

**Die Bedeutung der nutritiven Kohlenhydrate
für die Pathogenese und experimentelle Therapie
des Hepatozellulären Karzinoms**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich der Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Ines Rudolph

aus Naumburg/Saale

August 2014

Die vorliegende Arbeit wurde an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, in der Arbeitsgruppe „Hypoxie und maligne Progression“ von Prof. Dr. Thorsten Cramer angefertigt. Die Anfertigung der vorliegenden Arbeit erfolgte von April 2010 bis August 2014.

Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Cramer
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 16.12.2014

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thorsten Cramer, der mir die Gelegenheit gegeben hat, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe „Hypoxie und maligne Progression“ anzufertigen. Seine exzellente Betreuung und Hilfestellung sowie die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft haben diese Promotion in ihrer Form möglich gemacht.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel vom Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin danke ich für die Übernahme des internen Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. Bertram Wiedenmann danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion an der Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum der Charité, anfertigen zu können.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Loddenkemper für die fachliche Unterstützung bei der Analyse der Leberhistologien. Darüber hinaus danke ich der AG Hübner vom Max-Delbrück-Zentrum in Berlin für die umfangreiche Untersuchung meiner Transkriptomanalysen.

Ein Dankeschön gilt auch meinen Kollegen der Arbeitsgruppe „Hypoxie und maligne Progression“, die immer Diskussionsbereitschaft zeigten. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei Nadine Rohwer, die sehr viel wertvolle Zeit in das Korrekturlesen meiner Arbeit investiert hat. Auch ihre wissenschaftliche Unterstützung und die vielen unbezahlbaren Ratschläge haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein herzlicher Dank geht auch an meine Familie und meine Freunde, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten. Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester, die auch in schweren Zeiten immer für mich da waren und mir bedingungslosen Rückhalt gaben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Krebs	1
1.1.1 Der Metabolismus als ein zentrales Charakteristikum von Tumorzellen	3
1.1.1.1 Die Glykolyse als ein zentraler Bestandteil des Tumormetabolismus	4
1.1.1.1.1 Der Glykolysehemmer 2-Deoxy-D-Glukose.....	6
1.1.2 Der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor 1 (Hif-1)	8
1.1.2.1 Struktureller Aufbau von Hif-1	9
1.1.2.2 Sauerstoffabhängige und -unabhängige Regulation von Hif-1 α	10
1.1.2.2.1 Sauerstoffabhängige Regulation	10
1.1.2.2.2 Sauerstoffunabhängige Regulation	11
1.1.3 Das Phänomen der Chemotherapieresistenz	12
1.2 Das Hepatozelluläre Karzinom	13
1.2.1 Ätiologie und Risikofaktoren	13
1.2.2 Behandlungsmöglichkeiten des HCC	14
1.2.2.1 Kurative Behandlungsformen.....	14
1.2.2.2 Palliative Behandlungsformen.....	15
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Eukaryotische Zelllinien und verwendete Medien	18
2.1.1.1 Ursprungszellen.....	18
2.1.1.2 Funktionelle Inaktivierung von Hif-1 α in Zellen.....	18
2.1.1.3 Herstellung 2-Deoxy-D-Glukose-resistenter Hep G2- und SK-HEP-1-Zellen....	18
2.1.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze	19
2.1.2 Primäre und sekundäre Antikörper	20
2.1.3 Primer	21
2.1.4 Puffer und Lösungen	22
2.1.5 Kits.....	24
2.1.6 Größenstandards	24
2.1.7 Geräte	24
2.1.8 Statistik	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	26
2.2.1.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur	26
2.2.1.2 Wachstumsanalysen.....	27
2.2.1.2.1 Proliferationsassay unter Standardglukosekonzentrationen	27

2.2.1.2.2	Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration von 2-DG.....	27
2.2.1.2.3	Proliferationassay unter glukosereduzierten Bedingungen mit 2-DG.....	28
2.2.1.3	Zellzyklusanalysen.....	28
2.2.1.4	Transiente Transfektion und <i>Dual-Luciferase-Assay</i>	29
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.2.1	RNA-Isolation aus Zellen und Konzentrationsbestimmung.....	30
2.2.2.2	cDNA-Synthese.....	30
2.2.2.3	Isolation genomischer DNA für Genotypisierung.....	31
2.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	31
2.2.2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung der Versuchstiere.....	31
2.2.2.4.2	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR.....	32
2.2.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	33
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	33
2.2.3.1	Isolation von Kernextrakten aus HCC-Zelllinien.....	33
2.2.3.2	Isolation von Gesamtprotein aus Gewebeproben.....	34
2.2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode.....	35
2.2.3.4	Detektion von Proteinen.....	35
2.2.3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	35
2.2.3.4.2	Western-Blot.....	36
2.2.3.4.3	Immundetektion der Proteine.....	36
2.2.3.4.4	Strippen von Membranen.....	37
2.2.4	Tierexperimentelle Methoden.....	37
2.2.4.1	Versuchstiere und Haltung.....	37
2.2.4.2	Behandlung der Versuchstiere.....	38
2.2.4.3	Probenentnahme.....	40
2.2.5	Immunhistologie.....	41
2.2.5.1	Einbetten der Gewebeproben in Paraffin.....	41
2.2.5.2	Herstellung von Gewebeschnitten.....	41
2.2.5.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	41
2.2.5.4	Analyse der Tumorlast durch die Verwendung von ImageJ.....	42
3	Ergebnisse.....	43
3.1	<i>In-vitro</i>-Analyse zweier Leberkrebszelllinien nach Behandlung mit 2-DG.....	43
3.1.1	Analyse des Proliferationsverhaltens.....	43
3.1.2	Zellzyklusanalyse der HCC-Zelllinien.....	44
3.1.3	Analyse der Expression von Hif-1 α	46
3.1.3.1	Analyse der Hif-1 α -Proteinexpression mittels Western-Blot.....	46
3.1.3.2	Analyse von Hif-1-Zielgenen.....	46
3.1.4	Proliferationsanalyse Hif-1 α -defizienter Zellen.....	47
3.1.5	Die Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums.....	48
3.2	Analyse der Tumorprogression im ASV-B-Mausmodell nach Behandlung mit 2-DG.....	50
3.2.1	Auswertung der Parameter Körpergewicht und Lebergewicht.....	50
3.2.2	Histologische Analyse der 2-DG-behandelten ASV-B-Tiere.....	51
3.2.2.1	Etablierung einer geeigneten Methode zur Bestimmung der Tumorlast <i>in vivo</i>	51
3.2.2.2	Bestimmung der Tumorareale.....	52

3.3 Verringerung der Glukosekonzentration zur Optimierung der Wirksamkeit von 2-DG <i>in vitro</i>	53
3.3.1 Die Auswirkungen einer Glukoseresriktion und 2-DG-Behandlung <i>in vitro</i>	53
3.3.1.1 Analyse des Proliferationsverhaltens	53
3.3.1.2 Zellzyklusanalyse der HCC-Zelllinien	54
3.3.1.3 Analyse der Expression von ER-Stress-Chaperonen	56
3.4 <i>In-vivo</i>-Analyse der ASV-B-Mäuse nach Glukoseresriktion und 2-DG-Behandlung	57
3.4.1 <i>In-vivo</i> -Analyse der ASV-B-Adenom-Mäuse	57
3.4.1.1 Analyse des Körpergewichts der einzelnen Versuchsgruppen	58
3.4.1.2 Histologische Analyse der Tumorlast	59
3.4.1.3 Analyse der Mobilität von WT-Tieren bei Fütterung von 15%-KH-Futter	61
3.4.1.4 Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen der tumorhemmenden Wirkung	62
3.4.2 <i>In-vivo</i> -Analysen der ASV-B-HCC-Mäuse	65
3.4.2.1 Überlebensrate der ASV-B-HCC-Mäuse	65
3.4.2.2 Bestimmung der Blutglukose	66
3.4.2.3 Bestimmung der Parameter AST und ALT als Maß der Leberschädigung	66
3.4.2.4 Histologische Analyse der HCC-Tiere	68
3.5 Erzeugung und Untersuchung 2-DG-resistenter Zellen	69
3.5.1 Das Proliferationsverhaltens der resistenten Zellen.....	69
3.5.2 Analyse der resistenzvermittelnden Mechanismen	71
3.5.2.1 Untersuchung der Glukoseaufnahme.....	71
3.5.2.2 Regulation der Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums	73
3.5.2.3 Analyse der Expression von Hif-1 α	73
3.5.2.3.1 Analyse der Hif-1 α -Proteinexpression mittels Western-Blot	74
3.5.2.3.2 Analyse der Genexpression von <i>HIF1A</i> und des Zielgens <i>CA9</i>	74
3.5.2.3.3 Bestimmung der Hif-1-Aktivität mittels Luciferase-Reporter-Assay.....	75
4 Diskussion	77
4.1 Die Wirkmechanismen von 2-DG unter Standardglukosekonzentrationen <i>in vitro</i>	77
4.1.1 Proliferation der HCC-Zelllinien	77
4.1.2 Zellzyklusanalysen der Hep G2- und SK-HEP-1-Zellen.....	78
4.1.3 Vermittelt das Hif-1-Protein die Resistenz gegenüber 2-DG?	78
4.1.4 Die Induktion von ER-Stress-Genen <i>in vitro</i>	79
4.2 Auswirkung einer 2-DG-Behandlung auf das Tumorwachstum des transgenen HCC-Mausmodells <i>in vivo</i>	81
4.3 Analyse der 2-DG-Wirkmechanismen bei Glukoseresriktion <i>in vitro</i>	83
4.3.1 Proliferationsverhalten beider HCC-Zelllinien	83
4.3.2 Zellzyklusuntersuchungen der Hep G2- und SK-HEP-1-Zellen.....	83
4.3.3 Die Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums	84
4.4 Die Auswirkungen der Glukoseresriktion und 2-DG-Behandlung auf das Tumorwachstum im transgenen HCC-Mausmodell <i>in vivo</i>	85
4.4.1 <i>In-vivo</i> -Analyse der ASV-B-Adenom-Tiere	86

4.4.1.1	Untersuchung des Körpergewichts sowie Bestimmung der Tumorlast und der allgemeinen Fitness	86
4.4.1.2	Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen der antiproliferativen Wirkung der Glukoserestriktion	89
4.4.2	<i>In-vivo</i> -Analyse der ASV-B-HCC-Tiere	95
4.5	Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber 2-DG.....	96
4.5.1	Analyse des Wachstumsverhaltens beider resistenter Zelllinien.....	96
4.5.2	Analyse der resistenzvermittelnden Mechanismen	97
4.6	Klinische Relevanz und Ausblick.....	103
4.6.1	Kohlenhydratreduktion – Tumorprävention oder Tumorthherapie?	104
4.6.2	Die Identifikation möglicher resistenzvermittelnder Mechanismen als Ziel für die Therapie resistenter Tumorzellen?	106
5	Zusammenfassung.....	108
6	Summary.....	109
	Literaturverzeichnis	110
	Publikationen und Kongressbeiträge	142
	Anhang.....	144

Abkürzungsverzeichnis

Actb	β -Aktin, Haushaltsgen
Akt	<i>v-akt murin thyoma viral oncogene homolog</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
Arnt	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
bHLH	<i>Basic-Helix-Loop-Helix</i>
bidest.	zweifach destilliert
Ca9	karbonische Anhydrase IX
Calr	Calreticulin
Crebbp	CREB Bindeprotein
2-DG	2-Deoxy-D-Glukose
2-DG-6-P	2-Deoxy-D-Glukose-6-phosphat
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
Ep300	E1A Bindeprotein p300
ER	Endoplasmatisches Retikulum
18F-FDG-PET	¹⁸ F-fluorodeoxy-D-Glukose Positronen-Emissions-Tomografie
FBP	Fruktose-1,6-bisphosphatase
FDG	Fluorodeoxy-d-Glukose
5-FU	5-Fluorouracil
G6pc	katalytische Untereinheit der Glukose-6-phosphatase
Glut	Glukosetransporter
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
Hep G2 _R	resistente Hep G2-Zellen
HIF-	funktionelle Inaktivierung des Hif-1 α in Zellen
Hif-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HIF-KO	funktionelle Inaktivierung des Hif-1 α in Mäusen
Hk2	Hexokinase 2
HRE	<i>hypoxia-response element</i>

