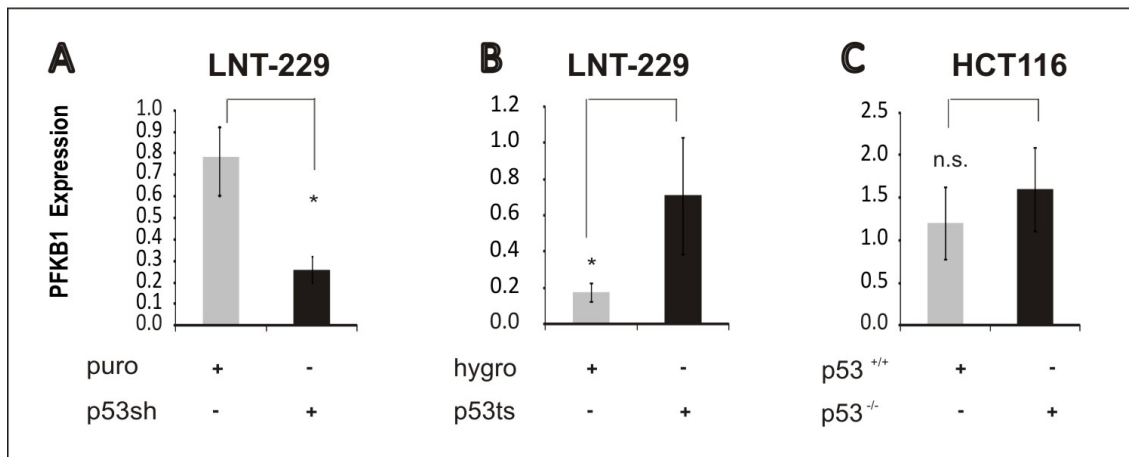


Abbildung 4-41: PFKB1-Expression in p53^{wt-defizient}-Systemen

LNT-229puro/p53sh- (A), LNT-229hygro/p53ts- (B) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-} (C) -Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, mit VM behandelt und nach 24 h geerntet. Die RNA wurde isoliert, die cDNA hergestellt und die PFKB1-Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf SDHA normiert. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

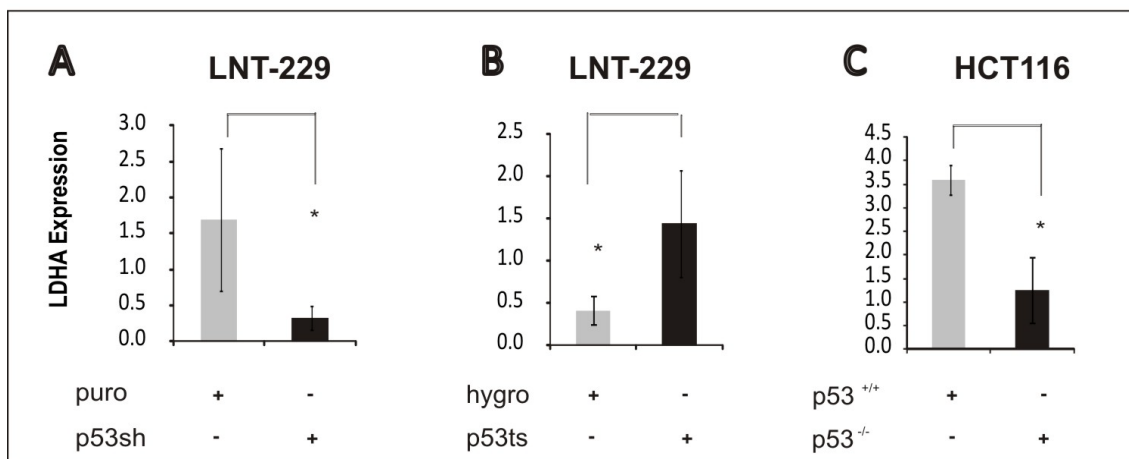


Abbildung 4-42: LDHA-Expression in p53^{wt-defizient}-Systemen

LNT-229puro/p53sh- (A), LNT-229hygro/p53ts- (B) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-} (C) -Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, mit VM behandelt und nach 24 h geerntet. Die RNA wurde isoliert, die cDNA hergestellt und die LDHA-Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf SDHA normiert. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

Bei den Enzymen des PPP konnte nur für die Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH, **Abbildung 4-43**) eine Tendenz zu einer verstärkten Expression des Enzyms in p53^{wt-defizient}-Zellen beobachtet werden, die jedoch nicht in allen Systemen signifikant war. Zudem war die G6PDH-Expression in p53^{wt-defizient}-Zellen hochreguliert. Für die Transketolase (TKT **Abbildung 4-44**) oder die Transaldolase (**Abbildung 4-45**) konnten keine p53-abhängigen einheitlichen Veränderungen der Expression festgestellt werden.

Die TKTL1-Expression wiederum war in p53^{wt-defizient}-Zellen vermindert im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (**Abbildung 4-46**), allerdings nicht signifikant in LNT-229puro/p53sh-

Zellen. Es konnte auch in $p53^{\text{wt-defizient}}$ -Zellen eine TKTL1-Expression nachgewiesen werden, so dass man daraus schließen konnte, dass p53 nicht der einzige Regulator der TKTL1 ist.

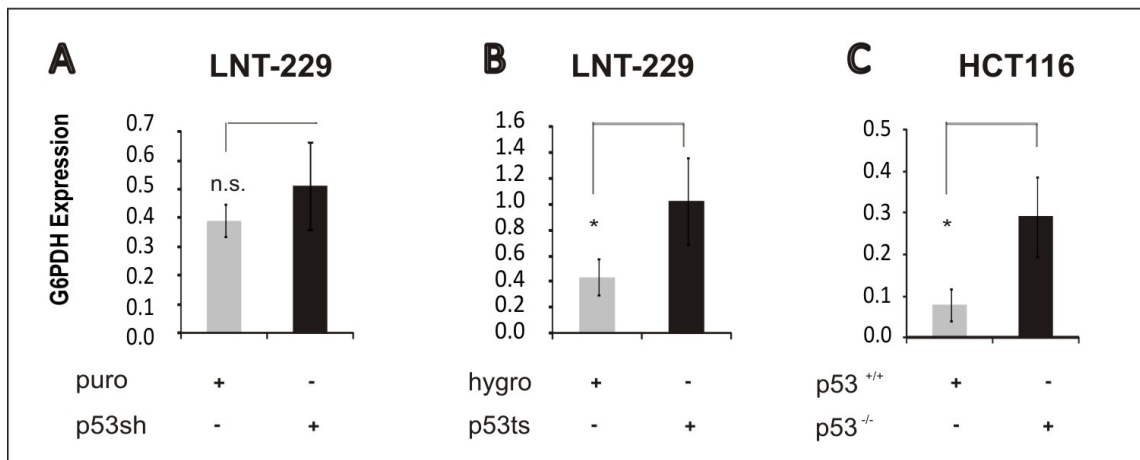


Abbildung 4-43: G6PDH-Expression in $p53^{\text{wt-defizient}}$ -Systemen

LNT-229puro/p53sh- (A), LNT-229hygro/p53ts- (B) und HCT116 $p53^{+/+}/p53^{-/-}$ (C) -Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, mit VM behandelt und nach 24 h geerntet. Die RNA wurde isoliert, die cDNA hergestellt und die G6PDH-Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf SDHA normiert. $n=3$, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

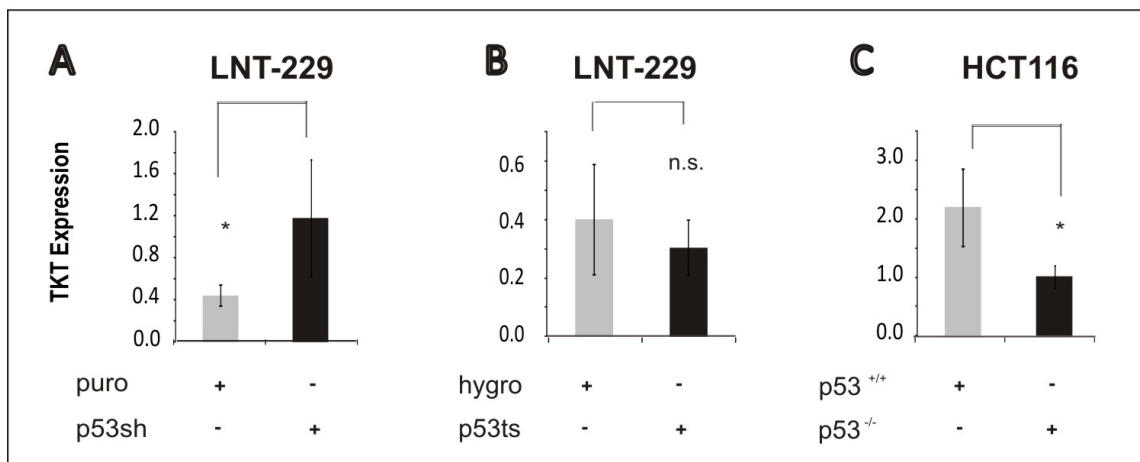


Abbildung 4-44: TKT-Expression in $p53^{\text{wt-defizient}}$ -Systemen

LNT-229puro/p53sh- (A), LNT-229hygro/p53ts- (B) und HCT116 $p53^{+/+}/p53^{-/-}$ (C) -Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, mit VM behandelt und nach 24 h geerntet. Die RNA wurde isoliert, die cDNA hergestellt und die TKT-Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf SDHA normiert. $n=3$, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

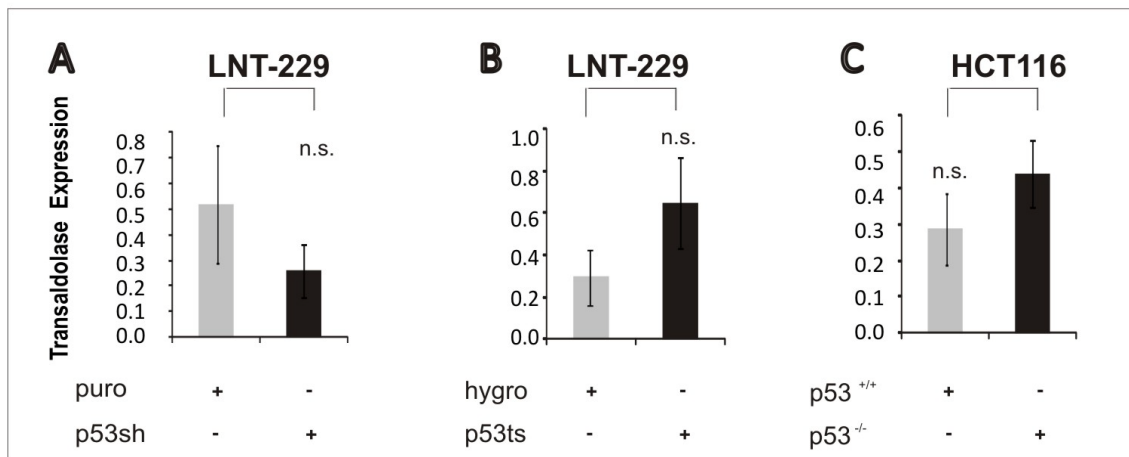


Abbildung 4-45: Transaldolase-Expression in p53^{wt-defizient}-Systemen

LNT-229puro/p53sh- (A), LNT-229hygro/p53ts- (B) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-} (C) -Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, mit VM behandelt und nach 24 h geerntet. Die RNA wurde isoliert, die cDNA hergestellt und die Transaldolase-Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf SDHA normiert. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

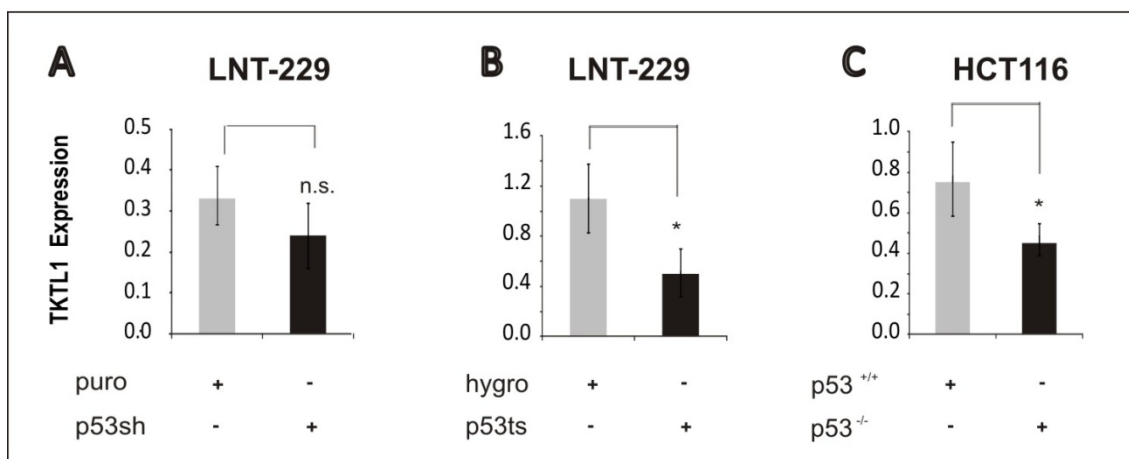


Abbildung 4-46: TKTL1-Expression in p53^{wt-defizient}-Systemen

LNT-229puro/p53sh (A), LNT-229hygro/p53ts (B) und HCT116 p53^{+/+}/p53^{-/-} (C) -Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, mit VM behandelt und nach 24 h geerntet. Die RNA wurde isoliert, die cDNA hergestellt und die TKTL1-Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf SDHA normiert. p n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

4.5.2 TKTL1 ist ein über TIGAR induziertes p53-Zielgen

In 4.5.1 wurde gezeigt, dass p53 die Expression von TKTL1 regulieren kann. Da TIGAR ebenfalls ein metabolisches p53-Zielgen ist und den PPP aktivieren kann, wurde überprüft, ob es zwischen TIGAR und TKTL1 einen Zusammenhang geben könnte. So wurde in T98G-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen (**Abbildung 4-47 C**) und in LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen (**Abbildung 4-47 D**) die TKTL1-Expression mittels QRT-PCR überprüft (**3.3.2**). Es zeigte sich, dass eine Überexpression von TIGAR in p53^{wt-defizient}-Zellen zu einer erhöhten Expression von TKTL1 führt, so dass TKTL1 kein direktes p53-Zielgen zu sein schien, da TKTL1 auch in p53^{wt-defizient}-Zellen vorhanden war

und die TKTL1-Expression nur über die Überexpression von TIGAR erhöht wurde. In einem Pilotexperiment war TIGAR-TM auch imstande, die Expression der TKTL1 zu verstärken.

Die TKT schien trotz der Sequenz- und Funktionsähnlichkeit mit TKTL1 kein p53-Zielgen zu sein (**Abbildung 4-44**) und wurde auch durch Überexpression von TIGAR nicht induziert (**Abbildung 4-48**).

Um eine Wechselwirkung mit dem Isoenzym TKTL1 auszuschließen, wurde auch die TKT- und die TKTL1-Expression in TIGAR-supprimierten Zellen überprüft. LNT-229- (**Abbildung 4-47 A**) und T98G-Zellen (**Abbildung 4-47 B**) wurden in 24-Well-Platten ausgesät und nach 30 min mit 100 nM scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 mittels Hiperfect transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert und cDNA hergestellt.

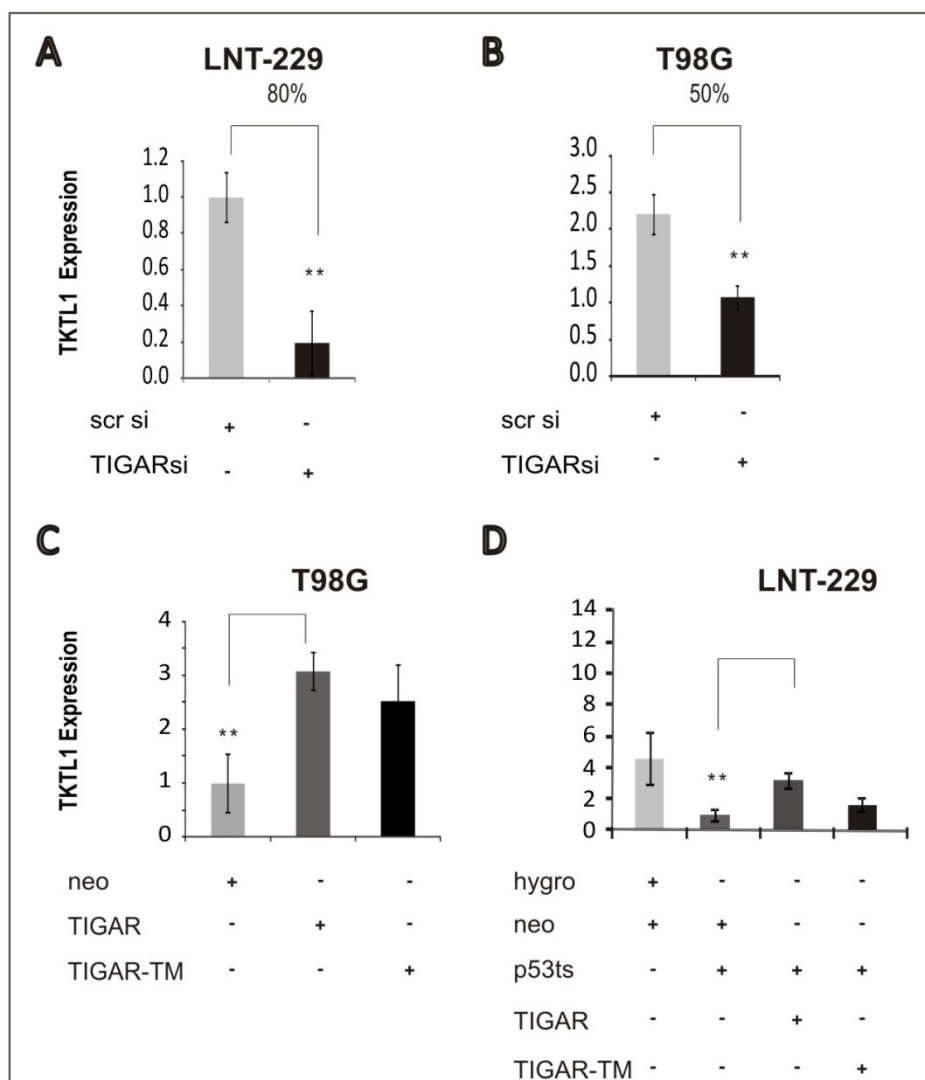


Abbildung 4-47: TKTL1-Expression in TIGAR-überexprimierenden und -supprimierten Zelllinien

In folgenden Zelllinien wurde die TKTL1-Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf 18S normiert:

A LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden,

B T98G-pcDNA3-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden,
C T98G-pcDNA3, T98G-pcDNA3-TIGAR und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM und
D LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM.
 Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte $p < 0.01$ (**) als hoch signifikant angesehen.

Mittels QRT-PCR wurde anschließend die TKT- und TKTL1-Expression untersucht. Normiert wurde auf die 18S-Expression. Eine TIGAR-Suppression in LNT-229- und T98G-Zellen führte zu einer signifikant geringeren TKTL1-Expression (ca. 80% und 50% **Abbildung 4-47 A und B**). TKT konnte nicht als p53- oder TIGAR-Zielgen identifiziert werden, die Expression von TKT war sogar eher verstärkt in $p53^{\text{wt-defizient}}$ -Zellen. Eine Überexpression von TIGAR hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die TKT-Expression (**Abbildung 4-48 C und D**).

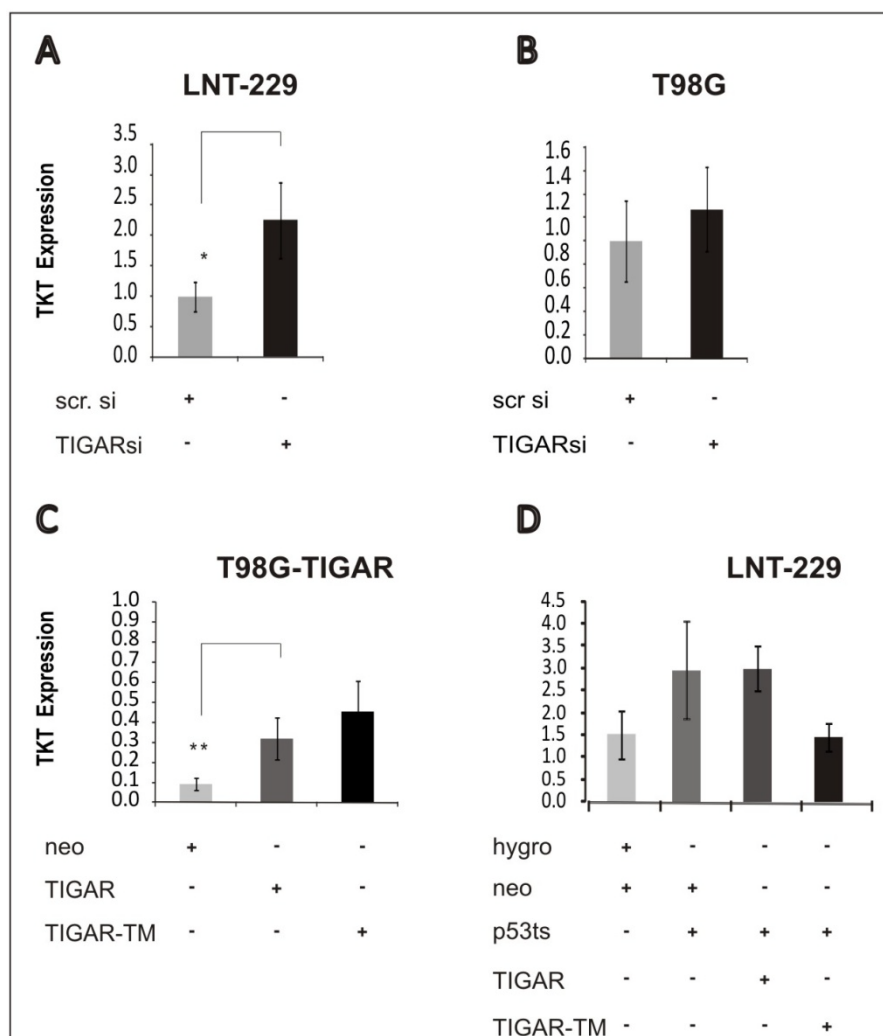


Abbildung 4-48: TKT-Expression in TIGAR-überexprimierenden Zelllinien und -supprimierten Zelllinien

In folgenden Zelllinien wurde die TKT-Expression mittels QRT-PCR überprüft und auf 18S normiert:

A LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden,

B T98G-pcDNA3-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden,
C T98G-pcDNA3, T98G-pcDNA3-TIGAR und T98G-pcDNA3-TIGAR-TM und
D LNT-229hygro-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM.
 Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

Einen zusätzlichen Hinweis dafür, dass TKTL1 über p53/TIGAR reguliert wird, lieferte die Induktion p53-abhängiger Zielgene. Hierfür wurden LNT-229-Zellen mit Adriamycin behandelt. Adriamycin induziert DNA-Schäden und aktiviert dadurch p53. Die ROS, die dabei entstehen, können durch Suppression von TIGAR noch vermehrt werden (33). Es wurde zunächst die Adriamycin-Konzentration ermittelt, die in LNT-229-Zellen notwendig ist, um eine Aktivierung von p53 hervorzurufen. Hierfür wurde einerseits die p53-Proteinexpression bei unterschiedlichen Konzentrationen von Adriamycin ermittelt: LNT-229-Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit 0, 170, 250, 345, 500 oder 1000 ng/mL Adriamycin behandelt und die Expression von p53 mittels WB ermittelt (**3.1.3**). Andererseits wurde die p53-Transaktivität mittels p53-Luziferase-Assay in LNT-229-Zellen untersucht, die mit Adriamycin behandelt wurden (**3.4**). Ab einer Konzentration von 345 ng/mL wurden sowohl die p53-Expression (**A**) und -Transaktivität (**B**) verstärkt induziert (**Abbildung 4-49**). Diese Konzentration wurde in den allen folgenden Versuchen verwendet.

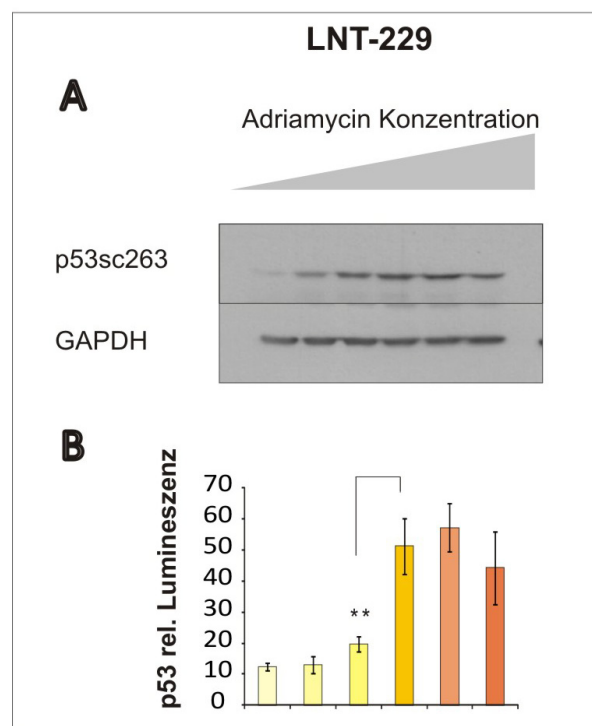


Abbildung 4-49: Induktion von p53 durch Adriamycin

LNT-229-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, nach 24 h für weitere 24 h mit verschiedenen Adriamycin-Konzentrationen behandelt (0, 170, 250, 345, 500 und 1000 ng/mL).

Proteinlysate wurden anschließend hergestellt und das p53-Protein mittels WB nachgewiesen (p53-sc263-Antikörper). Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet (**A**).

Die transkriptionale p53-Aktivität wurde mittels p53-Luziferase-Assay ermittelt: Zellen wurden ausgesät, nach 24 h mit 150 ng p53-Luziferase-Reporter und 20 ng pCMV (Renilla) transfiziert. Nach weiteren 36 h wurden die Zellen für weitere 24 h mit Adriamycin behandelt (0, 170, 250, 345, 500 oder 1000 ng/mL). Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert (**B**). $n=3$, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte $p < 0.01$ (******) als hoch signifikant angesehen.

Um die Auswirkungen von Adriamycin auf die TIGAR- und die TKTL1-Expression zu untersuchen, wurden LNT-229-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h für weitere 24 h mit 345 ng/mL Adriamycin behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert und cDNA hergestellt. Mittels QRT-PCR wurden die Expressionen von TIGAR, TKTL1 und TKT ermittelt (**3.3.2**). Durch die Zugabe von Adriamycin wurden sowohl die TIGAR-Expression als auch die TKTL1-Expression verstärkt. Die TKT-Expression blieb unverändert (**Abbildung 4-50**).

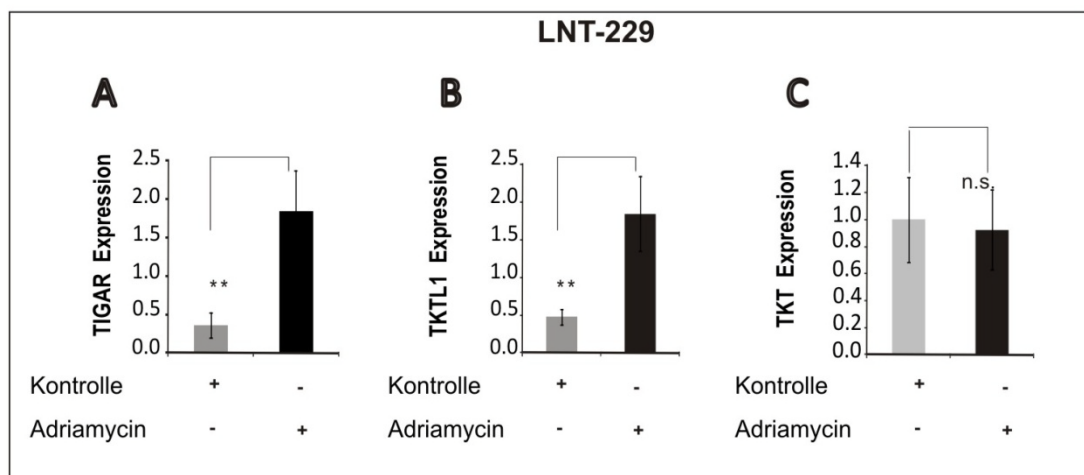


Abbildung 4-50: Induktion der TIGAR- und TKTL1-Expression durch Adriamycin

LNT-229-Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit 345 ng/mL Adriamycin behandelt. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Herstellung wurden die TIGAR- (**A**), TKTL1- (**B**) und TKT (**C**)-Expressionen mittels QRT-PCR überprüft und auf 18S normiert. $n=3$, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte $p < 0.01$ (******) als hoch signifikant angesehen. **n.s.**: nicht signifikant.

4.5.3 TKTL1 *in silico*-Untersuchung

Eine *in silico*-Analyse an drei großen Datensätzen mit Expressionsprofilen von malignen Gliomen (Sun et al., 2006, TCGA 2009, Philips et al. 2006) mittels der Oncomine-Datenbank (www.oncomine.org) ergab eine regelhafte, jedoch erheblich variierende Expression von TKTL1-mRNA (s. Datenbank-Untersuchungen unter **6.6.3**).

4.5.4 Funktionelle Untersuchungen von TKTL1 in Gliom-Zelllinien

In 4.5.2 wurde gezeigt, dass TKTL1 in Gliomen ein (indirektes) p53-Zielgen ist und über die Hemmung der Glykolyse durch TIGAR hochreguliert wird. TKTL1 trägt dazu bei, die ROS-Konzentrationen zu reduzieren (über eine verstärkte NADPH-Produktion im PPP) und ermöglicht das Auffüllen von Metaboliten (Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat) in die Glykolyse (62). Im nachfolgenden Teil wurde daher untersucht, ob die Restoration von TKTL1 in p53^{wt-defizient}-Zellen die Zellen vor H₂O₂, ROS und Hypoxie-induziertem Zelltod zu schützen vermag. Da TIGAR ebenfalls über die Aktivierung des PPP die Zellen vor ROS schützen kann, sollte weiterhin untersucht werden, welche Rolle TKTL1 für die Funktionen von TIGAR spielt.

4.5.4.1 Herstellung von TKTL1-Transfektanten

In 4.5.2 wurde gezeigt, dass eine TIGAR-Überexpression zu einer TKTL1-Überexpression führt, und eine TIGAR-Suppression eine TKTL1-Suppression zur Folge hat. Damit die Rolle von TKTL1 in Gliomzellen und später der Zusammenhang von TIGAR und TKTL1 untersucht werden konnten, wurden stabile LNT-229hygro-pDONR221-, LNT-229hygro-pDONR221-TKTL1-, LNT-229p53ts-pDONR221- und LNT-229p53ts-pDONR221-TKTL1-Zellen (**Abbildung 4-51 A**) und LNT-229puro-pDONR221-, LNT-229puro-pDONR221-TKTL1-, LNT-229p53sh-pDONR221- und LNT-229p53sh-pDONR221-TKTL1-Zellen (**Abbildung 4-51 B**) hergestellt.

Da pDONR221 kein Selektionsmarker trägt, wurden die hygro-Zellen zusätzlich mit dem Vektor pSUPERpuro transfiziert (pDONR221/pDONR221-TKTL1:pSUPERpuro im Verhältnis 10:1), die puro-Zellen mit pLTRcG-hygro transfiziert (pDONR221/TKTL1:pLTRcG-hygro im Verhältnis 10:1) und jeweils mit puromycin oder hygromycin selektiert (**3.1.1.6**). Die Expression von TKTL1 konnte in den jeweiligen Transfektanten um ein vielfaches gesteigert werden. Die endogene TKTL1-Expression wurde zusätzlich in LNT-229-Zellen mittels siRNA herunterreguliert. Hierfür wurden zwei Sequenzen verwendet, die aus (147) entnommen wurden. Diese beiden Sequenzen wurden in der Zellkultur in verschiedenen Konzentrationen getestet. Mit der effizientesten siRNA-Konzentration wurden alle weiteren Versuche durchgeführt. Die Positionen der verschiedenen siRNAs sind dem Methodenteil zu entnehmen (**Tabelle 4**).

Die TKTL1siRNAs wurden mittels HiPerfect (Qiagen, Hilden) in LNT-229- und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen transfiziert, die kurz zuvor in eine 24-Well-Platte ausgesät wurden (30-60 min). Die TKTL1siRNAs wurden in T98G-pcDNA3-TIGAR und nicht in T98G-pcDNA3-Zellen transfiziert, da Letztere fast keine TKTL1 exprimieren. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die RNA wurde mittels Trizol-Aufreinigung gewonnen, cDNA hergestellt, die TKTL1-Expression in der QRT-PCR untersucht und auf die jeweiligen 18S und GAPDH-mRNA-Level normiert (**3.3.2**). Als Kontrolle diente scrambledsiRNA. Die TKTL1siRNA1

war schon in einer Konzentration von 20 nM effizient (mRNA-Suppression von ca. 85% in LNT-229, 50% in T98G-pcdna3-TIGAR-Zellen (**Abbildung 4-51 C und E**)). Die siRNA2 war in den LNT-229-Zellen weniger effizient (ca. 65% bei 50 nM **Abbildung 4-51 D**), so dass alle weiteren Versuche mit der siRNA1 durchgeführt wurden.

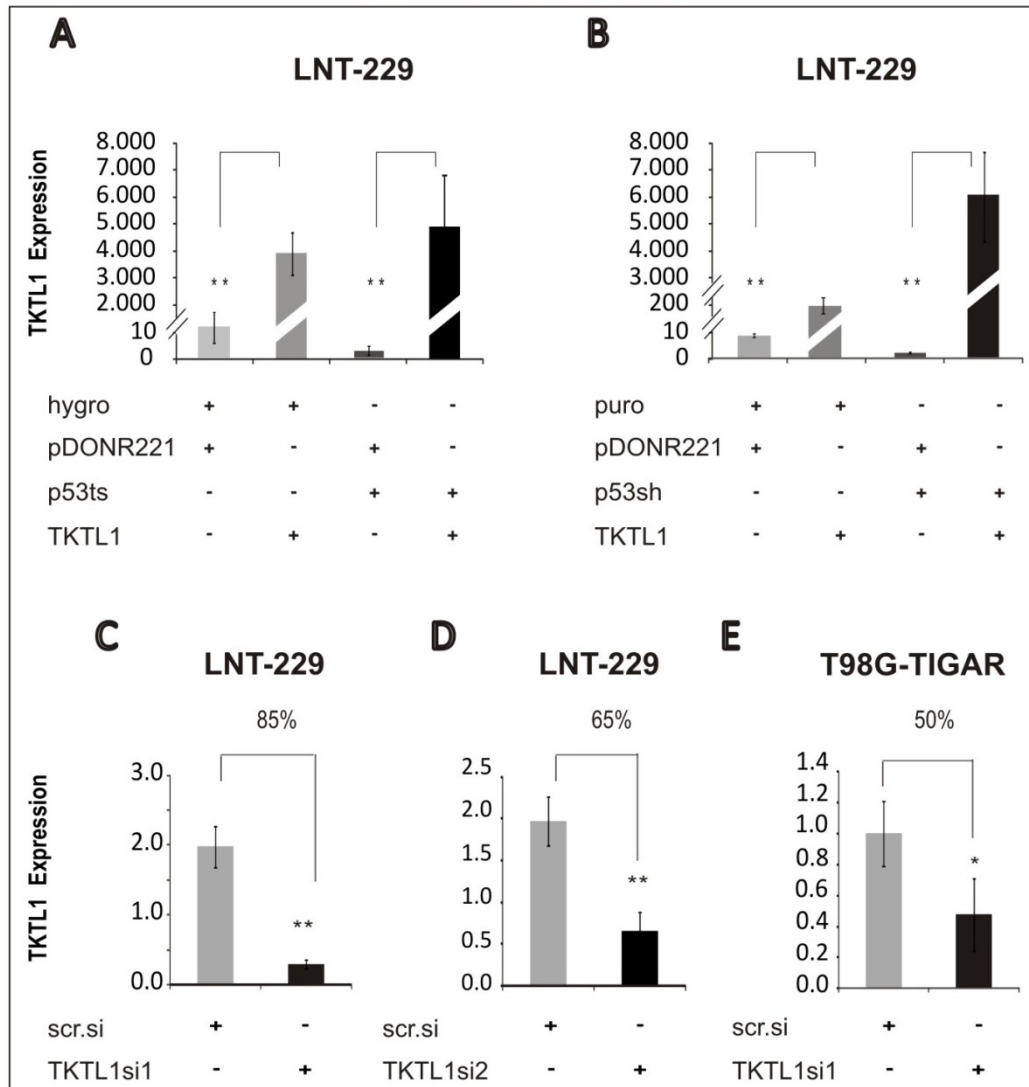


Abbildung 4-51: Relative Expression von TKTL1 in den verwendeten TKTL1-Zellsystemen

Die TKTL1-Expression wurde in folgenden Zelllinien mittels QRT-PCR ermittelt, als Kontrollgenen wurden 18S und GAPDH verwendet:

A LNT-229hygro-pDONR221, LNT-229hygro-pDONR221-TKTL1, LNT-229p53ts-pDONR221 und LNT-229p53ts-pDONR221-TKTL1

B LNT-229puro-pDONR221, LNT-229puro-pDONR221-TKTL1, LNT-229p53sh-pDONR221 und LNT-229p53sh-pDONR221-TKTL1,

C LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) transfiziert wurden

D LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA2 (50 nM) transfiziert wurden, und

E T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) transfiziert wurden.

