

Betrachtung des Zellmetabolismus mit Fokus auf Hexokinase 2 und IGFBP-2 im Tumorresistenzgeschehen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. Nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von:

Michael Sebastian Schmidt

aus

Bad Honnef

Bonn, 2025

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachter/Betreuer: Prof. Dr. Gerd Bendas

Gutachterin: PD Dr. Anke Schiedel

Tag der Promotion: 06.02.2025

Erscheinungsjahr: 2025

*All mistakes are important.
Learning from that experience makes you who you are.
So go make mistakes, go live your life.*

Clayton Knight

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	1
2. THEORIE	3
2.1 Glucosestoffwechsel	3
2.2 Enzyme des Glucosestoffwechsels	11
2.3 Glykolyseinhibitoren	19
2.4 IGF-System	22
2.5 Zytostatika und Resistenzmechanismen	26
3. ZIEL DER ARBEIT	33
4. MATERIAL UND METHODEN	34
4.1 Material	34
4.2 Zelllinien	48
4.3 Zellkultur	50
4.4 Glucosemessung	53
4.5 MTT-Assay	54
4.6 qPCR	58
4.7 Proteinanalytik mittels Gelelektrophorese und Western Blot	63
4.8 Proteinanalytik mittels ELISA	67
4.9 Durchflusszytometrie	69
4.10 Migrationsassay	71
4.11 Knockdown mittels siRNA	73
4.12 Statistik	76
5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	77
5.1 IGFBP-2-Expression in Mammakarzinomzellen	77

Inhaltsverzeichnis

5.2	Einfluss von Glucose und IGFBP-2 auf das Migrationsverhalten	79
5.3	Einfluss von Glucose und rekombinantem IGFBP-2 auf das Resistenzverhalten	82
5.4	Einfluss eines IGFBP-2-Knockdowns auf die Zytostatikaempfindlichkeit	83
5.5	Zwischenfazit IGFBP-2 in Mammakarzinomzellen	86
5.6	Glucoseabhängigkeit von Tumorzellen	87
5.7	Einfluss von Glucosestoffwechsellinhibitoren	90
5.8	Expression von Enzymen des Glucosestoffwechsels	98
5.9	Intrazelluläres Doxorubicin in Abhängigkeit von 3-BrPA	103
5.10	Knockdown der Hexokinase 2	105
5.11	Zwischenfazit Glucosestoffwechsel und Zytostatikaresistenz in Ovarialkarzinomzellen	108
6.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	111
7.	LITERATUR	114
8.	ANHANG	140
8.1	Tabellenverzeichnis	140
8.2	Formelverzeichnis	141
8.3	Abbildungsverzeichnis	142
8.4	Danksagung	145

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
2-DG	2-Deoxyglucose
3-BrPA	3-Bromopyruvat
A	Ampere
AB	<i>antibody</i>
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CEB	<i>cell extraction buffer</i>
C_T	<i>cycle threshold</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EC₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH₂	Dihydro-Flavin-Adenin-Dinukleotid
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glucosetransporter
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunden
HBD	Heparinbindungsdomäne

Abkürzungsverzeichnis

HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP27	Hitzeschockprotein 27
HXK2	Hexokinase 2
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFBP-2	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i>
K/D	Knockdown
LDH-A	Laktatdehydrogenase A
M	Molar [mol/l]
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
MDR1	<i>multidrug-resistance-protein 1</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
PFK1	Phosphofruktokinase 1
PFKFB	Phosphofruktokinase 2
P-gp	<i>permeability glycoprotein</i>
PIC	<i>protease-inhibitor-cocktail</i>
PKM	Pyruvatkinase, muskulär
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNase	Ribonukleasen
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPL13	<i>60S ribosomal protein L13</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkriptase
sc	<i>scrambled control</i>

Abkürzungsverzeichnis

SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i>
V	Volt
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1. Einleitung

Im Jahr 2022 stellten maligne Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Vereinigten Staaten dar. Diese forderten dort ein Vielfaches mehr an Todesopfern als die globale Pandemie COVID-19 (1). Die Wahrscheinlichkeit einmal im Leben an Krebs zu erkranken liegt bei ungefähr 40 %, sodass sich ein großer Teil der Bevölkerung im Laufe des Lebens mit einer antitumoralen Therapie auseinandersetzen muss (2). Diabeteserkrankungen zählten 2022 in den USA ebenfalls zu den zehn häufigsten Todesursachen (1). Diabetes- und Krebserkrankungen teilen sich viele Risikofaktoren, wie Übergewicht, übermäßiger Alkoholkonsum, ungesunde Ernährung und Rauchen (3). Weiterhin ist das Leitsymptom einer diabetischen Erkrankung, das Vorliegen einer Hyperglykämie, ein direkter Risikofaktor für diverse Krebsarten, wodurch diese beiden Erkrankungen oft gemeinsam auftreten (3–6). Das Vorliegen einer Hyperglykämie steigert sowohl die Prävalenz maligner Tumore als auch die Mortalitätsrate von Tumorpatienten. Dabei nimmt der hyperglykämische Zustand einen vielfältigen Einfluss auf das zelluläre Geschehen und kann die Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen begünstigen (7).

Obwohl es in den letzten Jahren beeindruckende Entwicklungen in der zielgerichteten Therapie von Krebserkrankungen gab (8), ist eine klassische, zytotoxische Therapie nach wie vor unverzichtbar. Diese Behandlung ist allerdings fast immer mit mehreren, teils starken, unerwünschten Arzneimittelwirkungen verbunden, die häufig schwere Langzeitschäden verursachen und somit eine große Belastung für die Patienten darstellen (9, 10). Ein weiteres Problem ist das Auftreten von komplexen, multifaktoriellen Resistenzen gegenüber klassischen Zytostatika. Die Resistenzentwicklung ist in der Regel nicht nur gegen den zur Behandlung eingesetzten Wirkstoff gerichtet, sondern gegen eine ganze Klasse zytotoxischer Substanzen. Dies kann oft zu einem Misserfolg der Therapie führen (11–14). Aus diesem Grund liegt nach wie vor großes wissenschaftliches Interesse darin neue Therapieansätze zu finden, vor allem für Krebsarten mit hoher Inzidenz und/oder hoher Mortalität, die nicht mit einer zielgerichteten Therapie adressiert werden können. Dabei wird stets nach neuen Ansatzpunkten gesucht, um mittels der Antitumorbehandlung hauptsächlich maligne Zellen anzugreifen und gesundes Gewebe möglichst unbeschädigt zu lassen. Das Ziel ist es, die Anzahl und Schwere unerwünschter Arzneimittelwirkungen so gering wie möglich zu halten. Dazu ist es sinnvoll, bei der Behandlung möglichst dort anzusetzen, wo sich eine Tumorzelle von einer gesunden Zelle unterscheidet.

Diese klassischen Unterschiede, die sich bei der Entwicklung einer malignen Erkrankung ergeben, werden als *hallmarks of cancer* betitelt. Diese umfassen acht Eigenschaften, durch die sich Tumorzellen von gesundem Gewebe unterscheiden. Neben den klassisch bekannten Eigenschaften, wie beispielsweise der Evasion der Apoptose oder der ungehemmten Vermehrung, ist auch ein veränderter Energiestoffwechsel der Tumorzellen ein solches Charakteristikum (15). Es wird schon

Einleitung

länger versucht diese Veränderungen als Therapieansatz zu nutzen, um die Behandlung von Krebserkrankungen zu verbessern. Einzelne Substanzen, die hemmend auf den Energiestoffwechsel eingreifen, wurden bereits in klinischen Studien untersucht (16, 17). Gerade in den letzten Jahren beschäftigen sich auch vermehrt Forschungsarbeiten mit dem Thema, inwiefern sich der Glucosestoffwechsel durch die Entwicklung einer Zytostatikaresistenz noch weiter verändert und was dessen Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Resistenz ist (18–21).

Diese Arbeit soll dazu beitragen die Korrelation zwischen dem Energiestoffwechsel und einer Zytostatikaresistenz besser zu verstehen. Dafür wird in einem Spektrum von unterschiedlichen Zelllinien mit verschiedenen Resistenzmechanismen untersucht, inwiefern sich die Entwicklung einer Resistenz in einem veränderten Stoffwechsel niederschlägt. Dabei liegt der Fokus zum einen auf dem Wachstumsfaktor-Bindeprotein IGFBP-2 und dessen eigenen, vom IGF unabhängigen Effekten. Weiterhin wird der Einfluss einer Resistenzentwicklung auf die Expression der wichtigsten, regulatorischen Glykolyseenzyme untersucht. Abschließend soll die Eignung eines Eingriffs in den Stoffwechsel zur Überwindung einer Chemoresistenz getestet werden.

2. Theorie

2.1 Glucosestoffwechsel

2.1.1 Überblick Glucosestoffwechsel

Der Glucosestoffwechsel dient hauptsächlich der Bereitstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). ATP, die wichtigste Energiewährung der Zelle, wird fast ausschließlich durch die Verstoffwechslung von Glucose gewonnen und die ATP-Gewinnung aus dem Fett- und Proteinstoffwechsel spielt nur eine untergeordnete Rolle. Das aus dem Glucosestoffwechsel gewonnene ATP ist ein wichtiger Treibstoff für viele Stoffwechselwege im Körper. Neben der Energiebereitstellung für zum Beispiel den Transport von Substraten mittels Transportern über Membranen, ist es auch bei der Synthese von Proteinen und der Muskelkontraktion beteiligt (22, 23).

Die Verstoffwechslung von Glucose wird, wie in Abbildung 1 dargestellt, in mehrere Schritte unterteilt. Zunächst wird sie durch die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut. Dabei wird nur vergleichsweise wenig ATP generiert. Das aus der Glykolyse resultierende Pyruvat kann hauptsächlich auf zwei verschiedenen Wegen weiter verstoffwechselt werden. Ein wichtiger Faktor dafür, welcher Weg abläuft, ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff. Ist Sauerstoff in ausreichendem Maße vorhanden, wird in der Regel das entstandene Pyruvat zu großen Teilen im Citratzyklus weiterverarbeitet. Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ werden an der inneren Mitochondrienmembran dazu verwendet, mittels der Atmungskette, einen Protonengradient aufzubauen. Dazu werden Protonen aus der Mitochondrienmatrix herausgepumpt. Dieser elektrochemische Gradient wird anschließend bei der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) von der ATP-Synthase dazu genutzt aus den beiden Substraten ADP und Phosphat ein ATP-Molekül zu synthetisieren. Für diesen Schritt wird Sauerstoff als finaler Elektronenakzeptor benötigt. Diese chemiosmotische Kopplung ist beim aeroben Glucosestoffwechsel für ca. 90 % der insgesamt generierten ATP-Menge verantwortlich. In der Bilanz werden durch die Glykolyse selbst nur 2 ATP aus einem Glucosemolekül gewonnen, während durch die komplette aerobe Verwertung 30-32 ATP-Moleküle generiert werden (22, 23).

Der Nettoenergiegewinn durch die Glykolyse ist also im Vergleich zu der ATP-Produktion durch die OXPHOS gering. Bei der OXPHOS wird die Energie der Reduktionsäquivalente, die zuvor in der Glykolyse und im Citratzyklus generiert wurden, auf ATP übertragen und dabei werden die Reduktionsäquivalente wieder oxidiert. Die oxidierten Formen werden benötigt, um den gesamten Zyklus am Laufen zu halten. Damit die Glykolyse selbst ablaufen kann, wird NAD⁺ benötigt, das bei der aeroben Zellatmung erst am Ende durch die OXPHOS wieder regeneriert wird. Im Gegensatz zu der aeroben Zellatmung, kann die Milchsäuregärung ohne Sauerstoff das bei der Glykolyse entstehende Reduktionsäquivalent wieder oxidieren. Dabei findet bei dem auch als

Theorie

Glucosestoffwechsel

anaerobe Zellatmung bezeichnetem Stoffwechselweg eine Reduktion von Pyruvat zu Lactat statt, wobei NADH wieder zu NAD^+ oxidiert wird. Auf diesem Weg ist eine sauerstoffunabhängige, deutlich schnellere Bereitstellung von NAD^+ möglich als über die OXPHOS. Somit kann schneller die Glykolyse mit dem wieder bereitgestellten NAD^+ weiter betrieben werden (22, 23).

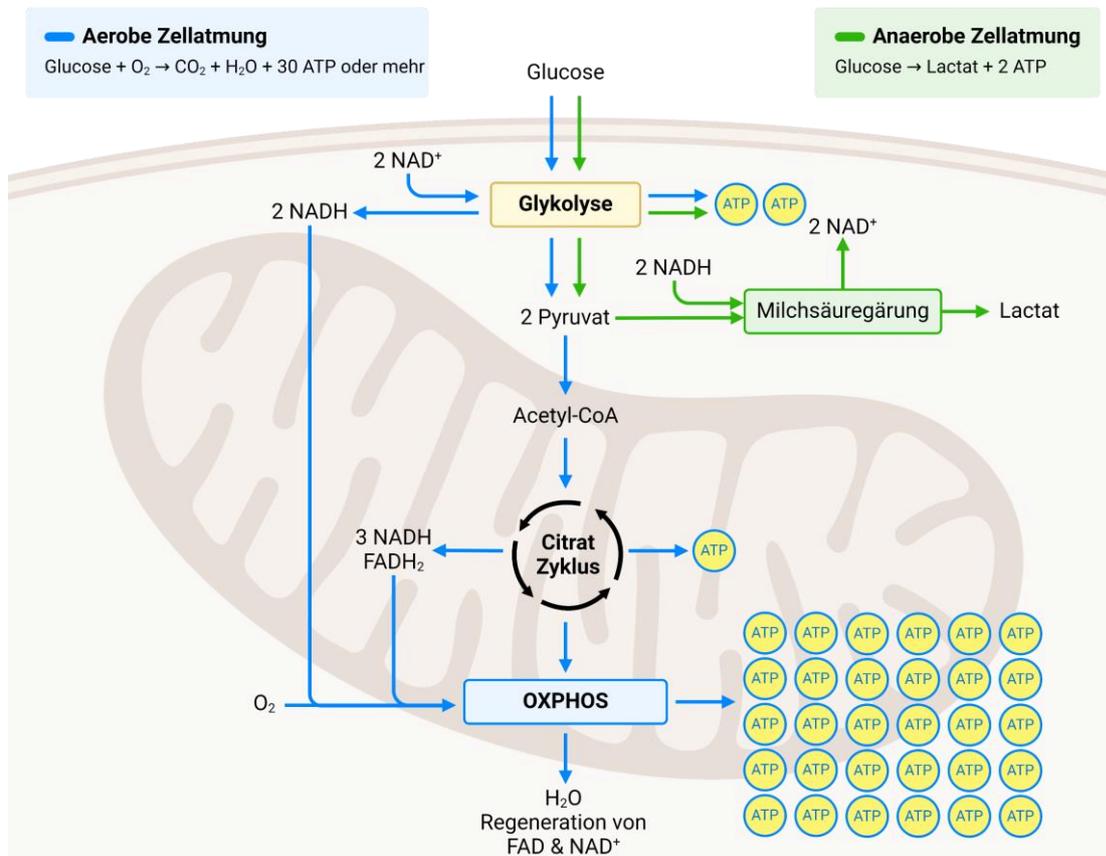


Abbildung 1: Gegenüberstellung der aeroben und der anaeroben Zellatmung. Erstellt mit BioRender.com.

2.1.2 Glykolyse

Die Glykolyse selbst ist ein anaerober Vorgang, bei dem ein Glucosemolekül in zwei Pyruvatmoleküle umgewandelt wird. Der Stoffwechselweg findet unter Beteiligung von 10 Enzymen statt und ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Die energetische Nettoausbeute der Glykolyse ist, wie bereits erwähnt, relativ gering und beträgt nur zwei Moleküle ATP und zwei Reduktionsäquivalente NADH. Die Glykolyse startet, nachdem die Glucose, mittels Glucosetransportern (GLUT), in die Zelle gelangt ist. Es gibt vierzehn verschiedene Subtypen dieser Transporter, von denen GLUT1 und GLUT3 für die insulinunabhängige, hauptsächliche Glucoseaufnahme zuständig sind (24, 25).

Der erste Schritt der Glykolyse wird durch die Hexokinase (HXK) katalysiert. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine irreversible Phosphorylierung der Glucose an Position 6. Die dadurch erhaltene negative Ladung hindert das Glucose-6-phosphatmolekül am Verlassen der Zelle. Nach

Theorie

Glucosestoffwechsel

einer Isomerisierung des Glucose-6-phosphats durch die Phosphoglucoseisomerase zu Fructose-6-phosphat findet eine weitere Phosphorylierung mittels der Phosphofruktokinase (PFK1) statt. Sowohl die Hexokinase als auch die Phosphofruktokinase benötigen für die Phosphorylierung ATP, sodass im ersten Teil der Glykolyse zunächst Energie verbraucht wird. Das nun zwei Mal phosphorylierte Fructose-1,6-bisphosphat wird durch die Aldolase in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat gespalten. Diese beiden Moleküle können durch die Triosephosphatisomerase in die jeweilig andere Form überführt werden. Nachdem die Umwandlung des Dihydroxyacetonphosphats zu Glycerinaldehyd-3-phosphat stattgefunden hat, beginnt nun der Teil der Glykolyse, in dem Energie gewonnen wird. Glycerinaldehyd-3-phosphat wird durch die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oxidiert und ATP-unabhängig phosphoryliert. Bei diesem Vorgang wird ein NAD^+ zu NADH reduziert. Da zwei Glycerinaldehyd-3-phosphat aus einem Glucosemolekül entstanden sind, werden auch zwei NAD^+ von der GAPDH umgesetzt, was die Entstehung von zwei Reduktionsäquivalenten NADH nach sich zieht. Beim nächsten Schritt wird Energie in Form von ATP frei, indem eine Phosphatgruppe von 1,3-Bisphosphoglycerat auf ADP übertragen wird. Auch dieser Prozess, wie die weiteren auch, findet zwei Mal statt, sodass zwei ATP-Moleküle entstehen, wodurch der ATP-Verbrauch aus der ersten Hälfte der Glykolyse ausgeglichen ist. Das noch an dem 3-Phosphoglycerat gebundene Phosphat wird durch eine Mutase an Position 2 verschoben. Anschließend findet durch eine Enolase eine Wasserabspaltung statt und Phosphoenolpyruvat entsteht. Dieses wird abschließend von der Pyruvatkinase dephosphoryliert und der Phosphatrest auf ADP übertragen. Somit entstehen insgesamt wieder zwei ATP und zwei Pyruvatmoleküle (22, 23).

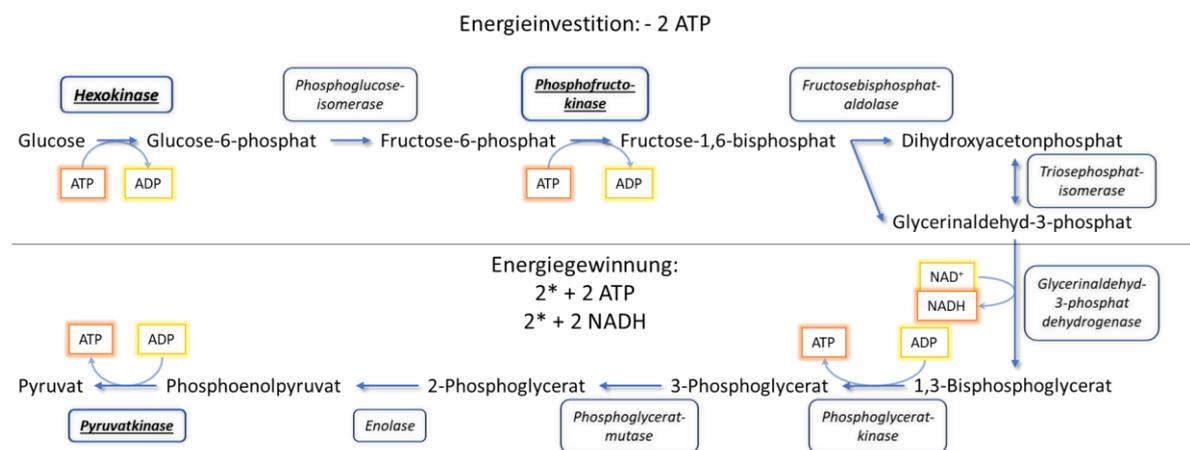


Abbildung 2: Übersicht über die Glykolyse. Die regulatorischen Schritte sind fett markiert. Da aus einem Glucosemolekül zwei Glycerinaldehyd-3-phosphat werden, laufen die Reaktionen in der unteren Hälfte zwei Mal ab. Nach Clark et al. (22)

Die Aufgabe der Glykolyse ist es für einen möglichst gleichmäßigen ATP-Spiegel innerhalb der Zelle zu sorgen. Daher ist diese stark reguliert. Kurzfristige Änderungen in der Menge des synthetisierten ATP und des für den Citratzyklus bereitgestellten Pyruvats sind durch Beeinflussung

Theorie

Glucosestoffwechsel

der wichtigsten regulatorischen Enzyme möglich. Die geschwindigkeitsbestimmenden, regulatorischen Enzyme sind die Hexokinase, die Phosphofruktokinase 1 und die Pyruvatkinase, deren Bedeutung und Regulation in Kapitel 2.2 „Enzyme des Glucosestoffwechsels“ eruiert werden. Diese Enzyme werden unter anderem durch das vorhandene Energielevel in Form von ATP oder NADH gesteuert. Langfristigere Regulationen der Glykolyse sind durch Hormone wie Adrenalin, Insulin und Glucagon möglich, welche auch die Expressionsmenge der Glykolyseenzyme verändern können (23).

2.1.3 Proliferationsfördernde Nebenstoffwechselwege der Glykolyse

Diverse Zwischenprodukte der Glykolyse dienen als Ausgangspunkte für andere Stoffwechselwege. Eine Übersicht ist in Abbildung 3 gezeigt. So können sowohl einige Aminosäuren als auch Lipide und Nukleotide aus Zwischenprodukten der Glykolyse hervorgehen (22, 23, 26). Glucose-6-phosphat, welches beim ersten Schritt der Glykolyse entsteht, kann sowohl zur Speicherform der Glucose, also zu Glykogen, als auch im Pentosephosphatweg weiterverarbeitet werden (27). Dem Pentosephosphatweg fallen mehrere Aufgaben zu. Bei dem Endprodukt handelt es sich um Ribose-5-phosphat, welches als Grundbaustein von Nukleosiden verwendet wird und somit für die DNA- und RNA-Synthese wichtig ist. Weiterhin dient es als Präkursor für verschiedene Coenzyme wie ATP, NADH und FADH₂. Als „Nebenprodukt“ des Pentosephosphatwegs wird NADPH aus NADP⁺ generiert. Dieses kann sowohl die Funktion von Glutathion wieder herstellen und somit den Schutz der Zelle vor oxidativem Stress unterstützen als auch an der Fettsäuresynthese teilnehmen (23, 28). Das Intermediat der Glykolyse Fructose-6-phosphat kann zur Hexosamin-Biosynthese weiterverwendet werden. Die dabei entstehenden Produkte spielen eine Rolle bei der co- und posttranslationalen Modifizierung von Proteinen und haben somit einen Einfluss auf deren Expression und Aktivität (29). Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) kann zu Glycerolphosphat umgewandelt werden, welches als Rückgrat für die Triglyceridsynthese dient (23). Weiterhin können noch die Aminosäuren Serin, Glycin, Cystein und Alanin aus Zwischenstufen des glykolytischen Abbaus entstehen, welche dann in der Proteinsynthese weiterverwendet werden können (17, 30). Das durch Milchsäuregärung anfallende Lactat kann ebenfalls noch konstruktiv weiterverwendet werden. Nach der Ausschleusung aus einer Zelle, in der viel Lactat anfällt, kann es in mit viel Sauerstoff versorgten Zellen aufgenommen und dort als Energieträger zur ATP-Synthese verwendet werden, sodass diese Zellen einen geringeren Glucoseverbrauch aufweisen (31). Zusammenfassend zeigt sich, dass die Glykolyse selbst zwar nicht viel Energie generiert, aber mit ihren Zwischenprodukten Bausteine für die Zellproliferation bereitstellt.

Theorie Glucosestoffwechsel

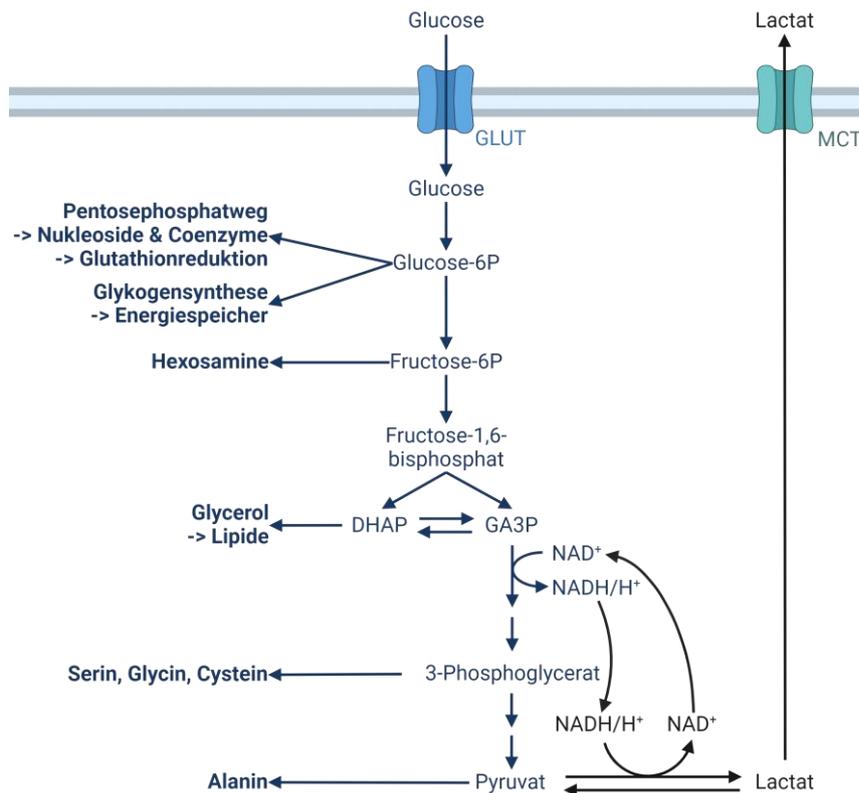


Abbildung 3: Verknüpfung von Zwischenprodukten der Glykolyse mit anderen Stoffwechselwegen (nicht stöchiometrisch). Mittels NAD⁺-Regenerierung durch die Lactatsynthese ist ein fortlaufender Kreislauf bei zuströmender Glucose möglich. Erstellt mit BioRender.com basierend auf (17, 30).

2.1.4 Glucose im Tumorgeschehen

Wenn es um die Beschreibung einer Tumorzelle geht, werden oft charakteristische Merkmale genannt, welche als *hallmarks of cancer* bezeichnet werden (Abbildung 4). Die ursprünglichen *hallmarks of cancer* sind sechs Eigenschaften, in denen sich Tumorzellen von gesunden Zellen unterscheiden und welche bei den meisten Tumorerkrankungen anzutreffen sind. Diese Eigenschaften sind: Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Eindringen und Metastasieren in gesundes Gewebe, ungehemmte Vermehrung, erhöhte Angiogenese zur Versorgung mit Nährstoffen und Apoptose-Evasion (32). Als neue, zusätzliche *hallmarks of cancer* wird neben der Immunevasion von Krebszellen auch ein veränderter Energiehaushalt bezeichnet (15).

Theorie Glucosestoffwechsel

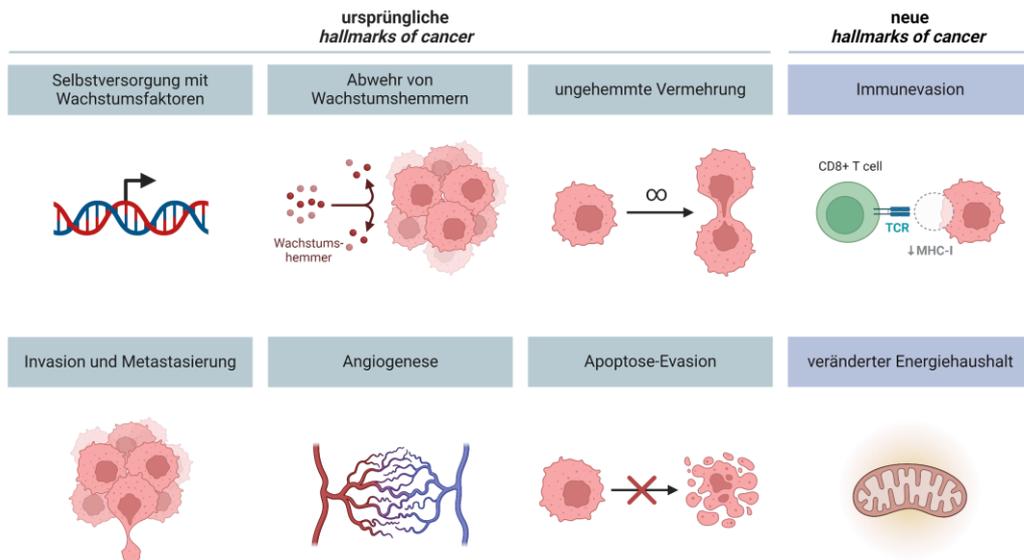


Abbildung 4: Ursprüngliche und neue hallmarks of cancer (15, 32). Erstellt mit BioRender.com

Es wird diskutiert, dass die Glykolyse in malignem Gewebe bis zu 10-mal schneller als in vergleichbarem gesundem Gewebe ablaufen kann, und somit bis zu 60 % des von einer Tumorzelle produzierten ATP durch die Glykolyse erzeugt werden. Diese Umstellung auf die Glykolyse als Hauptenergieerzeuger wird als Warburg-Effekt bezeichnet (23, 33–35). Der Warburg-Effekt beschreibt die Eigenschaft von Tumorzellen, trotz der Anwesenheit von ausreichend Sauerstoff, der für die OXPHOS benötigt wird, hauptsächlich die Glykolyse als Energieerzeuger zu nutzen. Außerdem werden die in der Glykolyse verwendeten Reduktionsäquivalente anaerobisch durch die Milchsäuregärung wiederhergestellt (36, 37).

In malignen Erkrankungen ist oft die Expression von mehreren Enzymen des Glucosemetabolismus erhöht. Zum einen ist die zelluläre Aufnahme von Glucose, durch die Hochregulierung der Expression ihrer Transporter, deutlich gesteigert (38, 39). Weiterhin sind die regulatorischen und somit geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der Glykolyse, die Hexokinase, die Phosphofruktokinase und die Pyruvatkinase zumeist in fortgeschrittenen Krebserkrankungen signifikant überexprimiert (40). Der Einfluss der jeweiligen Enzyme auf eine Tumorerkrankung wird in den jeweiligen Kapiteln 2.2.1.2 (HXK2), 2.2.2.2 (PFK-1) und 2.2.3.2 (PKM) erläutert.

Bezüglich des allgemeinen Einflusses eines verstärkten Glucosestoffwechsels auf eine Tumorerkrankung ist zunächst auf die in Kapitel 2.1.3 betrachteten Zwischenprodukte der Glykolyse zu verweisen. Dadurch, dass diese metabolischen Bausteine durch eine gesteigerte Glykolyse in einem höheren Maße zur Verfügung gestellt werden, können diverse andere anabole Stoffwechselwege verstärkt aktiviert werden. Dies ist gerade für Tumorzellen besonders relevant, da diese sich durch eine erhöhte proliferative Aktivität auszeichnen und somit einen hohen Bedarf an Nucleosiden und Proteinen haben (20, 26). Beispielsweise stellt der Pentosephosphatweg einen Baustein von Nucleosiden zur Verfügung, welcher für die Aufrechterhaltung der erhöhten

Theorie

Glucosestoffwechsel

Zellteilungsrate von Tumorzellen unabdinglich ist (23, 26). Ebenfalls fallen bei dem verstärkten Stoffwechsel und der erhöhten Teilungsaktivität von Tumorzellen viele *reactive oxygen species* (ROS) an, welche ihnen potenziell schaden können. Dem wird ebenfalls mit der Erhöhung der Aktivität des Pentosephosphatwegs entgegengetreten, da das dabei entstehende NADPH die ROS abfangen kann (28). Serin, welches aus dem Glykolyseintermediat 3-Phosphoglycerat gewonnen werden kann, hat einen Einfluss auf die ATP-Synthese und kann somit die Tumorzelle mit weiterer Energie unterstützen und zusätzlich an der Nukleotidsynthese teilnehmen (41–43). Allerdings kann auch das durch die verstärkt aktivierte Milchsäuregärung gebildete Lactat produktiv von den Tumorzellen weiterverwendet werden. Innerhalb eines Tumorgewebes herrscht zumeist eine schwankende Sauerstoffversorgung. Wenn in den Zellen, welche nicht ausreichend Sauerstoff zur Verfügung haben, besonders viel Lactat entsteht, dann kann dieses von Tumorzellen mit einer besseren Sauerstoffversorgung zur Energiegewinnung in Form von ATP verwendet werden (31).

Die Einflussnahme auf den Glucosestoffwechsel erfolgt unter anderem durch den PI3K/AKT-Signalweg, der die Glykolyse stimuliert, indem es für eine verstärkte Aktivität der Glykolyseenzyme und eine höhere Glucoseaufnahme sorgt (44, 45). Bei dem PI3K/AKT-Signalweg handelt es sich um einen in den meisten Tumoren überaktivierten Signalweg, welcher beträchtlich in die Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen involviert ist (46). Weiterhin liegt in soliden Tumoren zumeist eine hypoxische Situation vor, die ein erhöhtes Level von HIF-1 α begünstigt (47). HIF-1 α ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktor HIF-1, welcher einen Einfluss auf die mRNA-Synthese von mehreren Glykolyseenzymen und Glucosetransportern ausübt und somit einen erhöhten Glucosestoffwechsel begünstigt (48, 49).

Der Zusammenhang zwischen Stoffwechsel- und Tumorerkrankungen wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass Diabetiker eine höhere Wahrscheinlichkeit haben an manchen Krebsarten zu erkranken (50–54). Weiterhin ist bekannt, dass sich ein hyperglykämischer Zustand negativ auf die Prognose der meisten Krebserkrankungen auswirkt und auch mit einer erhöhten Mortalitätsrate einhergehen kann (3–5, 54). Ein erhöhter Glucosespiegel kann vielfältige Effekte in einer malignen Erkrankung auslösen. Zum einen wird dadurch die Proliferation von Tumorzellen angeregt (55). Mechanistisch äußert sich das auf vielfältige Weise (5). Zum Beispiel hat ein hoher Glucosespiegel einen Einfluss auf den Zellzyklus und kann diesen verstärkt aktivieren (56). In einem anderen Szenario wurde der Einfluss von einem hyperglykämischen Glucosespiegel auf die Angiotensinexpression untersucht. Ein hoher Angiotensinogenspiegel korreliert mit einer verminderten Proliferation, Viabilität und Migration von Tumorzellen. Allerdings hemmt ein hoher Glucosespiegel die Angiotensinogenexpression, was die Malignität von Tumorzellen erhöht (57). Außerdem wird die Aktivität von GTPasen verstärkt, welche den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) modulieren und somit eine höhere Proliferation ermöglichen (58, 59). Auch ein Einfluss

Theorie

Glucosestoffwechsel

auf das Immunsystem wird diskutiert (60). Genauso kann ein hoher Glucosespiegel die Aktivität der proapoptischen Proteine p53 (61, 62) und Cytochrom c reduzieren (63).

Zusammenfassend zeigt sich, dass in einer malignen Erkrankung Deregulierungen des Glucosestoffwechsels vorkommen, die mit negativen Folgen für den Patienten einhergehen. Außerdem wird ersichtlich, dass sich ein hyperglykämischer Zustand negativ auf die Prognose der meisten Krebserkrankungen auswirkt.

2.2 Enzyme des Glucosestoffwechsels

2.2.1 Hexokinase

2.2.1.1 Funktion der Hexokinase

Die Hexokinase katalysiert den ersten irreversiblen Schritt der Glucose-Verarbeitung, nach deren Aufnahme in die Zelle. Bei der Reaktion wird magnesiumabhängig ein Phosphatrest von einem ATP-Molekül auf ein Glucosemolekül übertragen. Das, durch die Phosphorylierung negativ geladene, Glucose-6-phosphatmolekül kann nicht mehr aus der Zelle heraus diffundieren und dient als Ausgangspunkt verschiedener Stoffwechselwege. Außer für die bereits beschriebene Glykolyse dient Glucose-6-phosphat auch als Startpunkt für die Glykogensynthese und für den Pentosephosphatweg (64). Somit hat die Funktion der Hexokinase einen Einfluss auf mehrere Stoffwechselwege.

Es wird zwischen vier verschiedenen Subtypen der Hexokinase unterschieden, von denen die Subtypen 1-3 hauptsächlich aktiv sind, allerdings durch Produktakkumulation von Glucose-6-phosphat in ihrer Aktivität gehemmt werden (22, 23, 27). Die Isoform HXK1 ist grundsätzlich in allen Geweben exprimiert und kann als *housekeeping* Enzym angesehen werden. Im Gegensatz dazu variiert die Expression der HXK2 stärker, je nach Gewebetyp (65). Die HXK3 ist auf einem geringen Level ubiquitär exprimiert, während die HXK4, welche auch als Glucokinase bezeichnet wird, nur in wenigen Geweben vorkommt. Diese weist weiterhin nur eine geringe Affinität gegenüber Glucose auf und übt eher regulatorische Effekte aus (66, 67). Im Gegensatz zu den anderen Subtypen hat die HXK2 zwei katalytische Domänen, mit denen Glucose phosphoryliert werden kann (66, 68, 69).

Den Hexokinasen werden, neben ihrer Teilnahme an der Glykolyse, weitere unterschiedliche Effekte zugeschrieben. So haben sie einen Einfluss auf die Immunantwort, die Reparatur von DNA-Schäden, den Redoxstatus und auf die Autophagie (66). Die Ausübung dieser Effekte ist unter anderem von der Lokalisation der Hexokinase innerhalb der Zelle abhängig. Die Hexokinase 2 kann zum Beispiel sowohl frei im Zytosol als auch an der mitochondrialen Membran gebunden vorliegen (70). Dort ist sie zumeist mit dem *voltage-dependent anion channel* (VDAC) assoziiert (64).

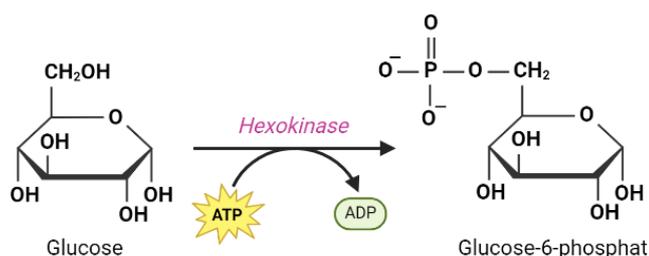


Abbildung 5: Die Hexokinase katalysiert die Übertragung eines Phosphatrests von ATP auf Glucose.
Erstellt mit BioRender.com

Theorie

Enzyme des Glucosestoffwechsels

2.2.1.2 Hexokinase 2 im Tumorkontext

Die Hexokinase 2 ist in diversen Tumorarten deutlich überexprimiert, während sie in vergleichbarem gesundem Gewebe kaum eine Rolle spielt. Neben der allgemeinen Überexpression findet teilweise ein Switch in der Expression von weniger aktiven Hexokinase-Subtypen, wie der Hexokinase 4, zu der weitaus aktiveren Hexokinase 2 statt. Dadurch, dass die HXK2 hauptsächlich in malignem Gewebe exprimiert wird und wenig in gesundem Gewebe, erscheint deren Targetierung als ein potenziell attraktiver Therapieansatz in der Onkologie (64, 71). Weiterhin kann die erhöhte Expression der HXK2 als ein prognostischer Marker für eine schwer verlaufende Tumorerkrankung dienen (72). Die erhöhte Hexokinaseaktivität erleichtert außerdem die klinische Diagnose und Lokalisation einer Tumorerkrankung. Dazu wird ein radioaktiv modifiziertes Glucosederivat einem Patienten verabreicht, welches sich aufgrund der Phosphorylierung durch die Hexokinase in Tumorzellen anreichert. Auf diese Weise können dann die stoffwechselmutierten Tumorzellen mittels Positronen-Emissions-Tomographie lokalisiert werden (33, 65).

Die an die Mitochondrien gebundene HXK2 ist einer der Hauptakteure, die den Warburg-Effekt ermöglichen. Dabei sorgt das Zusammenspiel der HXK2 mit verschiedenen weiteren Proteinen für eine erhöhte Glucose-6-phosphat Bereitstellung in der Tumorzelle (64). Durch eine Hochregulierung der Glucosetransporter und somit einer erhöhten Glucoseaufnahme steht mehr Substrat zur Verfügung (38). Durch das Assoziieren der HXK2 an spannungsabhängige Anionenkanäle (VDAC) auf den Mitochondrien wird die HXK2 nicht mehr durch das von ihr synthetisierte Glucose-6-phosphat gehemmt (33). Das durch die ATP-Synthase hergestellte ATP in den Mitochondrien wird durch die ATP/ADP-Translokase direkt zur HXK2 transportiert und versorgt es somit mit dem zweiten Substrat (64). Neben der erhöhten Glucosemetabolismusaktivität beeinflusst die HXK2 diverse weitere zytoprotektive Stoffwechselwege in malignen Zellen (70). Zum Beispiel wird durch die Bindung von HXK2 an VDAC die Apoptoseaktivität verringert (68, 73, 74). Auch eine Korrelation zwischen der Expression von der Hexokinase 2 und der Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen wurde nachgewiesen (75). Sie kann ebenso Proteine phosphorylieren, wodurch nachgeschaltet NF- κ B abhängig PD-L1 auf den Tumorzellen exprimiert und somit die Immunevasion von Tumorzellen begünstigt wird (76).

Die essenzielle Rolle der Isoform 2 der Hexokinase konnte mittels microRNA Untersuchungen bestätigt werden. Fang et al. haben dabei eine inverse Korrelation zwischen der microRNA-143 und der Hexokinase 2 Enzymexpression festgestellt. Bei einer hohen Expression der microRNA-143 kam es durch die reduzierte HXK2-Expression zu einem verringerten Glucoseverbrauch, da weniger Glucose-6-phosphat synthetisiert wurde. Dies resultierte in einer verringerten Proliferation von Tumorzellen (77). In Prostatakarzinomzellen zeigten Wang et al., dass eine unterdrückte p53-Aktivität, wie sie oft in Tumorzellen vorliegt, mit einer reduzierten microRNA-143 Expression einhergeht. Dadurch ergibt sich eine erhöhte Menge an HXK2-mRNA

Theorie

Enzyme des Glucosestoffwechsels

(78). Weiterhin führt eine in Tumorzellen oftmals vorherrschende verringerte PTEN-Expression zu einer gesteigerten AKT-mTOR-Aktivität. Diese fördert wiederum die Hexokinase 2-Translation. Auf diese Weise wurde ein deutlicher Anstieg der Hexokinase 2 Expression festgestellt. Zusammenfassend wird also sowohl die zur Verfügung stehende mRNA-Menge als auch die Translationsaktivität in Tumorzellen gesteigert (78). Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Überexpression durch eine verstärkte Transkription steuert, ist der bereits erwähnte hypoxische Transkriptionsfaktor HIF-1 α (48, 79).

Wie bereits erwähnt, ist die Expression der Hexokinase 2 vor allem in Tumorzellen erhöht und diese könnte somit ein attraktives Target für eine verbesserte Therapie von Tumorerkrankungen darstellen. Entsprechend konnte bereits gezeigt werden, dass es durch eine Inhibition der Hexokinase 2 zu einer verringerten ATP-Produktion kommt (80). In Mausversuchen wurde demonstriert, dass der Knockout von HXK2 einen chemostatischen Effekt auf einen Lungentumor hat, ohne dass dadurch verstärkt Nebenwirkungen auftraten (71). Zudem führte ein Knockdown der HXK2 in Glioblastomzellen zu einer verringerten Proliferation und einer Apoptoseinduktion (72).

Somit ergibt sich die Rolle der Hexokinase 2 als wichtiger Bestandteil zur Aufrechterhaltung des Tumormetabolismus und als prognostischer Marker für den Verlauf einer Tumorerkrankung (40, 71, 79).

2.2.2 Phosphofruktokinase 1

2.2.2.1 Funktion der Phosphofruktokinase 1

Der dritte Schritt der Glykolyse wird von der Phosphofruktokinase (PFK-1) katalysiert. Diese überträgt, wie in Abbildung 6 dargestellt, ein Phosphatmolekül von ATP auf Fructose-6-phosphat, woraus ein Molekül Fructose-1,6-bisphosphat resultiert. Es handelt sich um den zweiten energieverbrauchenden Schritt der Glykolyse, welcher ebenfalls irreversibel abläuft. Weiterhin ist die von der PFK-1 katalysierte Reaktion auch ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt des Glucoseabbaus (22, 23). Die PFK-1 wird als inaktives Monomer synthetisiert und erreicht nach Zusammenlagerung zu einem tetrameren Komplex ihre maximale Aktivität. Man unterscheidet zwischen drei Isoformen der PFK-1. PFK-M liegt hauptsächlich im Muskel vor, PFK-P vor allem im Plasma und PFK-L vorrangig in der Leber (65, 81).

Die Regulation der Aktivität der PFK-1 kann auf vielfältige Weise geschehen. Zum einen wird die Phosphofruktokinase durch einen erhöhten ATP-Spiegel in ihrer Aktivität gehemmt. Da es sich bei der PFK-1 um einen regulatorischen Schritt der Glykolyse handelt, bedeutet das, dass die Glykolyseaktivität allgemein gebremst wird. Auf der anderen Seite wird die Aktivität der PFK-1 durch das Vorhandensein eines hohen ADP- oder AMP-Spiegels gesteigert (22, 23). Eine weitere wichtige Regulation der PFK-1 findet durch die allosterische Modulation mittels Fructose-2,6-bisphosphat statt. Dieses wird durch die Phosphofruktokinase-2 (PFKFB) synthetisiert

Theorie

Enzyme des Glucosestoffwechsels

(16, 81). Somit ist auch eine indirekte hormonelle Regulation möglich, da Estradiol die Aktivität eines Phosphofruktokinase-2-Subtyps erhöht (PFKFB3), was in einem erhöhten Fructose-2,6-bisphosphat Spiegel resultiert. Dies wiederum sorgt für eine gesteigerte PFK-1 Aktivität (82).

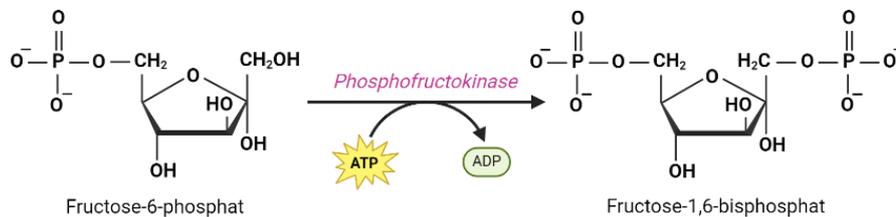


Abbildung 6: Die Phosphofruktokinase 1 katalysiert die Übertragung eines Phosphatrests von ATP auf Fructose-6-phosphat. Erstellt mit BioRender.com

2.2.2.2 Phosphofruktokinase im Tumorgeschehen

Da es sich bei der von der PFK-1 katalysierten Reaktion um einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse handelt, ist es naheliegend, dass das Enzym in diversen Tumorerkrankungen überexprimiert ist (40, 81, 83).

Die PFK-1 ist erforderlich, um den erhöhten Energiebedarf zu decken, was unter anderem durch eine verstärkte HIF-1-Aktivität vermittelt werden kann (40, 81). HIF-1 erhöht ebenfalls die Expression von PFKFB3. Dies resultiert in einem gesteigerten Fructose-2,6-bisphosphat-Spiegel, welcher wiederum die PFK-1 aktiviert, was für eine erhöhte glykolytische Aktivität sorgt (84). Eine Aktivierung von HER2, einem Wachstumsfaktorrezeptor, dessen Überexpression oft an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Krebserkrankungen beteiligt ist, kann ebenfalls eine verstärkte Aktivität der PFKFB3 verursachen (85).