Hspa5	<i>heat shock 70kDa protein 5</i>
Hsp90b1	<i>heat shock protein 90kDa beta; member 1</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Igf	insulinähnlicher Wachstumsfaktor
Igfr	insulinähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor
Insr	Insulinrezeptor
kDa	Kilodalton
KH	Kohlenhydrate
Kras	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LLO	<i>Lipid-Linked-Oligosaccharide</i>
Mapk	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Map2k	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
Mdr1	<i>multidrug resistance gene</i> , P-Glykoprotein
Mtor	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
Myc	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAFLD	nichtalkoholische Fettlebererkrankungen
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
P53	Tumorpotein 53
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
Pck2	Phosphoenolpyruvatkarboxykinase 2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pgi	Phosphoglukose-Isomerase
Pgk	Phosphoglycerat-Kinase
pH _e /pH _i	pH-Wert extrazellulär/intrazellulär
Pi3k	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pml	<i>promyelocytic leukemia</i>
Pten	Phosphatase- und-Tensin-Homolog
qPCR	quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
Ras	<i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Raf	Raf Proto-Onkogene
RNAi	RNA-Interferenz
Rpskb1	ribosomale Protein-S6-Kinase, 70kDa, Polypeptid 1
Rps6ka	ribosomale Protein-S6-Kinase, 90kDa

Rtk	Rezeptortyrosinkinasen
SCR	<i>scrambled</i> , Zellen die eine nicht-kodierende shRNA tragen
SDS	Natriumlaurylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SK-HEP-1 _R	resistente SK-HEP-1-Zellen
SV40IT	<i>Simian Virus large T</i>
TP53	P53, Tumorprotein 53
UPR	<i>unfolded protein response</i>
Vhl	Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor, E3 Ubiquitinproteinligase
Yy1	YY1 Transkriptionsfaktor

Schreibweisenkursiv klein (z. B. *Hif1a*)

murines Gen

kursiv groß (z. B. *HIF1A*)

humanes Gen

normal klein (z. B. Hif-1)

murines/humanes Gen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Glykolyse	7
Abb. 2: Proteinstruktur des humanen Hif-1 α	9
Abb. 3: Regulation von Hif-1 durch Onkoproteine und Tumorsuppressoren	11
Abb. 4: Zeitabhängige Proliferationshemmung bei Behandlung mit 2-DG	43
Abb. 5: Dosisabhängige Proliferationshemmung bei 2-DG-Behandlung	44
Abb. 6: Zellzyklusverteilung der Hep G2- und SK-HEP-1 Zellen nach Behandlung mit 2-DG.....	45
Abb. 7: Hif-1 α -Proteinexpression nach 6- und 16-stündiger Behandlung mit 2-DG.....	46
Abb. 8: Genexpressionsanalysen bekannter Hif-1-Zielgene nach 2-DG-Behandlung	47
Abb. 9: Proliferationsanalysen der Hif-1 α -defizienten Zellen bei 2-DG-Behandlung.....	48
Abb. 10: Genexpression von <i>CALR</i> , <i>HSPA5</i> und <i>HSP90B1</i> bei 2-DG-Behandlung	49
Abb. 11: Körpergewicht und Lebergewicht der ASV-B-Tiere nach 2-DG-Behandlung	50
Abb. 12: Lebergewicht-Körpergewicht-Quotient nach 2-DG-Behandlung	51
Abb. 13: Histologische Analyse der Tumorlast	52
Abb. 14: Zellteilungsraten bei Inkubation in glukosereduziertem Medium und 2-DG- Behandlung.....	54
Abb. 15: Verteilung der Zellen im Zellzyklus am Beispiel von Hep G2.....	55
Abb. 16: Genexpression von <i>CALR</i> , <i>HSPA5</i> und <i>HSP90B1</i> bei Wachstum im glukosereduzierten Medium	56
Abb. 17: Versuchsablauf bei Gabe von 15%-KH-Futter und 2-DG	58
Abb. 18: Gewichtsverlauf bei Fütterung des 15%-KH-Futters.....	59
Abb. 19: Tumorlast der ASV-B-Tiere bei Fütterung des 15%-KH-Futters	60
Abb. 20: Tumorlast der Hif-1 α -WT-Tiere bei Fütterung von 15%-KH-Futter	60
Abb. 21: Versuchsablauf bei freiwilliger Aktivität durch Laufradnutzung	61
Abb. 22: Gesamtstrecke und durchschnittliche Laufgeschwindigkeit	62
Abb. 23: Proteinexpression der murinen Amp-Kinase und der murinen Rps6kb1	63
Abb. 24: Proteinexpression der murinen Map-Kinasen 1 und 3	64
Abb. 25: Blutglukose der ASV-B-Tiere.....	64
Abb. 26: Sterberaten der ASV-B-Tiere bei zweiwöchiger Fütterung mit 15%-KH-Futter	65
Abb. 27: Blutglukose der ASV-B-Tiere bei Fütterung des 15%-KH-Futters.....	66
Abb. 28: AST und ALT als Maß für die Leberschädigung	67
Abb. 29: De-Ritis-Quotient der ASV-B-Tiere.....	68
Abb. 30: Hämatoxylin- und Eosin-gefärbte murine Leberhistologien.....	69
Abb. 31: Ermittlung der IC ₅₀ (2-DG) der resistenten Zellen	70

Abb. 32: Proliferationsverhalten der SK-HEP-1 _R im Vergleich zu SK-HEP-1-WT.....	70
Abb. 33: Genexpression von <i>GLUT1</i> in resistenten HCC-Zellen.....	72
Abb. 34: Analyse der Glukoseaufnahme der 2-DG-resistenten Zellen.....	72
Abb. 35: Genexpression von ER-Stress-Chaperonen in resistenten Zellen.....	73
Abb. 36: Hif-1 α -Proteinexpression der resistenten HCC-Zellen.....	74
Abb. 37: Genexpression von <i>CA9</i> in resistenten HCC-Zellen.....	74
Abb. 38: Genexpression von <i>HIF1A</i> in resistenten Zellen.....	75
Abb. 39: Luciferase-Aktivitätsmessung der resistenten Zellen.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verschiedene Kanzerogene und die dadurch hervorgerufenen Tumoren	2
Tabelle 2: Auswahl einiger glykolyserelevanter Onkoproteine und Tumorsuppressoren.....	5
Tabelle 3: Primäre Antikörper	20
Tabelle 4: Sekundärer Antikörper	20
Tabelle 5: Expression von <i>CALR</i> , <i>HSPA5</i> und <i>HSP90B1</i> bei 2-DG-Behandlung	49
Tabelle 6: Prozentuale Zusammensetzung und kJ-%-Zusammensetzung des Standard- und 15%-KH-Futters	57

1 Einleitung

In Deutschland stellen Krebserkrankungen neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar (1). Tumoren (Geschwülste) sind im weitesten Sinn als jede Art von Gewebsschwellungen definiert. Im engeren Sinn versteht man darunter Gewebsneubildungen (Neoplasien), unabhängig davon, ob diese Neoplasien gutartigen (benignen) oder bösartigen (malignen) Charakters sind. Als Krebs werden hingegen nur maligne Tumoren definiert.

1.1 Krebs

Im Gegensatz zu den benignen Veränderungen besitzen maligne Veränderungen das Potenzial zur Infiltration und Metastasierung des umgebenden Gewebes. Maligne Tumoren können aufgrund ihrer Herkunft in epitheliale Tumoren (Karzinome) und mesenchymale Tumoren (Sarkome) untergliedert werden (2). Während seiner Progression erwirbt der Tumor mindestens eine oder auch mehrere der sechs nachfolgend genannten Eigenschaften (2):

- die Fähigkeit, eigenständig Wachstumssignale zu produzieren;
- die Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Signalen;
- die Fähigkeit, sich der Apoptose zu entziehen;
- die Fähigkeit zur unbegrenzten Zellteilung;
- die Fähigkeit zur Induktion der Angiogenese (Gefäßneubildung);
- die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (2; 3).

2011 erweiterten Hanahan und Weinberg diese Eigenschaften um 2 weitere Faktoren (3):

- Deregulierung der zellulären Energetik;
- Umgehung der Zerstörung durch Zellen des Immunsystems.

Jedoch besitzen nicht alle Zellen eines Tumors die gleichen Eigenschaften. Es handelt sich vielmehr um ein komplexes Gewebe, das aus einer Vielzahl verschiedener Zellen besteht. Auch innerhalb der gleichen Zellart können sich deren Eigenschaften stark voneinander unterscheiden (3).

Zur Tumorentstehung (Karzinogenese) können sowohl exogene als auch endogene Faktoren beitragen. Zu den exogenen Faktoren (Kanzerogene) gehören unter ande-

rem chemische Substanzen, Strahlung und Onkoviren (Tabelle 1). Viele dieser Kanzerogene entfalten ihre Wirkung durch Mutationen im DNA-Molekül (2).

Tabelle 1: verschiedene Kanzerogene und die dadurch hervorgerufenen Tumoren
(modifiziert nach Bubendorf 2011 (2))

Kanzerogen	Tumor
Chemische Substanzen	
Aflatoxin	Leberzellkarzinom (4)
Vinylchlorid	Leberzellkarzinom (5)
Xenoöstrogene ¹	eventuell Assoziation mit Hodenkrebs (6)
Strahlung	
Ultraviolette Strahlung	Malignes Melanom (7)
Onkoviren	
Hepatitis B, C	Leberzellkarzinom (8)
Humanes Papillomavirus	Condylome, Gebärmutterhalskrebs (9)
Eppstein-Barr-Virus	B-, T-, NK-Zelllymphome, epitheliale Karzinome (8)

Zu den endogenen Faktoren zählt man beispielsweise Gene, die durch Mutationen in ihren Sequenzen zur Tumorentstehung beitragen. Diese Gene werden in drei Gruppen unterteilt (10):

- Tumorsuppressorgene,
- Onkogene,
- Stabilitäts- oder Reparaturgene.

Tumorsuppressorgene sind Gene, die in ihrer Wildtypform das Tumorwachstum hemmen. Durch Loss-of-Function-Mutationen in diesen Genen verlieren Tumorsuppressorgene ihre hemmende Wirkung und tragen so zur Tumorentstehung bei. Zu der Familie der Tumorsuppressorgene gehören unter anderem das Tumorphosphatase 53 (*TP53*) und Phosphatase-und-Tensin-Homolog (*PTEN*) (10). Im Gegensatz dazu führen Mutationen in Proto-Onkogenen, den Vorläufern der Onkogene, zu einem Funktionsgewinn (*gain-of-function*) und der konstitutiven Expression dieser Gene. Zu den bekannten Onkogenen zählen beispielsweise *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (*MYC*) und *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*KRAS*) (10). Sowohl Onkogene als auch Tumorsuppressorgene

¹ Als Xenoöstrogene werden natürliche oder synthetisch hergestellte chemische Verbindungen (auch als endokrine Disruptoren bezeichnet) mit östrogenartiger Wirkung bezeichnet.

beeinflussen das Wachstumsverhalten von Tumorzellen. Beide tragen zur erhöhten Proliferation z. B. durch Hemmung von Apoptose oder Zellzyklusarrest bei (10). Abhängig vom Karyotyp² verschiedener Zellen, können Gene jedoch auch Tumorsuppressorgene oder Proto-Onkogene darstellen (11). Dem gegenüber stehen Stabilitätsgene, die genetische Alterationen so minimal wie möglich halten. Stabilitätsgene kontrollieren beispielsweise die Mismatch-Reparatur (*mismatch repair*), die Nukleotid-Exzisionsreparatur (*nucleotide-excision repair*) und die Basen-Exzisionsreparatur (*base-excision repair*). Zur Klasse der Stabilitätsgene gehören unter anderem die „ATM Serin/Threonin Kinase“ (*ATM*), „*Bloom syndrome, RecQ helicase-like*“ (*BLM*) und „*breast cancer 1, early onset*“ (*BRCA1*) (10).