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.5.4.2 TKTL1 kann Adriamycin-induzierte ROS vermindern

Adriamycin gehört zur Stoffgruppe der Anthracycline und kommt in der Chemotherapie zum Einsatz, z.B. in soliden epithelialen und mesenchymalen Tumoren oder Leukämien. Das Wirkprinzip beruht in der DNA-Interkalation, was zu erhöhtem oxidativen Stress führt (ROS-Bildung) und damit zur Einleitung der Apoptose. Die Wirkung von Adriamycin hängt vom p53-Status ab. Dunkern et al. zeigten 2003, dass ein p53^{wt}-Status die Strangbrüche, die durch die Adriamycin-Behandlung entstehen noch verstärken kann. So wird in p53^{wt}-Zellen durch Adriamycin auch die Topoisomerase II gehemmt. Dies geschieht in p53^{mt}-Zellen nicht, der genaue Mechanismus hierfür ist noch unbekannt (287, 288). Deshalb wurden in dieser Arbeit keine p53^{wt-defizient}-Zellen untersucht, da die Wirkung des Adriamycins hier eingeschränkt ist. In 4.5.2 konnte gezeigt werden, dass die TKTL1-Expression in Adriamycin-behandelten p53^{wt}-Zellen steigt. Daher wurde in Gliomzellen überprüft, ob TKTL1 der Bildung von ROS entgegenwirken kann. Hierfür wurden die ROS-Konzentrationen in LNT-229puro-pDONR221 und LNT-229puro-pDONR221-TKTL1-Zellen, und in LNT-229hygro-pDONR221 und LNT-229hygro-pDONR221-TKTL1-Zellen, die 24 h mit 345 ng/mL Adriamycin behandelt wurden, mittels H₂DCFDA-FACS ermittelt (3.1.2.2).

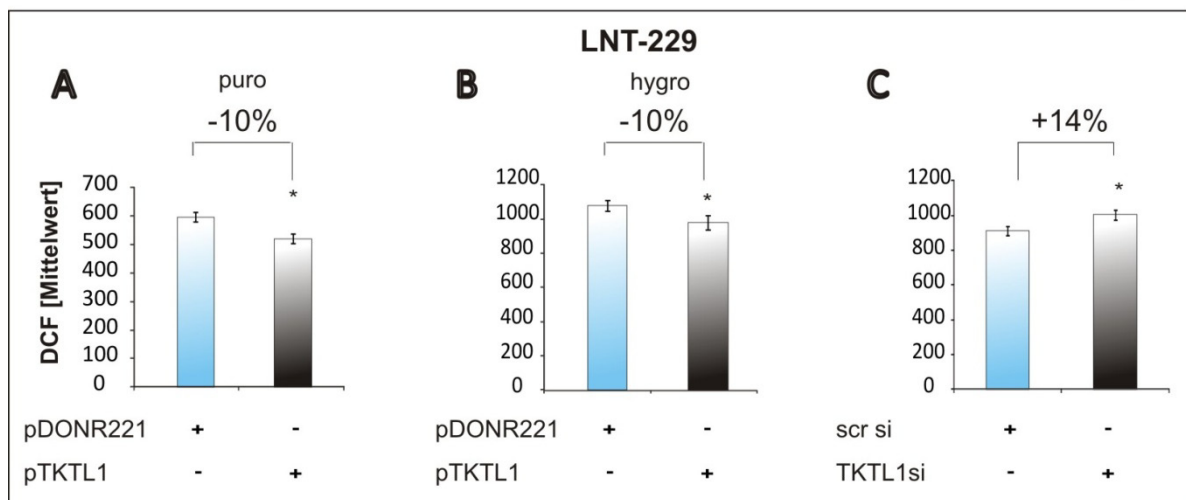


Abbildung 4-52: TKTL1-vermittelte Reduzierung von Adriamycin-induzierten ROS

Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h für weitere 24 h mit 345 ng/mL Adriamycin behandelt. Die ROS-Analyse erfolgte mittels H₂DCFDA-FACS.

A LNT-229puro-pDONR221, LNT-229puro-pDONR221-TKTL1, LNT-229p53sh-pDONR221 und LNT-229p53sh-pDONR221-TKTL1,

B LNT-229hygro-pDONR221, LNT-229hygro-pDONR221-TKTL1, LNT-229p53ts-pDONR221-TKTL1 und LNT-229p53ts-pDONR221-TKTL1 und

C LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) transfiziert wurden.

n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

Eine Überexpression der TKTL1 konnte in den Zellen die ROS-Menge reduzieren:

- LNT-229puro-pDONR221 vs. LNT-229puro-pDONR221-TKTL1= 600:520 DCF [Mittelwert] (13,3%) (**Abbildung 4-52 A**)
- LNT-229hygro-pDONR221 vs. LNT-229hygro-pDONR221-TKTL1= 1080:980 DCF [Mittelwert] (9,3%); (**Abbildung 4-52 A B**).

Durch eine Suppression der TKTL1-Expression mittels TKTL1siRNA1 (20 nM) konnten die ROS-Konzentrationen in der Zellen um 14,4% verstärkt werden (LNT-229scrambledsiRNA vs. LNT-229TKTL1siRNA1= 855:1012 DCF [Mittelwert]) (**Abbildung 4-52 C**).

4.5.4.3 TKTL1 schützt vor Nährstoffmangel- und Hypoxie-induziertem Zelltod

TKTL1 schützt vor externen und internen ROS (62, 147). Um zunächst zu überprüfen, ob in Gliomzellen eine TKTL1-Suppression die Zellen gegenüber Hypoxie sensibilisiert, wurde der Zelltod mittels PI-FACS in LNT-229-Zellen gemessen. Die Zellen wurden dazu in 24-Well-Platten ausgesät, mit 20 nM TKTL1siRNA1 transfiziert (**3.1.1.7**) und nach 24 h für weitere 24 h mit 2 mM Glukose in SFM 21% bzw. 0,1% O₂ behandelt und anschließend im PI-FACS untersucht (**3.1.2.1**). Eine TKTL1-Suppression führte zu Sensibilisierung gegenüber Hypoxie (25% mehr Zelltod) (**Abbildung 4-53**).

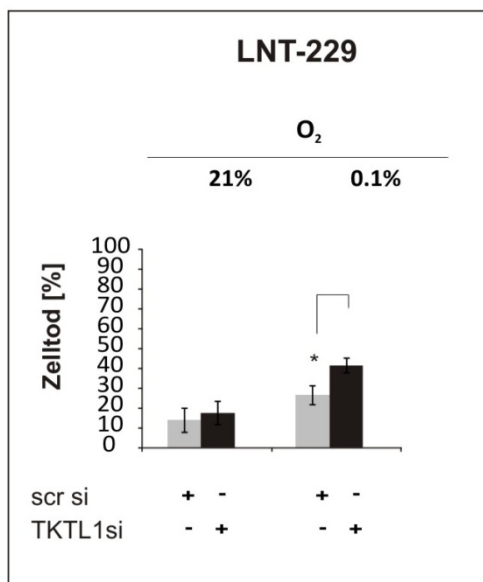


Abbildung 4-53: TKTL1-vermittelter Schutz gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod

LNT-229-Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, nach 30 min mit scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) transient mittels Hiperfect transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 24 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 21% oder 0,1% O₂ behandelt. Die Zelltod-Analyse erfolgte mittels PI-FACS. Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

In **4.5.2** wurde gezeigt, dass TKTL1 über TIGAR regulierbar ist, und in **4.4.6** dass eine Restoration von TIGAR in p53^{wt-defizient}-Zellen die Zellen vor Hypoxie-induziertem Zelltod schützen kann. Um zu überprüfen, ob in TIGAR-exprimierenden Gliomzellen eine TKTL1-Suppression diesen Effekt aufheben kann, wurden T98G-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen und LNT-229p53ts-pcDNA3- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät, mit 20 nM scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 transfiziert und nach 24 h

für weitere 24 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 21% O₂ oder 0,1% O₂ behandelt. Anschließend wurde der Zelltod mittels PI-FACS untersucht. Eine TKTL1-Suppression führte sowohl in T98G-pcDNA3-TIGAR- als auch LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen zu verstärktem Zelltod, bzw. zur Aufhebung des TIGAR-vermittelten Schutzes unter Hypoxie, und hatte denselben Effekt wie eine TIGAR-Suppression:

- T98G-pcDNA3:T98G-pcDNA3-TIGAR-scrambledsiRNA:T98G-pcDNA3-TIGAR-TKTL1siRNA:T98G-pcDNA3-TIGAR-TIGARsiRNA=56,2%:32,7%:65,5%:63,8% Zelltod **Abbildung 4-54 A)**
- LNT-229p53ts-pcDNA3:LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR:LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TKTL1siRNA:LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TIGARsiRNA=62,7%:24,2%:68,8%:56,2% Zelltod **Abbildung 4-54 B).**

Unter Normoxie war kein Unterschied zu erkennen, aber es könnte sein, dass der Zeitpunkt zu früh gewählt wurde, um einen Effekt beobachten zu können.

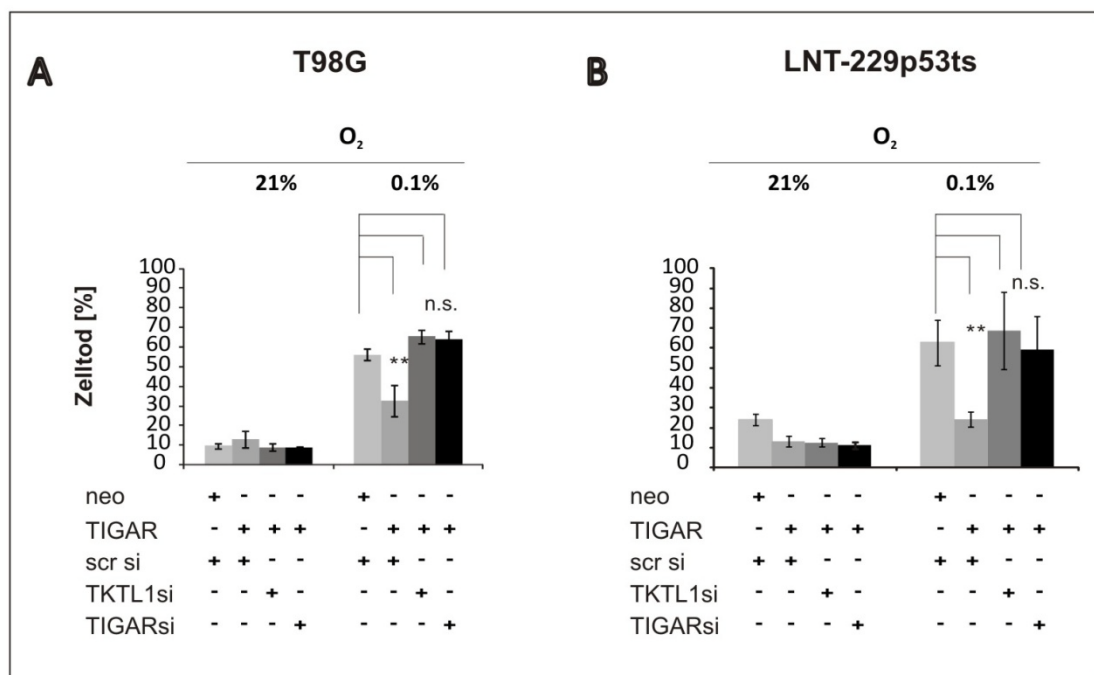


Abbildung 4-54: TKTL1-Abhängigkeit des TIGAR-vermittelten Schutzes in p53^{wt-defizient}-Zellen gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod

Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h für weitere 24 h mit 2 mM glukose in SFM unter 21% oder 0,1% O₂ behandelt. Die Zelltod-Analyse erfolgte mittels PI-FACS.

A T98G-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen, Letztere mittels Hiperfect transient mit scrambledsiRNA (100 nM) bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert
B LNT-229p53ts-pcDNA3- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen, Letztere mittels Hiperfect transient mit scrambledsiRNA (100 nM) bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert.

Repräsentatives Experiment aus mind. 3 unabhängigen Versuchen. p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen. n.s.: nicht signifikant.

4.5.4.4 TKTL1 vermittelt einen Schutz vor ROS-induziertem Zelltod (H₂O₂)

Xu et al. konnte zeigen, dass eine TKTL1-Suppression in HCT116-Zellen zu einer Sensitivierung gegenüber H₂O₂ führt (147) und dass diese Sensitivierung auf eine Absenkung der NADPH-Konzentration in der Zelle zurückzuführen ist. Um zu überprüfen, ob in Gliomzellen eine TKTL1-Überexpression ebenfalls Schutz vor externen ROS ermöglicht, wurde der H₂O₂-induzierte Zelltod in LNT-229hygro-pDONR221, LNT-229p53ts-pDONR221 und LNT-229p53ts-pDONR221-TKTL1-Zellen (**Abbildung 4-55 A**) LNT-229puro-pDONR221, LNT-229p53sh-pDONR221, LNT-229p53sh-pDONR221-TKTL1-Zellen (**Abbildung 4-55 B**) sowie in LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) transfiziert wurden (**Abbildung 4-55 C**), T98G-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) transfiziert wurden (**Abbildung 4-55 D**) mittels PI-FACS ermittelt. Es zeigte sich, dass eine Überexpression in p53^{wt-defizient}-Zellen die Zellen vor H₂O₂ schützte:

- LNT-229p53ts-pDONR221 vs. LNT-229p53ts-pDONR221-TKTL1=60:50% Zelltod (-16,7%) (**Abbildung 4-55 A**)
- LNT-229p53sh-pDONR221 vs. LNT-229p53sh-pDONR221-TKTL1=55:30% Zelltod (-45,5%) (**Abbildung 4-55 B**)

Zugleich wurde überprüft, ob eine Suppression von TKTL1 in LNT-229- und in T98G-Zellen-Zellen einen verstärkten H₂O₂-vermittelten Zelltod zur Folge hat. Eine TKTL1-Suppression führte sowohl in LNT-229- als auch in T98G-Zellen zu einer Sensitivierung gegenüber H₂O₂ (65% und 20%, **Abbildung 4-55 C und D**).

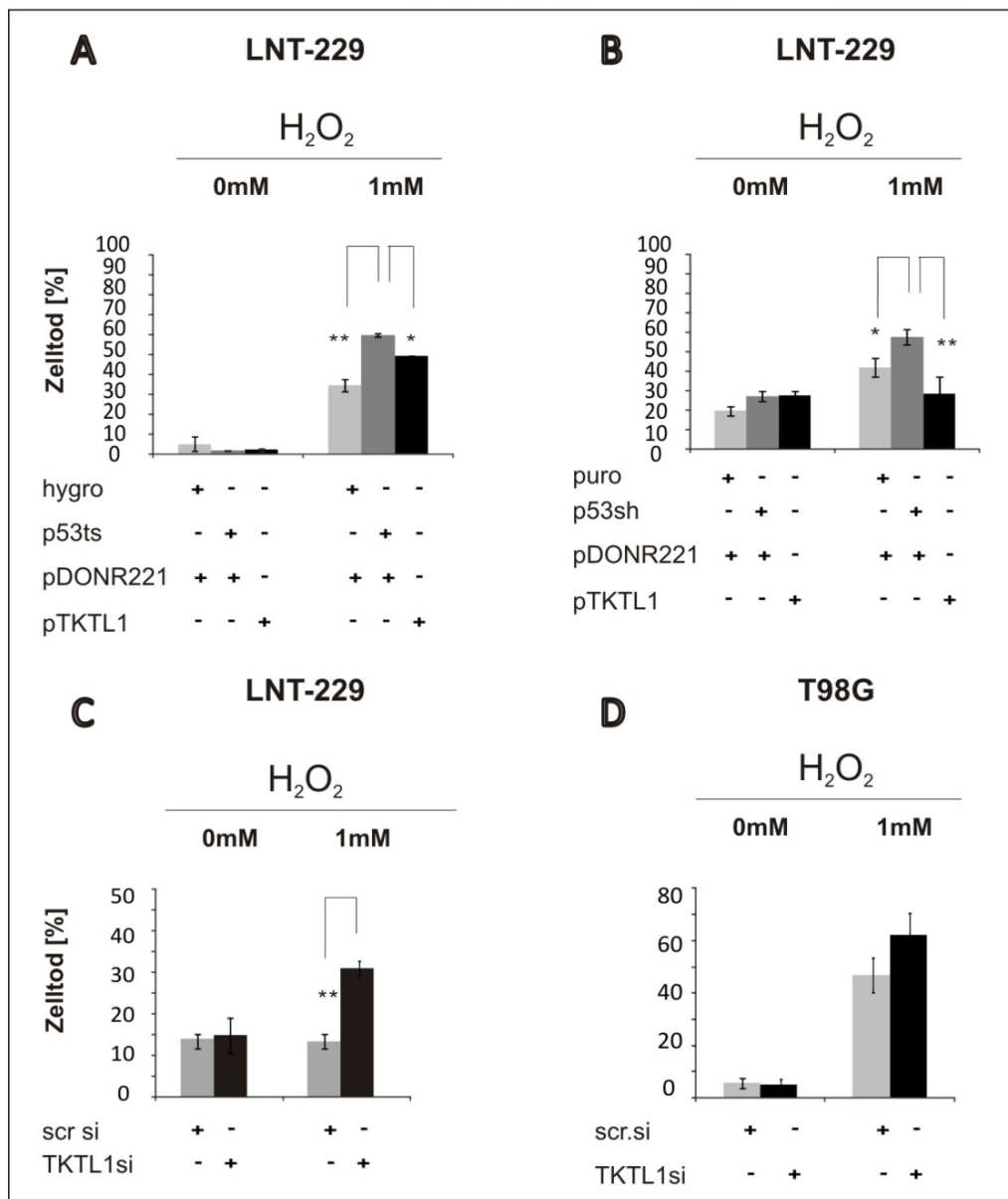


Abbildung 4-55: TKTL1 vermittelter Schutz vor H₂O₂

Folgende Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 h für weitere 4 h mit 1 mM H₂O₂ behandelt und der Zelltod mittels PI-FACS ermittelt:

A LNT-229hygro-pDONR221-, LNT-229p53ts-pDONR221-TKTL1- und LNT-229p53ts-pDONR221-TKTL1- und

B LNT-229puro-pDONR221-, LNT-229p53sh-pDONR221- und LNT-229p53sh-pDONR221-TKTL1-,

C LNT-229-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) transfiziert wurden,

D T98G-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) transfiziert wurden. Repräsentatives Experiment aus mind. 3 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01(**) als hoch signifikant angesehen.

4.5.4.5 TKTL1-Suppression sensibilisiert TIGAR-Zellen gegenüber ROS-induziertem Zelltod

Da TIGAR TKTL1 reguliert (4.5.2), wurde überprüft, ob eine TKTL1-Suppression in TIGAR-Zellen Einfluss auf externen ROS-induziertem Zelltod hat. Dabei wurde der Einfluss von TKTL1 auf den Zelltod mittels PI-FACS (3.1.2.1) in folgenden Zelllinien untersucht: T98G-

pcDNA3- und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen (**Abbildung 4-56 A**) und LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen (**Abbildung 4-56 B**). Die Zellen wurden dafür in 24-Well-Platten ausgesät, mit 100 nM scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 (20 nmol) bzw. 100 nM TIGARsiRNA transfiziert (**3.1.1.7**) und nach 24 h mit 1 mM H₂O₂ für weitere 24 h (T98G-Zellen) oder weitere 4 h (LNT-229-Zellen) behandelt.

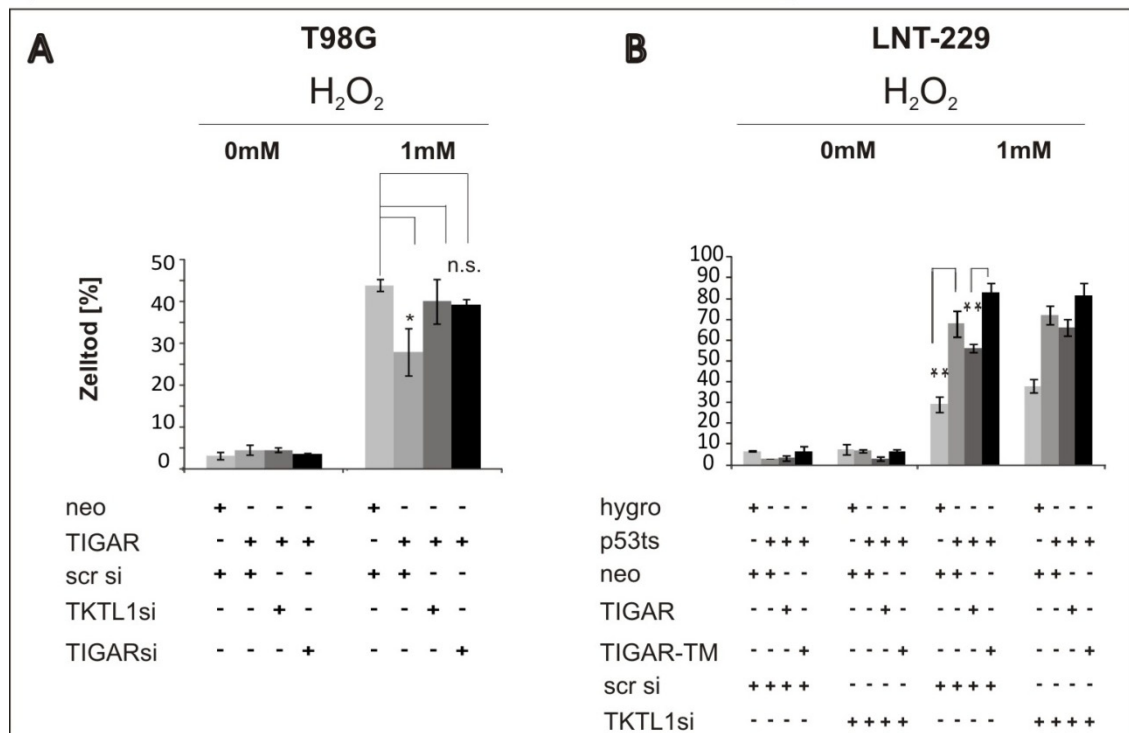


Abbildung 4-56: TKTL1-Abhängigkeit des TIGAR-vermittelten Schutzes in p53^{wt-defizient}-Zellen gegenüber ROS-induziertem Zelltod

Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 h für weitere 24 h mit 1 mM H₂O₂ behandelt. Die Zelltod-Analyse erfolgte mittels PI-FACS.

A T98G-pcDNA3- und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA (100 nM), bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden, und

B LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA (100 nM), bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden.

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen. n.s.: nicht signifikant. Aus Übersichtlichkeit-Gründen sind nicht alle Signifikanzen dargestellt.

Eine TKTL1-Suppression führte sowohl in T98G-pcDNA3-TIGAR als auch in LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-Zellen zu einer Sensibilisierung gegenüber H₂O₂:

- T98G-pcDNA3-scrambledsiRNA vs. T98G-pcDNA3-TIGAR-scrambledsiRNA vs. T98G-pcDNA3-TIGAR-TKTL1siRNA=56,2%:32,7%:65,3% Zelltod (TIGAR vermittelte einen

Schutz von ca. 40%, eine Suppression von TKTL1 in denselben Zellen kehrte diesen Schutz um (**Abbildung 4-56 A**)

- LNT-229p53ts-pcDNA3-scrambledsiRNA vs. LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-scrambledsiRNA vs. LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TKTL1siRNA=72,2%:33,3%:56,7% Zelltod (TIGAR vermittelte einen Schutz von ca. 55%, eine Suppression von TKTL1 in denselben Zellen kehrte diesen Schutz zum Teil um). Eine TKTL1-Suppression in LNT-229p53ts-TIGAR-TM-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Sensibilität gegenüber H₂O₂. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt von der Hemmung der Glykolyse und der Induktion des PPP abhängig ist (**Abbildung 4-56 B**).

4.5.4.6 TKTL1-Suppression führt zu erhöhten intrazellulären ROS-Konzentrationen unter Hypoxie und Nährstoffmangel

Eine TKTL1-Suppression in HCT116-Zellen führt zu erhöhten ROS-Konzentrationen in der Zelle (147), hervorgerufen durch die Absenkung der NADPH-Konzentration in der Zelle. Da noch keine Daten bezüglich der Auswirkungen einer TKTL1-Suppression in Gliomzellen vorhanden waren, wurde in T98G- und LNT-229-Zellen die TKTL1-Expression mittels TKTL1siRNA1 supprimiert und die Konzentration der intrazellulären ROS mittels H₂DCFDA-FACS ermittelt (**3.1.2.2**).

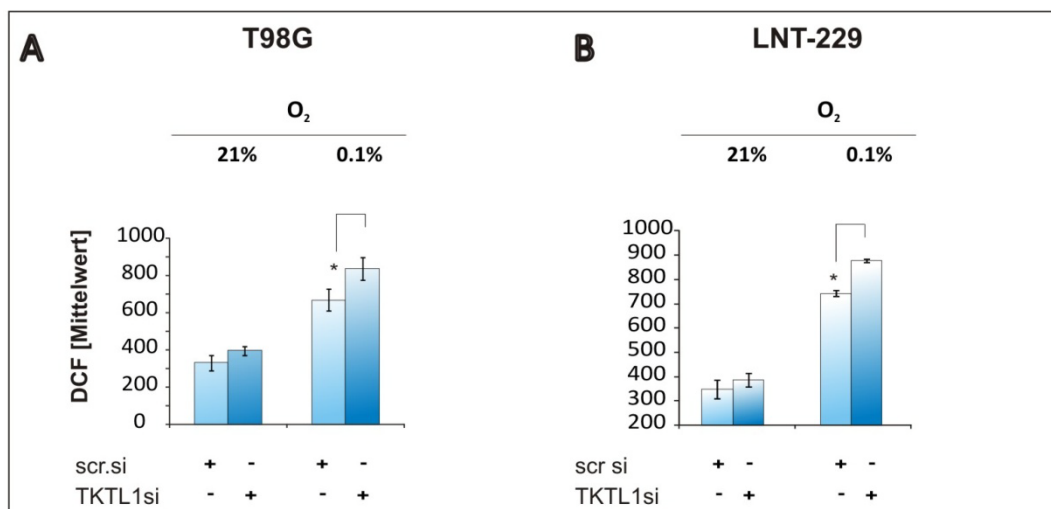


Abbildung 4-57: TKTL1 und Hypoxie-induzierte ROS-Sensitivität

T98G- (A) und LNT-229-Zellen (B) wurden 30 min nach Aussaat in 24-Well-Platten transient mit 20 nM scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 transfiziert und nach weiteren 24 h für 20 h mit 5 mM Glukose in SFM unter 21% bzw. 0,1% O₂ behandelt. Die ROS-Analyse erfolgte mittels H₂DCFDA-FACS. Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

Eine TKTL1-Suppression hatte eine Erhöhung der ROS-Konzentrationen unter hypoxischen Bedingungen zur Folge:

- T98G-scrambledsiRNA vs. T98G-TKTL1siRNA unter 0,1% O₂= 670:838 DCF [Mittelwert] (+25%) (**Abbildung 4-57 A**)
- LNT-229scrambledsiRNA vs. LNT-229-TKTL1siRNA unter 0,1% O₂= 743:876 DCF [Mittelwert] (+18%) (**Abbildung 4-57 B**)

Eine leichte, jedoch nicht signifikante Erhöhung der ROS-Konzentrationen war auch unter 21% O₂ zu beobachten.

4.5.4.7 TKTL1-Suppression in TIGAR-Zellen erhöht intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter Hypoxie

Um zu überprüfen, ob der protektive Effekt von TIGAR unter Hypoxie von TKTL1 abhängig ist, wurden stabile LNT-229hygro-pcDNA3/TIGAR-, LNT-229p53ts-pcDNA3/TIGAR- und T98G-pcDNA3/TIGAR-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät, mit 20 nM scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA1 transfiziert (**3.1.1.7**) und nach 24 h für 16 h mit 5 mM Glukose in SFM unter 21% oder 0,1% O₂ behandelt. Anschließend wurde der Zelltod mittels PI-FACS untersucht (**3.1.2.1**).

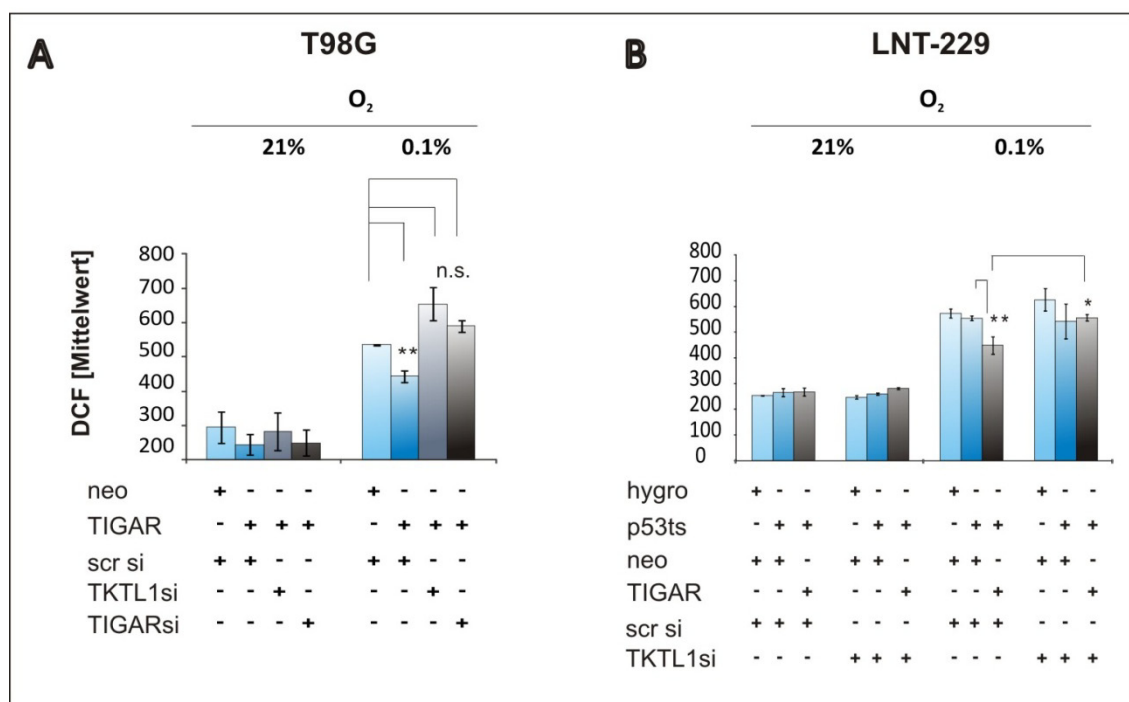


Abbildung 4-58: TIGAR- und TKTL1-abhängige intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter Hypoxie und Nährstoffmangel

Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h für 24 h mit 2 mM Glukose in SFM 21% oder 0,1% O₂ behandelt. Die ROS-Analyse erfolgte mittels H₂DCFDA-FACS.

A T98GpcDNA3- und T98G-pcDNA3-TIGAR-Zellen, Letztere transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA (100 nM), bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert, und

B LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen, die transient mittels Hiperfect mit scrambledsiRNA (100 nM), bzw. TKTL1siRNA1 (20 nM) bzw. TIGARsiRNA1 (100 nM) transfiziert wurden.

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.
n.s.: nicht signifikant.

Eine TKTL1-Suppression führte in TIGAR-überexprimierenden Zellen zu einer Erhöhung der ROS-Konzentrationen in den Zellen, und kehrte den TIGAR-Effekt um (genauso wie die TIGARsiRNA):

- T98G-pcDNA3-scrambledsiRNA vs. T98G-pcDNA3-TIGAR-scrambledsi vs. T98G-pcDNA3-TIGAR-TKTL1siRNA = 535:444: 654 DCF [Mittelwert] (**Abbildung 4-58 A**)
- LNT-229p53ts-pcDNA3-scrambledsiRNA vs. LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-scrambledsiRNA vs. LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TKTL1siRNA = 626:581: 556 DCF [Mittelwert].

TIGAR reduzierte die Hypoxie-induzierte ROS-Konzentrationen, eine Suppression von TKTL1 in denselben Zellen revertierte dies (**Abbildung 4-58 B**).

4.5.4.8 Einfluss von TKTL1 auf die Transaktivität von HIF-1 α unter hochgradiger Hypoxie

Sun al zeigten 2010, dass eine Überexpression von TKTL1 die Produktion von Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat erhöht und somit auch die Produktion von Pyruvat und Laktat steigern kann, da diese Metabolite wieder der Glykolyse zugeführt werden kann. Beide führen zu einer Hemmung der PHDs, und somit zu einer Stabilisierung von HIF-1 α (284, 285) und zu einer damit verbundenen Hochregulierung glykolytischer Enzyme (289). Es ist zudem beobachtet worden, dass bei Gliomen eine Akt-Phosphorylierung positiv mit der TKTL1-Expression korreliert (150). Eine Akt-Aktivierung führt einerseits zu einer intensivierten Glykolyse (120) aber andererseits auch zusätzlich über noch unbekannte Wege zu einer Erhöhung der HIF-1 α -Aktivität (290). Es wurde deshalb vermutet, dass TKTL1 HIF-1 α regulieren könnte, bzw. dass HIF-1 α und TKTL1 in Wechselwirkung treten könnten. So könnte die TKTL1-vermittelte Resistenz gegenüber ROS- oder auch Hypoxie-induziertem Zelltod über HIF-1 α vermittelt werden, da HIF-1 α sowohl vor ROS schützt (291, 292) als auch vor Hypoxie-induziertem Zelltod schützen kann (178, 293).

Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob die TKTL1-Expression in Gliomzellen die HIF-1 α -Transaktivität/Proteinmenge beeinflusst. Hierfür wurden LNT-229-Zellen mit HIF-1 α -Reporter-Plasmid (150 ng) und p-CMV (Renilla, 20 ng) transfiziert und nach 36 h mit 20 nM scrambledsi bzw. TKTL1siRNA1 mittels Hiperfect transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen für weitere 8 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 0,1% O₂ behandelt und die Luziferase-Lumineszenz mittels Luminometer ermittelt und auf den jeweiligen Renilla-Wert normiert (**3.1.3**). Eine TKTL1-Suppression unter hypoxischen Bedingungen führte zu einer geringeren HIF-1 α -Reporter-Aktivität (-50%). Dies wurde auch auf Proteinebene durch WB unter denselben Bedingungen überprüft (**Abbildung 4-59**) (**3.4**). Dabei konnte jedoch keine

Veränderung der HIF-1 α -Proteinmenge durch eine TKTL1-Suppression beobachtet werden, so dass die im Reporter gezeigte Regulierung nicht auf die Stabilität von HIF-1 α zurückzuführen war.

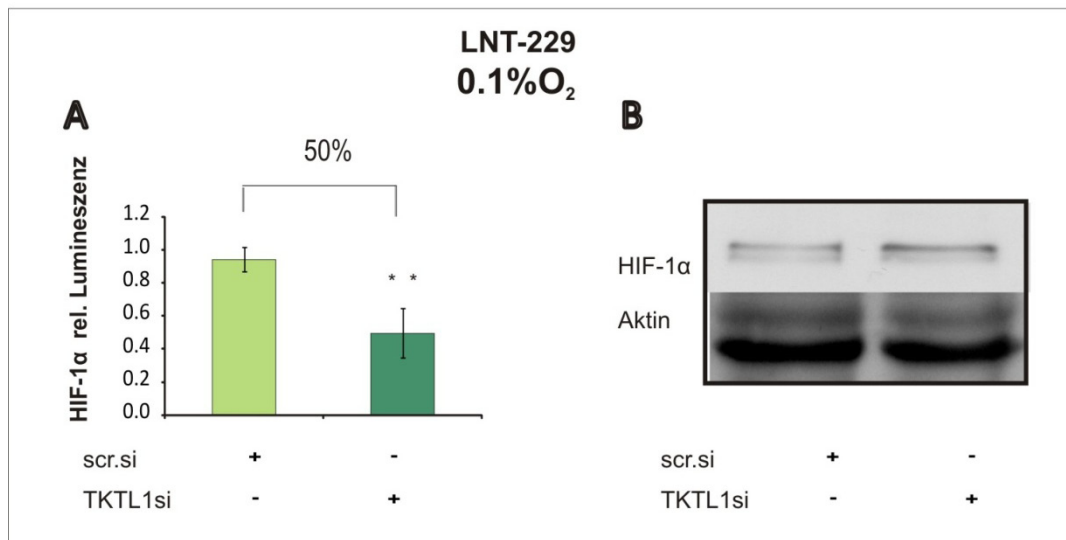


Abbildung 4-59: TKTL1-Abhängigkeit der HIF-1 α -Transaktivität unter hochgradiger Hypoxie

LNT-229-Zellen wurden in 96-Well ausgesät (10.000 Zellen) und nach 24 h mit HIF-1 α -Reporter-Plasmid (150 ng) und p-CMV (Renilla, 20 ng) mittels Metafectene pro transfiziert. Nach weiteren 36 h wurden die Zellen mit 20 nM scrambledsi bzw. TKTL1siRNA1 mittels Hiperfect transfiziert. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen für 8 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 0,1% O₂ behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ l Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert (**A**). Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen. Unter denselben Bedingungen wie der Reporter wurde auch HIF-1 α auf Proteinniveau durch WB nachgewiesen (**B**).