Die PFK-1 hat sich unter anderem als wichtig für die Entstehung und den Erhalt einer Brustkrebserkrankung gezeigt (40, 86). Entsprechend liegt es nah inhibierend in die PFK-1-Aktivität einzugreifen. Dabei kann zum einen mit der hormonellen Regulation interferiert werden (82, 85). Auf der anderen Seite kann mittels Salicylsäure die funktionale Struktur der PFK-1 gestört werden. Dies geschieht, indem die funktional aktive Tetramerstruktur durch Salicylsäure leichter dissoziiert und in die weniger aktiven Dimere zerfällt (87). Ein ähnlicher Effekt, der in einer reduzierten glykolytischen Aktivität resultiert, ist durch die Behandlung mit Clotrimazol erreichbar (88). Durch Inhibition der PFKFB3 und einem somit verringerten Fructose-2,6-bisphosphat Spiegel kann ebenfalls die Aktivität der PFK-1 verringert werden, was die Glucoseverwertung reduzieren und Apoptose induzieren kann (89). Ein Knockdown von PFK-1 kann die Überlebensfähigkeit, Proliferation und Migration von Krebszellen hemmen und unterstreicht somit ebenfalls die Bedeutung der PFK-1 für die Aufrechterhaltung einer Tumorerkrankung (90).

2.2.3 Pyruvatkinase

2.2.3.1 Funktion der Pyruvatkinase

Der letzte Schritt der Glykolyse wird durch die Pyruvatkinase katalysiert, welche in physiologischen Zuständen für die Dephosphorylierung von Phosphoenolpyruvat verantwortlich ist (Abbildung 7). Dabei wird der Phosphatrest auf ein ADP-Molekül übertragen, wodurch, unabhängig von Sauerstoff, Energie in Form eines ATP-Moleküls frei wird. Die durch die Pyruvatkinase katalysierte Reaktion ist irreversibel (22, 23, 91). Es wird zwischen vier Isoformen der Pyruvatkinase unterschieden. Die PKL wird hauptsächlich in der Leber und die PKR in Erythrozyten exprimiert. Die Subtypen PKM1 und PKM2 sind hingegen in verschiedenen Zelltypen und Geweben anzutreffen (92). Die PKM1 und PKM2 werden aus der gleichen mRNA-Vorlage synthetisiert, die einem unterschiedlichen *splicing*-Vorgang unterliegt. Die PKM2 liegt entweder als Dimer oder als Tetramer vor, wobei letztere Form eine hohe Affinität gegenüber Phosphoenolpyruvat aufweist, während die dimere Form fast inaktiv ist (91, 93).

Reguliert wird die Aktivität der Pyruvatkinase unter anderem durch das Produkt der PFK-1. Fructose-1,6-bisphosphat hat einen aktivitätssteigernden Einfluss auf die PKM2, wodurch zwei regulatorische Schritte der Glykolyse miteinander gekoppelt sind, und eine hohe PFK-1-Aktivität eine erhöhte PKM-Aktivität zur Folge hat. Die Regulation durch Fructose-1,6-bisphosphat erfolgt dabei durch Einflussnahme auf die Tetramerisierung, indem die PKM-Monomere vermehrt in die aktivere tetramere Form überführt werden (16, 94).

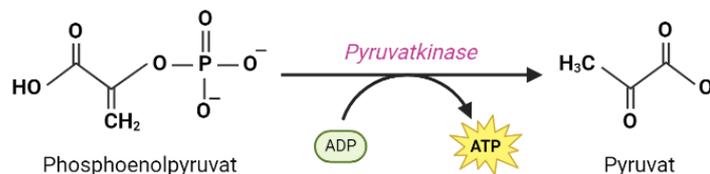


Abbildung 7: Die Pyruvatkinase katalysiert die Übertragung eines Phosphatrests von Phosphoenolpyruvat auf ADP. Erstellt mit BioRender.com

2.2.3.2 Pyruvatkinase im Tumorgeschehen

In Tumorzellen wird hauptsächlich die Pyruvatkinase M2 (PKM2) stark überexprimiert, welche den Warburg-Effekt antreibt (40, 95). Dabei findet oft auch eine Umstellung der Expression von PKM1 auf PKM2 statt. Bleibt diese Umstellung aus, sodass immer noch PKM1 exprimiert wird, ist das Expressionslevel der PKM2 trotzdem zumeist deutlich erhöht (96, 97). Der Einfluss der Pyruvatkinase auf den Ablauf einer Tumorerkrankung hängt nicht nur mit dem gesteigerten Glucosestoffwechsel zusammen. Die PKM2 übt weiterhin auch Effekte als Proteinkinase innerhalb des Zellkerns aus (98, 99). Sie beeinflusst das Tumorwachstum und die Metastasierung durch Phosphorylierung von Signalmolekülen, sowie durch Phosphorylierung von Histonen und

Theorie

Enzyme des Glucosestoffwechsels

Transkriptionsfaktoren (98, 100). Weiterhin liegt die PKM2, je nach aktuellem Bedarf der Tumorzelle, entweder als Tetramer oder als Dimer vor. Als Tetramer ist die glykolytische Aktivität hoch. Als Dimer nimmt sie dagegen ab. Dies hat den Vorteil, dass eine größere Menge an glykolytischen Intermediaten innerhalb der Zelle akkumuliert, welche in anabolen Stoffwechselvorgängen für die Zellproliferation verwendet werden kann (101).

Christofk et al. haben mittels *splicing* in Tumorzellen die Expression von der Pyruvatkinase M2 wieder auf die Pyruvatkinase M1 umgestellt und dadurch einen deutlich reduzierten Warburg-Effekt erreicht. Dies äußerte sich in einer erhöhten Sauerstoffaufnahme und einer verringerten Lactatproduktion. Die Tumorzellen waren ebenfalls schlechter in der Lage neue Kolonien zu bilden (102). Daraus zeigt sich die bedeutende Rolle der PKM2 für den erhöhten Glucosestoffwechsel innerhalb von Tumorzellen. Auch in Gliomzellen führte ein Knockdown von PKM2 zu einer signifikant niedrigeren Proliferation und zu einem deutlich verringerten Glucoseverbrauch (103).

2.2.4 Lactatdehydrogenase und Monocarboxylat-Transporter

2.2.4.1 Funktion der Lactatdehydrogenase

Die Glykolyse endet mit der Generierung von Pyruvat, welches auf verschiedenen Wegen weiterverarbeitet werden kann. In Zellen mit Mitochondrien und unter Verwendung von Sauerstoff wird es in gesundem Gewebe zumeist über den Citratzyklus und die OXPHOS weiterverarbeitet, wobei sehr viel Energie in Form von ATP frei wird. In Abgrenzung dazu wird Pyruvat bei der Milchsäuregärung sauerstoffunabhängig durch die Lactatdehydrogenase zu Lactat reduziert (siehe auch Abbildung 1 in Kapitel 2.1.1 „Überblick Glucosestoffwechsel“). Die Milchsäuregärung wird in der Regel von Zellen durchgeführt, die keine Mitochondrien besitzen, oder wenn die Atmungskette aufgrund von Sauerstoffmangel nicht ablaufen kann. Die Reaktion durch die Lactatdehydrogenase ist vollständig reversibel und in physiologischen Zuständen wird Lactat, welches beispielsweise in großen Mengen bei anaerober Muskelarbeit anfällt, in die Leber transportiert. Dort wird dieses wieder in Pyruvat umgewandelt, welches anschließend zur weiteren Energiegewinnung verwendet werden kann. Bei der Reduktion von Pyruvat zu Lactat durch die Lactatdehydrogenase dient NADH als Elektronendonator. NADH wird bei dieser Reaktion somit wieder zu NAD⁺ oxidiert. Dieses kann anschließend direkt wieder in der Glykolyse die Elektronen aufnehmen, die bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-phosphat durch die GAPDH frei werden. Dadurch kann ein geschlossener Kreislauf aus Glykolyse und Milchsäuregärung gebildet werden, bei dem als resultierende Energie allerdings nur die zwei ATP-Moleküle aus der Glykolyse frei werden (22, 23).

Es wird zwischen fünf verschiedenen Isoenzymen der Lactatdehydrogenase unterschieden, die aus jeweils vier Untereinheiten bestehen. Dabei wird zwischen zwei Arten von Untereinheiten

unterschieden, dem Typ Herz (LDH-B) und dem Typ Muskel (LDH-A). Beispielsweise besteht die LDH-1 aus vier Untereinheiten vom Typ Herz und die LDH-5 aus vier Untereinheiten des Typ Muskels (65).

2.2.4.2 Lactatdehydrogenase im Tumorkontext

Die erhöhte Aktivität der Lactatdehydrogenase ist vor allem dafür wichtig, dass NAD^+ zur Aufrechterhaltung der Glykolyse in schnell proliferierenden Zellen möglichst rasch wieder regeneriert wird (30, 104). In Tumorzellen ist, im Gegensatz zu normalem Gewebe, vor allem die Lactatdehydrogenase 5 überexprimiert, die aus vier Untereinheiten vom Typ LDH-A besteht (105–107). Für dieses Enzym ist ebenfalls HIF-1 ein direkter Regulator der Transkription (104, 108).

Außer für die Aufrechterhaltung der Glykolyse ist die Funktion der LDH-A auch wichtig, da das von ihr bereitgestellte NAD^+ auch bei der Nukleotid- und Aminosäure-Synthese benötigt wird (30). Ein weiterer möglicher Vorteil, den ein hoher Anteil an Milchsäuregärung für die Tumorzellen bringt, ist die Generierung einer sauren Tumormikroumgebung, was die Invasivität und Metastasierungsfähigkeit erhöhen kann. In Hypophysenkarzinomen wurde beobachtet, dass die Überexpression von LDH-A die Proliferation und Invasion der Krebszellen fördert (109). Ein hoher Lactatspiegel wurde in Kopf- und Nacken-Karzinomen mit einer erhöhten Metastasierung korreliert (81, 110). Weiterhin unterstützt er die Immunevasion von Tumorzellen (111).

Der Nachweis, dass LDH-A einen wichtigen Faktor in diversen Tumorerkrankungen spielen kann, wurde sowohl durch Knockdown als auch durch Applikation eines spezifischen LDH-A Inhibitors erbracht. Dabei konnte von Xie et al. gezeigt werden, dass LDH-A eine wichtige Rolle für die Überlebensfähigkeit und die Proliferation von Lungenkarzinomzellen spielt (112).

2.2.4.3 Monocarboxylat-Transporter (MCT) im Tumorkontext

Die Monocarboxylat-Transporter 1-4 sind transmembranäre Transporter, die unter anderem Pyruvat, Lactat und Ketonkörper in die Zelle rein- oder aus der Zelle herauspumpen können. Da sie auch Protonen transportieren, sind sie ebenfalls wichtig für die Regulation des extrazellulären pH-Werts (113, 114). Weiterhin spielen die MCTs eine Rolle im Energiemetabolismus, in der Aktivierung von T-Lymphozyten und der Gluconeogenese in der Leber (114). Im Muskel können die MCTs sowohl zur Abgabe von Lactat bei einer hohen Produktion dienen, als auch zur Aufnahme von Lactat um dieses als Energieträger weiterzuverwenden (115).

Der MCT1 ist in Tumorzellen oft vermehrt exprimiert (116), um Lactat aus den Zellen zu transportieren, welches dort, aufgrund der erhöhten Glykolyseaktivität, in Verbindung mit einer vermehrten Milchsäuregärung, in deutlich höherem Maße anfällt (31, 117). Der MCT1 kann allerdings auch Tumorzellen, welche mit viel Sauerstoff versorgt sind, ermöglichen, Lactat aufzunehmen, um dadurch glucoseunabhängig Energie zu generieren (31).

Theorie

Enzyme des Glucosestoffwechsels

Das Expressionslevel von MCT1 kann von vielen Faktoren beeinflusst werden (116). Ein Faktor der für eine erhöhte Expression von MCT1 in Tumorzellen sorgen kann ist die oftmals in Tumorzellen auftretende Mutation von p53 (118).

Eine erhöhte MCT1-Expression kann auch vom Lactattransport unabhängige Effekte auf die Invasivität und Migrationsfähigkeit von Tumorzellen ausüben. Dafür wird der aktivierende Einfluss von MCT1 auf den NF- κ B-Signalweg verantwortlich gemacht (119).

2.3 Glykolyseinhibitoren

2.3.1 3-Bromopyruvat

Bei 3-Bromopyruvat (3-BrPA) handelt es sich um die deprotonierte Form der Brombrenztraubensäure. Der enzymaktivitätsregulierende, alkylierende Einfluss von 3-BrPA wurde erstmalig bereits 1969 untersucht (120), woraufhin ab den 1970er Jahren mehrere Untersuchungen belegten, dass 3-BrPA einen Einfluss auf diverse metabolische Enzyme entfaltet (121, 122). Seit Anfang der 2000er sind erste Berichte zum Effekt von 3-BrPA auf Tumorerkrankungen zu finden (123, 124). Der Wirkmechanismus des 3-BrPA ist aufgrund seiner allgemein alkylierenden Eigenschaft sehr unspezifisch, so dass über ein Dutzend verschiedene Angriffspunkte diskutiert werden (26, 125).

Einer der wichtigsten Angriffspunkte scheint die Hexokinase 2 dazustellen (80, 126). 3-BrPA bindet kovalent an die HXK2, was in einer enzymatischen Inhibition resultiert und zusätzlich die Hexokinase 2 vom Mitochondrium wegdissoziieren lässt. Dadurch sind die glykolytische Funktion und die weiteren Effekte der Hexokinase beeinträchtigt (127). Weiterhin kann auch die GAPDH in ihrer Funktion durch 3-BrPA gestört werden (128). Durch Hemmung beider Targets ist daher eine Verminderung der Glykolyseaktivität möglich. Daraus resultierend ist einer der Haupteffekte einer 3-BrPA-Behandlung von Tumoren eine Reduzierung des intrazellulären ATP-Spiegels (123, 129). Dieser Effekt kann bei einer Kombinationsbehandlung mit einem anderen Zytostatikum von großem Nutzen sein. Durch den reduzierten ATP-Spiegel kann beispielsweise die ABC-Transporteraktivität eingeschränkt werden, und somit kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von Zytostatika, welche Substrat von z.B. P-gp sind (129–131).

Glutathion ist oft an der zellulären Entgiftung von zytotoxischen Substanzen beteiligt. Glutathion bindet allerdings auch 3-BrPA, wodurch der allgemeine Glutathionspiegel gesenkt und somit die Wirkung zytotoxischer Substanzen verstärkt wird (125, 132–134).

Durch die Hemmung der Glykolyseenzyme ist vermutlich nicht nur der Energiestoffwechsel selbst beeinträchtigt. Da die Glykolyse mehrere wichtige Grundbausteine für andere Stoffwechselwege bereitstellt (siehe Kapitel 2.1.3 „Proliferationsfördernde Nebenstoffwechselwege der Glykolyse“), sind diese wahrscheinlich auch negativ beeinflusst. So liegt zum Beispiel nahe, dass weniger Glucose-6-phosphat gebildet wird, wenn 3-BrPA die HXK2 hemmt und entsprechend weniger Substrat für den Pentosephosphatweg vorliegt (135). Allerdings ist 3-BrPA auch für die Erzeugung von ROS und somit oxidativem Stress verantwortlich, welcher DNA-Schäden verursachen und Autophagie auslösen kann (126, 136, 137). Zudem werden weitere, nicht-glykolytische Targets von 3-BrPA diskutiert (138). Somit zeigt sich zusammenfassend, dass 3-BrPA sowohl selbst zelltoxisch, als auch als Verstärker eines anderen Zytostatikums, wirken kann (139, 140).

Theorie

Glykolyseinhibitoren

Hauptsächlich in die Zelle aufgenommen wird 3-BrPA über den Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1), welcher in den meisten Tumorarten überexprimiert ist. Diese Aufnahme ist möglich, da 3-BrPA strukturell dem Lactat sehr ähnlich ist. Auf diese Weise wird 3-BrPA hauptsächlich in Tumorzellen und weniger in normalem Gewebe aufgenommen, was für eine gewisse Selektivität sorgt. Dementsprechend eignet sich möglicherweise das Expressionslevel von MCT1 als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Therapie mit 3-BrPA (26, 138).

Da 3-BrPA die Eigenschaft aufweist allgemein alkylierend zu wirken, können durch die unspezifische Wirkung auch Serumproteine alkyliert und diese damit in ihrer Funktion gestört werden, was zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen führt (125, 133). Durch die Bindung an Glutathion kann daher bei einer Therapie mit 3-BrPA dessen Wirkung mittels einer Gabe von GSH ausbalanciert werden, falls es zu starken unerwünschten Arzneimittelwirkungen kommen sollte. Somit sei die Wirkung selbst nach der Verabreichung von 3-BrPA noch steuerbar (125).

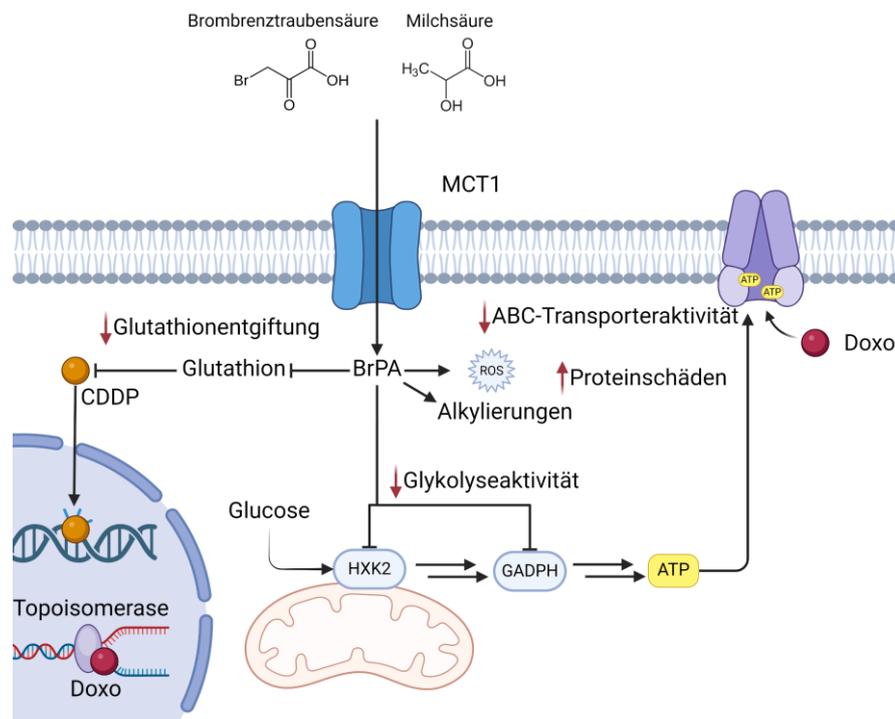


Abbildung 8: Übersichtsabbildung über einen Ausschnitt der Wirkmechanismen von Bromopyruvat im Kontext dieser Arbeit. Erstellt mit BioRender.com

Es gab schon eine erfolgreiche Einzelstudie, in der die Behandlung von einem Tumorpatienten mit 3-BrPA zu einer Verlängerung des Lebens geführt hat (141). In einer weiteren Untersuchung konnte ein antitumoraler Effekt in einem Patienten festgestellt werden. Dabei zeigte sich allerdings ein hoher GSH-Spiegel als hinderlich bei der Therapie, welchem aber mit einer zusätzlichen Gabe von Paracetamol begegnet werden konnte (142). Allerdings wird auch von Todesfällen in Zusammenhang mit einer unsachgemäßen Behandlung mit 3-BrPA durch einen Heilpraktiker berichtet (143). Die Schwere der unerwünschten Arzneimittelwirkungen können möglicherweise

Theorie

Glykolyseinhibitoren

mittels einer entsprechenden pharmazeutisch-technologischen Formulierung abgemildert werden (125, 141). Eine mögliche Formulierung, um die Toxizität zu reduzieren, ist die Einbindung von 3-BrPA in Goldnanopartikel, welche mit lipophilen Triphenylphosphonium-Kationen modifiziert sind und somit die Mitochondrien als Ziel haben. Diese haben in Tumorzellen oft ein höheres Membranpotenzial, wodurch die Nanopartikel hauptsächlich zu diesen wandern und dort 3-BrPA freisetzen. Diese Formulierung reduziert somit die Toxizität im umliegenden normalen Gewebe (144). Es werden noch andere Arten diskutiert, wie 3-BrPA gegebenenfalls formuliert werden könnte, um das Auftreten von möglichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu reduzieren (26). Auch die Art der Darreichung spielt eine Rolle. In einem Leberkrebsmodell in Hasen konnte durch eine langsame, kontinuierliche Gabe die Lebertoxizität von 3-BrPA deutlich reduziert werden, während der Tumor trotzdem komplett zerstört wurde (145).

2.3.2 2-Deoxyglucose

Bei 2-Deoxyglucose (2-DG) handelt es sich um ein Derivat der Glucose, bei dem an Position 2 eine Hydroxylgruppe durch ein Wasserstoffatom ausgetauscht wurde (146). 2-DG kann mittels Glucosetransportern in Zellen aufgenommen und mittels der Hexokinase phosphoryliert werden. Das Produkt 2-Deoxyglucose-6-phosphat kann nicht weiter verstoffwechselt werden und wirkt somit als allosterischer Inhibitor der HXK2. Auf diese Weise verdrängt es zum einen die Glucose kompetitiv vom Enzym und verlangsamt weiterhin durch Produkthemmung den Umsatz von regulärer Glucose (147). Unter anderem dadurch kann 2-DG den intrazellulären ATP-Spiegel senken (148). Neben dem Einfluss auf die Glykolyse werden auch andere Effekte auf den Zellmetabolismus diskutiert (149).

Bereits in den 1950er Jahren konnte ein inhibierender Effekt von 2-DG auf das Wachstum von Tumorzellen in Tiermodellen festgestellt werden (150). 2-DG selbst wird ein relativ geringer antitumoraler Effekt zugesprochen, wobei es bereits mehrere Ansätze gab es in eine Kombinationstherapie einzubeziehen (151). So erhöhte es zum Beispiel den Effekt einer Temozolomid- (107) und einer Docetaxel-Behandlung von soliden Tumorzellen (152). Auch in Kombination mit einer Radiotherapie werden der 2-DG vorteilhafte Effekte zugesprochen (153). Auch aufgrund des guten Verträglichkeitsprofils der 2-DG wurden verschiedene Kombinationstherapien mit diversen Zytostatika bei mehreren Tumorerkrankungen in präklinischen und klinischen Studien getestet (146).

2.4 IGF-System

2.4.1 Überblick IGF-System

Das *insulin-like growth factor* (IGF)-System spielt eine wichtige Rolle im Zellwachstum und ist in den meisten Organsystemen des Körpers relevant (154). Es setzt sich zusammen aus Insulin, zwei *insulin-like growth factors* (IGF-1 und IGF-2), deren zwei Hauptrezeptoren (IGF-1R und IGF-2R), dem Insulinrezeptor, hybriden IGF-Insulinrezeptoren und sechs Bindeproteinen (IGFBP-1-6). Die Bindeproteine können die Aktivität der IGF steuern, indem sie durch deren Bindung ihre Wirkung an den entsprechenden IGF-Rezeptoren modulieren oder blockieren (155, 156). IGF-1 ähnelt strukturell dem Insulin und hat auch einen Einfluss auf den Glucosemetabolismus. Weiterhin kann es proliferative und zellprotektive Effekte auslösen. Es spielt sowohl bei allgemeinen Wachstumsprozessen als auch bei kognitiven Funktionen eine Rolle (154, 157, 158). Der IGF-1 Rezeptor, welcher hauptsächlich für die Vermittlung der von IGF induzierten Effekte verantwortlich ist, ähnelt in seiner Funktion als Tyrosinkinase dem Insulinrezeptor. Dieser kann den PI3K- und den MAPK-Signalweg aktivieren. Der IGF-2 Rezeptor ist dahingegen ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der auch Glykoproteine binden kann (155, 159, 160). IGF-2 kann an den IGF-2R binden, wobei dadurch kein größerer Effekt in der Zelle ausgelöst wird. Auf diese Weise wird eher die Aktivität von IGF-2 moduliert, welche es sonst ebenfalls über den IGF-1R auslösen würde (154).

Die proliferativen und antiapoptotischen Effekte der IGFs machen sich diverse Krebsarten zunutze, indem sie eine verstärkte Aktivierung des IGF-Systems aufweisen (154, 161). Im Gegensatz zu Insulin, welches praktisch nur im Pankreas synthetisiert wird, werden die IGFs hauptsächlich in der Leber gebildet, können aber auch von malignem Gewebe exprimiert werden, welches sich somit direkt selbst im Wachstum stimulieren kann (161).

Die IGFBP binden kein Insulin, sie haben aber gegenüber den IGF eine höhere Affinität als die IGF-Rezeptoren. Auf diese Weise können sie einen steuernden Effekt auf die Aktivität der IGF ausüben. Der steuernde Effekt beruht einerseits darauf, dass die IGFBP die Aktivität der IGF durch deren Schutz vor proteolytischem Abbau verstärken können. Weiterhin dienen die IGFBP den IGF als Reservoir, aus dem eine kontinuierliche Freigabe und somit eine andauernde Aktivierung der Rezeptoren ermöglicht wird. Allerdings können die IGFBP auch durch das Binden der IGFs die Rezeptoraktivierung verhindern und auf diese Weise das System inhibieren. Gesteuert wird die Aktivität der IGFBPs durch drei verschiedene Proteasentypen, welche die Bindeproteine abbauen und auf diese Weise die IGFs wieder freisetzen können.

Die IGFBPs, und auch ihre Fragmente, weisen weiterhin selbst diverse zelluläre Effekte auf, die diese, unabhängig von ihrer IGF-bindenden Eigenschaft, auslösen können (155, 157, 162). Im

Theorie IGF-System

gesunden Zustand spielt IGFBP-3 die Hauptrolle im Transport von IGFs, während IGFBP-2 sehr häufig in Tumorgeweben überexprimiert ist und als prognostischer Marker dienen kann (155, 163).

2.4.2 IGFBP-2

Die Struktur des *insulin like growth factor binding protein 2* setzt sich zusammen aus einem C-terminalen Ende, einem N-terminalen Ende und einer Linker-Region, welche die beiden Enden miteinander verbindet. In der Linker-Region befinden sich mehrere Stellen, an denen IGFBP-2 gespalten und somit dessen Aktivität gesteuert werden kann (155). IGFBP-2 weist unter anderem zwei Bindungsstellen für IGF auf, eine Heparinbindungsstelle (HBD) und eine Integrinbindungsstelle (RGD-Sequenz). Die IGF-Bindungsstellen dienen der Aktivitätssteuerung von IGF, während die HBD die Interaktion mit Zelloberflächen und der extrazellulären Matrix vermittelt. Die RGD-Sequenz dient, auch unabhängig von IGF, dem Auslösen von zellulären Effekten (156, 164). IGFBP-2 kann Effekte sowohl extrazellulär, intrazellulär als auch im Nucleus als Transkriptionsfaktor auslösen (163, 165, 166).

Im nicht-malignen Kontext wirkt IGFBP-2 unter anderem durch die Bindung und somit durch die Aktivitätshemmung beider IGFs proliferationshemmend (157, 167, 168). Weiterhin ist es an der Entwicklung des Gehirns beteiligt (169). Auch hat es einen Einfluss auf die Insulinsensitivität und ist somit wichtig zur Aufrechterhaltung eines gesunden Stoffwechsels (162).

IGFBP-2 ist in diversen Krebsarten deutlich überexprimiert und kann Einfluss auf die Invasion, Proliferation, Metastasierung und Angiogenese nehmen (156, 163, 166, 170, 171). Dabei kann IGFBP-2 auf verschiedene Weise seine IGF unabhängigen Effekte auslösen. Extrazellulär bindet es vor allem mit der RGD-Sequenz an Integrine. Dabei wird zum Beispiel durch Bindung an β 1-Integrin der ERK-Signalweg verstärkt aktiviert und so die Tumorzellinvasion und -proliferation verstärkt sowie der NF- κ B-Signalweg aktiviert (163, 172, 173). Der NF- κ B Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Progression einer Tumorerkrankung (174). Auch über die RGD-Sequenz kann die Invasivität verstärkt werden (175). Die HBD ermöglicht IGFBP-2 an die extrazelluläre Matrix zu binden und auch auf diese Weise die Migration und Proliferation von Tumorzellen anzuregen (162, 176). Intrazellulär wirkt es durch Binden an die Zellzyklusinhibitoren p21 und PAPA-1 (165, 177). Aber auch der Transport von IGFBP-2 in den Zellkern spielt eine entscheidende Rolle für die onkogenen Funktionen des IGFBP-2, da es als Transkriptionsfaktor für mehrere protumorigene Promotoren wirkt (163). So wird zum Beispiel durch IGFBP-2 die Expression von VEGF erhöht (178, 179). Aber auch durch immunsuppressive Effekte kann es das Fortschreiten einer Tumorerkrankung fördern (180). Ein weiterer Mechanismus, durch den IGFBP-2 die Tumورprogression erleichtert, ist die Hemmung von PTEN. PTEN ist unter anderem wichtig um eine Zelle vor der Überstimulation durch IGF-2 zu schützen. Es dämpft weiterhin die proliferativen

Theorie IGF-System

Signalwege Akt und MAPK und ist deshalb mit einer erniedrigten Proliferation und einer erhöhten Apoptose assoziiert (156, 164, 181, 182).

Eine zusammenfassende Übersicht der hier vorgestellten Effekte des IGFBP-2 ist in Abbildung 9 dargestellt.

Für die Wirkung des IGFBP-2 ist es nicht wichtig, dass die Tumorzellen dieses selbst herstellen. Die Tumorzellen können auch durch IGFBP-2 welches im umliegenden Gewebe synthetisiert wird in ihrem Wachstum angeregt werden (173, 183).

Verschiedene Einflussfaktoren können die Expression von IGFBP-2 steuern. Zum einen wurde eine Korrelation zwischen einem hyperglykämischen Zustand und einer erhöhten IGFBP-2-Expression festgestellt (184, 185). Gesteuert wird die IGFBP-2-Expression unter anderem auch durch PTEN. Dabei unterdrückt ein hoher PTEN-Spiegel die IGFBP-2-Expression (181, 186). Ein fördernder Einfluss von HIF-1 α auf die Expression von IGFBP-2 wird ebenfalls diskutiert (187), wobei auch eine hormonelle Regulation den IGFBP-2-Gehalt beeinflussen kann. Dabei wird allerdings sowohl von einer möglichen Hoch- als auch von einer Runterregulation durch Estrogene berichtet (184, 188). Die Hauptregulation der IGFBP-2-Expression wird allerdings dem PI3K/Akt-Signalweg zugesprochen (189, 190).

Über den Einfluss von IGFBP-2 auf eine maligne Erkrankung gibt es gegensätzliche Anschauungen. So wird berichtet, dass IGFBP-2 in manchen Tumorerkrankungen runterreguliert, beziehungsweise eine hohe IGFBP-2-Expression sogar mit einem reduzierten Tumorwachstums assoziiert ist. Es wurde bereits gezeigt, dass IGFBP-2 sowohl stimulierende als auch inhibierende Einflüsse auf das Zellwachstum ausüben kann. Eine mögliche Begründung dabei ist auch, dass eine hohe IGFBP-2-Expression die proliferationsfördernde Aktivität der IGFs inhibieren kann (156, 170). Allerdings kann auch über den Integrinsignalweg durch IGFBP-2 selbst ein proapoptotischer oder ein antiproliferativer Effekt vermittelt werden (191, 192).

Zusammenfassend gilt es festzuhalten, dass eine abschließende Aussage über den Effekt von IGFBP-2 immer im Kontext des jeweilig betrachteten Systems getroffen werden muss.

Theorie IGF-System

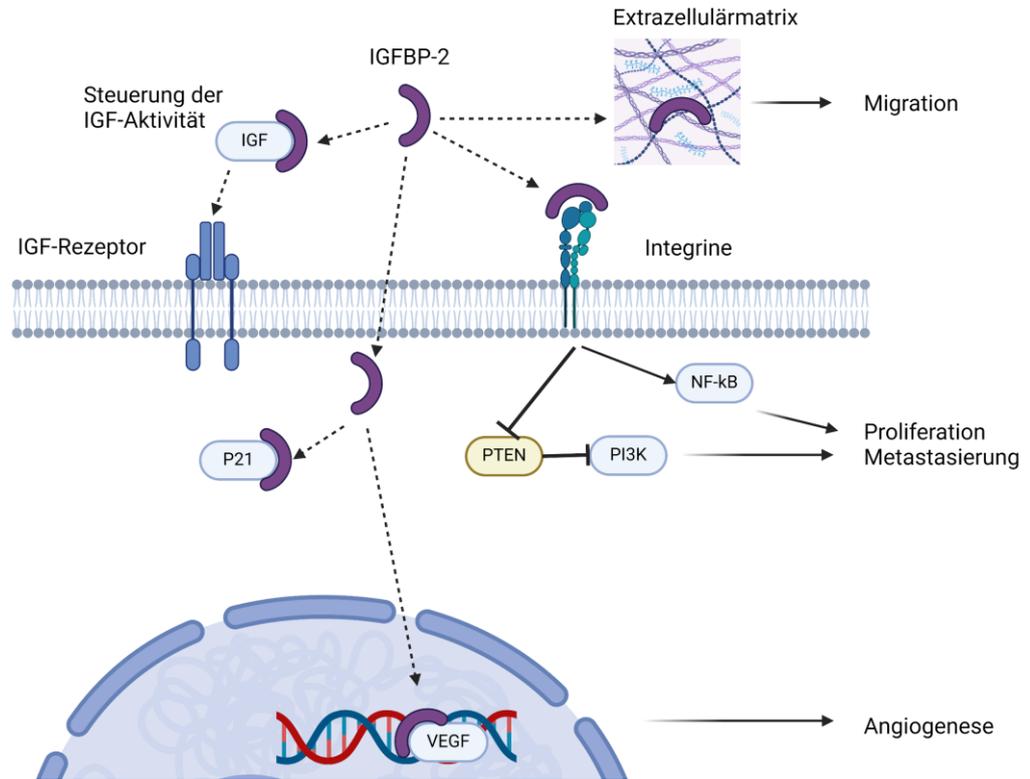


Abbildung 9: Übersicht über die durch IGFBP-2 ausgelösten Effekte basierend auf Li 2020 (163) und Yau 2015 (165)

2.5 Zytostatika und Resistenzmechanismen

2.5.1 Verwendete Zytostatika

Doxorubicin (früher als Adriamycin vermarktet) ist ein seit vielen Jahrzehnten bekannter zytotoxischer Arzneistoff und einer der ersten Vertreter der Anthracycline. Der Wirkmechanismus des Zytostatikums ist vielseitig und bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Doxorubicin wird mittels passiver Diffusion in die Zelle aufgenommen und entfaltet seine Wirkung sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Im Nucleus wirkt es als ein DNA-interkalierendes-Zytostatikum, welches ebenfalls die Topoisomerase II in ihrer Funktion hemmt. Dies resultiert in DNA-Schäden, die die Apoptose auslösen können. Weiterhin kann Doxorubicin über verschiedene Wege die zelltoxische ROS-Konzentration innerhalb einer Tumorzelle erhöhen (193–195).

In den letzten zwei Jahrzehnten gab es bedeutende medizinische Entwicklungen, wie Tamoxifen oder Trastuzumab, deren pharmakologischer Ansatzpunkt in Brustkrebszellen in deren überexprimierten Wachstumsfaktor-Rezeptoren liegt. Es gibt drei wichtige Rezeptoren, die in einem Mammakarzinom überexprimiert sein können und dessen Wachstum antreiben: Estrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PR) und *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) (196, 197). Allerdings werden diese Rezeptoren nicht von jedem Mammakarzinom exprimiert. Wenn alle drei Rezeptoren nicht exprimiert sind, spricht man von *triple*-negativem Brustkrebs (TNBC). Dieser ist zumeist sehr aggressiv und mangels spezifischer Targets ist keine zielgerichtete Therapie möglich (197, 198). Aufgrund dessen ist eine neoadjuvante Chemotherapie mit Doxorubicin und Cyclophosphamid nach wie vor etabliert (196, 197). Und auch bei diversen anderen Krebsarten wird Doxorubicin zur Therapie eingesetzt, sodass die Gruppe der zytotoxischen Anthracycline nach wie vor eine der effektivsten Tumorbehandlungen darstellt (195). Das Anwendungsgebiet von Doxorubicin umfasst auch Lymphome, Myelome, Schilddrüsenkarzinome und Ovarialkarzinome (199). Allerdings weist Doxorubicin aufgrund seiner unspezifischen Wirkweise sehr viele unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf, unter denen vor allem eine hohe Kardiotoxizität hervorzuheben ist, wodurch es zur Dosislimitierung kommt (194).

Mitoxantron zählt zu den Anthracendionen und wurde in den 80er-Jahren ausgehend vom Doxorubicin entwickelt. Das Ziel der Entwicklung war ein zytotoxisches Arzneimittel mit einer geringeren Kardiotoxizität als der des Doxorubicins zu etablieren (200). Der Wirkmechanismus des zytotoxischen Arzneistoffes Mitoxantron ist vielseitig und umfasst unter anderem die Quervernetzung der DNA, die Hemmung der Topoisomerase II und die Beeinträchtigung von DNA-Reparatur-Mechanismen (201, 202). Zusätzlich werden noch diverse weitere Wirkmechanismen diskutiert, wie zum Beispiel die Interaktion mit RNA und Proteinen (203). Mitoxantron weist auch hemmende Eigenschaften auf das Immunsystem auf, weshalb es im Jahr 2000 von der FDA für die Behandlung von Multipler Sklerose zugelassen wurde (200). In der

Theorie

Zytostatika und Resistenzmechanismen

Onkologie umfasst sein Anwendungsbiet, neben dem metastasierten Mammakarzinom, auch Leukämie und fortgeschrittenes Prostatakarzinom (204).

Cisplatin ist die geläufige Abkürzung für cis-Diammindichloridoplatin (II), bei welchem es sich um einen planaren, anorganischen Platinkomplex handelt. Das zentrale Platinatom ist in diesem Komplex von zwei Chloridionen und zwei Ammoniakliganden umgeben. Die antitumoralen Eigenschaften des Cisplatins wurden in den 60er-Jahren entdeckt und Cisplatin hat sich gegenüber vielen anderen platinhaltigen Strukturen durchgesetzt (205). Regulär zugelassen wurde es in den 70er-Jahren erstmals für die Behandlung von urologischen Krebsarten (206). Nach der Applikation findet es sich im Blutkreislauf wieder, in dem noch eine relativ hohe Chloridionenkonzentration vorliegt. In die Zelle gelangt es durch passive Diffusion oder aktiv mithilfe des Kupferionen-Transporters CTR1. Im Zellinneren ist die Chloridionenkonzentration deutlich niedriger, sodass der Arzneistoff aktiviert wird, indem mindestens ein Chloridion durch ein Wassermolekül substituiert wird (205). Die aktivierte Form kann unter anderem kovalent an DNA-Basen binden. Der dadurch angerichtete Schaden an der DNA wird erkannt und löst mindestens einen Zellzyklusstopp aus, kann aber auch bereits direkt den Apoptosevorgang auslösen (206). Die Standardtherapie von Ovarialkarzinomen war über lange Zeit die Behandlung mit Cisplatin, wobei multifaktoriell auftretende Resistenzen bei vielen Patientinnen ein Problem darstellten (207). Weiterhin weist Cisplatin diverse unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf, von denen zumeist die hohe Nephrotoxizität den dosislimitierenden Faktor darstellt (10). Aus diesem Grund wird in der Therapie inzwischen öfter auch Carboplatin, ein Derivat von Cisplatin, eingesetzt. Dieses weist eine bessere Verträglichkeit auf. Allerdings braucht es länger, um seine Wirkung zu entfalten. Auch ist dessen Wirkstärke in einigen Szenarien geringer, sodass die Behandlung mit Cisplatin nach wie vor Relevanz besitzt (206, 208, 209). Entsprechend wird Cisplatin bei schweren Krankheitsverläufen, die entweder weit fortgeschritten oder metastasiert sind, eingesetzt. Der Arzneistoff wird sowohl bei einer Ovarialkarzinomerkrankung als auch bei Hodenkarzinomen, Harnblasenkarzinomen und Bronchialkarzinomen angewendet (210).

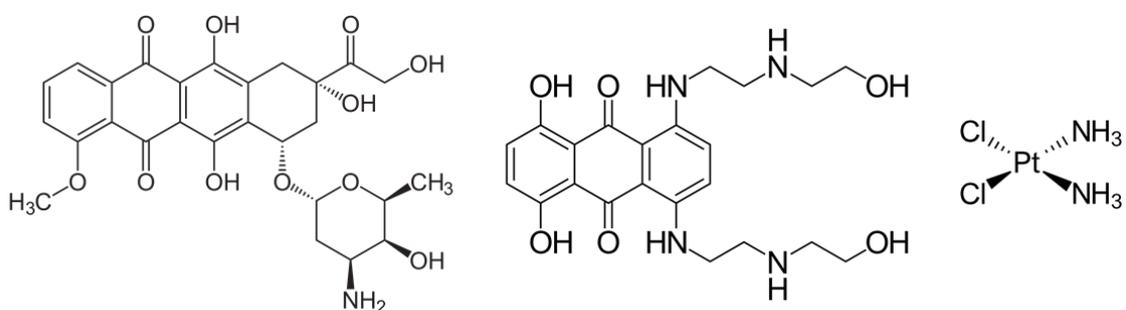


Abbildung 10: Strukturformeln der verwendeten Zytostatika. Von links nach rechts: Doxorubicin, Mitoxantron, Cisplatin

Theorie

Zytostatika und Resistenzmechanismen

2.5.2 Arten der Resistenzentwicklung

Viele Tumorzellen entwickeln, bei andauernder Behandlung mit einer zytotoxischen Substanz, eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber dem eingesetzten Arzneimittel. Diese Entwicklung einer Resistenz erfordert eine Dosiserhöhung, um die Effektivität der Behandlung aufrecht zu erhalten. Die Steigerung der verabreichten Dosis an Zytostatikum geht allerdings, aufgrund der hohen Zelltoxizität des Zytostatikums, oft mit verstärkten unerwünschten Arzneimittelwirkungen einher, die schließlich therapielimitierend sind. Weiterhin ist es problematisch, dass die entwickelte Resistenz oft nicht nur spezifisch für ein Arzneimittel ist, sondern die Resistenzentwicklung direkt eine ganze Gruppe von Arzneistoffen betrifft (211). Dies schränkt die Therapiemöglichkeiten und somit die Chance auf den Erfolg einer Behandlung weiter ein. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit Wege zu finden die Resistenzentwicklung zu verhindern oder zu überwinden.

Es gibt viele verschiedene Zytostatika-Resistenzmechanismen. Die Resistenz kann zum einen intrinsisch sein und bereits direkt zu Beginn der Erkrankung vorliegen. Häufiger entwickelt sich eine Resistenz erst durch den Selektionsdruck einer andauernden Behandlung. Die Resistenzmechanismen können, entsprechend der molekularen Mechanismen der Zellreaktion auf den Arzneistoff, grob in vier unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden (Abbildung 11) (11, 212).

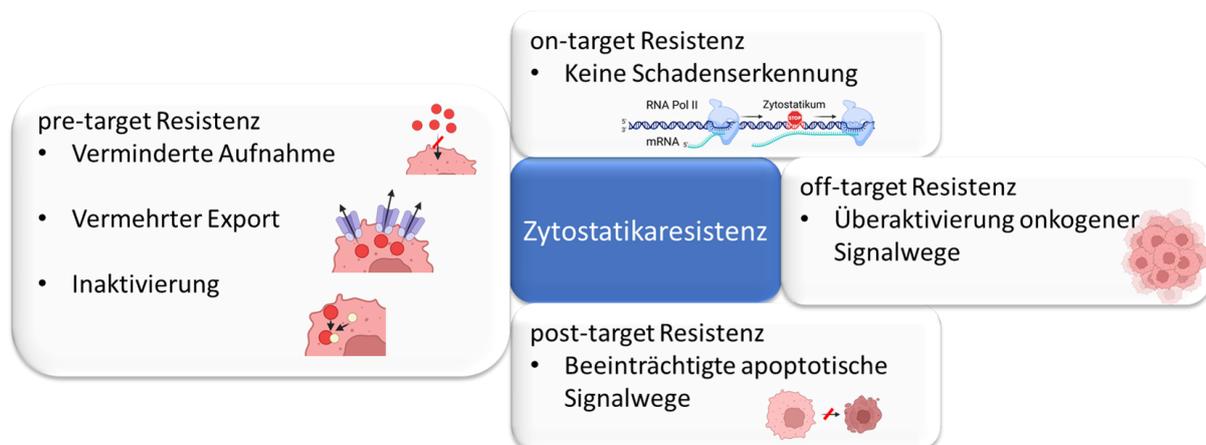


Abbildung 11: Übersicht über verschiedene Resistenzmechanismen. Symbole erstellt mit BioRender.com

Die *pre-target*-Resistenzmechanismen umfassen diverse Möglichkeiten der Tumorzelle die verhindern sollen, dass das Zytostatikum überhaupt erst seinen Wirkort erreicht. Ein *pre-target*-Resistenzmechanismus sorgt zum Beispiel für die Reduktion des aktiven Wirkstoffspiegels innerhalb der Zelle, indem der Aufnahmemechanismus des Arzneistoffes in die Zelle gehemmt ist (11). Eine weitere Möglichkeit ist, dass der Arzneistoff, nach der regulären Aufnahme in die Zelle, wieder möglichst schnell heraustransportiert wird. Dabei wird der intrazelluläre Wirkstoffspiegel zumeist durch eine verstärkte Expression und Aktivität der *ATP binding cassette* (ABC)-Effluxtransporter gesenkt (11, 213, 214). Diese pumpen, unter Energieverbrauch in Form

Theorie

Zytostatika und Resistenzmechanismen

von ATP, Arzneistoffe aus der Zelle hinaus. Die wichtigste Klasse der ABC-Effluxtransporter wird als *multidrug resistance proteins (MRPs)* bezeichnet. Einer der bekanntesten Vertreter dieser Klasse ist das P-Glykoprotein (P-gp) (213, 215). Dieses transportiert hauptsächlich polyaromatische, hydrophobe Arzneistoffe, wie zum Beispiel Doxorubicin, aus der Zelle hinaus (195). Eine weitere Transporterstruktur, die Doxorubicin und auch Mitoxantron aus der Zelle hinaustransportieren kann und für entsprechende Resistenzen verantwortlich ist, ist das *breast cancer resistance protein (BCRP)* (214). Ein anderer Mechanismus der *pre-target*-Resistenz ist die Detoxifizierung eines chemisch hoch reaktiven zytotoxischen Arzneistoffes. Dies kann zum Beispiel über die kovalente Bindung an Glutathion geschehen (132). Gerade bei der Resistenz von Tumorzellen gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin spielt Glutathion eine große Rolle. Das durch die Konjugation entstandene Produkt aus Cisplatin und Glutathion kann mittels ABC-Transporter aus der Zelle transportiert werden (216).

Weiterhin können Resistenzmechanismen noch als *on-target*, *post-target* und *off-target* charakterisiert werden. Bei der *on-target*-Resistenz erreicht zwar das Zytostatikum seine Zielstruktur und kann seinen molekularen Wirkmechanismus entfalten, der entstandene Schaden leitet aber nicht die klassische antiproliferative oder apoptotische Signalkaskade aus. Der Schaden wird stattdessen entweder repariert oder nicht erkannt, sodass schließlich kein apoptotisches Signal ausgelöst wird (11, 217).

Bei der *post-target*-Resistenz kommt das zytotoxische Agens ebenfalls zur Wirkung und der induzierte Schaden wird auch erkannt. Allerdings ist der nachgeschaltete apoptotische Signalweg verändert, wodurch dieser nicht mehr in der Lage ist ordnungsgemäß den Zelltod auszulösen (11). Vor allem das Protein p53, welches eigentlich DNA-Reparaturen und Zellapoptose einleiten kann, ist oft in resistenten Krebszellen mutiert und übt seine Funktion nicht ordnungsgemäß aus (218).

Unabhängig von der direkten Wirkung des Zytostatikums wird noch eine *off-target*-Resistenz beschrieben. Bei dieser sind andere Signalwege überaktiviert, die mit dem eigentlichen Einfluss des Zytostatikums nichts direkt zu tun haben, aber die Effekte des Zytostatikums zu einem gewissen Teil kompensieren können (11, 219).

2.5.3 Beteiligung des Glucosestoffwechsels am Entstehen einer Chemoresistenz

In den letzten Jahren wurde vermehrt die Frage aufgeworfen, inwieweit eine Resistenzentwicklung gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung mit einer Veränderung des Glucosestoffwechsels korreliert werden kann, also eine glykolytische Hochregulation als Ursache oder Trigger einer Resistenzentwicklung fungiert (7). Erste Untersuchungen zur Überwindung einer Zytostatikaresistenz mittels Inhibition des Glucosestoffwechsels fanden bereits statt (18, 21, 220).