Neben den oben genannten Faktoren besitzt das Tumormikromilieu einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorprogression (3). Tumoren sind gekennzeichnet durch abnormale Mikrovaskularisierung sowie ungleichmäßige Versorgung der einzelnen Tumorzellen mit Blut (12). Diese Faktoren tragen zur Entstehung eines Mikromilieus bei, welches sich stark vom Mikromilieu normaler Zellen unterscheidet (3; 12). Das Tumormikromilieu hat Einfluss auf Tumorwachstum, Tumorprogression und Metastasierung. Es ist ein zentraler Faktor für die metabolische Reprogrammierung in Tumoren und ist charakterisiert durch physikalische Eigenschaften wie Azidose³, hohe Laktatkonzentrationen, Hypoxie⁴ und Glukosemangel. Es besteht aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen (Tumorzellen, Immunzellen, Stroma) (12-14). Stromazellen tragen zur Tumorprogression z. B. durch Sekretion von Wachstumsfaktoren, Förderung der Angiogenese und Sekretion von Serinproteasen, welche die extrazelluläre Matrix umbauen, bei (15).

1.1.1 Der Metabolismus als ein zentrales Charakteristikum von Tumorzellen

Auf dem Weg von einer physiologisch normalen Zelle zur Tumorzelle durchläuft diese eine Reihe metabolischer Veränderungen, die in einer verstärkten Abhängigkeit von Glykolyse, Fettsäuresynthese und vom Glutaminmetabolismus resultieren. Weiterhin ist bekannt, dass die Veränderungen im zellulären Metabolismus durch Onkogene und Tumorsuppressorgene gesteuert werden (16; 16-18).

² Als Karyotyp werden die Eigenschaften des Chromosomensatzes einer Zelle, unter anderem in Hinsicht auf Chromosomengröße, -form und -anzahl, bezeichnet.

³ Die Übersäuerung des Gewebes (Azidose) wird durch das Absinken des extrazellulären pH-Werts verursacht.

⁴ Hypoxische Gewebe weisen einen Sauerstoffmangel auf.

Die Aminosäure Glutamin ist ein essenzieller Baustein, der von den meisten Zellen zur Proliferation benötigt wird (19). Demzufolge sind viele Tumoren aufgrund der verstärkten Proliferation auf ein erhöhtes Maß an Glutamin angewiesen (16; 20). Der verstärkte Glutaminmetabolismus ermöglicht es Tumorzellen durch Generierung von ATP sowie die Biosynthese von Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden, kontinuierlich zu wachsen (21; 22).

Neben der gesteigerten Aufnahme und Verstoffwechslung von Glutamin besitzen viele Tumoren die Fähigkeit, Fettsäuren *de novo* zu synthetisieren (23). Diese Fettsäuren sind unter anderem zum Aufbau neuer Zellmembranen und zur Aufrechterhaltung der Zellteilung essenziell.

Auf die Bedeutung der Glykolyse für den Tumormetabolismus wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.1.1.1 Die Glykolyse als ein zentraler Bestandteil des Tumormetabolismus

Wie bereits erwähnt, stellt die metabolische Reprogrammierung ein zentrales Charakteristikum solider Tumoren dar. Während in nicht transformierten Zellen bei Anwesenheit von Sauerstoff die Zellatmung zur Energiegewinnung genutzt wird, besitzen Tumorzellen die Fähigkeit, auch unter Anwesenheit von Sauerstoff Glukose weiter zu Laktat zu fermentieren (24). Tumorzellen weisen eine verstärkte aerobe Glykolyse im Vergleich zu nicht transformierten Zellen auf. Dieser Effekt wurde erstmals in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts durch Otto Warburg beschrieben (25; 26). Die gesteigerte aerobe Glykolyse geht mit der erhöhten Expression vieler glykolyserelevanter Gene einher. Diese Genexpression wird durch Mutationen, die Proto-Onkogene aktivieren sowie Tumorsuppressorgene inaktivieren, beeinflusst. Eine Auswahl verschiedener Onkoproteine sowie Tumorsuppressoren, die einen Einfluss auf die Glykolyse besitzen, ist in Tabelle 2 aufgelistet. Besonders hervorzuheben ist das Onkoprotein Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 (Hif-1), das die Expression vieler glykolyserelevanter Gene beeinflusst. Auf das Hif-1-Protein wird unter Abschnitt 1.1.2 näher eingegangen.

Tabelle 2: Auswahl einiger glykolyserrelevanter Onkoproteine und Tumorsuppressoren

Zielstruktur	Onkoprotein	Tumor-suppressor
Glukosetransporter (Glut)		
Glut 1	<u>Hif-1</u> (27), Myc (28), Akt1 (29)	P53 (30)
Glut 3	<u>Hif-1</u> (27)	
Glut 4		P53 (30)
Hexokinase II	<u>Hif-1</u> (31; 32), Myc (33)	P53 (34)
Glukosephosphat-Isomerase	<u>Hif-1</u> (31), Myc (28)	
Phosphofruktokinase	Myc (28)	
Aldolase A	<u>Hif-1</u> (31)	
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	<u>Hif-1</u> (35; 36), Myc (28)	
Phosphoglycerat-Kinase	<u>Hif-1</u> (37)	
Phosphoglycerat-Mutase	Myc (28)	P53 (38)
Enolase	Myc (28)	
Pyruvat-Kinase M2	<u>Hif-1</u> (37)	Pml (39), Pten (40)
Laktatdehydrogenase A	<u>Hif-1</u> (31; 37), Myc (41)	
Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1	<u>Hif-1</u> (42; 43), Myc (33)	

Akt1 – *v-akt murin thymoma viral oncogene homolog 1*, Hif-1 – Hypoxie-induzierbarer Faktor 1, Myc – *-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*, P53 – Tumorprotein 53, Pml – *promyelocytic leukemia*, Pten – Phosphatase-und-Tensin-Homolog

Tumorzellen unterscheiden sich nicht nur in der Glykolyserate, sondern auch in der Expression anderer Isoformen der beteiligten Enzyme von normalen Zellen.

Die gesteigerte aerobe Glykolyse dient transformierten Zellen zur Aufrechterhaltung der Menge der glykolytischen Intermediate. Diese Intermediate werden von Tumorzellen als Vorstufen zum Aufbau von Makromolekülen wie RNA, DNA und Lipiden benötigt. Die Synthese von Purinnukleotiden geschieht hier z. B. über die Einschleusung von Glukose-6-phosphat und Fruktose-6-phosphat in den Pentosephosphatweg (21; 44). Diese Purinmoleküle stellen unter anderem Komponenten von RNA, DNA, ATP und NADH dar (Abb. 1) (21). Zur Bildung von Lipiden dienen die Intermediate Dihydroxyacetonphosphat (DAP) und 3-Phosphoglycerat (21). Die aus DAP synthetisierten Phospholipide werden von der Zelle zum Aufbau von Membranen und die synthetisierten Triacylglycerole als Energiequelle genutzt (21). Aus 3-Phosphoglycerat wird zunächst die Aminosäure Serin synthetisiert, welche anschließend zu Lipiden weiterverarbeitet werden kann (21). Neben 3-Phosphoglycerat können auch

Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und Ribose-5-Phosphat (aus dem Pentosephosphatweg) von der Zelle als Vorstufen für Aminosäuren genutzt werden (Abb. 1 violette Boxen) (21). Nicht zuletzt ist die verstärkte aerobe Glykolyse mit einer infausten Prognose diverser Tumorentitäten assoziiert. Die Überexpression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase geht in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, die Überexpression von Laktatdehydrogenase A und Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1 im multiplen Myelom und die Überexpression von Pyruvat-Kinase M2 im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit einer schlechten Prognose des Patienten einher (45-47). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Überexpression der Phosphoglycerat-Kinase 1 sowie des Glukosetransporters 2 einen direkten prognostischen Marker für das Überleben von HCC-Patienten darstellt (48). Des Weiteren zeigt sich die klinische Relevanz der erhöhten aeroben Glykolyse in soliden Tumoren in der Entwicklung der ^{18}F -fluorodeoxy-D-Glukose Positronen-Emissions-Tomographie (^{18}F -FDG-PET) als bildgebendes Verfahren zur Detektion von Tumoren. Fluorodeoxy-D-Glukose (FDG) wird wie Glukose in die Zelle aufgenommen und phosphoryliert. Das phosphorylierte FDG kann anschließend jedoch nicht mehr weiter verstoffwechselt werden (49; 50). Die Aufnahme von ^{18}F -FDG in die Zelle kann zur Prognose verschiedener Tumorentitäten genutzt werden. Erhöhte Glykolyseraten, die durch eine verstärkte ^{18}F -FDG Aufnahme angezeigt werden, scheinen in vielen Tumoren für eine schlechte Prognose zu sprechen (50). Anhand der ^{18}F -FDG-PET kann scheinbar eine Aussage über die Expression verschiedener glykolyserelevanter Gene getroffen werden. Am Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von ^{18}F -FDG mit der Expression von Glut 1 und möglicherweise auch Hexokinase II korreliert (51). Die Glykolyse stellt dementsprechend ein potenzielles Ziel für die Therapie solider Tumoren dar.

1.1.1.1.1 Der Glykolysehemmer 2-Deoxy-D-Glukose

Es existiert eine Vielzahl von Glykolysehemmern, die verschiedene glykolyse-relevante Enzyme inhibieren. Eine Auswahl dieser Glykolysehemmer ist in der Abb. 1 aufgeführt (52-66).

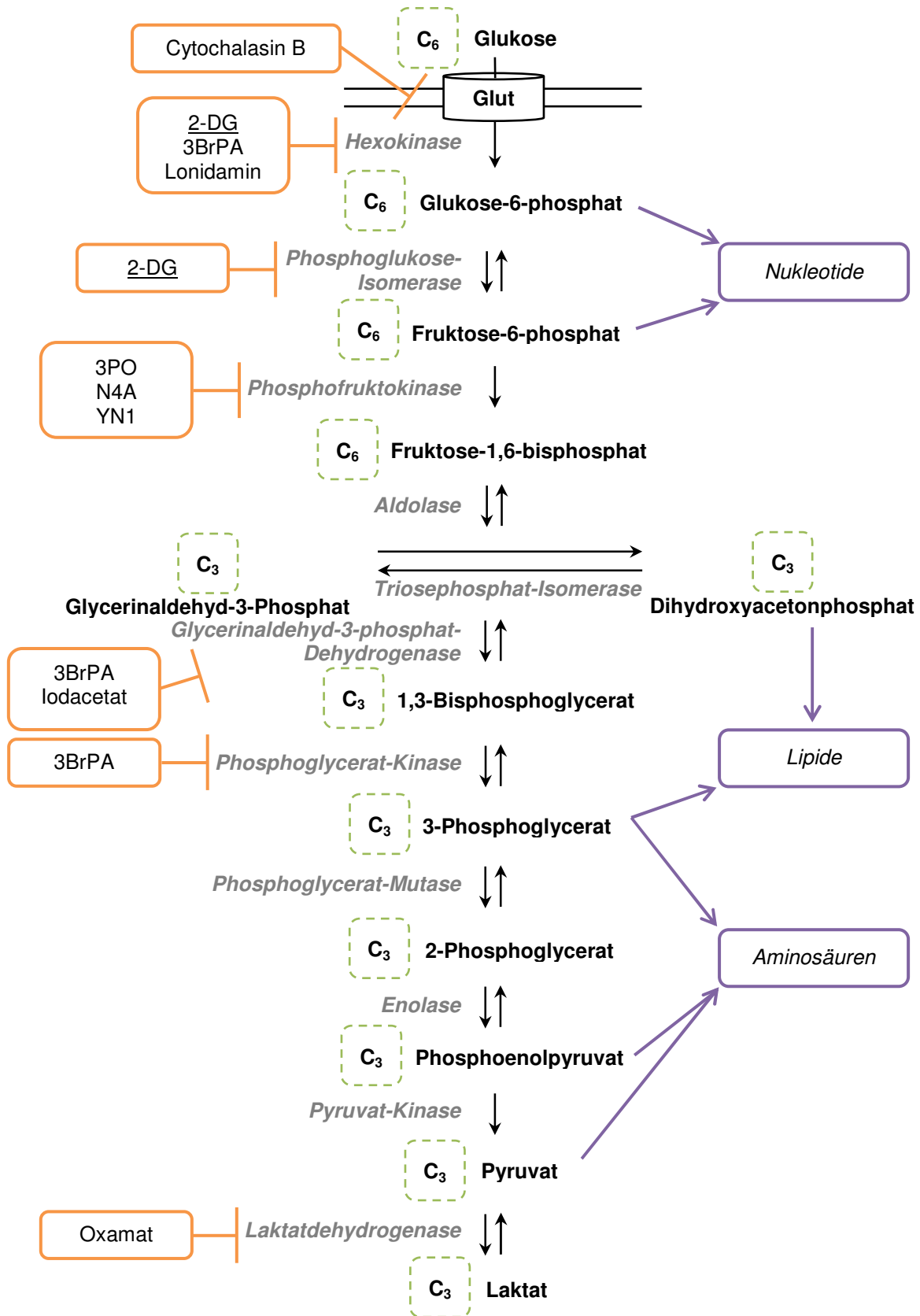


Abb. 1: Schematische Darstellung der Glykolyse

Gezeigt sind Vorstufen wichtiger Intermediate (violett) sowie eine Auswahl an Glykolysehemmern (orange). 3BrPA – 3-Brompyruvat, Glut – Glukotransporter, 2-DG – 2-Deoxy-D-Glukose, 3PO – 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one, C – Kohlenstoff