Da TKTL1 die Reporteraktivität von HIF-1 α unter Hypoxie verringerte, wurde überprüft, ob eine TKTL1-Suppression in TIGAR-exprimierenden Zellen zu Umkehr des TIGAR-Effektes auf die HIF-1 α -Reporteraktivität führt. LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen wurden mit je 150 ng/96-Well HIF-1 α -Reporter und je 20 ng/96-Well Renilla-Kontrollvektor transfiziert, nach 36 h mit 20 nM scrambledsiRNA bzw. TKTL1siRNA transfiziert (**3.1.1.7**), und nach weiteren 18 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 0,1% O₂ für weitere 8 h behandelt und die HIF-1 α -Luziferaseaktivität gemessen (**3.1.3**). Eine TKTL1-Suppression führte in LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen zu einer Reduktion der HIF-1 α -Aktivität unter Hypoxie, unabhängig vom p53-Status oder einer TIGAR-Überexpression (**Abbildung 4-60**).

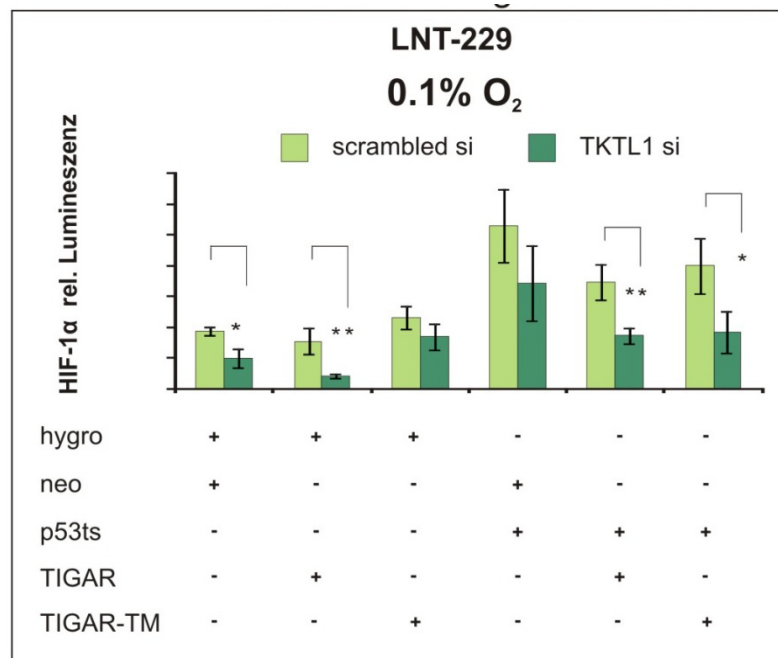


Abbildung 4-60: Auswirkungen einer TKTL1-Suppression in TIGAR-exprimierenden Zellen auf die Transaktivität von HIF-1 α in Gliomzellen unter Nährstoffmangel - Bedingungen und hochgradiger Hypoxie.

LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-, LNT-229hygro-pcDNA3-TIGAR-TM-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät (10.000 Zellen) und nach 24 h mit je 150 ng HIF-1 α -Luziferase-Reporter und 20 ng pRL-CMV (Renilla) pro 96-Well transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit 20 nM scrambledsiRNA oder TKTL1siRNA1 transient mit Hiperfect transfiziert, nach weiteren 16 h für weitere 8 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 0,1% O₂ behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.5.4.9 HIF-1 α reguliert die TKTL1-Expression in der Hypoxie

Da TIGAR einerseits HIF-1 α reguliert (4.4.5) und andererseits auch TKTL1 reguliert (4.5.2), sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob HIF-1 α die Expression von TKTL1 unter Hypoxie regulieren kann. Hierfür wurden LN229-Zellen, die stabil mit HIF-1 α bzw. mit dem Kontrollvektor SIMA transfiziert wurden für 20 h mit VM unter 0,1% O₂ behandelt und anschließend wurde die Expression von TKTL1 mittels QRT-PCR überprüft. Es konnte eine Korrelation zwischen HIF-1 α - und TKTL1-Expression hergestellt werden: eine Überexpression von HIF-1 α führte unter Hypoxie zu einer Expressionssteigerung von TKTL1 (80%) und eine HIF-1 α -Suppression zu einer Expressionsverminderung von TKTL1 (70%) (Abbildung 4-61).

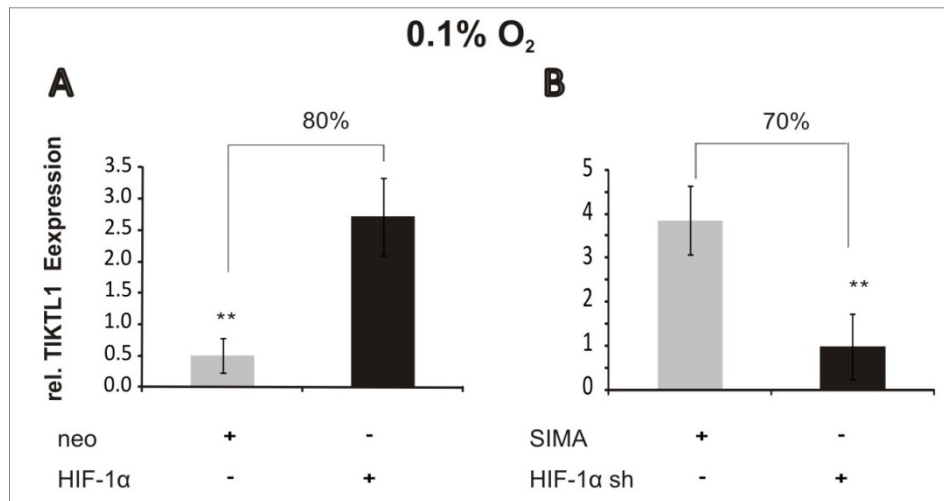


Abbildung 4-61: HIF-1 α -abhängige Regulierung der TKTL1-Expression unter hochgradiger Hypoxie

LN-229-Zellen, die transient mit pcDNA3 oder pcDNA3-HIF-1 α mittels Attractene transfiziert wurden (A) und LN229SIMA- und HIF-1 α -sh-Zellen (B) wurden nach 24 h für weitere 20 h unter 0,1% O₂ in VM behandelt. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurde die TKTL1-Expression mittels QRT-PCR untersucht und auf die jeweiligen SDHA-Werte normiert. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

4.5.4.10 TKTL1-Suppression in TIGAR-überexprimierenden Zellen verringert die Atmung

In **4.4.4.1** wurde gezeigt, dass eine Überexpression von TIGAR zu verstärkter Atmung führte. Da ein Zusammenhang zwischen TIGAR und TKTL1 besteht, wurde überprüft, ob TKTL1 den TIGAR-vermittelten Effekt auf die Atmung beeinflusst. Hierfür wurden LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229-TIGAR- und LNT-229p53ts-TM-Zellen in Glasschälchen ausgesät (250.000 Zellen/Schälchen), nach 1 h mit 20 nM scrambledsiRNA oder TKTL1siRNA transient transfiziert und nach weiteren 24 h mit vorinkubierten VM luftdicht verschlossen. Nach 48 h wurde der restliche Sauerstoff im Medium mittels Radiometer gemessen und der Sauerstoffverbrauch auf die Proteinmenge normiert (**3.2.3**). Eine TKTL1-Suppression in LNT-229hygro-Zellen bewirkte eine Verstärkung der Atmung um ca. 10%. Dies stand in Einklang mit Daten aus der Dissertation von Xu, DKFZ, Heidelberg. Bei einer TKTL1-Suppression in LNT-229p53ts-TIGAR- und LNT-229p53ts-TIGAR-TM-Zellen konnte allerdings eine Verringerung der Atmung um 35% erreicht werden. Da dieser Effekt auch in TM-Zellen zu beobachten war, scheint die TKTL1 nicht nur über die Funktion von TIGAR als glykolytischer Hemmer gesteuert zu werden, was die TKTL1-Expressionsuntersuchung in TIGAR/TIGAR-TM-Zellen (**Abbildung 4-62**) und die Reporteruntersuchungen in diesen Zellen (**Abbildung 4-60**) bestätigten. Eine TKTL1-Suppression in LNT-229p53ts-Zellen hatte keine Auswirkung auf das Atmungsverhalten dieser Zellen.

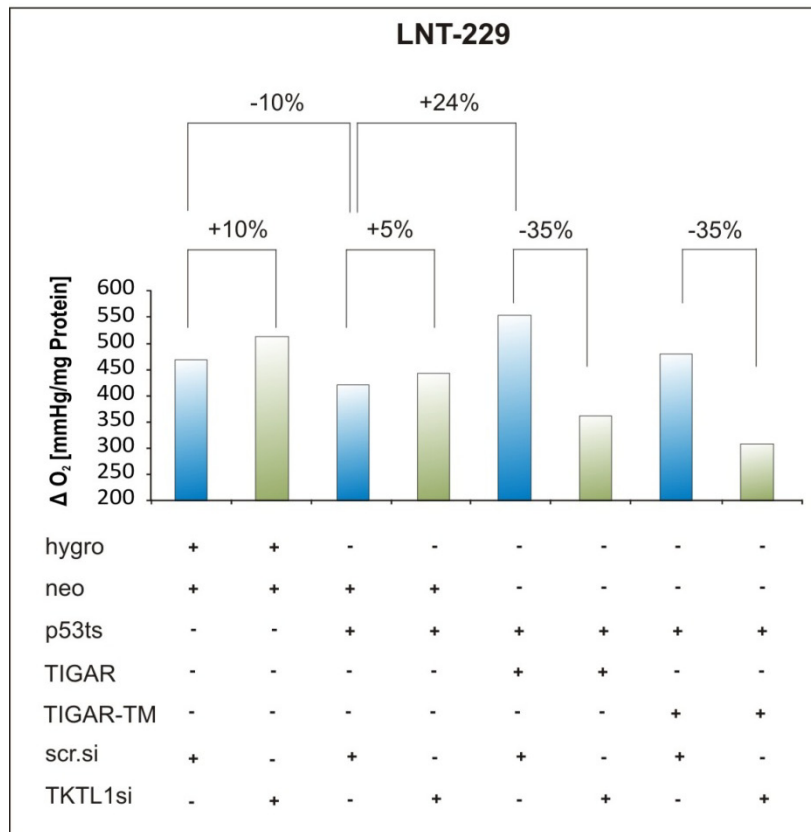


Abbildung 4-62: TKTL1-regulierte mitochondriale Atmung in TIGAR-überexprimierenden Zellen

LNT-229hygro-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-, LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR- und LNT-229p53ts-pcDNA3-TIGAR-TM-Zellen in Glasschälchen ausgesät mit scrambledsiRNA oder TKTL1siRNA (20 nM) mittels Hiperfect transfiziert, nach 24 h mit vorinkubiertem Medium behandelt und luftdicht verschlossen. Nach weiteren 48 h wurde der Sauerstoff mittels Radiometer gemessen und auf die jeweilige Proteinmenge normiert. Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen.

4.5.4.11 TKTL1-Suppression bewirkt eine Hemmung der HIF-1 α -Transaktivität unter moderater Hypoxie (5% O₂)

Da gezeigt werden konnte, dass TIGAR die Expression der TKTL1 reguliert (4.5.2) und TIGAR die Transaktivität von HIF-1 α regulieren kann (4.4.5), wurde die HIF-1 α -Reporteraktivität in TKTL1-supprimierten Zellen unter moderater Hypoxie (10-5% O₂) gemessen, um zu überprüfen, ob TKTL1 auch mit HIF-1 α unter diesen Bedingungen wechselwirken kann. Hierfür wurden LNT-229-Zellen mit 150 ng/96-Well HIF-1 α -Reporter und 20 ng/96-Well Renilla-Kontrollvektor transfiziert, nach 36 h mit 20 nM scrambledsiRNA oder TKTL1siRNA transfiziert, und nach weiteren 16 h mit 2 mM Glukose in SFM unter 5% und 10% O₂ für weitere 8 h behandelt und die Luziferaseaktivität gemessen (3.1.3). Eine TKTL1-Suppression führte erst unter 5% O₂ (Abbildung 4-63 B) zu einer HIF-1 α -Transaktivitäts-Regulierung; unter 10% O₂ war dieser Unterschied nicht signifikant (Abbildung 4-63 A). Wie in 4.5.4.8 konnte auch hier keine Veränderung der HIF-1 α -Proteinmenge durch eine TKTL1-Suppression beobachtet werden (Abbildung 4-63 C und D), so dass die im Reporter gezeigte

Regulierung unter normoxischen Bedingungen nicht auf die Stabilität von HIF-1 α zurückzuführen ist.

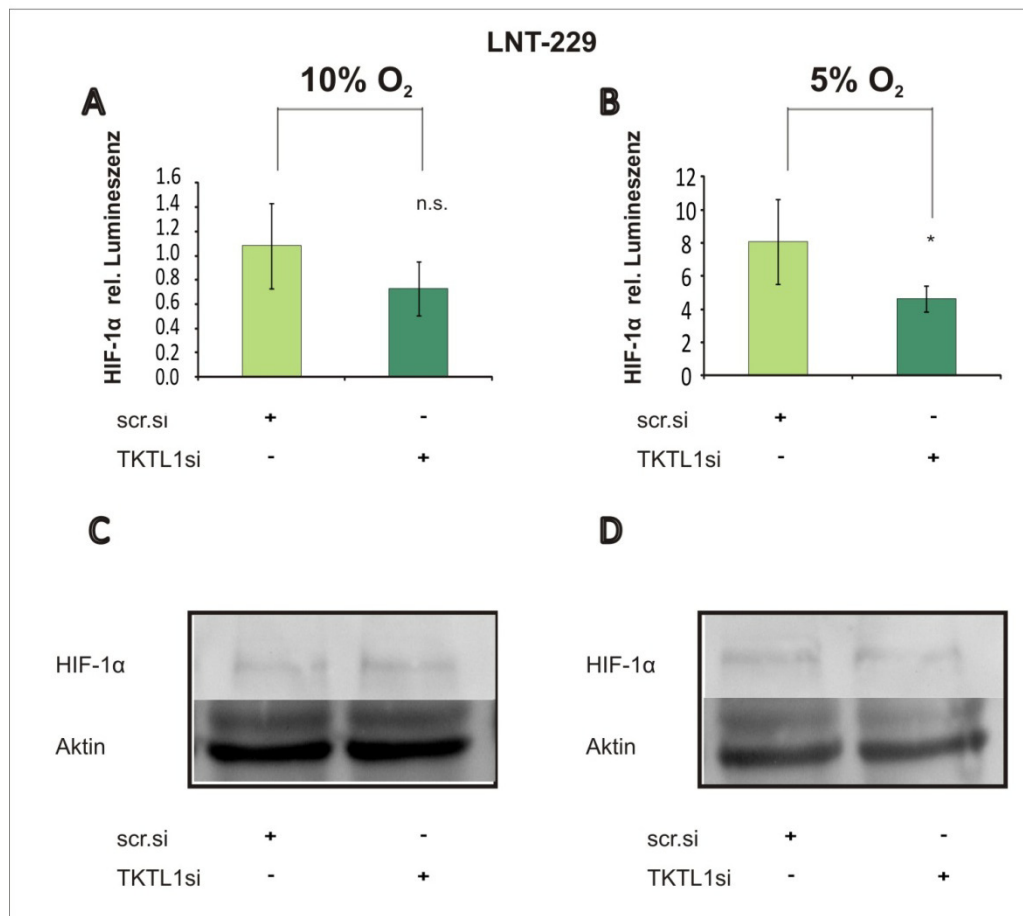


Abbildung 4-63: TKTL1-Abhängigkeit der HIF-1 α -Transaktivität unter moderater Hypoxie (10 und 5% O₂)

LNT-229-Zellen wurden ausgesät (10.000 Zellen/Well), und nach 24 h mit 150 ng HIF-1 α -Luziferase-Reporter und 20 ng pRL-CMV (Renilla) je Well transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit 20 nM scrambledsiRNA oder TKTL1siRNA1 transient mittels Hiperfect transfiziert, nach weiteren 16 h für weitere 8 h mit 2mM Glukose in SFM unter 10% (A) bzw. 5% (B) O₂ behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μ L Lysepuffer 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zelllysate in eine 96-Well-Luminometerplatte überführt und die p53-Luziferase-Reporter-Aktivität wurde mittels eines Luminometers ermittelt und auf die jeweiligen pRL-CMV (Renilla) normiert.

Repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Versuchen. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant angesehen.

Unter denselben Bedingungen wie der Reporter wurde HIF-1 α auf Proteinniveau mittels WB nachgewiesen (C und D).

4.5.4.12 HIF-1 α reguliert TKTL1 unter Normoxie und moderater Hypoxie

Da in 4.4.4.3 gezeigt werden konnte, dass HIF-1 α die TIGAR-Expression unter normoxischen Bedingungen regulieren kann, wurde überprüft, ob auch TKTL1 über HIF-1 α unter diesen Bedingungen regulierbar ist und somit die Atmung beeinflusst. Hierfür wurden LN229-Zellen, die stabil mit HIF-1 α sh bzw. mit dem Kontrollvektor SIMA transfiziert wurden unter 21%, 5% bzw. 1% O₂ für 24 h mit VM behandelt. Anschließend wurde die Expression von TKTL1

mittels QRT-PCR überprüft und auf SDHA normiert (**3.3.2**). Es konnte eine Korrelation zwischen HIF-1 α - und TKTL1-Expression hergestellt werden: Eine Überexpression von HIF-1 α führte unter allen untersuchten Sauerstoffkonzentrationen zu einer Expressionssteigerung von TKTL1: unter 21% O₂ konnte eine Expressionssteigerung von TIGAR um 95% beobachtet werden (**Abbildung 4-64 A**), unter 5% O₂ um 95% (**Abbildung 4-64 B**) und unter 1% O₂ um 100% (**Abbildung 4-64 C**). Eine HIF-1 α -Suppression vermochte es nur unter 21% O₂ die TKTL1-Expression signifikant zu beeinflussen (-70%) (**Abbildung 4-64 D**). Da HIF-1 α *in vivo* unter Hypoxie stark und akkut aktiviert wird, könnte es sein, dass TKTL1 in dem Überexpressionsmodell durch HIF-1 α unter 5 und 1% O₂ reguliert wird. Unter stärkeren Sauerstoffmangelbedingungen konnte kein Unterschied in der TKTL1-Expression beobachtet werden (**Abbildung 4-64 E und F**).

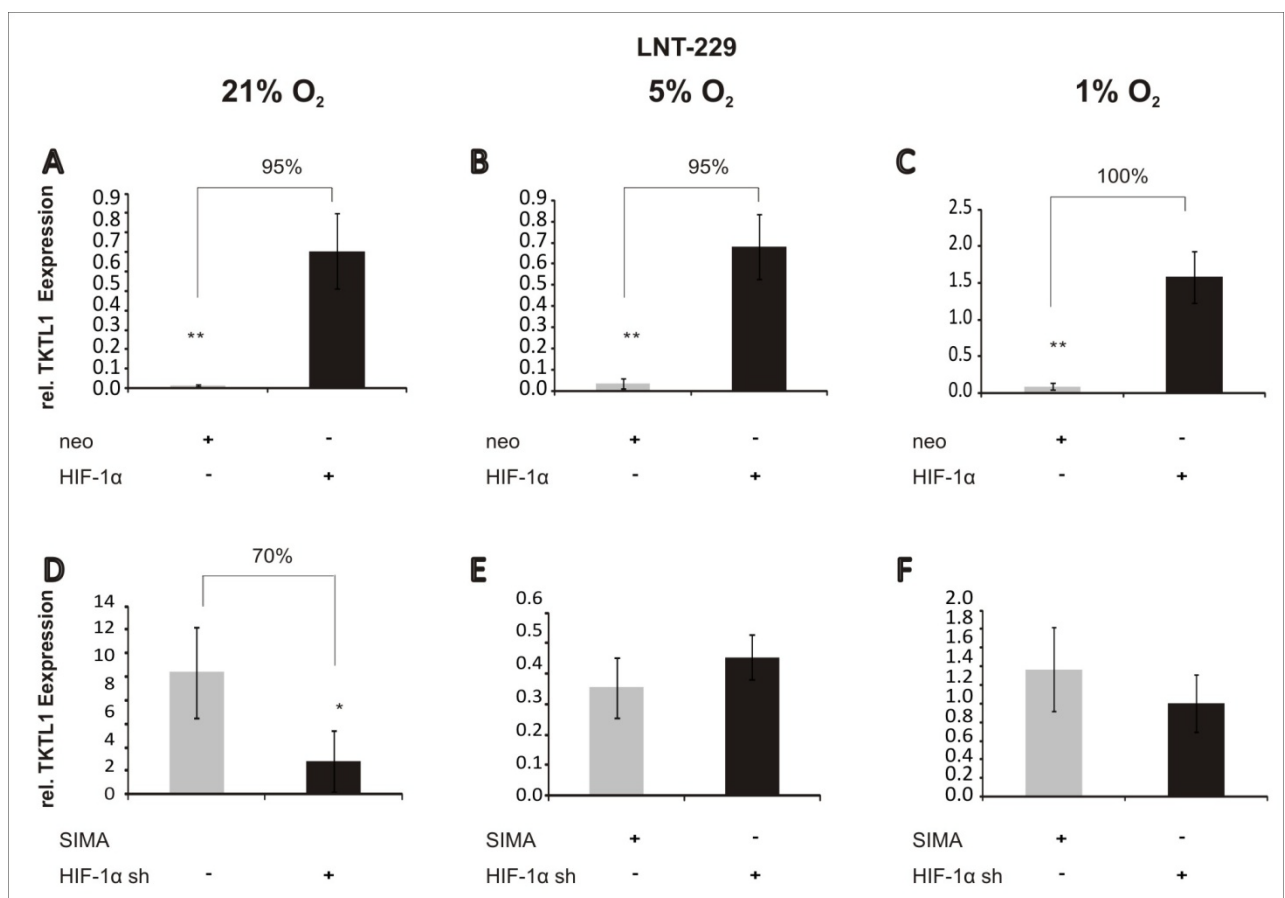


Abbildung 4-64: HIF-1 α -Regulierung der TKTL1-Expression unter normoxischen und moderaten Hypoxiebedingungen

Die TKTL1-Expression wurde in folgenden Zellen überprüft und auf SDHA normiert: LN-229-SIMA und -HIF-1 α Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit VM und 21% (A), 5% (B) oder 1% O₂ (C) für 24 h behandelt. LNT-229-Zellen, die transient mit pcDNA3/pcDNA3-HIF-1 α transfiziert wurden in 6-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit VM und 21% (D), 5% (E) oder 1% O₂ (F) für 24 h behandelt. n=3, p-Werte wurden über einen two-tailed Student's t-Test ermittelt und p-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant, p < 0.01 (**) als hoch signifikant angesehen.

5 Diskussion

Tumorzellen sind ständig schwankenden Sauerstoff- und/oder Nährstoffbedingungen unterworfen: Sublethale Hypoxie kommt wiederholt in Tumoren vor, hervorgerufen durch abnormale Strukturen und Funktionen der Mikrogefäße, die den Tumor mit Nährstoffen versorgen (60). Studien zeigten sowohl in murinen- als auch in menschlichen Tumoren eine große Anzahl an hypoxischen oder gar anoxischen Bereichen. Messungen des intratumoralen pO_2 ergaben typischerweise Werte zwischen 2 und 12 mmHg ($\sim 0.3\%$ - $\sim 2\%$ O_2) (294-296). Auch ist bekannt, dass intravaskuläre Thrombosen häufig in Glioblastom-Gewebe zu beobachten sind. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass in Gliomen diese intravaskuläre Thrombosen zu vaso-okklusiven Mechanismen führen, welche eine plötzliche Sauerstoff- und Nährstoff-Depletion hervorrufen (297, 298). Diese Bedingungen beeinflussen u.a. den Metabolismus und können einen starken selektionsdruck ausüben.

In den letzten Jahren mehrten sich die Erkenntnisse, dass p53 nicht nur proliferative und zellerhaltene Prozesse steuert, sondern auch in den Metabolismus der Zelle eingreift (33, 35, 37-39). So wurde zunächst *Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2* (SCO2), ein in der Atmungskette verankertes Enzym, das für den Kupfereinbau in die mitochondrialen COX II Untereinheiten des COX-Komplex zuständig ist, als p53-Zielgen identifiziert. In $p53^{wt-defizient}$ -Zellen wird SCO2 herunterreguliert, wodurch die Atmungskette inhibiert wird. Die Zellen sind deshalb verstärkt auf Glykolyse angewiesen (39). Weiterhin wurde *Tp53 Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator* (TIGAR) als Glykolyse-Hemmer und Pentosephosphat-Weg-Aktivator beschrieben (33). Durch TIGAR wird eine verstärkte NADPH-Produktion induziert und somit die Konzentrationen an intrazellulären ROS gesenkt. Zusätzlich spielt HIF-1 α , das mit p53 interagiert (28, 30, 273, 299) und unter Hypoxie stabilisiert wird, eine wichtige Rolle im Energie-Stoffwechsel der Tumorzelle (69, 102, 176, 300-302).

Da es bis heute keine metabolischen Untersuchungen über p53 unter Nährstoff- und Sauerstoffmangel in Gliomen gibt und über die genauen Bedingungen, unter denen p53 in Gliomen reguliert werden, wenig bekannt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die p53-Regulation unter Hypoxie und Glukosemangel (5.1) und die Auswirkungen einer p53-Deletion (5.2) unter diesen Bedingungen näher charakterisiert. Zusätzlich wurden die Funktionen der metabolischen p53-Zielgene SCO2 (5.3) und TIGAR (5.4) in Bezug auf Tumormikromilieu untersucht. Ferner wurde der Zusammenhang zwischen TIGAR und der *Transketolase-Like-1* (TKTL1), einem in vielen Tumoren überexprimierten Isoenzym des PPP-Enzyms Transketolase, untersucht (5.5). Die Relevanz dieser Arbeit für die Therapie maligner Gliome werden in 5.6 diskutiert.

5.1 p53-Regulation unter Nährstoff- und Sauerstoffmangel in Gliomzellen

Die Transaktivität von p53 unter Hypoxie wurde in einigen Veröffentlichungen diskutiert, bleibt allerdings aufgrund der Inkonsistenz der erzielten Ergebnisse kontrovers: So berichteten Zhao et al. 2009, dass p53 unter Hypoxie die Transaktivität vieler Genen vermindert oder gar hemmt (303), während Liu et al. 2007 durch cDNA Mikroarray-Analysen demonstrierten, dass p53 unter Hypoxie nur sehr wenige Gene reguliert, diese wenigen dafür aber sehr stark induziert (*DNA damage-inducible transcript 3 (DDIT3)*, *SEL1L* und die E3-Ubiquitin-Protein Ligase *SMURF1*) (304). In Gliomen ist die Transaktivität von p53 unter Bedingungen des Tumormikromilieus noch weitgehend unerforscht. Um die Regulation und die metabolischen Funktionen von p53 im Tumor-Metabolismus in Gliomzellen zu untersuchen, wurden zunächst *in vitro*-Modelle entworfen, die sowohl Nährstoffmangel als auch akute und chronische Hypoxie abbilden (Glukosedepletion, 0,1%-21% O₂).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst unter Nährstoff- und Sauerstoffmangel die p53-Transaktivität gemessen. In p53^{wt}-Zellen war unter unterschiedlichen Glukose- und Sauerstoffkonzentrationen kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression- und der Transaktivität von p53 zu erkennen (**Abbildung 4-3**). Dies schließt jedoch eine relevante Modulation p53-abhängiger Prozesse nicht aus, da p53 auch u.a. post-translational reguliert wird. So ist bekannt, dass Ser-15 in p53 unter Stressbedingungen phosphoryliert wird und u.a. p21WAF/CIP1 aktiviert (215, 305). Über diesen Faktor kann anschließend der Zellzyklusarrest eingeleitet werden (306, 307). Es wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass eine Induktion von Sauerstoff- und Nährstoffmangel die Phosphorylierung an Ser-15 in p53 mit der Zeit unter Hypoxie immer mehr verstärkt (**Abbildung 4-4 A**). Folglich können p53^{wt}-Zellen unter diesen Bedingungen Zellzyklus-Arrest induzieren, während p53^{wt-defizient}-Zellen weiterhin proliferieren können (**Abbildung 4-9**).

Seit einigen Jahren findet eine kontroverse Diskussion über mögliche Regulationsmechanismen von p53 unter Hypoxie statt, die zur Stabilität von p53 bzw. zu seinem Abbau führen und somit Einfluß auf seine Zielgene haben. So wurde u.a. beschrieben, dass unter Hypoxie HIF-1 α die Expression von MDM2 vermindert. MDM2 fungiert als E3-Ubiquitin-Ligase und fördert den Abbau von p53 (299). Der MDM2-gesteuerte Abbau von p53 wird über HIF-1 α gehemmt, sodass p53 den Zellzyklus arretieren und auftretende DNA-Schäden reparieren kann (308, 309). Zusätzlich entstehen unter Stressbedingungen, z.B. in der Hypoxie, durch den Abbruch der Atmungskettenreaktionen auch vermehrt ROS (199, 200). Diese können p53 ebenfalls aktivieren, so dass die Stabilisierung von p53 in der Hypoxie nicht nur HIF-1 α -gekoppelt ist (258, 310). Darüber hinaus beschreiben einige Autoren eine direkte Konkurrenz zwischen p53 und HIF1- α um den Kofaktor p300 unter Hypoxie (311-313): Unter Hypoxie wird HIF-1 α stabilisiert, so dass eine Translokation von HIF-1 α in den Zellkern stattfinden kann. Dort komplexiert HIF-1 α mit

der HIF-1 β -Untereinheit und dem Faktor p300/CPB. Dieser Komplex bindet an *Hypoxia-Responsive Elements* (HRE) auf der DNA und steigert das Ablesen von Zielgenen, die für die Anpassung der Zelle an eine mangelnde Sauerstoffversorgung erforderlich sind (101, 104-106). Parallel hierzu bindet aber auch p53 unter hypoxischen Bedingungen an p300 (28), und hemmt somit die HIF-1 α -Transaktivität. Diese Dichotomie zwischen p53 und HIF-1 α konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden: p53^{wt-defizient}-Zellen wiesen in der Hypoxie eine viel höhere HIF-1 α -Transaktivität auf als p53^{wt}-Zellen (**Abbildung 4-5** und **Abbildung 4-6**), da wahrscheinlich der Kofaktor p300 zur freien Verfügung stand (311, 313).

Es ist zudem bekannt, dass p53 in manchen Systemen unter Stressbedingungen stabilisiert wird und zum Abbau von HIF-1 α führt (28, 302, 314), wahrscheinlich über MDM2 vermittelte Ubiquitinierung (299, 315). In der frühen Phase der Hypoxie kann p53 zunächst die Zellen schützen, indem z.B. das Wachstum eingeschränkt (**Abbildung 4-9**) und eine effiziente Energie-Homöostase gewährleistet wird (**Abbildung 4-10** und **Abbildung 4-11**). In dieser Zeit wurde die Transaktivität von HIF-1 α in der Zelle zunächst relativ niedrig gehalten (**Abbildung 4-6**). Diese Aktivität reicht dennoch aus, um Zielgene zu induzieren, die für eine bessere Nährstoffaufnahme, wie z.B. den Glukose-Transporter Glut1 (316, 317), oder für eine schnellere Nährstoffzufuhr über die Aktivierung von Glykolyseenzymen, wie z.B. die Aldolase A, die PGK1, die LDHA oder die Pyruvat Kinase M2 (177) sorgen können. Dies korrelierte auch mit einem erhöhten Glukoseverbrauch (**Abbildung 4-4 B**). Verlängerte sich der Sauerstoffmangel, so kehrte sich das Verhältnis zwischen p53- und HIF-1 α um: p53 wurde abgebaut und HIF-1 α verstärkt transkriptionsaktiv (**Abbildung 4-4** und **Abbildung 4-6**), wobei hier eher die Transkription von Genen, die in der Zellerhaltung eine Rolle spielen, aktiviert werden (142, 318-320). Erreichte der Stress-Stimulus eine gewisse Grenze, den sog. *point of no return*, so wurde schließlich der Zelltod eingeleitet (**Abbildung 4-4 D**).

5.2 Auswirkungen einer p53-Inaktivierung in Gliomzellen

In vielen Paradigmen steigert p53^{wt} die Sensibilität gegenüber Apoptose. So ist bekannt, dass p53^{wt} den TRAIL/Apo2L ((255, 256) und **Abbildung 4-2 A**) und den CD95/FasL- (248-254) und **Abbildung 4-2 B**) -abhängigen Zelltod verstärkt, während p53^{mt}-Zellen von einem gewissen Schutz profitieren. Unter Hypoxie ist die Rolle von p53^{wt} jedoch umstritten. Es werden hier sowohl protektive als auch Zelltod-fördernde Phänotypen beschrieben. So zeigten Graber et al. (259), dass Ras-transformierte Fibroblasten, die p53^{wt-defizient} sind, vor Hypoxie-induziertem Zelltod geschützt sind und *in vivo* einem Selektionsvorteil aufweisen. Diese Befunde in hoch artifiziellen Systemen konnten jedoch nicht erklären, warum in primären Glioblastome überwiegend p53^{wt} vorkommt (321). Wir haben deshalb vermutet, dass der Erhalt von p53^{wt} in Gliomen unter Mangelbedingungen für Tumorzellen von Vorteil sein könnte. So wurde zunächst untersucht, ob unter Nährstoff- und

Sauerstoffmangelbedingungen der auftretende Zelltod p53-abhängig ist. p53^{wt} vermochte Gliomzellen (und auch Kolonkarzinom-Zellen) vor Nährstoffmangel- und Hypoxie-induziertem Zelltod zu schützen: Eine p53-Deletion sensibilisierte die Zellen sowohl unter moderater (1% O₂) als auch hochgradiger Hypoxie (0,1% O₂) (**Abbildung 4-7**).

Es ist bekannt, dass p53 unter Stressbedingungen einen Zellzyklusarrest initiieren kann, welcher der Zelle erlaubt, die Proliferation einzustellen, bis wieder genügend Nährstoffe vorhanden oder Stressbedingungen überwunden sind (13, 26, 322). So wurde zunächst, um die gesteigerte Hypoxie-Sensibilität p53^{wt-defizient}-Zellen gegenüber p53^{wt}-Zellen zu erklären, auf eine verstärkte Wachstumsrate der p53^{wt-defizient}-Zellen und auf einen damit verbundenen stärkeren Nährstoffverbrauch geschlossen. Der beobachtete Wachstums-Unterschied zwischen p53^{wt}- und p53^{wt-defizient}-Zellen war allerdings in der moderaten Hypoxie bei allen untersuchten Zelllinien marginal und in der hochgradigen Hypoxie nur im Falle der LNT-229puro/p53sh-Zellen signifikant, so dass der beobachtete Phänotyp nicht nur auf ein verstärktes Wachstum und eine damit verbundene schnellere Nährstoffdepletion zurückzuführen war (**Abbildung 4-9**). Vielmehr wiesen p53^{wt-defizient}-Zellen qualitative Veränderungen im Metabolismus auf: i) der glykolytische Index war Sauerstoff-unabhängig erhöht, während er in p53^{wt}-Zellen nur unter hypoxischen Bedingungen zunahm (**Abbildung 4-10**). Wir schlossen daraus, dass p53 unter Normoxie und moderater Hypoxie vermehrt über die oxidative Phosphorylierung und weniger über die Glykolyse Energie-Gewinnung ermöglichen kann, und so zu einer effektiveren Ausnutzung der Ressourcen und zu einem Schutz vor durch moderate Hypoxie-ausgelösten Zelltod beiträgt. Zudem zeigten Sauerstoffverbrauch-Untersuchungen, dass ii) p53^{wt-defizient}-Zellen gegenüber Kontrollzellen eine um 15-20% verringerte Atmungsrate aufwiesen (**Abbildung 4-11**). Auf die Mechanismen und Effekte von p53 unter moderater Hypoxie wird in **5.3** detailliert eingegangen.

Auch unter hochgradiger Hypoxie war ein p53-vermittelter Schutz vor Zelltod zu beobachten. Da hierbei der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion in p53^{wt}-Zellen geringer ausfielen als in p53^{wt-defizient}-Zellen (**Abbildung 4-10**), wurde die Hypothese aufgestellt, dass p53 auch unter hochgradiger Hypoxie den Metabolismus beeinflussen kann. Dieser Hypothese wird in **5.4** nachgegangen.

5.3 SCO2 schützt p53^{wt}-Zellen unter moderater Hypoxie

Matoba et al. konnten 2006 in Kolonkarzinom-Zellen zeigen, dass p53^{wt-defizient}-Zellen im Vergleich zu p53^{wt}-Zellen eine geringere Atmungsrate aufweisen. Sie entdeckten das dafür verantwortliche Protein SCO2, einen metabolischen Effektor von p53 (39). SCO2 agiert dabei als ein Kupfer-Chaperon, das Kupfer zu der Cytochrom c Oxidase-Untereinheit COX II transportiert (231, 232, 280, 323). SCO2 war daher ein Kandidatenmolekül als Effektor der p53-abhängigen Cytoprotektion unter Hypoxie. Die Funktionen von SCO2 für Glykolyse und

Sauerstoffverbrauch wurden zunächst durch transiente Überexpression oder Gensuppression in p53^{wt}- oder p53^{wt-defizient}-Zellen charakterisiert (5.3.1). Da durch Hemmung der Atmungskette ROS entstehen und diese oxidative Schäden verursachen, die letztlich zum Zelltod führen können, wurde SCO2 auch im Hinblick auf seine mögliche Rolle in der ROS-Prevention untersucht (5.3.2).