Theorie

Zytostatika und Resistenzmechanismen

Ein dabei naheliegender Zusammenhang ist zum Beispiel der Fakt, dass der Efflux vieler Arzneistoffe aus der Tumorzelle über P-gp, BCRP oder andere Proteine der ABC-Familie, stattfindet, die in zytostatikaresistenten Zellen oftmals deutlich überexprimiert werden (13, 14, 211). Die Funktion der ABC-Transporter aufrecht zu erhalten ist ein energieintensiver Prozess, welcher durch die Beeinflussung des Energiehaushalts gestört werden kann. Entsprechend zeigt sich, dass es durch eine Inhibition der Glykolyse zu einer erhöhten intrazellulären Wirkstoffkonzentration kommen kann, da nicht mehr ausreichend Energie zum Herauspumpen des zytotoxischen Arzneistoffes vorhanden ist (129, 130, 221).

Weiterhin hat der Glucosestoffwechsel, wie bereits in Kapitel 2.1.3 „Proliferationsfördernde Nebenstoffwechselwege der Glykolyse“ betrachtet, einen Einfluss auf viele weitere Stoffwechselwege. Diese sind ebenfalls in der Lage die Widerstandsfähigkeit einer Tumorzelle gegenüber einer Zytostatikabehandlung zu erhöhen, indem sie ausreichend Substrate für die Proliferation und zur Reparatur zur Verfügung stellen (221). Zum Beispiel wird durch eine verstärkte Aktivierung des Pentosephosphatwegs mehr Glutathion synthetisiert, welches wichtig für die Detoxifizierung zytotoxischer Arzneimittel ist. Außerdem kann durch GSH auch der ROS-Spiegel gesenkt und somit die Tumorzelle vor Schaden geschützt werden (26, 132, 222). Aber auch weitere Wege, auf denen ein veränderter Glucosestoffwechsel die Zytostatikaresistenz beeinflussen kann, werden diskutiert (20, 222–224). Ein wichtiger Einfluss dabei kann auch sein, dass ein hoher Glucosespiegel die apoptotische Aktivität von p53 senken kann (61).

Abbildung 12 zeigt eine Zusammenstellung der bis hier erläuterten Glucosestoffwechsel-abhängigen Effekte, durch die eine Tumorzelle allgemein und bei der Entwicklung einer Chemoresistenz profitieren kann.

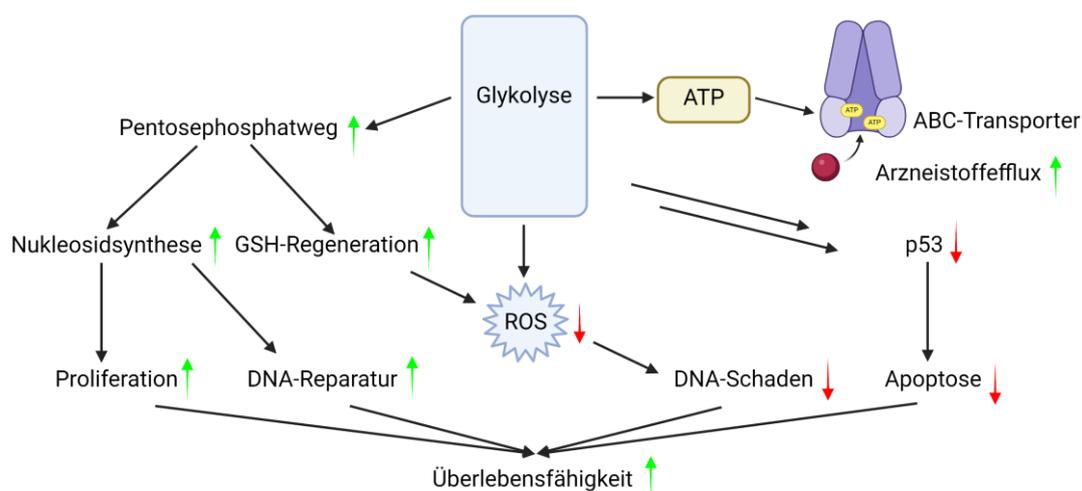


Abbildung 12: Einfluss von Glucose auf den Tumorstoffwechsel und die Zytostatikaresistenz. Erstellt mit BioRender.com. Basierend auf Lin und Qiu (19, 224).

2.5.4 Untersuchte Enzyme im Zusammenhang mit einer Zytostatikaresistenz

Bei genauerer Betrachtung hat nicht nur der Gesamteffekt einer erhöhten Glykolyseaktivität einen Einfluss auf die Zytostatikaresistenz. Es können auch den einzelnen Enzymen, neben ihrer Funktion im Glucosestoffwechsel, weitere Einflüsse auf die Entwicklung einer Zytostatikaresistenz zugeschrieben werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der HXK2 mit einer Cisplatinresistenz in einem Modell des Ovarialkarzinoms korrelierte. Als Schnittstelle wird dabei eine über ERK-vermittelte erhöhte Autophagie postuliert, welche einen zytoprotektiven Effekt aufwies (225). In tamoxifenresistenten Zellen übte die HXK2 einen Effekt auf den AKT/mTOR-Signalweg aus, worauf die erhöhte zelluläre Widerstandsfähigkeit gegenüber Tamoxifen beruhte. Chemoresistente Tumorzellen sind deutlich mehr von einer hohen HXK2-Expression abhängig. Deren Inhibition beeinträchtigt resistente Zellen in ihrem Wachstum deutlich mehr als nicht-resistente Zellen (226). Ebenfalls wird von einer Nivellierung einer chemotherapeutischen Resistenz von Tumorzellen durch einen HXK2-Knockdown berichtet (225, 227). Auch die PFK-1 kann eine Rolle im Resistenzgeschehen von Tumorzellen spielen. In Lungenkarzinomzellen zeigten Wang et al., dass eine erhöhte PFK-1-Expression mit einer erniedrigten Empfindlichkeit gegenüber einem Zytostatikum einherging und sie beobachteten, dass PFK-1 einen ABC-Transporter direkt aktiviert (228). Für den Subtyp 2 der Pyruvatkinase konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass dieser einen Einfluss auf die Widerstandsfähigkeit von Tumorzellen gegenüber einer zytotoxischen Behandlung entfalten kann (229–231). In Lungenkrebszellen konnte die Effektivität einer Cisplatinbehandlung durch einen PKM2-Knockdown deutlich gesteigert werden (232).

Auch die lactatbezogenen Enzyme können einen Einfluss auf die Chemoresistenz haben. So konnte sowohl in Brustkrebszellen eine Korrelation zwischen der Expression der LDH-A und einer Taxolresistenz festgestellt werden (233) als auch eine Korrelation zwischen der MCT1-Expression und einer Cisplatinresistenz in Ovarialkarzinomzellen (234). Entsprechend konnten auch schon vorteilhafte Effekte einer Kombinationsbehandlung bestehend aus einer zytotoxischen Behandlung und einem MCT1-Inhibitor bei diversen Tumorzelllinien nachgewiesen werden (31).

Daraus zeigt sich, dass die beschriebenen Enzyme nicht nur für die Entwicklung einer Tumorerkrankung von Bedeutung sind, sondern auch die Therapie dieser deutlich beeinträchtigen können.

2.5.5 IGFBP-2 im Kontext einer Zytostatikaresistenz

Neben den in Kapitel 2.4.2 „IGFBP-2“ beschriebenen Effekten, wird auch von der Beteiligung des IGFBP-2 im Resistenzgeschehen berichtet (166). So wurden bereits Zusammenhänge zwischen IGFBP-2 und einer Resistenz gegenüber Paclitaxel (171, 235), Tamoxifen (236), Temozolomid (173) Doxorubicin (171, 184), Gemcitabin (166) und Docetaxel (185) beobachtet. In

Theorie

Zytostatika und Resistenzmechanismen

tamoxifenresistenten Brustkrebszellen wurde dabei eine Überexpression des IGFBP-2 um ein Vielfaches festgestellt (236, 237). Der Einfluss von IGFBP-2 auf eine Resistenzentwicklung wurde auch untersucht, indem Zellen, welche normalerweise selbst kein IGFBP-2 exprimieren, durch Transfektion zu einer eigenen IGFBP-2-Produktion angeregt wurden. Diese Zellen zeigten eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber einer zytostatischen Behandlung (235). Diese Erkenntnisse wurden in anderen Szenarien bestärkt, in denen exogen zugebenes IGFBP-2 eine Resistenzsteigerung induzierte (171, 173, 184).

Es wurde auch beobachtet, dass die durch Hyperglykämie verursachte Resistenz mittels IGFBP-2 vermittelt werden kann (19, 184, 185). Mechanistisch wird die Resistenz zum Beispiel durch eine β 1-Integrin vermittelte verstärkte Aktivierung des ERK-Signalwegs ausgelöst (173). Weiterhin wurde ein Einfluss von IGFBP-2 auf die ABC-Transporteraktivität postuliert, aber noch nicht nachgewiesen (184). Grundsätzlich finden sich in der Literatur vor allem Beobachtungen und Korrelationen, während Kausalitäten kaum untersucht wurden.

3. Ziel der Arbeit

Die Entwicklung einer Resistenz gegenüber einem Zytostatikum stellt in der klinischen Anwendung von antitumoralen Therapien nach wie vor ein großes Problem dar. Deshalb ist die Zielsetzung dieser Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen zu liefern, welche für die Resistenzentwicklung maligner Zellen wichtig sind. Der Fokus liegt dabei auf dem Stoffwechsel, mit der Fragestellung, inwiefern die Widerstandsfähigkeit von Tumorzelllinien gegen zytotoxische Wirkstoffe durch funktionelle Schlüsselproteine des Zellmetabolismus gesteuert oder getragen wird. Dabei werden zwei Themenkomplexe untersucht.

Zunächst wird die Expression des Wachstumsfaktorbindepoteins IGFBP-2 in Mammakarzinomzellen und dessen Einfluss auf zelluläre Abläufe untersucht. Dabei wird getestet, wie groß der Einfluss von Glucose auf die IGFBP-2-Expression ist und inwiefern sich Wildtypzellen von ihren resistenten Subtypen unterscheiden. Mittels eines Knockdowns wird weiterhin untersucht, ob IGFBP-2 für die Aufrechterhaltung der Resistenz notwendig ist, und ob ein Mangel an IGFBP-2 entsprechend einen inhibierenden Effekt auf die Widerstandsfähigkeit der Zellen ausübt. Weiterhin wird untersucht, ob Zellen, welche selbst keine messbare IGFBP-2-Expression aufweisen, durch die Zugabe von rekombinantem IGFBP-2 profitieren.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Glucosestoffwechsel von (resistenten) Ovarialkarzinomzelllinien. Hierbei wird untersucht, ob sich eine Resistenzentwicklung in einem veränderten Glucosestoffwechsel widerspiegelt. Dafür wird die Glucoseabhängigkeit der Zellen und die Expression der wichtigsten Glykolyseenzyme untersucht. Weiterhin wird getestet, ob sich Glykolyseinhibitoren möglicherweise zur Behandlung von malignen Zellen eignen. Anschließend wird untersucht, ob eine Kombinationsbehandlung aus einem Glykolyseinhibitor mit einem klassischen Zytostatikum die Zytotoxizität erhöht und ob die Inhibition der Glykolyse möglicherweise einen Einfluss auf die Zytostatikaresistenz aufweist. Mittels Knockdown eines wichtigen Glykolyseenzym wird abschließend gezeigt, inwieweit der Eingriff in den Energiehaushalt der Zelle einen Einfluss auf die Wirkung zytotoxischer Substanzen erbringt.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Accu-Jet® pro	Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Analysenwaage Mettler Toledo Classic Plus AB135-S	Mettler-Toledo GmbH Gießen, Deutschland
Analysenwaage Sartorius basic BA210S	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Axiovert 25 (Lichtmikroskop)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Bechergläser (verschiedene)	Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
BioRad PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
CASY® 1 Model TT Zellzähler	Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland
CFX Opus Real-Time PCR System	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
CO₂-Inkubator MCO-170AICUV-PE	Panasonic Healthcare Corporation Tokio, Japan
Colibri Microvolume Spectrometer	Berthold Detection Systems GmbH Pforzheim, Deutschland
CONTOUR® NEXT	Ascensia Diabetes Care Deutschland GmbH Leverkusen, Deutschland
Guava easyCyte HT 11 Flow Cytometer	Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland
Heiz- und Magnetrührer Hei-Tec	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG Kelheim, Deutschland

Material und Methoden
Material

Holten safe 2010 (Laminar Air Flow)	Jouan Nordic A/S Allerød, Dänemark
Kryo-Einfriergerät Mr. Frosty®	Nalgene (Thermo Fisher) Lima, OH, USA
Mikroliterzentrifuge MiniSpin®	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Blotting Module	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
Multiskan® EX	Thermo Scientific GmbH Langenselbold, Deutschland
Pipette (5000 µl) Research®	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
RAININ Pipet-Lite™ L-2XLS+ (0,5-10 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
RAININ Pipet-Lite™ L-2XLS+ (100-1000 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
RAININ Pipet-Lite™ L-2XLS+ (10-100 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
RAININ Pipet-Lite™ L-2XLS+ (20-200 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
RAININ Pipet-Lite™ L-2XLS+ (2-20 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
Thermomixer comfort (IsoTherm 1,5 mL)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Transferpette®-12 electronic (200 µL)	Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Transferpette®-8 electronic (200 µL)	Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Trockenschrank 60 °C	Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex® Super RK 103 H	Scientific Industries New York, NY, USA
Vortex Genie 2	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA

Material und Methoden
Material

Wasseraufbereitungssystem Elix	Millipore GmbH Schwalbach, Deutschland
Wilovert S Inverses Mikroskop	Helmut Hund GmbH Wetzlar, Deutschland
Zentrifuge Minispin	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 320 R	Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Biosphere Filter Tips (100-1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Filter Tips (10-100 µl)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Filter Tips (1-10 µl)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
CASY[®] cups	Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland
CONTOUR[®] NEXT Sensoren	Ascensia Diabetes Care Deutschland GmbH Leverkusen, Deutschland
Cryo-Röhrchen	Th. Geyer GmbH & Co. KG Renningen, Deutschland
Dual Solution[™] Reservoirs	Heathrow Scientific Vernon Hills, IL, USA
Einmalspritzen Braun Luer Solo (20 ml)	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Hard Shell[®] PCR Platten, 96 Wells, skirted	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
Microseal[®] B Filme für PCR-Platten	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA

Material und Methoden
Material

Mini-Protean TGX Stain-Free Gel 10 %, 10-Well, 50 µl	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
Mini-Protean TGX Stain-Free Gel 12 %, 10-Well, 50 µl	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen Makro II (1-5 ml)	Ratiolab GmbH Dreieich, Deutschland
Pipettenspitzen SurPhob Gelloader 200 µl	Biozym Scientific GmbH Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® (10-200 µL), gelb	Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland
Pipettierreservoirs für Mehrkanalpipetten, 50ml, sterilisiert	Ratiolab GmbH Dreieich, Deutschland
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
RAININ Tips LTS 1000 µl	Mettler-Toledo GmbH Oakland, USA
RAININ Tips LTS 20 µl	Mettler-Toledo GmbH Oakland, USA
RAININ Tips LTS 250 µl	Mettler-Toledo GmbH Oakland, USA
Reagiergefäße (0,5 ml) DNase/RNase frei	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (0,6 ml)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (0,6 ml) DNase/RNase frei	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 ml) DNase/RNase frei	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 ml) Lichtschutz	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland

Material und Methoden
Material

Serologische Pipetten (10 ml)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (25 ml)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm)	Whatman GmbH Dassel, Deutschland
TC-Platten 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
TC-Platten 96 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Thermo Scientific™ Microtiter™ 96-Well Mikrotiterplatten 10519465	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen T175 (175 cm²)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen T25 (25 cm²)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen T75 (75 cm²)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zellstoff	Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zymo-Spin™ IIC Column	Zymo Research Irvine, CA, USA

4.1.3 Primer

Tabelle 3: Verwendete Primer

Primer	Hersteller
ACTB, human actin, beta	Real Time Primers LLC
VHPS-110	Melrose Park, PA, USA

Material und Methoden
Material

GAPD, human GAPDH VHPS-3541	Real Time Primers LLC Melrose Park, PA, USA
HK2, human hexokinase 2 VHPS-4148	Real Time Primers LLC Melrose Park, PA, USA
IGFBP2, human insulin-like growth factor binding protein 2 VHPS-4491	Real Time Primers LLC Melrose Park, PA, USA
PFKM, human phosphofruktokinase, muscle VHPS-6809	Real Time Primers LLC Melrose Park, PA, USA
PKM2, human pyruvate kinase, muscle VHPS-6938	Real Time Primers LLC Melrose Park, PA, USA
RPL13, human ribosomal protein L13 VHPS-7964	Real Time Primers LLC Melrose Park, PA, USA

4.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Primer	Hersteller
alpha Tubulin (TU-02): sc-8035	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
Anti-rabbit IgG HRP-Conjugated	R & D System, Inc. Minneapolis, USA
Hexokinase II (C64G5) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology Europe B.V. Leiden, Niederlande
LDH-A (E-9): sc-137243	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
MCT1 (H-1): sc-365501	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
m-IgGk-BP-HRP sc-516102	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
PFK-1 (G-11): sc-166722	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
PKM (C-11): sc-365684	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA

Material und Methoden
Material

4.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalie	Hersteller
2-Deoxyglucose	BIOMOL GmbH Hamburg, Deutschland
3-Bromopyruvat	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
Bacillol® AF	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	BIOMOL GmbH Hamburg, Deutschland
CASY®ton	Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland
Cell Extraction Buffer (CEB)	Bender MedSystems GmbH Wien, Österreich
Cisplatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Clarity Western ECL Substrate, 500 ml #1705061	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
Control siRNA-A sc-37007	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
D-Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit R2053	Zymo Research Irvine, CA, USA
DMEM® P04-01548S1 (ohne Glucose)	PAN Biotech GmbH Aldenbach, Deutschland
DMEM® P04-03500 (4,5 g/l Glucose)	PAN Biotech GmbH Aldenbach, Deutschland
DNase/RNase-free water	Zymo Research Irvine, CA, USA
Doxorubicin Hydrochlorid	MedChemExpress LLC Monmouth Junction, USA

Material und Methoden
Material

DPBS® ohne Calcium und Magnesium	PAN Biotech GmbH Aldenbach, Deutschland
EDTA-Lösung 0,02 %	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Glycin z.A.	Th. Geyer GmbH & Co. KG Renningen, Deutschland
Guava® Instrument Cleaning Fluid (ICF)	Luminex Corporation Austin, TX, USA
Hexokinase II siRNA (h): sc-35621	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
IGFBP2 siRNA (h): sc-37195	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
IGFBP-2 Quantikine ELISA Kit	R & D Systems Inc. Minneapolis, USA
IGFBP-2, recombinant human (carrier-free) [200 µg/ml]	BioLegend Inc. San Diego, USA
Isopropanol 100 %	Merck Chemicals GmbH Schwalbach, Deutschland
Laemmli 2×, Sample Buffer Concentrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	PAN Biotech GmbH Aldenbach, Deutschland
Metformin Hydrochlorid (1,1-Dimethylbiguanid Hydrochlorid)	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
Methanol, absolut	Merck Chemicals GmbH Schwalbach, Deutschland
Milchpulver blotting grade	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Mitoxantron Dihydrochlorid	MedChemExpress LLC Monmouth Junction, USA
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden
Material

Mycoplasma Off™	Minerva Biolabs GmbH Berlin, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Fisher BioReagent Geel, Belgien
Oxamidsäure-Natriumsalz (Oxamat)	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U; 10 mg/ml)	PAN Biotech GmbH Aldenbach, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, USA
Power SYBR® Green RNA-to-C_T™ 1-Step Kit	Applied Biosystems Waltham, USA
Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Thermo Scientific GmbH Langenselbold, Deutschland
Puromycin Dihydrochlorid	MedChemExpress LLC Monmouth Junction, USA
Pyruvat Natrium (100 mM)	Life Technologies Corporation New York, NY, USA
RPMI® 1640 P04-16500 (2 g/l Glucose)	PAN Biotech GmbH Aldenbach, Deutschland
RPMI® 1640 P04-17550 (ohne Glucose)	PAN Biotech GmbH Aldenbach, Deutschland
SDS BioChemica: A2572	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Sera Plus (Special processed FBS) = Fetales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech GmbH Aldenbach, Deutschland
siRNA Transfection Medium sc-36868	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA

Material und Methoden
Material

siRNA Transfection Reagent sc-295528	Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, USA
Sterillium®	Bode Chemie GmbH Hamburg, Deutschland
Sulfosalicylsäure Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
TRI Reagent®	Zymo Research Irvine, CA, USA
Tris für die Molekularbiologie	Th. Geyer GmbH & Co. KG Renningen, Deutschland
Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % in PBS	PAN Biotech GmbH Aldenbach, Deutschland
Tween® 20 pure	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland

4.1.6 Hergestellte Reagenzien

Tabelle 6: Hergestellte Lösungen, Zellkulturmedien, Reagenzien und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung	
2-Deoxyglucose Stammlösung 1 M	2-Deoxyglucose	1,64 g
	DPBS	10,0 ml
3-Bromopyruvat Stammlösung 100 mM	3-Bromopyruvat	167,0 mg
	DPBS	10,0 ml
A2780 Glucosemangelmedium	Fetales Kälberserum	50 ml
W1 Glucosemangelmedium	Penicillin/Streptomycin Lösung (10.000 I.E./ml)	5,0 ml
	Glucose Stammlösung	2,5 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5,0 ml
	RPMI® 1640 P04-17550	500 ml
A2780 Vollmedium	Fetales Kälberserum	50 ml
W1 Vollmedium	Penicillin/Streptomycin Lösung (10.000 I.E./ml)	5,0 ml
	RPMI® 1640 P04-16500	500 ml
Blotting Detektionslösung	Clarity™ Luminol solution	4 ml
	Clarity™ Peroxide solution	4 ml

Material und Methoden
Material

BSA-Lösung für Durchflusszytometrie	BSA	0,5 g
	DPBS	50 ml
Cisplatin Stammlösung 5 mM	Cisplatin	15,0 mg
	DPBS	10,0 ml
Doxorubicin Stammlösung 10 mM	Doxorubicin (HCl)	57,80 mg
	DPBS	10,0 ml
Elektrolysepuffer, 1×	Elektrolysepuffer, 10x	100 ml
	Aqua dest.	900 ml
Elektrolysepuffer, 10×	SDS	5 g
	Tris-Base	15 g
	Glycin	72 g
	Aqua dest.	100 ml
Glucose Stammlösung (200 g/l)	D-Glucose	4 g
	DPBS	20 ml
Kryomedium	DMSO	1,0 ml
	FKS	9,0 ml
Magermilchpulverlösung	Magermilchpulver	2,5 g
	TBS-T	50 ml
MCF-7 Vollmedium	Fetales Kälberserum	50 ml
	Penicillin/Streptomycin Lösung (10.000 I.E./ml)	5,0 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5,0 ml
	DMEM P04-03500	500 ml
MDA-MB-231 Glucosemangelmedium	Fetales Kälberserum	50 ml
MCF-7 Glucosemangelmedium	Penicillin/Streptomycin Lösung (10.000 I.E./ml)	5,0 ml
	Glucose Stammlösung	2,5 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5,0 ml
	DMEM P04-01548S1	500 ml
MDA-MB-231 Vollmedium	Fetales Kälberserum	50 ml
	Penicillin/Streptomycin Lösung (10.000 I.E./ml)	5,0 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5,0 ml
	Pyruvat (100 mM)	5,0 ml
	DMEM P04-03500	500 ml

Material und Methoden
Material

Metformin Stammlösung 1 M	Metformin (HCl)	1,66 g
	DPBS	10,0 ml
Mitoxantron Stammlösung 10 mM	Mitoxantron (2x HCl)	51,7 mg
	DPBS	10,0 ml
MTT Reagenz (5 mg/ml)	MTT	50,0 mg
	DPBS	10,0 ml
Oxamidsäure Stammlösung 100 mM	Oxamidsäure-Natriumsalz	111,0 mg
	DPBS	10,0 ml
Primäre Antikörperlösung für Western Blot (1:200-1:1000) (Verdünnungen abhängig von verwendetem primären Antikörper)	BSA	0,5 g
	Natriumazid	0,01 g
	Antikörper Zielprotein	10 – 50 µl
	Antikörper <i>housekeeping</i>	10 – 50 µl
Primer-Arbeitslösungen (1 µM)	TBS-T	10 ml
	Primer-Stammlösung (50 µM)	1,0 µl
RT-PCR Mastermix + Probe (pro Well)	DNase/RNase-free water	49 µl
	SYBR® Green PCR Mix (2x)	5,0 µl
	Primer-Arbeitslösung	1,0 µl
	RT-Enzyme Mix (125x)	0,08 µl
Sekundäre Antikörperlösung für Western Blot (Zusammensetzung abhängig von verwendeten primären Antikörpern)	RNA-Template (für 25 ng)	3,92 µl
	Magermilchpulver	0,5 g
	Anti-rabbit IgG HRP	0-3 µl
	m-IgGk-BP-HRP	0-3 µl
Sulfosalicylsäurelösung (10 %)	TBS-T	10 ml
	Sulfosalicylsäure	1,0 g
TBS-Puffer, 10×	Aqua dest.	10 ml
	Tris-Base	6,06 g
	Natriumchlorid	40 g
TBS-T Puffer	Aqua dest.	100 ml
	Tween® 20	1,6 ml
	TBS-Puffer, 10 x	80 ml
Transferpuffer, 1×	Aqua dest.	720 ml
	Transferpuffer, 10x	100 ml
Transferpuffer, 10×	Aqua dest.	900 ml
	Tris-Base	15 g
	Glycin	72 g
	Aqua dest.	100 ml

Material und Methoden

Material

Zellysepuffer	PMSF [0,3 M in DMSO]	3,4 µl
	PIC (100x)	10 µl
	Cell Extraction Buffer	1000 µl

4.1.7 Software

Tabelle 7: Verwendete Software

Software	Entwickler
Ascent Software™ Version 2.6	Thermo LabSystems Helsinki, Finnland
BioRender®	BioRender Toronto, Canada
CFX Maestro V2.2	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
ChemDraw 18.1	Perkin Elmer LAS GmbH Rodgau, Deutschland
Citavi 6.18	Swiss Academic Software GmbH Wädenswil, Schweiz
FlowJo v.10.5.3	BD Life Sciences Franklin Lakes, NJ, USA
GuavaSoft™ 3.3	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Image Lab™ Version 6.0.1	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
ImageJ 1.52a	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Microsoft Excel 2019 für Windows	Microsoft Corporation Redmond, WA, USA
Microsoft Power Point 2019 für Windows	Microsoft Corporation Redmond, WA, USA
Microsoft Windows 10	Microsoft Corporation Redmond, WA, USA
Microsoft Windows XP	Microsoft Corporation Redmond, WA, USA
Microsoft Word 2019 für Windows	Microsoft Corporation Redmond, WA, USA

Material und Methoden
Material

Prism 8.4 für Windows	GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA
ZEN 3.0 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, Deutschland

4.2 Zelllinien

4.2.1 MCF-7/MCF-7 MX

Aus dem Pleuraerguss einer metastasierenden Brustkrebserkrankung wurde 1973 an der *Michigan Cancer Foundation* die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 etabliert. Die zunächst freischwimmenden Tumorzellen wurden einer 69-jährigen kaukasischen Frau entnommen und über mehrere Passagen adhärent gezüchtet. Die Zelllinie weist eine vergleichsweise geringe Aggressivität und Invasivität auf. Da die Tumorzellen sowohl den Estrogen-Rezeptor als auch den Progesteron-Rezeptor exprimieren, ist eine antihormonelle Therapie möglich. Unter anderem deshalb werden die MCF-7-Zellen seit vielen Jahren in der Krebsforschung untersucht (238–240). Die Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen.

Als MCF-7 MX wird eine mitoxantronresistente Subzelllinie der MCF-7-Zellen bezeichnet. Diese wurde durch eine kontinuierlich steigende Exposition der parentalen MCF-7-Zellen gegenüber des Zytostatikums Mitoxantron generiert. Die Expression des *breast cancer resistance protein* (BCRP), welches zur Klasse der ABC-Transporter gehört, ist in den Zellen deutlich erhöht. Dieser Transporter ist für einen erhöhten Ausstoß des Zytostatikums verantwortlich, wodurch die Widerstandsfähigkeit der Tumorzellen gegenüber einer zytotoxischen Behandlung gesteigert ist (241, 242). Die MCF-7 MX-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. E. Schneider vom Wadsworth Center Albany, USA zur Verfügung gestellt.

4.2.2 MDA-MB-231

Die als MDA-MB-231 betitelte Zelllinie wurde 1973 ebenfalls aus einem Pleuraerguss einer kaukasischen Patientin mit Brustkrebs etabliert. Diese hatte bereits mehrere zytostatische Behandlungen erhalten. Es wurde eine adhärent wachsende, epitheliale Mammakarzinomzelllinie gezüchtet. Diese exprimiert weder den Estrogen-Rezeptor, noch den Progesteron- oder den HER2-Rezeptor, weswegen die MDA-MB-231-Zellen der Gruppe der *triple negative breast cancer* (TNBC) zugeordnet werden. Weiterhin weisen die MDA-MB-231-Zellen eine allgemein deutlich größere Aggressivität und Invasivität als die MCF-7-Zellen auf. Die MDA-MB-231-Zellen dienen als klassisches Modell zur Untersuchung von TNBC-Zellen, welche nicht mit einer zielgerichteten Therapie angegriffen werden können, sondern bei deren Behandlung klassische zytotoxische Substanzen eine größere Rolle spielen (240, 243, 244). Die verwendeten Zellen wurden von der Experimental Pharmacology and Oncology Berlin GmbH bezogen.

Material und Methoden

Zelllinien

4.2.1 A2780/A2780ADR/A2780cis

Bei den A2780-Zellen handelt es sich um eine adhärenz wachsende Ovarialkarzinomzelllinie. Die Zellen wurden aus dem Tumorgewebe einer unbehandelten Patientin am National Cancer Institute entnommen (245, 246).

Die A2780ADR-Zellen wurden durch wiederkehrende Exposition der parentalen Zellen gegenüber Doxorubicin (alter Handelsname **Adriamycin**) generiert und weisen eine hohe P-gp Expression auf. Bei P-gp handelt es sich um einen ABC-Effluxtransporter, der bei vielen Resistenzen eine Rolle spielt (247, 248).

Die cisplatinresistente Variante der A2780-Zellen, die A2780cis-Zellen, wurden durch wiederkehrende Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Cisplatin erzeugt. Diese Zelllinie zeichnet sich unter anderem durch eine erhöhte Konzentration des zytoprotektiven Glutathions aus (245, 249).

Alle drei Zelllinien wurden von der *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC) erworben.

4.2.2 W1/W1CR

Das Zelllinienpärchen W1/W1CR wurde von Professor Januchowski vom Institut für Medical Science der Universität Posen zur Verfügung gestellt. Die W1-Zellen sind dem ovariellen Adenokarzinom einer unbehandelten Patientin entnommen worden. Bei den W1CR-Zellen handelt es sich um die cisplatinresistente Zelllinie, welche in vitro durch Beimpfung mit inkrementell steigenden Cisplatinkonzentrationen erzeugt wurde. Die finale Konzentration an Cisplatin betrug dabei 1000 ng/ml. (250). Für die Resistenz der W1CR scheint vor allem HSP27, als Teil des MAPK-Signalwegs, von großer Bedeutung zu sein (251).

4.3 Zellkultur

4.3.1 Übersicht

Alle untersuchten Zelllinien wachsen als adhärenter Monolayer und werden zur Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Handhabung der verschiedenen Zelllinien beim Kultivieren unterscheidet sich nur in Einzelheiten, wie zum Beispiel in dem verwendeten Zellkulturmedium. Die Zusammensetzung des jeweils verwendeten Zellkulturmediums ist Kapitel 4.1.6 „Hergestellte Reagenzien“ zu entnehmen. Der Verlauf des Zellwachstums wird regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft, und spätestens bei dem Erreichen eines konfluenten Zustandes werden die Zellen subkultiviert. Um den Nährgehalt des verwendeten Zellkulturmediums nachzuverfolgen, ist allen eingesetzten Zellkulturmedien der Indikator Phenolrot zugesetzt. Färbt sich dieser Indikator durch die Akkumulation von sauren Stoffwechselprodukten gelb, wird das Kulturmedium gewechselt, um die Zellen mit frischen Nährstoffen zu versorgen.

Um einer bakteriellen Verunreinigung der Zellkultur vorzubeugen, werden den Zellkulturmedien Antibiotika zugesetzt. Weiterhin finden alle direkten Arbeiten mit den Tumorzellen steril in einem Laminar-Air-Flow (LAF) statt. Aus diesem Grund wird außerdem sterilisiertes Verbrauchsmaterial verwendet. Pipetten sowie andere Arbeitsgeräte werden mittels Isopropanol oder Bacillol desinfiziert oder erst nach Autoklavierung eingesetzt.

4.3.2 Subkultivierung und Zellzahlbestimmung

Um mit den Tumorzellen Experimente durchführen zu können, oder um diese zu subkultivieren, müssen die Zellen aus der Zellkulturflasche geerntet werden. Dazu wird als Erstes das alte Zellkulturmedium aus der Zellkulturflasche mittels eines Absaugsystems entfernt. Um tote Zellen und Zelltrümmer abzuwaschen, wird anschließend mit dem isotonischen Puffer DPBS der Zellrasen abgespült. Nachdem der Puffer abgesaugt wurde, werden die lebenden, adhärenen Zellen abgelöst. Dafür wird eine Trypsin/EDTA-Lösung in die Zellkulturflasche gegeben. Das Trypsin spaltet adhärenzvermittelnde Proteine, während EDTA mehrwertige Kationen komplexiert, welche für die Anhaftung der Zellen an der Zellkulturflasche nötig sind. Die Lösung wird gleichmäßig verteilt und die Zellkulturflasche im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für 1-2 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wird Zellkulturmedium in die Zellkulturflasche hinzugegeben und mit dem gesamten Volumen mehrfach der Flaschenboden gespült, um auf diese Weise alle Zellen zu suspendieren. Weiterhin dient das im Zellkulturmedium vorhandene FKS dazu die Proteaseaktivität des Trypsins zu beenden. Das gesamte Volumen, welches sich in der Zellkulturflasche befindet, wird nun in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 4 Minuten bei 450 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wird das übrig gebliebene Zellpellet anschließend in frischem Zellkulturmedium resuspendiert, und die Zellen können nun für Experimente verwendet oder in eine neue Zellkulturflasche ausgesät werden.

Material und Methoden

Zellkultur

Falls für ein Experiment eine definierte Zellzahl benötigt wird, wird die Konzentration an Zellen in der Zellsuspension mittels eines elektronischen Zellzählers bestimmt. Dafür werden 20 µl aus der erhaltenen Zellsuspension entnommen und in 10 ml sterilfiltrierter CASYton Lösung suspendiert. Diese Suspension wird anschließend mit einem CASY Modell TT Zellzähler vermessen. Die Messmethode des Zellzählers basiert grundlegend auf der Methode des Coulter Zählers. Dabei werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt, an der durch zwei Elektroden Spannung angelegt ist. Passiert nun eine Zelle diese Engstelle zwischen den Elektroden, ändert sich aufgrund der Leitfähigkeit der Zellmembran der elektrische Widerstand. Diese Widerstandsänderung ist abhängig von der Zellgröße. Dabei werden lebende Zellen mit intakter Zellmembran als größer wahrgenommen als tote Zellen, bei denen nur noch der Zellkern den Strom leiten kann. Auf diese Weise ist eine Differenzierung zwischen toten und lebendigen Zellen und somit eine Berechnung der Viabilität möglich (252). Schlussendlich kann so aus der Anzahl der Signale auf die Zellzahl geschlossen werden und über die Höhe des jeweiligen Widerstands auf die Zellgröße. Dadurch kann eine Aussage über die Größe und die Zellviabilität der gemessenen Population getroffen werden und dies für die Planung eines Experiments berücksichtigt werden. Der Zellzähler ist so eingestellt, dass dieser zwei Messungen mit je 400 µl Probenvolumen durchführt. Als lebende Zellen werden Zellen mit einer Größe zwischen 8 und 30 µm dokumentiert.

4.3.3 Besonderheiten bei der Zellkultur der resistenten Zelllinien

Um die Resistenz der zytostatikaresistenten Zelllinien aufrechtzuerhalten, müssen diese regelmäßig mit dem entsprechenden Zytostatikum beimpft werden.

Der Resistenzerhalt der MCF-7 MX-Zellen wird mittels der Zugabe von 0,1 µM Mitoxantron jede 5. Passage sichergestellt. Weiterhin werden die Zellen zwischen den durchgeführten Versuchen, wie ihre parentale Zelllinie auch, in DMEM inkubiert, allerdings benötigen die MCF-7 MX-Zellen den doppelten FKS-Gehalt im Medium, um ordnungsgemäß proliferieren zu können (248, 253).

Um die Widerstandsfähigkeit der cisplatinresistenten W1CR-Zellen aufrechtzuerhalten, wird alle zwei Wochen am Tag nach der Subkultivierung Cisplatin hinzugegeben. Dabei beträgt die Zielkonzentration in der Zellkulturflasche 1000 ng/ml. Dies entspricht der maximalen Konzentration, welche zur Etablierung der Resistenz verwendet wurde (250).

Die A2780cis-Zellen benötigen seltener und nur bei nachlassender Resistenz eine Cisplatinzugabe. Dabei wird die gleiche Cisplatinkonzentration verwendet wie bei den W1CR-Zellen.

Um die P-gp Überexpression und somit die Resistenz der A2780ADR-Zellen aufrecht zu erhalten, müssen diese Zellen regelmäßig mit 1 µM Doxorubicin beimpft werden (253).

Material und Methoden

Zellkultur

Um das Vorhandensein der erhöhten Resistenz im Vergleich zu den jeweiligen parentalen Zelllinien sicherzustellen, muss auf den Resistenzunterschied regelmäßig mittels eines MTT-Assays geprüft werden.

4.3.4 Kryokonservierung und Inkulturnahme

Um Zellen für einen längeren Zeitraum zu lagern, können diese eingefroren werden. Je nach Zelltyp werden die Zellen entweder in flüssigem Stickstoff bei -196 °C oder bei -80 °C in einem Gefrierschrank gelagert. Um die Zellen einfrieren zu können, müssen diese zunächst, wie in Kapitel 4.3.2 „Subkultivierung und Zellzahlbestimmung“ beschrieben, gewaschen, abgelöst, zentrifugiert, resuspendiert und gezählt werden. Nach dem Resuspendieren wird das entsprechende Volumen, welches die gewünschte Anzahl an Zellen enthält, aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wird wieder zentrifugiert, das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen werden in Kryomedium resuspendiert. Diese Suspension wird nachfolgend auf mehrere Kryogefäße aufgeteilt. Die befüllten Kryogefäße werden in einen Mr. Frosty[®] gestellt und mit diesem zusammen in einem -80 °C Gefrierschrank untergebracht. Der Mr. Frosty[®] soll ein langsames Absinken der Temperatur der Zellen sicherstellen, damit diese nicht durch einen sprunghaften Temperaturabfall Schaden nehmen. Nachdem die Kryogefäße einen Tag im Mr. Frosty[®] verbracht haben, können diese entweder weiter in einem -80 °C Gefrierschrank oder in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Bei dem Ausfrieren der Zellen ist darauf zu achten, dass diese möglichst schnell in Zellkulturmedium resuspendiert werden, da der hohe Prozentsatz an DMSO in dem verwendeten Kryomedium zytotoxisch wirkt. Deshalb wird zunächst ein Zentrifugenröhrchen mit Zellkulturmedium vorbereitet und dann schrittweise das Volumen aus dem Kryogefäß in das Zentrifugenröhrchen überführt, wobei eine möglichst gründliche und schnelle Durchmischung erreicht werden soll. Nach vollständiger Durchmischung kann die Suspension anschließend in eine Zellkulturflasche ausgesät werden.

Nach einigen Stunden, in denen die Zellen Gelegenheit hatten am Boden der Zellkulturflasche zu adhären, wird das Zellkulturmedium, in welchem sich noch DMSO befindet, aus der Zellkulturflasche abgesaugt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

4.4 Glucosemessung

4.4.1 Messprinzip eines Blutzuckermesssystems

Für die Verlaufskontrolle einer diabetischen Erkrankung werden von den Patienten zumeist handliche Blutzuckermesssysteme eingesetzt. Diese ermöglichen, durch eine elektrochemische Reaktion, eine Quantifizierung der Glucosekonzentration im Kapillarblut. Das Messprinzip eines handelsüblichen Blutzuckermesssystems basiert auf der spezifischen Umsetzung von Glucose durch den Glucosedehydrogenase-FAD-Komplex. Die Elektronenübertragung von Glucose auf FAD wird elektrochemisch gemessen und erzeugt ein proportionales elektrisches Signal. Auf diese Weise ist eine spezifische Quantifizierung der vorliegenden Glucosekonzentration möglich (254, 255).

4.4.2 Versuchsablauf

Die einfache, selektive Quantifizierung von Glucose wird in dieser Arbeit zur Untersuchung des Glucoseverbrauchs der unterschiedlichen Tumorzelllinien verwendet. Dabei soll beobachtet werden, ob sich zytostatikaresistente Zelllinien in ihrem Glucosstoffwechsel von ihren parentalen Zelllinien unterscheiden. Als erster Anhaltspunkt soll dafür die Abnahme des Glucosegehalts im Zellkulturmedium unter regulären Wachstumsbedingungen mit fortschreitender Zeit untersucht werden.

Der Versuchsablauf besteht aus dem Aussäen von 300.000 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte, wobei immer eine resistente Zelllinie mit einer parentalen Zelllinie verglichen wird. Die erste Messung der Glucosekonzentration erfolgt direkt aus dem Zellkulturmedium, während jede weitere Messung, nach jeweils 24 h, aus dem Überstand der Zellen erfolgt. Dadurch kann der zeitliche Verlauf der Glucoseabnahme im Zellkulturmedium beobachtet werden und zu den jeweiligen Zeitpunkten die verbliebene Glucosekonzentration im Zellkulturmedium der parentalen Zellen mit der der resistenten Zellen verglichen werden. Die statistische Auswertung des Glucosegehaltes in Abhängigkeit von der Zeit und der Zelllinie von mindestens drei unabhängigen Versuchen erfolgt mit Prism.

Material und Methoden

MTT-Assay

4.5 MTT-Assay

4.5.1 Übersicht

Ein klassisches Experiment zur Untersuchung der Viabilität von Zellen ist dadurch möglich, dass nur lebende Zellen in der Lage sind den Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in ein violette Formazan umzusetzen. Der genaue Reaktionsmechanismus ist nicht abschließend geklärt und es gibt mehrere Erklärungsansätze, wie es zu der in Abbildung 13 dargestellten Reduktion kommt. Diese Reaktion kann unter anderem in Mitochondrien intakter Zellen mithilfe von Succinat als Elektronendonator stattfinden. Allerdings zeigen neuere Erkenntnisse, dass die Elektronendonatoren NADPH und NADH außerhalb der Mitochondrien die Hauptrolle bei der Elektronenübertragung auf das MTT zu spielen scheinen (256). Die Menge des gebildeten Farbstoffes ist proportional zu der Anzahl lebender, stoffwechselaktiver Zellen (257). Dieser Fakt macht den MTT-Assay vielseitig einsetzbar. Zum einen wird der MTT-Assay zur Bestimmung der Viabilität von Zellen unter steigenden Zytostatikakonzentrationen verwendet und erlaubt somit die Berechnung von EC₅₀-Werten. Er kann weiterhin auch dazu verwendet werden die allgemeine proliferative Aktivität von Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen zu untersuchen.

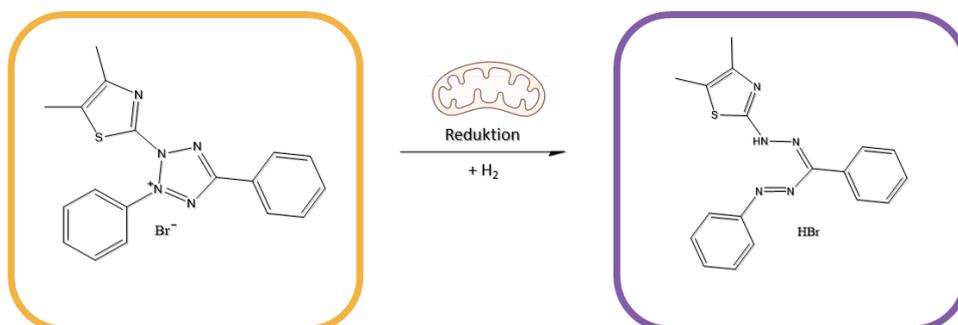


Abbildung 13: Reduktion von MTT zu einem violetten Formazan durch Reduktionsprozesse lebender Zellen.

4.5.2 Allgemeine Versuchsdurchführung

Die zu untersuchenden Zellen werden zunächst, wie in Kapitel 4.3 „Zellkultur“ beschrieben, abgelöst, gewaschen, zentrifugiert, resuspendiert und gezählt. Anschließend werden in die inneren 60 Wells einer 96-Well-Platte jeweils 80 µl Zellsuspension mit einer definierten Zellzahl pipettiert. Von den Ovarialkarzinomzelllinien A2780, A2780ADR, A2780cis, W1 und W1CR werden 10.000 Zellen, von den Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 15.000 Zellen, von den MCF-7 und MCF-7 MX 4000 Zellen pro Well ausgesät. Zumeist werden technische Triplikate ausgesät und auf jeweils eine Hälfte einer Platte eine Zelllinie pipettiert. Wie in Abbildung 14 dargestellt, werden in die äußeren Wells der 96-Well-Platte 90 µl DPBS pipettiert. Dieses dient als Verdunstungsschutz, damit in den inneren Wells mit Zellsuspension kein Zellkulturmedium verdunstet. Nach

Material und Methoden

MTT-Assay

24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ werden die Behandlungen hinzugefügt, sodass das Endvolumen in jedem Well 100 µl beträgt. Die zweite Spalte der Platte dient als Negativkontrolle, da in diese nur DPBS pipettiert wird. Unter dem Einfluss der Behandlung werden die Zellen weitere 72 Stunden inkubiert und der Assay wird anschließend ausgewertet.

Nach der Inkubation mit dem Zytostatikum beziehungsweise mit den jeweils zu testenden Substanzen werden für die Auswertung in jedes Well 20 µl MTT-Reagenz gegeben. Mit dieser wird für weitere 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit reduzieren die übrig gebliebenen, lebenden Zellen das MTT zu violetterem Formazan.

Nach der Inkubation wird die Flüssigkeit aus den Wells entfernt und die wasserunlöslichen Formazankristalle werden in 200 µl DMSO gelöst. Die Stärke der Färbung der Lösung hängt von der Menge des gebildeten Formazans ab, welche wiederum mit der Anzahl an lebenden Zellen korreliert. Die Absorption der Färbung wird mit einem Multiskan® EX vermessen. Dieser homogenisiert die DMSO-Formazan-Lösung in den Wells durch Schütteln und misst anschließend die Absorption bei den Wellenlängen 570 nm und 690 nm. In der Nähe von 570 nm befindet sich das Absorptionsmaximum des Formazansalzes, während bei 690 nm die Hintergrundmessung stattfindet. Die Werte der Hintergrundmessung werden von den Absorptionswerten der Formazanmessung abgezogen. Die resultierenden Absorptionswerte sollen im Bereich des Lambert-Beerschen Gesetzes liegen, damit die Korrelation zwischen der Absorption und der Konzentration der Formazankristalle gilt.

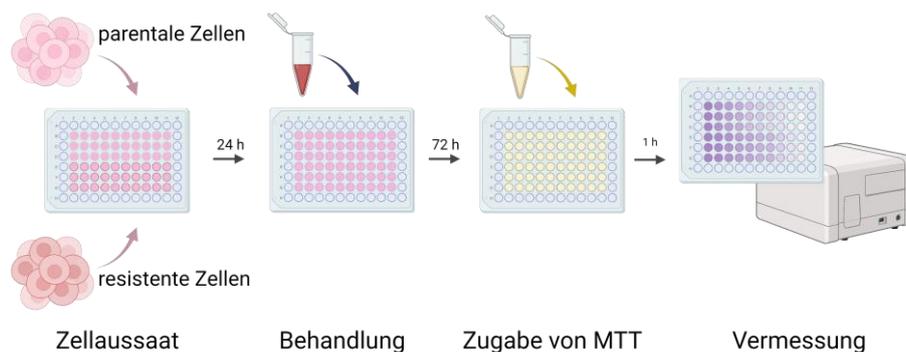


Abbildung 14: Schematischer Ablauf eines MTT-Assays. Erstellt mit BioRender.com

4.5.3 Untersuchung von Resistenzunterschieden mittels Bestimmung der EC₅₀

Für den Vergleich der Resistenz von unterschiedlichen Zelllinien ist es notwendig, das Ansprechverhalten der Zelllinien gegenüber einer zytotoxischen Behandlung zu quantifizieren. Mittels des MTT-Assays kann die mittlere effektive Wirkkonzentration (EC₅₀) bestimmt werden.