An dieser Stelle soll ausschließlich auf den Glykolysehemmer 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) eingegangen werden. 2-DG ist ein nicht-metabolisierbares Glukoseanalogon aus der Familie der Antimetabolite. Es wird wie Glukose über Glukosetransporter in die Zelle aufgenommen und durch eine Hexokinase phosphoryliert. Im Gegensatz zu Glukose-6-phosphat kann 2-Deoxy-D-Glukose-6-phosphat (2-DG-6-P) jedoch nicht weiter verstoffwechselt werden. 2-DG-6-P reichert sich in der Zelle an und hemmt die ersten beiden enzymatischen Schritte der Glykolyse (Abb. 1) (53; 59). Diese Hemmung führt einerseits dazu, dass Glukose nicht zu Pyruvat abgebaut werden kann, und andererseits zur Reduktion von verfügbarem ATP (53).

Die Behandlung mit 2-DG führt z. B. zur Induktion apoptotischer Signalwege in humanen alveolären Rhabdomyosarkomzelllinien *in vitro*, zur verminderten Angiogenese im murinen Retinoblastom *in vivo* und zu Zellzyklusarrest sowie zum Teil zu Apoptose in Ovarialkarzinom-, Glioblastom- und Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs *in vitro* (67-69). Weiterhin scheint 2-DG das Potenzial als antivirales Therapeutikum zu besitzen. Untersuchungen konnten zeigen, dass 2-DG die Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus-Replikation sowie die Transkription des humanen Papillomavirus 18 hemmt (70; 71). Zudem erhöht 2-DG die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Chemo- und Radiotherapie. In der Brustkrebszelllinie SkBr3 führt die Kombination von 2-DG mit verschiedenen Chemotherapeutika, darunter z. B. 5-Fluorouracil (5-FU), Doxorubicin und Cisplatin, zu einem verstärkten antiproliferativen Effekt im Vergleich zur alleinigen Gabe der verschiedenen Substanzen (72). Auch trägt 2-DG zur Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Radiotherapie bei (73-75), wobei sich 2-DG protektiv auf normales Gewebe (welches den Tumor umgibt) auswirkt (76; 77). Des Weiteren besitzt 2-DG einen antiproliferativen Effekt in wirkstoffresistenten Zellen (78; 79).

1.1.2 Der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor 1 (Hif-1)

Wie bereits erwähnt, spielt das Onkoprotein Hif-1 bei der Glykolyse solider Tumoren eine wichtige Rolle (Tabelle 2). Die erhöhte Expression der sauerstoffabhängig regulierten Untereinheit Hif-1 α geht oft mit einer schlechten Prognose für den Krebspatienten einher (27; 80-82).

Während der Tumorprogression kommt es häufig zur Ausbildung hypoxischer Areale. Die Entwicklung solcher Areale beruht unter anderem auf der Überschreitung der

maximalen Sauerstoffdiffusionsstrecke im Gewebe (< 70µm), der Bildung strukturell und funktional abnormaler Mikrogefäße sowie der Entstehung tumorassoziierter oder therapieinduzierter Anämie (83). Die Adaptation der hypoxischen Zellen an das veränderte Mikromilieu wird durch Hif-1 vermittelt. Hif-1 beeinflusst dabei beispielsweise Zellproliferation, Angiogenese und Zellmetabolismus (84).

1.1.2.1 Struktureller Aufbau von Hif-1

Das Protein Hif-1 ist ein Heterodimer, das aus einer konstitutiv exprimierten, aber sauerstoffabhängig regulierten α -Untereinheit sowie einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit (Arnt, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) besteht (85). Aktuell sind drei Formen der α - (Hif-1 α , Hif-2 α , Hif-3 α) und β -Untereinheit (Arnt1, Arnt2, Arnt3) bekannt. Es dimerisieren jedoch nur Hif-1 α und Hif-2 α mit Arnt (86). Im Folgenden soll näher auf die Untereinheiten Hif-1 α und Arnt eingegangen werden. Beide Proteine besitzen eine Reihe an strukturell ähnlichen Motiven. Hierzu gehört zum einen die aminoterminalen *Basic-Helix-Loop-Helix*-Domäne (bHLH), welche zur Dimerisierung beider Untereinheiten und zur DNA-Bindung benötigt wird, und zum anderen 2 aminoterminalen PER-ARNT-SIM (PAS) Domänen (PAS-A, PAS-B), von denen eine oder möglicherweise beide Domänen zur Dimerisierung und nukleären Lokalisierung dienen (87-90). Während die α -Untereinheit spezifisch für Hif-1 ist, kann die β -Untereinheit auch mit anderen Proteinen der bHLH-PAS-Familie dimerisieren (89; 90). Beide Proteine tragen Transaktivierungsdomänen (TAD) im carboxyterminalen Bereich. Hif-1 α besitzt 2 TAD – eine aminoterminalen (N-) und eine carboxyterminale, sauerstoffregulierte (C-) TAD (91; 92). Die N-TAD von Hif-1 α überlappt partiell mit der sauerstoffabhängigen Degradierungsdomäne (ODDD) (93). Die Rekrutierung verschiedener Kofaktoren wie z. B. CREB Bindeprotein/E1A Bindeprotein p300 (Crebbp/Ep300) wird durch die C-TAD von Hif-1 α vermittelt (Abb. 2) (94; 95).



Abb. 2: Proteinstruktur des humanen Hif-1 α

Hif-1 α besteht aus 2 aminoterminalen PAS Domänen, 2 carboxyterminalen TAD Domänen und einer sauerstoffabhängigen Degradierungsdomäne (modifiziert nach Lisy *et al.* (86)).

bHLH – *Basic-Helix-Loop-Helix*-Domäne, PAS – PER-ARNT-SIM-Domäne, ODDD – sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne, TAD – Transaktivierungsdomäne

1.1.2.2 Sauerstoffabhängige und -unabhängige Regulation von Hif-1 α

1.1.2.2.1 Sauerstoffabhängige Regulation

Normoxie

Unter normoxischen⁵ Bedingungen wird die transkriptionelle Aktivität von Hif-1 α durch Asparaginhydroxylasen und die Degradierung durch Prolinhydroxylasen (Egln, *egl-9 family hypoxia-inducible factor*) gesteuert. Beide Hydroxylasen benötigen Sauerstoff für ihre enzymatische Aktivität (96; 97).

Die Aktivität der C-TAD wird durch die Hydroxylierung eines Asparaginylnrestes (Asn803) beeinflusst. Die Hydroxylierung durch den Hif-1-hemmenden Faktor (Hif1an) führt zur Blockade der Bindung der Kofaktoren Crebbp/Ep300 und somit zur Inhibition der transkriptionellen Aktivität von Hif-1 (97).

Die Hif-1 α -Proteinstabilität wird negativ durch Prolinhydroxylasen beeinflusst. Diese Prolinhydroxylasen katalysieren die Hydroxylierung von 2 Prolinresten (Pro402 und Pro564) innerhalb der ODD-Domäne (96; 98-100). Diese Hydroxylierung führt zur Bindung des Von-Hippel-Lindau-Proteins (Vhl, von Hippel-Lindau *tumor suppressor*, *E3 ubiquitin protein ligase*) und dadurch zur Degradierung von Hif-1 α (101). Vhl ist Bestandteil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, zu dem auch Cullin 2, Ring-Box 1 *E3 ubiquitin protein ligase* (Rbx1), Elongin B und C gehören. Der Vhl-Komplex polyubiquitinyliert Hif-1 α und markiert es somit zur Degradierung durch das 26S-Proteasom (102; 103). Eine Mutation im *VHL*, z. B. beim Von-Hippel-Lindau-Syndrom, führt zu einer konstanten Expression von Hif-1-Zielgenen, auch unter Normoxie (101). Ob die Interaktion von Hif-1 α und Ard1 zur Acetylierung und Destabilisation von Hif-1 α führt, wird kontrovers diskutiert (104-106).

Hypoxie

Bei Sauerstoffmangel wird die negative Regulation der Proteinstabilität und transkriptionellen Aktivität von Hif-1 α , die unter normoxischen Bedingungen herrscht, aufgehoben. Hif-1 α akkumuliert im Zytoplasma, transloziert in den Zellkern und dimerisiert dort mit Arnt (107). Das Heterodimer bindet anschließend an die cis-wirkenden *hypoxia-response elements* (HRE) in Hif-1-Zielgenen. Das HRE be-

⁵ Normoxie beschreibt den Zustand von Geweben und Organen, bei dem der Sauerstoffpartialdruck im Normalbereich des jeweiligen Gewebes oder Organs liegt.

steht aus einer kurzen Konsensussequenz 5'-RCGTG-3', die in der Promotor- oder Enhancerregion der Zielgene liegt (108). Wie bereits erwähnt, erfolgt die Rekrutierung von Kofaktoren über die C-TAD von Hif-1 α .

1.1.2.2.2 Sauerstoffunabhängige Regulation

Die Regulation von Hif-1 kann durch verschiedene Faktoren auch sauerstoffunabhängig erfolgen. Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine können zur Stabilisierung von Hif-1 α unter Normoxie beitragen. Hierzu gehören z. B. Insulin, insulinähnlicher Wachstumsfaktor 2 (Igf2), epidermaler Wachstumsfaktor (Egf), Prostaglandin E₂ und Interleukin-1 β (Il1b) (109-115). Weiterhin wird die erhöhte Hif-1 α -Expression durch Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gesteuert (Abb. 3).

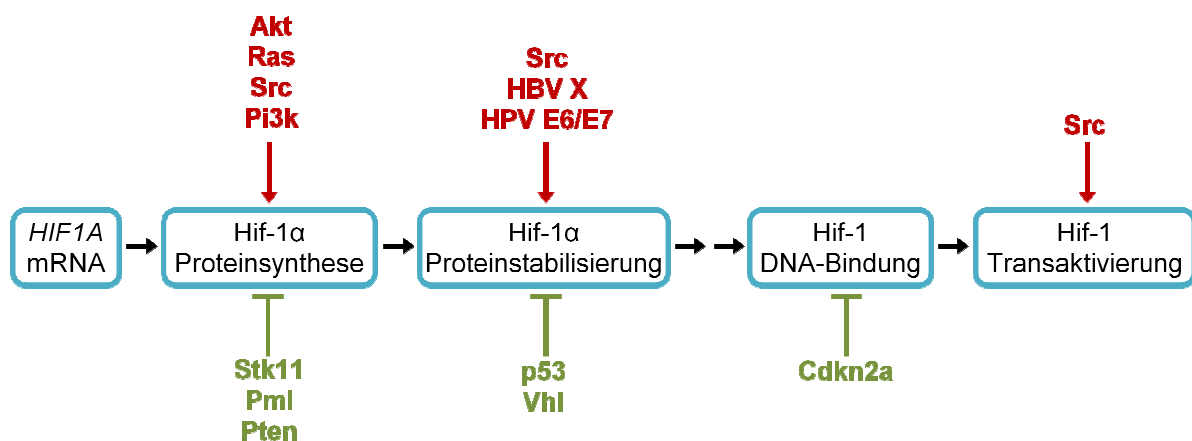


Abb. 3: Regulation von Hif-1 durch Onkoproteine und Tumorsuppressoren

Der Funktionsverlust von Tumorsuppressoren (grün) sowie der Funktionsgewinn von Onkoproteinen (rot) stimuliert die Hif-1-Aktivität (modifiziert nach Semenza 2012 (116)). Akt – *v-akt murin thymoma viral oncogene homolog*, Cdkn2a – cyclinabhängiger Kinaseinhibitor 2A, HBV X – Hepatitis-B-Virus Protein X, HPV E6/E7 – humanes Papillomavirus *transforming protein* E6/E7, p53 – Tumorprotein 53, Pi3k – Phosphatidylinositol-3-Kinase, Pml – *promyelotic leukemia*, Pten – Phosphatase- und-Tensin-Homolog, Ras – *rat sarcoma viral oncogene homolog*, Src – SRC Proto-Onkogen Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, Stk11 – Serin/Threonin-Kinase 11, Vhl – Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor

Hierbei scheinen die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase- (Pi3k) und „mitogen-activated protein kinase“-Signalwegs (Mapk-Signalweg) eine zentrale Rolle zu spielen (112; 117).