5.3.1 p53 und HIF-1 α regulieren die Atmung über SCO2

Bis heute gibt es nur eine Veröffentlichung, in der ein Zusammenhang zwischen p53 und SCO2 (in den Kolonkarzinom-Zelllinien HCT116, SW480 und DLD1) beschrieben wird (39). So wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst überprüft, ob in den verwendeten Gliomzellen SCO2 exprimiert wird und ob eine Regulation über p53 stattfindet. Eine *in silico*-Analyse an drei großen Datensätzen mit Expressionsprofilen von malignen Gliomen (Sun et al., 2006, TCGA 2009, Philips et al. 2006) mittels der Oncomine-Datenbank ergab eine regelhafte, jedoch erheblich variierende Expression von SCO2-mRNA. Die Analyse der Rembrandt-Datenbank ergab bei der Analyse der Datensätze von 343 Gliomen darüber hinaus eine Korrelation von SCO2-Expression mit ungünstigem Verlauf (6.6.1).

Es zeigte sich weiterhin, dass auch in den in dieser Arbeit untersuchten Gliomzellen die p53-Expression positiv mit einer SCO2-Expression korrelierte. Eine Expression von SCO2 war dennoch auch in p53^{wt-defizient}-Zellen zu erkennen, so dass vermutet wurde, dass SCO2 nicht ausschließlich über p53 reguliert wird (**Abbildung 4-12**). Dies stimmte mit den Ergebnissen von Matoba et al. überein: In p53^{wt-defizient}-Zellen konnte ebenfalls eine Restexpression von SCO2 beobachtet werden (39). Bis heute waren noch keine weiteren Regulatoren von SCO2 bekannt. Eine Überprüfung der SCO2-Expression unter Normoxie und moderater Hypoxie ergab, dass SCO2 unter moderater Hypoxie p53-abhängig stark induziert wird (**Abbildung 4-13**). Dies stand etwas in Widerspruch zu den in **Abbildung 4-4** beobachteten Ergebnissen: p53 zeigte unter diesen Bedingungen keine veränderte Transaktivität. Es ist aber beschrieben, dass p53 je nach Bedingungen, Stresstärke bzw. Stressart bestimmte Zielgene differentiell aktiviert (76, 304, 314, 324, 325). p53 kann somit in der Hypoxie andere Zielgene als unter Normoxie aktivieren, insgesamt bleibt aber die Transaktivitätsfähigkeit in Reporter-Untersuchungen in etwa gleich (82, 266, 267). Zudem sollte erwähnt werden, dass bis jetzt noch keine putativen p53-Bindesequenzen am SCO2-Promotor gefunden wurden. SCO2 wurde bis jetzt nur mittels SAGE-Analyse charakterisiert, indem in HCT116p53^{+/+} und p53^{-/-}-Zellen p53-induzierbare Gene ermittelt wurden (39, 326). Der in dieser Arbeit verwendete p53-Luc-Reporter trägt eine bestimmte Sequenz eines Enhancer Elements (TGCCTGGACTTGCTGG₁₄), die in den meisten Promotoren von p53-Zielgenen zu finden ist. Es könnte dennoch sein, dass SCO2 nicht zu diesen Genen gehört und dementsprechend keine Aktivierung auf Reporter-Ebene nachzuweisen ist.

Nicht außer Acht zu lassen ist ebenfalls die Rolle der vielfältigen post-transkriptionalen Modifizierungen von p53 (z.B. Acetylierung (327), Phosphorylierung (328), Methylierung (324), etc.), aber auch von Kofaktoren (313, 329), die eine Rolle in der (direkten oder indirekten) Aktivierung von Genen spielen. Es erschien aber unwahrscheinlich, dass p53 alleine für die starke Induktion der SCO2-Expression verantwortlich ist, da auch in p53^{wt-defizient}-Zellen unter moderaten hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Expression von SCO2 zu beobachten war (**Abbildung 4-13**). Es wurde daher spekuliert, dass ein zusätzlicher, bisher unbekannter Faktor für diese p53-vermittelte Induktion der SCO2-Expression unter moderater Hypoxie benötigt wird. Als Kandidat hierfür wurde HIF-1 α vermutet, und es konnte nachgewiesen werden, dass HIF-1 α in Anwesenheit von p53 die Expression von SCO2 reguliert (**Abbildung 4-23**). Zunächst erscheint es paradox, dass HIF-1 α SCO2 und somit vielleicht auch die Zellatmung positiv regulieren kann, da es bekannt ist, dass HIF-1 α den Eintritt in die Atmungskette blockiert, indem es z.B. die Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 (PDK-1) transaktiviert (71, 178) und somit die Glykolyse einschaltet. Fukuda et al. (176) konnten 2007 jedoch eine neue Rolle von HIF-1 α in der Aufrechterhaltung von Atmungsprozessen zeigen: Unter reduzierten Sauerstoff-Konzentrationen (1-10% O₂) steuert HIF-1 α die Expression von Atmungskette-Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase 4, indem einerseits unter Hypoxie die Expression der effizienten Untereinheit Cox4-2 intensiviert wird und andererseits die Expression der Lon-Protease verstärkt wird. Diese Protease vermittelt unter Hypoxie (10-1% O₂) den Abbau der weniger effizienten Untereinheit Cox4-1. Zusammen ermöglichen diese Vorgänge einen effizienteren Elektronentransport in der Atmungskette (176). Allerdings kann Lon noch andere Funktionen erfüllen: So kann Lon noch eine Rolle im direkten Abbau oxidierter mitochondrialer Proteine übernehmen (226, 283, 330, 331). Es wird vermutet, dass HIF-1 α nicht nur zur Energiegewinnung die Atmungskette reguliert, sondern um hohe intrazelluläre ROS-Konzentrationen zu vermeiden, die durch einen Kettenabbruch unter hypoxischen Bedingungen (176) bzw. durch zu hohe intrazelluläre Sauerstoff-Konzentrationen (174) entstehen würden. Je effizienter schon begonnene Atmungsreaktionen zu Ende geführt werden können, bzw. je eher der Sauerstoff, der schon aufgenommen wurde und noch in der Zelle vorhanden ist, inaktiviert werden kann, indem er über die Atmungskette zu Wasser reduziert wird, desto weniger entstehen hohe intrazelluläre ROS-Konzentrationen und folglich weniger Protein- und DNA-Schäden bzw. Lipidperoxidation. Gleichzeitig steigt gegenüber der Glykolyse die Energieschöpfung, da in der oxidativen Phosphorylierung 38 ATP pro Molekül Glukose (2 ATP durch die Glykolyse und 36 durch die Atmungsreaktionen) gegen 2 ATP in der Glykolyse gewonnen werden. Unter Nährstoffmangel kann daher schon eine geringe Aktivität der oxidativen Phosphorylierung einen relevanten Beitrag zum Überleben dieser Zellen

ermöglichen. So könnte HIF-1 α nicht nur über Lon sondern auch über SCO2 Atmungsprozesse steuern und die Energie-Homöostase der Zelle garantieren.

Weiterhin konnte ein Unterschied in der HIF-1 α -Regulierung der SCO2- und Lon-Expression beobachtet werden: So wurde SCO2 Sauerstoff-unabhängig (1-5% O₂) über p53 und HIF-1 α reguliert, Lon dagegen nur bei einer bestimmten Sauerstoffmenge (5% O₂) (**Abbildung 4-22** und **Abbildung 4-23**). Fukuda et al. beschrieben hingegen eine Lon-Regulierung bei 1% O₂ in Nieren- und Cervixkarzinomen, sowie in Leber-, Lunge- und Herzgewebe von Mäusen, die mit 10% O₂ behandelt wurden (176). Dies spricht dafür, dass Lon Zelllinien- oder Gewebespezifisch durch Sauerstoff reguliert wird (wie schon zuvor beschriebene HIF-1 α -Gene (332)). p53 und HIF-1 α regulieren die Expression von SCO2 und Lon, sorgen damit für die Stabilität von Atmungskettenreaktionen und steuern somit eine adaptive Antwort, die die COX-Aktivität unter unterschiedlich starken hypoxischen Bedingungen optimiert. Zugleich werden über Lon und SCO2 antioxidative Vorgänge reguliert. Auf eine protektive SCO2-Funktion in der ROS-Abwehr wird in **5.3.2** eingegangen. Nähere Studien zur Regulierung und Interaktionen von p53, HIF-1 α , SCO2 und Lon sind nötig, um die adaptiven Mechanismen bzw. die metabolischen Antworten von Tumorzellen auf Hypoxie weiter zu charakterisieren.

Da gezeigt werden konnte, dass SCO2 ein p53-Zielgen ist und unter moderater Hypoxie (1% O₂) induziert wird, wurde vermutet, dass die Restoration von SCO2 in p53^{wt-defizient}-Zellen den p53-vermittelten Schutz unter moderater Hypoxie wiederherstellen kann. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine solche Restoration eine verstärkte zelluläre Respiration erlaubte (**Abbildung 4-15**) und zu einem geringeren glykolytischen Index (**Abbildung 4-17**) und somit zu einer Verschiebung des Metabolismus in Richtung oxidative Phosphorylierung führte. SCO2^{-/-}-Zellen sind unter moderater Hypoxie vermehrt auf die Glykolyse angewiesen (174), was den etwas höheren Glukoseverbrauch unter moderater Hypoxie in p53^{wt-defizient}-Zellen erklären könnte (**Abbildung 4-10**). Die Restoration von SCO2 in p53^{wt-defizient}-Zellen konnte entsprechend die Zelltod-Sensibilität von p53^{wt-defizient}-Zellen gegenüber moderaten hypoxischen Bedingungen verringern (**Abbildung 4-18**), und somit eine Angleichung an den metabolischen p53-Phänotyp ermöglichen. Dies könnte auf eine bessere Effizienz der mitochondrialen Atmung im Vergleich zur Glykolyse zurückzuführen sein. Hingegen konnte die SCO2-Expression in p53^{wt-defizient}-Zellen nicht vor durch hochgradige Hypoxie-induziertem Zelltod (0,1% O₂) schützen, was darauf hinweist, dass SCO2 nur unter Bedingungen zu schützen vermag, in denen noch ausreichend Sauerstoff vorhanden ist. Der SCO2-vermittelte Schutz gegenüber moderate Hypoxie-induziertem Zelltod war dabei von der SCO2-Funktion in der mitochondrialen Atmungskette abhängig und erforderte eine intakte oxidative Phosphorylierung: So kehrte eine Behandlung der Zellen mit Rotenone, einem Inhibitor des

Komplexes I in der Atmungskette, den SCO2-vermittelten Schutz vor Hypoxie-induziertem Zelltod um (**Abbildung 4-20**).

5.3.2 SCO2 schützt Gliomzellen vor moderater Hypoxie

Es ist bekannt, dass es unter Hypoxie (182, 187-189) oder bei Hemmung der Atmungskette (190-193) zu erhöhten intrazellulären ROS-Konzentrationen kommt, überwiegend bedingt durch die Freisetzung von Radikalen bei Abbruch der Atmungsreaktionen (194-196). So hat die Hemmung der mitochondrialen Komplexe II (192) und III (197), aber auch des Cytochroms c (198) eine ROS-Konzentrationssteigerung in der Zelle zur Folge. Es wurde vermutet, dass auch SCO2 ROS-Konzentrationen reduzieren könnte. SCO2 agiert als Kupfer-Chaperon, das Kupfer zur Cytochrom c Oxidase-Untereinheit COX II transportiert (232, 280, 323). Fehlt SCO2, kann kein Kupfer mehr in die Atmungskette eingebaut werden, die ablaufenden Reaktionen werden abgebrochen und dadurch entstehende Sauerstoffradikale werden in das Cytoplasma entlassen. Sung et al. 2010 konnten über eine SCO2-Suppression in Kolonkarzinom-Zellen zeigen, dass SCO2 in der ROS-Prevention eine Rolle spielt (174). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine SCO2-Restoration in p53^{wt-defizient}-Zellen die ROS-Konzentrationen in der Zelle vermindert und somit, zusätzlich zur SCO2-bedingten Atmungsinduktion, mittels ROS-Prevention zum Schutz unter moderater Hypoxie beitragen kann (**Abbildung 4-19 A und B**). Zusätzlich führt eine SCO2-Suppression zur Erhöhung der intrazellulären ROS (**Abbildung 4-19 C**) und Sauerstoffkonzentration (176). Es wurde vermutet, dass der aufgenommene Sauerstoff nicht mehr über die Atmungskette verarbeitet werden kann, und zu einer Erhöhung der ROS-Konzentrationen in der Zelle beiträgt, wahrscheinlich aufgrund der Hemmung von cytoplasmatischen Oxidoreduktasen (176).

Weiterhin ist bekannt, dass SCO2 eine strukturelle Similarität mit den Thioredoxin-Reduktasen aufweist (175). Diese Enzyme vermögen es, die Konzentrationen an intrazellulären ROS durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. Ascorbat- und Ubichinon-Regenerierung, abzusenken (s. **1.3.5**). Da trotz Atmungsketten-Inhibition mittels Rotenone mehr SCO2-supprimierte Zellen unter moderater Hypoxie sterben als SCO2^{wt}-Zellen (**Abbildung 4-20**), könnte es folglich sein, dass SCO2 nicht nur über die Aufrechterhaltung der Reaktionen der Atmungskette, sondern auch über eine direkte Thioredoxin-Reduktase-Funktion ROS-abbauend wirkt. HIF-1 α könnte so mit Hilfe von p53 die Expression von SCO2 regulieren, um i) eine effizientere Ausnutzung des Sauerstoffs in der Tumorumgebung und einen ausgeglichenen Energiehaushalt zu gewährleisten, ii) möglichst effizient die schon stattfindenden Reaktionen in der Atmungskette unter moderater Hypoxie so zu beschleunigen, dass weniger Radikale in das Cytoplasma freigesetzt werden können, (iii) den intrazellulären Sauerstoff effektiv abzubauen und somit auch eine Zunahme an ROS zu

verhindern, und (iv) aktiv über eine Thioredoxin-Reduktasen-Funktion ROS abbauend wirken. Ein Modell der Auswirkungen einer p53- oder SCO2-Depletion wird in **Abbildung 5-1** vorgestellt.

Es wird vermutet, dass Mutationen, die zu einer defekten mitochondrialen Atmung führen, die Zellen zwingen, Glykolyse zur Energiegewinnung zu betreiben (Warburg-Effekt), was mit einer geringeren ROS-Generierung einhergeht (333), aber eine geringere Effizienz gegenüber schwankenden Sauerstoffbedingungen bedingt. Die Expression von SCO2 könnte diesen Effekt umkehren. Da ein *SCO2-rescue* die Zellen nur unter moderater Hypoxie zu schützen vermochte und nicht unter hochgradiger Hypoxie, kann der beobachtete Schutz von p53^{wt}-Zellen gegenüber p53^{wt-defizient}-Zellen unter 0,1% O₂ nicht SCO2-abhängig sein. Die Vermutung lag nahe, dass andere metabolische p53-Zielgene dafür verantwortlich sein könnten. Auf diese wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

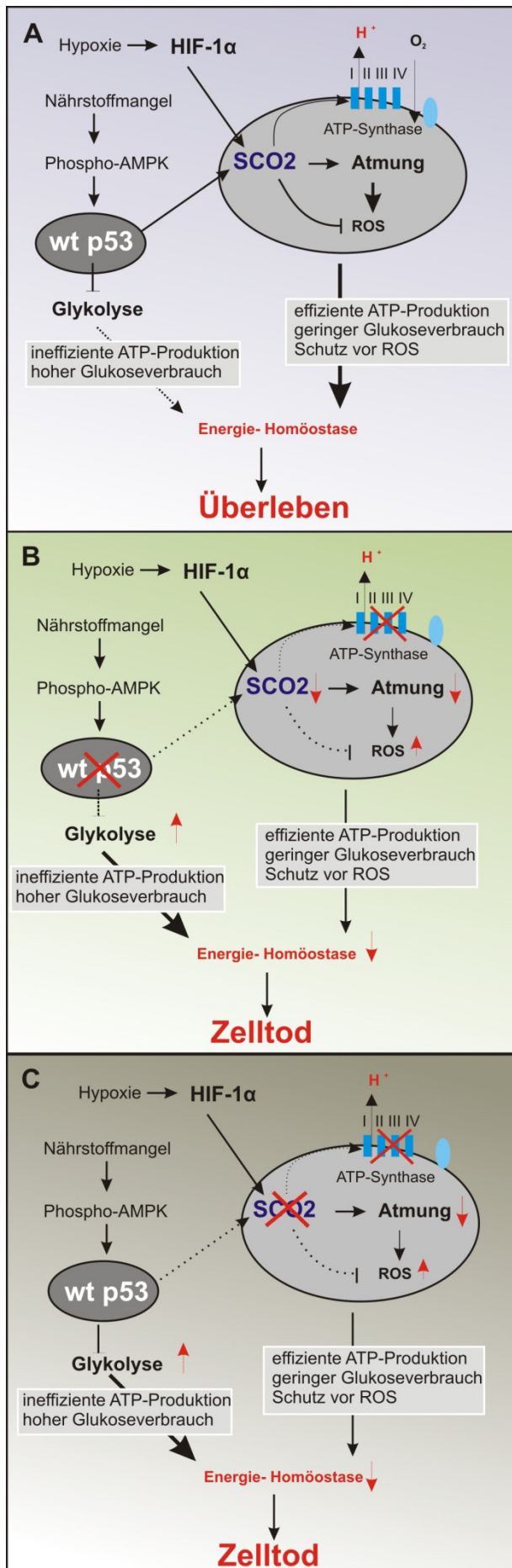


Abbildung 5-1 Funktionen von SCO2

In Tumorzellen kommt es häufig zu Nährstoffmangel und Hypoxie. Der Nährstoffmangel wird über die AMPK registriert, diese wird über das AMP/ATP-Verhältnis aktiviert. Dies führt zur Aktivierung von p53 (A). Dadurch wird die Glykolyse gehemmt. Gleichzeitig wird die Atmung über SCO2 gesteigert, was unter moderater Hypoxie zu einem Überlebensvorteil der Zellen führt. SCO2 wirkt aber auch der Entstehung von ROS entgegen, vermutlich über eine Thioredoxin-Funktion (175).

Fehlt p53 (B) findet eine weniger effiziente ATP-Produktion statt, da einerseits die Nährstoffe über verstärkte Glykolyse-Reaktionen schnell verbraucht werden, und andererseits die Atmungsketten-Reaktionen aufgrund des Fehlens von SCO2 abgebrochen werden. Dadurch steigen die intrazellulären ROS-Konzentrationen an, es entstehen Zellschäden. Beide Faktoren (Nährstoffdepletion und ROS) lösen letztendlich Zelltod aus.

Fehlt SCO2 (C), findet Atmung wie bei einer p53-Depletion nur noch sehr begrenzt statt. Durch den Abbruch der Atmungsreaktionen und durch hohe intrazelluläre O₂-Konzentrationen - der schon aufgenommene Sauerstoff kann nicht verbraucht werden - entstehen vermehrt ROS, diese lösen Zellschäden aus. Gleichzeitig wird die Glykolyse aktiviert. Es wird vermutet, dass dies kompensatorisch als Reaktion auf den durch Wegfall der mitochondrialen ATP-Produktion entstehenden Energiemangel geschieht. Die zugrundeliegenden Signalkaskaden sind noch unbekannt.

5.4 TIGAR: ein vielseitiges p53-Zielgen

TIGAR (*Tp53 Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*) wurde 2006 als p53-Zielgen entdeckt und spielt in Glykolyse-Hemmung und ROS-Schutz unter hypoxischen Bedingungen eine Rolle (33). Folglich wurde spekuliert, ob TIGAR für den p53-vermittelten Schutz unter hochgradiger Hypoxie (0,1% O₂) verantwortlich ist. In **5.4.1** werden zunächst die Funktionen von TIGAR unter Hypoxie erläutert. Da TIGAR die Glykolyse unter Normoxie hemmt, wurde vermutet, dass TIGAR^{wt}-Zellen über einen alternativen Weg Energiegewinnung einleiten können. Es wurde daher überprüft, ob TIGAR die mitochondriale Atmung als alternativen Weg aktivieren kann und somit auch unter Normoxie den Zellen einen Selektionsvorteil verschaffen kann (**5.4.2**).

5.4.1 TIGAR vermittelt Tumorzellen einen Schutz gegenüber Nährstoffmangel- und Hypoxie-induziertem Zelltod

TIGAR kann die Fruktose-2,6-Bisphosphat-Konzentration in der Zelle absenken und somit die Glykolyse blockieren und über die Aktivierung des Pentosephosphat-Weges und eine damit verbundene verstärkte Produktion der Reduktionsäquivalenten (NADPH) die Konzentrationen an intrazellulären ROS senken (33). Die Funktionen von TIGAR korrelieren mit der Fähigkeit, Zellen vor ROS- und metabolischen Stress-induzierter Autophagie und Apoptose zu schützen (35). So könnte TIGAR unter Stress das Überleben der Zelle über eine Hemmung der Glykolyse durch eine Verlangsamung der Nährstoffdepletion bewirken und zugleich über seine ROS-abbauende Funktion Zell- und DNA-Schäden verhindern. Diese Daten beruhen auf Untersuchungen in Osteosarcom (U2OS)- und hemapoetischen (FL5-12)-Zellen. Eine Expression von TIGAR konnte zusätzlich in Sarcom-, Kolonkarzinom-, Mammakarzinom- und Lungen-Zellen nachgewiesen werden (33). Daten zu Gliomen gibt es bis heute nicht. Eine *in silico*-Analyse mittels der Oncomine- und Rembrandt-Datenbanken ergab eine regelhafte, jedoch erheblich variierende Expression von TIGAR-mRNA, und eine Korrelation von TIGAR-Expression mit ungünstigem Verlauf (**6.6.2**). Die Überprüfung der TIGAR-Expression in Gliomzellen in dieser Arbeit ergab, dass TIGAR auch in Gliomzellen p53-abhängig exprimiert wird (**Abbildung 4-24**) und so für den beobachteten Schutz vor hochgradiger Hypoxie in p53^{wt}-Zellen verantwortlich sein könnte. Die Restoration von TIGAR in p53^{wt-defizient}-Zellen vermittelte tatsächlich einen Schutz gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod (**Abbildung 4-33**). Geringerer Glukoseverbrauch konnte aber hier nicht die Ursache sein, da diese Zellen etwa gleichviel Glukose verbrauchten wie p53^{wt-defizient}-Zellen. Die Restoration von TIGAR in p53^{wt-defizient}-Zellen veränderte auch die glykolytische Rate unter hypoxischen Bedingungen nicht, eine geringere glykolytische Rate konnte jedoch in p53^{wt}-TIGAR- vs. p53^{wt}-Zellen beobachtet werden (**Abbildung 4-27**). Entweder ist daher TIGAR nur in Anwesenheit von p53 in der Lage ist, die Glykolyse zu hemmen, oder es kommt in TIGAR-

überexprimierenden $p53^{\text{wt-defizient}}$ -Zellen auch zu einer Glykolyse-Hemmung, deren Effekt auf dem Glukose-Verbrauch aber durch eine Aktivierung des PPP maskiert bzw. kompensiert wird. Über diesen Weg werden anschließend NADPH der Zelle zur Verfügung gestellt und Metabolite (Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat) wieder in die Glykolyse geführt, so dass diese wieder aufgefüllt wird und es folglich auch in diesen Zellen zu einer erhöhten Laktatentstehung kommt. Dies würde für die Zelle bedeuten, dass bei etwa gleichbleibendem Glukoseverbrauch und gleichbleibender Laktatproduktion noch zusätzlich über eine erhöhte NADPH-Produktion ein Schutz gegenüber ROS ermöglicht wird (**Abbildung 5-2**). Um genaue Angaben zu erhalten, inwiefern und in welchem Umfang Ribosen produziert werden, und welchen Anteil Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat an der Verstärkung der Glykolyse beitragen, müssen noch weitere Untersuchungen stattfinden.

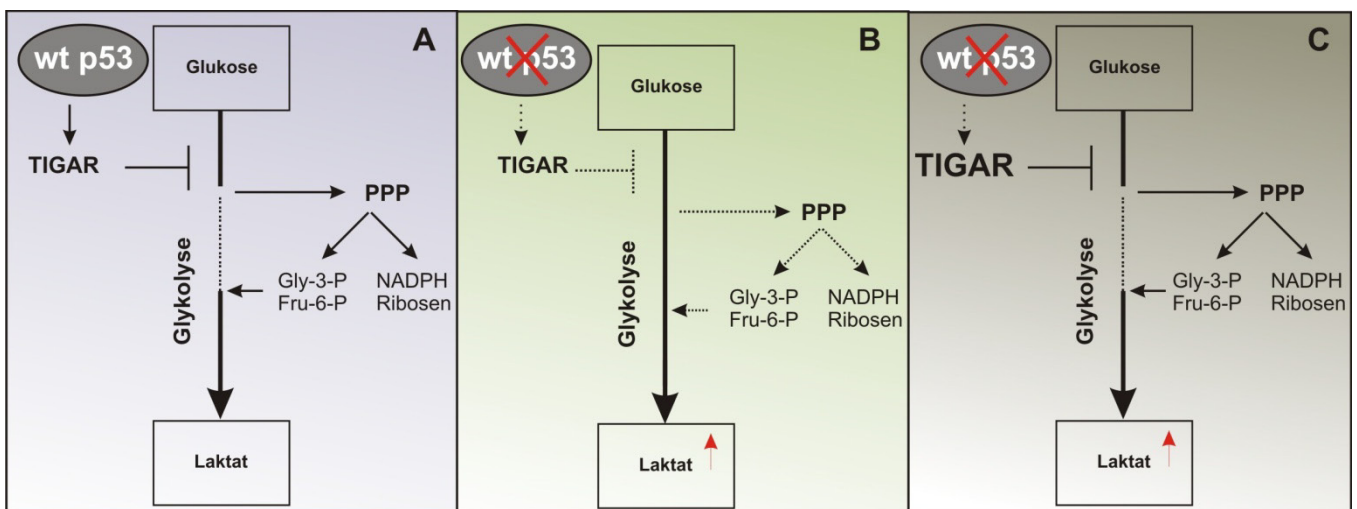


Abbildung 5-2 p53-abhängige Regulation des Metabolismus durch TIGAR

In $p53^{\text{wt}}$ -Zellen (**A**) kommt es zu einer Glykolyse-Hemmung auf dem Niveau der FBPase-2, wobei der PPP aktiviert wird. Über diesen Weg werden der Zelle NADPH (und eventuell Ribosen) zur Verfügung gestellt. Bestimmte Metabolite (Glycerinaldehyd-3-Phosphat (Gly-3-P) und Fruktose-6-Phosphat (Fru-6-P)) werden wieder der Glykolyse zugeführt. In $p53^{\text{wt-defizient}}$ -Zellen (**B**) wird wiederum nur die Glykolyse verstärkt, ohne den Pentose-Phosphat-Weg verstärkt zu induzieren. Dabei entsteht bei gleichem Glukosekonsum weniger NADPH (und eventuell Ribosen), die für die Bekämpfung von ROS (und die Proliferation) benötigt werden. In $p53^{\text{wt-defizient}}$ TIGAR-überexprimierenden-Zellen (**C**) kommt es wie in (**A**) zu einer Glykolyse-Hemmung und einem verstärkten PPP. Dabei werden auch Gly-3-P und Fru-6-P wieder der Glykolyse zugeführt.

Es wurde weiterhin vermutet, dass der beobachtete TIGAR-vermittelte Schutz vor Hypoxie nicht nur über eine effizientere Glukoseverwertung, sondern auch über die Antioxidans-Funktion von TIGAR vermittelt werden kann. Die Möglichkeit von p53, als Antioxidans-Aktivator (z.B. über TIGAR) zu fungieren, könnte einer der Mechanismen sein, über die p53 seine tumorsupprimierenden Funktionen ausüben kann. Dies scheint Gewebe- und zellspezifisch reguliert zu sein (21). Die Ermittlung der ROS-Konzentrationen mittels

H₂DCFDA-FACS unter hochgradiger Hypoxie ergab, dass die Expression von TIGAR in p53^{mt}-Zellen die Absenkung intrazellulärer ROS-Konzentrationen bewirkt (**Abbildung 4-35**). Auch bei Zugabe externer ROS (H₂O₂, Adriamycin) konnte TIGAR die intrazelluläre ROS-Menge reduzieren (**Abbildung 4-35** und **Abbildung 4-38**), bzw. vor ROS-induziertem Zelltod schützen (**Abbildung 4-34**).

Eine weitere Möglichkeit die Zellen vor Stress wie Hypoxie zu schützen könnte die Autophagie darstellen. Autophagie ist ein zellerhaltender Prozess, bei dem alte, unbrauchbare oder degenerierte Organellen in ihre Bestandteile abgebaut und wiederverwertet werden. Unter Stresssituationen, wie Nährstoff- (334, 335) oder Sauerstoffmangel (73), wird diese überlebenswichtige Funktion in der Zelle aktiviert. Wird sie allerdings zu stark betrieben, so führt sie zum Zelltod (25, 336). Einige Untersuchungen zeigen, dass p53 Autophagie aktivieren kann (23, 77, 337-339), wobei die genaue Regulation noch weitgehend unbekannt ist. Auch HIF-1 α kann in der Hypoxie oder vermittelt durch Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentrationen Autophagie beeinflussen, je nach Stärke des einwirkenden Stresses, z.T. über mitochondriale Prozesse (142, 340), oder über AMPK-Aktivierung und mTOR-Inhibierung (341). Neuere Untersuchungen ergaben, dass auch TIGAR Schutz vor Autophagie vermittelt und somit den Zelltod hinauszögert (35). Diese protektive Rolle scheint im Zusammenhang mit der Fähigkeit zu stehen, ROS zu mindern. Es ist wahrscheinlich, dass p53 über die Aktivierung von TIGAR das Zellüberleben solange begünstigt, dass moderate Schäden behoben werden können. In TIGAR^{wt}-Zellen kann ein verstärkter ROS-Abbau eher stattfinden als in TIGAR^{wt-defizient}-Zellen, so dass autophagischer Zelltod vermutlich erst verzögert eintritt. Diese zusätzliche TIGAR-Funktion wurde in dieser Arbeit allerdings nicht eingehend untersucht, es wurde nur gezeigt, dass TIGAR die Expression von ATG12 (*Autophagy-related protein 12*), ein Autophagie-induzierendes Gen, hemmen kann (**Abbildung 4-39**). Zur genauen Charakterisierung der Autophagie-Rolle von TIGAR und dem eventuell damit verbundenen Hypoxie-Schutz wären weitere Experimente u.a. unter Stressbedingungen und funktionelle Autophagie-Assays notwendig.

Eine zusätzliche Möglichkeit von TIGAR, ROS einzudämmen und somit auch zu starke Autophagie zu verhindern, könnte über eine TIGAR-vermittelte Induktion der HIF-1 α verlaufen, da eine TIGAR-Überexpression in p53^{wt}-Zellen im Vergleich zu p53^{wt}-Zellen unter Hypoxie zu hohen Laktat-Werten führte (**Abbildung 4-27**) und diese eventuell HIF-1 α stabilisierten könnten (285). Ein Zusammenhang zwischen der TIGAR-Expression und der HIF-1 α -Aktivität unter hochgradiger Hypoxie konnte jedoch in den hier untersuchten Modellen nicht gänzlich hergestellt werden: Eine TIGAR-Suppression vermittelte zwar eine geringere HIF-1 α -Aktivität (**Abbildung 4-36**), dennoch konnte eine TIGAR-Restoration in p53^{wt-defizient}-Zellen keine Veränderung der HIF-1 α -Aktivität beobachtet werden (**Abbildung 4-37**). Es wird vermutet, dass die HIF-1 α -Aktivität in den p53^{wt-defizient}-Zellen schon ein hohes

Niveau erreicht hatte (da keine Konkurrenz zwischen p53 und HIF-1 α um den Kofaktor p300 mehr stattfindet) und durch die Restoration von TIGAR nicht weiter gesteigert werden konnte.

5.4.2 TIGAR steuert die Atmung über HIF-1 α

Da TIGAR die Glykolyse unter Normoxie hemmt (**Abbildung 4-27** und (33)), stellte sich die Frage, ob TIGAR noch über einen anderen Weg Energiegewinnung induzieren kann. Es wurde daher überprüft, ob TIGAR die mitochondriale Atmung als alternativen Weg aktivieren kann. Eine Überexpression von TIGAR hatte tatsächlich eine p53-unabhängige Zunahme der zellulären Respiration zur Folge (**Abbildung 4-26**). Dies scheint über eine TIGAR-vermittelte HIF-1 α -Aktivierung zu verlaufen: Reporter-Untersuchungen zeigten, dass TIGAR die HIF-1 α -Transaktivität unter niedrigen Sauerstoff-Bedingungen (5%, aber nicht 10% O₂) verstärken kann (**Abbildung 4-29**). Wie schon in **5.3** erwähnt, konnten Fukuda et al. 2007 in Säugerzellen zeigen, dass HIF-1 α unter reduzierten Sauerstoff-Bedingungen Reaktionen der Atmungskette verstärkt (176). So könnte eine TIGAR-vermittelte Erhöhung der HIF-1 α -Aktivität ein effizienteres Ausnutzen des unter moderater Hypoxie vorhandenen Sauerstoffs ermöglichen und gleichzeitig die Erzeugung von Nebenprodukten der Atmung (ROS) vermindern, da die Atmungskette nicht unterbrochen wird und sowohl TIGAR (über die PPP-Induktion (33)) als auch HIF-1 α zusätzlich ROS mindern können (291). Zudem fördert HIF-1 α die Aktivierung von Lon, einer mitochondrialen Protease, die sowohl atmungsfördernd als auch ROS-abbauend wirkt (**5.3.1** und (176)). Eine positive Korrelation konnte zwischen der TIGAR- und Lon-Expression beobachtet werden (**Abbildung 4-31**), so dass die Atmungs- und/oder ROS-schützenden Funktionen von TIGAR vielleicht nicht nur über den PPP, sondern auch unter bestimmten Bedingungen (5% O₂) über die Regulation von Lon verlaufen könnten. Allerdings konnte keine HIF-1 α -Regulierung auf Proteinniveau beobachtet werden (**Abbildung 4-29** und **Abbildung 4-30**), so dass ein anderer Mechanismus als die HIF-1 α -Proteinstabilisierung vermutet wurde. Dies stand im Einklang mit den in TIGAR-überexprimierenden Zellen gemessenen Laktatwerten: Eine Überexpression von TIGAR führte zu einer Zunahme der Laktatkonzentration, allerdings nur in p53^{wt}-Zellen, so dass die ursprüngliche Vermutung, hohe Laktatwerte könnten HIF-1 α stabilisieren und zu dessen Aktivität beitragen (342, 343), nicht zutreffend war, da es auch in p53^{wt-defizient}-Zellen zu einer erhöhten HIF-1 α -Transaktivität kam. Eine weitere Möglichkeit, die HIF-1 α -Transaktivität zu steigern, ohne die Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins zu beeinflussen, könnte über Stabilisierung oder Induzierung der für die HIF-1 α -Transaktivierung benötigten Kofaktoren gehen (PCAF, p300 (313, 329, 344, 345)). Dies wäre der erste Hinweis dafür, dass TIGAR die Atmung regulieren kann und dass dies in Wechselwirkung mit HIF-1 α geschieht.

Ein weiterer Anhaltspunkt für eine mögliche Interaktion zwischen HIF-1 α und TIGAR liefern Arbeiten von Minchenko et al. 2003, Fukusawa et al. 2004, und Marin-Hernandez et al. 2009: Diese konnten zeigen, dass HIF-1 α Gewebe-spezifisch Mitglieder der PFKB-Familie induzieren kann. Einige dieser Mitglieder besitzen HRE-Sequenzen im Promotor-Bereich (346-348). Da PFKB1 Similarität zu TIGAR aufzeigt, erschien es möglich, dass auch TIGAR über HIF-1 α induzierbar sein könnte. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es unter Normoxie und moderater Hypoxie zwischen HIF-1 α - und TIGAR-Expression eine positive Korrelation gibt (**Abbildung 4-28**). Dies würde einen *feedback*-Mechanismus zwischen HIF-1 α und TIGAR implizieren: Einerseits verstärkt TIGAR unter Normoxie und moderater Hypoxie die Transaktivierung von HIF-1 α und könnte so eine effiziente Energiegewinnung über die Atmungskette -wahrscheinlich über Lon und Cox4-2- ermöglichen, andererseits wird die TIGAR-Expression über HIF-1 α induziert, was zur Aktivierung des PPP und zu einer erhöhten Transaktivität von HIF-1 α führt (**Abbildung 4-29** und **Abbildung 4-30**). Untersuchungen des TIGAR-Promotorbereichs bezüglich möglicher HRE-Sequenzen sind geplant.

Da TIGAR unter moderater Hypoxie die HIF-1 α -Transaktivität induzieren kann (**Abbildung 4-29** und **Abbildung 4-30**), und HIF-1 α die Expression von SCO2 induzieren kann (**Abbildung 4-22**), wurde spekuliert, ob TIGAR auch die Expression von SCO2 modulieren könnte. Dies würde neben der TIGAR-vermittelten Aktivierung von Lon eine weitere Erklärung für die beobachtete verstärkte Atmung in TIGAR^{wt}-Zellen liefern. Allerdings konnte keine Induktion von SCO2 durch TIGAR beobachtet werden; TIGAR hemmte sogar die SCO2-Expression (**Abbildung 4-32**). Die p53-abhängige Induktion der mitochondrialen Atmung über SCO2 und TIGAR als zwei unabhängige Effektoren könnte die Fähigkeit von p53^{wt}-Zellen verbessern, flexibel auf Veränderungen im Sauerstoff- und Nährstoffangebot zu reagieren.