Material und Methoden

MTT-Assay

Um die EC₅₀ einer Substanz zu bestimmen, werden die Zellen mit einer Verdünnungsreihe dieser Substanz beimpft. Da die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen bei den unterschiedlichen Zelllinien unterschiedlich starke zytotoxische Effekte zeigen, müssen die Verdünnungsreihen angepasst werden, um den EC₅₀-Wert möglichst gut bestimmen zu können. Dazu wird versucht möglichst gleichviele Messpunkte oberhalb und unterhalb der EC₅₀ zu erreichen. Eine weitere Modifikation stellt die Abweichung von den standardmäßig verwendeten Abständen zwischen den verschiedenen Konzentrationen einer Verdünnungsreihe dar. Der übliche Abstand zwischen den verwendeten Konzentrationen beträgt eine halbe logarithmischen Einheit. Dies entspricht ungefähr einem Faktor von 3,16. Abhängig von der Zelllinie und der verwendeten Substanz ist es notwendig weitere Konzentrationen in der Nähe der zu erwarteten EC₅₀ zu testen, da nur durch diese erhöhte Auflösung eine ordnungsgemäße Auswertung möglich ist. Entsprechend sind die Konzentrationen der verwendeten Verdünnungsreihen in Abhängigkeit von der Zelllinie und der Substanz in Tabelle 8 zu finden.

Probe/ 10^x [M]	Mito	Doxo, MDA	Doxo, A2780	CDDP	3-BrPA	2-DG
1	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
2	-8,5	-7,0	-8,0	-7,5	-6,0	-5,0
3	-8,0	-6,204	-7,5	-7,0	-5,5	-4,5
4	-7,5	-6,0	-7,0	-6,5	-5,0	-4,0
5	-7,0	-5,903	-6,5	-6,0	-4,75	-3,5
6	-6,5	-5,602	-6,0	-5,5	-4,5	-3,0
7	-6,0	-5,5	-5,5	-5,0	-4,25	-2,5
8	-5,5	-5,301	-5,0	-4,5	-4,0	-2,0
9	-5,0	-5,0	-4,5	-4,0	-3,5	-1,5
10	-4,5	-4,5	-4,0	-3,5	-3,0	-1,0

Tabelle 8: Verwendete Verdünnungsreihen der getesteten Substanzen. Angegeben sind die Potenzen für eine Konzentration in mol/l. Mito: Mitoxantron, Doxo: Doxorubicin, CDDP: Cisplatin, 3-BrPA: 3-Bromopyruvat, 2-DG: 2-Deoxyglucose

Ausgewertet wird der Assay, indem die gemessenen Absorptionen zunächst auf den höchsten Mittelwert eines technischen Triplikats der jeweilig vermessenen Zelllinie normalisiert werden. Dies wird als 100 % Viabilität angesehen. Für die Bestimmung des EC₅₀-Werts werden diese normalisierten Werte auf die verwendeten logarithmierten Konzentrationen aufgetragen. Aus der sich ergebenden sigmoidalen Kurve kann am Wendepunkt der EC₅₀-Wert mittels einer vier parametrischen nicht linearen *dose response* Auswertung bestimmt werden.

Für einen übersichtlicheren Vergleich der Resistenzunterschiede zwischen zwei Zelllinien kann durch das in Formel 1 gebildete Verhältnis der gemessenen EC₅₀-Werte der Resistenzfaktor

Material und Methoden

MTT-Assay

berechnet werden. Dieser gibt an, um welchen Faktor der EC₅₀-Wert einer Zelllinie größer oder kleiner ist als der einer zweiten untersuchten Zelllinie.

$$\text{Resistenzfaktor} = \frac{EC_{50}(\text{Zelllinie 1})}{EC_{50}(\text{Zelllinie 2})}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung des Resistenzfaktors

Die EC₅₀-Werte oder die Resistenzfaktoren werden von mindestens drei unabhängigen Versuchsreihen mit identischem Ablauf zusammengefasst und statistisch ausgewertet.

4.5.4 Untersuchung auf Proliferationseffekte mittels *fixed-dose* Assays

Da der MTT-Assay eine einfache Methode ist, um eine Aussage über die proliferative Aktivität von Tumorzellen zu treffen, kann dieser auch verwendet werden, um zu beobachten, wie stark das Wachstum von Tumorzellen durch verschiedene, individuelle Behandlungen beeinflusst wird. In dieser Arbeit wird zum Beispiel untersucht, ob ein verringerter Glucosespiegel im Zellkulturmedium die resistenten und die parentalen Tumorzellen gleichermaßen beeinträchtigt. Dabei wird mit einer Konzentration von 1 g/l Glucose gestartet, welche bereits im hohen Normbereich des Nüchternblutglucosewerts liegt. Als nächste Konzentration wird 1,5 g/l gewählt, welche ungefähr dem postprandialen Wert eines Gesunden oder dem etwas erhöhten Nüchternblutglucosewert eines Diabetikers entspricht. Eine Konzentration von 2,0 g/l entspricht ungefähr dem postprandialen Wert eines Diabetikers (258). Zusätzlich werden noch die Konzentrationen von 3 g/l und 4,5 g/l untersucht, die nur in hochdiabetischen Zuständen auftreten (185).

Ein weiteres Szenario, in dem der *fixed-dose* Assay verwendet wird, ist die Testung von einzelnen bestimmten Zytostatika- und Bromopyruvatkonzentrationen. Dabei werden die zu testenden Konzentrationen basierend auf den Ergebnissen der EC₅₀-Untersuchungen gewählt. Diese im *fixed-dose* Assay getesteten Konzentrationen sind jeweils Teil von den in Tabelle 8 aufgeführten Verdünnungsreihen. Mit der Untersuchung von beispielhaften Kombinationen aus Zytostatikum und Glykolyseinhibitor wird überprüft, ob die Kombinationsbehandlungen sich vorteilhaft auswirken und ob die relative Proliferation stärker inhibiert ist als durch die jeweiligen Einzelbehandlungen.

Zur Auswertung des *fixed-dose* Assays werden die Absorptionen ebenfalls auf das technische Triplikat dessen Absorptionen den höchsten Mittelwert ergeben normalisiert. Dies ist in der Regel die unbehandelte Kontrolle. Anschließend werden die normalisierten Absorptionen mehrerer Versuchsreihen zusammengefasst und der relative Einfluss auf die Proliferation durch die unterschiedlichen Behandlungen direkt miteinander verglichen. Die statistische Auswertung erfolgt von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen mit PRISM.

4.6 qPCR

4.6.1 Übersicht

Die Expression von Enzymen ist unter anderem davon abhängig, wie oft die genomische DNA transkribiert wird. Die dafür benötigte RNA-Polymerase stellt bei einer erhöhten Expression mehr mRNA zur Verfügung, welche dann für die Translation durch Ribosomen zur Synthese der funktionalen Enzyme verwendet werden kann (259). Das Ziel der qPCR ist es die vorliegende mRNA-Menge zu quantifizieren, um somit eine Aussage über das Expressionsverhalten treffen zu können.

In einem der PCR vorgelagerten Versuchsschritt wird die isolierte mRNA zunächst mittels einer Reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt. Diese wird anschließend bei der PCR selektiv exponentiell vervielfältigt. Die Selektivität der Vervielfältigung wird durch die Verwendung von Primern sichergestellt. Bei diesen handelt es sich um kurzkettige Nukleinsäuresequenzen. Nach dem Aufschmelzen des cDNA-Doppelstrangs binden die Primer selektiv an komplementäre Sequenzen an der für das Zielprotein codierenden cDNA. Von diesen aus wird jeweils ein neuer Doppelstrang mittels einer DNA-Polymerase synthetisiert. Dieser kann nun wieder aufgeschmolzen werden und über erneute Primer-Anlagerung und DNA-Synthese ein exponentieller Zyklus gestartet werden, welcher mehrfach wiederholt wird. In die DNA-Stränge kann ein Fluoreszenzfarbstoff interkalieren. Die Fluoreszenz von diesem wird nach jedem Verdopplungszyklus semiquantitativ ausgewertet und lässt einen Rückschluss auf die ursprünglich vorliegende mRNA-Menge zu.

4.6.2 Durchführung der RT-qPCR

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wird durchgeführt, um die Ausmaße der Expression von IGFBP-2 und von den Enzymen der Glykolyse Hexokinase 2, Phosphofruktokinase 1 und Pyruvatkinase zu untersuchen. Dabei wird festgestellt, ob die Expression sich durch die Entwicklung einer Zytostatikaresistenz geändert hat.

Die Probengenerierung erfolgt, indem fast konfluent gewachsene Zellen, wie in Kapitel 4.3 „Zellkultur“ beschrieben, geerntet werden. Die Zellen werden nach dem Zentrifugieren mit PBS gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird das verbliebene Zellpellet bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Um die mRNA zu isolieren, wird das Direct Zol™ RNA Mini Prep Kit verwendet und entsprechend der beiliegenden Anleitung verfahren. Der Ablauf umfasst dabei die Zellyse mittels 700 µl Tri Reagent®, und die Aufreinigung auf einer Zymo-Spin™ IIC Säule, mit mehreren Waschschritten. Nach der Elution der mRNA von der Microsäule mit RNase freiem Wasser werden die mRNA-Konzentration und die Reinheit mittels eines Microspektrometers bestimmt. Das

Material und Methoden

qPCR

Verhältnis zwischen Nukleotiden und Proteinen in der eluierten Probe wird als Reinheitsmaß verwendet. Dieses wird durch den Quotienten aus den gemessenen Absorptionen bei 260 nm und 280 nm gebildet und soll möglichst nahe 2,0 sein.

Die extrahierte mRNA wird anschließend entweder bei -80 °C gelagert oder direkt mit dem 1-step RT-qPCR-Kit von Applied Biosystems weiterverarbeitet. Dieses enthält neben den klassischen Bestandteilen eines PCR-Mixes, wie der DNA-Polymerase und den Nukleotiden, auch eine Reverse Transkriptase. Aus diesem Grund können in einem Versuchsaufbau direkt die generierten mRNA-Proben verwendet werden und der Umweg über einen extra Versuchsschritt für die cDNA-Synthese entfällt. Die in dem Kit enthaltene Reverse Transkriptase sorgt in einem der qPCR vorgeschalteten Schritt für die Umwandlung der mRNA in cDNA. Mit dieser wird direkt anschließend die eigentliche Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Aufgrund der Kombination der Reversen Transkriptase und der qPCR in einem Versuchsaufbau wird dieses Verfahren als *one-step RT-qPCR* bezeichnet.

Nach der einmaligen reversen Transkription läuft die Polymerase-Kettenreaktion, wie in Abbildung 15 gezeigt, in drei Phasen ab, welche mehrfach wiederholt werden.

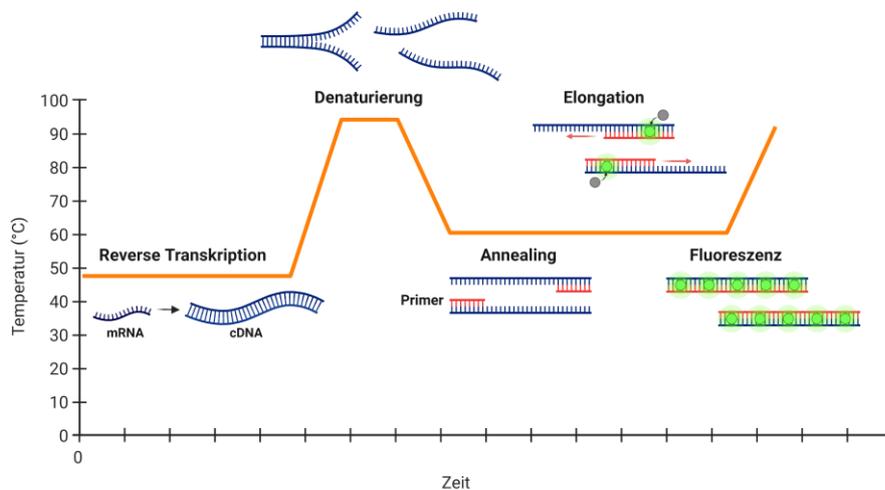


Abbildung 15: Schematischer Ablauf der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion mit vorgeschalteter reverser Transkription. (Zeitachse nicht maßstabsgetreu). Denaturierung, Annealing und Elongation bilden einen Zyklus, der mehrfach wiederholt wird.

In der ersten Phase wird der cDNA-Doppelstrang in zwei einzelsträngige DNA-Moleküle aufgeschmolzen. In der zweiten Phase findet die Primeranlagerung (Primer-Annealing) statt. Dabei lagern sich der *forward* und der *reverse* Primer an die gegenläufigen, einzelsträngigen DNA-Matrizen an. Die dritte Phase wird als Elongation bezeichnet. In dieser Phase wird durch die DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern, ein neuer komplementärer DNA-Abschnitt synthetisiert. Somit entstehen aus ursprünglich einem DNA-Strang zwei neue Stränge, die aufgrund des interkalierenden SYBR Green I Farbstoffes fluoreszieren. Dieser interkalierende Farbstoff lagert

Material und Methoden

qPCR

sich in die kleine Furche der gebildeten doppelsträngigen DNA-Helix ein (260). Durch diese Einlagerung wird ein Fluoreszenzsignal messbar, dessen Stärke proportional zu der Menge der gebildeten DNA ist. Die frisch synthetisierten DNA-Helices dienen als Vorlage für den nächsten Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion. Es handelt sich somit um eine exponentielle Vervielfältigung (260).

Es wird ein Versuchsansatz in einer 96 Well-Platte mit einem Gesamtvolumen von 10 µl pro Well in technischen Triplikaten gewählt. Es werden weiterhin Proben ohne genetisches Material eingeführt (*no template controls*), welche als Negativkontrollen fungieren. Sämtliche Reagenzien werden zwischen den Pipettierschritten auf Eis gelagert. Die Zusammensetzung des verwendeten RT-PCR-Mix ist Kapitel 4.1.6 „Hergestellte Reagenzien“ zu entnehmen. Das verwendete Temperaturprogramm für den gesamten Ablauf der RT-qPCR besteht aus den in Tabelle 9 aufgeführten Schritten.

Phase	Temperatur	Dauer [min]
Reverse Transkription	48 °C	30:00
cDNA-Denaturierung; Aktivierung der Enzyme	95 °C	10:00
Denaturierung	95 °C	0:15
Annealing & Elongation	60 °C	1:00
Beendigung der Reaktion	95 °C	0:15
Bestimmung des Schmelzpunktes	60-95 °C in 0,5 °C Schritten	0:10 pro Schritt

Tabelle 9: Ablauf der RT-qPCR. Dabei wird der im Kasten eingeschlossene Komplex aus Denaturierung, Annealing & Elongation 50-mal wiederholt. Die Fluoreszenz wird am Ende jeder Elongationsphase und während der Bestimmung des Schmelzpunktes nach jeder Temperaturerhöhung gemessen.

4.6.3 Auswertung mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Um mithilfe der Fluoreszenzintensität die ursprünglich vorliegende mRNA-Menge zu quantifizieren, wird zunächst der Ct-Wert (*cycle threshold*) bestimmt. Dieser gibt an wie viele Quantifizierungszyklen nötig sind, damit das gemessene Fluoreszenzsignal signifikant größer ist als die Hintergrundfluoreszenz. Die Ct-Werte werden durch die Software CFX Maestro bestimmt. In dieser werden die Einstellungen so modifiziert, dass der Ct-Wert mittels einer nicht-linearen Regression anhand der jeweiligen detektierten Fluoreszenzkurve eines Wells bestimmt wird. Außerdem wird festgelegt, dass die Ct-Wert-Bestimmung abhängig von dem jeweils verwendeten Primerpaar sein soll und nicht ein gemeinsamer Fluoreszenzgrenzwert für alle Primerpaare zur Auswertung herangezogen wird.

Material und Methoden

qPCR

Nach Abschluss der Polymerase-Kettenreaktion wird außerdem das Produkt aufgeschmolzen und der Schmelzpunkt bestimmt. Dabei ist der Schmelzpunkt abhängig von der jeweilig amplifizierten cDNA-Sequenz und deren Verhältnis zwischen Guanin-Cytosin und Adenin-Thymin Paaren (261). Aufgrund dessen weist jedes Produkt einen individuellen Schmelzpunkt auf. Die Schmelzpunktbestimmung dient der Sicherstellung, dass es sich bei dem gebildeten fluoreszierenden Produkt um tatsächlich nur eine Art von amplifizierter DNA handelt und nicht um Verunreinigungen oder gebildete Primer-Dimere. Letztere hätten einen niedrigeren Schmelzpunkt mit einer breiteren Schmelzkurve, beziehungsweise wären bei einer Verunreinigung mehrere Schmelzpunktmaxima bestimmbar (260, 261).

Nachdem mittels der Schmelzpunktbestimmung sichergestellt wurde, dass die gemessenen Ct-Werte alle auf einem sauberen Produkt basieren, werden diese ausgewertet. Die erhaltenen Ct-Werte sind nicht nur von der Expression, sondern auch von den Versuchsbedingungen abhängig, wie zum Beispiel der eingesetzten Template-Menge, dem verwendeten qPCR-Kit und dem verwendeten Temperaturprogramm. Somit sind die Ct-Werte selbst als relative Werte zu verstehen, die ohne weiteres keine direkte Quantifizierung oder Vergleichbarkeit zulassen. Diesem Umstand wird Abhilfe geschaffen, indem neben den Ct-Werten der Zielproteine auch die Ct-Werte von *housekeeping*-Genen mitbestimmt werden. Bei diesen handelt es sich zumeist um Strukturproteine, deren relative Expression sich zwischen den untersuchten Proben nicht unterscheiden sollte. Dies ermöglicht, dass ein Unterschied berechnet werden kann, welcher angibt, wie stark das Zielprotein im Vergleich zum *housekeeping*-Gen exprimiert ist. Dieser Wert wird als ΔCt bezeichnet und dessen Berechnung ist in Formel 2 dargestellt.

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{housekeeping-Gen})$$

Formel 2: Berechnung des ΔCt -Werts.

Um nun die Expression in verschiedenen Zelllinien miteinander zu vergleichen, wird der berechnete ΔCt -Wert von der zu untersuchenden Zelllinie mit dem ΔCt -Wert der Referenzzelllinie verrechnet. Das resultierende Ergebnis wird als $\Delta\Delta Ct$ -Wert bezeichnet. Dieser trifft eine Aussage darüber, um wie viele Quantifizierungszyklen sich die Expression des Zielgens in der untersuchten Zelllinie im Vergleich zur Referenzzelllinie unterscheidet (Formel 3).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Probe}) - \Delta Ct (\text{Referenz})$$

Formel 3: Berechnung des $\Delta\Delta Ct$ -Werts.

Aus dem $\Delta\Delta Ct$ -Wert wird anschließend die relative Genexpression mit Formel 4 berechnet. Diese berücksichtigt, dass es sich bei der PCR um einen exponentiellen Vorgang handelt und mit jedem durchlaufenen Zyklus sich die Menge der synthetisierten DNA verdoppelt. Das bedeutet somit, dass

Material und Methoden

qPCR

jeder Unterschied eines $\Delta\Delta Ct$ -Werts um einen Zahlenwert von eins mit einer jeweils verdoppelten (oder halbierten) Expression einhergeht.

$$\text{relative Genexpression} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

Formel 4: Berechnung der relativen Genexpression aus dem $\Delta\Delta Ct$ -Wert.

Die anschließende statistische Auswertung der relativen Genexpression von mindestens drei biologischen Replikaten wird mittels PRISM durchgeführt.

4.7 Proteinanalytik mittels Gelelektrophorese und Western Blot

4.7.1 Übersicht

Mittels qPCR kann zwar auf schnellem Weg eine Aussage über die Menge an vorhandener mRNA in einer Zelle getroffen werden, dies sagt allerdings noch nicht zwangsweise etwas darüber aus, wie viel funktionales Protein schlussendlich seine Aktivität in einer Zelle entfaltet. Zur relativen intrazellulären Proteinquantifizierung wird deshalb die antikörperbasierte Methode des Western Blots verwendet. Zur Vorbereitung werden zunächst Zellen lysiert und somit deren gesamtes Proteom freigegeben. Dieses wird dann elektrophoretisch nach Molekularmasse aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Auf dieser kann hochspezifisch mittels Antikörperbindung und Chemilumineszenz die Menge des vorliegenden Zielproteins semiquantitativ im Vergleich zu einer Kontrollbehandlung bestimmt werden. Der grobe schematische Ablauf ist in Abbildung 16 dargestellt und wird nachfolgend erläutert.

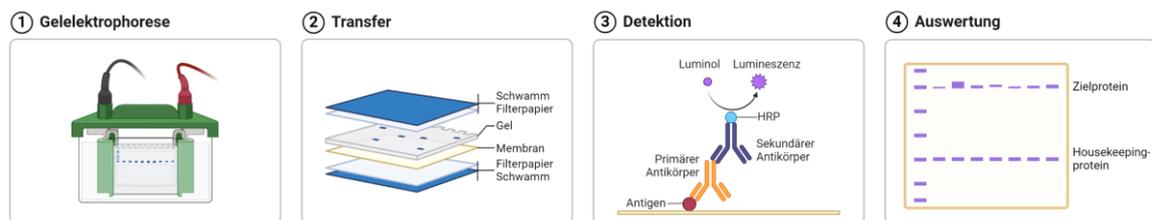


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Proteinquantifizierung mittels Gelelektrophorese und Western Blot. Erstellt mit BioRender.com.

4.7.2 Probengenerierung und Lysatgewinnung

Allgemein werden die zu untersuchenden Zelllinien zunächst, wie bei der Probenvorbereitung der PCR-Experimente auch, in einer Zellkulturflasche ausgesät und nach 72 h, bei nahezu konfluentem Zustand, geerntet und wie nachfolgend beschrieben lysiert. Bei der Untersuchung des Einflusses vom Glucosegehalt des Zellkulturmediums auf die IGFBP-2-Expression wird das Schema leicht modifiziert. Die Zellen werden zunächst in einem Glucosemangelmedium mit FKS ausgesät und nach 24 Stunden wird das Zellkulturmedium gewechselt. Dabei wird auf FKS freies Medium gewechselt und die Glucosekonzentration entweder bei 1 g/l belassen oder wieder auf die für die untersuchten Mammakarzinomzelllinien standardmäßige Konzentration von 4,5 g/l erhöht. Nach weiteren 48 h werden anschließend die Proben geerntet.

Um die Zellen lysieren zu können, müssen diese zunächst, wie im Kapitel 4.3 „Zellkultur“ beschrieben, geerntet, zentrifugiert und nochmal mit PBS gewaschen werden. Anschließend wird erneut zentrifugiert und die Zellpellets werden in einem Zellysepuffer bestehend aus CEB, PMSF und PIC resuspendiert. Die Lyse findet statt, während die Zellen in dieser Mischung für eine halbe Stunde bei 4 °C in einem Thermomixer® bei 800 rpm inkubiert werden. PMSF und PIC werden zugesetzt, um den Abbau der Proteine durch Proteasen zu inhibieren. Nach der Inkubation werden

Material und Methoden

Proteinanalytik mittels Gelelektrophorese und Western Blot

unlösliche Bestandteile und Zelltrümmer bei 15.000 g für 10 Minuten abzentrifugiert, sodass die klaren Überstände mit den gelösten, zu untersuchenden Proteinen abgenommen werden können. Die Überstände enthalten nun die isolierten Proteine und können bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

4.7.3 Proteinquantifikation mittels BCA-Assay

Um bei der Gelelektrophorese eine möglichst gleichmäßige Taschenbeladung gewährleisten zu können, werden zunächst die Konzentrationen der extrahierten Proteinlösungen bestimmt. Dazu wird ein BCA-Assay durchgeführt. Bei dieser kolorimetrischen Methode reduzieren die zu quantifizierenden Proteine zweiwertige Kupferionen zu einwertigen Kupferionen. Diese Reduktion wird hauptsächlich durch die Oxidation der Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin ermöglicht. Die reduzierten, einwertigen Kupferionen bilden mit der zusätzlich eingesetzten Bicinchoninsäure einen farbigen Komplex (262). Dabei ist die Menge an gebildetem Farbstoff proportional zu der Proteinmenge, sodass diese mittels einer Absorptionsmessung und dem Lambert-Beerschen-Gesetz quantifiziert werden kann.

In der praktischen Durchführung werden die Lysate zunächst mit hochreinem Wasser 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt. Diese Verdünnungen werden je als technische Duplikate in eine 96 Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wird als externer Standard eine BSA-Verdünnungsreihe mit Konzentrationen zwischen 0 µg/ml und 400 µg/ml in die Platte pipettiert. Diese Standardverdünnungsreihe ermöglicht eine absolute Konzentrationsbestimmung. Anschließend werden pro Well 200 µl einer Mischung aus BCA-Puffer und Kupfersulfat aus dem Pierce™ BCA-Protein-Assay-Kit hinzugegeben und die Proben werden für eine Stunde bei 60 °C inkubiert. Nach anschließender Homogenisierung werden die Absorptionen bei 570 nm vermessen und mittels der Kalibriergerade der BSA-Standards werden die Konzentrationen der Lysatproben bestimmt. Nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wird zur Auswertung der Mittelwert der Ergebnisse aller vier Verdünnungsstufen der jeweils zu untersuchenden Proteinlösung herangezogen.

4.7.4 Gelelektrophorese

Bevor eine Quantifizierung des Zielproteins mittels einer spezifischen Antikörperdetektion stattfinden kann, müssen die Proteine in den Zelllysaten zunächst mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) der Größe nach aufgetrennt werden. Dafür wird mittels SDS die Tertiärstruktur der Proteine zerstört und die Eigenladung der Moleküle maskiert, sodass eine Trennung ausschließlich aufgrund der Molekülgröße, respektive des Molekulargewichts erfolgt. Das SDS ist im Laemmli-Puffer enthalten, der bei der Probenvorbereitung zu den Lysaten gegeben wird. Dieser enthält außerdem Bromphenolblau zur Sichtbarmachung einer Laufmittelfront und Glycerin für die Dichteerhöhung der Probe, was ein Pipettieren in die Taschen des Gels erleichtert. Aus den Zelllysaten wird ein entsprechendes Volumen entnommen, welches

Material und Methoden

Proteinanalytik mittels Gelelektrophorese und Western Blot

20 µg Protein enthält und mit dem gleichen Volumen an 2× Laemmli-Puffer gemischt. Nach dem Versetzen der zu untersuchenden Proben mit dem Laemmli-Puffer wird die Mischung für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt, um somit die Proteinauffaltung zu erleichtern. Anschließend werden die Proben neben einem Proteingrößenstandard in ein *stain free* Gel pipettiert, welches in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Laufkammer mit Elektroden eingespannt ist. Die Elektrophorese wird bei 200 V und 350 mA für 45 Minuten durchgeführt.

Anschließend wird eine *stain free* Detektion durchgeführt. Bei dieser handelt es sich um eine UV-Belichtung des Gels, durch welche die Gesamtproteinmenge visualisiert werden kann. Dabei reagieren Trihalogenverbindungen, welche im *stain free* Gel enthalten sind, durch die UV-Anregung mit Tryptophanresten der Proteine, wodurch ein starkes Fluoreszenzsignal gemessen werden kann (263, 264). Die Messung dieses Fluoreszenzsignals dient zur Erfolgskontrolle der Elektrophorese und ermöglicht weiterhin die Quantifizierung des später detektierten Zielproteins in Relation zum gesamten Proteingehalt der jeweiligen Probe.

4.7.5 Western Blot

Nach der Elektrophorese und der *stain free* Detektion werden anschließend die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen, da nur auf dieser eine Antikörperdetektion stattfinden kann. Dafür wird ein sogenanntes Blot-Sandwich zusammengesetzt. Dieses besteht aus dem Gel und einer zuvor durch Methanol aktivierten PVDF-Membran, welche gemeinsam zwischen Filterpapieren und Schwämmen eingebettet liegen. Die Proteine werden mittels eines elektrischen Feldes zur Migration von dem Gel auf die Membran gebracht. Durch die Überführung auf die Membran wird das SDS entfernt, sodass die Tertiärstruktur der Proteine wiederhergestellt wird, welche notwendig für die Antikörperdetektion ist (265). Praktisch verwendet wird die Methode des *wet blots*. Dafür wird das Blot-Sandwich in einem Gestell in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingespannt. An die Elektroden wird eine Spannung von 100 V und eine Stromstärke von 350 mA für 45 Minuten angelegt. Die Übertragung soll bei einer möglichst niedrigen Temperatur ablaufen. Dies wird durch die Verwendung von kaltem Transferpuffer und einem Kühlelement sichergestellt.

Nach dem Transfer wird das Sandwich auseinandergebaut und die Membran entnommen. Um vor der Antikörperzugabe unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wird die Membran für 90 Minuten in einer Milchpulverlösung inkubiert und anschließend mehrfach mit TBS-T gewaschen. Nachfolgend wird der gegen das Zielprotein gerichtete monoklonale primäre Antikörper auf die Membran gegeben. Nach gleichmäßiger Verteilung kann die Bindung über Nacht stattfinden. Am nächsten Tag wird die primäre Antikörperlösung entfernt und es folgen Waschschritte mit TBS-T. Anschließend wird eine Lösung von einem sekundären Antikörper zu der Membran hinzugegeben. Der sekundäre Antikörper bindet an das tierspezifische Epitop des primären Antikörpers. Da der sekundäre Antikörper mit HRP konjugiert ist, ist anschließend eine

Material und Methoden

Proteinanalytik mittels Gelelektrophorese und Western Blot

quantitative Lumineszenzreaktion möglich. Die HRP ist in der Lage das zugegebene Luminolreagenz umzusetzen, sodass dessen Chemolumineszenz anschließend vermessen werden kann. Das Lumineszenzsignal ist schlussendlich von der Menge des zu detektierenden Zielproteins abhängig, da an diesem proportional viel primärer Antikörper gebunden ist, an welchem wiederum der sekundäre Antikörper mit der HRP gebunden hat. Dies ermöglicht somit, nach der Belichtung mit einem ChemiDoc™ XRS+, eine semiquantitative Auswertung.

4.7.6 Auswertung

Die gemessene Chemilumineszenz ist, wie bereits erwähnt, abhängig von der Menge des Zielproteins. Entsprechend kann die Auswertung mittels der Intensität des Lumineszenzsignals, was in der ImageLab® Software als Bandenintensität dargestellt ist, erfolgen. Somit kann eine semiquantitative Aussage über die vorliegende Proteinmenge im Vergleich zu einer Kontrolle getroffen werden. Zunächst müssen allerdings potenzielle Beladungsunterschiede der Geltaschen berücksichtigt werden. Damit wird sichergestellt, dass ein beobachteter Expressionsunterschied des Zielproteins zwischen zwei Proben nicht auf einer Abweichung der jeweilig vermessenen Gesamtproteinmenge beruht. Dafür wird mittels des zuerst aufgenommenen *stain free* Bildes die Gesamtproteinmenge jeder einzelnen Probe mittels der Fluoreszenzintensität bestimmt und bezogen auf eine gemeinsame Referenz der jeweilige Beladungsfaktor mit Formel 5 bestimmt.

$$\text{Beladungsfaktor} = \frac{\text{Fluoreszenz Gesamtproteinmenge Referenz}}{\text{Fluoreszenz Gesamtproteinmenge Probe}}$$

Formel 5: Berechnung des Beladungsfaktors mittels der Gesamtproteinmengen aus der stain free-Messung.

Im nächsten Schritt kann anschließend die Lumineszenzintensität des Zielproteins von den jeweiligen Proben bestimmt werden. Dafür wird zunächst die *background subtraction* so eingestellt, dass das Integral des Signals eindeutig und basisliniengetrennt bestimmt werden kann. Anschließend wird das Lumineszenzsignal einer Probe relativ zu der Kontrollbehandlung ausgewertet. Dafür wird die Bandenintensität des Zielproteins bei der untersuchten Probe ins Verhältnis zu der Bandenintensität des gleichen Proteins bei einer Kontrollbehandlung gesetzt. Das Ergebnis wird mit dem Beladungsfaktor multipliziert und auf diese Weise sichergestellt, dass die unterschiedliche Beladung der Geltaschen ausgeglichen ist. Für diese Operation wird Formel 6 verwendet.

$$\text{relative Proteinmenge} = \frac{\text{Bandenintensität Zielprotein Probe}}{\text{Bandenintensität Zielprotein Kontrolle}} * \text{Beladungsfaktor}$$

Formel 6: Berechnung der relativen Zielproteinmenge.

Die resultierende relative Proteinmenge von mindestens drei unabhängigen Proben wird anschließend mittels PRISM statistisch ausgewertet.

4.8 Proteinanalytik mittels ELISA

4.8.1 Übersicht

Eine weitere antikörperbasierte Möglichkeit für die Quantifizierung von Proteingehältern ist der *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Bei diesem werden in der Regel, im Gegensatz zum Western Blot, keine Zellysate verwendet, sondern der ELISA wird direkt zur Detektion von in Flüssigkeit gelösten Proteinen eingesetzt. Ein klassischer Anwendungsfall ist die Bestimmung der Konzentration eines Zielproteins im Zellkulturmedium. Auf diese Weise kann untersucht werden, wie Tumorzellen untereinander kommunizieren und sich gegenseitig zum Beispiel zum Proliferieren anregen können. Der Assay wird zumeist in einem Sandwich-Verfahren durchgeführt. Dafür werden zwei Antikörperarten verwendet, welche an unterschiedliche Epitope des Zielproteins binden. Das Zielprotein wird zunächst mittels eines *capture antibody*, welcher auf einer Mikrotiterplatte verankert ist, immobilisiert. Danach folgen mehrere Waschschrte, um ungebundene, sonstige Proteine zu entfernen. Abschließend wird ein *detection antibody* hinzugegeben, welcher an ein anderes Epitop des Zielproteins bindet. Der *detection antibody* ist in der Regel mit einer HRP konjugiert, welche einen Farbstoff umsetzen kann. Dabei wird klassischerweise Tetramethylbenzidin (TMB) als Farbstoff verwendet. Es gilt wieder die proportionale Korrelation, dass je mehr Protein vorhanden ist, desto mehr Farbstoff wird gebildet. Auf diese Weise ist eine kolorimetrische Auswertung mittels einer Absorptionmessung möglich. Da bei einem ELISA zumeist eine externe Standardkalibriergerade mit aufgenommen wird, ermöglicht dieser eine absolute Quantifizierung des Zielproteins.

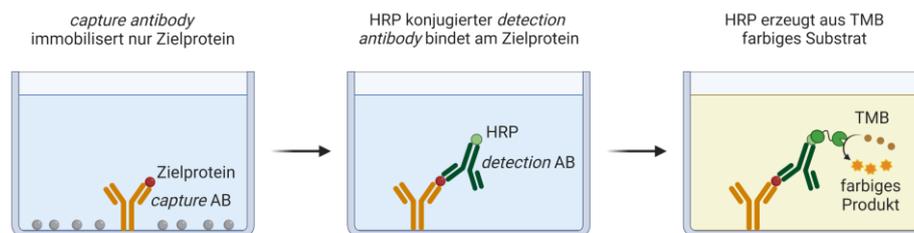


Abbildung 17: Detektionsprinzip des ELISA. Erstellt mit BioRender.com.

4.8.2 ELISA zur IGFBP-2 Bestimmung

In dieser Arbeit wird ein ELISA verwendet, um die extrazelluläre Konzentration von IGFBP-2 zu bestimmen. Dabei wird zum einen untersucht, ob eine Deregulation des IGFBP-2-Gehalts durch die Inkubation von Tumorzellen bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen beobachtet werden kann. Weiterhin wird untersucht, ob zytostatikaresistente Mammakarzinomzellen einen höheren IGFBP-2-Gehalt in ihrer Umgebung aufweisen und ob sich somit die extrazelluläre IGFBP-2 Konzentration als Marker einer Zytostatikaresistenz zeigt. Die Untersuchung des extrazellulären IGFBP-2 ist relevant, da dieses unter anderem durch das Binden an zellmembranständige Proteine Effekte innerhalb einer Tumorzelle auslösen kann (163).

Material und Methoden

Proteinanalytik mittels ELISA

Zur Probengenerierung werden die Zellen in einem glucosearmen Zellkulturmedium (1 g/l Glucose) mit FKS ausgesät. Das FKS ermöglicht den Zellen das Anwachsen am Boden der Zellkulturflasche. Nach 24 Stunden wird das Medium gegen FKS freies Medium ausgetauscht und jeweils bei einer Behandlung einmal die Standardglucosekonzentration von 4,5 g/l und einmal die Hungerglucosekonzentration von 1 g/l eingestellt. Nach weiteren 72 h Inkubation wird jeweils ein Aliquot des Zellkulturmediums abgenommen und bis zur Untersuchung bei -20 °C gelagert.

Mit den Zellüberständen wird der ELISA durchgeführt. Dabei wird sich an die Anweisungen des *Quantikine® ELISA Human IGFBP-2 Immunoassay-Kit* der Firma R & D Systems gehalten. Zunächst wird mit dem enthaltenen rekombinanten IGFBP-2 eine Standardkalibriergerade hergestellt, mit Konzentrationen zwischen 20 ng/ml und 0,313 ng/ml IGFBP-2 in 1:1 Verdünnungsschritten. Diese wird anschließend neben den Proben in die mit dem *capture antibody* vorbeschichteten Wells pipettiert. Alle Proben werden als technische Duplikate untersucht. Nach 2 Stunden Inkubationszeit hat der *capture antibody* das IGFBP-2 gebunden und es erfolgen mehrere Waschschriffe. Danach wird der *detection antibody* hinzugegeben und abermals für eine Stunde inkubiert. Anschließend wird wieder gewaschen und die Substratreagenz hinzugegeben. Mit dieser findet unter Lichtausschluss die Farbstoffbildung statt, welche nach 30 Minuten durch die Zugabe von Schwefelsäure beendet wird. Durch die Zugabe der Schwefelsäure ändert sich die Farbe von blau zu gelb und die Farbintensität kann mittels einer Absorptionsmessung bestimmt werden. Die Absorptionsmessung des Farbstoffes findet bei 450 nm und die Hintergrundmessung bei 570 nm statt. Die gemessenen Absorptionen sollen im Bereich des Lambert-Beerschen-Gesetzes liegen, damit von den gemessenen Absorptionen auf die Konzentrationen geschlossen werden kann.

4.8.3 Auswertung

Da eine Standardkalibriergerade mit rekombinantem IGFBP-2 aufgenommen wird, ist eine absolute Quantifizierung des IGFBP-2-Gehalts von den zu untersuchenden Proben möglich.

Die Auswertung der Absorptionswerte erfolgt mit PRISM. Mittels der Absorptionsmesswerte der Standards wird eine nichtlineare vierparametrische logistische Regression durchgeführt. Mittels dieser Standardkurve kann von den gemessenen Absorptionen der zu untersuchenden Proben auf die IGFBP-2-Konzentrationen geschlossen werden. Auf die Signifikanz der Konzentrationsunterschiede zwischen den unterschiedlichen Zelllinien und Behandlungen wird nach mindestens drei biologischen Wiederholungen statistisch mit PRISM getestet.

4.9 Durchflusszytometrie

4.9.1 Übersicht

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren, welches es erlaubt, einzelne Zellen im Rahmen einer Population zu untersuchen. Dies ermöglicht einen detaillierten Einblick in das zelluläre Geschehen, da auf diese Weise eine Aussage über lebendige Zellen getroffen werden kann und nicht, wie zum Beispiel beim Western Blot, erst eine ganze Zellpopulation lysiert werden muss.

Für die Untersuchung wird von dem Durchflusszytometer eine Zellsuspension vereinzelt, sodass anschließend, beim Durchführen der Zellen durch eine Kapillare, jede Zelle einzeln mittels eines Lasers bestrahlt werden kann. Aus dem resultierenden Streulicht lässt sich zum einen die Größe der Zelle mittels des *forward scatters* (FSC) bestimmen. Zum anderen kann mit dem um 90° gebrochenem Licht die Granularität der Zelle mittels des *side scatters* (SSC) bestimmt werden. Diese beiden Parameter ermöglichen schon eine erste Charakterisierung der untersuchten Zellen aufgrund ihrer Größe und ihres Aufbaus. Auf diese Weise ist es möglich zwischen verschiedenen Zellpopulationen und zwischen ganzen Zellen und Zelltrümmern zu unterscheiden.

Mittels der monochromatischen Laserbestrahlung können weiterhin Fluorophore angeregt werden. Die resultierende Fluoreszenzstrahlung wird durch ein komplexes Filtersystem aufgetrennt, sodass in verschiedenen Wellenlängenbereichen die Fluoreszenzintensität gemessen werden kann. Diese gemessene Fluoreszenzintensität ermöglicht eine semiquantitative Auswertung im Vergleich zu einer Kontrollbehandlung. Zum einen können dabei entweder mittels fluorophorgebundener Antikörper Zielproteine oder auch in die Zelle aufgenommene fluoreszierende Einzelsubstanzen quantifiziert werden (266).

4.9.2 Versuchsablauf

In dieser Arbeit wird das Durchflusszytometer dazu verwendet, um festzustellen, ob die Behandlung mit Bromopyruvat bei den untersuchten Zelllinien einen Einfluss auf die intrazelluläre Doxorubicinkonzentration aufweist. Diese Untersuchung liegt nahe, da die Hauptwirkung von Bromopyruvat in der Hemmung des Energiestoffwechsels postuliert ist, was mit einer verringerten ATP-Verfügbarkeit einhergeht. Dies ist relevant, da der Resistenzmechanismus gegenüber Doxorubicin in der Regel auf der Überexpression von ABC-Effluxtransportern beruht, welche ATP als Substrat für die Aufrechterhaltung ihrer Aktivität benötigen (130, 267).

Die zu untersuchenden Zellen werden in 6-Well-Platten ausgesät und nach 24 h mit den zu testenden Behandlungen beimpft. Dabei werden, basierend auf den beim MTT-Assay bestimmten EC₅₀-Werten, beispielhafte Konzentrationen von Doxorubicin und Bromopyruvat gewählt. Nach 72 h Inkubationszeit werden die Zellen geerntet. Um ein vollständiges Bild über die gesamte Zellpopulation zu erhalten, werden nicht nur die lebenden, sondern auch die toten Zellen mittels

Material und Methoden

Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie untersucht. Dazu werden zunächst die Überstände aus den Wells abgenommen und zentrifugiert, um die toten, nicht mehr adhärenen Zellen zu pelletieren. Die zellfreien Überstände werden anschließend abgesaugt und die mit Trypsin aus den Wells geernteten Zellen hinzugegeben. Nach Waschschrinen mit DPBS und einer BSA-Lösung werden die Zellen anschließend als technische Duplikate in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit einem Durchflusszytometer vermessen. Für die Messung wird zunächst anhand des FSC und des SSC ein *gate* angelegt, in dem die erwartete Zellpopulation auftritt. Anschließend wird das Durchflusszytometer so eingestellt, dass pro Well 5000 Events in diesem Gate gemessen werden sollen. Die Messempfindlichkeit (*gain*) der verschiedenen Wellenlängenbereiche, bei denen die Fluoreszenz gemessen wird, wird so angepasst, dass die Eigenfluoreszenz der Zellen im Messbereich zwischen 10-100 relativen Fluoreszenzeinheiten liegt.

4.9.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgt mittels der Software FlowJo, indem die gemessenen Einzelsignale zuerst mittels eines *gates* sortiert werden. Dafür werden mittels FSC und SSC die vermessenen Zellen eingegrenzt und die Zelltrümmer für die Auswertung ausgegrenzt. Dies wird gemacht, um die störende hohe Autofluoreszenz der Zelltrümmer aus der Auswertung zu exkludieren. Das verbliebene Signal entspricht dann nur noch der Fluoreszenz des intrazellulär aufgenommenen Doxorubicins und einer geringen Autofluoreszenz der Zellen, die allerdings durch die semiquantitative, vergleichende Auswertung ausgeglichen wird. Die Fluoreszenz des Doxorubicins wird durch einen blauen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Fluoreszenzintensität wird im Rotbereich, in einem Wellenlängenbereich von 695 ± 50 nm, ausgewertet. Dazu werden die Mittelwerte der Fluoreszenzsignale der technischen Duplikate gebildet und diese anschließend auf eine Kontrollbehandlung normalisiert. Die normalisierte relative Fluoreszenz wird anschließend in PRISM statistisch ausgewertet. Dabei werden mindestens drei biologisch unabhängige Versuche zusammengefasst.

4.10 Migrationsassay

4.10.1 Übersicht

Der Migrationsassay bietet eine simple Möglichkeit eine Aussage über die Beweglichkeit von Tumorzellen zu treffen. Nachdem einem konfluenten Zellrasen ein *scratch* zugefügt wurde und somit ein zellfreier Spalt entstanden ist, migrieren die Tumorzellen am Rand der Lücke in diese hinein und versuchen sie zu schließen. Dies wird mittels regelmäßiger, lichtmikroskopischer Aufnahmen beobachtet. Die Zeit, die die Tumorzellen benötigen, um die Lücke zu schließen, ermöglicht eine Aussage über die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen. Da dieser Effekt nicht von der Proliferation gestört werden soll, wird der Assay zumeist in wachstumsfaktorfreiem Zellkulturmedium durchgeführt. Dadurch wird sichergestellt, dass die beobachtete Spaltverkleinerung nur auf der Motilität beruht und nicht auf sonstigen proliferativen Effekten (268).

Der grundlegende Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 18 dargestellt. Dieser beginnt mit dem Aussäen einer zuvor optimierten Zellzahl in serumhaltigen Zellkulturmedium. Die Zellzahl wird dabei so gewählt, dass nach Anwachsen der Zellen sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hat. Ist dies geschehen, wird das Zellkulturmedium gewechselt und serumfreies Medium auf die Zellen gegeben. In dem Zellrasen wird außerdem ein Spalt erzeugt. Eine Möglichkeit diesen zu erzeugen ist, dass mittels einer Pipettenspitze ein *scratch* eingetragen wird. Eine alternative Möglichkeit zur Spaltgenerierung ist die Verwendung von Inlays, die beim Aussäen der Zellen einen entsprechenden Spalt blockieren, in dem die Zellen nicht anwachsen können. Dieses Inlay wird nach dem Anwachsen der Zellen, beim Wechsel des Zellkulturmediums, entfernt. Der entstandene zellfreie Spalt wird in regelmäßigen Abständen mit einem Mikroskop beobachtet und es werden Bildaufnahmen getätigt. Somit wird nachverfolgt, inwieweit die Zellen sich in den Spalt reinbewegen.

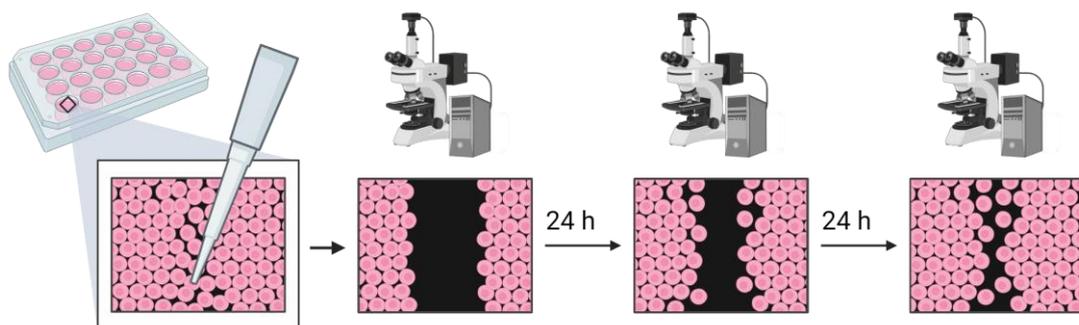


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines Migrationsassays. Erstellt mit BioRender.com

Material und Methoden

Migrationsassay

4.10.2 Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des Glucosegehaltes und von IGFBP-2

Der Migrationsassay wird in dieser Arbeit verwendet, um zu untersuchen, wie sich die MCF-7-Zellen und die MDA-MB-231-Zellen in ihrem Migrationsverhalten bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen unterscheiden. Weiterhin wird getestet, ob die Zugabe von rekombinatem IGFBP-2 einen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit hat.