1.1.3 Das Phänomen der Chemotherapieresistenz

Die Entstehung bzw. das Vorhandensein einer Chemotherapieresistenz in Tumorzellen stellt den primären Grund für das Therapieversagen bei einer Vielzahl von Patienten dar (118). Hierbei unterscheidet man zwischen der primären und der sekundären Resistenz. Die primäre Resistenz, auch intrinsische Resistenz genannt, wird durch genetische Alterationen, die schon vor der Behandlung der Tumorzellen existieren, hervorgerufen. Die sekundäre Resistenz, auch erworbene Resistenz genannt, wird durch Genommutationen sowie epigenetische Veränderungen in den Tumorzellen bei Behandlung mit Chemotherapeutika verursacht (118). Die Chemotherapieresistenz ist meist multifaktoriell. Neben den zellulären Resistenzmechanismen können auch unzureichende intratumorale Wirkstoffkonzentrationen, ungleichmäßige Verteilung der Wirkstoffe im Tumor, das Tumormikromilieu sowie der leberspezifische Medikamentenmetabolismus zur Resistenzentstehung beitragen (13; 119-121). Zu den zellulären Mechanismen zählen (118; 122):

- Vermeidung der Apoptose (beispielsweise durch aktivierende Mutationen in Onkogenen oder inaktivierende Mutationen in Tumorsuppressorgenen);
- verringerte intrazelluläre Wirkstoffkonzentrationen durch verstärkten Export, z. B. durch erhöhte Expression des P-Glykoproteins, des *multidrug resistance-associated protein-1* (Mrp1) und „*ATP-binding cassette, sub-family G, member 2*“ (Abcg2);
- verstärkte DNA-Reparaturmechanismen;
- enzymatische Inaktivierung von Wirkstoffen;
- Änderungen in den Strukturen der Wirkstoffziele.

Das Tumormikromilieu stellt, wie zuvor erwähnt, eine weitere wichtige Komponente in der Resistenzentstehung dar und ist neben anderen Faktoren auch durch die Ausbildung hypoxischer Areale gekennzeichnet (12; 13). Die Anpassung an das hypoxische Milieu wird durch Hif-1 gesteuert. Es fördert z. B. den Transport der Wirkstoffe aus der Zelle, die Inhibition der Apoptose und die Resistenz gegenüber DNA schädigenden Substanzen (123). Das Protein Hif-1 spielt demzufolge eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Chemotherapieresistenz von Tumorzellen.

1.2 Das Hepatozelluläre Karzinom

2012 stellte das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) die fünfthäufigste Krebsart und zweithäufigste Krebstodesursache weltweit dar (www.globocan.iarc.fr) (124). In Deutschland steht das HCC an sechster Stelle der häufigsten Krebstodesursachen bei Männern und an elfter Stelle bei Frauen (125). Die Zahl der Neuerkrankungen steigt jährlich und die 5-Jahres-Überlebensrate betrug 2010 deutschlandweit nur 12 % (126). Auch in anderen westlichen Nationen nimmt die Inzidenz seit Jahren zu (127). Neben der wachsenden Anzahl der Neuerkrankungen stellen auch die Chemotherapieresistenz sowie die zumeist späte Diagnosestellung im inoperablen Stadium zentrale Probleme der Therapie des HCC dar (128).

1.2.1 Ätiologie und Risikofaktoren

Beim HCC handelt es sich um eine komplexe Erkrankung, die mit vielen Risikofaktoren assoziiert ist. Viele dieser Risikofaktoren bedingen Leberzirrhosen, welche wiederum die Basis der Entstehung der meisten HCC (ca. 80 %) darstellen (129). Die Entwicklung des HCC aus nichtzirrhotischen Lebern ist oftmals verbunden mit Hepatitis-B-Virus-Infektionen, der Aufnahme von Aflatoxinen und/oder der Ausbildung von nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen (130). Des Weiteren stellt der Alkoholmissbrauch einen HCC-bedingenden Risikofaktor dar.

Virale Infektionen zählen zu den größten Risikofaktoren weltweit. Hierzu gehören chronische Infektionen mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) in Asien und Afrika, sowie mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) in westlichen Ländern und Japan (131).

Neben den viralen Hepatiden stellt der Missbrauch von Alkohol ein zunehmendes Risiko für die Entstehung eines HCC dar. Der Konsum von mehr als 80 g Alkohol täglich über einen Zeitraum von 10 Jahren erhöht das Risiko der Entwicklung eines Leberzellkarzinoms. Auch hierbei induziert der Alkoholmissbrauch eine Leberzirrhose, die zur Bildung eines HCC führt. Weiterhin führt Alkoholmissbrauch in Patienten mit bestehender HCV-Infektion oftmals zur Verdoppelung des Risikos der Entstehung eines HCC (132).

Aflatoxine sind Sekundärmetabolite der Pilzarten *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*. Sie entstehen oftmals bei falscher Nahrungsmittellagerung. Die Aflatoxinexposition allein kann schon ein HCC verursachen (4). In Verbindung mit

einer bestehenden HBV-Infektion erhöht die Aflatoxinexposition das Risiko der Entstehung eines Leberzellkarzinoms um ein Vielfaches (4).

Zu den nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD) zählen unter anderem die Steatose⁶, die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) und die Fettleberzirrhose. Diabetes und Adipositas zählen zu den Risikofaktoren, die zur Entwicklung einer NAFLD beitragen (130; 133). Beide werden zusammen mit weiteren Faktoren unter dem Begriff Metabolisches Syndrom⁷ zusammengefasst (129; 134). Nichtalkoholische Fettlebererkrankungen sind in den meisten Fällen benign. Bei ca. 20 % der Erkrankten liegt jedoch eine NASH vor, welche die Basis für eine Zirrhose darstellen kann (130).

1.2.2 Behandlungsmöglichkeiten des HCC

Die Behandlung des HCC erfolgt je nach Stadium kurativ oder palliativ. Einige dieser Behandlungsmöglichkeiten sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

1.2.2.1 Kurative Behandlungsformen

Leberresektion, Lebertransplantation, perkutane Alkoholinjektion (PEI) und Radiofrequenz-Thermoablation (RFA) stellen die drei kurativen Therapieformen zur Behandlung des HCC dar.

Leberresektion

Eine Leberresektion kommt nur für Patienten mit ausreichender Leberfunktion infrage. Zudem sollte das HCC nicht auf Basis einer chronischen Lebererkrankung entstanden sein. Da 80 % der HCC in zirrhotischen Lebern entstehen, kann eine Resektion nur bei einer geringen Prozentzahl der Patienten durchgeführt werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach partieller Hepatektomie beträgt ca. 50–70 % (135; 136).

⁶ Die Steatose, auch Fettleber genannt, ist eine krankhafte Leberveränderung, verursacht durch die vermehrte Einlagerung von Triglyzeriden.

⁷ Das Metabolische Syndrom bezeichnet eine Kombination aus Insulinresistenz, abdomineller Adipositas, Hypertonie und Dyslipoproteinämie.

Lebertransplantation

Sollte eine Leberresektion (partielle Hepatektomie) nicht möglich sein, kann eine Lebertransplantation in Betracht gezogen werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate dieser Patienten beträgt bis zu 70 % (135; 137-139).

Lokale Therapie – perkutane Ablationen

Die perkutanen Ablationen (Substanzinjektionen und herbeigeführte Temperaturänderungen) zählen neben der transarteriellen Chemoembolisation (1.2.2.2) zur den lokalen Therapieformen. Zu den 2 gängigsten Verfahren gehören die perkutane Ethanolinjektion (PEI), bei der 95-prozentiger Ethanol in den Tumorknoten injiziert wird, und die Radiofrequenz-Thermoablation (RFA), bei der hohe Temperaturen im Tumor induziert werden (140; 141). Beide Verfahren werden unter Sichtkontrolle mit Ultraschall oder Computertomografie durchgeführt und kommen dann zur Anwendung, wenn neben einem HCC noch Begleiterkrankungen (z. B. Zirrhose, Hepatitis) auftreten (141). Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit einem Knoten unter 2 cm beträgt hier 50–80 % (137; 141).

1.2.2.2 Palliative Behandlungsformen

Aufgrund der späten Diagnosestellung besitzen kurative Therapieverfahren nur für ca. 30 % der Patienten einen Stellenwert (139). Der Großteil der diagnostizierten HCC kann nur noch palliativ therapiert werden.

Lokale Therapie – transarterielle Chemoembolisation

Bei der transarteriellen Chemoembolisation (TACE) wird ein Katheter über die Leberarterie, welche fast die komplette Blutversorgung der Leber übernimmt, bis vor den Tumor geschoben. Über diesen Katheter werden zytotoxische Chemotherapeutika sowie Agens, die einen Arterienverschluss verursachen, injiziert. Beides führt zu Nekrosen und zur Inhibition der Tumorprogression (137; 141).

Zielgerichtete Therapien – Sorafenib

In den letzten Jahren nimmt die zielgerichtete Therapie einen immer größeren Stellenwert in der Therapie verschiedener Tumorentitäten ein (142-144). Während die konventionelle Chemotherapie auf einen antiproliferativen Effekt in den Tumorzellen

abzielt oder diese abtötet, greift die zielgerichtete Therapie in gestörte Signalwege der Tumorzellen ein. Für die Behandlung des HCC wird aktuell der Multikinaseinhibitor Sorafenib empfohlen. Sorafenib greift in die Tumorproliferation und Angiogenese⁸ ein. Dabei inhibiert es z. B. die Phosphorylierung von *mitogen-activated protein kinase kinase* (Map2k) und Mapk. Beide Kinasen sind Bestandteil des Ras/Raf/Map2k/Mapk-Signalwegs (*rat sarcoma viral oncogene homolog/Raf proto-oncogene/Map2k/Mapk*), der unter anderem zelluläre Prozesse wie Proliferation, Genexpression und Apoptose steuert (145; 146).

⁸ Als Angiogenese wird die Neubildung von Gefäßen bezeichnet.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Hepatozelluläre Karzinom weist eine steigende Inzidenz in Europa und den Vereinigten Staaten auf. Zudem ist es durch eine infauste Prognose charakterisiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt deutschlandweit nur 12 %. Die späte Diagnosestellung im meist inoperablen Stadium sowie das Fehlen kurativer Therapieformen stellen zentrale Probleme in der Therapie des HCC dar. Nicht zuletzt ist es durch eine ausgeprägte primäre Resistenz gegenüber systemischen Chemotherapeutika gekennzeichnet. Vor diesen Hintergrund ist die Charakterisierung resistenzvermittelnder Mechanismen für die Entwicklung innovativer Therapieformen von hoher Bedeutung.