TIGAR scheint zusammengefasst sauerstoffabhängig unterschiedliche Funktionen auszuüben: Unter hochgradiger Hypoxie vermag es die NADPH-Produktion zu induzieren und somit ROS-Schäden zu limitieren. Unter moderater Hypoxie hemmt TIGAR zunächst die Glykolyse, induziert den PPP und kann über das Einschalten der mitochondrialen Atmung einen metabolischen Vorteil gegenüber Nährstoffmangel ermöglichen. Zusätzlich sollte erwähnt werden, dass in Gegenwart von TIGAR die Atmung verstärkt stattfindet (eventuell über Lon und Cox4-2, weiter Untersuchungen diesbezüglich sind geplant), was bei einem Übergang in die Hypoxie, bedingt durch den Abbruch der Respirationsprozesse, in erhöhter ROS-Konzentration resultieren müsste. Dennoch können diese Zellen über die Induzierung des PPP ROS-Schäden in der Hypoxie besser entgegensteuern als TIGAR-defiziente-Zellen (**Abbildung 4-33**-**Abbildung 4-35**). TIGAR könnte also aus vielen Gründen ein für die Tumorzelle vorteilhaftes Protein sein.

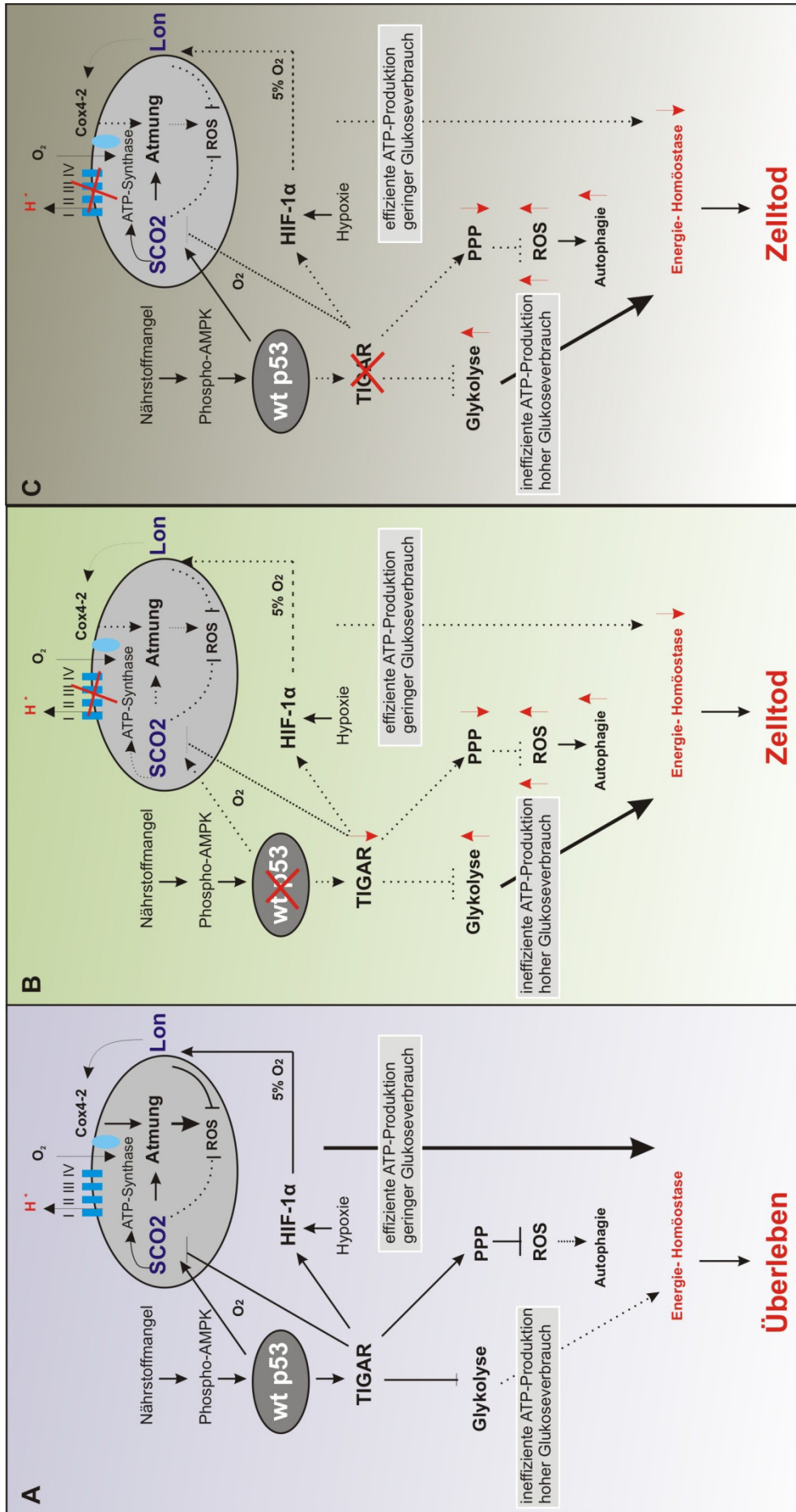


Abbildung 5-3 Funktionen von TIGAR

Nährstoffmangel wird über die AMPK registriert, diese wird über das AMP/ATP-Verhältnis aktiviert. Dies führt zur Aktivierung von p53. **(A)** p53 hemmt die Glykolyse über TIGAR. TIGAR kann über mindestens drei Wege den Zelltod reduzieren: i) der PPP wird induziert und über die dabei entstandenen Reduktionspotentiale NADPH der ROS-Abbau gefördert. ii) Durch den ROS-Abbau wird gleichzeitig die Autophagie gehemmt. iii) Zugleich induziert TIGAR eine HIF-1 α -Transaktivierung. Dies kann zur Induzierung von Lon führen und die Atmungskette über den proteolytischen Abbau von Cox4-1 effizienter machen. Weitere HIF-1 α -abhängigen antiapoptotische Funktionen könnten ebenfalls induziert werden. Andererseits scheint die TIGAR-vermittelte Regulierung der Atmung komplex zu sein: TIGAR vermittelt zwar eine verstärkte Atmung, reprimiert allerdings die SCO2-Expression, so dass vermutet wird, dass es ein Rückkoppelungsmechanismus zwischen TIGAR und SCO2 gibt. So tragen TIGAR-vermittelt sowohl effektive Energie-Homöostase als auch Schutz vor ROS unter moderater Hypoxie und Nährstoffmangel zu einem Überleben der Zellen bei. Fehlt p53 **(B)**, so wird i) TIGAR weniger induziert, es findet eine ineffizientere ATP-Produktion statt: Es kommt zu verstärkten Glykolyse- und Atmungsreaktionen und finden weniger statt, auch bedingt durch das Fehlen von SCO2. Gleichzeitig steigen die intrazellulären ROS-Konzentrationen an, hervorgerufen durch Kettenabbrüche, durch nicht verbrauchten intrazellulären Sauerstoff und durch das Fehlen von Lon. Dadurch wird Autophagie induziert und letztendlich Zelltod ausgelöst. Fehlt TIGAR **(C)**, so wird die Atmung gehemmt: SCO2 ist zwar vorhanden und wird auch nicht mehr über TIGAR gehemmt, trotzdem kann dadurch nicht vermehrt Atmung stattfinden, vermutlich aufgrund des Fehlens der Lon-Induzierung. Durch die ineffiziente ATP-Generierung (die Glykolyse wird verstärkt aktiviert), den Abbruch der Atmungsreaktionen und hohe intrazelluläre ROS werden Zellschäden und Autophagie ausgelöst und der Zelltod eingeleitet. Gestrichelte Linie: Signalweg wird gehemmt, volle Linie: Signalweg wird aktiviert

5.5 TKTL1: Ein über die Hemmung der Glykolyse induzierbares p53-Zielgen

TIGAR vermittelt Schutz gegenüber ROS und Hypoxie-induziertem Zelltod (**Abbildung 4-33-Abbildung 4-35**). Dies geschieht über die Aktivierung des PPP. Über diesen können Tumorzellen gegenüber ROS geschützt werden und zugleich Ribosen für die DNA-Synthese zur Verfügung gestellt und die Glykolyse mit Metaboliten aus dem PPP versorgt werden (62). Die Bedeutung des PPP in Tumoren wird auch als Ansatzpunkt experimenteller Therapien genutzt, die sich mit der Hemmung dieses Glukose-Abbauweges befassen (148, 349). Hierbei wurden z.B. Inhibitoren der Transketolase verwendet, da die Transketolase das limitierende Enzym des nicht-oxidativen Teils des PPP ist (62). Dieser Weg wird benötigt, um für die Glykolyse Metabolite zu generieren oder Ribosen für die DNA-Synthese zur Verfügung zu stellen. Die Zugabe des Transketolase-Inhibitors Oxythiamin auf Tumorzellen induziert u.a. einen G1-Phasen-Arrest (148, 350). Es wurde vermutet, dass dies aufgrund des Nucleinsäuren-Mangels geschieht, da der PPP diese nicht mehr zur Verfügung stellen kann. Dagegen fördert eine Thiamin-Zugabe das Tumorwachstum (149). Da bekannt ist, dass TIGAR die Glykolyse reguliert und den PPP induzieren kann (33), wurde untersucht, ob bestimmte Enzyme aus der Glykolyse und dem PPP durch p53 bzw. TIGAR reguliert sein könnten. Ausserdem wurden Regulierung und biologische Bedeutung von TKTL1, eine bei Gliomen und anderen Tumoren häufig exprimierte Variante der TKT, charakterisiert.

5.5.1 TKTL1 wird über p53 und TIGAR reguliert

Die Analyse der Expression von Glykolyse-Enzymen in p53^{wt} und p53^{wt-defizient}-Zellen ergab keine p53-abhängige Expressionsveränderungen der untersuchten Enzyme (**Abbildung 4-40**, **Abbildung 4-41** und **Abbildung 4-42**). Auch bei PPP-Enzymen (Transaldolase, Transketolase oder Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase) konnte kein signifikanter und einheitlicher Unterschied in p53^{wt}-Zellen im Vergleich zu p53^{wt-defizient}-Zellen beobachtet werden (**Abbildung 4-40-Abbildung 4-45**). Da die Expression eines Enzyms jedoch nicht immer mit seiner möglichen Aktivität korreliert, bedeutet dies nicht, dass p53 nur die TKTL1 beeinflusst. Hierfür müsste auf enzymatischer Ebene Studien betrieben werden. In vielen Tumoren konnte eine Überexpression der *Transketolase-Like 1* (TKTL1), einem Isoenzym der Transketolase, nachgewiesen werden. Diese Überexpression korreliert mit einer schlechteren Prognose für Patienten (143, 144, 151, 152, 154). Eine *in silico*-Analyse an Datensätzen von malignen Gliomen (Sun et al., 2006, TCGA 2009, Philips et al. 2006) mittels der Oncomine-Datenbank ergab eine variierende Expression von TKTL1-mRNA. Es konnte zudem ein Trend der Korrelation von TKTL1-Expression mit ungünstigem Verlauf bestätigt werden (**6.6.3**). Daher wurde die Expression von TKTL1 in Gliomzellen ermittelt. Es stellte sich heraus, dass die p53-Expression mit der TKTL1-Expression positiv korrelierte (**Abbildung 4-46**). Da TKT keine einheitliche p53-abhängige Regulierung zeigte (**Abbildung 4-44**), wurde davon ausgegangen, dass p53 spezifisch das Isoenzym TKTL1 regulieren kann. TKTL1 ist aber, genauso wie SCO2 (**Abbildung 4-12** und (39)) und TIGAR (**Abbildung 4-24** und (33)), nicht alleine über p53 regulierbar. Einen weiteren Anhaltspunkt, dass die TKTL1-Expression über p53 induziert wird, lieferten die Expressionsanalysen in Adriamycin-behandelten Proben. Die Zugabe von Adriamycin induziert die Aktivität von p53 (351) und damit auch die Expression seiner Zielgene (**Abbildung 4-49**). Eine Überprüfung auf mRNA-Ebene ergab, dass auch die Expression von TIGAR und TKTL1 hochreguliert wurde, aber nicht die Expression p53-unabhängiger Gene wie der TKT (**Abbildung 4-50**). Adriamycin wird momentan überwiegend in Mammakarzinomen (352, 353) und Leukämien (354, 355) eingesetzt. Bei Gliomen ist es klinisch wegen schlechter Penetration der Bluthirnschranke nicht wirksam. *In vitro* ist Adriamycin jedoch wirksam gegen Gliomzellen (356-359).

5.5.2 TKTL1 vermittelt TIGAR-Effekte in der Hypoxie

Es wurden zunächst bekannte Funktionen von TKTL1 (die Resistenz gegenüber ROS-induziertem Zelltod (147) in **Abbildung 4-55** und **Abbildung 4-57**, und die mögliche Stabilisierung von HIF-1 α (289) in **Abbildung 4-59**) in Gliomzellen bestätigt. Anschließend wurde, um die Rolle von TKTL1 und dessen Zusammenhänge mit TIGAR zu untersuchen, in TIGAR-exprimierenden Zellen die TKTL1-Expression supprimiert: Diese Suppression kehrte den protektiven Effekt von TIGAR in der Hypoxie um (**Abbildung 4-54**); dabei traten

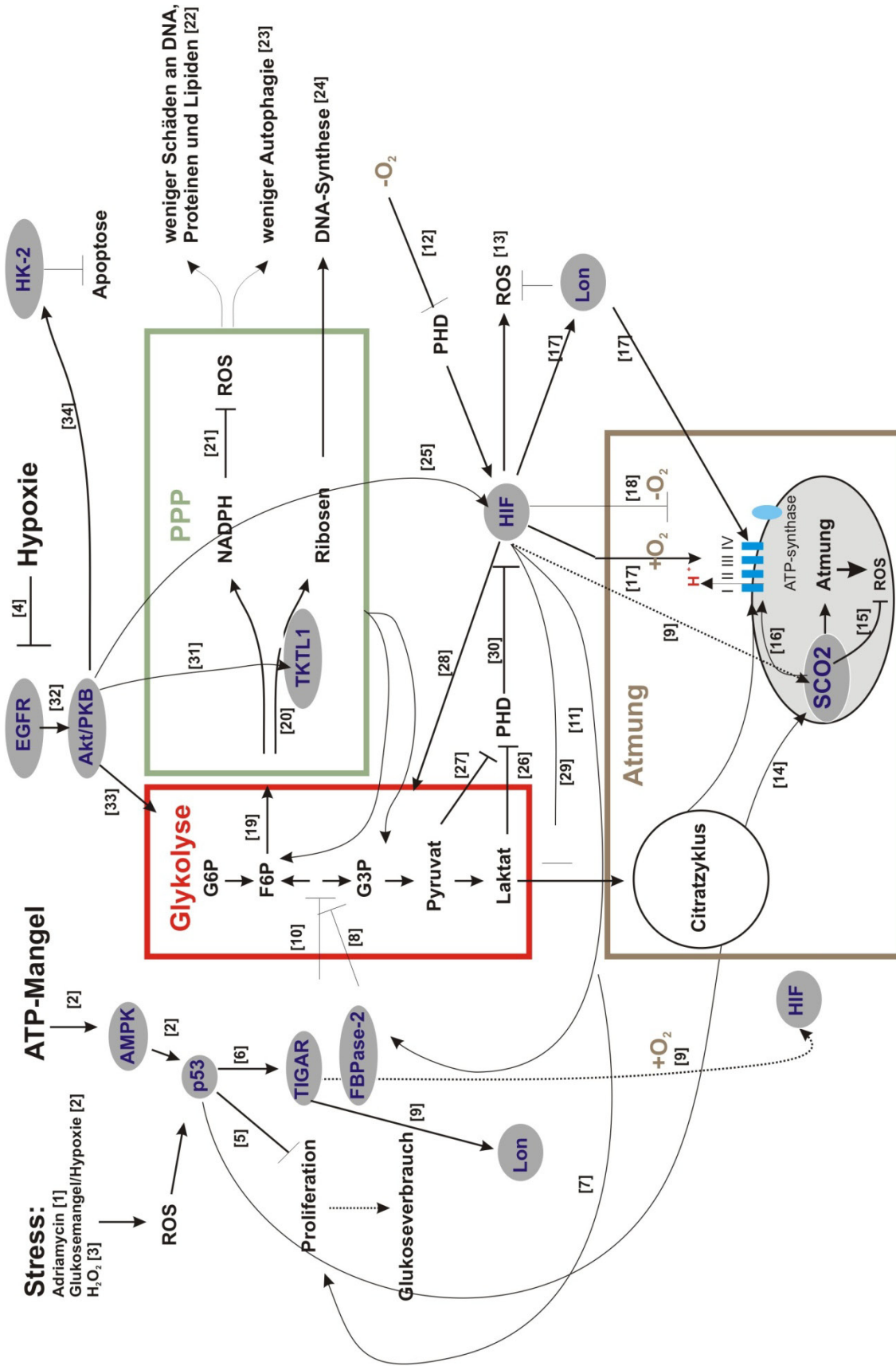
vermehrt ROS in der Zelle auf (**Abbildung 4-58**). Auch die Sensibilität gegenüber externen ROS (H_2O_2) konnte gesteigert werden (**Abbildung 4-56**), so dass einige der beobachteten TIGAR-Effekte auf TKTL1 zurückzuführen waren. Es ist bekannt, dass eine TIGAR-Expression zu hohen NADPH-Konzentrationen führt. Da diese aber im oxidativen, und nicht im nicht-oxidativen, TKT-regulierten Zweig des PPP entstehen, müsste über TKTL1 ein anderer Weg eingeschlagen werden, um NADPH in hohen Mengen zu generieren. TKTL1 könnte am Ende des nicht-oxidativen Teils des PPP Glucose-6-Phosphat für den oxidativen Teil des PPP zur Verfügung stellen (**Abbildung 1-6**), was die erhöhte Menge an NADPH erklären würde.

Weiterhin konnte eine mögliche Verknüpfung zwischen TKTL1 und HIF-1 α unter hochgradiger Hypoxie hergestellt werden: So bewirkte eine TKTL1-Suppression eine Reduktion der HIF-1 α -Transaktivität (**Abbildung 4-59**). Es wurde ferner vermutet, dass TIGAR als *upstream*-Protein hierfür verantwortlich sein könnte, da i) die Expression von TIGAR positiv mit der der TKTL1 korrelierte (**Abbildung 4-47**), ii) eine Suppression von TIGAR (**Abbildung 4-37**) oder TKTL1 (**Abbildung 4-59**) unabhängig voneinander die Transaktivität von HIF-1 α reduzierte, iii) eine TKTL1-Suppression in TIGAR-exprimierenden Zellen zu einer Abnahme der HIF- α -Transaktivität führte (**Abbildung 4-60**), und iv) auch hier keine Veränderung der HIF-1 α -Proteinmenge beobachtet werden konnte (**Abbildung 4-37** und **Abbildung 4-60**). Weiterhin zeigte sich auch, dass HIF-1 α die Expression der TKTL1 in der Hypoxie modulieren kann (**Abbildung 4-61**). Welcher Faktor die Ursache und welcher die Wirkung ist, bleibt hier zunächst noch unklar. Ein Rückkoppelungsschleife zwischen TKTL1 und HIF-1 α wird vermutet.

5.5.3 TIGAR, TKTL1 und die oxidative Phosphorylierung

TKTL1 kann die HIF-1 α -Transaktivität unter moderater Hypoxie induzieren (**Abbildung 4-63**), und somit vielleicht über HIF-1 α (SCO₂- oder Lon-abhängig) die Atmung induzieren (**Abbildung 4-62**). Es gibt allerdings auch einen *feedback*-Mechanismus: Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α unter moderater Hypoxie die TKTL1-Expression induzieren kann (**Abbildung 4-64**). Dies könnte direkt über HRE-Bindesequenzen auf dem TKTL1-Promotor gehen. Diesbezügliche Untersuchungen sind geplant. Ein mögliches Bindeglied zwischen HIF-1 α und TKTL1 könnte aber auch Akt sein, da einerseits eine Korrelation zwischen TKTL1-Überexpression und p-Akt in Glioblastomen gezeigt werden konnte (150) und andererseits Hypoxie Akt-Aktivierung fördert (360). p-Akt geht an den VDAC (*voltage-dependent anion channels*) an der Mitochondrienmembran eine Bindung mit der Hexokinase 2 (HK-2) ein (361, 362). Dies führt zu einem Schutz vor Apoptose, da durch diese Bindung verhindert wird, dass Bax an die Mitochondrienmembran bindet und Cytochrom c freisetzt (362-366). So könnte zum TKTL1- (und somit auch TIGAR-) vermittelten Schutz vor zellulärem Stress (ROS, Hypoxie, Nährstoffmangel) auch p-Akt und HK-2 beitragen.

Ein zusammenfassendes Modell der Zusammenhänge zwischen p53, TIGAR, TKTL1, Akt, SCO2 und HIF-1 α ist in **Abbildung 5-4** wiedergegeben.



[1]: Bilim et al., 2000
 [2]: Jones et al., 2005; Okoshi et al., 2008
 [3]: Uberti et al., 1999; Kitamura et al., 1999
 [4]: Steinbach et al., 2004
 [5]: Scian et al., 2008
 [6] und [10]: Bensaad et al., 2006
 [7]: Gardner et al 2001; Goda et al., 2003
 [8]: Hue et al., 1993; Depre et al., 1993
 [9]: in dieser Dissertation neu beschrieben
 [11]: Minchenko et al., 2002
 [12]: Huang et al., 1998
 [13]: Kirito et al., 2009
 [14]: Matoba et al., 2006
 [15]: Sung et al., 2010
 [16]: Horng et al., 2005; Leary et al., 2007
 [17]: Fukuda et al., 2007
 [18]: Papanreou et al., 2006
 [19]: Bensaad et al., 2006 und Boada et al., 2000
 [20]: Coy et al., 2005; Langbein et al., 2006
 [21]: Rapoport et al., 1979
 [22]: Lee et al., 2007; Indo et al., 2007
 [23]: Bensaad et al., 2009
 [24]: Boros et al., 1998
 [25]: Wittig et al., 2008
 [26]: Lu et al., 2002
 [27]: Lu et al., 2005
 [28]: Semenza et al., 2007
 [29]: Kim et al., 2006
 [30]: Schofield et al., 2004 und 2005
 [31]: Volker et al., 2008; Kohrenhagen et al., 2008
 [32]: Vivanco et al., 2002; Whiteman et al., 2002
 [33]: Elstrom et al., 2004
 [34]: Miyamoto et al., 2008; Majewski et al., 2004

→ Aktivierung bzw. Ergebnis
 — Hemmung
 beobachtete Regulierung, Regulierungsmechanismus und Zwischenschritte unbekannt

Abbildung 5-4 Zusammenfassendes Modell

p53 wird durch äußere Faktoren aktiviert (ROS, Tumormikromilieu [1, 2, und 3]). Dies führt einerseits zu einer Aktivierung p53-abhängiger Zielgene wie TIGAR [6] und SCO2 [14], kann aber auch zu einer p53-bedingten Proliferationshemmung und einem damit verbundenen verringerten Metabolismus [5] führen.

- **SCO2** wird über p53 [14] und HIF-1 α [9] induziert, stabilisiert die Atmungskette, verringert den Glukoseverbrauch [9] und fördert ROS-Schutz/Abbau [15].
- Über **TIGAR** bzw. FBPase2 wird die Glykolyse zunächst gehemmt und der PPP eingeleitet [8, 10 und 19]. Hierbei entstehen NADPH [21] und Ribosen für die DNA-Synthese [24]. Desweiteren induziert TIGAR die Zellatmung, vielleicht über die Induzierung von HIF-1 α [9]. Zusätzlich reguliert TIGAR die Expression von **Lon**, einer Protease, die die Effizienz der Atmung [17] und den ROS-Abbau steuert [13]. Über TIGAR wird **TKTL1** induziert. Eine Korrelation zwischen TKTL1-Überexpression und p-Akt in Glioblastomen konnte in [31] gezeigt werden. Eine Aktivierung von **Akt** korreliert mit einer HK-2-Bindung an der Mitochondrienmembran und so mit einer Apoptosehemmung [34]. So könnte es einen Zusammenhang zwischen Akt, TIGAR und HK-2 geben.
- **HIF-1 α** hat multiple Funktionen in der Zelle, bedingt durch die Stress-Art bzw. -Stärke, die auf die Zelle einwirkt: HIF-1 α reguliert die Glykolyse hoch [11 und 28] und kann unter geringen Sauerstoffbedingungen die Atmungskette effizienter machen, um ROS abzubauen [17]. Ein weiterer Regulierungsmechanismus von HIF-1 α könnte über **TIGAR** und **TKTL1** gehen über einen bis jetzt unbekanntenen Mechanismus. Gleichzeitig wirkt HIF-1 α auch auf Proliferation und Apoptoseinduktion [7].
- Ein weiterer wichtiger Regulator von Stressbedingungen in der Zelle ist **EGFR**. EGFR kann die Aktivierung von Akt/PKB induzieren [32]. Dadurch können Glykolysereaktionen verstärkt werden [33], vielleicht verbindet dieser Schritt **p-Akt** mit **TKTL1** [31] und **HIF-1 α** [25]: Diese verstärkte Glykolyse wird durch TIGAR gegenreguliert, der PPP-Weg eingeschlagen und TKTL1 induziert.

5.6 Implikationen für die Entwicklung neuer Tumorthapien

Diese Ergebnisse haben wichtige Implikationen für das Verständnis des Phänotyps primärer Glioblastome und könnten Ansätze für die Entwicklung neuer Tumorthapien bieten. Gliome sind sehr stark hypoxische und besonders angiogene Tumore. Verschiedene antiangiogene Therapie-Ansätze sind zurzeit Gegenstand von präklinischen und klinischen Studien, u.a. werden PKC β /Akt-Inhibitoren (Enzastaurin (367-369)), Integrin-Antagonisten (Cilengitide (370-372)), sowie VEGF-Antikörper (Avastin (373, 374)) als antiangiogene Substanzen für die Behandlung von Gliomen eingesetzt. Diese induzieren jedoch wahrscheinlich moderate Hypoxie (375). Besonders akute Hypoxie wird durch *vascular targeted agents* (sog. VTAs) induziert ((376-378)). Eine Modulation der Sensibilität gegenüber spontaner oder Therapie-induzierter Hypoxie ist daher von großer Bedeutung. Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der Erhalt eines p53^{wt}-Status das Überleben von Tumorzellen in einer sog. perinekrotischen Nische fördern könnte (139, 379, 380). Dennoch könnte dies negative Effekte auf die nähere Umgebung solcher Zellen nach sich ziehen: Ähnlich wie Dichloracetat, ein Inhibitor der Pyruvat-Dehydrogenase und Aktivator der oxidativen Phosphorylierung, könnten SCO2 oder TIGAR durch eine verstärkte Atmung

der Umgebung Sauerstoff entziehen, und somit für eine verstärkte globale Hypoxie im Tumorgewebe sorgen.

Hypoxischer Stress gilt als bedeutender Selektionsfaktor für die Entwicklung von Therapie-Resistenzen (381-383). Die Frage, wie Tumore Mangelsignale erfassen und prozessieren können und welche Kaskaden die Vermittlung adaptiver Antworten steuern, die das Überleben der Zellen sichern, ist gegenwärtig im Fokus einiger Arbeitsgruppen. Diese Mechanismen zu verstehen könnte die Basis der Entwicklung molekularer metabolischer Therapien darstellen. Diese könnten synergistisch mit antiangiogenese-Therapien (384-386) sein. Neue Chemotherapeutika, die gegen Hypoxie sensibilisieren, indem sie z.B. Hypoxie-spezifisch in cytotoxische Effektoren umgewandelt werden, werden momentan erforscht (379, 387-389) und könnten ebenfalls antimetabolische Strategien ergänzen.

Dennoch muss auch bei der Entwicklung von Therapien auf der Basis der in dieser Arbeit untersuchten Moleküle kritisch auf unerwünschte Effekte geprüft werden. So erscheint es angesichts dieser Ergebnisse unerlässlich, dass mit Bedacht die Restoration von p53^{wt} in p53-mutierten Zellen verfolgt wird (390-392), da es unbeabsichtigt zu SCO2- bzw. TIGAR-vermittelten Resistenzen gegenüber Hypoxie kommen könnte, was mit Antiangiogenese-Therapien interferieren und die Selektion von Tumorklonen begünstigen könnte (393). Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TKTL1 ein über p53 induzierbares Gen ist. Im Falle einer p53-Restoration könnte es zu unerwünschte Nebenwirkungen wie Schutz vor ROS und HIF-1 α -Induktion, und somit auch zu Resistenzen gegenüber Chemo- (65, 66, 70) und -Strahlentherapien (69, 394) kommen. So ist bei einer TIGAR-basierenden Therapie die Induzierung des in Tumoren häufig überexprimierten Isoenzym TKTL1 nicht zu vernachlässigen (**Abbildung 4-47**), da dieses Auswirkungen auf den ROS-Haushalt hat und somit eine geringere Therapieeffizienz hervorrufen könnte.

Außer Acht lassen sollte man auch nicht die Induktion von HIF-1 α und somit auch von TIGAR und TKTL1 durch Antiangiogenese (386), da dies aufgrund der tumorpotenzierenden Eigenschaften und der Induktion von Therapie-Resistenzen durch HIF-1 α kontraproduktiv ist (69, 379, 395, 396): Eine hohe HIF-1 α -Expression bewirkt u.a. Adaptationen des Tumors an starke Mangelbedingungen und fördert Angiogenese (397, 398), Invasivität und Migration (399-404).

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

6.1.1 Allgemeine Abkürzungen

°C:	Grad Celsius	mL:	Milliliter
Abb.:	Abbildung	mM:	Millimolar
Ak:	Antikörper	ng:	Nanogramm
Bp:	Basenpaar	nm:	Nanometer
Bzw.:	Beziehungsweise	rpm:	engl. round per minute
ca.:	circa	RT:	Raumtemperatur
cm:	Zentimeter	sog.:	sogenannt
d.h.:	das heißt	Tab.:	Tabelle
engl.	englisch	u.a.:	unter anderem
et al.:	et altera (und andere)	ÜN:	über Nacht
etc.:	et cetera (und so weiter)	usw.:	und so weiter
g:	Gramm	UV:	Ultraviolett
h:	Stunde	V:	Volt
Kat. Nr.	Katalognummer	V _{max} :	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
kb:	Kilobasenpaar	wt:	wildtyp
kDa:	Kilodalton	z.B.:	zum Beispiel
Konz.	Konzentration	z.T.:	zum Teil
L:	Liter	µg:	Mikrogramm
M:	Molar	µl:	Mikroliter
min:	Minute		

6.1.2 Zelllinien-, Protein- oder Gen-Namen

aa:	engl. A mino a cid
Akt:	zelluläres Homologon des viralen Onkogens v-akt; auch PKB genannt
AMP:	A denosin M ono P hosphat
AMPK:	A MP-Kinase
ATM:	engl. M utated in A taxia- T elangiectasia
ATP:	A denosin T riphosphat
Cox4-1:	engl. C ytochrome c O xidase subunit 4 isoform 1
Cox4-2:	engl. C ytochrome c O xidase subunit 4 isoform 2
DRAM:	engl. D amage- R egulated A utophagy M odulator
EGFR:	engl. E pidermal G rowth F actor R eceptor

FBPase-2:	F ruktose-2,6- BisP hosphatase
FL5.12:	Interleukin-3-abhängige murine pro-B lymphocytische Zelllinie
G6P:	G lukose- 6-P hosphat
GAPDH:	G lycerinaldehyd-3- P hosphat- D ehydrogenase
GSH:	Glutathion
HCT116:	Kolorektal Karzinom-Zelllinie (p53 ^{wt})
HIF-1α:	engl. Hypoxia Inducible Factor-1α
LN-18:	aus Lausanne (LN) stammende Zellen eines Gliompatienten (Astrozytom Grad IV (<i>Glioblastoma multiforme</i>)), p53 ^{mt} (405)
LNT-229:	aus Lausanne (LN) stammende Zellen, in Tübingen (T) hergestellter Zellklon 229 eines Gliompatienten (Astrozytom Grad IV (<i>Glioblastoma multiforme</i>)), p53 ^{wt}
Lon:	humanes Homolog zu <i>La</i> -Protease in <i>E.coli</i>
MDM2:	engl. M ouse D ouble M inute 2
mTOR:	engl. m ammalian T arget O f R apamycin
p-:	P hospho-
p300:	Histon Acetyl-Transferase, transkriptionaler Koaktivator
p53	P rotein 53 kDa
p53 ^{mt} :	p53-mutant
p53 ^{wt} :	p53-wildtyp
p53 ^{wt-defizient} :	darunter werden der Einfachheit halber in dieser Arbeit alle Zellen zusammengefasst, (1) die p53-mutant sind (p53 ^{mt} , wie die LN-18-, T98G-, und die LNT2229p53ts-Zellen), (2) in denen p53 stabil durch homologe Rekombination entfernt wurde (wie die HCT116 p53 ^{-/-} -Zellen) und/oder (3) in denen p53 supprimiert wird (wie die LNT-229p53sh-Zellen), folglich alle Zelllinien, die keine p53 ^{wildtyp} -Funktionen bzw. -Aktivitäten ausüben.
PDH:	P yruvat- D e H ydrogenase
PDK-1:	P yruvat- D ehydrogenase K inase 1
PFK-1:	6- P hospho F rukto- 1-K inase
PFK-2:	6- P hospho F rukto- 2-K inase
PGM:	P hospho G lycerat- M utase
PI3K:	P hosphatidyl I nositol 3-K inase
PPP:	engl. P entose P hosphate P athway
PTEN:	engl. P hosphatase and T ensin homolog deleted on chromosome tEN
pVHL:	von H ippel L indau P rotein
SCO2:	engl. S ynthesis of C ytochrome c O xidase 2
T98G	Gliom-Zelllinie (p53 ^{mt}) (406)

TIGAR:	engl. Tp53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator
TKT:	Transketolase-Gen
TKTL1:	engl. Transketolase-Like 1
Tp53:	p53-Gen
Trx-R	Thioredoxin-Reduktase
U2OS:	Humane Osteosarcom Zelllinie (p53 ^{wt})
VDAC:	engl. Voltage-Dependent Anion Channel

6.1.3 Materialien/Methoden

Amp:	Ampicillin
APS:	AmmoniumPerSulfat
BSA:	engl. Bovine Serum Albumin
bw:	engl. backward
cDNA:	engl. complementarity DNA
CO ₂ :	Kohlendioxid
CoA:	Coenzym A
ddH ₂ O:	Deuterium Depletiertes oder bidestilliertes Wasser
DMEM:	engl. Dulbeccos Minimal Essential Medium
DNA:	engl. DesoxyriboNucleic Acid
dNTP:	desoxy-Nukleotid TriPhosphat
DTT:	DiThioThreitol
ECL:	engl. Enhanced ChemiLuminescence
EDTA:	engl. EthylenDiamineTetraAcetat
FACS:	eng. Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS:	engl. Fetal Calf Serum
FITC:	engl. Fluorescein IsoThioCyanate (Form)
fw:	engl. forward
hygro:	hygromycin
KV:	KristallViolett
Luc:	Luziferase
mRNA:	eng. messenger RNA
NADH:	Nicotinamid Adenin Dinukleotid (reduzierte Form)
NADPH:	Nicotinamid Adenin Dinukleotid-Phosphat
neo:	neomycin (G418)
O ₂ :	Sauerstoff
p-:	phosphoryliert
PBS:	engl. Phosphate Buffered Saline

PI:	Propidium Iodid
pO ₂ :	Sauerstoff- P artialdruck
puro:	puromycin
QRT-PCR:	eng. Q uantitative R eal-time P olymerase C hain R eaction
RNA:	engl. R ibonucleic A cid
ROS:	engl. R eactive O xygen S pecies
Ser:	Ser in
SFM:	Serum-F reies M edium
shRNA:	sh ort h airpin RNA
siRNA:	si lencer RNA
TBE:	T ris- B orat- E DTA-Puffer
TE:	T ris- E DTA
TEMED:	N, N, N', N' - TetraMethylEthylenDiamin
Thr:	Thre onin
Tris:	Tr ihydroxymethylaminomethan
VM	VollM edium (DMEM, 25 mM Glukose mit FCS)
WB:	W estern B lot