Die zu untersuchenden Zellen werden zunächst in FKS-haltigem Medium mit nur 1 g/l Glucose in die Wells einer 24 Well-Platte ausgesät. Innerhalb von 24 Stunden wachsen die Zellen am Boden der Wells an. Die niedrige Glucosekonzentration soll bewirken, dass die Tumorzellen ihre Glucosereserven aufbrauchen und anschließend besser der tatsächliche Effekt von unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im Zellkulturmedium untersucht werden kann (185). Von den MDA-MB-231-Zellen werden 350.000 und von den MCF-7-Zellen 500.000 pro Well ausgesät. Die MCF-7-Zellen werden mit Inlays ausgesät, welche beim Zellkulturmediumwechsel nach 24 Stunden entfernt werden. Hingegen wird im Zellrasen der MDA-MB-231-Zellen beim Zellkulturmediumwechsel mittels einer Pipettenspitze ein *scratch* erzeugt. Der Zellkulturmediumwechsel beinhaltet die Umstellung auf FKS-freies Medium und weiterhin auch die Anpassung der Glucoselevels. Entweder wird eine Glucosekonzentration von 1 g/l beibehalten oder die Glucosekonzentration wird auf das für Mammakarzinomzellen standardmäßige Level von 4,5 g/l erhöht. Weiterhin wird bei bestimmten Behandlungen rekombinantes IGFBP-2 hinzugefügt.

Die erste Aufnahme mit einem Lichtmikroskop wird unmittelbar nach Erzeugung der zellfreien Lücke durchgeführt. Die weiteren Aufnahmen erfolgen jeweils im Abstand von 24 h. Mittels der Software ZEN[®] und ImageJ werden die aufgenommenen Bilder ausgewertet. Dazu wird die Fläche des Spaltes graphisch bestimmt. Die Fläche zum Zeitpunkt der Erzeugung des Spalts wird als 100 % gesetzt und in Abhängigkeit von der Zeit wird die Fläche der späteren Messungen auf diese Startmessung normalisiert. Die statistische Auswertung der relativen Spaltflächen zu den verschiedenen Zeitpunkten wird von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen mittels PRISM durchgeführt.

4.11 Knockdown mittels siRNA

4.11.1 Übersicht

Um die Bedeutung eines Proteins für das zelluläre Geschehen möglichst genau feststellen zu können, bietet es sich an, die Expression des Proteins zu vermindern und anschließend zu testen, ob sich das Verhalten der untersuchten Zellen ändert. Eine Möglichkeit zur Reduktion der Expression ist der transiente Knockdown mittels siRNA. Bei diesem bleiben die eigentlichen Gene, wie auch das bereits vorhandene Protein, unberührt. Allerdings wird die vorhandene mRNA, welche zur Proteinsynthese benötigt wird, abgebaut. Das restlich vorhandene Protein kann zwar noch seine Funktion ausüben, da allerdings die Zellen weiterhin proliferieren und sich teilen, und aufgrund fehlender mRNA kein Protein nachsynthetisiert werden kann, ist die Menge des restlich vorhandenen Proteins relativ bedeutungslos.

Bei der Durchführung des transienten siRNA vermittelten Knockdowns werden zunächst verschiedene dsRNA-Stränge in die Zelle eingeschleust. Dafür werden bestimmte kationische Lipide genutzt, um die Zellmembran temporär durchgängig zu machen. Bei den in die Zelle eingebrachten dsRNA-Strängen handelt es sich um kurzkettige doppelsträngige RNA-Moleküle. Diese werden durch den Dicer in jeweils zwei einzelsträngige siRNA-Moleküle aufgetrennt. Diese sind komplementär zu jeweils verschiedenen Basenfolgen in der für das Zielprotein kodierenden mRNA. Die siRNA-Moleküle werden von dem *RNA-induced silencing complex* (RISC) aufgenommen und binden dort an den entsprechenden komplementären Sequenzen der ebenfalls aufgenommenen mRNA. Dies ermöglicht dem RISC die mRNA abzubauen, welche somit nicht mehr für die Translation zur Verfügung steht (269).

Weil das Genom nicht beeinflusst wird und die siRNA-Menge begrenzt ist und bei dem Prozess ebenfalls gespalten wird, kann nur die aktuell vorhandene mRNA abgebaut werden. Somit handelt es sich um einen transienten Knockdown und das Zielprotein wird wieder normal exprimiert, nachdem die siRNA verbraucht ist. Der schematische Ablauf ist in Abbildung 19 dargestellt.

Material und Methoden

Knockdown mittels siRNA

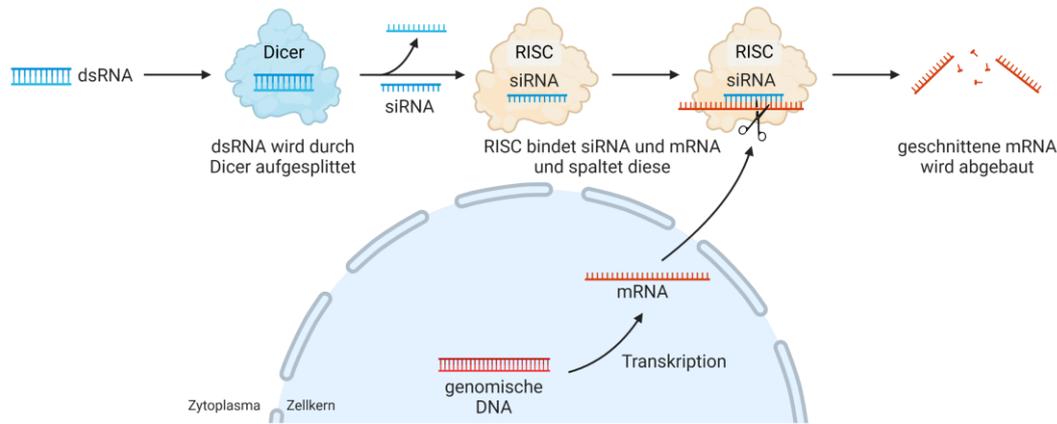


Abbildung 19: Schematische Darstellung eines transienten Knockdowns mittels siRNA. Erstellt mit BioRender.com.

4.11.2 Knockdown von HXK2 und IGFBP-2

In dieser Arbeit wird untersucht, inwiefern die Expression von IGFBP-2 einen Einfluss auf das Resistenzverhalten von Mammakarzinomzelllinien ausübt. Weiterhin wird getestet, welche Bedeutung die Expression von HXK2 für das Resistenzverhalten von Ovarialkarzinomzelllinien hat. Ziel beider Untersuchungen ist es zu überprüfen, ob der jeweilige Verlust des Proteins einen Einfluss auf die Widerstandsfähigkeit der Tumorzellen gegenüber einer zytotoxischen Behandlung hat. Ist dies der Fall, bedeutet das, dass diese Proteine sich somit möglicherweise als Targets für eine Chemosensitivierung eignen. Außerdem kann mit dem Knockdown überprüft werden, ob die Zielproteine wichtig für die Wirkung von bestimmten Inhibitoren sind.

Der Versuchsablauf des Knockdowns erstreckt sich über mehrere Tage. Grundsätzlich wird sich an das Protokoll des Herstellers der Materialien, Santa Cruz Biotechnology, gehalten. Allerdings werden einige Schritte optimiert und andere Vorgänge des Versuches verändert.

Am ersten Tag des Versuches werden die Zellen in ihrem jeweiligen normalen Wachstumsmedium ausgesät. Dabei werden von den Mammakarzinomzelllinien 250.000 Zellen pro Well und von den Ovarialkarzinomzelllinien 300.000 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte mit jeweils 2 ml Zellkulturmedium ausgesät. Am zweiten Tag wird das Knockdown-Reagenz, bestehend aus dem *Transfection Reagent* und der siRNA, nach 30-minütiger gemeinsamer Präinkubation, auf die Zellen gegeben. Dabei werden immer 6 μ l *Transfection Reagent* verwendet. Für den IGFBP-2 Knockdown werden 8 μ l siRNA und für den HXK2 Knockdown 6 μ l siRNA eingesetzt. Es wird zum einen siRNA verwendet, die zum Ziel hat, die Expression des Zielproteins zu vermindern, und zusätzlich auch noch eine Kontrollbehandlung (*scrambled control*) eingeführt. Diese durchläuft den identischen Vorgang wie die eigentliche Probe, allerdings bindet die hier eingesetzte siRNA in einem nicht kodierenden mRNA-Bereich. Auf diese Weise hat man eine Kontrollbehandlung, für die zwar der Versuchsablauf der gleiche ist, aber deren Proteinexpression nicht verändert ist. Für den besten Knockdown-Effekt werden die Zellen nun 24 Stunden unter dem Einfluss der

Material und Methoden

Knockdown mittels siRNA

siRNA-Behandlung inkubiert. Anschließend wird zu der Transfektionsmischung für weitere 24 Stunden Zellkulturmedium mit dem doppelten FKS und dem doppelten Antibiotikagehalt hinzugegeben, damit die Zellen anfangen können wieder normal zu proliferieren. Am Tag danach wird diese Mischung, die auch noch das Knockdownreagenz enthält, entfernt und die Zellen werden mit regulärem Zellkulturmedium versorgt. Einen weiteren Tag später kann, somit am 5. Tag, begonnen werden mit den Zellen Experimente durchzuführen. Zum einen wird ein Teil der Zellen lysiert und mit den Lysaten ein Western Blot durchgeführt. Auf diese Weise soll die Knockdowneffektivität überprüft und somit sichergestellt werden, dass die Expression des Zielproteins tatsächlich reduziert ist. Weiterhin werden MTT-Assays ausgesät, um zu untersuchen, wie sich die Zellen mit einer reduzierten Menge des Zielproteins im Vergleich zur *scrambled control* gegenüber einer zytotoxischen Behandlung verhalten.

4.12 Statistik

Zur statistischen Auswertung aller Experimente wird GraphPad PRISM 8.4 verwendet. Alle statistischen Auswertungen werden von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Zum Vergleich zweier Proben wird ein t-Test verwendet. Wenn mehr als zwei Proben ausgewertet werden sollen, die abhängig von einer Variable sind, wird dies mittels eines One-Way ANOVA getan. Wenn ein Effekt untersucht werden soll, der abhängig von zwei Variablen ist, wie zum Beispiel bei dem Glucoseverbrauchs-Assay oder der Glucoseproliferation, wo die Variable Zeit oder Glucosekonzentration und Zelllinie getestet wird, wird ein Two-Way ANOVA verwendet.

Die Signifikanzniveaus der gezeigten Asteriske werden wie folgt verwendet: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: *** und $p > 0,05$: nicht signifikant (ns).

Bei der Darstellung von Histogrammen wird als Lagemaß das arithmetische Mittel gewählt und mit den Fehlerbalken als Streuungsmaß die Standardabweichung.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 IGFBP-2-Expression in Mammakarzinomzellen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welche Bedeutung IGFBP-2 für repräsentative Mammakarzinomzelllinien besitzt und inwiefern die IGFBP-2-Expression durch die extrazelluläre Glucosekonzentration beeinflusst wird.

Zunächst wurde getestet, ob der Glucosespiegel einen Einfluss auf die IGFBP-2-Expression ausübt. Dazu wurden MCF-7-Zellen unter verschiedenen Glucosebedingungen auf ihre IGFBP-2-Expression, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf intrazellulärer und extrazellulärer Proteinebene, untersucht. Die mRNA-Expression wurde mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode und den *housekeeping*-Genen β -Actin und GAPDH auf die Expression von IGFBP-2 in solchen MCF-7-Zellen normalisiert, die bei einem niedrigen Glucoselevel gewachsen sind. Die mittels Western Blot bestimmte Proteinmenge wurde ebenfalls auf die IGFBP-2-Expression von Zellen, die bei einem niedrigen Glucosegehalt gewachsen sind, normalisiert. Das sezernierte IGFBP-2 konnte mittels ELISA und einer externen Standardkurve absolut quantifiziert werden. Die festgestellten Expressionsunterschiede sind in Abbildung 20 dargestellt.

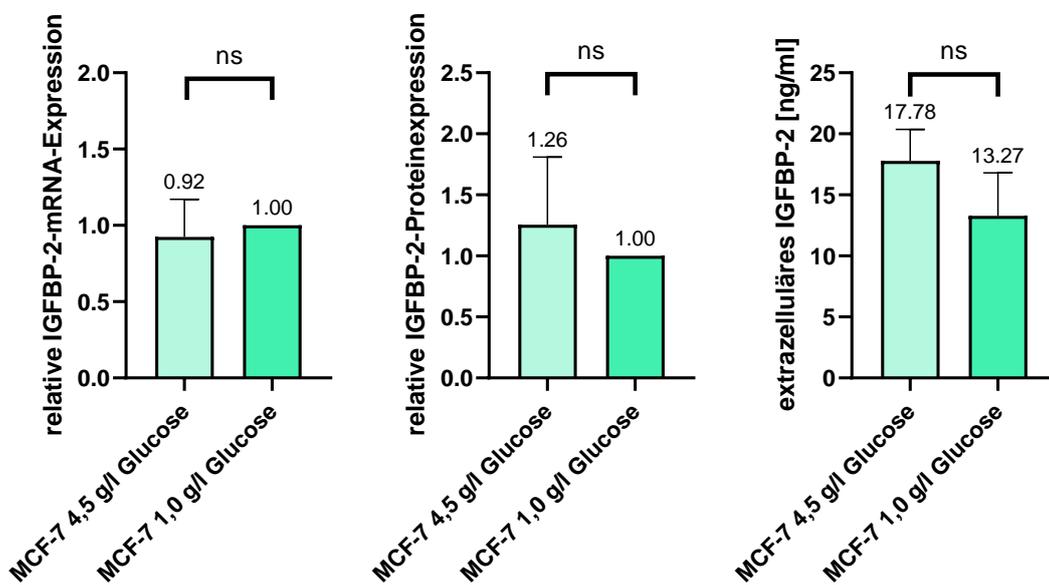


Abbildung 20: IGFBP-2 von MCF-7-Zellen gewachsen bei 4,5 g/l Glucose im Vergleich zu 1,0 g/l Glucose.

Auf mRNA-Ebene zeigte sich kaum eine Deregulation der Expression von IGFBP-2. Auf der Ebene des intrazellulären IGFBP-2, also bei Betrachtung der Zelllysate, traten starke Schwankungen auf, wobei eine deutliche, aber nicht signifikante, Tendenz in Richtung einer erhöhten IGFBP-2-Expression bei einem erhöhten Glucoselevel sichtbar war. Am deutlichsten war der

Ergebnisse und Diskussion

IGFBP-2-Expression in Mammakarzinomzellen

Einfluss der Glucose auf das extrazelluläre IGFBP-2 zu sehen (Faktor ~1,34), wobei auch dort keine Signifikanz festgestellt werden konnte.

Als weiterer Aspekt wurde untersucht, inwieweit sich IGFBP-2 als Marker für eine Zytostatikaresistenz in mitoxantronresistenten Zellen eignen könnte. Dabei wurde auf den IGFBP-2-Gehalt in den MCF-7 MX-Zellen, im Vergleich zu den parentalen MCF-7-Zellen, getestet. Die MCF-7 MX-Zellen weisen eine ca. 4000-fach höhere Resistenz gegenüber Mitoxantron auf als die normalen MCF-7-Zellen (241). Es wurden die gleichen Untersuchungen durchgeführt, wie bei der Testung bezüglich des Einflusses des Glucosegehalts. Ob der umgebende Glucosespiegel einen Einfluss auf die IGFBP-2-Expression der MCF-7 MX-Zellen ausübt, konnte nicht untersucht werden, da die mitoxantronresistenten Zellen bei dem reduzierten Glucosespiegel von 1 g/l Glucose nicht lebensfähig waren und somit keine Proben generiert werden konnten. Dies gab allerdings einen Hinweis darauf, dass zytostatikaresistente Zelllinien stark von Glucose abhängig sein können.

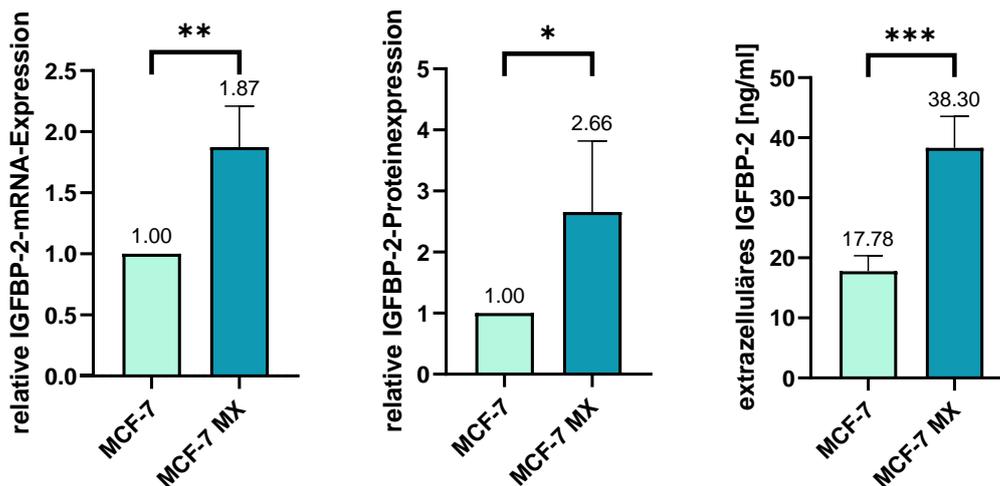


Abbildung 21: IGFBP-2-Gehalt der MCF-7-Zellen im Vergleich zu MCF-7 MX-Zellen.

Bei dem in Abbildung 21 dargestellten IGFBP-2-Gehalt der MCF-7-Zellen, im Vergleich zu dem Gehalt in den MCF-7 MX-Zellen, zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression in den mitoxantronresistenten Zellen. Diese Erhöhung war sowohl bei der mRNA-Menge (Faktor ~1,9), als auch beim intrazellulären (Faktor ~2,7) und extrazellulären (Faktor ~2,2) IGFBP-2 sichtbar. Dies deckt sich auch mit den Erkenntnissen von anderen Forschungsgruppen, bei deren Untersuchungen IGFBP-2 bei zytostatikaresistenten Zellen ebenfalls stark hochreguliert war (236, 237). Somit unterstreichen die hier gewonnenen Kenntnisse, dass IGFBP-2 möglicherweise ein Marker für eine Chemoresistenz darstellen könnte.

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss von Glucose und IGFBP-2 auf das Migrationsverhalten

5.2 Einfluss von Glucose und IGFBP-2 auf das Migrationsverhalten

Die erhöhte Invasivität von Tumorzellen ist ein entscheidender Faktor der Malignität von Tumoren und trägt entscheidend zum Prozess der Metastasierung bei. Die Zelldynamik kann in vitro durch Migrationsassays beobachtet werden. Um den Einfluss von Glucose beziehungsweise von IGFBP-2 auf die Invasivität von Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurde ein von der Proliferation unabhängiger Migrationsassay durchgeführt. Untersucht wurde dabei die Zellmigration in einen zuvor in den Zellrasen gebildeten Spalt.

Die MCF-7-Zellen wurden bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen und jeweils mit und ohne den Zusatz von rekombinantem IGFBP-2 untersucht. Als Dosis wurden 50 ng/ml IGFBP-2 gewählt, welche dem ca. 2,5-fachen der eigenen Produktion der MCF-7-Zellen entspricht (Abbildung 21) und nahezu die Menge beträgt, die von den MCF-7 MX-Zellen sezerniert wird.

In Abbildung 22 ist der Verlauf der Größe der Spaltfläche über die Zeit dargestellt. In der Abbildung zeigt sich, dass der Glucosespiegel nur einen geringen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit der MCF-7-Zellen entfaltet hat. Bei 4,5 g/l Glucose migrierten die Zellen nicht signifikant schneller als bei der geringeren Glucosekonzentration. Die Zugabe von IGFBP-2 übte ebenfalls keinen signifikanten vorteilhaften Effekt auf die Migrationsgeschwindigkeit aus. Es waren nur leichte Tendenzen zu erkennen, dass die IGFBP-2-Zugabe bei einer niedrigen Glucosekonzentration die Migrationsfähigkeit etwas steigerte, während bei einer hohen Glucosekonzentration das Gegenteil der Fall war. Allgemein waren die Spaltflächen nach 72 h durchschnittlich nur um ein relativ geringes Maß auf 77-86 % des jeweiligen Ursprungsspalts geschrumpft, was für eine geringe Migrationsfähigkeit der MCF-7-Zellen spricht.

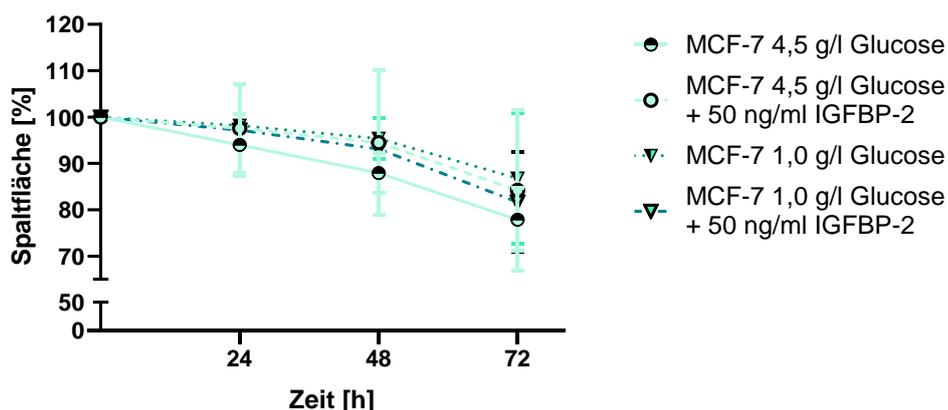


Abbildung 22: Einfluss der Glucosekonzentration und von exogenem IGFBP-2 auf die Migration von MCF-7-Zellen.

Für eine alleinige Messung der Migration, ohne den Einfluss der Proliferation, wurde nach dem Anwachsen der Zellen auf FKS-freies Medium gewechselt. Da die mitoxantronresistenten

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss von Glucose und IGFBP-2 auf das Migrationsverhalten

MCF-7 MX-Zellen durch die Entwicklung der Resistenz stark in ihrem Stoffwechsel mutiert sind, überlebten diese Zellen den Wechsel auf FKS-freies Medium nicht. Somit konnte der Assay mit dieser Zelllinie nicht durchgeführt werden. Dies lieferte abermals einen Hinweis darauf, dass diese zytostatikaresistente Zelllinie einen veränderten Stoffwechsel aufweist und eine bessere Nährstoffversorgung benötigt.

Zusätzlich zu den MCF-7-Zellen wurden auch MDA-MB-231-Zellen auf ihre Migrationsfähigkeit untersucht. Diese Zelllinie exprimiert, wie in Vorversuchen getestet und in der Literatur bestätigt, kein IGFBP-2 (235). Bei der Untersuchung dieser Mammakarzinomzelllinie zeigte sich zum einen, dass der Glucosespiegel einen deutlich größeren Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit nahm. Weiterhin resultierte bei diesem Zellsystem die Zugabe von 100 ng/ml IGFBP-2 (270), in einer etwas erhöhten Migrationsgeschwindigkeit. Die Ergebnisse der IGFBP-2-Zugabe bei einem niedrigen Glucosespiegel waren nicht auswertbar. In Abbildung 23 ist eine Zusammenfassung der Messreihen gezeigt und in Abbildung 24 sind beispielhafte Aufnahmen der Migration der MDA-MB-231-Zellen dargestellt. Im Durchschnitt betrug die Spaltfläche nach 48 h bei den Zellen, die nur bei 1,0 g/l Glucose kultiviert wurden, noch 78 %, während bei einer Inkubation mit 4,5 g/l Glucose die Spaltfläche im Durchschnitt nur noch 58 % des ursprünglichen Spalts, bei Zugabe von IGFBP-2 sogar nur 51 %, betrug. Allerdings konnte bei statistischen Tests keine Signifikanz festgestellt werden.

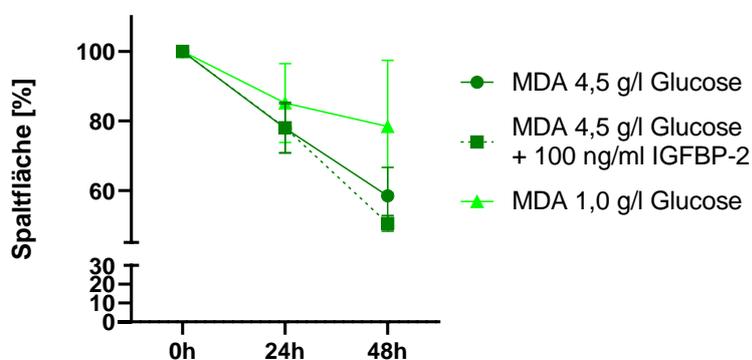


Abbildung 23: Einfluss von Glucose und IGFBP-2 auf das Migrationsverhalten von MDA-MB-231-Zellen.

Aus den Daten der Migrationsassays lässt sich schließen, dass ein höherer Glucosespiegel einen fördernden Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit der untersuchten Mammakarzinomzellen nehmen könnte. Allerdings zeigte sich bei den MCF-7-Zellen, welche bereits selbst IGFBP-2 exprimieren, durch die Zugabe von weiterem rekombinanten IGFBP-2 kein geschwindigkeitserhöhender Effekt. Die Zugabe von IGFBP-2 erhöhte allerdings in geringem Maße die Migrationsfähigkeit der MDA-MB-231-Zellen, welche selbst kein IGFBP-2 exprimieren. Allerdings war dieser Effekt im Rahmen der durchgeführten Messreihe nicht signifikant.

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss von Glucose und IGFBP-2 auf das Migrationsverhalten

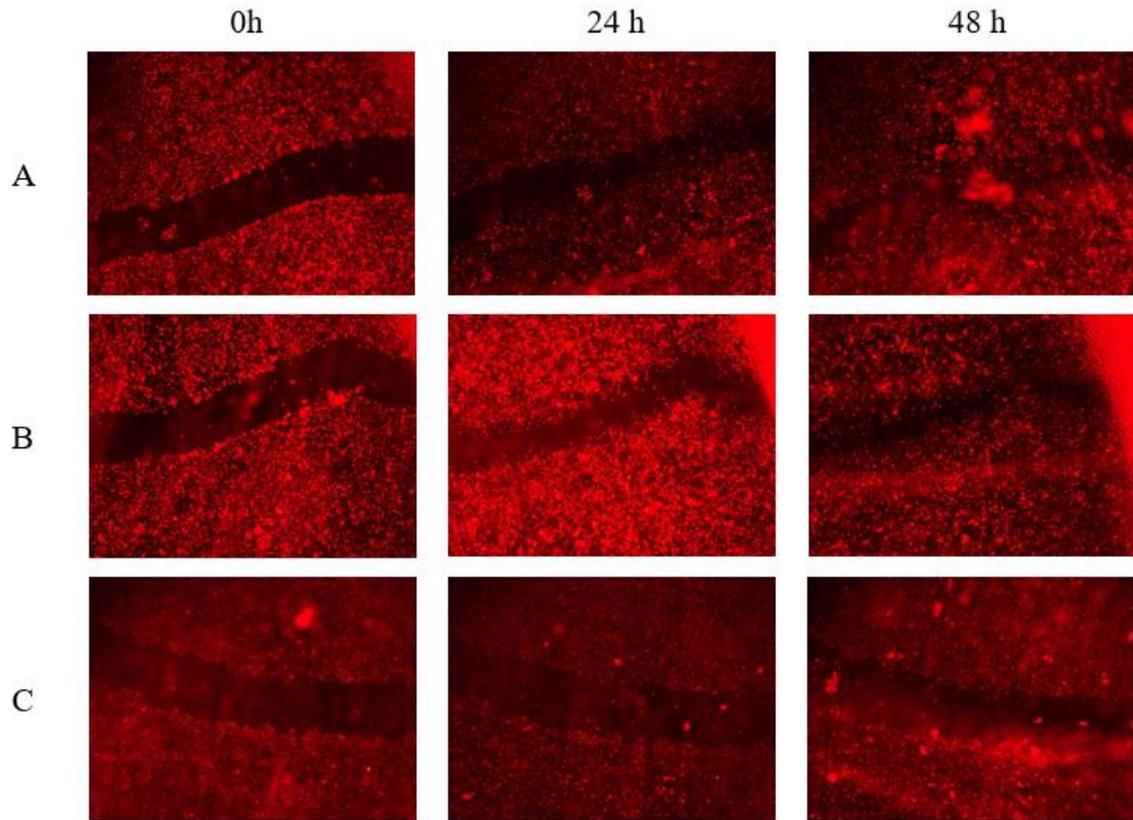


Abbildung 24: Fotos einer beispielhaften Migrationsmessung der MDA-MB-231-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. A: 4,5 g/l Glucose, B: 4,5 g/l Glucose + 100 ng/ml IGFBP-2, C: 1,0 g/l Glucose

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss von Glucose und rekombinatem IGFBP-2 auf das Resistenzverhalten

5.3 Einfluss von Glucose und rekombinatem IGFBP-2 auf das Resistenzverhalten

Da sich bei den MDA-MB-231-Zellen ein Einfluss des IGFBP-2 auf das Migrationsverhalten der Zellen zeigte, wurde anschließend getestet, ob IGFBP-2 einen Einfluss auf die Zytostatikawiderstandsfähigkeit der Tumorzellen entfaltet. Dabei wurde gleichzeitig mit untersucht, ob auch ein unterschiedlicher Glucosespiegel einen Effekt ausüben kann.

Bei den Experimenten mit den MDA-MB-231-Zellen zeigte sich in den EC_{50} -Werten von Doxorubicin eine große Abhängigkeit von der Glucosekonzentration des Zellkulturmediums. So war der EC_{50} -Wert bei einer hohen Glucosekonzentration fast 50 % größer als bei einer niedrigen. Durch die Zugabe von 100 ng/ml rekombinatem IGFBP-2 wurde die Widerstandsfähigkeit um weitere 17 % gesteigert und war signifikant erhöht (Abbildung 25).

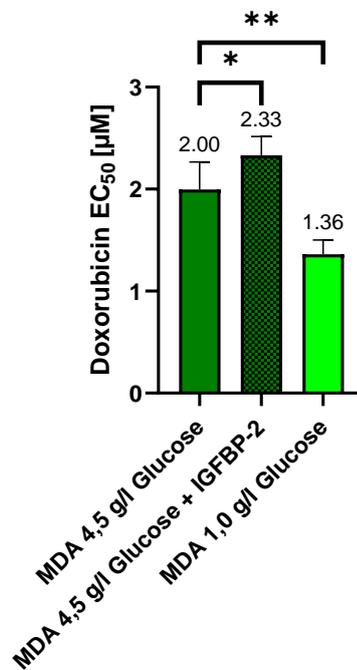


Abbildung 25: Widerstandsfähigkeit der MDA-MB-231-Zellen gegenüber Doxorubicin, angegeben als EC_{50} , in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration und IGFBP-2 (100 ng/ml).

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss eines IGFBP-2-Knockdowns auf die Zytostatikaempfindlichkeit

5.4 Einfluss eines IGFBP-2-Knockdowns auf die Zytostatikaempfindlichkeit

Nachdem festgestellt wurde, dass die Erhöhung des für die MCF-7-Zellen zur Verfügung stehenden IGFBP-2 weder einen Vorteil für deren Überlebensfähigkeit unter einer Zytostatikabehandlung (Abbildung 26), noch für die Migration brachte (siehe Kapitel 5.2), wurde untersucht, ob der Verlust des von den Zellen selbst exprimierten IGFBP-2 eine merkbare Veränderung auf das zelluläre Verhalten gegenüber einer Zytostatikabehandlung ausübt.

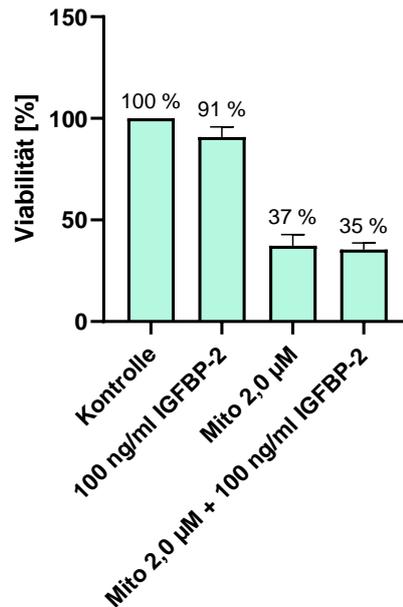


Abbildung 26 Einfluss von IGFBP-2, Mitoxantron (Mito), und IGFBP-2 in Kombination mit Mitoxantron auf die Viabilität von MCF-7-Zellen.

Durch den siRNA-vermittelten-Knockdown von IGFBP-2 in den MCF-7-Zellen wurde die IGFBP-2-Expression auf ca. 40 % gesenkt (Abbildung 27).

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss eines IGFBP-2-Knockdowns auf die Zytostatikaempfindlichkeit

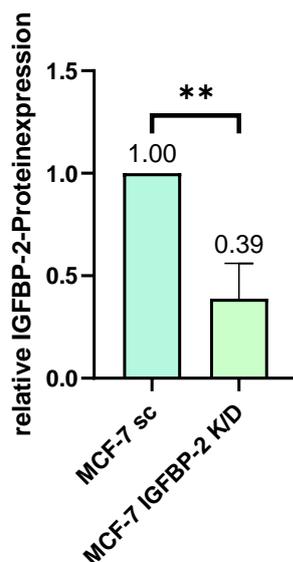


Abbildung 27: Relative IGFBP-2-Proteinexpression nach siRNA-vermittelterm-Knockdown.

Während Uzoh et al. durch den Knockdown von IGFBP-2 eine reduzierte Widerstandsfähigkeit der von ihnen untersuchten Prostatatumorzellen gegenüber Zytostatika nachweisen konnten (271), wurde in dieser Arbeit bei den untersuchten Mammakarzinom-Knockdown-Zellen kein Effekt sichtbar. Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen. Der linke Graph stellt dar, wie sich die Knockdown-Zellen und die *scrambled*-Zellen jeweils bei ausgewählten, unterschiedlichen Behandlungen verhalten haben. Normalisiert wurde dabei auf die unbehandelte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie. Dabei war ein ähnliches Verhalten beider Varianten sichtbar. Dies impliziert, dass der Knockdown von IGFBP-2 eine in diesem Kontext zu vernachlässigende Bedeutung besitzt. Die Zugabe von IGFBP-2 allein wies einen tendenziell eher negativen Einfluss auf die Viabilität auf. Als Dosis wurde dabei die bei den MDA-MB-231-Zellen als wirkungsvoll etablierten 100 ng/ml gewählt. Auch bei der Behandlung der Zellen mit Mitoxantron konnte IGFBP-2 dessen zytotoxischen Effekt nicht abmildern, sondern verstärkte ihn im Gegenteil tendenziell sogar nicht signifikant. Beim direkten Vergleich der Zelllinien miteinander zeigte sich weiterhin, dass die Knockdown-Zellen bei allen Behandlungen tendenziell besser proliferierten als die korrespondierenden *scrambled*-Zellen (rechter Graph in Abbildung 28).

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss eines IGFBP-2-Knockdowns auf die Zytostatikaempfindlichkeit

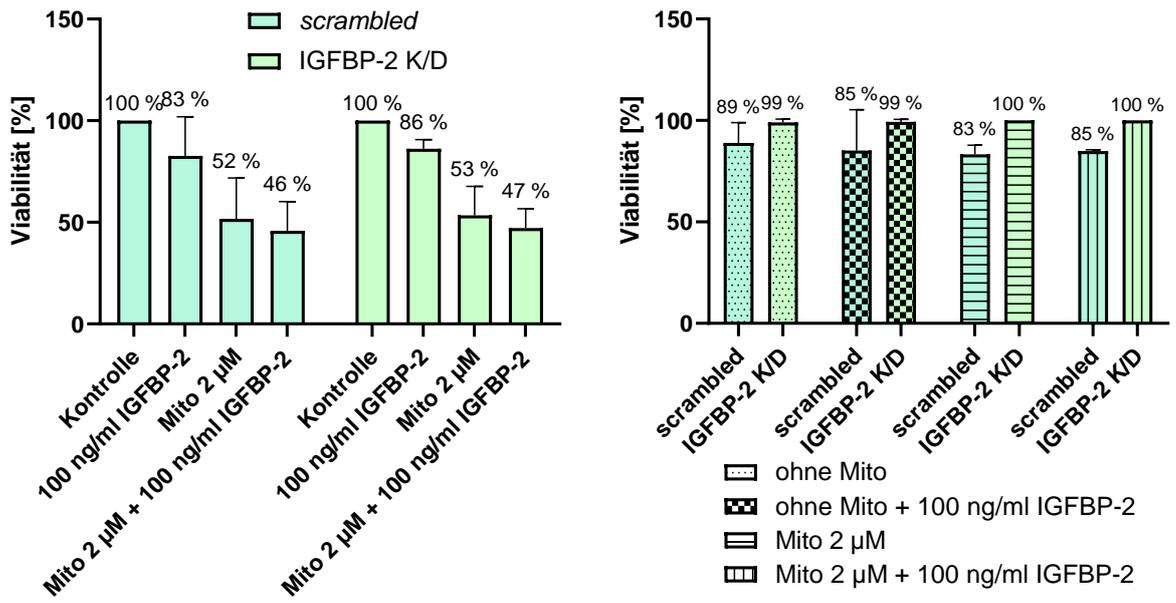


Abbildung 28: Links: Effekte von unterschiedlichen Behandlungen bei MCF-7-scrambled- und Knockdown-Zellen. Rechts: Vergleich der Viabilität der scrambled- und der Knockdown-Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen.

5.5 Zwischenfazit IGFBP-2 in Mammakarzinomzellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des Einflusses von IGFBP-2 auf Tumorzellen zeigen, dass IGFBP-2 keinen bemerkenswerten Effekt auf die zellulären Eigenschaften der untersuchten Mammakarzinomzellen hinsichtlich Invasivität und Sensitivität ausübt. Bei den MDA-MB-231-Zellen, welche kein IGFBP-2 exprimieren, erhöhte die Zugabe von rekombinantem IGFBP-2 die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen zwar leicht, aber nicht signifikant. Allerdings steigerte es signifikant die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegenüber einer Doxorubicinbehandlung. In den MCF-7-Zellen konnte hingegen weder durch die Reduzierung des IGFBP-2-Spiegels durch einen Knockdown, noch durch die Zugabe von zusätzlichem, rekombinanten IGFBP-2 eine Veränderung des Zellverhaltens in den verwendeten Assays nachgewiesen werden. Es zeigte sich einzig, dass die mitoxantronresistente Subzelllinie MCF-7 MX eine höhere IGFBP-2-Expression aufwies.

Die beobachteten Effekte liegen vermutlich in dem komplexen Zusammenspiel des IGF-Systems begründet. IGFBP-2 selbst kann zwar einen Einfluss auf die zellulären Aktivitäten nehmen, allerdings ist der regulierende Effekt von IGFBP-2 auf die Aktivität der IGFs in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Es gibt zwar Studien, in denen der Knockout von IGFBP-2 zu einer erhöhten Zytostatikaempfindlichkeit, einer Reaktivierung von PTEN und einer verringerten Proliferation geführt hat (166, 171), allerdings konnte auch ein gegenteiliger Effekt gezeigt werden. In der Forschungsarbeit von Juncker-Jensen et al. wurde beobachtet, dass IGFBP-2 in resistenten Zellen überexprimiert war und somit einen Resistenzmarker darstellen könnte. Allerdings hatte der Knockout von IGFBP-2 keinen Einfluss auf das Wachstum von resistenten Zellen und somit schien dieses in dem untersuchten System nicht essentiell zu sein (237).

Eine weitere mögliche Erklärung der beobachteten Effekte könnte sein, dass verschiedene Mengen für unterschiedliche Effekte des IGFBP-2 verantwortlich sind. So könnte es einen Konzentrationsbereich geben, in dem IGFBP-2 für Tumorzellen vorteilhafte Effekte ausübt, aber eine Steigerung über diese Konzentration hinaus keinen weiteren Nutzen bringt. Entsprechendes wurde bereits von Foulstone et al. beobachtet (171). Weiterhin wäre denkbar, dass über ein verstärktes Abfangen von IGF sogar proliferationshemmende Effekte ausgeübt werden könnten. Ähnliche Überlegungen ergeben sich bei der Reduktion des IGFBP-2-Levels. Zum einen könnten dadurch mehr IGF-1 und IGF-2 freigesetzt werden oder diese besser kontinuierlich freigegeben werden, was in einem proliferationsfördernden Effekt resultieren könnte (162). Zum anderen wird durch den in dieser Arbeit verwendeten IGFBP-2-Knockdown die Menge des IGFBP-2 nur reduziert und dessen Expression nicht komplett ausgeschaltet. Die verbleibende Menge an IGFBP-2 ist dabei möglicherweise ausreichend, um den IGF-unabhängigen Effekt auszulösen und die vor dem Knockdown relativ höhere Expression zur Ausübung der Effekte gar nicht notwendig.

5.6 Glucoseabhängigkeit von Tumorzellen

Bei den IGFBP-2-Untersuchungen wurde beobachtet, dass die mitoxantronresistente MCF-7 MX-Zelllinie extrem empfindlich auf Glucosemangel reagierte. Dies wurde zum Anlass genommen, in verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien, welche bei einem Glucosemangel nicht sofort starben, den Glucosestoffwechsel weitergehend zu untersuchen und zu testen, ob dieser sich in resistenten Zelllinien, im Vergleich zu den parentalen Zelllinien, unterscheidet.

Zur ersten funktionalen Untersuchung wurde der Glucoseverbrauch von resistenten Tumorzellen im Vergleich zu den parentalen Tumorzellen dokumentiert. Weiterhin wurde untersucht, wie stark die jeweiligen Tumorzelllinien von einer relativen Glucosemangelsituation beeinträchtigt werden. Bei diesen ersten Untersuchungen stellte sich auf verschiedene Weisen heraus, dass die Entwicklung einer Resistenz mit einem veränderten Glucosemetabolismus einhergehen kann. Zunächst werden die Untersuchungen zur Glucosekonsumption der Zellen betrachtet, deren Ergebnisse in Abbildung 29 dargestellt sind. Bei der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 zeigte sich, dass die doxorubicinresistente Subzelllinie A2780ADR signifikant mehr Glucose verbrauchte als die ursprüngliche Zelllinie. So war nach 72 h im Zellkulturmedium der A2780-Zellen noch durchschnittlich 0,73 g/l Glucose, während im Zellkulturmedium der A2780ADR-Zellen die Glucosekonzentration nur noch ca. halb so groß war und im Durchschnitt 0,37 g/l betrug. Auch die cisplatinresistenten A2780cis-Zellen verbrauchten geringfügig mehr Glucose als die parentalen Zellen (nach 72 h war noch 0,68 g/l Glucose im Zellkulturmedium vorzufinden). Überraschenderweise zeigte sich bei dem Zelllinienpärchen W1/W1CR ein gegensätzliches Bild. Die W1-Zellen wiesen einen höheren Glucoseverbrauch als die cisplatinresistenten W1CR-Zellen auf. Nach 72 h war die Glucosekonzentration im Zellkulturmedium der W1-Zellen bei 0,32 g/l und bei den W1CR-Zellen bei 0,46 g/l.

Ergebnisse und Diskussion

Glucoseabhängigkeit von Tumorzellen

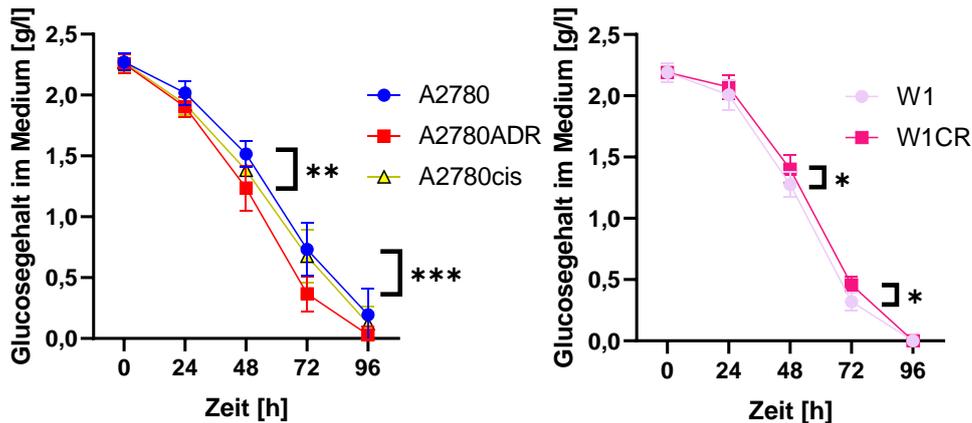


Abbildung 29: Glucoseverbrauch kultivierter Ovarialkarzinom-Zellen mit unterschiedlichen Resistenzverhalten in Abhängigkeit von der Zeit. Ausgewertet mittels 2-Way-ANOVA. Dieser berücksichtigt bei der Berechnung der Signifikanzen zwischen zwei Messpunkten der beiden Zelllinien zu einem Zeitpunkt immer auch den Unterschied zwischen den Zelllinien zu anderen Zeitpunkten. Die beiden dargestellten Signifikanzen in der linken Abbildung sind zwischen A2780- und A2780ADR-Zellen.

Zusätzlich wurde die relative Wachstumsfähigkeit der Ovarialkarzinomzelllinien in Abhängigkeit von unterschiedlichen Glucosekonzentrationen untersucht. Dies ist in Abbildung 30 dargestellt. Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass alle untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien ihre maximale Wachstumsfähigkeit bei einer Glucosekonzentration von 2 g/l im Zellkulturmedium erreichten. Es zeigte sich, dass, wie es bereits die Ergebnisse des Glucoseverbrauchsassays erwarten ließen, die W1-Zellen schlechter bei niedrigeren Glucosekonzentrationen wuchsen als die W1CR-Zellen. Bei 1,5 g/l Glucose wiesen die W1CR-Zellen noch ca. 73 % der maximalen Viabilität auf, die W1-Zellen hingegen nur ca. 49 %. Weiterhin wuchsen bei niedrigen Glucosekonzentrationen sowohl die A2780ADR- als auch die A2780cis-Zellen signifikant schlechter, im Vergleich zu ihren parentalen Zellen. Bei 1,5 g/l Glucose im Zellkulturmedium wiesen die A2780-Zellen noch ein normales Proliferationsverhalten auf, während die Viabilität der A2780ADR-Zellen schon signifikant auf 80 % ihrer maximalen Viabilität reduziert war. Die Ergebnisse der A2780cis-Zellen befanden sich in einem ähnlichen Rahmen, haben aber stärker geschwankt, weshalb keine Signifikanz festgestellt werden konnte. Bei 1 g/l Glucose zeigte sich der Unterschied zwischen den Zelllinien noch deutlicher. Während die A2780-Zellen noch 80 % ihrer maximalen Viabilität aufwiesen, war die Viabilität der A2780ADR- und A2780cis-Zellen hoch signifikant auf 47 % und 23 % reduziert.

Ergebnisse und Diskussion

Glucoseabhängigkeit von Tumorzellen

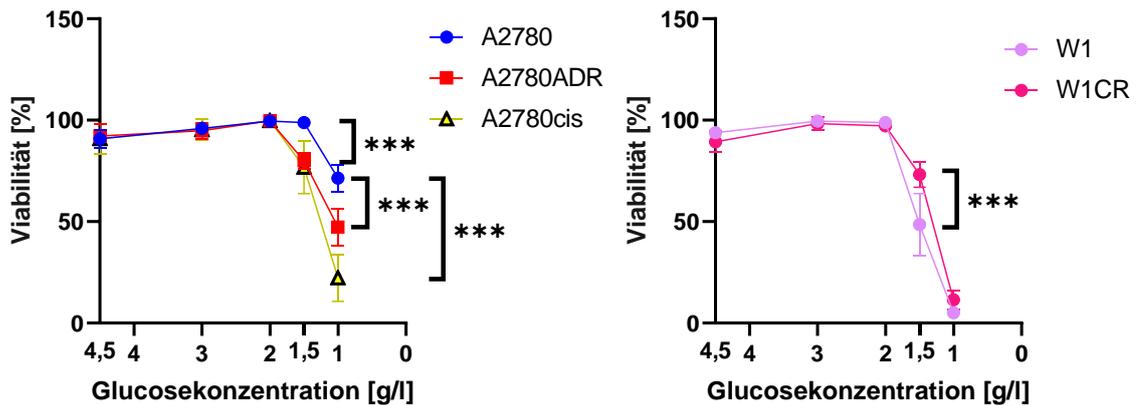


Abbildung 30: Viabilität der Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration. Ausgewertet mittels 2-Way-ANOVA. Die Signifikanzen in der linken Abbildung sind bei 1,5 g/l Glucose zwischen A2780- und A2780ADR-Zellen und bei 1,0 g/l zwischen A2780-Zellen und A2780ADR-Zellen bzw. A2780-Zellen und A2780cis-Zellen.