Tumorzellen sind durch metabolische Alterationen, wie z. B. eine gesteigerte Glykolyserate, gekennzeichnet. Es ist bekannt, dass der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor Hif-1 die Expression glykolyserelevanter Gene beeinflusst. Darüber hinaus ist Hif-1 an der Vermittlung von Chemotherapieresistenz beteiligt. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der Glykolyse für die Tumorprogression des Hepatozellulären Karzinoms in Abhängigkeit von Hif-1 ermittelt werden. Hierzu wurden zwei humane HCC-Zelllinien sowie ein transgenes HCC-Mausmodell mit dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose behandelt. Um die Bedeutung von Hif-1 näher zu analysieren, sollten zeitgleich Hif-1 α -defiziente Zelllinien sowie Mäuse mit funktionell inaktivem Hif-1 α auf ihr Verhalten gegenüber 2-DG untersucht werden. Im Anschluss erfolgte die nähere Charakterisierung der Mechanismen, welche zur Glykolysehemmung führten. Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine Analyse der resistenzvermittelnden Mechanismen erfolgen. Hierzu war zunächst die Erzeugung 2-DG-resistenter HCC-Zelllinien erforderlich. Anschließend sollten diese Zellen näher charakterisiert und in Hinsicht möglicher resistenzvermittelnder Mechanismen analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle verwendeten Grundchemikalien, Lösungsmittel, Puffersubstanzen sowie Detergenzien wurden von den Firmen Merck KGaA, Carl Roth GmbH + Co. KG und Sigma-Aldrich Co. bezogen und werden in der folgenden Darstellung nicht einzeln aufgeführt. Sämtliche Primer wurden von TIB Molbiol Syntheselabor GmbH synthetisiert. Plastikware wurde von den Firmen Eppendorf AG, VWR International, Bio Rad Laboratories, Becton; Dickinson and Company, Corning Incorporated und Sarstedt AG & Co. bezogen.

2.1.1 Eukaryotische Zelllinien und verwendete Medien

2.1.1.1 Ursprungszellen

Die Hep G2-Zelllinie ist eine adhärent wachsende humane Leberzellkarzinomzelllinie mit epithelialer Morphologie. Sie wurde aus der Leber eines 15 Jahre alten Kaukasiers gewonnen.

Bei der SK-HEP-1-Zelllinie handelt es sich ebenfalls um eine adhärent wachsende humane Leberadenokarzinomzelllinie mit epithelialer Morphologie. Sie stammt aus der Aszitesflüssigkeit eines 52 Jahre alten Kaukasiers.

2.1.1.2 Funktionelle Inaktivierung von Hif-1 α in Zellen

Zellen mit funktioneller Inaktivierung des Hif-1 α (HIF-) waren durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits vorhanden (147). Eine funktionelle Inaktivierung des Hif-1 α wurde hier durch lentiviral-vermittelte RNA-Interferenz (RNAi) erreicht. Beide Zelllinien, die mit einem Plasmid mit nicht-kodierender shRNA (*scrambled*, SCR) transduziert wurden, dienten als entsprechende Kontrollzellen.

2.1.1.3 Herstellung 2-Deoxy-D-Glukose-resistenter Hep G2- und SK-HEP-1-Zellen

Um eine Resistenz gegenüber 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) hervorzurufen, wurden sowohl Hep G2- als auch SK-HEP-1-Wildtyp-Zellen mit steigenden 2-DG-

Konzentrationen behandelt. Als initiale Konzentration wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bzw. die halbe IC_{50} gewählt. Die Behandlung mit jeder 2-DG-Konzentration erfolgte in 3 Zyklen zu jeweils 120 h in 75-cm²-Zellkulturflaschen. Zwischen den einzelnen Zyklen erfolgte eine Erholungsphase, in der die Zellen bis zu einer Konfluenz von 95 % in normalem Zellkulturmedium inkubiert wurden. Die hier gewählte Methode ist international etabliert (148-150).

2-DG-Konzentrationen:

Hep G2 0,5 mM; 1 mM (IC_{50}); 4 mM; 8 mM; 12 mM

SK-HEP-1 0,25 mM (IC_{50}); 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 3 mM; 4 mM

2.1.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Alle Hep G2-Zellen wurden in DMEM-Medium und alle SK-HEP-1-Zellen in RPMI-Medium mit folgenden Zusätzen inkubiert:

- DMEM *high glucose* (4,5 g/l Glukose, Gibco), 10 % FBS (Biochrom AG), 1 % Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml/10000 µg/ml (Biochrom AG), 1 % GlutaMAX-I 100 x (Gibco);
- RPMI 1640 x (2 g/l Glukose, Gibco), 10 % FBS (Biochrom AG), 1 % Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml/10000 µg/ml (Biochrom AG), 1 % GlutaMAX-I 100 x (Gibco).

Für Experimente mit glukosereduziertem Medium wurden glukosefreies RPMI- und glukosereduziertes DMEM-Medium verwendet (Zusätze wie oben). Die entsprechende Glukosemenge (0,5 g/l) wurde dem RPMI zugefügt:

- DMEM, low glucose (1 g/l), GlutaMAX;
- RPMI 1640 Medium, *no glucose*;
- D-(+)-Glukose Lösung 45 % (Sigma-Aldrich Co.).

2.1.2 Primäre und sekundäre Antikörper

Alle Antikörper wurden nach Herstellerangaben aufbewahrt.

Tabelle 3: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung	Waschpuffer
AMPK α (23A3)	Kaninchen monoklonal	Cell Signalling Technology	1:1000 5 % BSA TBS-T	TBS-T
Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9)	Kaninchen monoklonal	Cell Signalling Technology	1:1000 5 % BSA TBS-T	TBS-T
p70 S6 Kinase (49D7)	Kaninchen monoklonal	Cell Signalling Technology	1:1000 5 % BSA TBS-T	TBS-T
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2)	Kaninchen monoklonal	Cell Signalling Technology	1:1000 5 % BSA TBS- Ten	TBS-T
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)	Kaninchen monoklonal	Cell Signalling Technology	1:1000 5 % BSA TBS-T	TBS-T
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Hr202/Tyr204)(D13.14.4E) XP	Kaninchen monoklonal	Cell Signalling Technology	1:2500 5 % BSA TBS-T	TBS-T
HIF-1 α (C-Term)	Kaninchen polyklonal	Cayman Che- mical	1:625 5 % Magermilch PBS-T	PBS-T
YY1 (C-20)	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology	1:1000 5 % Magermilch PBS-T	PBS-T

BSA – Bovines Serum Albumin

Tabelle 4: Sekundärer Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Ziege anti-Kaninchen Horseradish Peroxidase konjugiert	Ziege polyklonal	Dianova	1:10000 in PBS-T oder TBS-T 5 % Mager- milch, je nach primärem Antikörper

2.1.3 Primer

Alle Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/μl eingesetzt.

Murine Primer (Genotypisierung)

HIF24	GCA GTT AAG AGC ACT AGT TG
HIF25	GGA GCT ATC TCT CTA GAC C
NewCre_F	GCC AGC TAA ACA TGC TTC ATC
NewCre_R	ATT GCC CCT GTT TCA CTA TCC

Humane Primer (quantitative *Real-Time-PCR*)

Ca9_F	TAA GCA GCT CCA CAC CCT CT
Ca9_R	TCT CAT CTG CAC AAG GAA CG
Calreticul_L	GAC ATG CAC GGA GAC TCA GA
Calreticul_R	GAA GTC CCA ATC GTC TTC CA
Glut1_F	GCC TGG ATC TCC CCA CTC TAG
Glut1_R	CAG GTA AAG AAA GAT TAA TTT GAG TGG TT
GRP78_L	CCT GTG GCT GGA CTG CCT GC
GRP78_R	ACG CCG ACG CAG GAG TAG GT
GRP94_L	TTG ATG GGA AGA GGT TCC AG
GRP94_R	GTT GCC AGA CCA TCC GTA CT
HIF KnDo_F	CCG CTG GAG ACA CAA TCA TA
HIF KnDo_R	CTT CCT CAA GTT GCT GGT CA
PGK1-551_F	AGA AGG GAA GGG AAA AGA TGC T
PGK1-627_R	GTG AAG CTC GGA AAG CTT CTA TTT
Beta-Aktin_F	TGC ATT GTT ACA GGA AGT CCC TT
Beta-Aktin_F	GGG AGA GGA CTG GGC CAT

2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle nicht aufgeführten Puffer wurden nach Herstellerangaben angesetzt.

Allgemeine Lösungen und Puffer

DNA Ladepuffer	40 % Glycerol; 0,2 M EDTA; 1 x TAE Spatelspitze Xylencyanolblau, mit bidest. Wasser auffüllen
DTT 100 mM	100 mM in bidest. Wasser
EDTA 500 mM	500 mM EDTA in bidest. Wasser lösen, pH 8 einstellen
KCl 1 M	1 M KCl in bidest. Wasser
K ₂ HPO ₄ 1 M	1 M K ₂ HPO ₄ in bidest. Wasser
MgCl ₂ 500 mM	500 mM MgCl ₂ in bidest. Wasser
NaCl 5 M	5 M NaCl in bidest. Wasser
NaF 500 mM	500 mM NaF in bidest. Wasser
Na ₃ VO ₄ 100 mM	100 mM Na ₃ VO ₄ in bidest. Wasser lösen, pH 10 einstellen, wenn Lösung gelb wird, ggf. mehrfach kochen und pH-Werteinstellen
NP 40 12,5 %	125 µl Nonidet P 40, 875 µl bidest. Wasser
PMSF 100 mM	100 mM in 96 % Ethanol
Propidiumiodid-Lösung	20 ml PBS, 400 µl Propidiumiodid (1 mg/ml), 40 µl RNase (10 mg/ml)
Proteaseinhibitor	1 Tablette cOmplete Protease Inhibitor Cocktail in 2 ml bidest. Wasser
TAE 50x	242g Tris; 57,1 ml 100 % Essigsäure; 100 ml EDTA (0,5 mM; pH 8) ad 1l bidest. Wasser; pH auf 8,5 einstellen
TBS 10x	80g NaCl, 2g KCl, 30g Tris, pH 7,4
SDS 20 %	20g in 100 ml bidest. Wasser

Puffer für Kernextrakte

Puffer A	10 mM Tris pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 10 % [v/v] Glycerol; 10 mM K ₂ HPO ₄ ; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 10 mM NaF Aliquots bei -20 °C: 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF vor Gebrauch: 1 Aliquot + 940 µl Puffer A; 40 µl Proteaseinhibitor; 10 µl Phosphataseinhibitor
----------	---

Puffer C	20 mM Tris pH 7,9; 0,42 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM EDTA; 10 % [v/v] Glycerol; 10 mM K ₂ HPO ₄ ; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 10 mM NaF <u>Aliquots</u> bei -20 °C: 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF <u>vor Gebrauch</u> : 1 Aliquot + 141 µl Puffer C; 6 µl Proteaseinhibitor; 1,5 µl Phosphataseinhibitor
----------	---

Puffer für Gesamtproteinextrakte

RIPA	10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,25 % [v/v] SDS; 10 mg/ml Natriumdeoxycholat, 1 % [v/v] Nonidet P 40 <u>Aliquot</u> bei -20 °C: 1 mM Na ₃ VO ₄ , 1 mM DTT; 2 mM PMSF <u>vor Gebrauch</u> : 1 Aliquot + 929,2 µl RIPA; 4,4x10 ⁻⁴ TIU/mg Aprotonin; 2 µM Leupeptin; 100 mM β-Mercaptoethanol
------	--

Puffer für SDS-Gel und Western-Blot

Je nach Herstellerangabe wurde TBS-T oder PBS-T als Waschpuffer verwendet.