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Das p53-Netzwerk	6
Abbildung 1-2: Sauerstoff- und Nährstoffgradienten im Tumorgewebe	9
Abbildung 1-3: p53 im Metabolismus	12
Abbildung 1-4: Metabolismus in normalen und proliferierenden Zellen	14
Abbildung 1-5: FBPase-2-Regulierung	16
Abbildung 1-6: Der Pentosephosphat-Weg	17
Abbildung 3-1 Funktionsweise des Luziferase-Assays	41
Abbildung 4-1: Expression (A) und funktionelle Suppression (B) von p53	52
Abbildung 4-2: p53-vermittelter Apo2L- und FasL-Zelltod	53
Abbildung 4-3: Proteinexpression und funktionelle Aktivität von p53 unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie	55
Abbildung 4-4: Zeitbedingte Proteinexpression, funktionelle Aktivität von p53 und Zelltod in Gliomzellen unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie	56
Abbildung 4-5: Funktionelle Aktivität von HIF-1 α unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie in Gliomzellen	58
Abbildung 4-6: Zeitbedingte Proteinexpression und funktionelle Aktivität von HIF-1 α in Gliomzellen unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie	60
Abbildung 4-7: Zelltod in Abhängigkeit des p53-Status unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie	62
Abbildung 4-8: Intrazelluläre ROS-Konzentrationen in Abhängigkeit des p53-Status	64
Abbildung 4-9: Relative Zellzahl in Abhängigkeit des p53-Status unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie	65
Abbildung 4-10: Glukoseverbrauch, Laktatproduktion und glykolytischer Index in Abhängigkeit des p53-Status unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie	68
Abbildung 4-11: Mitochondriale Atmung in p53 ^{wt-defizient} -Zellen	69
Abbildung 4-12: Relative Expression von SCO2 unter Normoxie in p53 ^{wt-defizient} -Zellen	71
Abbildung 4-13: Relative Expression von SCO2 unter Normoxie (21% O ₂) und moderater Hypoxie (1% O ₂)	72
Abbildung 4-14: Relative Expression von SCO2 in SCO2-überexprimierenden - und	73
Abbildung 4-15: Einfluss von SCO2 auf den Sauerstoff-Verbrauch	75
Abbildung 4-16: Wachstum in SCO2-restorierte-p53 ^{wt-defizient} -Zellen	77
Abbildung 4-17: Glykolytischer Index unter Tumormikromilieu.	79
Abbildung 4-18: Zelltodanalyse unter Nährstoff- und Sauerstoffmangelbedingungen	81
Abbildung 4-19: Intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter moderater Hypoxie und Nährstoffmangel	83
Abbildung 4-20: I- Blockade des Atmungskettenkomplexes I durch Rotenone und	85
Abbildung 4-21: Regulierung der Cox4-2- und Lon-Expression unter moderater Hypoxie durch HIF-1 α	87
Abbildung 4-22: Regulierung der SCO2- und Lon- Expression durch HIF-1 α unter moderater Hypoxie (5% O ₂)	88
Abbildung 4-23: Regulierung der SCO2- und Lon- Expression durch HIF-1 α unter moderater Hypoxie (1% O ₂)	89
Abbildung 4-24: Relative Expression von TIGAR in p53 ^{wt-defizient} -Zellen	90
Abbildung 4-25: Relative Expression von TIGAR in den verwendeten TIGAR-Zellsystemen	92
Abbildung 4-26: Der Effekt von TIGAR auf den zellulären Sauerstoffverbrauch	94
Abbildung 4-27: Glykolyse-Hemmung in TIGAR-überexprimierenden Zellen	96
Abbildung 4-28: HIF-1 α -Regulierung der TIGAR-Expression	97
Abbildung 4-29: Regulierung von HIF-1 α durch TIGAR-Überexpression unter moderater Hypoxie	99
Abbildung 4-30: Regulierung von HIF-1 α durch TIGAR-Suppression unter moderater Hypoxie	100

Abbildung 4-31: Einfluss von TIGAR auf die Expression von Lon unter moderater Hypoxie.....	101
Abbildung 4-32: Einfluss von TIGAR auf die Expression von SCO2 unter moderater Hypoxie (5% O ₂)	102
Abbildung 4-33: Zelltod-Sensitivität bei TIGAR-Überexpression und -Suppression in der hochgradigen Hypoxie (0,1% O ₂).....	104
Abbildung 4-34: H ₂ O ₂ -Sensitivität bei TIGAR-Überexpression und -Suppression.....	106
Abbildung 4-35: Intrazelluläre ROS-Konzentrationen bei TIGAR-Überexpression und- Suppression unter Hypoxie und Nährstoffmangel	109
Abbildung 4-36: Einfluss einer TIGAR-Suppression auf die funktionelle Aktivität von HIF-1 α in Gliomzellen unter Nährstoffmangel-Bedingungen und Hypoxie	110
Abbildung 4-37: Einfluss von TIGAR auf die funktionelle Aktivität von HIF-1 α in Gliomzellen unter Nährstoffmangelbedingungen und Hypoxie	111
Abbildung 4-38: Intrazelluläre ROS-Konzentrationen in Abhängigkeit des TIGAR-Status unter Adriamycin-Behandlung	112
Abbildung 4-39: Expression von ATG12 in Abhängigkeit der TIGAR-Status	113
Abbildung 4-40: GAPDH-Expression in p53 ^{wt-defizient} -Systemen	114
Abbildung 4-41: PFKB1-Expression in p53 ^{wt-defizient} -Systemen	115
Abbildung 4-42: LDHA-Expression in p53 ^{wt-defizient} -Systemen	115
Abbildung 4-43: G6PDH-Expression in p53 ^{wt-defizient} -Systemen.....	116
Abbildung 4-44: TKT1-Expression in p53 ^{wt-defizient} -Systemen	116
Abbildung 4-45: Transaldolase-Expression in p53 ^{wt-defizient} -Systemen.....	117
Abbildung 4-46: TKTL1-Expression in p53 ^{wt-defizient} -Systemen.....	117
Abbildung 4-47: TKTL1-Expression in TIGAR-überexprimierenden und -supprimierten Zelllinien	118
Abbildung 4-48: TKT-Expression in TIGAR-überexprimierenden Zelllinien und -supprimierten Zelllinien	119
Abbildung 4-49: Induktion von p53 durch Adriamycin	120
Abbildung 4-50: Induktion der TIGAR- und TKTL1-Expression durch Adriamycin	121
Abbildung 4-51: Relative Expression von TKTL1 in den verwendeten TKTL1-Zellsystemen.....	123
Abbildung 4-52: TKTL1-vermittelte Reduzierung von Adriamycin-induzierten ROS	124
Abbildung 4-53: TKTL1-vermittelter Schutz gegenüber Hypoxie-induzierten Zelltod.....	125
Abbildung 4-54: TKTL1-Abhängigkeit des TIGAR-vermittelten Schutzes in p53 ^{wt-defizient} - Zellen gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod.....	126
Abbildung 4-55: TKTL1 vermittelter Schutz vor H ₂ O ₂	128
Abbildung 4-56: TKTL1-Abhängigkeit des TIGAR-vermittelten Schutzes in p53 ^{wt-defizient} -Zellen gegenüber ROS-induziertem Zelltod	129
Abbildung 4-57: TKTL1 und Hypoxie-induzierte ROS-Sensitivität.....	130
Abbildung 4-58: TIGAR- und TKTL1-abhängige intrazelluläre ROS-Konzentrationen unter Hypoxie und Nährstoffmangel	131
Abbildung 4-59: TKTL1-Abhängigkeit der HIF-1 α -Transaktivität unter hochgradiger Hypoxie	133
Abbildung 4-60: Auswirkungen einer TKTL1-Suppression in TIGAR-exprimierenden Zellen auf die Transaktivität von HIF-1 α in Gliomzellen unter Nährstoffmangel -Bedingungen und hochgradiger Hypoxie.....	134
Abbildung 4-61: HIF-1 α -abhängige Regulierung der TKTL1-Expression unter hochgradiger Hypoxie.....	135
Abbildung 4-62: TKTL1-regulierte mitochondriale Atmung in TIGAR-überexprimierenden Zellen....	136
Abbildung 4-63: TKTL1-Abhängigkeit der HIF-1 α -Transaktivität unter moderater Hypoxie (10 und 5% O ₂).....	137
Abbildung 4-64: HIF-1 α -Regulierung der TKTL1-Expression unter normoxischen und moderaten Hypoxiebedingungen.....	138
Abbildung 5-1 Funktionen von SCO2	148
Abbildung 5-2 p53-abhängige Regulierung des Metabolismus durch TIGAR	150
Abbildung 5-3 Funktionen von TIGAR.....	155
Abbildung 5-4 Zusammenfassendes Modell.....	160

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhibitoren, Zytostatika und Chemotherapeutika.....	26
Tabelle 2: Antikörper	27
Tabelle 3: RT-Primer.....	27
Tabelle 4: siRNA-Sequenzen	29
Tabelle 5: Stabile Zelllinien	32
Tabelle 6: Zellen-Aussaat	37
Tabelle 7: Transiente Transfektionansätze siRNA.....	38
Tabelle 8: Transiente Transfektionansätze für Plasmide mittels Metafectene	39
Tabelle 9: Transiente Transfektionansätze für Plasmide mittels Attractene.....	39
Tabelle 10: Glukose- und Laktatwerte in p53 ^{wt} und p53 ^{wt-defizient} -Zellen.....	68
Tabelle 11: Glykolytischer Index in p53 ^{wt} und p53 ^{wt-defizient} -Zellen	68

6.4 Pufferverzeichnis

Chemolumineszenzpuffer	50	SDS Lämmli-Ladepuffer (2x)	48
Kristallviolett-Färbelösung	43	SDS Laufpuffer (5x)	49
LB-Puffer.....	36	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	49
Luziferase-Lyse-Puffer (5x):.....	42	TBS (10x)	50
Natriumcitrat-Lösung	43	TS-TMBSA	50
Protein-Lysepuffer P.....	47	WB-Laufpuffer(1x)	50
Puffer Luziferin	42	WB-Transfer-Puffer (10x)	50
Puffer Renilla (2x):.....	42		

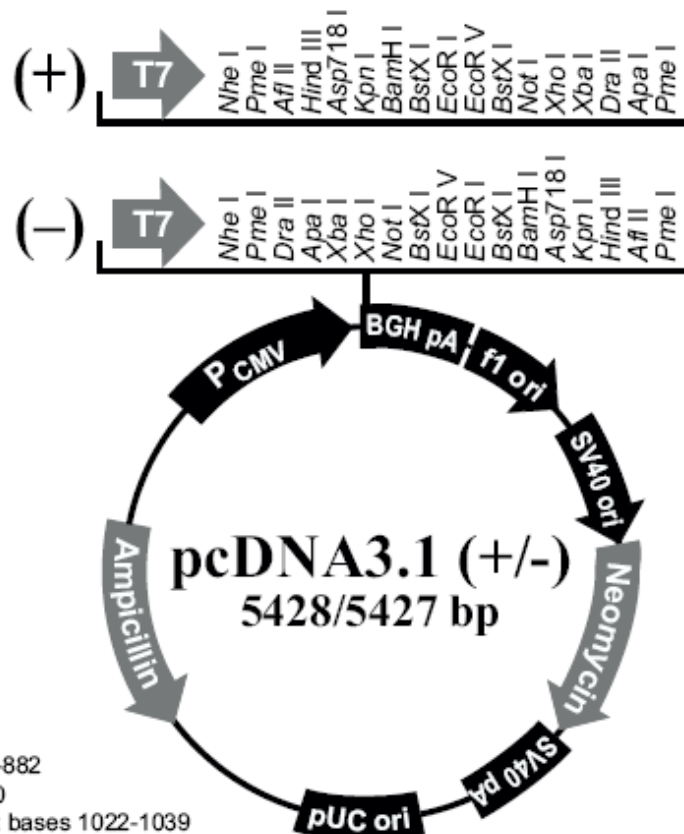
6.5 Vektorenverzeichnis

1) Pcdna3-neo

Invitrogen Kat.Nr. V790-20, dieser Vektor diente als Kontrolle für pcDNA3-SCO2, pcDNA3-TIGAR, pcDNA3-TIGAR-TM und pcDNA3-HIF-1 α -Versuche.

Map of pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-)

The figure below summarizes the features of the pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-) vectors. The complete sequences for pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-) are available for downloading from our World Wide Web site (www.invitrogen.com) or from Technical Service (see page 13). Details of the multiple cloning sites are shown on page 3 for pcDNA3.1(+) and page 4 for pcDNA3.1(-).



Comments for pcDNA3.1 (+)
5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819
T7 promoter/priming site: bases 863-882
Multiple cloning site: bases 895-1010
pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
f1 origin: bases 1298-1726
SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)
ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
bla promoter (P₃): bases 5327-5333 (complementary strand)

2) pSUPERpuro

Oligoengine, Kat.Nr. VEC-PBS-0007/0008, dieser Vektor diente als Kontrolle für pSUPERpuro-p53sh

Length: 4353 Bp

Key Sites

BglII: 2105

HindIII: 2111

EcoRI: 1884

Sall: 2126

XhoI: 2132

Vector Features

f1(+) origin: 135-441

PGK promoter: 1768-1370

Puro ORF: 1355-756

H1 promoter: 1889-2137

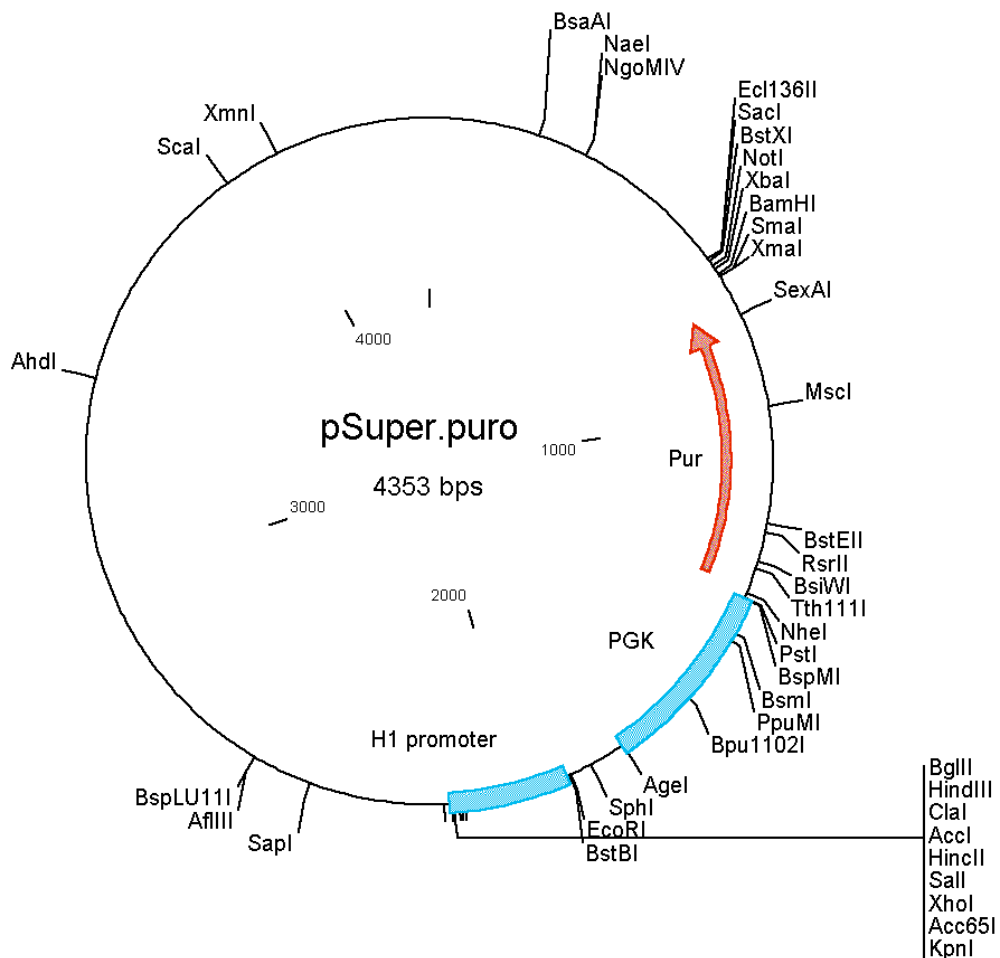
Ampicillin resistance ORF: 3368-4225

T7 primer binding site (AATACGACTCACTATAG): 627-643

T3 primer binding site (CTTTAGTGAGGGTTAAT): 2166-2182

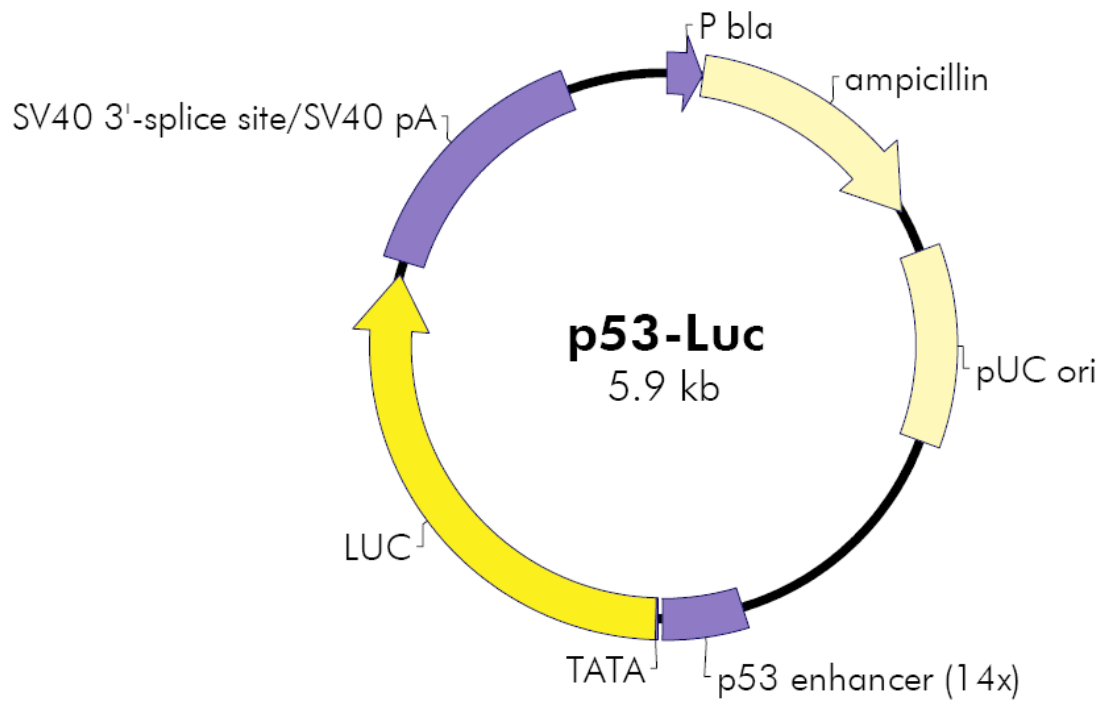
M13(-20) primer binding site (GTAAAACGACGGCCAGT): 600-616

M13 reverse primer binding site (CATGGTCATAGCTGTT): 2200-2215



3) p53-Luziferase

Stratagene (PathDetects p53 Nr.219092), dieser Vektor diente in den p53-Luziferase-Reporter-Versuche.

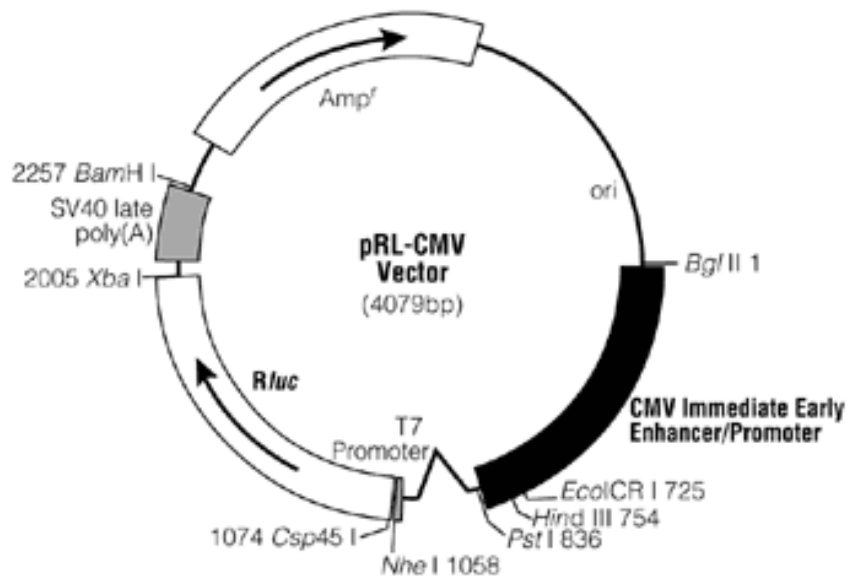


4) pRL-CMV (Renilla)

Promega (Promega, Mannheim, Germany) Kat.Nr. E2261, dieser Vektor diente als Transfektionskontrolle für Reporter-Versuche.

pRL-CMV Vector sequence reference points:

base pairs	4079 bases
CMV Enhancer and Immediate early promoter	7-803
Chimeric intron	860-996
T7 promoter (-17 to +2)	1040-1058
T7 promoter transcription start site	1057
Rluc reporter gene	1068-2003
SV40 late polyadenylation signal	2045-2246
Beta-lactamase (AmpR) coding region	2393-3253



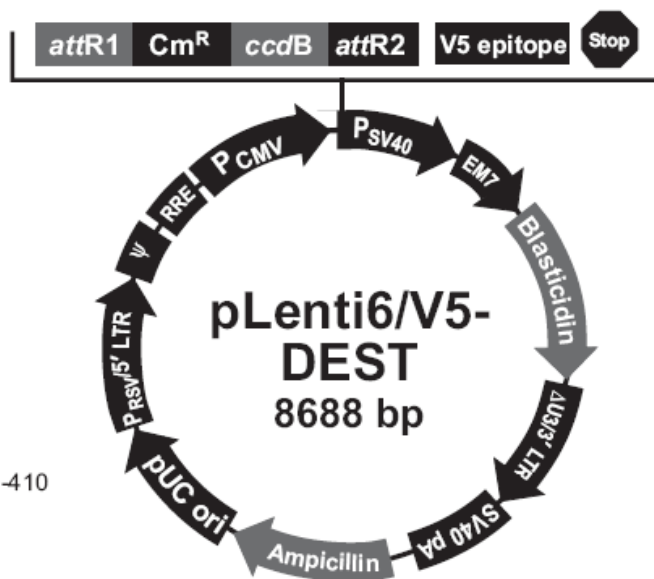
1354VIA01_6A

5) pLenti6/V5-DEST

Invitrogen, Kat.Nr. V498-10, dieser Vektor diente als Klonierungsplasmid für SIMA und HIF-1 α . Diese Vektoren wurden von Frau Cornelia Depner (AG T. Acker, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Giessen) hergestellt.

Map of pLenti6/V5-DEST

The map below shows the elements of pLenti6/V5-DEST. DNA from the entry clone replaces the region between bases 2447 and 4130. The complete sequence for pLenti6/V5-DEST is available from our web site at www.invitrogen.com or by contacting Technical Support (page 37).

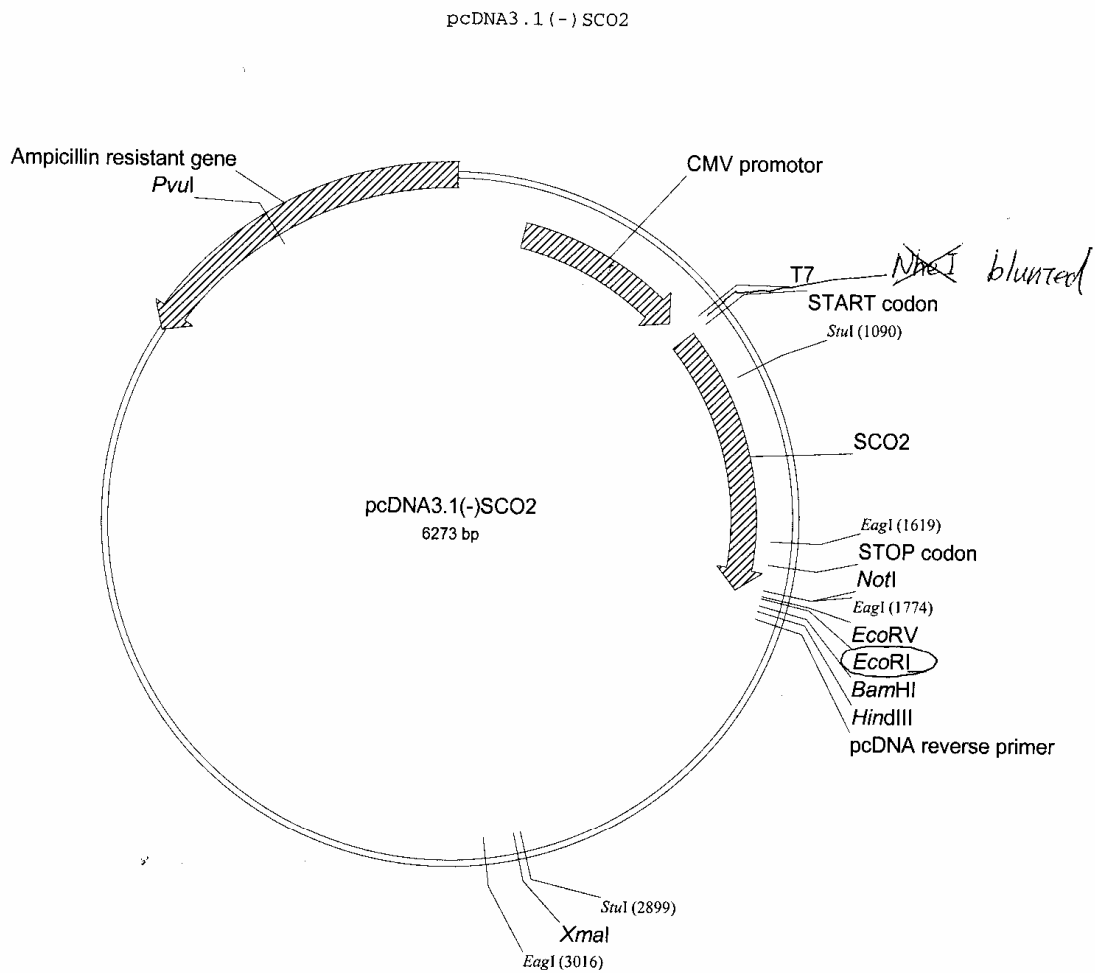


Comments for pLenti6/V5-DEST 8688 nucleotides

RSV/5' LTR hybrid promoter: bases 1-410
 RSV promoter: bases 1-229
 HIV-1 5' LTR: bases 230-410
 5' splice donor: base 520
 HIV-1 psi (ψ) packaging signal: bases 521-565
 HIV-1 Rev response element (RRE): bases 1075-1308
 3' splice acceptor: base 1656
 3' splice acceptor: base 1684
 CMV promoter: bases 1809-2392
 attR1 site: bases 2440-2564
 Chloramphenicol resistance gene (Cm^R): bases 2673-3332
 ccdB gene: bases 3674-3979
 attR2 site: bases 4020-4144
 V5 epitope: bases 4197-4238
 SV40 early promoter and origin: bases 4293-4602
 EM7 promoter: bases 4657-4723
 Blastidicin resistance gene: bases 4724-5122
 ΔU3/3' LTR: bases 5208-5442
 ΔU3: bases 5208-5261
 3' LTR: bases 5262-5442
 SV40 polyadenylation signal: bases 5514-5645
 bla promoter: bases 6504-6602
 Ampicillin (bla) resistance gene: bases 6603-7463
 pUC origin: bases 7608-8281

1) pcDNA3.1 SCO2 (Neomycin)

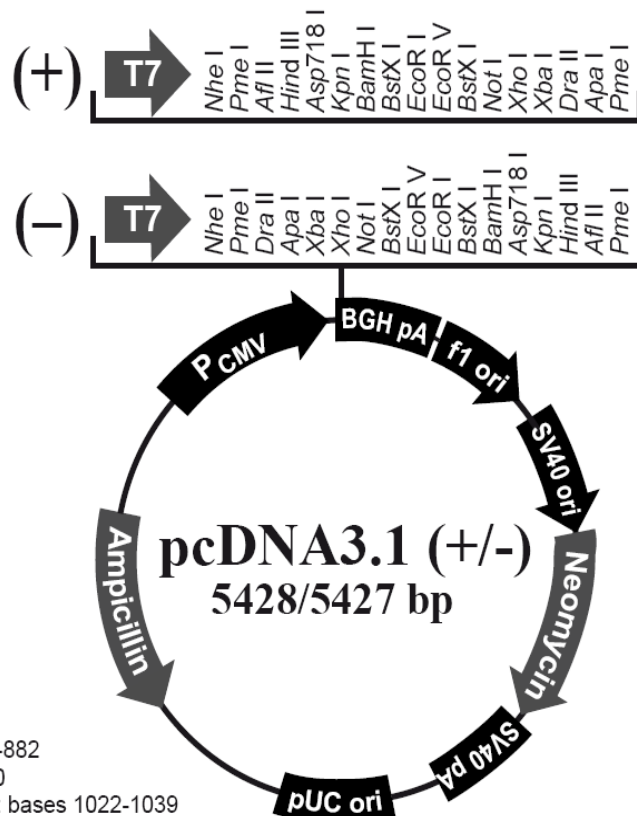
SCO2 wurde in pcDNA3.1 kloniert. Nähere Angaben zur Klonierungsstrategie von SCO2 s. bitte unter (39)



SCO2 cDNA (EST Locus# A1553776) was cleaved with *EcoRI* and *NotI*, blunted, cloned into the *NheI* and *NotI* sites of pcDNA3.1(-) (Invitrogen Life Technologies).

2) pcDNA3.1Flag-TIGAR und pcDNA3.1Flag-TIGAR-TM (Neomycin)

TIGAR und TIGAR-TM wurde in pcDNA3.1 kloniert. Nähere Angaben zur Klonierungsstrategie von TIGAR s. bitte (33). Zwischen BamHI und EcoRI ist die Flag-TIGAR-cDNA-Sequenz integriert (862 bp). In Flag-TIGAR-TM sind die 3 Aminosäuren mutiert, die für die Funktionsausübung von TIGAR relevant sind. Diese Mutationen verhindern, dass TIGAR in der Lage ist, den Fru-2,6-Phosphat-Level zu vermindern.



Comments for pcDNA3.1 (+) 5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819
 T7 promoter/priming site: bases 863-882
 Multiple cloning site: bases 895-1010
 pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
 BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
 f1 origin: bases 1298-1726
 SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
 Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
 SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
 pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
 Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)
 ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
 Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
bla promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)

pcDNA3.1-TIGAR:

Das Plasmid wurde über SeqLab mittel T7-Primer sequenziert und die Sequenz mit ncbi verglichen:

In grün unterlegt sind die TIGARsiRNA 1 GCAGCAGCTGCTGGTATAT und siRNA2 TTAGCAGCCAGTGTCTTAG aus (33)

```

Query 75  ACAAGGCTCGCTTCGCTCTGACTGTTGTCCGGCATGGAGAAACAAGATTTAAACAAGGAGA 134
      ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 78  ACATGGCTCGCTTCGCTCTGACTGTTGTCCGGCATGGAGAAACAAGATTTAAACAAGGAGA 137

Query 135 AAATAATCCAAGGACAAGGAGTAGATGAACCTCTTTCAGAACTGGATTTAAACAAGCAG 194
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 138 AAATAATCCAAGGACAAGGAGTAGATGAACCTCTTTCAGAACTGGATTTAAACAAGCAG 197

Query 195  CAGCTGCTGGTATATTTCTGAATAATGTGAAGTTTACTCATGCTTCTCCAGTGATCTCA 254
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 198  CAGCTGCTGGTATATTTCTGAATAATGTGAAGTTTACTCATGCTTCTCCAGTGATCTCA 257

Query 255  TGAGGACAAAGCAGACCATGCATGGAATTTTGGAGAGAAGCAAATTTTGCAAAGATATGA 314
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 258  TGAGGACAAAGCAGACCATGCATGGAATTTTGGAGAGAAGCAAATTTTGCAAAGATATGA 317

Query 315  CGGTAAAGTATGACTCAAGACTTCGGGAAAGGAAATACGGGGTTGTAGAAGGCAAAGCGC 374
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 318  CGGTAAAGTATGACTCAAGACTTCGGGAAAGGAAATACGGGGTTGTAGAAGGCAAAGCGC 377

Query 375  TAAGTGAGCTAAGGGCCATGGCCAAAGCAGCCAGGGAAGAGTGCCCTGTGTTTACACCGC 434
      ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 378  TAAGTGAGCTGAGGGCCATGGCCAAAGCAGCCAGGGAAGAGTGCCCTGTGTTTACACCGC 437

Query 435  CCGGAGGAGAGACGCTGGACCAGGTGAAAATGCGTGGAATAGACTTTTTTGAATTTCTTT 494
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 438  CCGGAGGAGAGACGCTGGACCAGGTGAAAATGCGTGGAATAGACTTTTTTGAATTTCTTT 497

Query 495  GTCAACTAATCCTGAAAGAAGCGGATCAAAAAGAACAGTTTTTCCCAAGGATCTCCAAGCA 554
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 498  GTCAACTAATCCTGAAAGAAGCGGATCAAAAAGAACAGTTTTTCCCAAGGATCTCCAAGCA 557

Query 555  ACTGTCTGGAAACTTCTTTGGCAGAGATATTTCTTTAGGAAAAAATCACAGCTCTAAAG 614
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 558  ACTGTCTGGAAACTTCTTTGGCAGAGATATTTCTTTAGGAAAAAATCACAGCTCTAAAG 617

Query 615  TTAATTCAGACAGCGGTATTCCAGGATTTAGCAGCCAGTGTCTTAGTTGTGAGTCACGGTG 674
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 618  TTAATTCAGACAGCGGTATTCCAGGATTTAGCAGCCAGTGTCTTAGTTGTGAGTCACGGTG 677

Query 675  CTTACATGAGAAGTCTGTTTGATTATTTTCTGACTGACCTTAAGTGTTCCTTACCAGCCA 734
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 678  CTTACATGAGAAGTCTGTTTGATTATTTTCTGACTGACCTTAAGTGTTCCTTACCAGCCA 737

Query 735  CTCTGAGCAGATCTGAACTTATGTCAGTCACTCCAATACAGGGATGAGTCTCTTTATCA 794
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 738  CTCTGAGCAGATCTGAACTTATGTCAGTCACTCCAATACAGGGATGAGTCTCTTTATCA 797

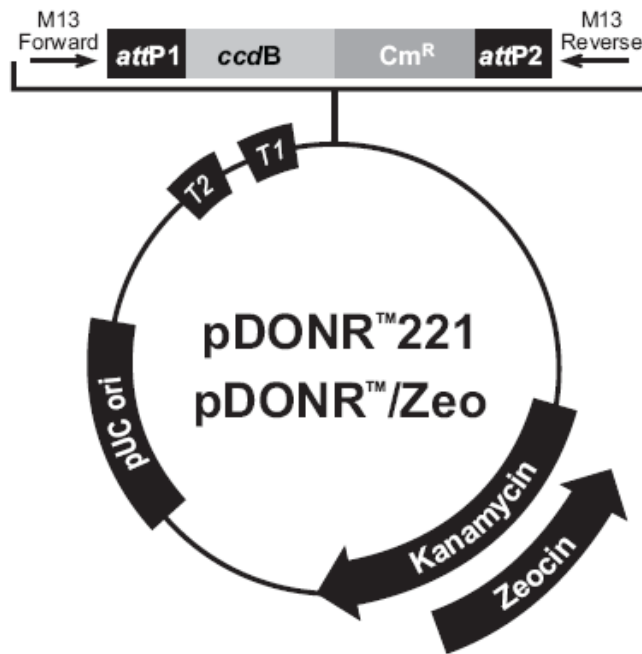
Query 795  TAAACTTTGAGGAAGGAAGAGAAGTTAAACCAACGGTTCAGTGTATTTGTATGAACCTAC 854
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 798  TAAACTTTGAGGAAGGAAGAGAAGTTAAACCAACGGTTCAGTGTATTTGTATGAACCTAC 857

Query 855  AGGATCATCTAAATGGACTGACTGAAACTCGCTAAG 890
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 858  AGGATCATCTAAATGGACTGACTGAAACTCGCTAAG 893

```


3) pDONR221

Der Vektor pDONR221 (Invitrogen) wurde als Kontrolle für das pDONR221-TKTL1-Konstrukt verwendet. Für die Transformation des Plasmides wurden Ominmax™ 2 competent cells (Kat. Nr. 12535-029, Invitrogen) benutzt.



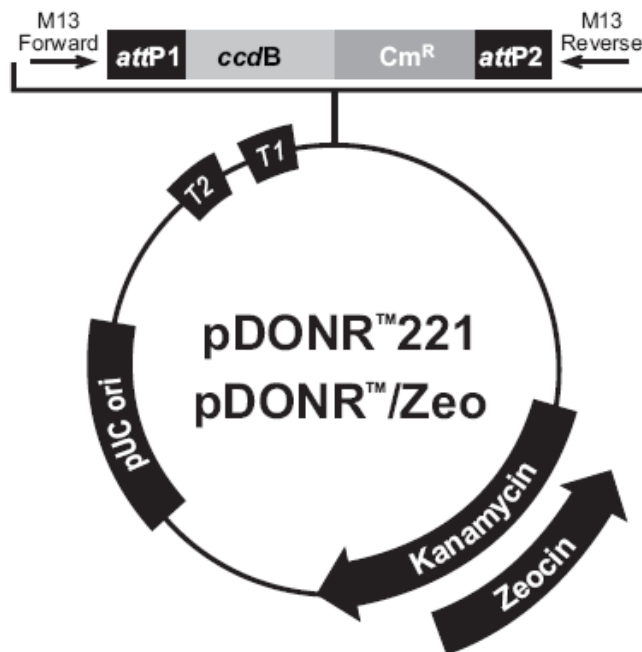
Comments for:

	pDONR [™] 221 4761 nucleotides	pDONR [™] /Zeo 4291 nucleotides
<i>rrnB</i> T2 transcription termination sequence (c):	268-295	268-295
<i>rrnB</i> T1 transcription termination sequence (c):	427-470	427-470
M13 Forward (-20) priming site:	537-552	537-552
<i>attP1</i> :	570-801	570-801
<i>ccdB</i> gene (c):	1197-1502	1197-1502
Chloramphenicol resistance gene (c):	1825-2505	1847-2506
<i>attP2</i> (c):	2753-2984	2754-2985
M13 Reverse priming site:	3026-3042	3027-3043
Kanamycin resistance gene:	3155-3964	--
EM7 promoter (c):	--	3486-3552
Zeocin resistance gene (c):	--	3111-3485
pUC origin:	4085-4758	3615-4288

(c) = complementary strand

4) TKTL1 F24L in pDONR221 (von Dr. Markus Böhl)

Das synthetische Gen BC025382 wurde in pDONR221 kloniert mittels der attB1 und attB2-Schnittstellen. Das Konstrukt wurde anschließend mittels Sequenzierung überprüft.