Die Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 werden grundsätzlich bei einer deutlich höheren Glucosekonzentration kultiviert als die Ovarialkarzinomzellen. Deshalb wurde diese Zelllinie als Referenz für eine stark glucoseabhängige Zelllinie ebenfalls getestet. Bei der Glucosekonzentration, bei der die untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien ihre maximale Viabilität aufgewiesen haben, waren die MDA-MB-231-Zellen schon deutlich in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt, die nur noch ca. 50 % betrug. Dies war ein Indiz für eine größere Abhängigkeit der Zellen von einer hohen Glucoseversorgung und einem entsprechend stark ausgeprägten Glucosemetabolismus.

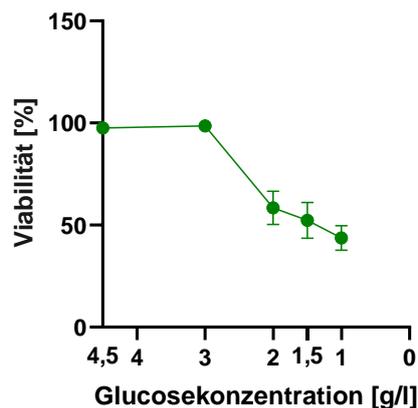


Abbildung 31: Viabilität in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration bei MDA-MB-231-Zellen.

5.7 Einfluss von Glucosestoffwechsellinhibitoren

5.7.1 Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber Glykolyseinhibitoren

Nachdem beobachtet wurde, dass die zytostatikaresistenten Zellen eine deutlich veränderte Glucoseabhängigkeit zeigten, wurde untersucht, ob sich diese entsprechend in einem anderen Ansprechverhalten gegenüber einem Glykolyseinhibitor widerspiegelt. Zunächst wurden die A2780-Zelllinie und ihre resistenten Subzelllinien auf ihre Empfindlichkeit gegenüber 2-Deoxyglucose (2-DG) hinsichtlich der EC_{50} -Werte des Inhibitors untersucht. Die in Abbildung 32 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die A2780ADR- und die A2780cis-Zellen eine signifikant höhere Empfindlichkeit gegenüber 2-DG aufwiesen als die parentalen Zellen. Da sich allerdings die EC_{50} -Werte im millimolaren Bereich befanden, zeigte sich 2-DG in der Monotherapie als relativ untoxisch. Vor allem unter dem Aspekt, dass eine EC_{50} von 5,48 mM praktisch der gleichen Konzentration entspricht, in der Glucose im Blut eines gesunden, nüchternen Menschen vorliegt (258).

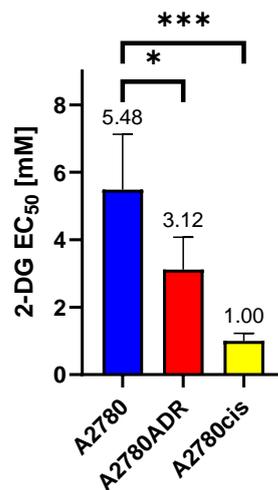


Abbildung 32: Dargestellt sind die EC_{50} -Werte gegenüber 2-Deoxyglucose in A2780-, A2780ADR- und A2780cis-Zellen.

Als nächstes wurde als potenzieller Inhibitor der Glykolyse 3-Bromopyruvat (3-BrPA) untersucht. Auf eine Behandlung mit 3-BrPA zeigte sich ein sehr unterschiedliches Ansprechverhalten der Zelllinien (Abbildung 33). Die A2780-Zelllinien wiesen mit Abstand die größte Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit 3-BrPA auf. Dabei waren die zytostatikaresistenten Zelllinien deutlich empfindlicher als die parentale Zelllinie. So war die EC_{50} von 3-BrPA bei den A2780ADR-Zellen nur ungefähr halb so groß und betrug bei den A2780cis-Zellen sogar nur ca. ein Drittel der bei den A2780-Zellen ermittelten Konzentration. Unter der Annahme, dass es sich bei 3-BrPA hauptsächlich um einen Glykolyseinhibitor handelt (130, 267), sind die hier gewonnenen Daten in Kongruenz zu den in Kapitel 5.6 erhobenen Daten, dass die vom Glucosegehalt stärker

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss von Glucosestoffwechsellinhibitoren

abhängigen Zellen auch stärker von einer Beeinflussung des Glucosestoffwechsels beeinträchtigt werden. Da sich 3-BrPA bei den A2780-Zelllinien mit Wirkkonzentrationen im unteren mikromolaren Bereich als sehr effektiv gezeigt hatte, wurden zusätzlich die W1-Zelllinien untersucht, um deren Ansprechverhalten zu überprüfen. Auch das Verhalten der W1- im Vergleich zu den W1CR-Zellen deckte sich mit dem erwarteten Verhalten, dass die Zelllinie welche mehr Glucose verbraucht auch anfälliger gegenüber einer 3-BrPA-Behandlung ist. Dabei ist der EC₅₀-Wert von 3-BrPA bei den W1CR-Zellen ca. 15 % höher als bei den W1-Zellen, wobei bei der durchgeführten Messreihe allerdings keine Signifikanz festgestellt werden konnte. Nach der Beobachtung, dass die MDA-MB-231-Zellen, im Vergleich zu den untersuchten Ovarialkarzinomzellen, deutlich abhängiger von einer ausreichend hohen Glucosekonzentration waren, wirkte es überraschend, dass der EC₅₀-Wert von 3-BrPA bei den MDA-MB-231-Zellen um ein Vielfaches höher ist.

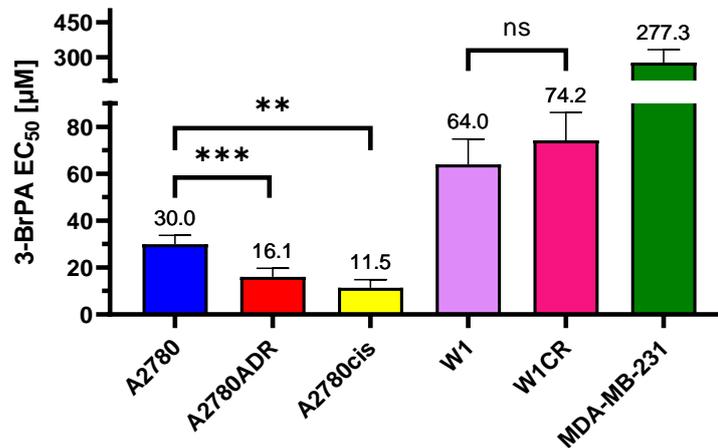


Abbildung 33: Darstellung der EC₅₀-Werte von 3-BrPA in den unterschiedlichen Zelllinien. Dargestellt sind nur relevante Signifikanzen.

In Abbildung 34 ist eine beispielhafte Viabilitätskurve der A2780-Zellen nach einer Behandlung mit einer speziell optimierten 3-BrPA-Verdünnungsreihe dargestellt. Bei dieser Kurve zeigt sich, dass die getestete Konzentration von $10^{-4,75}$ M (17,78 µM) die höchste getestete Konzentration war, bei der noch keine Viabilitätseinschränkung der Zellen festgestellt werden konnte. Unter anderem diese Konzentration wurde deshalb bei weiteren Versuchen in Kombinationsbehandlungen mit einem Zytostatikum getestet.

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss von Glucosestoffwechsellinhibitoren

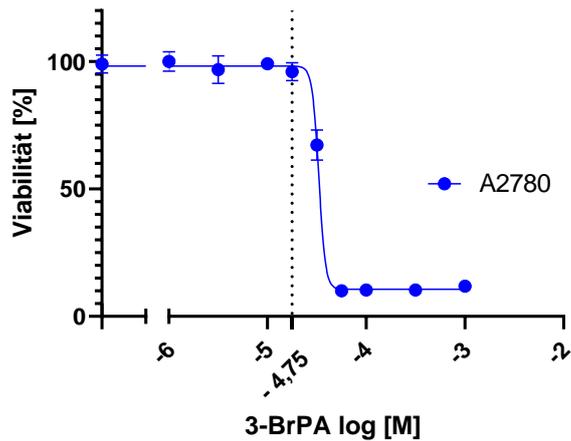


Abbildung 34: Repräsentative Bestimmung einer EC_{50} von 3-BrPA mittels MTT-Assay. Markiert ist die höchste vermessene Konzentration $10^{-4.75}$ M (=17,78 μ M) bei der die parentale Zelllinie A2780 noch nicht in ihrem Wachstum durch die 3-BrPA-Zugabe eingeschränkt war.

5.7.2 Untersuchung auf Kombinationseffekte von 3-BrPA und einem Zytostatikum

Da 2-DG, wie bereits erwähnt, nur in sehr hohen Konzentrationen überhaupt einen Effekt auf die Zellen gezeigt hatte, wurde dieses nur in einem *screening* hinsichtlich der Beeinflussung der Toxizität von Zytostatikabehandlungen der Zellen untersucht. Bei diesem stellte sich heraus, dass die Zugabe von 2-DG zu einer Zytostatikabehandlung einen sehr geringen bis kaum messbaren Effekt entfaltetete, weshalb es im Folgenden nicht weiter betrachtet wird.

Basierend auf den ermittelten EC_{50} -Werten einer 3-BrPA-Behandlung wurde untersucht, ob die gemeinsame Applikation von 3-BrPA mit einem Zytostatikum einen Kombinationseffekt ergibt. Zunächst wurde eine Messreihe mit den stark glucosestoffwechselabhängigen MDA-MB-231-Zellen durchgeführt. Gewählt wurden die 3-BrPA- und Doxorubicin-Konzentrationen die auch später bei den A2780-Zellen verwendet werden sollten. Die 3-BrPA-Konzentration wurde dabei so gewählt, dass sie einem Messpunkt der bestimmten EC_{50} -Kurve von 3-BrPA entspricht und für die A2780-Zellen noch relativ untoxisch ist (Abbildung 34). Die getesteten Doxorubicinkonzentrationen wurden, basierend auf der verwendeten Verdünnungsreihe, in der Nähe bzw. jeweils unterhalb und oberhalb des Doxorubicin- EC_{50} -Wertes der A2780ADR-Zellen gewählt.

Bei der Untersuchung der MDA-MB-231-Zellen ließen sich deutliche Kombinationseffekte feststellen. Die Kombination von 3-BrPA und Doxorubicin zeigte sich sowohl bei einer Doxorubicinkonzentration von 1 μ M als auch bei einer Konzentration von 3,16 μ M (= $10^{-5.5}$ mol/l) als deutlich effektiver in ihrer Toxizität als die jeweilige Einzelbehandlung (linker Graph in Abbildung 35). Die gestrichelte waagerechte Linie zeigt in der Abbildung den Effekt der Einzelbehandlung mit 3-BrPA an und erleichtert somit den Vergleich der verschiedenen Behandlungen. Bei 10 μ M Doxorubicin waren die Zellen bereits so stark in ihrer Viabilität

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss von Glucosestoffwechsellinhibitoren

eingeschränkt, dass die Zugabe von 3-BrPA keinen Unterschied mehr machte. Nach der Voruntersuchung im *fixed-dose*-Assay wurde weiterhin noch getestet, inwiefern der EC₅₀-Wert von Doxorubicin bei der Behandlung der MDA-MB-231-Zellen durch die Zugabe von 3-BrPA beeinflusst wird. Dabei zeigte sich über einen größeren Konzentrationsbereich von 3-BrPA ein vorteilhafter Effekt. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 3-BrPA signifikant empfindlicher gegenüber einer Doxorubicinbehandlung (rechter Graph in Abbildung 35). So war die EC₅₀ von Doxorubicin durch die Zugabe von 100 µM 3-BrPA, im Vergleich zur Kontrolle, um ca. 25 % geringer. Dies entspricht grundsätzlich bereits vorherigen Erkenntnissen, dass 3-BrPA die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber einer Behandlung mit Doxorubicin erhöhen kann (267).

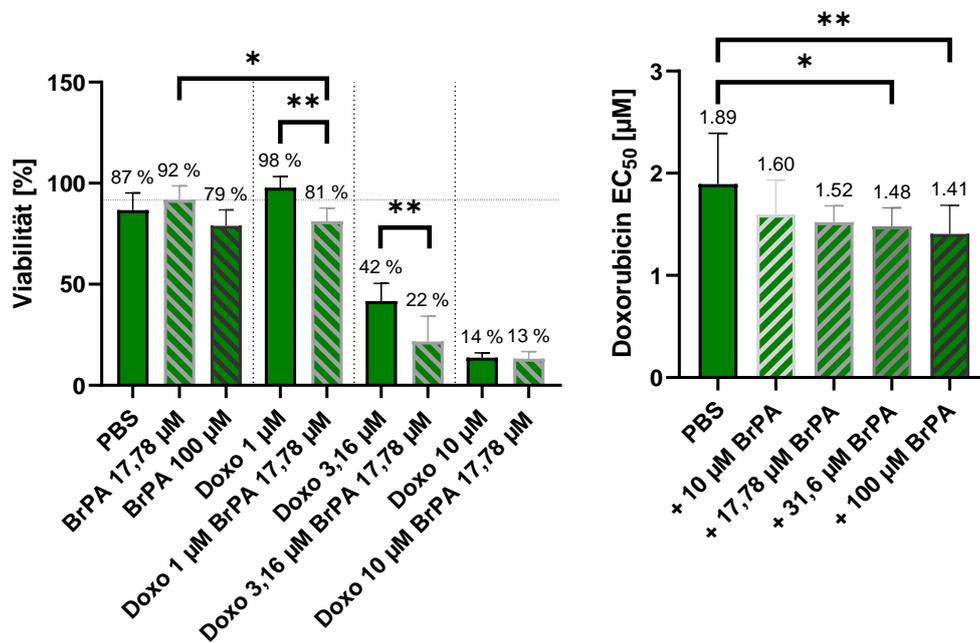


Abbildung 35: Untersuchung auf Kombinationseffekte der Zytotoxizität einer Doxorubicin- und 3-BrPA-Behandlung von MDA-MB-231-Zellen.

Der Frage nachgehend, ob diese Ergebnisse auf die Ovarialkarzinomzellen übertragen werden können, zeigt Abbildung 36 die Kombinationseffekte von Doxorubicin und 3-BrPA in A2780- und A2780ADR-Zellen. Erstaunlicherweise fällt bei der Betrachtung der Graphen auf, dass sowohl die A2780- als auch die A2780ADR-Zellen nicht von einer gemeinsamen Behandlung mit den beiden Substanzen stärker in ihrer Viabilität eingeschränkt wurden. Teilweise schienen sogar gegenteilige Effekte zu resultieren, da die relative Viabilität nach einer Kombinationsbehandlung höher war als bei einer der beiden Einzelbehandlungen.

Ergebnisse und Diskussion
Einfluss von Glucosestoffwechsellinhibitoren

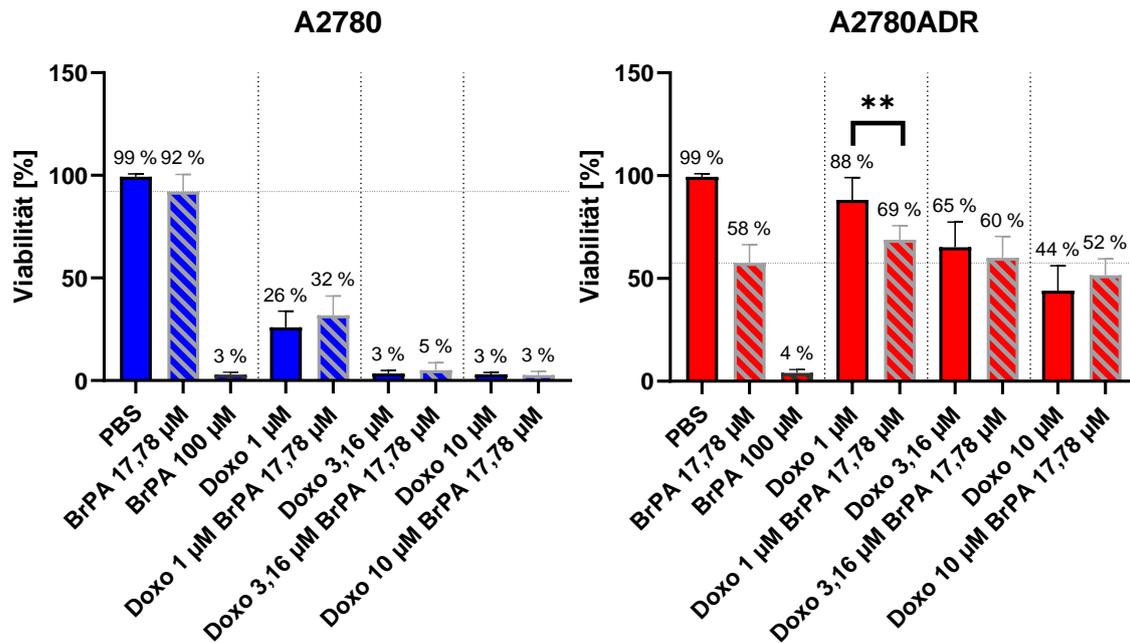


Abbildung 36: Untersuchung auf Kombinationseffekte von einer Doxorubicin- und 3-BrPA-Behandlung von A2780- und A2780ADR-Zellen.

Bei der Untersuchung von Kombinationsbehandlungen bestehend aus Cisplatin und 3-BrPA in A2780- und in cisplatinresistenten A2780cis-Zellen zeigten sich geringfügige additive Effekte. So waren in allen Szenarien die Kombinationsbehandlungen gleichwertig oder vorteilhaft im Vergleich zu den Einzelbehandlungen (Abbildung 37).

Bei den in Abbildung 38 dargestellten untersuchten W1- und W1CR-Zellen wurden zu den A2780-Zellen analoge Cisplatinosierungen verwendet. Die getestete 3-BrPA-Konzentration wurde erhöht, mit dem Ziel, dass diese so hoch war, dass sie gerade noch untoxisch für die W1CR-Zellen war. Bei der Untersuchung beider Zelllinien zeigten sich große, signifikante vorteilhafte Effekte einer Kombinationsbehandlung.

Ergebnisse und Diskussion
Einfluss von Glucosestoffwechsellinhibitoren

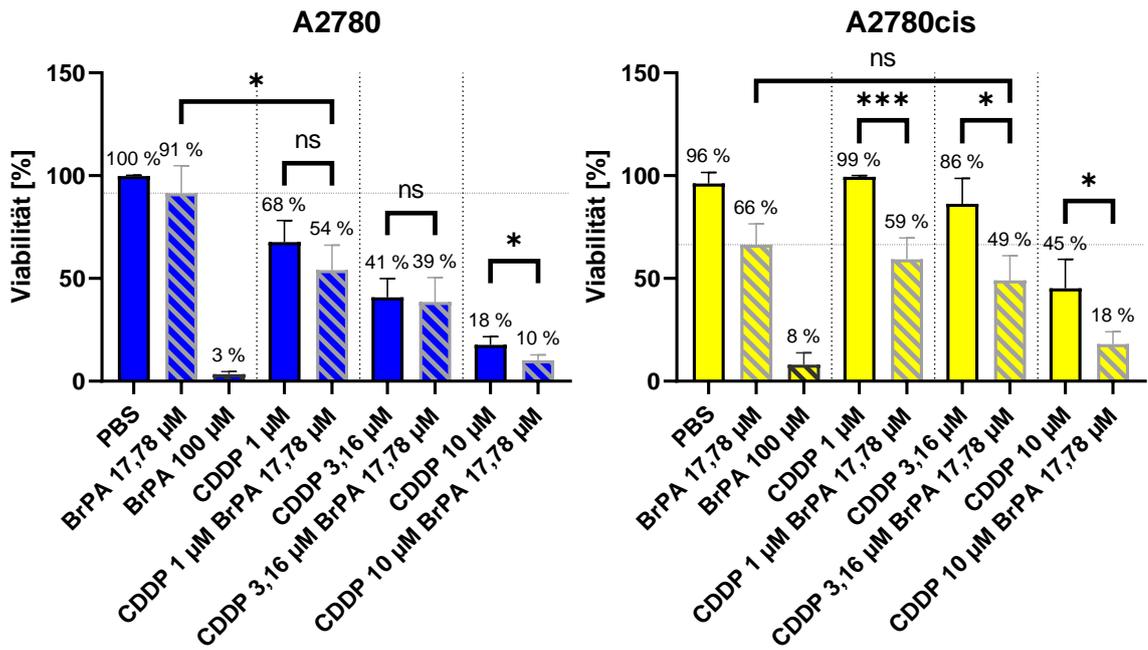


Abbildung 37: Untersuchung auf Kombinationseffekte der Zytotoxizität einer Cisplatin (CDDP)- und 3-BrPA-Behandlung von A2780- und A2780cis-Zellen. Bei den A2780-Zellen war jegliche Kombination aus 3-BrPA und Cisplatin signifikant besser als die Einzelbehandlung mit 3-BrPA, bei den A2780cis war nur die Kombinationsbehandlung mit 10 µM Cisplatin besser als die Einzelbehandlung mit 3-BrPA.

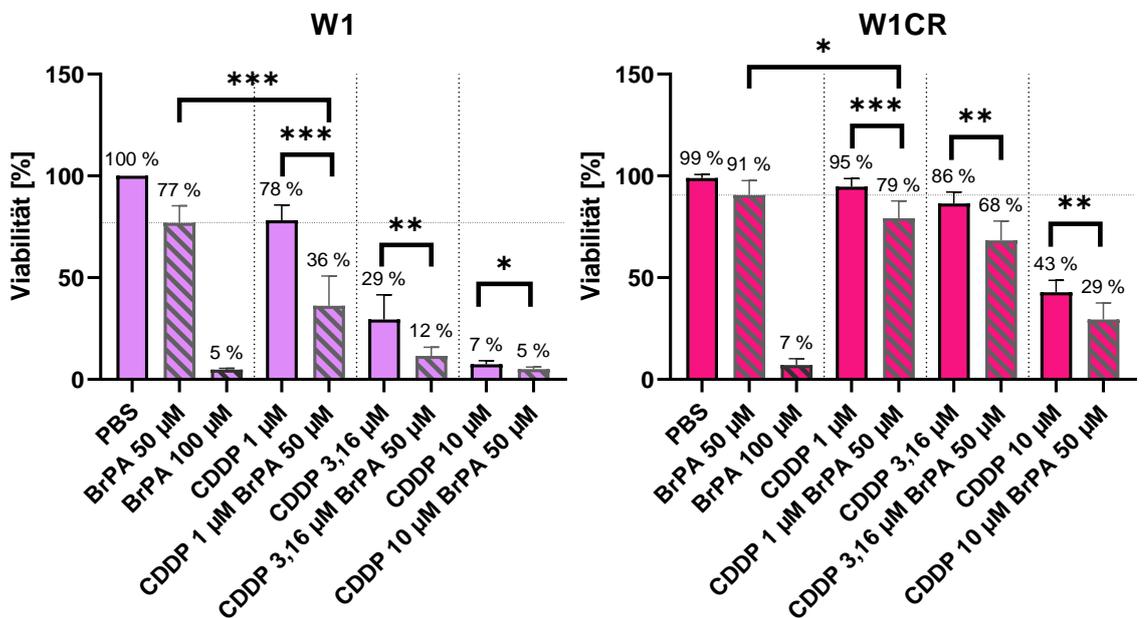


Abbildung 38: Untersuchung auf Kombinationseffekte einer Cisplatin (CDDP)- und 3-BrPA-Behandlung von W1- und W1CR-Zellen hinsichtlich Zytotoxizität. Jegliche Kombination aus Zytostatikum und 3-BrPA war signifikant besser als die Einzelbehandlung mit 3-BrPA.

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss von Glucosestoffwechsellinhibitoren

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die A2780-Zelllinien durch eine Kombinationsbehandlung aus 3-BrPA und Cisplatin nur geringfügig stärker in ihrer Viabilität eingeschränkt waren, wohingegen sich im Fall von Doxorubicin sogar antagonistische Effekte zeigten. Dabei muss allerdings auch beachtet werden, dass die allgemeine Empfindlichkeit gegenüber einer Einzelbehandlung mit 3-BrPA deutlich höher war als bei den anderen untersuchten Zelllinien. Bei den W1-Zelllinien und den MDA-MB-231-Zellen zeigten sich größere Kombinationseffekte.

Als ergänzende Untersuchung ist in Abbildung 39 der Einfluss von 3-BrPA auf den EC_{50} -Wert eines Zytostatikums dargestellt. Dabei wurde bei den A2780-Zelllinien eine geringere Konzentration von 10 μM 3-BrPA gewählt, um den zytotoxischen Einfluss von diesem selbst so gering wie möglich zu halten und besser auf Kombinationseffekte untersuchen zu können. Aufgrund der hohen Widerstandsfähigkeit der W1-Zelllinien wurde zusätzlich die höhere Konzentration von 50 μM 3-BrPA getestet.

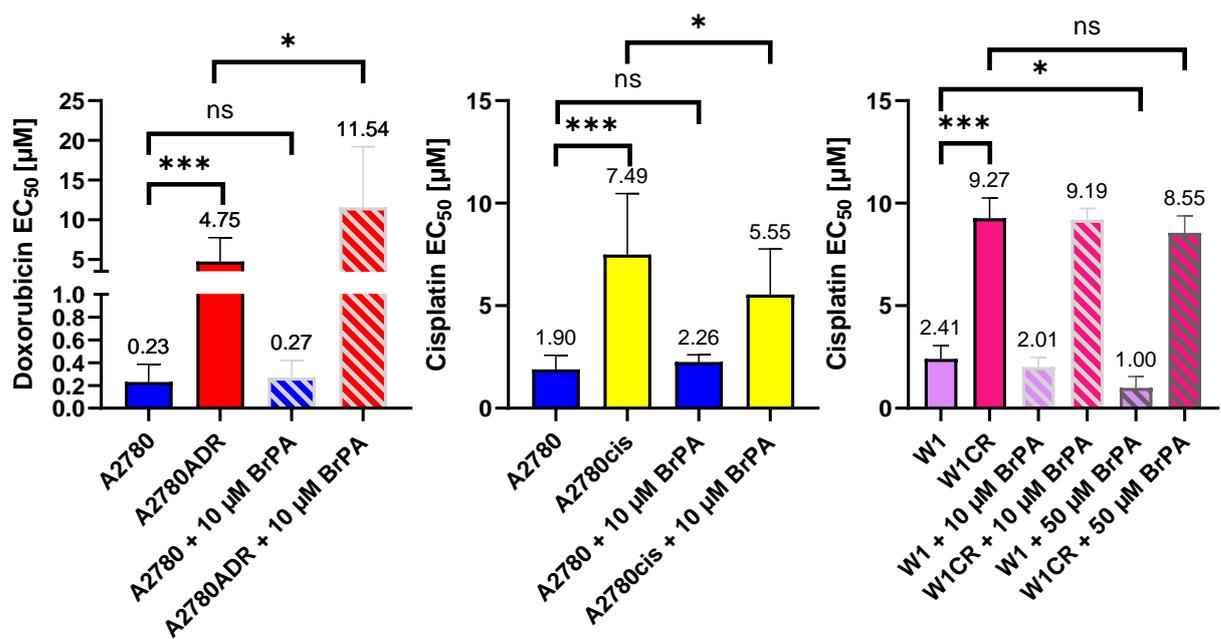


Abbildung 39: Bestimmung der EC_{50} eines Zytostatikums bei der Kombinationsbehandlung mit 3-BrPA in den untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien.

Die Bestimmung der EC_{50} -Werte der einzelnen Zytostatika bestätigte das zuvor getroffene Bild. Die EC_{50} gegenüber Doxorubicin war bei den A2780ADR-Zellen bei der gleichzeitigen Behandlung mit 3-BrPA signifikant erhöht.

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss von Glucosestoffwechsellinhibitoren

Bei der Behandlung der A2780cis-Zellen mit Cisplatin zeigte sich ein vorteilhafter Effekt der gemeinsamen Behandlung. Am stärksten ausgeprägt zeigte sich die Reduktion der Cisplatin-EC₅₀, die mehr als halbiert war, durch die Zugabe von 3-BrPA bei den W1-Zellen.

Bhattacharya et al. berichteten in ihrer Arbeit, dass das Vorliegen einer Hypoglykämie in stark Glucosestoffwechsel-abhängigen Zellen ein Treiber einer Chemoresistenz sein kann (272). Und auch in weiteren Versuchen anderer Arbeitsgruppen hat sich gezeigt, dass eine Hemmung des glykolytischen Stoffwechsels, zum Beispiel mit 2-DG, zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber Doxorubicin führen kann. Die dabei zugrunde liegende These ist, dass Energie in Form von ATP für die Wirkung von Doxorubicin notwendig ist. Wird nun durch die Inhibition des Metabolismus weniger ATP zur Verfügung gestellt, kann Doxorubicin entsprechend schlechter wirken. Daraus wird gefolgert, dass Metabolismusinhibitoren auch zytoprotektive Effekte entfalten können (273, 274). Tatsächlich ist dies ein wenig erforschtes Feld, zu dem kaum belastbare Studien existieren. Es könnte allerdings den hier bei den A2780ADR-Zellen beobachteten Effekt erklären. Bei der Kombinationsbehandlung von 3-BrPA und Cisplatin liegt eine Reduktion des GSH-Spiegels durch 3-BrPA als Ursache für eine verstärkte Wirkung des Cisplatin nahe (125, 132).

Ergebnisse und Diskussion

Expression von Enzymen des Glucosestoffwechsels

5.8 Expression von Enzymen des Glucosestoffwechsels

5.8.1 Untersuchung der Genexpression mittels qPCR

Nachdem sowohl ein unterschiedlicher Glucosebedarf der Tumorzellen als auch eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber potenziellen Glykolyseinhibitoren festgestellt wurde, erfolgte anschließend eine Expressionsanalyse der wichtigsten Glykolyseenzyme in den Zelllinien. Dafür wurde zunächst bei den Ovarialkarzinomzelllinien untersucht, ob sich die relative mRNA-Menge der regulatorischen Glykolyseenzyme in den resistenten Zelllinien von jener in den parentalen Tumorzelllinien unterscheidet.

Bei den Untersuchungen der A2780-Zelllinien zeigte sich, dass nur die HXK2-mRNA in den doxorubicinresistenten A2780ADR-Zellen signifikant erhöht war. Die für PFK-1 und PKM codierenden mRNA waren zu einem geringen Maße signifikant herunterreguliert.

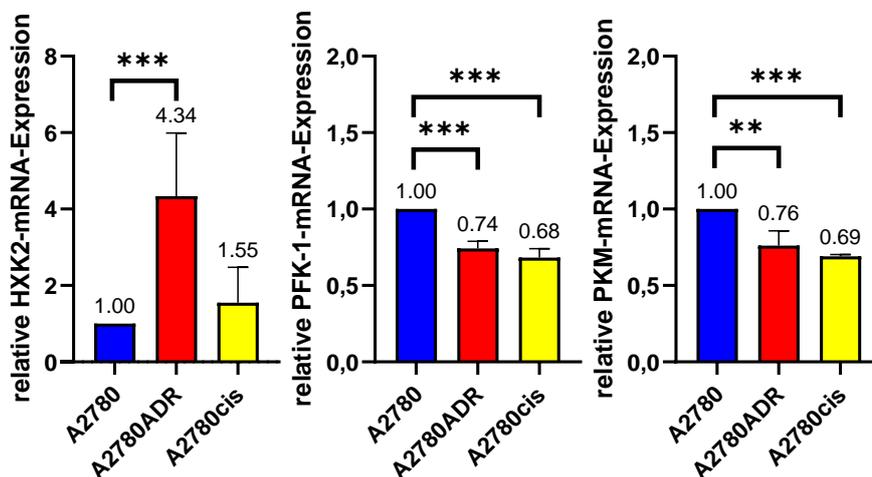


Abbildung 40: mRNA-Expressionslevel der regulatorischen Enzyme der Glykolyse in A2780-, A2780ADR- und A2780cis-Zellen.

Bei dem Zelllinienpärchen W1/W1CR zeigte sich kein eindeutiges Bild einer veränderten Regulation und einzig die Reduktion der PFK-1-mRNA wurde als signifikant festgestellt (Abbildung 41).

Ergebnisse und Diskussion

Expression von Enzymen des Glucosestoffwechsels

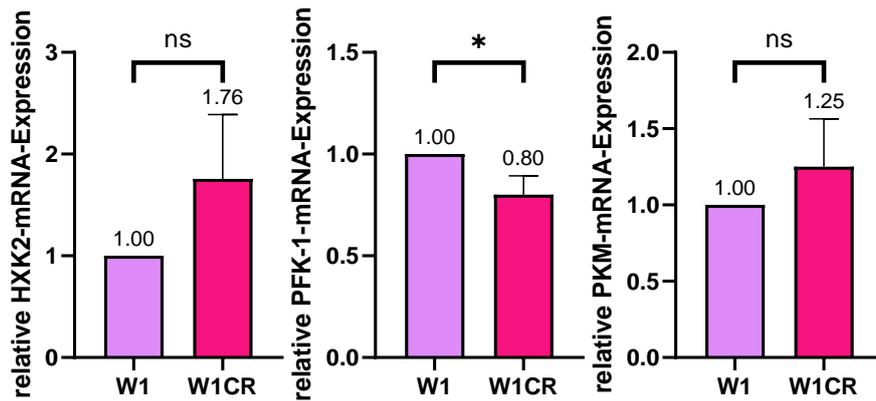


Abbildung 41: mRNA-Expressionslevel der regulatorischen Enzyme der Glykolyse in W1- und W1CR-Zellen.

5.8.2 Untersuchung der Proteinexpression

Um die auf mRNA-Ebene detektierte Deregulation der Glykolyseenzyme auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurden die betreffenden Zellen mittels Western Blot auf die Expression der unterschiedlichen Enzyme untersucht.

Bei der diesbezüglichen Quantifizierung der regulatorischen Enzyme der Glykolyse sowie auch der LDH-A und des MCT1 zeigte sich, dass in A2780ADR-Zellen die Expression aller fünf Enzyme signifikant erhöht war (Abbildung 42). Der deutlichste Effekt war bei dem MCT1 und bei der HXK2 zu sehen, deren Expressionen fast um den Faktor 3,2 bzw. 2,5 gesteigert waren. Die A2780cis-Zellen zeigten ein heterogeneres Bild. Während die PFK-1-Expression signifikant hoch- und die PKM-Expression signifikant herunterreguliert war, konnten bei den Expressionsleveln von der HXK2, der LDH-A und dem MCT1 keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

Ergebnisse und Diskussion
Expression von Enzymen des Glucosestoffwechsels

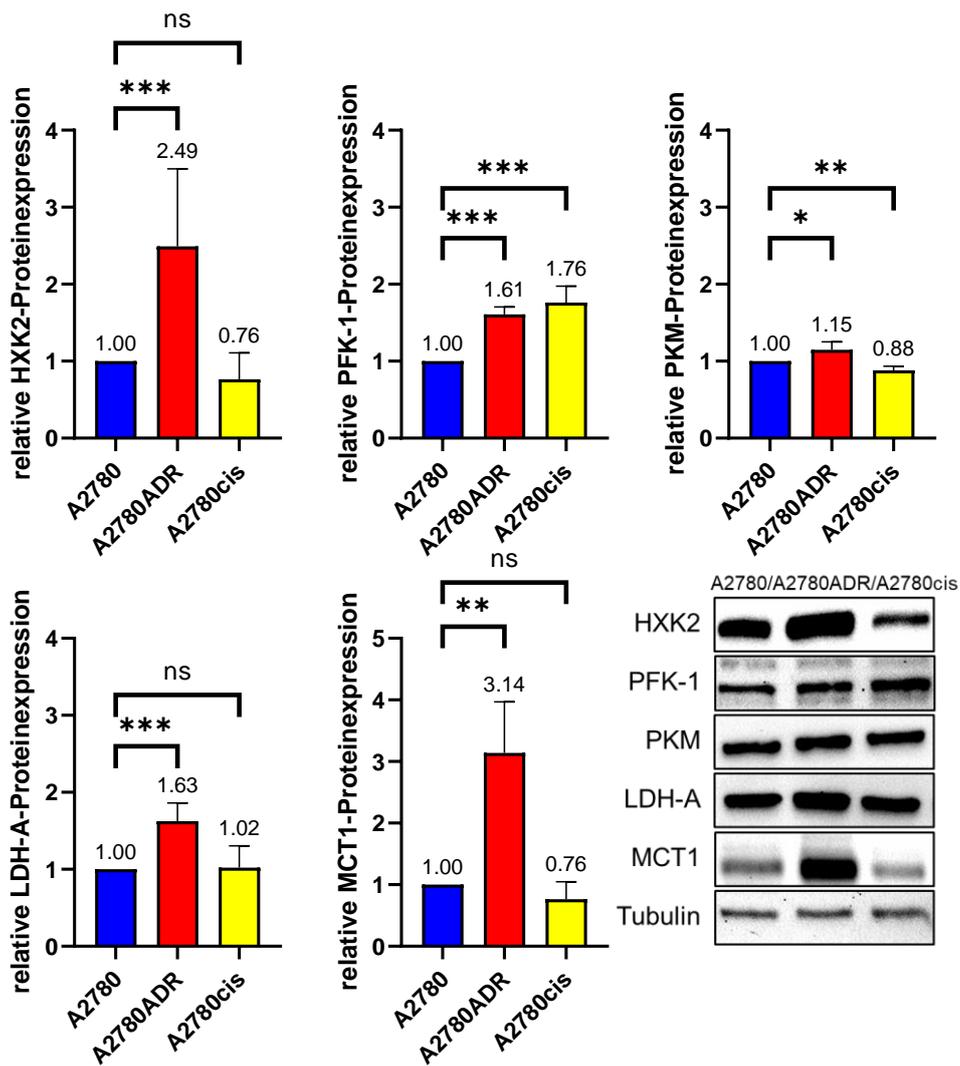


Abbildung 42: Relative Proteinexpression der regulatorischen Glykolyseenzyme sowie von LDH-A und MCT1 in A2780-, A2780ADR- und A2780cis-Zellen.

Bei dem Zelllinienpärchen W1/W1CR zeigte sich, wie es auch schon die eingangs beschriebenen Glucoseversuche haben vermuten lassen, ein umgekehrtes Bild. Hier war die Proteinexpression der meisten Enzyme in der zytostatikaresistenten Variante deutlich herunterreguliert (Abbildung 43).

Ergebnisse und Diskussion

Expression von Enzymen des Glucosestoffwechsels

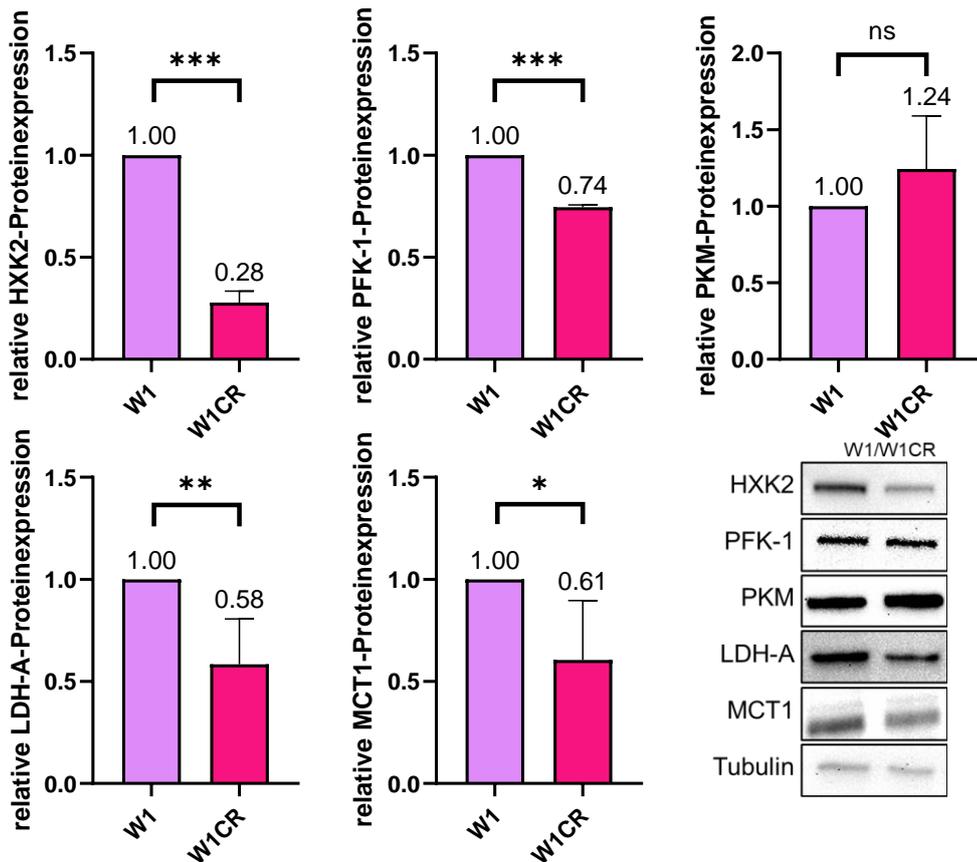


Abbildung 43: Relative Proteinexpression der regulatorischen Glykolyseenzyme sowie von LDH-A und MCT1 in den W1- und W1CR-Zellen.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine Resistenzentwicklung nicht zwangsläufig mit einer höheren Stoffwechselaktivität, wie sie sich bei den A2780ADR-Zellen gezeigt hatte, einhergeht. Die Proteinexpression kann, wie bei den A2780cis-Zellen, im Vergleich zu den parentalen Zellen auf einem ähnlichen Niveau oder sogar, wie bei den W1CR-Zellen sichtbar, deutlich reduziert sein. Dies unterstreicht die Individualität der einzelnen Zelllinien und insbesondere der Resistenzmechanismen gegenüber den zytotoxischen Substanzen.

In Abbildung 44 ist weiterhin ein Vergleich der Proteinexpressionen in den parentalen Zelllinien A2780, W1 und MDA-MB-231 dargestellt. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass die regulatorischen Glykolyseenzyme in den stark von Glucose abhängigen MDA-MB-231-Zellen deutlich überexprimiert waren. Auch verwundert es nicht, dass die LDH-A ein deutlich höheres Expressionsniveau aufwies, da dessen Aktivität in der Regel für eine erhöhte Glykolyseaktivität notwendig ist (30, 104). Durch den erhöhten Expressionsgrad der LDH-A wäre zu erwarten, dass in den MDA-MB-231-Zellen auch deutlich mehr Lactat innerhalb der Tumorzellen anfällt. Umso überraschender war es, dass die Expression von MCT1, dessen Funktion unter anderem der Export

Ergebnisse und Diskussion

Expression von Enzymen des Glucosestoffwechsels

von Lactat aus der Zelle ist, in den MDA-MB-231-Zellen hoch signifikant reduziert war. Dies lässt vermuten, dass Lactat von den MDA-MB-231-Zellen auf eine andere Art und Weise verwertet wird. Dies zeigt aber auch, dass der für die Zellaufnahme von 3-BrPA als wichtig postulierte Transporter (138) kaum zur Verfügung steht, und damit die geringe Empfindlichkeit der MDA-MB-231-Zellen gegenüber 3-BrPA erklärt ist.

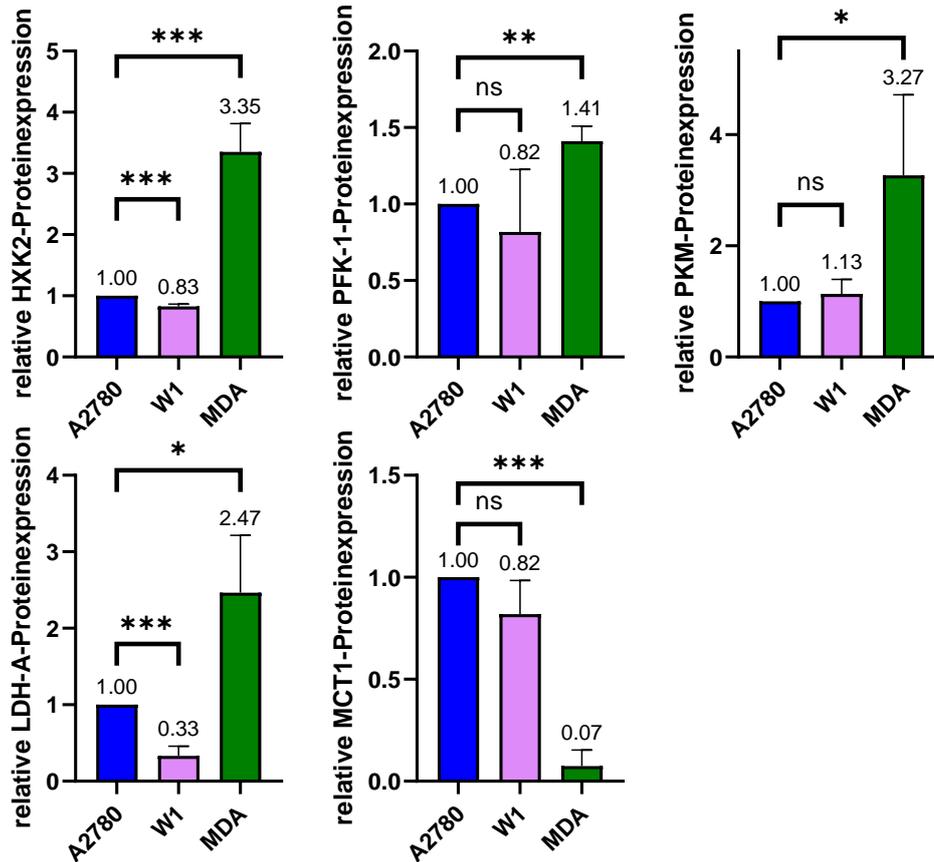


Abbildung 44: Relative Proteinexpression der regulatorischen Glykolyseenzyme sowie von LDH-A und MCT1 in den parentalen Zelllinien A2780, W1 und MDA-MB-231.

5.9 Intrazelluläres Doxorubicin in Abhängigkeit von 3-BrPA

Um die widersprüchlichen Effekte, dass die Kombinationsbehandlung von Doxorubicin mit 3-BrPA bei den MDA-MB-231-Zellen synergistisch wirkte, während bei den A2780ADR-Zellen hingegen ein antagonistischer Effekt auftrat, mit den intrazellulären Doxorubicin-Konzentrationen zu korrelieren, wurde ein Durchflusszytometriessay zur zellulären Vermessung von Doxorubicin durchgeführt.

Bei den Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von 3-BrPA den intrazellulären Doxorubicinspiegel in den MDA-MB-231-Zellen erhöhte (links in Abbildung 45). Dieser Effekt wurde bereits von anderen Forschungsgruppen beobachtet und auf eine verringerte ATP-Produktion und die daraus resultierende reduzierte Aktivität der ABC-Transporter zurückgeführt (129, 130, 134).

Dagegen war bei den A2780ADR-Zellen keine eindeutige Erhöhung des intrazellulären Doxorubicinspiegels sichtbar (rechts in Abbildung 45). Allgemein war bei den Zellen im Vergleich zu der jeweiligen Autofluoreszenz unter Behandlung nur eine geringe Steigerung der Fluoreszenz und somit der Doxorubicinaufnahme detektierbar. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass die A2780ADR-Zellen P-gp stark überexprimiert aufweisen und dadurch viel Doxorubicin aus der Zelle transportieren können (248). Zudem ist der intrazelluläre Wirkstoffgehalt durch die Zugabe von 3-BrPA nur sehr wenig oder gar nicht gestiegen. Somit wird deutlich, dass sich die beiden Zelllinien bei ähnlicher Behandlung grundverschieden verhalten.