Sammelgelpuffer 4x	0,5 M Tris; 0,4 % SDS; pH 6,8 einstellen
Trenngelpuffer 4x	1,5 M Tris; 0,4 % SDS; pH 8,8 einstellen
Laufpuffer 10x	0,25 M Tris; 1,9 M Glycin; 1 % SDS; pH 8,8 stellt sich automatisch ein
Transferpuffer 10x	0,25 M Tris; 1,9 M Glycin, pH 8,0 automatisch
Transferpuffer 1x	10 % 10 x Transferpuffer, 20 % Ethanol (96 %), 70 % bidest. Wasser
Strip-Puffer	20 ml 10 % SDS, 3,1 ml Tris (2 M pH 8) ad 100 ml bidest. Wasser zu 20 ml Puffer 175 µl β-Mercaptoethanol
TBS-T	1 x TBS; 0,1 % Tween-20
PBS-T	1 x PBS; 0,1 % Tween-20

Färbelösung für Hämytoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin	1 g Hämatoxylin, 0,2 g NaJO ₃ ; 50 g Kalialaun ad 1l bidest. Wasser; über Nacht rühren und anschließend 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure zufügen
Eosin	770 ml 96 % Ethanol, 10 ml Phloxin, 100 ml Eosin, 10 ml Eisessig

2.1.5 Kits

DNase I, Amplification Grade	Invitrogen
Effectene Transfection Reagent	Qiagen N.V.
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega Corporation
iScript Select cDNA Synthesis Kit	Bio Rad Laboratories

2.1.6 Größenstandards

DNA Marker	O'GeneRuler 50pb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
Protein Marker	SeeBlue Plus2	Invitrogen
Protein Standard	Protein Standard (BSA) 1 mg/ml	Sigma-Aldrich Co.

2.1.7 Geräte

Biophotometer plus	Eppendorf AG
Blotmodul Xcell II	Invitrogen
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH
Einbettstation: Thermal Console, Dispensing Console, Cryo Console	Microm International GmbH
EI800 <i>Microplate Reader</i>	Bio-Tek Instruments
Elektronische Waage (Kern 440–47)	KERN&SOHN GmbH
Excelsior ES Tissue Processor	Thermo Fisher Scientific Inc.
FACS Calibur	Becton, Dickinson and Company
Heizblock HLC Blockthermostat BT 1303	HLC BioTech
Kamera Axio Cam HRc	Carl Zeiss AG
Kühlzentrifuge Microfuge R	Beckman Coulter
Laborschüttler silent rocker	Cti GmbH
Luminometer Lumat LB 9507	EG&G Berthold
Magnetrührer	Heidolph Instruments
Mikrotom 355S	Microm International GmbH
Mikroskop Axiophot	Carl Zeiss AG
Mikroskop Eclipse TS100-F	Nikon Corporation
PCR Gerät PeqStar 2 x Cyclor	Peqlab Biotechnologie GmbH

Power Supply Power Pac Basic	Bio Rad Laboratories
qPCR Gerät C1000 Touch Thermal Cycler CFX96	Bio Rad Laboratories
SDS Gelelektrophoresekammer Novex Mini-Cell	Invitrogen
Sterile Werkbank	Heraeus Holding GmbH
TissueLyser	Qiagen N.V.
Ultraschallgerät Bandelin Sonoplus	Bandelin electronic GmbH&Co. KG
Wasserbad	Köttermann GmbH&Co. KG
Zentrifuge (Multifuge 1s)	Heraeus Holding GmbH

2.1.8 Statistik

Die Signifikanzen und *standard error of the mean* (SEM) wurden mithilfe der Software *GraphPad Prism 4.0* für jedes Experiment einzeln berechnet. Die Berechnung der Signifikanten erfolgte durch Verwendung des Student's t-Tests (*two-tailed; unpaired; Confidence Interval 95 %*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Das Überleben wurde durch Verwendung der Kaplan-Meier-Methode bestimmt. Hierbei wurde der Tag, an dem jedes einzelne Tier verstarb, verwendet.

Alle Experimente wurden, bis auf nachfolgende Ausnahmen oder wenn nicht anders angegeben, mindestens 3 x unabhängig voneinander ausgeführt:

- Nachweis von Hif-1 α in Hep G2-Zellen nach 6 und 16 h 2-DG -Behandlung wurde 2 x durchgeführt;
- *Dual-Luciferase*-Reporter-Assay wurde für jede Zelllinie 2 x durchgeführt;
- Western-Blots an murinen Geweben: 4 oder 5 Proben je Futterart spiegeln 4 oder 5 unabhängig voneinander ausgeführte Versuche wider.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Kultivierung und Passagieren

Die humanen HCC-Zelllinien (SK-HEP-1 und Hep G2) wurden in entsprechenden Medien (2.1.1.4) im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in 75-cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch auf ihre Zelldichte untersucht und gegebenenfalls passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit 12 ml PBS (ohne Kalzium und Magnesium, Gibco) gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 % in PBS ohne Kalzium, Biochrom AG) im Brutschrank bei 37 °C für 2–5 min (je nach Zelllinie) inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurden diese 1:12 (Hep G2) bzw. 1:14–1:16 (SK-HEP-1) im Medium verdünnt und anschließend weiter kultiviert. Beide Zelllinien wurden kontinuierlich 2 x pro Woche bei einer Konfluenz von 80–95 % passagiert. Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgten alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen.

Aussaat

Beide Zelllinien wurden, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, mittels Trypsin/EDTA abgelöst und im entsprechenden Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf ein geeignetes Volumen und eine geeignete Dichte eingestellt und im gewünschten Format ausgesät.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mithilfe eines Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer). 50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau (Gibco) versetzt und ein Teil der Suspension wurde auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Es wurden nur vitale Zellen, die den Farbstoff nicht aufnehmen, mit einem Handstückzähler gezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in dem aus vier Einzelquadraten bestehenden Großquadrat der Neubauer-Zählkammer. Aufgrund des definierten Ge-

samtvolumens der Neubauer-Zählkammer von $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ }\mu\text{l}$, berechnet sich die Zellzahl in einem Milliliter wie folgt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl}_{\text{Großquadrat}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{4}$$

Aufbewahrung und erneute Kultivierung

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 5 min bei 1000 rpm im 15-ml-Falcon zentrifugiert und anschließend in fötalem Kälberserum (Biochrom AG) mit 10%-Dimethylsulfoxide (DMSO, AppliChem GmbH) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Cryo-Röhrchen im Einfrierbehälter (Cryo 1 °C Freezing Container, Nalgene) langsam auf -80 °C (im Gefrierschrank) gekühlt und dabei schonend eingefroren. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen schonend aufgetaut, 1 x mit Zellkulturmedium gewaschen und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm im 15-ml-Falcon zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, erfolgten die Resuspension des Zellpellets im Medium und die anschließende Überführung in die Zellkulturflasche.

2.2.1.2 Wachstumsanalysen

2.2.1.2.1 Proliferationsassay unter Standardglukosekonzentrationen

Triplikate der SCR- und HIF-Zellen bzw. der Wildtyp-Zellen und der resistenten Zellen wurden in 1 ml Medium in 24-Well-Platten in definierten Zellzahlen (Hep G2 15000 Zellen/Well, SK-HEP-1 20000 Zellen/Well) ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden dann in 24-Stunden-Abständen in einem Zeitraum von 72 h gezählt. Dazu wurden diese mit 400 μl PBS gewaschen und trypsinisiert. Anschließend wurde eine adäquate Menge an PBS (200–500 μl) zugegeben und dazu entsprechend 10–30 μl Trypanblau. Gezählt wurde die Suspension in einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.1.2.2 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration von 2-DG

Um die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) zu bestimmen, wurden beide Zelllinien mit unterschiedlichen 2-DG -Konzentrationen behandelt. Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.2.1 beschrieben ausgesät. Die Behandlung erfolgte mit dem

Mediumwechsel 24 h später über einen Zeitraum von 72 h. Dazu wurde einem ml des Mediums die entsprechende Menge an 2-DG -Lösung zugefügt. Als Kontrolle dienten Triplikate der Zellen, die nach 24 h ebenfalls einen Mediumwechsel erhielten, dabei aber nicht mit antiproliferativen Substanzen behandelt wurden.

2.2.1.2.3 Proliferationassay unter glukosereduzierten Bedingungen mit 2-DG

Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.2.1 beschrieben im Medium mit Standard-Glukosekonzentrationen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und durch Medium mit niedrigen Glukosekonzentrationen (DMEM 10 %FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin; 1 g/l Glukose, RPMI 20 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin; 0,5 g/l Glukose) ersetzt. Gegebenenfalls fand hier auch eine Behandlung mit der unter 2.2.1.2.2 ermittelten IC_{50} für 72 h statt.

2.2.1.3 Zellzyklusanalysen

Es wurden SCR-Zellen beider Zelllinien in 6-Wells (55000 Hep G2-Zellen, 75000 SK-HEP-1-Zellen) im entsprechenden Medium ausgesät. Nach 24 h erfolgten ein Mediumwechsel und ggf. die Behandlung mit verschiedenen Substanzen sowie eine Reduktion der Glukose im Medium. Anschließend wurden die Zellen unter normoxischen Bedingungen 72 h kultiviert. Der Zellzyklus der behandelten Zellen sollte mit dem der unbehandelten Zellen verglichen werden. Dazu wurden die Zellen nach 72 h geerntet. Der Zellüberstand wurde in ein 15-ml-Falcon überführt. Zu diesem kam 1 ml PBS vom Waschschrift, die Zellen in 500 μ l Trypsin (Inkubation bei 37 °C für 15 min) sowie ein weiterer ml eines zweiten PBS-Waschschrifts hinzu. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1300 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 900 μ l PBS resuspendiert und die Zellen wurden mithilfe einer Multipipette und aufgesteckter 10- μ l-Spitze vereinzelt. Darauf folgend wurden die Zellen mit 3-mal 700 μ l eiskaltem 96-prozentigen Ethanol für mindestens 20 min bei -20 °C fixiert. Hier können die Zellen für 1–2 Wochen im -20-°C-Gefrierschrank gelagert werden. Für die folgende Zellzyklusanalyse wurden die Zellen für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, 1-mal mit 1 ml PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 300 μ l Propidiumjodid resuspendiert und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Das Propidiumjodid interkaliert in die DNA und lässt somit eine Aussage über den DNA-Gehalt der Zellen zu. Die Messung von 10000 Zellen jeder

Probe erfolgte mithilfe der Software *CellQuest* im FACS-Calibur-Gerät (Becton, Dickinson and Company).

2.2.1.4 Transiente Transfektion und *Dual-Luciferase-Assay*

Transiente Transfektion mit Effectene

Um die Aktivität des Hif-1-Proteins zu messen, wurden sowohl die Hep G2- und SK-HEP-1-Wildtyp-Zellen als auch die resistenten Zellen beider Zelllinien mithilfe der Transfektionsreagenz Effectene (Effectene Transfection Reagent, Qiagen N.V.) transfiziert. Hierfür wurden 30000 Zellen im 24-Well ausgesät. Die Aussaat jeder Probe erfolgte in Triplikaten. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen mit 100 ng pHRE-Luc (*Firefly* Luciferase) Reporterplasmid transfiziert (151). Als Expressionskontrolle wurden 30 ng des pRL-null-Plasmids (*Renilla* Luciferase, Promega Corporation) ko-transfiziert. Je 1-fach-Ansatz wurden 13,3 µl Enhancer und 10 µl Effectene je 1 µg DNA verwendet. Nach einer 4- bis 6-stündigen Inkubation des Transfektionsansatzes wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und in 500 µl Medium für 28–46 h inkubiert.

Dual-Luciferase-Assay

Die Analyse wurde mittels Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Corporation) durchgeführt. Zur Lyse der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und in 100 µl 1 x passivem Lysepuffer für 20 min auf einem Laborschüttler inkubiert. Anschließend wurden 25 µl der Lysate in Messröhrchen überführt. Die Messung erfolgte mit dem Lumat LB 9507 Luminometer (EG&G Berthold). Das Gerät führte der Probe zunächst 25 µl Luciferase Assay Buffer II zu. Nach Quantifizierung der Lumineszenz der *Firefly* Luciferase wurde die Reaktion durch Zufügen von 25 µl Stop & Glo Reagent gestoppt und gleichzeitig wurde die Lumineszenzreaktion der *Renilla* Luciferase gestartet und quantifiziert. Die Messung wurde in Form von *Relative Light Units* (RLU) berechnet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation aus Zellen und Konzentrationsbestimmung

RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde RNase-freies Wasser (DEPC) verwendet. Alle analysierten Zelllinien wurden in 6-cm-Schalen zu je 200000 Zellen je Schale ausgesät. Nach 24 h erfolgten ein Mediumwechsel und ggf. die Behandlung mit 2-DG oder glukosereduziertem Medium. Auch nicht behandelte Zellen wurden zur Standardisierbarkeit der Versuchsreihen der gleichen Prozedur unterzogen. Nach weiteren 24 h erfolgte die Gesamt-RNA-Isolation. Hierzu wurde das Medium vollständig entfernt und jede Schale mit 300 µl TRIzol Reagent (Ambion) benetzt. Nachdem die Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt wurden, wurden der Zellsuspension 60 µl Chloroform zugefügt. Nach einer 2- bis 3-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C für 10 min bei 10000 rpm. Hierbei trennte sich die Probe in mehrere Phasen auf, wobei sich die RNA in der oberen, wässrigen Phase anreicherte. Nachdem diese Phase sorgfältig und ohne Kontamination durch die Interphase abgenommen wurde, erfolgte die RNA-Fällung jeder Probe durch Zugabe von 150 µl Isopropanol und anschließende Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Nach einer Zentrifugation (10000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 75-prozentigem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 12–15 µl DEPC-Wasser gelöst.