Comments for:

	pDONR TM 221 4761 nucleotides	pDONR TM /Zeo 4291 nucleotides
<i>rrnB</i> T2 transcription termination sequence (c):	268-295	268-295
<i>rrnB</i> T1 transcription termination sequence (c):	427-470	427-470
M13 Forward (-20) priming site:	537-552	537-552
<i>attP1</i> :	570-801	570-801
<i>ccdB</i> gene (c):	1197-1502	1197-1502
Chloramphenicol resistance gene (c):	1825-2505	1847-2506
<i>attP2</i> (c):	2753-2984	2754-2985
M13 Reverse priming site:	3026-3042	3027-3043
Kanamycin resistance gene:	3155-3964	--
EM7 promoter (c):	--	3486-3552
Zeocin resistance gene (c):	--	3111-3485
pUC origin:	4085-4758	3615-4288

(c) = complementary strand

6.6 Datenbankuntersuchungen

Rembrandt-Datenbank:

All: All glioma (454 samples)

Astro: Astrocytoma (148 samples)

GBM: Glioblastoma (228 samples)

MIXED: mixed (11 Proben)

control: nicht tumoröses Hirngewebe (28 Proben)

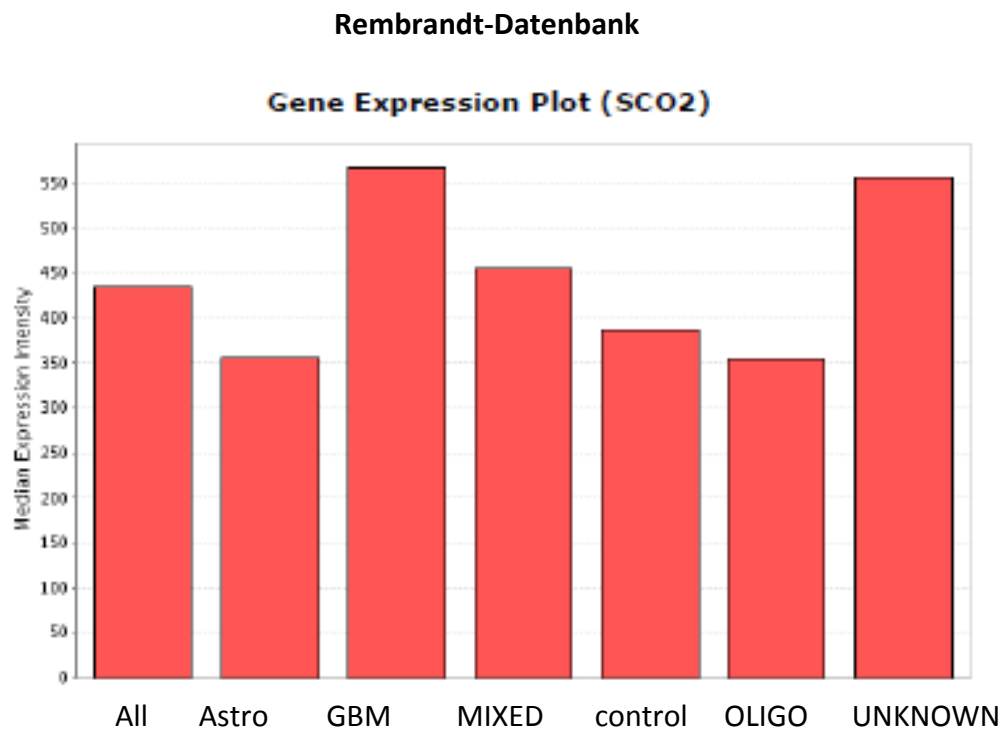
Oligo: Oligodendroglioma (67 Proben)

UNKNOWN: unbekanntes Hirn-Material (67 Proben)

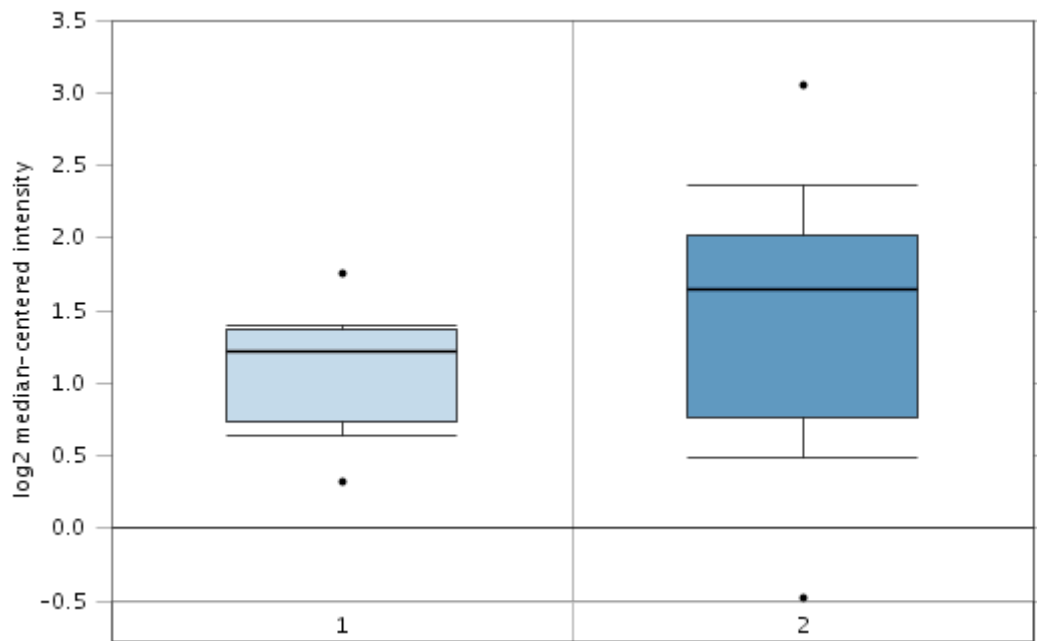
Oncomine-Datenbank:

Sun et al Cancer Cell 2006/04/01 Human Genome U133 Plus 2.0 Array

6.6.1 SCO2



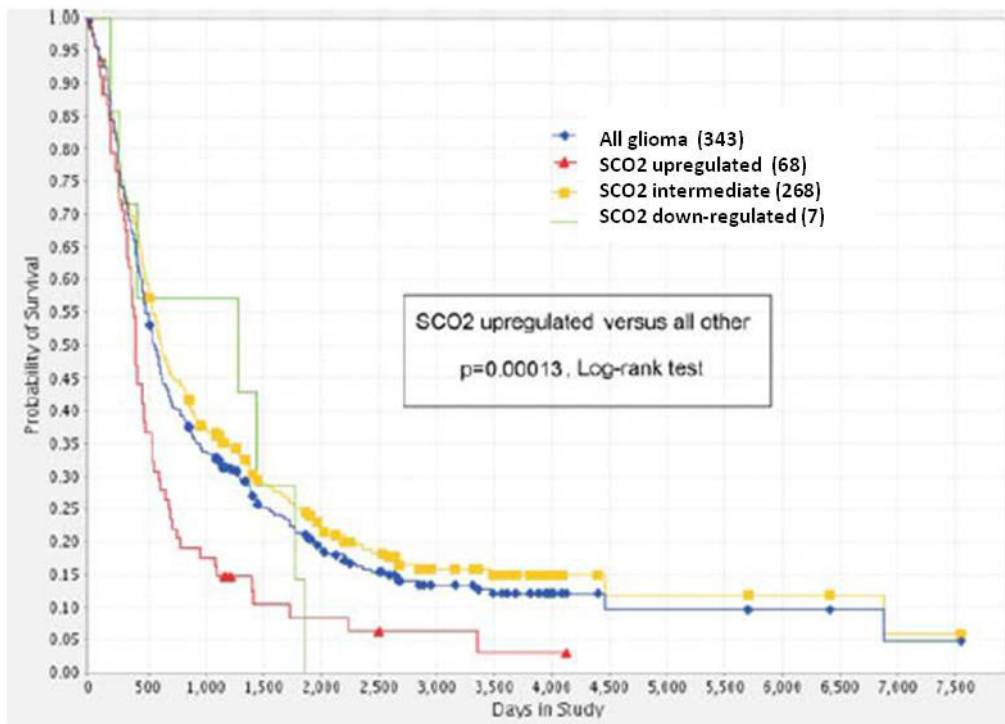
Oncomine-Datenbank



1. Brain (23)

2. Glioblastoma (81)

Fold change 1,28, $p=0,001$

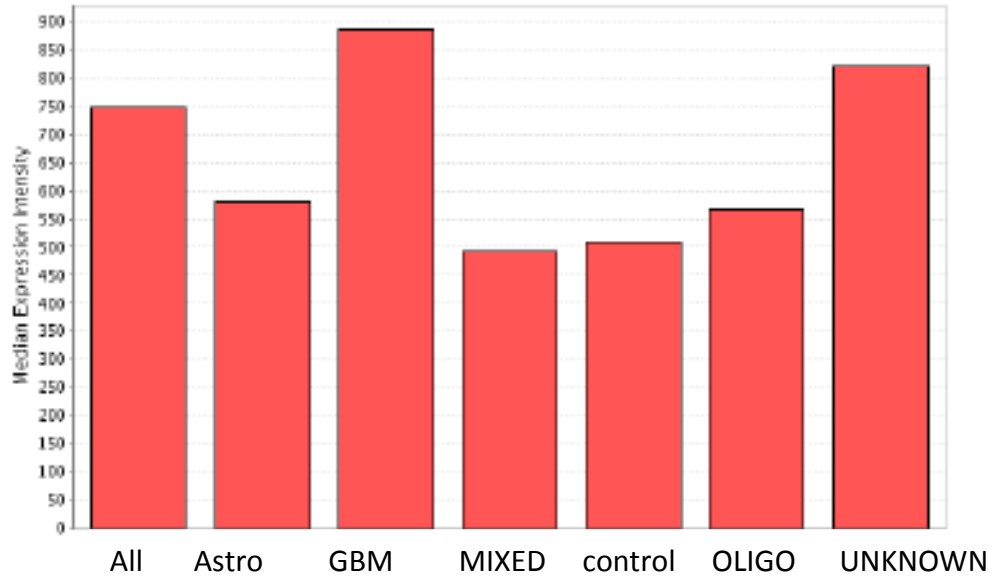


In silico-Analyse der Korrelation der SCO2-mRNA Expression mit dem Patienten Überleben bei Gliomen in der Rembrandt-Datenbank (Kaplan-Meier-Kurve).

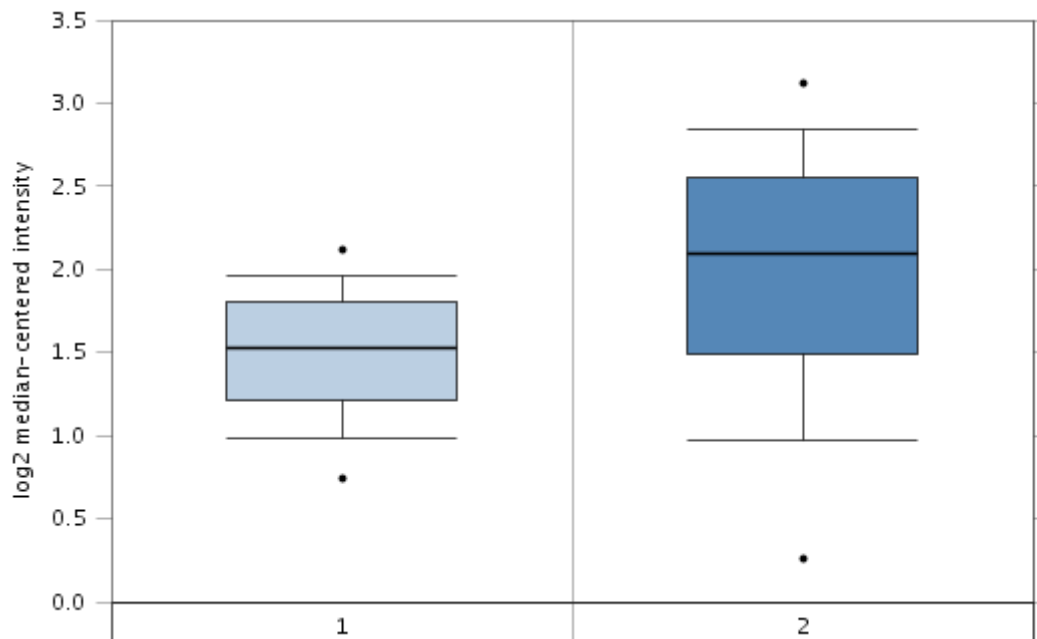
6.6.2 TIGAR

Rembrandt-Datenbank

Gene Expression Plot (C12ORF5)



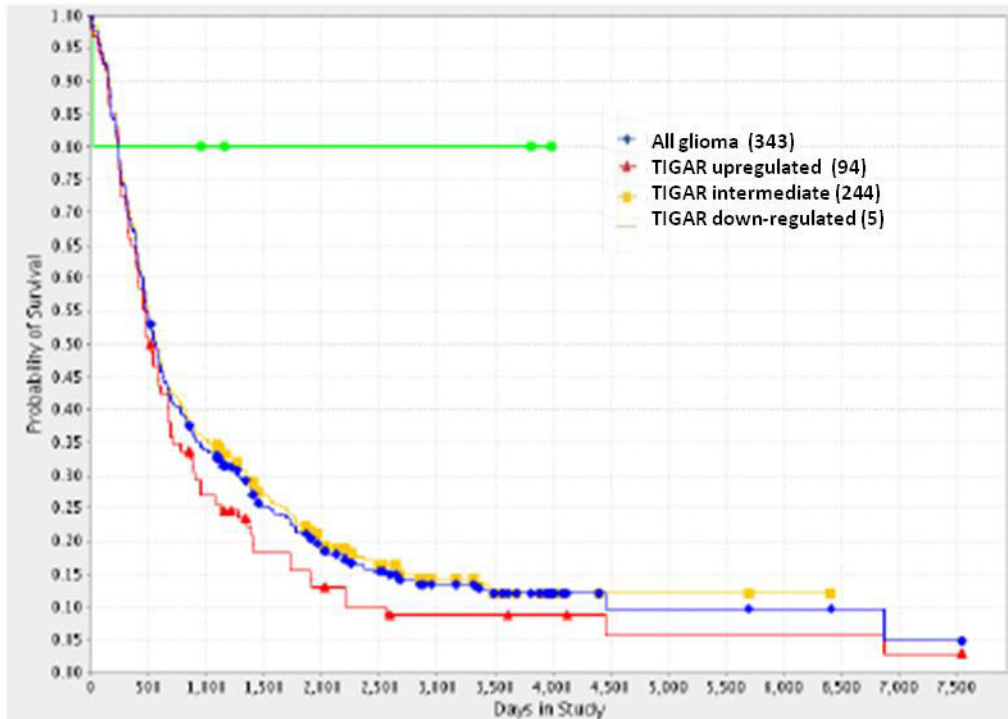
Oncomine-Datenbank



1. Brain (23)

2. Glioblastoma (81)

Fold Change: 1.407, p-value: $1,3 \times 10^{-5}$

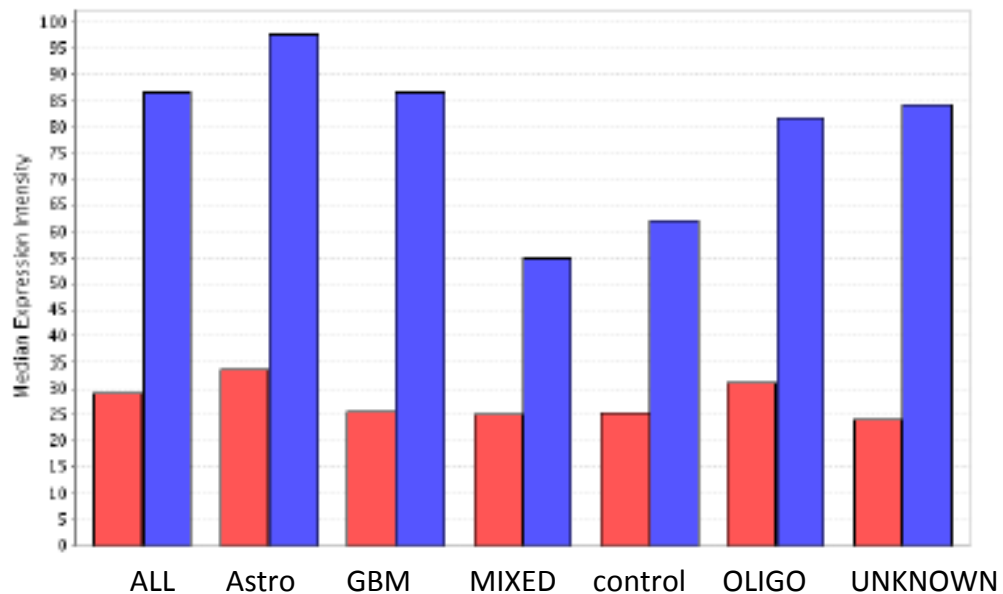


In silico-Analyse der Korrelation der TIGAR-mRNA Expression mit dem Überleben von Patienten bei Gliomen in der Rembrandt-Datenbank (Kaplan-Meier-Kurve). TIGAR upregulated versus all others p-value= 0.109

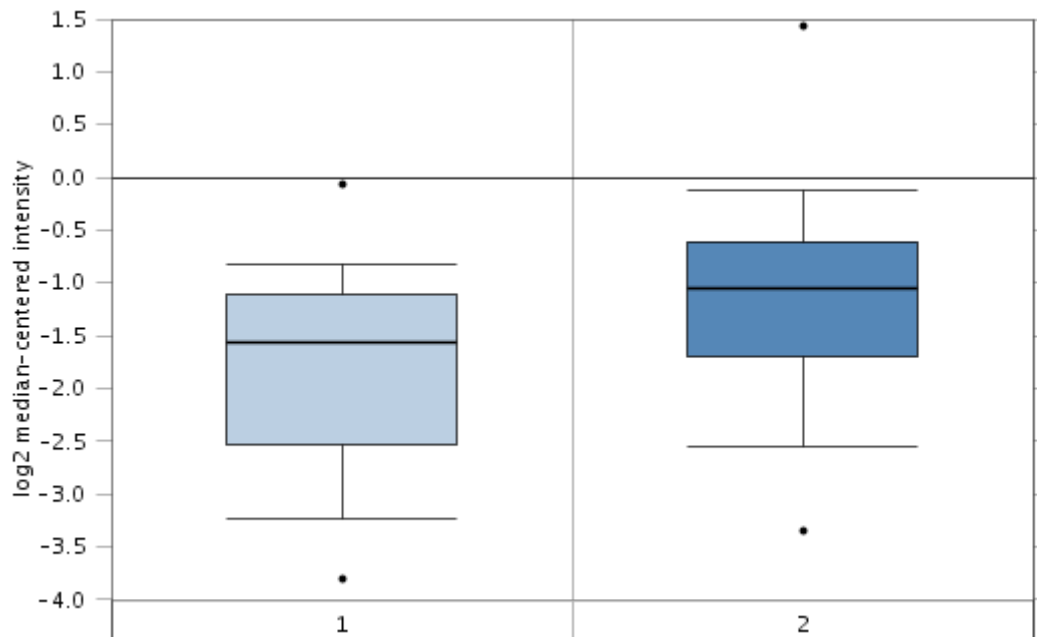
6.6.3 TKTL1:

Rembrandt-Datenbank

Gene Expression Plot (TKTL1)



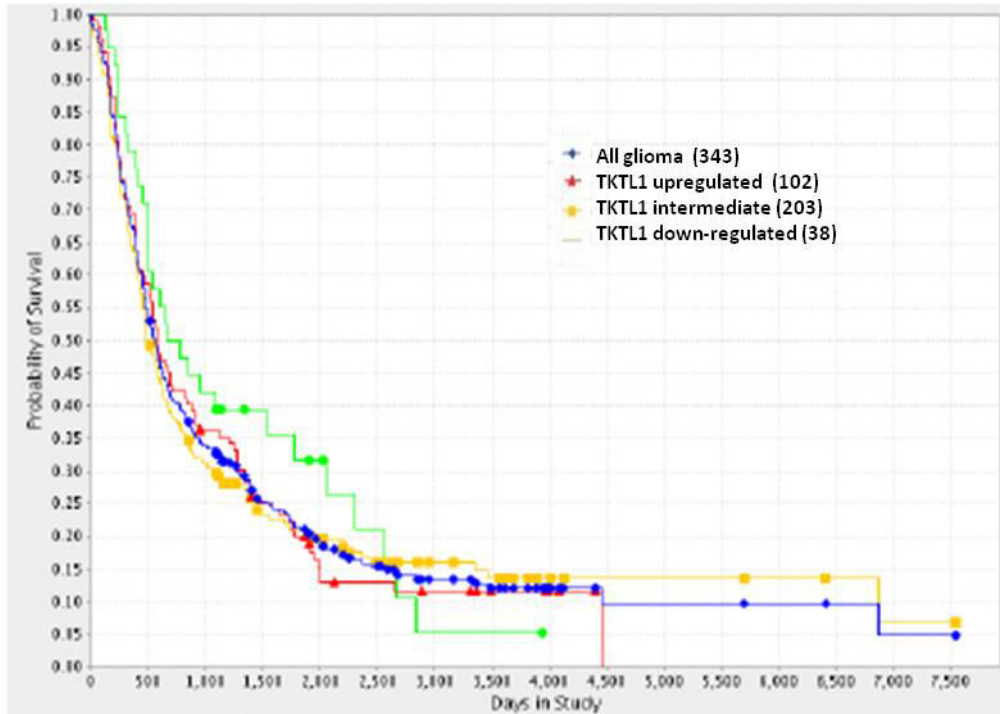
Oncomine-Datenbank



1. Brain (23)

2. Glioblastoma (81)

Fold Change: 1,542, p-value: 0,005



In silico-Analyse der Korrelation der TKTL1-mRNA Expression mit dem Überleben von Patienten bei Gliomen in der Rembrandt-Datenbank (Kaplan-Meier-Kurve). TKTL1 upregulated versus all others p-value= 0.892.

7 Literaturverzeichnis

1. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:275-83.
2. Guimaraes DP, Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie* 2002;84:83-93.
3. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523-6.
4. Royds JA, Iacopetta B. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death Differ* 2006;13:1017-26.
5. Bensaad K, Vousden KH. Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med* 2005;11:1278-9.
6. Balint EE, Vousden KH. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer* 2001;85:1813-23.
7. Braithwaite AW, Del Sal G, Lu X. Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death Differ* 2006;13:984-93.
8. Braithwaite AW, Prives CL. p53: more research and more questions. *Cell Death Differ* 2006;13:877-80.
9. Braithwaite AW, Royds JA, Jackson P. The p53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis* 2005;26:1161-9.
10. Cui Q, Yu JH, Wu JN, *et al.* P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3- independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:1057-66.
11. Kashkin KN, Khlgatian SV, Gurova OV, Kuprash DV, Nedospasov SA. New mutations in the human p53 gene--a regulator of the cell cycle and carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2007;72:282-92.
12. Scian MJ, Carchman EH, Mohanraj L, *et al.* Wild-type p53 and p73 negatively regulate expression of proliferation related genes. *Oncogene* 2008;27:2583-93.
13. Bates S, Vousden KH. p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:12-8.
14. Murphy ME, Leu JI, George DL. p53 moves to mitochondria: a turn on the path to apoptosis. *Cell Cycle* 2004;3:836-9.
15. Godefroy N, Lemaire C, Renaud F, *et al.* p53 can promote mitochondria- and caspase-independent apoptosis. *Cell Death Differ* 2004;11:785-7.
16. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001;7:683-94.
17. Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 2008;134:451-60.
18. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11848-52.
19. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *Embo J* 1999;18:6027-36.
20. Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee SW, Aaronson SA. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol* 2003;23:8576-85.
21. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 2005;11:1306-13.
22. Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, *et al.* DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006;126:121-34.
23. Crighton D, Wilkinson S, Ryan KM. DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy* 2007;3:72-4.

24. Kelekar A. Introduction to the review series Autophagy in Higher Eukaryotes--a matter of survival or death. *Autophagy* 2008;4:555-6.
25. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, *et al.* Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* 2008;54:92-9.
26. Jones RG, Plas DR, Kubek S, *et al.* AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2005;18:283-93.
27. McGee SL, Hargreaves M. AMPK and transcriptional regulation. *Front Biosci* 2008;13:3022-33.
28. Schmid T, Zhou J, Brune B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med* 2004;8:423-31.
29. Alarcon R, Koumenis C, Geyer RK, Maki CG, Giaccia AJ. Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. *Cancer Res* 1999;59:6046-51.
30. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* 1998;392:405-8.
31. Park HJ, Lyons JC, Ohtsubo T, Song CW. Cell cycle progression and apoptosis after irradiation in an acidic environment. *Cell Death Differ* 2000;7:729-38.
32. Xiang W, Zhu X, Zhao H. Effect of wild-type p53 gene transfection on the growth and radiotherapeutic sensitivity of human glioma cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005;25:448-50.
33. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, *et al.* TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 2006;126:107-20.
34. Strosznajder RP, Jesko H, Banasik M, Tanaka S. Effects of p53 inhibitor on survival and death of cells subjected to oxidative stress. *J Physiol Pharmacol* 2005;56 Suppl 4:215-21.
35. Bensaad K, Cheung EC, Vousden KH. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *Embo J* 2009;28:3015-26.
36. Green DR, Chipuk JE. p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* 2006;126:30-2.
37. Corcoran CA, Huang Y, Sheikh MS. The regulation of energy generating metabolic pathways by p53. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1610-3.
38. Kondoh H, Lleonart ME, Gil J, *et al.* Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* 2005;65:177-85.
39. Matoba S, Kang JG, Patino WD, *et al.* p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 2006;312:1650-3.
40. Assaily W, Benchimol S. Differential utilization of two ATP-generating pathways is regulated by p53. *Cancer Cell* 2006;10:4-6.
41. Kruse JP, Gu W. p53 aerobics: the major tumor suppressor fuels your workout. *Cell Metab* 2006;4:1-3.
42. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007;170:1445-53.
43. Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, *et al.* Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 1994;54:649-52.
44. Momand J, Zambetti GP. Mdm-2: "big brother" of p53. *J Cell Biochem* 1997;64:343-52.
45. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 1998;26:3453-9.
46. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455:1061-8.
47. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109.
48. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the

- evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996;6:217-23; discussion 23-4.
49. Heinzl PA, Balaram P, Bernard HU. Mutations and polymorphisms in the p53, p21 and p16 genes in oral carcinomas of Indian betel quid chewers. *Int J Cancer* 1996;68:420-3.
50. Mousses S, Ozcelik H, Lee PD, Malkin D, Bull SB, Andrulis IL. Two variants of the CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer. *Hum Mol Genet* 1995;4:1089-92.
51. Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, Watson PH, Zhou XP, Eng C. Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat Genet* 2002;32:355-7.
52. Watanabe K, Peraud A, Gratas C, Wakai S, Kleihues P, Ohgaki H. p53 and PTEN gene mutations in gemistocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol* 1998;95:559-64.
53. Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* 1998;8:1195-8.
54. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8:187-98.
55. Kim JS, Lee C, Bonifant CL, Ransom H, Waldman T. Activation of p53-dependent growth suppression in human cells by mutations in PTEN or PIK3CA. *Mol Cell Biol* 2007;27:662-77.
56. Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 1998;58:1408-16.
57. Denekamp J, Dasu A, Waites A. Vasculature and microenvironmental gradients: the missing links in novel approaches to cancer therapy? *Adv Enzyme Regul* 1998;38:281-99.
58. Steinbach JP, Wolburg H, Klumpp A, Probst H, Weller M. Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. *Cell Death Differ* 2003;10:823-32.
59. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988;240:177-84.
60. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004;9 Suppl 5:4-9.
61. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 2001;28:29-35.
62. Wittig R, Coy JF. The role of glucose metabolism and glucose-associated signalling in cancer. *Perspect Medicin Chem* 2008;1:64-82.
63. Ehrmann J, Kolar Z, Kala M, Vojtesek B, Komenda S. Expression of p53 in glioblastoma multiforme cells: relationship to survival, proliferation and glycosylation. *Cesk Patol* 1995;31:87-91.
64. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58-62.
65. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;7:1661-8.
66. DeClerck K, Elble RC. The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Front Biosci*;15:213-25.
67. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 2004;5:429-41.

68. Nakamura J, Kitajima Y, Kai K, *et al.* HIF-1 α is an unfavorable determinant of relapse in gastric cancer patients who underwent curative surgery followed by adjuvant 5-FU chemotherapy. *Int J Cancer* 2009;127:1158-71.
69. Semenza GL. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell* 2004;5:405-6.
70. Zhang W, Zhang H. Hypoxia-inducible factor-1 α suppressing apoptosis and increasing tolerance of lung cancer cells to chemotherapy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2006;26:520-3.
71. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3:177-85.
72. Pouyssegur J. Signal transduction. An arresting start for MAPK. *Science* 2000;290:1515-8.
73. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441:437-43.
74. Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 2007;405:1-9.
75. Semenza GL. Hypoxia and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:223-4.
76. Royds JA, Dower SK, Qwarnstrom EE, Lewis CE. Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NF κ B. *Mol Pathol* 1998;51:55-61.
77. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8204-9.
78. Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 2004;64:2627-33.
79. Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF- κ B pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* 2008;10:611-8.
80. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J Biol Chem* 2008;283:3979-87.
81. Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:598-608.
82. Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, *et al.* Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol* 2001;21:1297-310.
83. Cheung EC, Vousden KH. The role of p53 in glucose metabolism. *Curr Opin Cell Biol*;22:186-91.
84. Olovnikov IA, Kravchenko JE, Chumakov PM. Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Semin Cancer Biol* 2009;19:32-41.
85. Wong ET. Tumor growth, invasion, and angiogenesis in malignant gliomas. *J Neurooncol* 2006;77:295-6.
86. Gao CF, Xie Q, Su YL, *et al.* Proliferation and invasion: plasticity in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10528-33.
87. Zagzag D, Friedlander DR, Margolis B, *et al.* Molecular events implicated in brain tumor angiogenesis and invasion. *Pediatr Neurosurg* 2000;33:49-55.
88. Thorsen F, Tysnes BB. Brain tumor cell invasion, anatomical and biological considerations. *Anticancer Res* 1997;17:4121-6.
89. Bjerkgvig R, Lund-Johansen M, Edvardsen K. Tumor cell invasion and angiogenesis in the central nervous system. *Curr Opin Oncol* 1997;9:223-9.

90. Rouhi P, Lee SL, Cao Z, Hedlund EM, Jensen LD, Cao Y. Pathological angiogenesis facilitates tumor cell dissemination and metastasis. *Cell Cycle*;9:913-7.
91. Abe R. Angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Curr Pharm Des* 2008;14:3779.
92. Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res* 2005;25:3327-33.
93. Ellis LM. Angiogenesis and its role in colorectal tumor and metastasis formation. *Semin Oncol* 2004;31:3-9.
94. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29:15-8.
95. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:266-76.
96. Hockel M, Vaupel P. Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol* 2001;28:36-41.
97. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* 2004;14:198-206.
98. Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, *et al.* Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int J Radiat Biol* 2006;82:699-757.
99. Vaupel P, Thews O, Hoekel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001;18:243-59.
100. Kim JW, Gao P, Dang CV. Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:291-8.
101. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004;36:1-12.
102. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Hypoxia in cancer cell metabolism and pH regulation. *Essays Biochem* 2007;43:165-78.
103. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:223-9.
104. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res* 2001;49:614-7.
105. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;88:1474-80.
106. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:343-54.
107. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 2003;546:113-20.
108. Hawley SA, Davison M, Woods A, *et al.* Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996;271:27879-87.
109. Hardie DG, Pan DA. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* 2002;30:1064-70.
110. Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, *et al.* AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans* 2003;31:162-8.
111. Li J, Jiang P, Robinson M, Lawrence TS, Sun Y. AMPK-beta1 subunit is a p53-independent stress responsive protein that inhibits tumor cell growth upon forced expression. *Carcinogenesis* 2003;24:827-34.
112. Saitoh M, Nagai K, Nakagawa K, Yamamura T, Yamamoto S, Nishizaki T. Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol* 2004;67:2005-11.
113. Thoreen CC, Sabatini DM. AMPK and p53 help cells through lean times. *Cell Metab* 2005;1:287-8.

114. Fiscella M, Ullrich SJ, Zambrano N, *et al.* Mutation of the serine 15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell cycle progression. *Oncogene* 1993;8:1519-28.
115. Pitt SC, Davis R, Kunnimalaiyaan M, Chen H. AKT and PTEN expression in human gastrointestinal carcinoid tumors. *Am J Transl Res* 2009;1:291-9.
116. Chen M, Cassidy A, Gu J, *et al.* Genetic variations in PI3K-AKT-mTOR pathway and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* 2009;30:2047-52.
117. Takahashi K, Miyashita M, Makino H, *et al.* Expression of Akt and Mdm2 in human esophageal squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2009;87:42-7.
118. Renne C, Willenbrock K, Martin-Subero JI, *et al.* High expression of several tyrosine kinases and activation of the PI3K/AKT pathway in mediastinal large B cell lymphoma reveals further similarities to Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2007;21:780-7.
119. Riemenschneider MJ, Betensky RA, Pasedag SM, Louis DN. AKT activation in human glioblastomas enhances proliferation via TSC2 and S6 kinase signaling. *Cancer Res* 2006;66:5618-23.
120. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3892-9.
121. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, *et al.* The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* 2007;67:3043-53.
122. Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y, Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2002;21:1299-303.
123. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115:577-90.
124. Liang SH, Clarke MF. Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 2001;268:2779-83.
125. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, *et al.* The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3329-35.
126. Arsham AM, Plas DR, Thompson CB, Simon MC. Akt and hypoxia-inducible factor-1 independently enhance tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64:3500-7.
127. Krebs HA. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem* 1972;8:1-34.
128. Barker J, Khan MA, Solomos T. Mechanism of the Pasteur effect. *Nature* 1966;211:547-8.
129. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956;124:269-70.
130. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123:309-14.
131. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:985-93.
132. Curi R, Newsholme P, Newsholme EA. Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. *Biochem J* 1988;250:383-8.
133. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4:891-9.
134. Gatenby RA, Gawlinski ET. The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Res* 2003;63:3847-54.
135. Gatenby RA, Gawlinski ET. Mathematical models of tumour invasion mediated by transformation-induced alteration of microenvironmental pH. *Novartis Found Symp* 2001;240:85-96; discussion -9.

136. Bhujwala ZM, Artemov D, Aboagye E, *et al.* The physiological environment in cancer vascularization, invasion and metastasis. *Novartis Found Symp* 2001;240:23-38; discussion -45, 152-3.
137. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, *et al.* Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007;109:3812-9.
138. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, *et al.* Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005;105:659-69.
139. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 2008.
140. Jen KY, Cheung VG. Identification of novel p53 target genes in ionizing radiation response. *Cancer Res* 2005;65:7666-73.
141. Hers HG, Van Schaftingen E. Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem J* 1982;206:1-12.
142. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, *et al.* Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008;283:10892-903.
143. Langbein S, Zerilli M, Zur Hausen A, *et al.* Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br J Cancer* 2006;94:578-85.
144. Coy JF, Dressler D, Wilde J, Schubert P. Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clin Lab* 2005;51:257-73.
145. Coy JF, Dubel S, Kioschis P, *et al.* Molecular cloning of tissue-specific transcripts of a transketolase-related gene: implications for the evolution of new vertebrate genes. *Genomics* 1996;32:309-16.
146. Wikner C, Meshalkina L, Nilsson U, Backstrom S, Lindqvist Y, Schneider G. His103 in yeast transketolase is required for substrate recognition and catalysis. *Eur J Biochem* 1995;233:750-5.
147. Xu X, Zur Hausen A, Coy JF, Lochelt M. Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells. *Int J Cancer* 2009;124:1330-7.
148. Rais B, Comin B, Puigjaner J, *et al.* Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett* 1999;456:113-8.
149. Comin-Anduix B, Boren J, Martinez S, *et al.* The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. A metabolic control analysis study. *Eur J Biochem* 2001;268:4177-82.
150. Volker HU, Hagemann C, Coy J, *et al.* Expression of transketolase-like 1 and activation of Akt in grade IV glioblastomas compared with grades II and III astrocytic gliomas. *Am J Clin Pathol* 2008;130:50-7.
151. Foldi M, Stickeler E, Bau L, *et al.* Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer. *Oncol Rep* 2007;17:841-5.
152. Zhang S, Yue JX, Yang JH, Cai PC, Kong WJ. Overexpression of transketolase protein TKTL1 is associated with occurrence and progression in nasopharyngeal carcinoma: a potential therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2008;7:517-22.
153. Chen H, Yue JX, Yang SH, Ding H, Zhao RW, Zhang S. Overexpression of transketolase-like gene 1 is associated with cell proliferation in uterine cervix cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:43.
154. Schultz H, Kahler D, Branscheid D, Vollmer E, Zabel P, Goldmann T. TKTL1 is overexpressed in a large portion of non-small cell lung cancer specimens. *Diagn Pathol* 2008;3:35.