Ergebnisse und Diskussion

Intrazelluläres Doxorubicin in Abhängigkeit von 3-BrPA

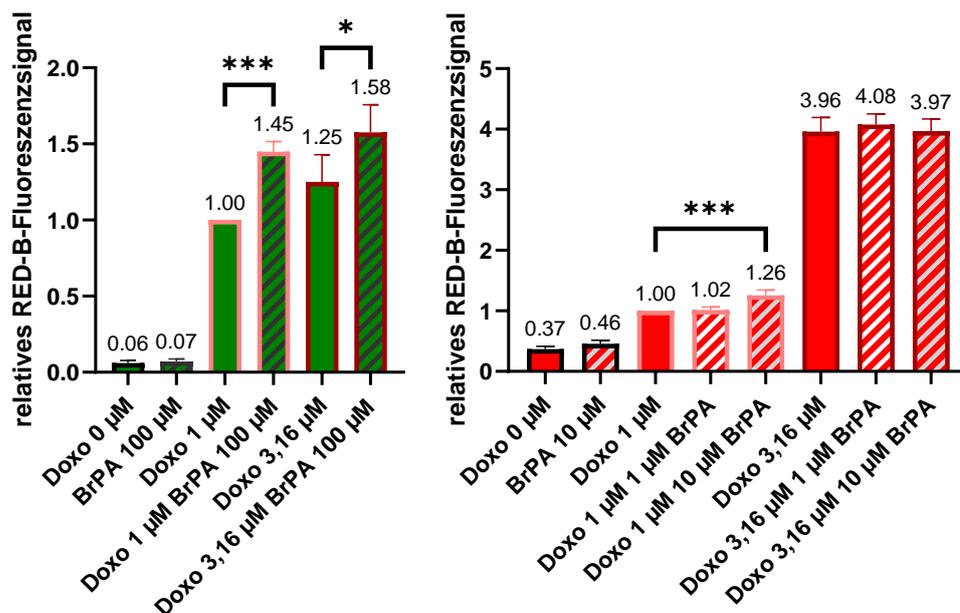


Abbildung 45: Doxorubicin-induziertes, relatives Fluoreszenzsignal in MDA-MB-231-Zellen (links) und A2780ADR-Zellen (rechts).

Die A2780ADR-Zellen wiesen zwar einen höheren HXK2-Spiegel auf als die A2780-Zellen (Abbildung 42), allerdings exprimierten die MDA-MB-231-Zellen noch mehr HXK2 (Abbildung 44), wodurch keine Korrelation zwischen der HXK2-Expression und den hier beobachteten Ergebnissen bezüglich der Wirkung von 3-BrPA aufgestellt werden kann. Es ist denkbar, dass 3-BrPA andere Wirkungen innerhalb der A2780ADR-Zellen ausgelöst hat als in den MDA-MB-231-Zellen, da möglicherweise in den verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Zielstrukturen adressiert wurden. In diesem Zusammenhang ist auch drauf hinzuweisen, dass die jeweilig untersuchten Konzentrationen von 3-BrPA in den beiden Zelllinien, in Anlehnung an die jeweilige Toxizität, unterschiedlich gewählt wurden. Allerdings ist denkbar, dass 3-BrPA, je nach Dosierung, an unterschiedliche Targets bindet und entsprechend in den A2780ADR-Zellen ein ähnlicher Akkumulationseffekt von Doxorubicin bei Verwendung einer einheitlichen Dosis von 100 μM sichtbar gewesen wäre. Da die A2780ADR-Zellen allerdings einer 3-BrPA-Behandlung gegenüber sehr empfindlich waren und eine solche Dosis letal wäre, handelt es sich um eine rein hypothetische Überlegung.

Ergebnisse und Diskussion

Knockdown der Hexokinase 2

5.10 Knockdown der Hexokinase 2

Von den Enzymen der Glykolyse wies HXK2 die stärkste Deregulierung bei den A2780ADR-Zellen auf und diese gilt als primäres Target der Wirkung von 3-BrPA. Um die Bedeutung der HXK2 für die Zytostatikaresistenz und die Wirkung von 3-BrPA zu untersuchen, wurde ein siRNA-Knockdown der HXK2 mit den A2780-Zelllinien und den MDA-MB-231-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich der Knockdown in allen Zelllinien durch eine deutliche Reduktion des Proteingehalts erfolgreich (Abbildung 46).

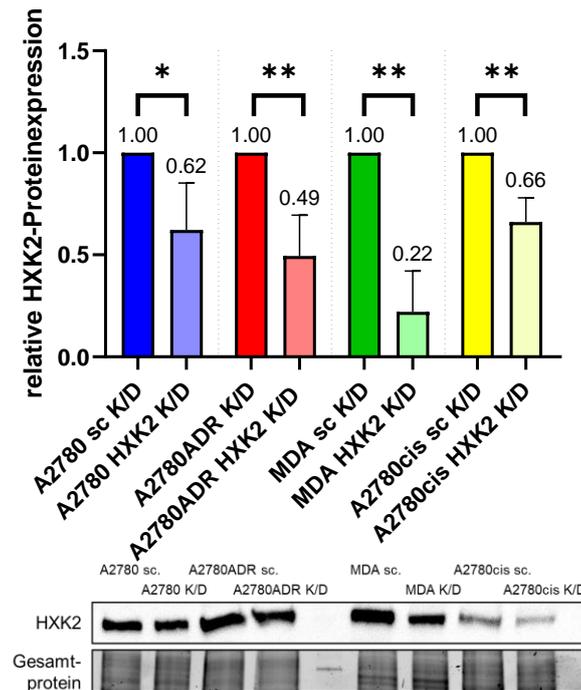


Abbildung 46: Relative HXK2-Expression im Verhältnis zur jeweiligen scrambled-Kontrolle.

Die A2780-, A2780ADR- und MDA-MB-231-Zellen wurden alle entsprechend auf ihre Doxorubicinempfindlichkeit untersucht. Um festzustellen, ob sich diese relativ zur *scrambled control* durch den Knockdown geändert hatte, wurde der Resistenzfaktor gebildet (Abbildung 47). Dabei zeigte sich bei allen drei Zelllinien ein ähnlicher Effekt. Die Widerstandsfähigkeit der Zellen mit reduziertem HXK2-Gehalt gegenüber einer Doxorubicinbehandlung betrug nur noch 70-80 % der der *scrambled*-Varianten.

Ergebnisse und Diskussion

Knockdown der Hexokinase 2

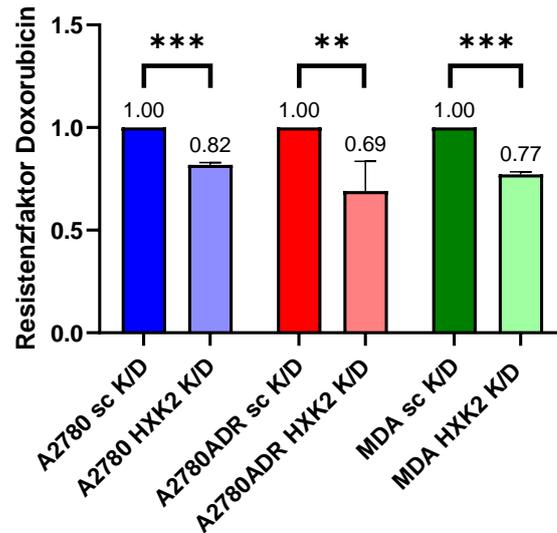


Abbildung 47: Resistenzfaktor der HXK2-Knockdown-Zellen gegenüber Doxorubicin.

Bei der Untersuchung der A2780- und der A2780cis-Zellen auf ihr Ansprechen gegenüber Cisplatin zeigte sich hingegen, dass der Knockdown von HXK2 bei beiden Zelllinien keinen Unterschied für das Überleben einer zytotoxischen Behandlung machte (Abbildung 48).

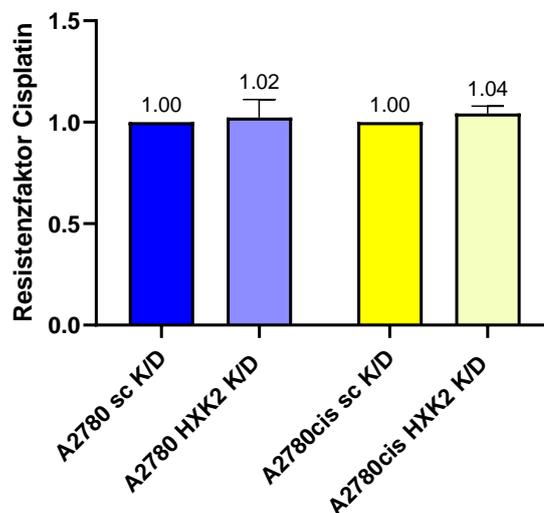


Abbildung 48: Resistenzfaktor der HXK2-Knockdown-Zellen gegenüber Cisplatin.

Die A2780-, A2780ADR- und A2780cis-Zellen zeigten, wie im Kapitel 5.7.1 dargestellt, die höchste Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit 3-BrPA. Deshalb wurden diese Zellen gewählt, um zu testen, ob der Knockdown von der HXK2 einen Effekt auf die 3-BrPA-Behandlung der Zellen hat und ob somit in diesen Zelllinien die HXK2 als wichtiges Target von 3-BrPA gesehen werden kann. Die in Abbildung 49 dargestellten Ergebnisse zeigen allerdings, dass bei allen drei

Ergebnisse und Diskussion

Knockdown der Hexokinase 2

untersuchten Zelllinien der Resistenzfaktor nahe 1 ist. Dies lässt darauf schließen, dass die HXK2 in ihnen nicht essenziell für den zytotoxischen Effekt von 3-BrPA ist. Möglicherweise gibt es in diesen Zelllinien ein anderes Target, das von 3-BrPA bereits bei einer deutlich niedrigeren Konzentration angegriffen wird und den Zelltod auslöst. Es kann daher angenommen werden, dass die Menge, die für eine letale Interferenz mit der HXK2 nötig wäre, bei der Behandlung der A2780-Zelllinien gar nicht erreicht werden konnte, da die Zelllinien bereits vorher durch einen anderen Mechanismus gestorben sind (26, 33).

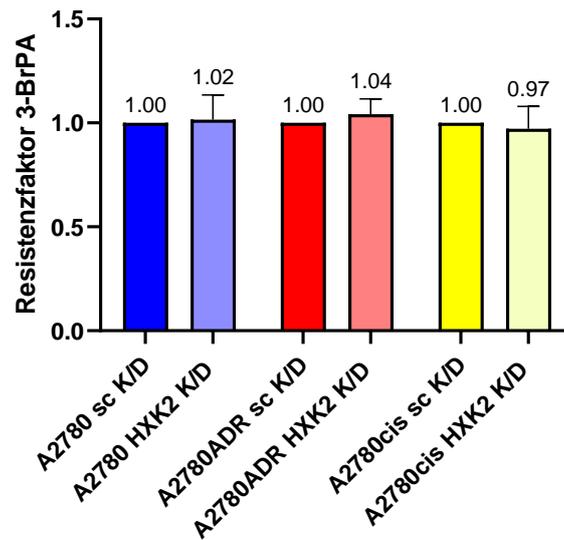


Abbildung 49: Resistenzfaktor der HXK2-Knockdown-Zellen gegenüber 3-BrPA.

5.11 Zwischenfazit Glucosestoffwechsel und Zytostatikaresistenz in Ovarialkarzinomzellen

Bei der Untersuchung von verschiedenen zytostatikaresistenten Zelllinien, im Vergleich zu ihren jeweiligen parentalen Zelllinien, zeigten sich sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die Doxorubicinresistenz der A2780ADR-Zellen ging mit einem deutlich erhöhten Glucosestoffwechsel einher. Die cisplatinresistenten A2780cis-Zellen waren zwar durch eine geringe Glucosekonzentration stärker in ihrem Wachstum gehemmt als die A2780-Zellen, allerdings zeigten sich die Glykolyseenzyme nur geringfügig dereguliert und die Expressionsniveaus waren denen der parentalen Zelllinie relativ ähnlich. Interessanterweise verhielt sich das Zelllinienpärchen W1/W1CR komplett gegensätzlich. Hier waren die Ursprungszellen diejenigen, welche eine höhere Glucosekonzentration zum Wachstum benötigten, und auch die regulatorischen Glykolyseenzyme waren in den W1-Zellen deutlich höher exprimiert. Auffällig war allerdings, dass sämtliche Deregulationen hauptsächlich auf der Ebene der Proteinexpression stattgefunden haben und auf mRNA-Ebene zumeist nur geringe Unterschiede in der Expression feststellbar waren. Trotzdem lässt sich keine Verallgemeinerung treffen, dass die Entwicklung einer Zytostatikaresistenz immer mit einer erhöhten Glucosestoffwechselabhängigkeit einhergeht. Auch wenn eine Resistenzentwicklung gegen den gleichen Wirkstoff stattgefunden hat, sind gegensätzliche Entwicklungen des Metabolismus möglich.

Diese Erkenntnis, dass diesbezüglich keine Verallgemeinerung getroffen werden kann, sensibilisiert allerdings gleichzeitig für die Individualität einer malignen Erkrankung. Es verdeutlicht auch sehr gut, dass ein geringer Effekt einer Behandlung bei einer Tumorentität nicht zwangsläufig bedeutet, dass diese nicht bei einer anderen Tumorentität zielführend sein könnte. Das zeigte sich hier beim Einsatz von 3-BrPA. Während die sehr aggressiven, glucoseabhängigen MDA-MB-231-Zellen eine 3-BrPA-EC₅₀ von über 250 µM aufwiesen, hatten alle untersuchten, weniger glucoseabhängigen, Ovarialkarzinomzelllinien eine 3-BrPA-EC₅₀ von deutlich unter 100 µM. Auch der Unterschied bei der relativen Betrachtung der untersuchten cisplatinresistenten Zelllinien A2780cis und W1CR war auffällig groß. Beide wiesen eine ungefähr gleich hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Cisplatin auf, wodurch man zunächst geneigt sein mag die Zellen als relativ ähnlich anzusehen. Bei der Betrachtung der EC₅₀ von 3-BrPA bei einer Behandlung der Zelllinien ergab sich allerdings ein Unterschied von einem Faktor nahe 7. Dies unterstreicht, dass sich die beiden Zelllinien im Endeffekt doch massiv unterscheiden müssen. Allgemein hat sich das sehr einfache Molekül 3-BrPA bei den A2780cis-Zellen mit einer EC₅₀ von ca. 10 µM als vergleichsweise potent gezeigt.

Die zusätzliche Anwendung von 3-BrPA zu einer Zytostatikabehandlung zeigte weiterhin sehr unterschiedliche Effekte bei den untersuchten Zelllinien. Während die MDA-MB-231-Zellen durch

Ergebnisse und Diskussion

Zwischenfazit Glucosestoffwechsel und Zytostatikaresistenz in Ovarialkarzinomzellen

eine subtoxische 3-BrPA-Konzentration deutlich gegenüber Doxorubicin sensitiviert wurden, zeigte sich dieser Effekt sowohl bei den A2780-Zellen als auch bei den A2780ADR-Zellen nicht. Bei den A2780ADR-Zellen war sogar ein antagonistischer Effekt mit einer Erhöhung der EC_{50} von Doxorubicin festgestellt worden. Die daraufhin durchgeführten Durchflussszytometer-Untersuchungen zeigten, dass 3-BrPA einen großen Einfluss auf die intrazelluläre Wirkstoffakkumulation in den MDA-MB-231-Zellen ausübte. Zudem konnte bereits in anderen Zellmodellen gezeigt werden, dass 3-BrPA den P-gp vermittelten Doxorubicinefflux inhibieren kann (129). Dagegen hatte die Kombinationsbehandlung mit 3-BrPA kaum einen Einfluss auf die intrazelluläre Doxorubicinkonzentration in den A2780ADR-Zellen. Wobei auch berücksichtigt werden muss, dass die untersuchten Ovarialkarzinomzellen, im Vergleich zu den MDA-MB-231-Zellen, einen deutlich geringeren Glucosestoffwechsel aufwiesen. Somit bleiben nur Spekulationen, dass durch die zusätzliche Behandlung mit 3-BrPA möglicherweise der ohnehin schon weniger ausgeprägte Glucosestoffwechsel der Ovarialkarzinomzellen über einen anderen Weg verlangsamt wurde und somit weniger Doxorubicin seine Wirkung entfalten konnte (274). Beziehungsweise zeigte sich 3-BrPA auch in einer ganz anderen Größenordnung in den A2780-Zelllinien im Vergleich zu den MDA-MB-231-Zellen wirksam, was auch auf einen Angriff des 3-BrPA an unterschiedlichen Zielstrukturen hindeuten kann.

Vorteilhaft, zumindest aber gleichwertig zu einer Einzelbehandlung, zeigten sich die Kombinationsbehandlungen von Cisplatin und 3-BrPA in allen entsprechend untersuchten Zelllinien. Wobei sich die Zelllinienpärchen auch hier wieder gegensätzlich verhielten. Während bei den A2780/A2780cis-Zellen die cisplatinresistente Variante deutlich stärker in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt war, konnte beim W1/W1CR-Pärchen ein umgekehrtes Verhalten beobachtet werden. Dort war die parentale Zelllinie diejenige bei der der deutlichste Kombinationseffekt sichtbar wurde. Diesem liegt als Wirkmechanismus eine Reduktion des GSH-Spiegels durch 3-BrPA nahe, welches somit nicht mehr in der Lage war die zytotoxischen Effekte von Cisplatin zu verhindern (125, 132).

Trotzdem wirft der Wirkmechanismus des 3-BrPA in den untersuchten Zelllinien Fragen auf. Obwohl 3-BrPA allgemein als Inhibitor der HXK2 angesehen wird (80, 127, 275), werden doch auch viele weitere mögliche Angriffspunkte von 3-BrPA diskutiert (26, 125). Dies ist nicht zuletzt der hochalkylierenden Eigenschaft von 3-BrPA geschuldet. Die Ergebnisse der HXK2-Knockdownversuche in den untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien zeigen, dass HXK2 in diesen Zellen nicht das hauptsächliche Target von 3-BrPA zu sein scheint, da der Knockdown keinen Effekt auf die Behandlungseffektivität gezeigt hat. Ho et al. konnten ebenfalls beobachten, dass der Knockdown von HXK2 nicht zwangsweise einen Einfluss auf die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber einer Behandlung mit 3-BrPA hat (276).

Ergebnisse und Diskussion

Zwischenfazit Glucosestoffwechsel und Zytostatikaresistenz in Ovarialkarzinomzellen

Daraufhin wurde in dieser Arbeit die MCT1-Expression untersucht. Birsoy et al. haben nach ihren Studien postuliert, dass das Expressionslevel des Monocarboxylattransporters die eigentliche Determinante der 3-BrPA-Toxizität in einer regulären Tumorzelle sei. Somit sei die zytotoxische Wirkung hauptsächlich von der Aufnahme in die Zelle abhängig und könnte aufgrund der allgemein alkylierenden Natur weniger mit einer spezifischen Wirkung an einem Target beschrieben werden (138). Und auch in dieser Arbeit hat sich die relative Expression von MCT1, betrachtet im Vergleich der unterschiedlichen Zelllinien, als besserer Prädiktor für die 3-BrPA-Toxizität gezeigt als die Expression der HXK2. Die MDA-MB-231-Zellen zeigten die größte Abhängigkeit von einer Glucoseversorgung und exprimierten die regulatorischen Glykolyseenzyme, vor allem die HXK2, deutlich mehr. Allerdings waren die MDA-MB-231-Zellen deutlich unempfindlicher gegenüber einer 3-BrPA-Behandlung als alle anderen untersuchten Zelllinien. Dies korrelierte mit dem in Kapitel 5.8.2 „Untersuchung der Proteinexpression“ in Abbildung 44 dargestellten deutlich verringerten Expressionslevel von MCT1, im Vergleich zu den anderen Zelllinien. Liu et al. konnten durch die Induktion einer MCT1-Expression in MDA-MB-231-Zellen deren Empfindlichkeit gegenüber einer 3-BrPA-Behandlung erhöhen (131). Die Bedeutung von MCT1 wird auch dadurch unterstützt, dass die W1/W1CR-Zelllinien eine etwas niedrigere MCT1-Expression zeigten als die A2780-Zelllinien und gleichzeitig auch eine etwas erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber 3-BrPA aufwiesen. Weiterhin bestärkt wird der Zusammenhang bei der Betrachtung der A2780ADR-Zellen im Vergleich zu den A2780-Zellen. Die untersuchten A2780ADR-Zellen hatten eine höhere Expression von MCT1 und wiesen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber einer 3-BrPA-Behandlung auf. Daraus ergibt sich, dass für eine 3-BrPA-Behandlung, bei den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien, sich nicht die HXK2 als Marker für die Empfindlichkeit gezeigt hat, sondern auch hier die MCT1-Expression der bessere Marker war.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob Zytostatikaresistenzen von Tumorzellen in einem Zusammenhang mit einem veränderten Energiestoffwechsel stehen. Dabei konnten, abhängig von den untersuchten Zelllinien und Resistenzen, unterschiedliche Veränderungen des Stoffwechsels festgestellt werden, was die Individualität einer Tumorerkrankung unterstreicht.

Die Ergebnisse bezüglich der Rolle des IGFBP-2 in den untersuchten Mammakarzinomzelllinien zeigten nur einen geringfügigen Effekt des Bindeproteins auf das zelluläre Geschehen. Auch andere Forschungsgruppen haben bereits entdeckt, dass IGFBP-2 ggf. ein Marker für eine Resistenz ist und zu einem erhöhten Level in resistenten Zellen vorliegen kann, allerdings nicht für die Aufrechterhaltung der Resistenz notwendig ist und ein Knockdown von IGFBP-2 nicht zwangsweise sensitivierende Effekte nach sich zieht (237).

Allgemein ist die Rolle von IGFBP-2, aufgrund seiner diversen Einflüsse, sowohl durch die Aktivitätssteuerung der IGFs als auch aufgrund seiner eigenen teils gegenläufigen Effekte, nur schwer zu verallgemeinern. Gleiches gilt für den genauen Wirkmechanismus des IGFBP-2 innerhalb des zellulären Geschehens. Somit verbleibt, dass IGFBP-2 als möglicher Marker einer Resistenz dienen und in Korrelation dazu auf einem erhöhten Level vorliegen kann. Allerdings ist eine ursächliche Verknüpfung zwischen der Wirkung von IGFBP-2 und dem zellulären Geschehen schwer aufzustellen (170, 191).

Mit der Beschreibung des Warburg-Effektes ist seit nahezu einhundert Jahren bekannt, dass sich Tumorzellen in ihrem Energiestoffwechsel von normalen Zellen unterscheiden (36). Weiterhin wurde schon berichtet, dass eine Hyperglykämie einen Einfluss auf das Fortschreiten einer Tumorerkrankung haben kann (5). Allerdings wurde ein veränderter Energiemetabolismus erst im Jahre 2011 in die *hallmarks of cancer* aufgenommen (15). Erst in den letzten Jahren befasst sich die wissenschaftliche Forschung ausführlicher mit dem Thema, dass der Glucosemetabolismus einen Beitrag zu der Entwicklung einer Zytostatikaresistenz leisten könnte, sowie dass eine chemotherapeutische Behandlung eine Veränderung des Metabolismus eines Tumors induzieren kann (18, 20, 21, 277). Allgemein zeigt sich der Tumorstoffwechsel als ein äußerst komplexer Mechanismus mit häufig tumorindividuellen Besonderheiten. Beispielsweise kann die Entwicklung einer Resistenz sowohl mit einer Runterregulierung (278, 279) als auch mit einer Hochregulierung (222) des Glucosestoffwechsels einhergehen. Auch in dieser Arbeit zeigte sich in zwei Ovarialkarzinomzellsystemen, die gegen das gleiche Zytostatikum eine Resistenz aufweisen, ein komplett unterschiedliches Verhalten im Glucosestoffwechsel. So wurde jeweils bei dem Vergleich einer parentalen mit einer cisplatinresistenten Zelllinie entdeckt, dass eine resistente Zelllinie deutlich mehr von Glucose abhängig war als auch dass eine andere resistente Zelllinie einen verringerten Glucosebedarf und eine verringerte Expression der Glykolyseenzyme aufwies.

Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten Jahren gab es viele Entwicklungen, die eine bessere Charakterisierung einer Tumorerkrankung eines Patienten ermöglichen. Eine Einbeziehung der wichtigsten Glykolyseenzyme könnte dieses Bild deutlich erweitern. Dabei könnte die Expression der glykolyse-regulierenden Enzyme HXK2, PFK-1 und PKM als Biomarker für einen veränderten Energiestoffwechsel der Tumorzellen verwendet werden (40). Diese drei Enzyme haben sich, neben der LDH-A, auch unabhängig von ihrer Rolle in der Glykolyse, als wichtige Marker für die Tumorpheriferation und -migration erwiesen (65). Somit wäre es auch bei der Testung von verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten sinnvoll Glykolyseinhibitoren mit einzubeziehen. Dazu werden allerdings mehr prospektive Studien benötigt, um einen evidenten und gut verträglichen Effekt nachweisen zu können.

Es werden zwar immer wieder Glykolyseinhibitoren bei der Behandlung von Tumorzellen *in vitro* getestet (17), basierend auf dem Stand von 2020 sind allerdings noch keine Inhibitoren des Energiestoffwechsels bei der FDA zur Therapie von malignen Erkrankungen gelistet (280). Auch Inhibitoren der HXK2 haben es noch nicht in weiter fortgeschrittene klinische Studien geschafft. Dies liegt unter anderem daran, dass wichtige Organsysteme stark von der Glykolyse abhängig sind und somit eine Hemmung der Hexokinase-, oder allgemein der Glykolyseaktivität schnell mit schweren unerwünschten Arzneimittelwirkungen einhergehen kann (66). Eine Chance sich möglichst selektiv den sonst nahezu ubiquitär vorkommenden Glykolyseenzymen innerhalb einer malignen Erkrankung als Therapietarget zu nähern, wäre die Interferenz mit onkogenen Signalwegen, die einen Einfluss auf die Expression von Glykolyseenzymen haben (30).

Auch aufgrund neuer Entwicklungen zur selektiven Adressierung eines Targets wird die Glykolyse als Angriffspunkt bei der Behandlung einer malignen Erkrankung wieder interessanter, da es nun möglicherweise Chancen gibt selektiver ausschließlich die Glykolyse von Tumorzellen zu beeinträchtigen. So wurde kürzlich ein HXK2-PROTAC entwickelt, welches den Abbau der HXK2 vermittelt und somit die Glykolyse hemmt (281). Auch durch fortschreitende pharmazeutisch-technologische Entwicklungen ist eine Verminderung der unspezifischen Toxizität denkbar.

Weiterhin mag die Kombination von mehreren Glykolyseinhibitoren als eine Option angesehen werden, da dadurch möglicherweise synergistische Effekte erreichbar sind, während gleichzeitig durch verringerte Dosen das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen reduziert werden könnte (147). Eine weitere Idee stellt die Inhibition der Glykolyse in Kombination mit der Adressierung eines anderen *hallmark of cancer* dar, um somit an mehreren Stellen die Unterschiede zwischen einer Tumorzelle und einer gesunden Zelle auszunutzen.

Das dem 3-BrPA zwischenzeitlich zugeschriebene große Potenzial als Tumorthapeutikum stellt sich eher kritisch dar, dafür ist der Erfahrungsumfang in klinischen Studien zu gering und bezieht

Zusammenfassung und Ausblick

sich auf Einzelstudien, bei denen auch Todesfälle auftraten (141, 143). Der Wirkmechanismus der Substanz ist zu unspezifisch alkylierend und somit zu unberechenbar. Von Vorteil ist lediglich, dass es durch den Eingriff in den Energiemetabolismus schneller als klassische zytotoxische Arzneistoffe wirkt und dadurch auch etwas besser kontrollierbar sein könnte (141). Allerdings zeigt sich schon an diesem simplen Molekül, wie unterschiedlich Tumorzellen auf eine Substanz reagieren können und wie wichtig eine individuell angepasste Tumorthherapie ist. Die untersuchten Zelllinien unterschieden sich in ihrer 3-BrPA-EC₅₀ fast um den Faktor 25. Auch in der Kombinationsbehandlung zeigten sich unterschiedliche, teils gegenteilige Effekte, von einer Behinderung der Wirkung des Zytostatikums bis zu einer Verstärkung. Neue pharmazeutisch-technologische Entwicklungen konnten die unspezifische Toxizität einer 3-BrPA-Behandlung in einem Zellmodell senken (144). Dies zeigt, dass nicht nur der Wirkstoff, sondern auch dessen Applikation wichtig ist und somit Chancen birgt, wenn nicht für 3-BrPA selbst, dann vielleicht für die Anwendung anderer Glykolyseinhibitoren. Somit könnten diese doch noch einen Weg in die Therapie von malignen Erkrankungen finden. Und der Fakt bleibt, dass klassische Zytostatika in der Regel ebenfalls ein breites Spektrum an unerwünschten Arzneimittelwirkungen aufweisen.

Im Zusammenhang mit den bereits gewonnen Erkenntnissen von Birsoy et al., die hier bestätigt und teilweise auch auf resistente Zelllinien erweitert werden konnten, dass ein Transporter (MCT1) für die Aufnahme und Wirkung einer zytotoxischen Substanz wichtig ist (138), könnte dies ebenfalls ein Anhaltspunkt für die Entwicklung zukünftiger chemotoxischer Substanzen sein. Ziel wäre es dann diese so zu entwickeln, dass sie Substrat für einen in Tumorzellen überexprimierten Transporter sind. Auf diese Weise wäre eine gewisse Selektivität und eine Verminderung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen denkbar.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass in der Beeinflussung des Tumorstoffwechsels großes Potenzial liegen könnte, die Therapie einer malignen Erkrankung zu verbessern. Gleichzeitig wird aber auch durch diese Arbeit betont, dass dies hochgradig tumorindividuell ist und keine einfachen Verallgemeinerungen getroffen werden können. Entsprechend sollten größere Vorstöße in der Forschung in Richtung von individuellen Behandlungen durchgeführt werden, die auch den Glucosestoffwechsel als mögliches Target mitberücksichtigen.

7. Literatur

1. Ahmad FB, Cisewski JA, Xu J, Anderson RN. Provisional Mortality Data - United States, 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2023; 72(18):488–92. doi: 10.15585/mmwr.mm7218a3.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; 70(1):7–30. doi: 10.3322/caac.21590.
3. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* 2010; 33(7):1674–85. doi: 10.2337/dc10-0666.
4. Simon D, Balkau B. Diabetes mellitus, hyperglycaemia and cancer. *Diabetes Metab* 2010; 36(3):182–91. doi: 10.1016/j.diabet.2010.04.001.
5. Duan W, Shen X, Lei J, Xu Q, Yu Y, Li R et al. Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression. *BioMed Research International* 2014; 2014:461917. doi: 10.1155/2014/461917.
6. Gallagher EJ, LeRoith D. Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality. *Physiol Rev* 2015; 95(3):727–48. doi: 10.1152/physrev.00030.2014.
7. Li W, Zhang X, Sang H, Zhou Y, Shang C, Wang Y et al. Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38(1):327. doi: 10.1186/s13046-019-1309-6.
8. Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med* 2021; 9:20503121211034366. doi: 10.1177/20503121211034366.
9. Pearce A, Haas M, Viney R, Pearson S-A, Haywood P, Brown C et al. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PLoS One* 2017; 12(10):e0184360. doi: 10.1371/journal.pone.0184360.
10. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans* 2018; 47(19):6645–53. doi: 10.1039/c8dt00838h.
11. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012; 31(15):1869–83. doi: 10.1038/onc.2011.384.
12. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer* 2018; 18(1):41. doi: 10.1186/s12885-017-3953-6.

Literatur

13. Nikolaou M, Pavlopoulou A, Georgakilas AG, Kyrodimos E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin Exp Metastasis* 2018; 35(4):309–18. doi: 10.1007/s10585-018-9903-0.
14. Zheng H-C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* 2017; 8(35):59950–64. doi: 10.18632/oncotarget.19048.
15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
16. Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(4):267–77. doi: 10.1038/nrc2817.
17. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 11.07.2020:1393–418.
18. Varghese E, Samuel SM, Líšková A, Samec M, Kubatka P, Büsselberg D. Targeting Glucose Metabolism to Overcome Resistance to Anticancer Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2020; 12(8). doi: 10.3390/cancers12082252.
19. Qiu J, Zheng Q, Meng X. Hyperglycemia and Chemoresistance in Breast Cancer: From Cellular Mechanisms to Treatment Response. *Front Oncol* 2021; 11:628359. doi: 10.3389/fonc.2021.628359.
20. Zaal EA, Berkers CR. The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer. *Front Oncol* 2018; 8:500. doi: 10.3389/fonc.2018.00500.
21. Cunha A, Silva PMA, Sarmiento B, Queirós O. Targeting Glucose Metabolism in Cancer Cells as an Approach to Overcoming Drug Resistance. *Pharmaceutics* 2023; 15(11). doi: 10.3390/pharmaceutics15112610.
22. Clark MA. *Biology. 2e: OpenStax College, Rice University.* Verfügbar unter: <https://openstax.org/details/books/biology-2e>.
23. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry. Sixth edition.* Basingstoke, New York: Macmillan Higher Education; W.H. Freeman and Company; 2013.
24. Ancey P-B, Contat C, Meylan E. Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment. *FEBS J* 2018; 285(16):2926–43. doi: 10.1111/febs.14577.
25. Holman GD. Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. *Pflugers Arch* 2020; 472(9):1155–75. doi: 10.1007/s00424-020-02411-3.
26. Fan T, Sun G, Sun X, Zhao L, Zhong R, Peng Y. Tumor Energy Metabolism and Potential of 3-Bromopyruvate as an Inhibitor of Aerobic Glycolysis: Implications in Tumor Treatment. *Cancers (Basel)* 2019; 11(3). doi: 10.3390/cancers11030317.

Literatur

27. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* 2003; 206(Pt 12):2049–57. doi: 10.1242/jeb.00241.
28. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci* 2014; 39(8):347–54. doi: 10.1016/j.tibs.2014.06.005.
29. Paneque A, Fortus H, Zheng J, Werlen G, Jacinto E. The Hexosamine Biosynthesis Pathway: Regulation and Function. *Genes (Basel)* 2023; 14(4). doi: 10.3390/genes14040933.
30. Papa S, Choy PM, Bubici C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. *Oncogene* 2019; 38(13):2223–40. doi: 10.1038/s41388-018-0582-8.
31. Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 2008; 118(12):3930–42. doi: 10.1172/JCI36843.
32. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57–70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
33. Lis P, Dylağ M, Niedźwiecka K, Ko YH, Pedersen PL, Goffeau A et al. The HK2 Dependent "Warburg Effect" and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Cancer: Targets for Effective Therapy with 3-Bromopyruvate. *Molecules* 2016; 21(12). doi: 10.3390/molecules21121730.
34. Nakashima RA, Paggi MG, Pedersen PL. Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. *Cancer Res* 1984; 44(12 Pt 1):5702–6.
35. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930):1029–33. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849637/>.
36. WARBURG O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research* 1925; 9(1):148–63. doi: 10.1158/jcr.1925.148.
37. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123(3191):309–14. doi: 10.1126/science.123.3191.309.
38. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* 2005; 202(3):654–62. doi: 10.1002/jcp.20166.
39. Zeng K, Ju G, Wang H, Huang J. GLUT1/3/4 as novel biomarkers for the prognosis of human breast cancer. *Transl Cancer Res* 2020; 9(4):2363–77. doi: 10.21037/tcr.2020.03.50.

Literatur

40. Ishfaq M, Bashir N, Riaz SK, Manzoor S, Khan JS, Bibi Y et al. Expression of HK2, PKM2, and PFKM Is Associated with Metastasis and Late Disease Onset in Breast Cancer Patients. *Genes (Basel)* 2022; 13(3). doi: 10.3390/genes13030549.
41. Maddocks ODK, Labuschagne CF, Adams PD, Vousden KH. Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells. *Mol Cell* 2016; 61(2):210–21. doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.014.
42. Labuschagne CF, van den Broek NJF, Mackay GM, Vousden KH, Maddocks ODK. Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Rep* 2014; 7(4):1248–58. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.045.
43. Ye J, Mancuso A, Tong X, Ward PS, Fan J, Rabinowitz JD et al. Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(18):6904–9. doi: 10.1073/pnas.1204176109.
44. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(11):3892–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2904.
45. Marbaniang C, Kma L. Dysregulation of Glucose Metabolism by Oncogenes and Tumor Suppressors in Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018; 19(9):2377–90. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.9.2377.
46. Rascio F, Spadaccino F, Rocchetti MT, Castellano G, Stallone G, Netti GS et al. The Pathogenic Role of PI3K/AKT Pathway in Cancer Onset and Drug Resistance: An Updated Review. *Cancers (Basel)* 2021; 13(16). doi: 10.3390/cancers13163949.
47. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10):721–32. doi: 10.1038/nrc1187.
48. Yasuda S, Arai S, Mori A, Isobe N, Yang W, Oe H et al. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance. *J Hepatol* 2004; 40(1):117–23. doi: 10.1016/s0168-8278(03)00503-8.
49. Lum JJ, Bui T, Gruber M, Gordan JD, DeBerardinis RJ, Covelto KL et al. The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev* 2007; 21(9):1037–49. doi: 10.1101/gad.1529107.
50. Swerdlow AJ, Laing SP, Qiao Z, Slater SD, Burden AC, Botha JL et al. Cancer incidence and mortality in patients with insulin-treated diabetes: a UK cohort study. *Br J Cancer* 2005; 92(11):2070–5. doi: 10.1038/sj.bjc.6602611.

Literatur

51. Zendejdel K, Nyrén O, Ostenson C-G, Adami H-O, Ekblom A, Ye W. Cancer incidence in patients with type 1 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Sweden. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(23):1797–800. doi: 10.1093/jnci/djg105.
52. Stattin P, Björk O, Ferrari P, Lukanova A, Lenner P, Lindahl B et al. Prospective study of hyperglycemia and cancer risk. *Diabetes Care* 2007; 30(3):561–7. doi: 10.2337/dc06-0922.
53. Pearson-Stuttard J, Zhou B, Kontis V, Bentham J, Gunter MJ, Ezzati M. Worldwide burden of cancer attributable to diabetes and high body-mass index: a comparative risk assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018; 6(6):e6-e15. doi: 10.1016/S2213-8587(18)30150-5.
54. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16(4):1103–23. doi: 10.1677/ERC-09-0087.
55. Masur K, Vetter C, Hinz A, Tomas N, Henrich H, Niggemann B et al. Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. *Br J Cancer* 2011; 104(2):345–52. doi: 10.1038/sj.bjc.6606050.
56. Okumura M, Yamamoto M, Sakuma H, Kojima T, Maruyama T, Jamali M et al. Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: reciprocal involvement of PKC- α and PPAR expression. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592(2):107–16. doi: 10.1016/S0167-4889(02)00276-8.
57. Sun S, Sun Y, Rong X, Bai L. High glucose promotes breast cancer proliferation and metastasis by impairing angiotensinogen expression. *Biosci Rep* 2019; 39(6). doi: 10.1042/BSR20190436.
58. Hou Y, Zhou M, Xie J, Chao P, Feng Q, Wu J. High glucose levels promote the proliferation of breast cancer cells through GTPases. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2017; 9:429–36. doi: 10.2147/BCTT.S135665.
59. Han L, Ma Q, Li J, Liu H, Li W, Ma G et al. High glucose promotes pancreatic cancer cell proliferation via the induction of EGF expression and transactivation of EGFR. *PLoS One* 2011; 6(11):e27074. doi: 10.1371/journal.pone.0027074.
60. Xia L, Oyang L, Lin J, Tan S, Han Y, Wu N et al. The cancer metabolic reprogramming and immune response. *Mol Cancer* 2021; 20(1):28. doi: 10.1186/s12943-021-01316-8.
61. Garufi A, D'Orazi G. High glucose dephosphorylates serine 46 and inhibits p53 apoptotic activity. *J Exp Clin Cancer Res* 2014; 33:79. doi: 10.1186/s13046-014-0079-4.

Literatur

62. Baldari S, Garufi A, Granato M, Cuomo L, Pistrutto G, Cirone M et al. Hyperglycemia triggers HIPK2 protein degradation. *Oncotarget* 2017; 8(1):1190–203. doi: 10.18632/oncotarget.13595.
63. Vaughn AE, Deshmukh M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2008; 10(12):1477–83. doi: 10.1038/ncb1807.
64. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* 2006; 25(34):4777–86. doi: 10.1038/sj.onc.1209603.
65. Li X-B, Gu J-D, Zhou Q-H. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thorac Cancer* 2015; 6(1):17–24. doi: 10.1111/1759-7714.12148.
66. Guo D, Meng Y, Jiang X, Lu Z. Hexokinases in cancer and other pathologies. *Cell Insight* 2023; 2(1):100077. doi: 10.1016/j.cellin.2023.100077.
67. Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39(6):647–52. doi: 10.2337/diab.39.6.647.
68. Pastorino JG, Hoek JB. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Current medicinal chemistry* 2003; 10(16):1535–51. doi: 10.2174/0929867033457269.
69. Ardehali H, Yano Y, Printz RL, Koch S, Whitesell RR, May JM et al. Functional organization of mammalian hexokinase II. Retention of catalytic and regulatory functions in both the NH₂- and COOH-terminal halves. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(4):1849–52. doi: 10.1074/jbc.271.4.1849.
70. Ciscato F, Ferrone L, Masgras I, Laquatra C, Rasola A. Hexokinase 2 in Cancer: A Prima Donna Playing Multiple Characters. *Int J Mol Sci* 2021; 22(9). doi: 10.3390/ijms22094716.
71. Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, Miller L, Wang Z, Wheaton W et al. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell* 2013; 24(2):213–28. doi: 10.1016/j.ccr.2013.06.014.
72. Wolf A, Agnihotri S, Micallef J, Mukherjee J, Sabha N, Cairns R et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J Exp Med* 2011; 208(2):313–26. doi: 10.1084/jem.20101470.
73. Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 2008; 40(3):171–82. doi: 10.1007/s10863-008-9148-8.

Literatur

74. Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(9):7610–8. doi: 10.1074/jbc.M109950200.
75. Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, Hua E, Bronder JL, Weil RJ et al. Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. *Mol Cancer Res* 2009; 7(9):1438–45. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0234.
76. Guo D, Tong Y, Jiang X, Meng Y, Jiang H, Du L et al. Aerobic glycolysis promotes tumor immune evasion by hexokinase2-mediated phosphorylation of I κ B α . *Cell Metab* 2022; 34(9):1312-1324.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2022.08.002.
77. Fang R, Xiao T, Fang Z, Sun Y, Li F, Gao Y et al. MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *J Biol Chem* 2012; 287(27):23227–35. doi: 10.1074/jbc.M112.373084.
78. Wang L, Xiong H, Wu F, Zhang Y, Wang J, Zhao L et al. Hexokinase 2-mediated Warburg effect is required for PTEN- and p53-deficiency-driven prostate cancer growth. *Cell Rep* 2014; 8(5):1461–74. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.053.
79. Sato-Tadano A, Suzuki T, Amari M, Takagi K, Miki Y, Tamaki K et al. Hexokinase II in breast carcinoma: a potent prognostic factor associated with hypoxia-inducible factor-1 α and Ki-67. *Cancer Sci* 2013; 104(10):1380–8. doi: 10.1111/cas.12238.
80. Nakano A, Miki H, Nakamura S, Harada T, Oda A, Amou H et al. Up-regulation of hexokinaseII in myeloma cells: targeting myeloma cells with 3-bromopyruvate. *J Bioenerg Biomembr* 2012; 44(1):31–8. doi: 10.1007/s10863-012-9412-9.
81. Al Hasawi N, Alkandari MF, Luqmani YA. Phosphofructokinase: a mediator of glycolytic flux in cancer progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 92(3):312–21. doi: 10.1016/j.critrevonc.2014.05.007.
82. Imbert-Fernandez Y, Clem BF, O'Neal J, Kerr DA, Spaulding R, Lanceta L et al. Estradiol stimulates glucose metabolism via 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3). *J Biol Chem* 2014; 289(13):9440–8. doi: 10.1074/jbc.M113.529990.
83. Tian R-F, Li X-F, Xu C, Wu H, Liu L, Wang L-H et al. SiRNA targeting PFK1 inhibits proliferation and migration and enhances radiosensitivity by suppressing glycolysis in colorectal cancer. *Am J Transl Res* 2020; 12(9):4923–40.
84. Obach M, Navarro-Sabaté A, Caro J, Kong X, Duran J, Gómez M et al. 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for

Literatur

- transactivation in response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(51):53562–70. doi: 10.1074/jbc.M406096200.
85. O'Neal J, Clem A, Reynolds L, Dougherty S, Imbert-Fernandez Y, Telang S et al. Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) suppresses glucose metabolism and the growth of HER2+ breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2016; 160(1):29–40. doi: 10.1007/s10549-016-3968-8.
86. Coelho RG, Calaça IC, Celestrini DM, Correia-Carneiro AHP, Costa MM, Zancan P et al. Hexokinase and phosphofructokinase activity and intracellular distribution correlate with aggressiveness and invasiveness of human breast carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6(30):29375–87. doi: 10.18632/oncotarget.4910.
87. Spitz GA, Furtado CM, Sola-Penna M, Zancan P. Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity. *Biochem Pharmacol* 2009; 77(1):46–53. doi: 10.1016/j.bcp.2008.09.020.
88. Zancan P, Rosas AO, Marcondes MC, Marinho-Carvalho MM, Sola-Penna M. Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(10):1520–7. doi: 10.1016/j.bcp.2007.01.018.
89. Clem BF, O'Neal J, Tapolsky G, Clem AL, Imbert-Fernandez Y, Kerr DA et al. Targeting 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) as a therapeutic strategy against cancer. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(8):1461–70. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0097.
90. Li S, He P, Wang Z, Liang M, Liao W, Huang Y et al. RNAi-mediated knockdown of PFK1 decreases the invasive capability and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cell line, CNE-2. *Cell Cycle* 2021; 20(2):154–65. doi: 10.1080/15384101.2020.1866279.
91. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(4):300–8. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.04.009.
92. Yang W, Lu Z. Pyruvate kinase M2 at a glance. *J Cell Sci* 2015; 128(9):1655–60. doi: 10.1242/jcs.166629.
93. Zahra K, Dey T, Ashish, Mishra SP, Pandey U. Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Front Oncol* 2020; 10:159. doi: 10.3389/fonc.2020.00159.
94. Ashizawa K, Willingham MC, Liang CM, Cheng SY. In vivo regulation of monomer-tetramer conversion of pyruvate kinase subtype M2 by glucose is mediated via fructose 1,6-

Literatur

- bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266(25):16842–6. doi: 10.1016/S0021-9258(18)55378-3.
95. Zhu S, Guo Y, Zhang X, Liu H, Yin M, Chen X et al. Pyruvate kinase M2 (PKM2) in cancer and cancer therapeutics. *Cancer Lett* 2021; 503:240–8. doi: 10.1016/j.canlet.2020.11.018.
96. Desai S, Ding M, Wang B, Lu Z, Zhao Q, Shaw K et al. Tissue-specific isoform switch and DNA hypomethylation of the pyruvate kinase PKM gene in human cancers. *Oncotarget* 2014; 5(18):8202–10. doi: 10.18632/oncotarget.1159.
97. Bluemlein K, Grüning N-M, Feichtinger RG, Lehrach H, Kofler B, Ralser M. No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis. *Oncotarget* 2011; 2(5):393–400. doi: 10.18632/oncotarget.278.
98. Chen X, Chen S, Yu D. Protein kinase function of pyruvate kinase M2 and cancer. *Cancer Cell Int* 2020; 20(1):523. doi: 10.1186/s12935-020-01612-1.
99. Dong G, Mao Q, Xia W, Xu Y, Wang J, Xu L et al. PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncol Lett* 2016; 11(3):1980–6. doi: 10.3892/ol.2016.4168.
100. Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu Z-R. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol Cell* 2012; 45(5):598–609. doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.001.
101. Gupta V, Bamezai RNK. Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein Sci* 2010; 19(11):2031–44. doi: 10.1002/pro.505.
102. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008; 452(7184):230–3. doi: 10.1038/nature06734.
103. Luan W, Wang Y, Chen X, Shi Y, Wang J, Zhang J et al. PKM2 promotes glucose metabolism and cell growth in gliomas through a mechanism involving a let-7a/c-Myc/hnRNPA1 feedback loop. *Oncotarget* 2015; 6(15):13006–18. doi: 10.18632/oncotarget.3514.
104. Feng Y, Xiong Y, Qiao T, Li X, Jia L, Han Y. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med* 2018; 7(12):6124–36. doi: 10.1002/cam4.1820.
105. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E. Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5: differential expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epithelial malignant tumors. *Tumour Biol* 2003; 24(4):199–202. doi: 10.1159/000074430.
106. Kayser G, Kassem A, Siene W, Schulte-Uentrop L, Mattern D, Aumann K et al. Lactate-dehydrogenase 5 is overexpressed in non-small cell lung cancer and correlates with the

Literatur

- expression of the transketolase-like protein 1. *Diagn Pathol* 2010; 5:22. doi: 10.1186/1746-1596-5-22.
- 107.Koukourakis M, Tsolou A, Pouliliou S, Lamprou I, Papadopoulou M, Ilemosoglou M et al. Blocking LDHA glycolytic pathway sensitizes glioblastoma cells to radiation and temozolomide. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 491(4):932–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.138.
- 108.Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gatter KC et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 2003; 89(5):877–85. doi: 10.1038/sj.bjc.6601205.
- 109.An J, Zhang Y, He J, Zang Z, Zhou Z, Pei X et al. Lactate dehydrogenase A promotes the invasion and proliferation of pituitary adenoma. *Sci Rep* 2017; 7(1):4734. doi: 10.1038/s41598-017-04366-5.
- 110.Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51(2):349–53. doi: 10.1016/s0360-3016(01)01630-3.
- 111.Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab* 2016; 24(5):657–71. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.011.
- 112.Xie H, Hanai J-I, Ren J-G, Kats L, Burgess K, Bhargava P et al. Targeting lactate dehydrogenase--a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metab* 2014; 19(5):795–809. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.003.
- 113.Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest* 2013; 123(9):3685–92. doi: 10.1172/JCI69741.
- 114.Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life* 2012; 64(2):109–19. doi: 10.1002/iub.572.
- 115.Juel C, Halestrap AP. Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol* 1999; 517 (Pt 3)(Pt 3):633–42. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0633s.x.
- 116.Payen VL, Mina E, van Hée VF, Porporato PE, Sonveaux P. Monocarboxylate transporters in cancer. *Mol Metab* 2020; 33:48–66. doi: 10.1016/j.molmet.2019.07.006.