155. Staiger WI, Coy JF, Grobholz R, *et al.* Expression of the mutated transketolase TKTL1, a molecular marker in gastric cancer. *Oncol Rep* 2006;16:657-61.
156. Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:54-61.
157. Heerdt BG, Halsey HK, Lipkin M, Augenlicht LH. Expression of mitochondrial cytochrome c oxidase in human colonic cell differentiation, transformation, and risk for colonic cancer. *Cancer Res* 1990;50:1596-600.
158. Herrmann PC, Gillespie JW, Charboneau L, *et al.* Mitochondrial proteome: altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer. *Proteomics* 2003;3:1801-10.
159. Luciakova K, Kuzela S. Increased steady-state levels of several mitochondrial and nuclear gene transcripts in rat hepatoma with a low content of mitochondria. *Eur J Biochem* 1992;205:1187-93.
160. Modica-Napolitano JS, Singh KK. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion* 2004;4:755-62.
161. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997;389:300-5.
162. Liang Y, Diehn M, Watson N, *et al.* Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5814-9.
163. Shai R, Shi T, Kremen TJ, *et al.* Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas. *Oncogene* 2003;22:4918-23.
164. Bredel M, Bredel C, Juric D, *et al.* Functional network analysis reveals extended gliomagenesis pathway maps and three novel MYC-interacting genes in human gliomas. *Cancer Res* 2005;65:8679-89.
165. Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, *et al.* The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 2002;62:6674-81.
166. Kim MM, Clinger JD, Masayeva BG, *et al.* Mitochondrial DNA quantity increases with histopathologic grade in premalignant and malignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* 2004;10:8512-5.
167. Okamura S, Ng CC, Koyama K, *et al.* Identification of seven genes regulated by wild-type p53 in a colon cancer cell line carrying a well-controlled wild-type p53 expression system. *Oncol Res* 1999;11:281-5.
168. Zhou S, Kachhap S, Singh KK. Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells. *Mutagenesis* 2003;18:287-92.
169. Ibrahim MM, Razmara M, Nguyen D, Donahue RJ, Wubah JA, Knudsen TB. Altered expression of mitochondrial 16S ribosomal RNA in p53-deficient mouse embryos revealed by differential display. *Biochim Biophys Acta* 1998;1403:254-64.
170. Jaksch M, Ogilvie I, Yao J, *et al.* Mutations in SCO2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 2000;9:795-801.
171. Leary SC, Mattman A, Wai T, *et al.* A hemizygous SCO2 mutation in an early onset rapidly progressive, fatal cardiomyopathy. *Mol Genet Metab* 2006;89:129-33.
172. Joost K, Rodenburg R, Piirsoo A, van den Heuvel B, Zordania R, Ounap K. A novel mutation in the SCO2 gene in a neonate with early-onset cardioencephalomyopathy. *Pediatr Neurol*;42:227-30.
173. Mobley BC, Enns GM, Wong LJ, Vogel H. A novel homozygous SCO2 mutation, p.G193S, causing fatal infantile cardioencephalomyopathy. *Clin Neuropathol* 2009;28:143-9.
174. Sung HJ. Mitochondrial respiration protects against oxygen-associated DNA damage. *Nature communications* 2010;1:1-8.
175. Chinenov YV. Cytochrome c oxidase assembly factors with a thioredoxin fold are conserved among prokaryotes and eukaryotes. *J Mol Med* 2000;78:239-42.

176. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 2007;129:111-22.
177. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994;269:23757-63.
178. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006;3:187-97.
179. Lambert AJ, Brand MD. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol* 2009;554:165-81.
180. Indo HP, Davidson M, Yen HC, *et al.* Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* 2007;7:106-18.
181. Kamat JP, Devasagayam TP. Oxidative damage to mitochondria in normal and cancer tissues, and its modulation. *Toxicology* 2000;155:73-82.
182. Rathore R, Zheng YM, Niu CF, *et al.* Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1223-31.
183. Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J Biochem Biophys* 2009;46:9-15.
184. Suji G, Sivakami S. DNA damage by free radical production by aminoguanidine. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:191-9.
185. Misiaszek R, Crean C, Joffe A, Geacintov NE, Shafirovich V. Oxidative DNA damage associated with combination of guanine and superoxide radicals and repair mechanisms via radical trapping. *J Biol Chem* 2004;279:32106-15.
186. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002;32:1102-15.
187. Desireddi JR, Farrow KN, Marks JD, Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxia Increases ROS Signaling and Cytosolic Ca(2+) in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Mouse Lungs Slices. *Antioxid Redox Signal*;12:595-602.
188. Chi AY, Waypa GB, Mungai PT, Schumacker PT. Prolonged Hypoxia Increases ROS Signaling and RhoA Activation in Pulmonary Artery Smooth Muscle and Endothelial Cells. *Antioxid Redox Signal*;12:603-10.
189. Heberlein W, Wodopia R, Bartsch P, Mairbaurl H. Possible role of ROS as mediators of hypoxia-induced ion transport inhibition of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L640-8.
190. Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, *et al.* mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:719-24.
191. Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, *et al.* Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 2005;65:1655-63.
192. Yoon YS, Byun HO, Cho H, Kim BK, Yoon G. Complex II defect via down-regulation of iron-sulfur subunit induces mitochondrial dysfunction and cell cycle delay in iron chelation-induced senescence-associated growth arrest. *J Biol Chem* 2003;278:51577-86.
193. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, *et al.* Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 2005;1:401-8.
194. Bechtel W, Bauer G. Modulation of intercellular ROS signaling of human tumor cells. *Anticancer Res* 2009;29:4559-70.
195. Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, Neuzil J, Moreno-Sanchez R. Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. *Mol Aspects Med* 2009.

196. Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:695-705.
197. Guzy RD, Mack MM, Schumacker PT. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and gene transcription in yeast. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1317-28.
198. Napoli E, Taroni F, Cortopassi GA. Frataxin, iron-sulfur clusters, heme, ROS, and aging. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:506-16.
199. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007;12:913-22.
200. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:143-83.
201. Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev* 2007;39:443-55.
202. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000;62:649-71.
203. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287-312.
204. Bjornstedt M, Hamberg M, Kumar S, Xue J, Holmgren A. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem* 1995;270:11761-4.
205. Bjornstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1994;269:29382-4.
206. Ganther HE. Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. *Biochemistry* 1971;10:4089-98.
207. Kumar S, Bjornstedt M, Holmgren A. Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. *Eur J Biochem* 1992;207:435-39.
208. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993;300:535-43.
209. Tamura T, Gladyshev V, Liu SY, Stadtman TC. The mutual sparing effects of selenium and vitamin E in animal nutrition may be further explained by the discovery that mammalian thioredoxin reductase is a selenoenzyme. *Biofactors* 1995;5:99-102.
210. Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:195-204.
211. Xia L, Bjornstedt M, Nordman T, Eriksson LC, Olsson JM. Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway. *Eur J Biochem* 2001;268:1486-90.
212. Liu B, Chen Y, St Clair DK. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med* 2008;44:1529-35.
213. Tomko RJ, Jr., Bansal P, Lazo JS. Airing out an antioxidant role for the tumor suppressor p53. *Mol Interv* 2006;6:23-5, 2.
214. Ruiz-Lozano P, Hixon ML, Wagner MW, *et al.* p53 is a transcriptional activator of the muscle-specific phosphoglycerate mutase gene and contributes in vivo to the control of its cardiac expression. *Cell Growth Differ* 1999;10:295-306.
215. Chen K, Albano A, Ho A, Keaney JF, Jr. Activation of p53 by oxidative stress involves platelet-derived growth factor-beta receptor-mediated ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase activation. *J Biol Chem* 2003;278:39527-33.
216. Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 2004;304:596-600.

217. Yoon KA, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J Hum Genet* 2004;49:134-40.
218. Scheper GC, Voorma HO, Thomas AA. Basepairing with 18S ribosomal RNA in internal initiation of translation. *FEBS Lett* 1994;352:271-5.
219. Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabate A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem Sci* 2001;26:30-5.
220. Pastorino JG, Hoek JB. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* 2003;10:1535-51.
221. Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F, Luzzatto L. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *Embo J* 1995;14:5209-15.
222. Rapoport I, Elsner R, Muller M, Dumdey R, Rapoport S. NADPH production in the oxidative pentose phosphate pathway as source of reducing equivalents in glycolysis of human red cells in vitro. *Acta Biol Med Ger* 1979;38:901-8.
223. Markert CL. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. *Cell Biochem Funct* 1984;2:131-4.
224. Kaplan NO. Lactate Dehydrogenase--Structure and Function. *Brookhaven Symp Biol* 1964;17:131-53.
225. Bota DA, Van Remmen H, Davies KJ. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett* 2002;532:103-6.
226. Ngo JK, Davies KJ. Mitochondrial Lon protease is a human stress protein. *Free Radic Biol Med* 2009;46:1042-8.
227. Bota DA, Ngo JK, Davies KJ. Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radic Biol Med* 2005;38:665-77.
228. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:332-7.
229. Passonneau JV, Lowry OH. The role of phosphofructokinase in metabolic regulation. *Adv Enzyme Regul* 1964;2:265-74.
230. Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG, Hue L. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* 2004;381:561-79.
231. Leary SC, Sasarman F, Nishimura T, Shoubbridge EA. Human SCO2 is required for the synthesis of CO II and as a thiol-disulphide oxidoreductase for SCO1. *Hum Mol Genet* 2009.
232. Horng YC, Leary SC, Cobine PA, *et al.* Human Sco1 and Sco2 function as copper-binding proteins. *J Biol Chem* 2005;280:34113-22.
233. Atkinson DE. Citrate and the citrate cycle in the regulation of energy metabolism. *Biochem Soc Symp* 1968;27:23-40.
234. Boros LG, Lee PW, Brandes JL, *et al.* Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors: is cancer a disease of cellular glucose metabolism? *Med Hypotheses* 1998;50:55-9.
235. Novello F, McLean P. The pentose phosphate pathway of glucose metabolism. Measurement of the non-oxidative reactions of the cycle. *Biochem J* 1968;107:775-91.
236. Wischhusen J, Naumann U, Ohgaki H, Rastinejad F, Weller M. CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death. *Oncogene* 2003;22:8233-45.
237. Ryan JJ, Danish R, Gottlieb CA, Clarke MF. Cell cycle analysis of p53-induced cell death in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* 1993;13:711-9.

238. Ryan JJ, Prochownik E, Gottlieb CA, *et al.* c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5878-82.
239. Michalovitz D, Halevy O, Oren M. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 1990;62:671-80.
240. Akakura S, Yoshida M, Yoneda Y, Horinouchi S. A role for Hsc70 in regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53Val-135). *J Biol Chem* 2001;276:14649-57.
241. Naumann U, Durka S, Weller M. Dexamethasone-mediated protection from drug cytotoxicity: association with p21WAF1/CIP1 protein accumulation? *Oncogene* 1998;17:1567-75.
242. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J* 2003;22:4082-90.
243. Dyer BW, Ferrer FA, Klindedinst DK, Rodriguez R. A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal Biochem* 2000;282:158-61.
244. Wu HT, Allie N, Myer L, Govender D. Anaplastic neuroblastomas express transketolase-like enzyme 1. *J Clin Pathol* 2009;62:460-3.
245. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, *et al.* Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998;282:1497-501.
246. Erdal H, Berndtsson M, Castro J, Brunk U, Shoshan MC, Linder S. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:192-7.
247. Kaeser MD, Pebernard S, Iggo RD. Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:7598-605.
248. Okazaki T, Sakamuro D. Induction of Fas (CD95/APO-1) ligand is essential for p53-dependent apoptosis in an in vitro renal carcinoma model system. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:581-8.
249. Huang C, Li J, Zheng R, Cui K. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human hepatoma cells is mediated by CD95(APO-1/Fas) receptor/ligand system and may involve activation of wild-type p53. *Mol Biol Rep* 2000;27:1-11.
250. Munsch D, Watanabe-Fukunaga R, Bourdon JC, *et al.* Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:3867-72.
251. Fukazawa T, Fujiwara T, Morimoto Y, *et al.* Differential involvement of the CD95 (Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells. *Oncogene* 1999;18:2189-99.
252. Muller M, Wilder S, Bannasch D, *et al.* p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 1998;188:2033-45.
253. Miyake H, Hara I, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S. p53 modulation of Fas/Apo-1 mediated apoptosis in a human renal cell carcinoma cell line. *Int J Oncol* 1998;12:469-73.
254. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, *et al.* Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 1995;15:3032-40.
255. Weinmann L, Wischhusen J, Demma MJ, *et al.* A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2008;15:718-29.
256. Liu Q, El-Deiry WS, Gazitt Y. Additive effect of Apo2L/TRAIL and Adeno-p53 in the induction of apoptosis in myeloma cell lines. *Exp Hematol* 2001;29:962-70.
257. Pan Y, Oprysko PR, Asham AM, Koch CJ, Simon MC. p53 cannot be induced by hypoxia alone but responds to the hypoxic microenvironment. *Oncogene* 2004;23:4975-83.

258. Ashcroft M, Taya Y, Vousden KH. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 2000;20:3224-33.
259. Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Jr., Giaccia AJ. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 1994;14:6264-77.
260. Cosse JP, Ronvaux M, Ninane N, Raes MJ, Michiels C. Hypoxia-induced decrease in p53 protein level and increase in c-jun DNA binding activity results in cancer cell resistance to etoposide. *Neoplasia* 2009;11:976-86.
261. Grier JD, Xiong S, Elizondo-Fraire AC, Parant JM, Lozano G. Tissue-specific differences of p53 inhibition by Mdm2 and Mdm4. *Mol Cell Biol* 2006;26:192-8.
262. Chin MY, Li G. Tissue-specific regulation of checkpoint kinase 2 expression by p53. *Exp Mol Pathol* 2003;75:131-6.
263. Fei P, Bernhard EJ, El-Deiry WS. Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res* 2002;62:7316-27.
264. Lin P, Bush JA, Cheung KJ, Jr., Li G. Tissue-specific regulation of Fas/APO-1/CD95 expression by p53. *Int J Oncol* 2002;21:261-4.
265. Tendler Y, Weisinger G, Coleman R, *et al.* Tissue-specific p53 expression in the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;72:40-6.
266. Krieg AJ, Hammond EM, Giaccia AJ. Functional analysis of p53 binding under differential stresses. *Mol Cell Biol* 2006;26:7030-45.
267. Hammond EM, Mandell DJ, Salim A, *et al.* Genome-wide analysis of p53 under hypoxic conditions. *Mol Cell Biol* 2006;26:3492-504.
268. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:617-26.
269. Choi KS, Bae MK, Jeong JW, Moon HE, Kim KW. Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:120-7.
270. Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis. *Curr Pharm Des* 2003;9:531-41.
271. Berra E, Milanini J, Richard DE, *et al.* Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1171-8.
272. Semenza GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. *J Clin Invest* 2001;108:39-40.
273. Fels DR, Koumenis C. HIF-1 α and p53: the ODD couple? *Trends Biochem Sci* 2005;30:426-9.
274. Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res* 1992;52:674-9.
275. Hosein AN, Wu M, Arcand SL, *et al.* Breast Carcinoma-Associated Fibroblasts Rarely Contain p53 Mutations or Chromosomal Aberrations. *Cancer Res*.
276. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 2001;29:345-50.
277. Hancock JT. The role of redox mechanisms in cell signalling. *Mol Biotechnol* 2009;43:162-6.
278. Miettinen HE, Paunu N, Rantala I, *et al.* Cell cycle regulators (p21, p53, pRb) in oligodendrocytic tumors: a study by novel tumor microarray technique. *J Neurooncol* 2001;55:29-37.
279. Ma W, Sung HJ, Park JY, Matoba S, Hwang PM. A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis. *J Bioenerg Biomembr* 2007;39:243-6.
280. Leary SC, Kaufman BA, Pellecchia G, *et al.* Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet* 2004;13:1839-48.

281. Jaksch M, Paret C, Stucka R, *et al.* Cytochrome c oxidase deficiency due to mutations in SCO2, encoding a mitochondrial copper-binding protein, is rescued by copper in human myoblasts. *Hum Mol Genet* 2001;10:3025-35.
282. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
283. Tsilibaris V, Maenhaut-Michel G, Van Melderen L. Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Res Microbiol* 2006;157:701-13.
284. Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A. Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* 2005;280:41928-39.
285. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 2002;277:23111-5.
286. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer* 2006;93:E73-80.
287. Dunkern TR, Wedemeyer I, Baumgartner M, Fritz G, Kaina B. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair (Amst)* 2003;2:49-60.
288. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, *et al.* p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994;266:807-10.
289. Sun W, Liu Y, Glazer CA, *et al.* TKTL1 is activated by promoter hypomethylation and contributes to head and neck squamous cell carcinoma carcinogenesis through increased aerobic glycolysis and HIF1alpha stabilization. *Clin Cancer Res*;16:857-66.
290. Zhong H, Chiles K, Feldser D, *et al.* Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000;60:1541-5.
291. Kirito K, Hu Y, Komatsu N. HIF-1 prevents the overproduction of mitochondrial ROS after cytokine stimulation through induction of PDK-1. *Cell Cycle* 2009;8:2844-9.
292. Galanis A, Pappa A, Giannakakis A, Lanitis E, Dangaj D, Sandaltzopoulos R. Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer. *Cancer Lett* 2008;266:12-20.
293. Dai S, Huang ML, Hsu CY, Chao KS. Inhibition of hypoxia inducible factor 1alpha causes oxygen-independent cytotoxicity and induces p53 independent apoptosis in glioblastoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:1027-36.
294. Beppu T, Kamada K, Yoshida Y, Arai H, Ogasawara K, Ogawa A. Change of oxygen pressure in glioblastoma tissue under various conditions. *J Neurooncol* 2002;58:47-52.
295. Cerniglia GJ, Wilson DF, Pawlowski M, Vinogradov S, Biaglow J. Intravascular oxygen distribution in subcutaneous 9L tumors and radiation sensitivity. *J Appl Physiol* 1997;82:1939-45.
296. Scigliano S, Pinel S, Poussier S, *et al.* Measurement of hypoxia using invasive oxygen-sensitive electrode, pimonidazole binding and 18F-FDG uptake in anaemic or erythropoietin-treated mice bearing human glioma xenografts. *Int J Oncol* 2008;32:69-77.
297. Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest* 2004;84:397-405.
298. Rodas RA, Fenstermaker RA, McKeever PE, *et al.* Correlation of intraluminal thrombosis in brain tumor vessels with postoperative thrombotic complications: a preliminary report. *J Neurosurg* 1998;89:200-5.
299. Chen D, Li M, Luo J, Gu W. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* 2003;278:13595-8.

300. Gatenby RA, Gillies RJ. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1358-66.
301. Kilic M, Kasperczyk H, Fulda S, Debatin KM. Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene* 2007;26:2027-38.
302. Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brune B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett* 2006;237:10-21.
303. Zhao Y, Chen XQ, Du JZ. Cellular adaptation to hypoxia and p53 transcription regulation. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009;10:404-10.
304. Liu T, Laurell C, Selivanova G, Lundberg J, Nilsson P, Wiman KG. Hypoxia induces p53-dependent transactivation and Fas/CD95-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 2007;14:411-21.
305. Li DW, Liu JP, Schmid PC, *et al.* Protein serine/threonine phosphatase-1 dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to modulate its transcriptional and apoptotic activities. *Oncogene* 2006;25:3006-22.
306. Plasilova M, Schonmeyer B, Fernandez J, Clavin N, Soares M, Mehrara BJ. Accelerating stem cell proliferation by down-regulation of cell cycle regulator p21. *Plast Reconstr Surg* 2009;123:149S-57S.
307. Werner SR, Lee PA, DeCamp MW, Crowell DN, Randall SK, Crowell PL. Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21(Cip1/Waf1) by PRL tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* 2003;202:201-11.
308. Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, Duraisingham S, Crook T, Lu X. ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol Cell Biol* 2004;24:1341-50.
309. Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, *et al.* ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 2001;8:781-94.
310. Chandel NS, Vander Heiden MG, Thompson CB, Schumacker PT. Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene* 2000;19:3840-8.
311. Grossman SR. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem* 2001;268:2773-8.
312. Grossman SR, Perez M, Kung AL, *et al.* p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell* 1998;2:405-15.
313. Schmid T, Zhou J, Kohl R, Brune B. p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem J* 2004;380:289-95.
314. Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, Trepel J, Fojo T, Neckers L. p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem* 1998;273:11995-8.
315. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000;14:34-44.
316. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 1999;24:68-72.
317. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *Embo J* 1998;17:5085-94.
318. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, *et al.* Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 2009;29:2570-81.
319. Mazure NM, Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol*;22:177-80.
320. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:718-22.
321. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, *et al.* Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004;64:6892-9.
322. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.

323. Leary SC, Cobine PA, Kaufman BA, *et al.* The human cytochrome c oxidase assembly factors SCO1 and SCO2 have regulatory roles in the maintenance of cellular copper homeostasis. *Cell Metab* 2007;5:9-20.
324. Scoumanne A, Chen X. Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation. *Histol Histopathol* 2008;23:1143-9.
325. el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 1998;8:345-57.
326. Hwang PM, Bunz F, Yu J, *et al.* Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med* 2001;7:1111-7.
327. Appella E, Anderson CW. Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol Biol (Paris)* 2000;48:227-45.
328. Meek DW. Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal* 1998;10:159-66.
329. Xenaki G, Ontikatzte T, Rajendran R, *et al.* PCAF is an HIF-1 α cofactor that regulates p53 transcriptional activity in hypoxia. *Oncogene* 2008;27:5785-96.
330. Bota DA, Davies KJ. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol* 2002;4:674-80.
331. Gur E, Sauer RT. Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease. *Genes Dev* 2008;22:2267-77.
332. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, *et al.* Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res* 2003;93:1074-81.
333. Brand KA, Hermfisse U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *Faseb J* 1997;11:388-95.
334. Jin S. p53, Autophagy and tumor suppression. *Autophagy* 2005;1:171-3.
335. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 2007;3:28-31.
336. Yee KS, Wilkinson S, James J, Ryan KM, Vousden KH. PUMA- and Bax-induced autophagy contributes to apoptosis. *Cell Death Differ* 2009;16:1135-45.
337. Morselli E, Tasmemir E, Maiuri MC, *et al.* Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle* 2008;7:3056-61.
338. Tasmemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E, *et al.* A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* 2008;4:810-4.
339. Tasmemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, *et al.* Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 2008;10:676-87.
340. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA, Gustafsson AB. Autophagy as a protective response to Bnip3-mediated apoptotic signaling in the heart. *Autophagy* 2006;2:307-9.
341. Bohensky J, Leshinsky S, Srinivas V, Shapiro IM. Chondrocyte autophagy is stimulated by HIF-1 dependent AMPK activation and mTOR suppression. *Pediatr Nephrol*;25:633-42.
342. Hussain MZ, Ghani QP, Hunt TK. Inhibition of prolyl hydroxylase by poly(ADP-ribose) and phosphoribosyl-AMP. Possible role of ADP-ribosylation in intracellular prolyl hydroxylase regulation. *J Biol Chem* 1989;264:7850-5.
343. McFate T, Mohyeldin A, Lu H, *et al.* Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J Biol Chem* 2008;283:22700-8.
344. Vleugel MM, Shvarts D, van der Wall E, van Diest PJ. p300 and p53 levels determine activation of HIF-1 downstream targets in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 2006;37:1085-92.

345. Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, *et al.* HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* 2005;24:3110-20.
346. Minchenko O, Opentanova I, Caro J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett* 2003;554:264-70.
347. Fukasawa M, Tsuchiya T, Takayama E, *et al.* Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J Biochem* 2004;136:273-7.
348. Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, Moreno-Sanchez R. HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:1084-101.
349. Ramos-Montoya A, Lee WN, Bassilian S, *et al.* Pentose phosphate cycle oxidative and nonoxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int J Cancer* 2006;119:2733-41.
350. Boros LG, Puigjaner J, Cascante M, *et al.* Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Res* 1997;57:4242-8.
351. Bilim V, Kawasaki T, Takahashi K, Tomita Y. Adriamycin induced G2/M cell cycle arrest in transitional cell cancer cells with wt p53 and p21(WAF1/CIP1) genes. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19:483-8.
352. Fukuda M, Yamaguchi S, Ohta T, *et al.* Combination therapy for advanced breast cancer: cyclophosphamide, doxorubicin, UFT, and tamoxifen. *Oncology (Williston Park)* 1999;13:77-81.
353. Lenzhofer R, Dudeczak R, Dittrich C, Gumhold G, Moser K, Spitzky KH. [Monitoring of cardiac function during doxorubicin therapy in metastasized breast cancer. Measuring systolic time interval]. *Dtsch Med Wochenschr* 1983;108:771-5.
354. Johnson S, Smith AG, Loffler H, *et al.* Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet* 1996;347:1432-8.
355. Takeuchi J, Kyo T, Naito K, *et al.* Induction therapy by frequent administration of doxorubicin with four other drugs, followed by intensive consolidation and maintenance therapy for adult acute lymphoblastic leukemia: the JALSG-ALL93 study. *Leukemia* 2002;16:1259-66.
356. Jeong YI, Jin SG, Kim IY, *et al.* Doxorubicin-incorporated nanoparticles composed of poly(ethylene glycol)-grafted carboxymethyl chitosan and antitumor activity against glioma cells in vitro. *Colloids Surf B Biointerfaces*;79:149-55.
357. Baltes S, Freund I, Lewis AL, Nolte I, Brinker T. Doxorubicin and irinotecan drug-eluting beads for treatment of glioma: a pilot study in a rat model. *J Mater Sci Mater Med*;21:1393-402.
358. Kasperczyk J, Stoklosa K, Dobrzynski P, Stepień K, Kaczmarczyk B, Dzierzega-Leczna A. Designing bioresorbable polyester matrices for controlled doxorubicin release in glioma therapy. *Int J Pharm* 2009;382:124-9.
359. Chen L, Feng P, Li S, *et al.* Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha silencing on the sensitivity of human brain glioma cells to doxorubicin and etoposide. *Neurochem Res* 2009;34:984-90.
360. Alvarez-Tejado M, Naranjo-Suarez S, Jimenez C, Carrera AC, Landazuri MO, del Peso L. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:22368-74.

361. Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* 2008;15:521-9.
362. Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, *et al.* Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* 2004;16:819-30.
363. Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:7610-8.
364. Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 2008;40:171-82.
365. Chiara F, Castellaro D, Marin O, *et al.* Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PLoS One* 2008;3:e1852.
366. Shoshan-Barmatz V, Zakar M, Rosenthal K, Abu-Hamad S. Key regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:421-30.
367. Kreisl TN, Kotliarova S, Butman JA, *et al.* A phase I/II trial of enzastaurin in patients with recurrent high-grade gliomas. *Neuro Oncol*;12:181-9.
368. Wick W, Puduvalli VK, Chamberlain MC, *et al.* Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J Clin Oncol*;28:1168-74.
369. Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, *et al.* The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res* 2005;65:7462-9.
370. Chamberlain MC. Cilengitide: does it really represent a new targeted therapy for recurrent glioblastoma? *J Clin Oncol* 2009;27:1921; author reply 2.
371. Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, *et al.* Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2008;26:5610-7.
372. Reardon DA, Nabors LB, Stupp R, Mikkelsen T. Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17:1225-35.
373. Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Oncologist* 2009;14:1131-8.
374. Fischer I, Cunliffe CH, Bollo RJ, *et al.* High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin: initial observations. *Neuro Oncol* 2008;10:700-8.
375. Rieger J, Bahr O, Ronellenfitsch MW, Steinbach J, Hattingen E. Bevacizumab-induced diffusion restriction in patients with glioma: tumor progression or surrogate marker of hypoxia? *J Clin Oncol*;28:e477; author reply e8.
376. Baguley BC. Antivascular therapy of cancer: DMXAA. *Lancet Oncol* 2003;4:141-8.
377. Hinnen P, Eskens FA. Vascular disrupting agents in clinical development. *Br J Cancer* 2007;96:1159-65.
378. Thorpe PE. Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2004;10:415-27.
379. Cairns RA, Papandreou I, Sutphin PD, Denko NC. Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:9445-50.
380. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, *et al.* A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain*;133:983-95.

381. Yasuda H. Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radio-resistance: novel strategy for cancer therapy: nitric oxide donor as a therapeutic enhancer. *Nitric Oxide* 2008;19:205-16.
382. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus Clin Biol* 2005;12:5-10.
383. Brown JM. Tumor hypoxia, drug resistance, and metastases. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:338-9.
384. Jansen M, de Witt Hamer PC, Witmer AN, Troost D, van Noorden CJ. Current perspectives on antiangiogenesis strategies in the treatment of malignant gliomas. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;45:143-63.
385. Puduvalli VK, Sawaya R. Antiangiogenesis -- therapeutic strategies and clinical implications for brain tumors. *J Neurooncol* 2000;50:189-200.
386. Rieger J, Bahr O, Muller K, Franz K, Steinbach J, Hattingen E. Bevacizumab-induced diffusion-restricted lesions in malignant glioma patients. *J Neurooncol* 2009.
387. Duan JX, Jiao H, Kaizerman J, *et al.* Potent and highly selective hypoxia-activated achiral phosphoramidate mustards as anticancer drugs. *J Med Chem* 2008;51:2412-20.
388. Hicks KO, Myint H, Patterson AV, *et al.* Oxygen dependence and extravascular transport of hypoxia-activated prodrugs: comparison of the dinitrobenzamide mustard PR-104A and tirapazamine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69:560-71.
389. Zhao D, Najbauer J, Garcia E, *et al.* Neural stem cell tropism to glioma: critical role of tumor hypoxia. *Mol Cancer Res* 2008;6:1819-29.
390. Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 2006;127:1323-34.
391. Senatus PB, Li Y, Mandigo C, *et al.* Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide. *Mol Cancer Ther* 2006;5:20-8.
392. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, *et al.* Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 2007;445:661-5.
393. Weinmann M, Belka C, Guner D, *et al.* Array-based comparative gene expression analysis of tumor cells with increased apoptosis resistance after hypoxic selection. *Oncogene* 2005;24:5914-22.
394. Vaupel PW. The influence of tumor blood flow and microenvironmental factors on the efficacy of radiation, drugs and localized hyperthermia. *Klin Padiatr* 1997;209:243-9.
395. Hewitson KS, Schofield CJ. The HIF pathway as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 2004;9:704-11.
396. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*;20:51-6.
397. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 2005;7:134-53.
398. Xia C, Meng Q, Liu LZ, Rojanasakul Y, Wang XR, Jiang BH. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2007;67:10823-30.
399. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* 2006;86:1221-32.
400. Fujiwara S, Nakagawa K, Harada H, *et al.* Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *Int J Oncol* 2007;30:793-802.

401. Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R, Loges S, Westphal M, Lamszus K. Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int J Cancer* 2007;121:276-83.
402. Mendez O, Zavadil J, Esencay M, *et al.* Knock down of HIF-1alpha in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. *Mol Cancer*;9:133.
403. Djagaeva I, Doronkin S. Hypoxia response pathway in border cell migration. *Cell Adh Migr*;4.
404. Wang Y, Li Z, Zhang H, *et al.* HIF-1alpha and HIF-2alpha correlate with migration and invasion in gastric cancer. *Cancer Biol Ther*;10.
405. Diserens AC, de Tribolet N, Martin-Achard A, Gaide AC, Schnegg JF, Carrel S. Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta Neuropathol* 1981;53:21-8.
406. Godbout R, Miyakoshi J, Dobler KD, *et al.* Lack of expression of tumor-suppressor genes in human malignant glioma cell lines. *Oncogene* 1992;7:1879-84.

8 Anhang

(Teil-)Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Publikationen:

- **Nordhammer C.**, Brucker D. P., Weller, M., Steinbach, J.P., Rieger J.: *Synthesis of cytochrome c oxidase 2: a p53-dependent metabolic regulator that promotes respiratory function and protects glioma cells from hypoxia-induced cell death.*
Eingereicht in Oncogene

Poster:

- **Nordhammer C.**, Brucker DP, Rieger J, Steinbach JP, Weller M: „Zur Bedeutung der PI3K für die EGFR/p53-Dichotomie in der Pathogenese des Glioblastoms“, IZKF Verbundprojekt 1468-0-0 **Tübingen 2007** und **Frankfurt am Main, Deutschland, 2008**
- Steinbach JP, **Nordhammer C.**, Rieger J, Brucker DP, Wolking S, Weller M: „p53: an antagonist of EGFR-mediated metabolic activity in human malignant glioma cells“, WFNO, **Yokohama, Japan 2009**
- **Nordhammer C.**, Rieger J, Steinbach JP, Weller M: „loss of p53 sensitizes glioma cells towards hypoxia via reduced SCO2 expression and impaired cellular respiration“, UCT Science Day **Frankfurt am Main, Deutschland, 2009**
- **Nordhammer C.**, Brucker DP, Rieger J, Weller M, Steinbach JP: „Synthesis of cytochrome c oxidase 2 (SCO2): a p53-dependent metabolic regulator that promotes respiratory chain function and protects glioma cells from hypoxia-induced cell death“, Keystone symposia on molecular and cellular biology, metabolism and cancer progression, **Vancouver, Kanada, 2010** und International brain tumor research conference, **Seeheim-Jugenheim, Deutschland 2010**

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit (einschließlich Abbildungen), die anderen Ursprungs sind in jedem Einzelfall mit Angabe des Urhebers als solche kenntlich gemacht habe.

Des weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht ist, sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die von mir vorgelegte Dissertation wurde von Prof. Dr. med. J. P. Steinbach der Fakultät Medizin der Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt betreut.

Die Promotion wurde u.a. mit Fördermitteln der DFG (Graduiertenkolleg GRK 1302/1 „Der PI3K-Signalweg bei Tumorwachstum und Diabetes“) durchgeführt.

Frankfurt am Main, den

Christina Nordhammer

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2007 bis Dezember 2010 am Hertie Institut für Hirnforschung in Tübingen und am Dr. Senckenbergisches Institut für Neuroonkologie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe Neuroonkologie von Prof. Dr. J.P. Steinbach angefertigt. Sie wurde u.a. durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG GRK 1302/1) gefördert, bei der ich mich für die Förderung sehr bedanken möchte.

Bei Prof. Dr. J.P. Steinbach möchte ich mich für die Bereitstellung der interessanten Themen, die Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Eckhardt Boles möchte ich für die schnelle und unkomplizierte Übernahme der naturwissenschaftlichen Erstkorrektorschaft danken.

Besonders möchte ich mich auch bei Dr. Johannes Rieger für die Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Bei den Arbeitsgruppen Platte und Kögel/Auburger des Blauen Turms in FFM möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit und die Bereitstellung einiger Geräte bedanken.

Vielen Dank an Vousden K.H. und Bensaad K. für die sehr schnelle und unkomplizierte Bereitstellung der Vektoren pcDNA3.1-Flag-TIGAR und pcDNA3.1-Flag-TIGAR-TM, an Hwang P.M. für die des pcDNA3.1-SCO2-Plasmids, an Clarke M.F. für die der hygro/p53^{V135A}-Vektoren, an Böhl M. (Tavargenix GmbH, Darmstadt) für die des TKTL1 F24L-pDONR221-Plasmids, und an Pouyssegur J. für die des HIF-1 α Reporter Vektors.

Natürlich wäre diese Doktorarbeit nie ohne die vielen Leute im Labor zustande gekommen. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Weller und Jucker im Hertie Institut in Tübingen bedanken, die mir in meinen zwei Tübinger Jahre hilfreich und freundschaftlich zur Seite gestanden haben und mir u.a. die deutsche Grammatik, das Kickern, die schwäbische Sprache und -Esskultur näher gebracht haben, und natürlich auch labormäßig einiges beigebracht haben. Speziellen Dank gebührt Daniel Brucker, ohne den so manches im Labor nicht laufen würde und der u.a. die Sauerstoffmessungen ermöglichte. Gabriele Maurer, Michael Ronellenfitsch, Michael Burger und Oliver Bähr, die wie ich aus dem beschaulichen Tübingen in die Großstadt Frankfurt gezogen sind, möchte ich für die schöne Zeit im Labor, die Unterstützung und Freundschaft danken. Viel Dank gebührt auch den fleißigen Helferinnen in der Klinik, Suze, Susanne, Jana und „Frau Wasi“. Auch unseren Nachwuchsdoktoranden Stefan, Sebastian und Steffi gebührt hier einen herzlichen Dank für die nette Zusammenarbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir in vielen Bereichen zur Seite stand, und ohne die diese Arbeit nicht zur Stande gekommen wäre. Ein großes Merci!

Last but not least möchte ich mich ganz herzlich bei Lukas bedanken, der mich immer wieder liebevoll unterstützt und zum Weitermachen ermutigt hat, und der mit viel Hingabe die Erstkorrektur dieser Arbeit übernommen hat.

Lebenslauf

Name: Christina Anna Barbara Nordhammer

Geburtsdatum/Ort: 19.01.1980 in Casablanca, Marokko

04/2008-12/2010 Naturwiss. Doktorandin am Dr. Senckenbergisches Institut für Neuroonkologie, Frankfurt am Main, Prof. J.P. Steinbach

02/2007-03/2008 Naturwiss. Doktorandin am Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung, Abt. Allgemeine Neurologie, Tübingen, Prof. J.P. Steinbach

05/2006-01/2007 Wiss. Angestellte am Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung, Abt. Zellbiologie Neuronaler Erkrankungen, Tübingen, Prof. M. Jucker

2000-2005 Studium Diplom-Biologie an der Justus-Liebig Universität in Gießen
Schwerpunkte Genetik, Biochemie, Mikrobiologie, Zusatzfach Anthropologie, Abschlussarbeit im Institut für Genetik (Prof. R. Renkawitz): "Herstellung und Charakterisierung eines CTCF-*Knock-outs/Knock-downs*"

1999-2006 Studium Gymnasiallehramt Französisch/Biologie an der Justus-Liebig Universität in Gießen, 1.Staatsexamen

1997-1998 Gymnasium Lycée d'Enseignement Général et Technique (LEGT) in Haguenau, Frankreich

1990-1997 Gymnasium Lycée Lyautey in Casablanca, Marokko

1986-1990 Grundschule Ecole Molière in Casablanca, Marokko