Literatur

117. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, Baltazar F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr* 2012; 44(1):127–39. doi: 10.1007/s10863-012-9428-1.
118. Boidot R, Végran F, Meulle A, Le Breton A, Dessy C, Sonveaux P et al. Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Res* 2012; 72(4):939–48. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2474.
119. Payen VL, Hsu MY, Rådecke KS, Wyart E, Vazeille T, Bouzin C et al. Monocarboxylate Transporter MCT1 Promotes Tumor Metastasis Independently of Its Activity as a Lactate Transporter. *Cancer Res* 2017; 77(20):5591–601. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0764.
120. Baker JP, Rabin BR. Effects of bromopyruvate on the control and catalytic properties of glutamate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 1969; 11(1):154–9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00753.x.
121. Sanborn BM, Felberg NT, Hollocher TC. The inactivation of succinate dehydrogenase by bromopyruvate. *Biochim Biophys Acta* 1971; 227(2):219–31. doi: 10.1016/0005-2744(71)90055-6.
122. Chang GG, Hsu RY. The substrate analog bromopyruvate as a substrate, an inhibitor and an alkylating agent of malic enzyme of pigeon liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1973; 55(3):580–7. doi: 10.1016/0006-291X(73)91183-2.
123. Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS et al. Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(1):269–75. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.047.
124. Geschwind J-FH, Ko YH, Torbenson MS, Magee C, Pedersen PL. Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res* 2002; 62(14):3909–13.
125. El Sayed SM, Baghdadi H, Zolaly M, Almaramhy HH, Ayat M, Donki JG. The promising anticancer drug 3-bromopyruvate is metabolized through glutathione conjugation which affects chemoresistance and clinical practice: An evidence-based view. *Med Hypotheses* 2017; 100:67–77. doi: 10.1016/j.mehy.2017.01.014.
126. Zhang Q, Zhang Y, Zhang P, Chao Z, Xia F, Jiang C et al. Hexokinase II inhibitor, 3-BrPA induced autophagy by stimulating ROS formation in human breast cancer cells. *Genes Cancer* 2014; 5(3-4):100–12. doi: 10.18632/genesandcancer.9.

Literatur

127. Chen Z, Zhang H, Lu W, Huang P. Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787(5):553–60. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.03.003.
128. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind J-FH, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen JA, Tchernyshyov I et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer Res* 2009; 29(12):4909–18.
129. Wu L, Xu J, Yuan W, Wu B, Wang H, Liu G et al. The reversal effects of 3-bromopyruvate on multidrug resistance in vitro and in vivo derived from human breast MCF-7/ADR cells. *PLoS One* 2014; 9(11):e112132. doi: 10.1371/journal.pone.0112132.
130. Nakano A, Tsuji D, Miki H, Cui Q, El Sayed SM, Ikegame A et al. Glycolysis inhibition inactivates ABC transporters to restore drug sensitivity in malignant cells. *PLoS One* 2011; 6(11):e27222. doi: 10.1371/journal.pone.0027222.
131. Liu Z, Sun Y, Hong H, Zhao S, Zou X, Ma R et al. 3-bromopyruvate enhanced daunorubicin-induced cytotoxicity involved in monocarboxylate transporter 1 in breast cancer cells. *Am J Cancer Res* 2015; 5(9):2673–85.
132. Potęga A. Glutathione-Mediated Conjugation of Anticancer Drugs: An Overview of Reaction Mechanisms and Biological Significance for Drug Detoxification and Bioactivation. *Molecules* 2022; 27(16). doi: 10.3390/molecules27165252.
133. Sadowska-Bartosz I, Szewczyk R, Jaremko L, Jaremko M, Bartosz G. Anticancer agent 3-bromopyruvic acid forms a conjugate with glutathione. *Pharmacol Rep* 2016; 68(2):502–5. doi: 10.1016/j.pharep.2015.11.007.
134. Kwiatkowska E, Wojtala M, Gajewska A, Soszyński M, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Effect of 3-bromopyruvate acid on the redox equilibrium in non-invasive MCF-7 and invasive MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Bioenerg Biomembr* 2016; 48(1):23–32. doi: 10.1007/s10863-015-9637-5.
135. Cardaci S, Desideri E, Ciriolo MR. Targeting aerobic glycolysis: 3-bromopyruvate as a promising anticancer drug. *J Bioenerg Biomembr* 2012; 44(1):17–29. doi: 10.1007/s10863-012-9422-7.
136. Cal M, Matyjaszczyk I, Litwin I, Augustyniak D, Ogórek R, Ko Y et al. The Anticancer Drug 3-Bromopyruvate Induces DNA Damage Potentially Through Reactive Oxygen Species in Yeast and in Human Cancer Cells. *Cells* 2020; 9(5). doi: 10.3390/cells9051161.
137. Petricciuolo M, Davidescu M, Fettucciari K, Gatticchi L, Brancorsini S, Roberti R et al. The efficacy of the anticancer 3-bromopyruvate is potentiated by antimycin and menadione by

Literatur

- unbalancing mitochondrial ROS production and disposal in U118 glioblastoma cells. *Heliyon* 2020; 6(12):e05741. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05741.
138. Birsoy K, Wang T, Possemato R, Yilmaz OH, Koch CE, Chen WW et al. MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors. *Nat Genet* 2013; 45(1):104–8. doi: 10.1038/ng.2471.
139. Ihrlund LS, Hernlund E, Khan O, Shoshan MC. 3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs. *Mol Oncol* 2008; 2(1):94–101. doi: 10.1016/j.molonc.2008.01.003.
140. Azevedo-Silva J, Queirós O, Baltazar F, Ułaszewski S, Goffeau A, Ko YH et al. The anticancer agent 3-bromopyruvate: a simple but powerful molecule taken from the lab to the bedside. *J Bioenerg Biomembr* 2016; 48(4):349–62. doi: 10.1007/s10863-016-9670-z.
141. Ko YH, Verhoeven HA, Lee MJ, Corbin DJ, Vogl TJ, Pedersen PL. A translational study "case report" on the small molecule "energy blocker" 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside. *J Bioenerg Biomembr* 2012; 44(1):163–70. doi: 10.1007/s10863-012-9417-4.
142. El Sayed SM, Mohamed WG, Seddik M-AH, Ahmed A-SA, Mahmoud AG, Amer WH et al. Safety and outcome of treatment of metastatic melanoma using 3-bromopyruvate: a concise literature review and case study. *Chin J Cancer* 2014; 33(7):356–64. doi: 10.5732/cjc.013.10111.
143. Hinnerk Feldwisch-Drentrup AD. Wirkte das alternative Krebsmittel tödlich?: 3-Bromopyruvat: DAZ.online; 2016 [Stand: 16.11.2023]. Verfügbar unter: <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2016/08/05/wirkte-das-alternative-krebsmittel-todlich>.
144. Marrache S, Dhar S. The energy blocker inside the power house: Mitochondria targeted delivery of 3-bromopyruvate. *Chem Sci* 2015; 6(3):1832–45. doi: 10.1039/C4SC01963F.
145. Vali M, Liapi E, Kowalski J, Hong K, Khwaja A, Torbenson MS et al. Intraarterial therapy with a new potent inhibitor of tumor metabolism (3-bromopyruvate): identification of therapeutic dose and method of injection in an animal model of liver cancer. *J Vasc Interv Radiol* 2007; 18(1 Pt 1):95–101. doi: 10.1016/j.jvir.2006.10.019.
146. Singh R, Gupta V, Kumar A, Singh K. 2-Deoxy-D-Glucose: A Novel Pharmacological Agent for Killing Hypoxic Tumor Cells, Oxygen Dependence-Lowering in Covid-19, and Other Pharmacological Activities. *Adv Pharmacol Pharm Sci* 2023; 2023:9993386. doi: 10.1155/2023/9993386.

Literatur

147. Xiao H, Li S, Zhang D, Liu T, Yu M, Wang F. Separate and concurrent use of 2-deoxy-D-glucose and 3-bromopyruvate in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 2013; 29(1):329–34. doi: 10.3892/or.2012.2085.
148. Yamada M, Tomida A, Yun J, Cai B, Yoshikawa H, Taketani Y et al. Cellular sensitization to cisplatin and carboplatin with decreased removal of platinum-DNA adduct by glucose-regulated stress. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44(1):59–64. doi: 10.1007/s002800050945.
149. Laussel C, Léon S. Cellular toxicity of the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose and associated resistance mechanisms. *Biochem Pharmacol* 2020; 182:114213. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114213.
150. Ely JO. 2-deoxy-d-glucose as an inhibitor of cancerous growth in animals. *Journal of the Franklin Institute* 1954; 258(2):157–60. doi: 10.1016/0016-0032(54)90946-1.
151. Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett* 2014; 355(2):176–83. doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.003.
152. Raez LE, Papadopoulos K, Ricart AD, Chiorean EG, Dipaola RS, Stein MN et al. A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71(2):523–30. doi: 10.1007/s00280-012-2045-1.
153. Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, Tripathi RP, Gupta JP, Mathew TL et al. Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol* 2005; 181(8):507–14. doi: 10.1007/s00066-005-1320-z.
154. Annunziata M, Granata R, Ghigo E. The IGF system. *Acta Diabetol* 2011; 48(1):1–9. doi: 10.1007/s00592-010-0227-z.
155. Brahmkhatri VP, Prasanna C, Atreya HS. Insulin-like growth factor system in cancer: novel targeted therapies. *BioMed Research International* 2015; 2015:538019. doi: 10.1155/2015/538019.
156. Yao X, Sun S, Zhou X, Guo W, Zhang L. IGF-binding protein 2 is a candidate target of therapeutic potential in cancer. *Tumour Biol* 2016; 37(2):1451–9. doi: 10.1007/s13277-015-4561-1.
157. Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 2002; 23(6):824–54. doi: 10.1210/er.2001-0033.

Literatur

158. Sepp-Lorenzino L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 47(3):235–53. doi: 10.1023/a:1005955017615.
159. Ikezu T, Okamoto T, Giambarella U, Yokota T, Nishimoto I. In vivo coupling of insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor to heteromeric G proteins. Distinct roles of cytoplasmic domains and signal sequestration by the receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(49):29224–8. doi: 10.1074/jbc.270.49.29224.
160. Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1332(3):F105-26. doi: 10.1016/s0304-419x(97)00007-3.
161. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(12):915–28. doi: 10.1038/nrc2536.
162. Russo VC, Azar WJ, Yau SW, Sabin MA, Werther GA. IGFBP-2: The dark horse in metabolism and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26(3):329–46. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.12.001.
163. Li T, Forbes ME, Fuller GN, Li J, Yang X, Zhang W. IGFBP2: integrative hub of developmental and oncogenic signaling network. *Oncogene* 2020; 39(11):2243–57. doi: 10.1038/s41388-020-1154-2.
164. Zeng L, Perks CM, Holly JMP. IGFBP-2/PTEN: A critical interaction for tumours and for general physiology? *Growth Horm IGF Res* 2015; 25(3):103–7. doi: 10.1016/j.ghir.2015.01.003.
165. Yau SW, Azar WJ, Sabin MA, Werther GA, Russo VC. IGFBP-2 - taking the lead in growth, metabolism and cancer. *J Cell Commun Signal* 2015; 9(2):125–42. doi: 10.1007/s12079-015-0261-2.
166. Liu H, Le Li, Chen H, Kong R, Pan S, Hu J et al. Silencing IGFBP-2 decreases pancreatic cancer metastasis and enhances chemotherapeutic sensitivity. *Oncotarget* 2017; 8(37):61674–86. doi: 10.18632/oncotarget.18669.
167. Höflich A, Lahm H, Blum W, Kolb H, Wolf E. Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines. *FEBS Lett* 1998; 434(3):329–34. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01011-4.
168. Moore MG, Wetterau LA, Francis MJ, Peehl DM, Cohen P. Novel stimulatory role for insulin-like growth factor binding protein-2 in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2003; 105(1):14–9. doi: 10.1002/ijc.11015.

Literatur

169. Khan S. IGFBP-2 Signaling in the Brain: From Brain Development to Higher Order Brain Functions. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; 10:822. doi: 10.3389/fendo.2019.00822.
170. Pickard A, McCance DJ. IGF-Binding Protein 2 - Oncogene or Tumor Suppressor? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; 6:25. doi: 10.3389/fendo.2015.00025.
171. Foulstone EJ, Zeng L, Perks CM, Holly JMP. Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) promotes growth and survival of breast epithelial cells: novel regulation of the estrogen receptor. *Endocrinology* 2013; 154(5):1780–93. doi: 10.1210/en.2012-1970.
172. Holmes KM, Annala M, Chua CYX, Dunlap SM, Liu Y, Hugen N et al. Insulin-like growth factor-binding protein 2-driven glioma progression is prevented by blocking a clinically significant integrin, integrin-linked kinase, and NF- κ B network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(9):3475–80. doi: 10.1073/pnas.1120375109.
173. Han S, Li Z, Master LM, Master ZW, Wu A. Exogenous IGFBP-2 promotes proliferation, invasion, and chemoresistance to temozolomide in glioma cells via the integrin β 1-ERK pathway. *Br J Cancer* 2014; 111(7):1400–9. doi: 10.1038/bjc.2014.435.
174. Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L et al. Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther* 2018; 11:2063–73. doi: 10.2147/OTT.S161109.
175. Song SW, Fuller GN, Khan A, Kong S, Shen W, Taylor E et al. Iip45, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGFBP-2 stimulation of glioma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(24):13970–5. doi: 10.1073/pnas.2332186100.
176. Russo VC, Schütt BS, Andaloro E, Ymer SI, Hoeflich A, Ranke MB et al. Insulin-like growth factor binding protein-2 binding to extracellular matrix plays a critical role in neuroblastoma cell proliferation, migration, and invasion. *Endocrinology* 2005; 146(10):4445–55. doi: 10.1210/en.2005-0467.
177. Terrien X, Bonvin E, Corroyer S, Tabary O, Clement A, Henrion Caude A. Intracellular colocalization and interaction of IGF-binding protein-2 with the cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP1/WAF1 during growth inhibition. *Biochem J* 2005; 392(Pt 3):457–65. doi: 10.1042/BJ20050517.
178. Azar WJ, Zivkovic S, Werther GA, Russo VC. IGFBP-2 nuclear translocation is mediated by a functional NLS sequence and is essential for its pro-tumorigenic actions in cancer cells. *Oncogene* 2014; 33(5):578–88. doi: 10.1038/onc.2012.630.

Literatur

179. Azar WJ, Azar SHX, Higgins S, Hu J-F, Hoffman AR, Newgreen DF et al. IGFBP-2 enhances VEGF gene promoter activity and consequent promotion of angiogenesis by neuroblastoma cells. *Endocrinology* 2011; 152(9):3332–42. doi: 10.1210/en.2011-1121.
180. Liu Y, Song C, Shen F, Zhang J, Song SW. IGFBP2 promotes immunosuppression associated with its mesenchymal induction and FcγRIIB phosphorylation in glioblastoma. *PLoS One* 2019; 14(9):e0222999. doi: 10.1371/journal.pone.0222999.
181. Levitt RJ, Georgescu M-M, Pollak M. PTEN-induction in U251 glioma cells decreases the expression of insulin-like growth factor binding protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(4):1056–61. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.229.
182. Perks CM, Vernon EG, Rosendahl AH, Tonge D, Holly JMP. IGF-II and IGFBP-2 differentially regulate PTEN in human breast cancer cells. *Oncogene* 2007; 26(40):5966–72. doi: 10.1038/sj.onc.1210397.
183. Lin Y, Jiang T, Zhou K, Xu L, Chen B, Li G et al. Plasma IGFBP-2 levels predict clinical outcomes of patients with high-grade gliomas. *Neuro Oncol* 2009; 11(5):468–76. doi: 10.1215/15228517-2008-114.
184. Al Qahtani A, Holly J, Perks C. Hypoxia negates hyperglycaemia-induced chemo-resistance in breast cancer cells: the role of insulin-like growth factor binding protein 2. *Oncotarget* 2017; 8(43):74635–48. doi: 10.18632/oncotarget.20287.
185. Biernacka KM, Uzoh CC, Zeng L, Persad RA, Bahl A, Gillatt D et al. Hyperglycaemia-induced chemoresistance of prostate cancer cells due to IGFBP2. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20(5):741–51. doi: 10.1530/ERC-13-0077.
186. Mehrian-Shai R, Chen CD, Shi T, Horvath S, Nelson SF, Reichardt JKV et al. Insulin growth factor-binding protein 2 is a candidate biomarker for PTEN status and PI3K/Akt pathway activation in glioblastoma and prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(13):5563–8. doi: 10.1073/pnas.0609139104.
187. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999; 59(16):3915–8.
188. Dubois V, Couissi D, Schonke E, Rémacle C, Trouet A. Intracellular levels and secretion of insulin-like-growth-factor-binding proteins in MCF-7/6, MCF-7/AZ and MDA-MB-231 breast cancer cells. Differential modulation by estrogens in serum-free medium. *Eur J Biochem* 1995; 232(1):47–53. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20779.x.

Literatur

189. Martin JL, Baxter RC. Expression of insulin-like growth factor binding protein-2 by MCF-7 breast cancer cells is regulated through the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin pathway. *Endocrinology* 2007; 148(5):2532–41. doi: 10.1210/en.2006-1335.
190. Mireuta M, Darnel A, Pollak M. IGFBP-2 expression in MCF-7 cells is regulated by the PI3K/AKT/mTOR pathway through Sp1-induced increase in transcription. *Growth Factors* 2010; 28(4):243–55. doi: 10.3109/08977191003745472.
191. Schütt BS, Langkamp M, Rauschnabel U, Ranke MB, Elmlinger MW. Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J Mol Endocrinol* 2004; 32(3):859–68. doi: 10.1677/jme.0.0320859.
192. Frommer KW, Reichenmiller K, Schutt BS, Hoefflich A, Ranke MB, Dodt G et al. IGF-independent effects of IGFBP-2 on the human breast cancer cell line Hs578T. *J Mol Endocrinol* 2006; 37(1):13–23. doi: 10.1677/jme.1.01955.
193. Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol* 1994; 45(4):649–56.
194. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65(2):157–70. doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
195. Mattioli R, Ilari A, Colotti B, Mosca L, Fazi F, Colotti G. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol Aspects Med* 2023; 93:101205. doi: 10.1016/j.mam.2023.101205.
196. Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol* 2014; 5(3):283–98. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.283.
197. Aysola K, Desai A, Welch C, Xu J, Qin Y, Reddy V et al. Triple Negative Breast Cancer - An Overview. *Hereditary Genet* 2013; 2013(Suppl 2). doi: 10.4172/2161-1041.S2-001.
198. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 13(15 Pt 1):4429–34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045.
199. TEVA GmbH. Doxorubicinhydrochlorid Teva®: Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung; 2022 [Stand: 06.03.2024]. Verfügbar unter: <https://www.fachinfo.de/api/public/fachinfo/pdf/012535>.
200. Fox EJ. Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology* 2004; 63(12 Suppl 6):S15-8. doi: 10.1212/WNL.63.12_suppl_6.S15.

Literatur

201. Fisher GR, Patterson LH. DNA strand breakage by peroxidase-activated mitoxantrone. *J Pharm Pharmacol* 1991; 43(1):65–8. doi: 10.1111/j.2042-7158.1991.tb05455.x.
202. Isabella P de, Palumbo M, Sissi C, Capranico G, Carenini N, Menta E et al. Topoisomerase II DNA cleavage stimulation, DNA binding activity, cytotoxicity, and physico-chemical properties of 2-aza- and 2-aza-oxide-anthracenedione derivatives. *Mol Pharmacol* 1995; 48(1):30–8.
203. Evison BJ, Sleebs BE, Watson KG, Phillips DR, Cutts SM. Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison. *Med Res Rev* 2016; 36(2):248–99. doi: 10.1002/med.21364.
204. MEDA Pharma GmbH & Co. KG. Novantron® 20 mg/10 ml: Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung; 2019 [Stand: 06.03.2024]. Verfügbar unter: <https://www.fachinfo.de/api/public/fachinfo/pdf/022315>.
205. Alderden RA, Hall MD, Hambley TW. The Discovery and Development of Cisplatin. *J. Chem. Educ.* 2006; 83(5):728. doi: 10.1021/ed083p728.
206. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(8):573–84. doi: 10.1038/nrc2167.
207. Helm CW, States JC. Enhancing the efficacy of cisplatin in ovarian cancer treatment - could arsenic have a role. *J Ovarian Res* 2009; 2:1–7. doi: 10.1186/1757-2215-2-2.
208. Ho GY, Woodward N, Coward JIG. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 102:37–46. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.03.014.
209. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; 740:364–78. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
210. TEVA GmbH. Cisplatin Teva®: 1 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung; 2018 [Stand: 06.03.2024]. Verfügbar unter: <https://www.fachinfo.de/api/public/fachinfo/pdf/012558>.
211. Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD et al. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 11):2011–21. doi: 10.1242/jcs.113.11.2011.
212. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull* 2017; 7(3):339–48. doi: 10.15171/apb.2017.041.

Literatur

213. Baltes F, Pfeifer V, Silbermann K, Caspers J, Wantoch von Rekowski K, Schlesinger M et al. β 1-Integrin binding to collagen type 1 transmits breast cancer cells into chemoresistance by activating ABC efflux transporters. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2020; 1867(5):118663. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118663.
214. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(26):15665–70. doi: 10.1073/pnas.95.26.15665.
215. Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z et al. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res* 2004; 64(12):4294–301. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3884.
216. Chen HHW, Kuo MT. Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs* 2010; 2010. doi: 10.1155/2010/430939.
217. Kirschner K, Melton DW. Multiple roles of the ERCC1-XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs. *Anticancer Res* 2010; 30(9):3223–32.
218. Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 2017; 8(5):8921–46. doi: 10.18632/oncotarget.13475.
219. Christowitz C, Davis T, Isaacs A, van Niekerk G, Hattingh S, Engelbrecht A-M. Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model. *BMC Cancer* 2019; 19(1):757. doi: 10.1186/s12885-019-5939-z.
220. Pelicano H, Martin DS, Xu R-H, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25(34):4633–46. doi: 10.1038/sj.onc.1209597.
221. Ma L, Zong X. Metabolic Symbiosis in Chemoresistance: Refocusing the Role of Aerobic Glycolysis. *Front Oncol* 2020; 10:5. doi: 10.3389/fonc.2020.00005.
222. Chen X, Chen S, Yu D. Metabolic Reprogramming of Chemoresistant Cancer Cells and the Potential Significance of Metabolic Regulation in the Reversal of Cancer Chemoresistance. *Metabolites* 2020; 10(7). doi: 10.3390/metabo10070289.
223. Zeng L, Biernacka KM, Holly JMP, Jarrett C, Morrison AA, Morgan A et al. Hyperglycaemia confers resistance to chemotherapy on breast cancer cells: the role of fatty acid synthase. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(2):539–51. doi: 10.1677/ERC-09-0221.
224. Lin J, Xia L, Liang J, Han Y, Wang H, Oyang L et al. The roles of glucose metabolic reprogramming in chemo- and radio-resistance. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38(1):218. doi: 10.1186/s13046-019-1214-z.

Literatur

225. Zhang X-Y, Zhang M, Cong Q, Zhang M-X, Zhang M-Y, Lu Y-Y et al. Hexokinase 2 confers resistance to cisplatin in ovarian cancer cells by enhancing cisplatin-induced autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2018; 95:9–16. doi: 10.1016/j.biocel.2017.12.010.
226. Woo YM, Shin Y, Lee EJ, Lee S, Jeong SH, Kong HK et al. Inhibition of Aerobic Glycolysis Represses Akt/mTOR/HIF-1 α Axis and Restores Tamoxifen Sensitivity in Antiestrogen-Resistant Breast Cancer Cells. *PLoS One* 2015; 10(7):e0132285. doi: 10.1371/journal.pone.0132285.
227. Jiang J-X, Gao S, Pan Y-Z, Yu C, Sun C-Y. Overexpression of microRNA-125b sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to 5-fluorouracil through inhibition of glycolysis by targeting hexokinase II. *Mol Med Rep* 2014; 10(2):995–1002. doi: 10.3892/mmr.2014.2271.
228. Wang Z, Wu S, Chen X, Liang J, Xue F, Cho WC et al. PFKFB3 confers chemoresistance by upregulating ABCG2 transporter in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2023; 12(11):2294–309. doi: 10.21037/tlcr-23-567.
229. Liu Y, He C, Huang X. Metformin partially reverses the carboplatin-resistance in NSCLC by inhibiting glucose metabolism. *Oncotarget* 2017; 8(43):75206–16. doi: 10.18632/oncotarget.20663.
230. Pan C, Wang X, Shi K, Zheng Y, Li J, Chen Y et al. MiR-122 Reverses the Doxorubicin-Resistance in Hepatocellular Carcinoma Cells through Regulating the Tumor Metabolism. *PLoS One* 2016; 11(5):e0152090. doi: 10.1371/journal.pone.0152090.
231. He J, Xie G, Tong J, Peng Y, Huang H, Li J et al. Overexpression of microRNA-122 re-sensitizes 5-FU-resistant colon cancer cells to 5-FU through the inhibition of PKM2 in vitro and in vivo. *Cell Biochem Biophys* 2014; 70(2):1343–50. doi: 10.1007/s12013-014-0062-x.
232. Guo W, Zhang Y, Chen T, Wang Y, Xue J, Zhang Y et al. Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(1):65–72. doi: 10.1007/s00432-010-0860-5.
233. Zhou M, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Liu Z, Fodstad O et al. Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer* 2010; 9:33. doi: 10.1186/1476-4598-9-33.
234. Yan C, Yang F, Zhou C, Chen X, Han X, Liu X et al. MCT1 promotes the cisplatin-resistance by antagonizing Fas in epithelial ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(3):2710–8.
235. So AI, Levitt RJ, Eigl B, Fazli L, Muramaki M, Leung S et al. Insulin-like growth factor binding protein-2 is a novel therapeutic target associated with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(21):6944–54. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0408.

Literatur

236. Hawsawi Y, Humphries MP, Wright A, Berwick A, Shires M, Al-Kharobi H et al. Deregulation of IGF-binding proteins -2 and -5 contributes to the development of endocrine resistant breast cancer in vitro. *Oncotarget* 2016; 7(22):32129–43. doi: 10.18632/oncotarget.8534.
237. Juncker-Jensen A, Lykkesfeldt AE, Worm J, Ralfkiaer U, Espelund U, Jepsen JS. Insulin-like growth factor binding protein 2 is a marker for antiestrogen resistant human breast cancer cell lines but is not a major growth regulator. *Growth Horm IGF Res* 2006; 16(4):224–39. doi: 10.1016/j.ghir.2006.06.005.
238. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res* 2015; 35(6):3147–54.
239. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51(5):1409–16. doi: 10.1093/jnci/51.5.1409.
240. Caroline Gest, Ulrich Joimel, Limin Huang, Linda-Louise Pritchard, Alexandre Petit, Charlene Dulong et al. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines.
241. Nakagawa M, Schneider E, Dixon KH, Horton J, Kelley K, Morrow C et al. Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 1992; 52(22):6175–81.
242. Ross DD, Yang W, Abruzzo LV, Dalton WS, Schneider E, Lage H et al. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(5):429–33. doi: 10.1093/jnci/91.5.429.
243. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53(3):661–74. doi: 10.1093/jnci/53.3.661.
244. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis* 2010; 32(1-2):35–48. doi: 10.3233/BD-2010-0307.
245. Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, Grotzinger KR, Whang-Peng J, Louie KG et al. Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res* 1987; 47(2):414–8.
246. Culture Collections. A2780; 2024 [Stand: 03.01.2024]. Verfügbar unter: <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/a2780>.
247. Culture Collections. A2780ADR; 2024 [Stand: 03.01.2024]. Verfügbar unter: <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/a2780adr>.

Literatur

248. Pick A, Müller H, Wiese M. Structure-activity relationships of new inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg Med Chem* 2008; 16(17):8224–36. doi: 10.1016/j.bmc.2008.07.034.
249. Culture Collections. A2780cis; 2024 [Stand: 03.01.2024]. Verfügbar unter: <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/a2780cis>.
250. Januchowski R, Wojtowicz K, Sujka-Kordowska P, Andrzejewska M, Zabel M. MDR Gene Expression Analysis of Six Drug-Resistant Ovarian Cancer Cell Lines. *BioMed Research International* 2013; 2013:1–10. doi: 10.1155/2013/241763.
251. Wantoch von Rekowski K, König P, Henze S, Schlesinger M, Zawierucha P, Januchowski R et al. Insight into Cisplatin-Resistance Signaling of W1 Ovarian Cancer Cells Emerges mTOR and HSP27 as Targets for Sensitization Strategies. *Int J Mol Sci* 2020; 21(23). doi: 10.3390/ijms21239240.
252. Cambridge Bioscience Limited. Cambridge Bioscience: CASY cell counter; 2020 [Stand: 08.10.2020]. Verfügbar unter: <https://www.bioscience.co.uk/cpl/casy-cell-counter>.
253. Silbermann K, Li J, Namasivayam V, Baltes F, Bendas G, Stefan SM et al. Superior Pyrimidine Derivatives as Selective ABCG2 Inhibitors and Broad-Spectrum ABCB1, ABCC1, and ABCG2 Antagonists. *J Med Chem* 2020; 63(18):10412–32. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00961.
254. Ascensia Diabetes Care Holdings AG. Contour next Blutzuckermesssystem: Bedienungsanleitung [Stand: 15.12.2023]. Verfügbar unter: https://www.diabetes.ascensia.de/siteassets/products/contour-next-new/web90008942_cntrnxt_bw-ug_r07-21.pdf.
255. Okuda-Shimazaki J, Yoshida H, Sode K. FAD dependent glucose dehydrogenases - Discovery and engineering of representative glucose sensing enzymes. *Bioelectrochemistry* 2020; 132:107414. doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107414.
256. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303(2):474–82. doi: 10.1006/abbi.1993.1311.
257. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65(1-2):55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Literatur

258. Seery C. Normal and Diabetic Blood Sugar Level Ranges; 2019 [Stand: 05.01.2024]. Verfügbar unter: https://www.diabetes.co.uk/diabetes_care/blood-sugar-level-ranges.html.
259. Rye C, Wise RR, Jurukovski V, Desaix J-F, Choi JH, Avissar Y. Biology. Houston, Texas: OpenStax College, Rice University; 2017. (Open textbook library).
260. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol. Unserer Zeit* 2007; 37(2):120–6. doi: 10.1002/biuz.200610332.
261. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* 1997; 245(2):154–60. doi: 10.1006/abio.1996.9916.
262. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry* 1988; 175(1):231–7. doi: 10.1016/0003-2697(88)90383-1.
263. Rivero-Gutiérrez B, Anzola A, Martínez-Augustín O, Medina FS de. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Analytical biochemistry* 2014; 467:1–3. doi: 10.1016/j.ab.2014.08.027.
264. Posch A, Kohn J, Oh K, Hammond M, Liu N. V3 stain-free workflow for a practical, convenient, and reliable total protein loading control in western blotting. *J Vis Exp* 2013; (82):50948. doi: 10.3791/50948.
265. Reinard T. *Molekularbiologische Methoden 2.0. 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; 2018. (UTB Biologie, Molekularbiologie, Biochemie; Bd. 8449).
266. Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol* 1999; 11(1):37–53. doi: 10.1007/BF02789175.
267. Bean JF, Qiu Y-Y, Yu S, Clark S, Chu F, Madonna MB. Glycolysis inhibition and its effect in doxorubicin resistance in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2014; 49(6):981-4; discussion 984. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.01.037.
268. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007; 2(2):329–33. doi: 10.1038/nprot.2007.30.
269. O’Keefe EP. siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. *MATER METHODS* 2013; 3. doi: 10.13070/mm.en.3.197.

Literatur

270. Khan MA, Zubair H, Anand S, Srivastava SK, Singh S, Singh AP. Dysregulation of metabolic enzymes in tumor and stromal cells: Role in oncogenesis and therapeutic opportunities. *Cancer Lett* 2020; 473:176–85. doi: 10.1016/j.canlet.2020.01.003.
271. Uzoh CC, Holly JMP, Biernacka KM, Persad RA, Bahl A, Gillatt D et al. Insulin-like growth factor-binding protein-2 promotes prostate cancer cell growth via IGF-dependent or -independent mechanisms and reduces the efficacy of docetaxel. *Br J Cancer* 2011; 104(10):1587–93. doi: 10.1038/bjc.2011.127.
272. Bhattacharya B, Low SHH, Soh C, Kamal Mustapa N, Belouèche-Babari M, Koh KX et al. Increased drug resistance is associated with reduced glucose levels and an enhanced glycolysis phenotype. *Br J Pharmacol* 2014; 171(13):3255–67. doi: 10.1111/bph.12668.
273. Thakkar NS, Potten CS. Inhibition of doxorubicin-induced apoptosis in vivo by 2-deoxy-D-glucose. *Cancer Res* 1993; 53(9):2057–60.
274. Colofiore JR, Ara G, Berry D, Belli JA. Enhanced survival of adriamycin-treated Chinese hamster cells by 2-deoxy-D-glucose and 2,4-dinitrophenol. *Cancer Res* 1982; 42(10):3934–40.
275. Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett* 2001; 173(1):83–91. doi: 10.1016/s0304-3835(01)00667-x.
276. Ho N, Morrison J, Silva A, Coomber BL. The effect of 3-bromopyruvate on human colorectal cancer cells is dependent on glucose concentration but not hexokinase II expression. *Biosci Rep* 2016; 36(1):e00299. doi: 10.1042/BSR20150267.
277. Lima Junior EA de, Yamashita AS, Pimentel GD, Sousa LGO de, Santos RVT, Gonçalves CL et al. Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPk signalling in skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2016; 7(5):615–25. doi: 10.1002/jcsm.12104.
278. Sullivan EJ, Kurtoglu M, Brenneman R, Liu H, Lampidis TJ. Targeting cisplatin-resistant human tumor cells with metabolic inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 73(2):417–27. doi: 10.1007/s00280-013-2366-8.
279. Wangpaichitr M, Wu C, Li YY, Nguyen DJM, Kandemir H, Shah S et al. Exploiting ROS and metabolic differences to kill cisplatin resistant lung cancer. *Oncotarget* 2017; 8(30):49275–92. doi: 10.18632/oncotarget.17568.
280. El Hassouni B, Franczak M, Capula M, Vonk CM, Gomez VM, Smolenski RT et al. Lactate dehydrogenase A inhibition by small molecular entities: steps in the right direction. *Oncoscience* 2020; 7(9-10):76–80. doi: 10.18632/oncoscience.519.

Literatur

281. Sang R, Fan R, Deng A, Gou J, Lin R, Zhao T et al. Degradation of Hexokinase 2 Blocks Glycolysis and Induces GSDME-Dependent Pyroptosis to Amplify Immunogenic Cell Death for Breast Cancer Therapy. *J Med Chem* 2023; 66(13):8464–83. doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c00118.

Anhang
Tabellenverzeichnis

8. Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	34
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	36
Tabelle 3: Verwendete Primer	38
Tabelle 4: Verwendete Antikörper.....	39
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	40
Tabelle 6: Hergestellte Lösungen, Zellkulturmedien, Reagenzien und Puffer	43
Tabelle 7: Verwendete Software.....	46
Tabelle 8: Verwendete Verdünnungsreihen der getesteten Substanzen. Angegeben sind die Potenzen für eine Konzentration in mol/l. Mito: Mitoxantron, Doxo: Doxorubicin, CDDP: Cisplatin, 3-BrPA: 3-Bromopyruvat, 2-DG: 2-Deoxyglucose	56
Tabelle 9: Ablauf der RT-qPCR. Dabei wird der im Kasten eingeschlossene Komplex aus Denaturierung, Annealing & Elongation 50-mal wiederholt. Die Fluoreszenz wird am Ende jeder Elongationsphase und während der Bestimmung des Schmelzpunktes nach jeder Temperaturerhöhung gemessen.	60

Anhang
Formelverzeichnis

8.2 Formelverzeichnis

Formel 1: Formel zur Berechnung des Resistenzfaktors	57
Formel 2: Berechnung des Δ Ct-Werts.	61
Formel 3: Berechnung des $\Delta \Delta$ Ct-Werts.	61
Formel 4: Berechnung der relativen Genexpression aus dem $\Delta \Delta$ Ct-Wert.	62
Formel 5: Berechnung des Beladungsfaktors mittels der Gesamtproteinmengen aus der stain free-Messung.....	66
Formel 6: Berechnung der relativen Zielproteinmenge.....	66

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gegenüberstellung der aeroben und der anaeroben Zellatmung. Erstellt mit BioRender.com.	4
Abbildung 2: Übersicht über die Glykolyse. Die regulatorischen Schritte sind fett markiert. Da aus einem Glucosemolekül zwei Glycerinaldehyd-3-phosphat werden, laufen die Reaktionen in der unteren Hälfte zwei Mal ab. Nach Clark et al. (22)	5
Abbildung 3: Verknüpfung von Zwischenprodukten der Glykolyse mit anderen Stoffwechselwegen (nicht stöchiometrisch). Mittels NAD ⁺ -Regenerierung durch die Lactatsynthese ist ein fortlaufender Kreislauf bei zuströmender Glucose möglich. Erstellt mit BioRender.com basierend auf (17, 30).7	7
Abbildung 4: Ursprüngliche und neue hallmarks of cancer (15, 32). Erstellt mit BioRender.com . 8	8
Abbildung 5: Die Hexokinase katalysiert die Übertragung eines Phosphatrests von ATP auf Glucose. Erstellt mit BioRender.com	11
Abbildung 6: Die Phosphofruktokinase 1 katalysiert die Übertragung eines Phosphatrests von ATP auf Fructose-6-phosphat. Erstellt mit BioRender.com.....	14
Abbildung 7: Die Pyruvatkinase katalysiert die Übertragung eines Phosphatrests von Phosphoenolpyruvat auf ADP. Erstellt mit BioRender.com.....	15
Abbildung 8: Übersichtsabbildung über einen Ausschnitt der Wirkmechanismen von Bromopyruvat im Kontext dieser Arbeit. Erstellt mit BioRender.com	20
Abbildung 9: Übersicht über die durch IGFBP-2 ausgelösten Effekte basierend auf Li 2020 (163) und Yau 2015 (165)	25
Abbildung 10: Strukturformeln der verwendeten Zytostatika. Von links nach rechts: Doxorubicin, Mitoxantron, Cisplatin	27
Abbildung 11: Übersicht über verschiedene Resistenzmechanismen. Symbole erstellt mit BioRender.com	28
Abbildung 12: Einfluss von Glucose auf den Tumorstoffwechsel und die Zytostatikaresistenz. Erstellt mit BioRender.com. Basierend auf Lin und Qiu (19, 224).	30
Abbildung 13: Reduktion von MTT zu einem violetten Formazan durch Reduktionsprozesse lebender Zellen.....	54
Abbildung 14: Schematischer Ablauf eines MTT-Assays. Erstellt mit BioRender.com.....	55
Abbildung 15: Schematischer Ablauf der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion mit vorgeschalteter reverser Transkription. (Zeitachse nicht maßstabsgetreu). Denaturierung, Annealing und Elongation bilden einen Zyklus, der mehrfach wiederholt wird.	59
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Proteinquantifizierung mittels Gelelektrophorese und Western Blot. Erstellt mit BioRender.com.	63
Abbildung 17: Detektionsprinzip des ELISA. Erstellt mit BioRender.com.	67
Abbildung 18: Schematische Darstellung eines Migrationsassays. Erstellt mit BioRender.com ..	71

Anhang Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: Schematische Darstellung eines transienten Knockdowns mittels siRNA. Erstellt mit BioRender.com.....	74
Abbildung 20: IGFBP-2 von MCF-7-Zellen gewachsen bei 4,5 g/l Glucose im Vergleich zu 1,0 g/l Glucose.....	77
Abbildung 21: IGFBP-2-Gehalt der MCF-7-Zellen im Vergleich zu MCF-7 MX-Zellen.....	78
Abbildung 22: Einfluss der Glucosekonzentration und von exogenem IGFBP-2 auf die Migration von MCF-7-Zellen.....	79
Abbildung 23: Einfluss von Glucose und IGFBP-2 auf das Migrationsverhalten von MDA-MB-231-Zellen.	80
Abbildung 24: Fotos einer beispielhaften Migrationsmessung der MDA-MB-231-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. A: 4,5 g/l Glucose, B: 4,5 g/l Glucose + 100 ng/ml IGFBP-2, C: 1,0 g/l Glucose.....	81
Abbildung 25: Widerstandsfähigkeit der MDA-MB-231-Zellen gegenüber Doxorubicin, angegeben als EC ₅₀ , in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration und IGFBP-2 (100 ng/ml).....	82
Abbildung 26 Einfluss von IGFBP-2, Mitoxantron (Mito), und IGFBP-2 in Kombination mit Mitoxantron auf die Viabilität von MCF-7-Zellen.....	83
Abbildung 27: Relative IGFBP-2-Proteinexpression nach siRNA-vermitteltem-Knockdown.....	84
Abbildung 28: Links: Effekte von unterschiedlichen Behandlungen bei MCF-7-scrambled- und Knockdown-Zellen. Rechts: Vergleich der Viabilität der scrambled- und der Knockdown-Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen.....	85
Abbildung 29: Glucoseverbrauch kultivierter Ovarialkarzinom-Zellen mit unterschiedlichen Resistenzverhalten in Abhängigkeit von der Zeit. Ausgewertet mittels 2-Way-ANOVA. Dieser berücksichtigt bei der Berechnung der Signifikanzen zwischen zwei Messpunkten der beiden Zelllinien zu einem Zeitpunkt immer auch den Unterschied zwischen den Zelllinien zu anderen Zeitpunkten. Die beiden dargestellten Signifikanzen in der linken Abbildung sind zwischen A2780- und A2780ADR-Zellen.	88
Abbildung 30: Viabilität der Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration. Ausgewertet mittels 2-Way-ANOVA. Die Signifikanzen in der linken Abbildung sind bei 1,5 g/l Glucose zwischen A2780- und A2780ADR-Zellen und bei 1,0 g/l zwischen A2780-Zellen und A2780ADR-Zellen bzw. A2780-Zellen und A2780cis-Zellen.	89
Abbildung 31: Viabilität in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration bei MDA-MB-231-Zellen.	89
Abbildung 32: Dargestellt sind die EC ₅₀ -Werte gegenüber 2-Deoxyglucose in A2780-, A2780ADR- und A2780cis-Zellen.	90
Abbildung 33: Darstellung der EC ₅₀ -Werte von 3-BrPA in den unterschiedlichen Zelllinien. Dargestellt sind nur relevante Signifikanzen.....	91

Anhang
Abbildungsverzeichnis

Abbildung 34: Repräsentative Bestimmung einer EC ₅₀ von 3-BrPA mittels MTT-Assay. Markiert ist die höchste vermessene Konzentration 10 ^{-4,75} M (=17,78 µM) bei der die parentale Zelllinie A2780 noch nicht in ihrem Wachstum durch die 3-BrPA-Zugabe eingeschränkt war.....	92
Abbildung 35: Untersuchung auf Kombinationseffekte der Zytotoxizität einer Doxorubicin- und 3-BrPA-Behandlung von MDA-MB-231-Zellen.....	93
Abbildung 36: Untersuchung auf Kombinationseffekte von einer Doxorubicin- und 3-BrPA-Behandlung von A2780- und A2780ADR-Zellen.....	94
Abbildung 37: Untersuchung auf Kombinationseffekte der Zytotoxizität einer Cisplatin (CDDP)- und 3-BrPA-Behandlung von A2780- und A2780cis-Zellen. Bei den A2780-Zellen war jegliche Kombination aus 3-BrPA und Cisplatin signifikant besser als die Einzelbehandlung mit 3-BrPA, bei den A2780cis war nur die Kombinationsbehandlung mit 10 µM Cisplatin besser als die Einzelbehandlung mit 3-BrPA.....	95
Abbildung 38: Untersuchung auf Kombinationseffekte einer Cisplatin (CDDP)- und 3-BrPA-Behandlung von W1- und W1CR-Zellen hinsichtlich Zytotoxizität. Jegliche Kombination aus Zytostatikum und 3-BrPA war signifikant besser als die Einzelbehandlung mit 3-BrPA.....	95
Abbildung 39: Bestimmung der EC ₅₀ eines Zytostatikums bei der Kombinationsbehandlung mit 3-BrPA in den untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien.....	96
Abbildung 40: mRNA-Expressionslevel der regulatorischen Enzyme der Glykolyse in A2780-, A2780ADR- und A2780cis-Zellen.....	98
Abbildung 41: mRNA-Expressionslevel der regulatorischen Enzyme der Glykolyse in W1- und W1CR-Zellen.....	99
Abbildung 42: Relative Proteinexpression der regulatorischen Glykolyseenzyme sowie von LDH-A und MCT1 in A2780-, A2780ADR- und A2780cis-Zellen.....	100
Abbildung 43: Relative Proteinexpression der regulatorischen Glykolyseenzyme sowie von LDH-A und MCT1 in den W1- und W1CR-Zellen.....	101
Abbildung 44: Relative Proteinexpression der regulatorischen Glykolyseenzyme sowie von LDH-A und MCT1 in den parental Zelllinien A2780, W1 und MDA-MB-231.....	102
Abbildung 45: Doxorubicin-induziertes, relatives Fluoreszenzsignal in MDA-MB-231-Zellen (links) und A2780ADR-Zellen (rechts).....	104
Abbildung 46: Relative HXK2-Expression im Verhältnis zur jeweiligen scrambled-Kontrolle.....	105
Abbildung 47: Resistenzfaktor der HXK2-Knockdown-Zellen gegenüber Doxorubicin.....	106
Abbildung 48: Resistenzfaktor der HXK2-Knockdown-Zellen gegenüber Cisplatin.....	106
Abbildung 49: Resistenzfaktor der HXK2-Knockdown-Zellen gegenüber 3-BrPA.....	107

8.4 Danksagung

Mein Dank geht zuallererst an meinen Betreuer Prof. Dr. Gerd Bendas für den Freiraum sich wissenschaftlich entfalten zu können. Danke für die offene, kollegiale Diskussionskultur und die jederzeit offene Tür.

PD Dr. Anke Schiedel danke ich herzlich für die Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit sowie für die hervorragende Organisation des 1. Semesterpraktikums, in dem ich tätig war.

Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Prof. Dr. Hanns Häberlein danke ich für Ihre Tätigkeit in der Promotionskommission.

Ich danke meinen Masteranden Leon Bade und Jenushan Jeyapalan für die Zusammenarbeit, das Teamwork und die konstruktiven Diskussionen in nicht immer allzu einfachen Laborzeiten. Unsere gemeinsame Zeit habe ich sehr genossen.

Danken möchte ich außerdem den technischen Assistenten unserer Arbeitsgruppe dafür, dass sie durch ihre Unterstützung und organisatorischen Tätigkeiten die Forschung erst ermöglicht haben. Besonders hervorzuheben sind dabei Svenja Henze und Ramona Menden für ihre Unterstützung und Expertise bei Western Blot- und PCR-Experimenten.

Philipp König danke ich für die langjährige Unterstützung, sowohl schon im Studium als auch zu Zeiten der Dissertation, und dass ich mich in schwierigen Zeiten immer auf seinen Beistand verlassen konnte.

Weiterhin danke ich Katrin Nekipelov, Irina Honin, Linda Schäker Hübner sowie den vielen netten Kollegen der gesamten Arbeitsgruppe Pharmazeutische und Zellbiologische Chemie für eine tolle gemeinsame Zeit.

Abschließend möchte ich meinen Freunden und meiner Familie für die stete Unterstützung und für das Ermöglichen meines Werdegangs und dieser Arbeit danken.