Konzentrationsbestimmung

Die Messung der RNA erfolgte mittels UV-Küvette im Biophotometer plus (Eppendorf AG). Hierfür wurde die RNA 1:100 mit DEPC-Wasser verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Als Leerwert diente DEPC-Wasser.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

DNA-Verdau

Alle Arbeiten wurden auf Eis und mit RNase-freiem Wasser (DEPC) durchgeführt. Zum DNA-Verdau wurde 1 µg RNA Suspension mit DEPC-Wasser auf 8 µl aufgefüllt. Danach wurden jeweils 1 µl DNase I *Reaction Buffer* und DNase (1 U/µl) (Kit: DNase I

Amplification Grade, Invitrogen) zugefügt und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 µl 25 mM EDTA zugefügt und der Reaktionsansatz bei 65 °C für 10 min durch Hitze inaktiviert. Nachdem der Reaktionsansatz mit 2 µl DEPC-Wasser auf 13 µl aufgefüllt wurde, wurde die RNA in cDNA transkribiert.

cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das iScript Select cDNA Synthesis Kit (Bio Rad Laboratories) verwendet. Zu dem Reaktionsansatz nach DNA-Verdau wurden 7 µl eines Mastermixes (4 µl 5 x iScript reaction mix, 2 µl Oligo(dT)₂₀ primer, 1 µl iScript reverse transcriptase) gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemixt und für 60–90 min bei 42 °C im Heizblock (HLC Blockthermostat BT 1303, HLC BioTech) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase für 5 min bei 85 °C. Um eine Endkonzentration von 20 ng/µl cDNA zu erhalten, wurde der Ansatz mit 30 µl DEPC-Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 Isolation genomischer DNA für Genotypisierung

Die Isolation der genomischen DNA aus Schwanzbiopsien oder Ohrbiopsien diente der Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere. Hierbei wurde zum einen ermittelt, ob beide *HIF1A*-Allele durch loxP-Seiten flankiert sind, und zum anderen, ob die Versuchstiere die Cre-Rekombinase tragen. Dazu wurden die Biopsien zunächst in 600 µl 50-mM-Natriumhydroxid für 10 min bei 95 °C im HLC Blockthermostat BT 1303 (HLC BioTech) inkubiert. Nachdem die Proben 2–3 min auf Eis abgekühlt wurden, wurden 50 µl 1 M Tris pH 8,0 zugefügt und die Suspension gevortext. Die Proben wurden bei 4 °C bis zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion aufbewahrt. Danach erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

2.2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung der Versuchstiere

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden ausgewählte DNA-Abschnitte durch Verwendung spezifischer Primer und einer Taq-Polymerase durch den PeqStar 2 x Cycler (Peqlab Biotechnologie GmbH) amplifiziert. Die PCR fand in einem Volumen von 25 µl (Cre) oder 27 µl (HIF) statt. Hierzu wurden je 1-x-Ansatz

12,5 µl 2 x Taq-Polymerase Mastermix, 10,5 µl DEPC-Wasser und jeweils 0,5 µl Primersuspension (10 pmol/µl) verwendet. Es wurden 1 µl (Cre) oder 3 µl (HIF) genomische DNA eingesetzt.

Primer

Cre PCR	NewCre_R, NewCre_F
HIF PCR	HIF24, HIF25

PCR Programm

Cre PCR

initiale Denaturierung	94 °C 2 min	
Denaturierung	94 °C 45 s	} 30 Zyklen
Primerannealing	62 °C 45 s	
Elongation	72 °C 45 s	
finale Elongation	72 °C 10 min	

HIF PCR

initiale Denaturierung	94 °C 1.45 min	
Denaturierung	94 °C 25 s	} 36 Zyklen
Primerannealing	57 °C 45 s	
Elongation	72 °C 1 min	
finale Elongation	72 °C 10 min	

2.2.2.4.2 Quantitative *Real-Time*-PCR

Alle Arbeiten wurden auf Eis und mit RNase-/DNase-freiem Wasser durchgeführt. Durch die quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR) kann die mRNA-Menge, welche zuvor in cDNA transkribiert wurde, quantifiziert werden. Alle hier gezeigten qPCRs wurden mit spezifischen Primern und dem SYBR Green RCR Master Mix (Applied Biosystems) in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt. Jeder Ansatz der Doppelbestimmung setzte sich wie folgt zusammen:

0,75 µl je Vorwärts- und Rückwärts-Primer 10 pmol/µl, 12,5 µl 2 x SYBR Green Master Mix, 9 µl bidest. Wasser, 2 µl cDNA.

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert während der Elongationsphase in die cDNA der Probe. Durch die Anregung mit UV-Licht kann die Fluoreszenz des interkalierten Farbstoffs gemessen und der DNA-Gehalt der Probe so quantifiziert werden. Um Kontaminationen detektieren zu können, wurde je Ansatz eine *no-template-control* (NTC), die keine cDNA enthielt, pipettiert. Zur Normalisierung aller Proben wurde die Fluoreszenz des Haushaltsgens β -Aktin (*ACTB*) gemessen.

Die Messung aller Gene erfolgte durch den C1000 Touch Thermal Cycler CFX96 (Bio Rad Laboratories) unter Verwendung des folgenden Programms:

95 °C 10 min, 44 x Zyklen (95 °C 15 s, 60 °C 1 min), 55 °C 30 s, 95 °C 30 s, Schmelzkurve.

Die Quantifizierung erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Normalisiert man anschließend alle Proben auf eine Kontrolle, so kann man die relative Expression dieser Proben ermitteln.

2.2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente der Feststellung des Genotyps der potenziellen Versuchstiere. Hierbei werden die DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. Für das Gel wurde die entsprechende Agarosemenge in 1-x-TAE-Puffer aufgekocht und mit $1/10$ Ethidiumbromidlösung (1:5 in DEPC) versetzt. Es wurden dem PCR-Mix nach Ende der PCR 5 μ l DNA-Ladepuffer zugefügt und 25 μ l des Mixes wurden auf ein Agarosegel (1,5 % Gel für CRE, 2 % Gel für HIF) aufgetragen. Das Gel wurde in 1-x-TAE bei einer Spannung von 120 Volt aufgetrennt und zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Isolation von Kernextrakten aus HCC-Zelllinien

Behandlung

Es sollte nur die aktive Form von Hif-1 α , welche sich im Kern befindet, nachgewiesen werden. Für den Nachweis von Hif-1 α erfolgte die Isolation von Kernextrakten aus den entsprechenden Zelllinien.

Hierzu wurden die Zellen in 10-cm-Zellkulturschalen (Hep G2 550000/Schale, SK-HEP-1 750000/Schale) in 10-ml-Zellkulturmedium ausgesät. Nach einer Inkubati-

on von ca. 24 h erfolgten ein Mediumwechsel und ggf. die Behandlung mit der entsprechenden 2-DG -Menge für 16 h. Nach 16 h erfolgten die Isolation der Kernextrakte und ggf. gleichzeitig die Behandlung weiterer Zellen für 6 h mit 2-DG.

Für die Isolation der Kernextrakte aus Wildtypzellen und aus resistenten Zellen war keine Behandlung mit 2-DG notwendig. Hier erfolgte trotzdem ein Mediumwechsel 24 h nach Aussaat. Dies diente der Standardisierung des Behandlungsablaufs.

Isolation

Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Die adhärennten Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen. Alle Proben wurden dann mit 300 µl Puffer A in Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 3 µl 12,5 % Nonidet P 40 erfolgte die Dissemblierung der Zellmembran für 5 min. Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 1000 g (4300 rpm) wurde der Überstand, der die Cytoplasmaextrakte enthielt, verworfen. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 30 µl Puffer C. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 12000 g) wurde der Überstand mit den Kernextrakten in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Kernextrakte erfolgte bei -20 °C. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mithilfe der Bradford-Methode.

2.2.3.2 Isolation von Gesamtprotein aus Gewebeproben

Kleine Gewebeproben (Würfel mit ca. 3 mm Kantenlänge) wurden mithilfe des TissueLyser (Qiagen N.V.) im tiefgefrorenen Zustand für 1 min bei 30 rpm/s pulverisiert. Eine Spatelspitze dieses Pulvers (ca. 10–12 mg) wurde auf Trockeneis in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 100 µl RIPA Puffer (mit Mercaptoethanol) wurde das Pulver durch mehrmaliges Pipettieren gelöst. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde das Gewebe in 6 Zyklen für je 20 s und 50 % Leistung mit dem Bandelin Sonoplus Ultraschallgerät (Bandelin electronic GmbH & Co. KG) auf Eis sonifiziert. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Lysate für 20 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Durch das im Puffer enthaltene Mercaptoethanol wurden die Proteinmengen mithilfe der Bradford-Methode bestimmt.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode

Die Messung erfolgte im 96-Well-Format mithilfe des EI800 Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc.) und der KCjunior Software (Bio-Tek Instruments, Inc.) bei 595 nm. Alle Proben (1 μ l) sowie 1, 2, 4, 6 und 8 μ g des Standard (BSA 1 μ g/ μ l) wurden in Duplikaten bestimmt. Hierzu wurden zunächst 50 μ l zweifach destilliertes (bidest.) Wasser je Well pipettiert. Danach wurden Proben sowie Standard hinzupipettiert, zum Schluss wurde dem Ansatz 200 μ l 1:4 Bradford-Reagenz (Roti-Quant, Carl Roth GmbH + Co. KG, Endkonzentration 1:5) hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Proteinmessung.

2.2.3.4 Detektion von Proteinen

2.2.3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*) können die denaturierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die SDS-Gele, bestehend aus Trenn- und Sammelgel wurden in Gelkassetten der Firma Invitrogen gegossen. Das Trenngel mit einem Acrylamidgehalt von 8 % (HIF) oder 12 % (murine Gewebeproben) wurde bis 2 cm unterhalb des oberen Gelrands gegossen und mit Isopropanol (zur Erzeugung eines gleichmäßigen Randes) überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und ein 4,5%-Sammelgel darüber gegossen. Jedes Sammelgel wurde mit einem 12-Well-Kamm versehen. Die Proteinlysate wurden von dem Auftrag in 5-x-Nu-PAGE-Puffer für 10 min bei 70 °C im HLC Blockthermostat BT 1303 (HLC Bio-Tech) denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 120 V in der Novex Mini-Cell Kammer (Invitrogen) im 1-x-Laufpuffer. Als Größenstandard wurden 5 μ l des SeeBlue Plus2 Proteinmarkers aufgetragen.

Komponenten	Trenngel		Sammelgel
	8 %	12 %	4,5 %
Polyacrylamid (30 %)	2,14 ml	3,2 ml	500 µl
Trenngelpuffer 4x	2 ml	2 ml	–
Sammelgelpuffer 4x	–	–	875 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	54 µl	54 µl	30 µl
TEMED	2,7 µl	2,7 µl	3 µl
bidest. Wasser	3,81 ml	2,75 ml	2,5 ml

2.2.3.4.2 Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran (GE Healthcare) übertragen und durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Hierzu wurde ein Nass-Blot-Modul der Firma Invitrogen eingesetzt. Alle Komponenten des Nass-Blots wurden in 1-x-Transferpuffer getränkt und dann wie folgt luftblasenfrei aufgebaut: Minuspol-3 Schwämme, 1 Löschpapier (VWR International), Polyacrylamidgel, Nitrocellulosemembran, 1 Löschpapier (VWR International), 3 Schwämme-Pluspol. Das Blot-Modul wurde vollständig mit 1-x-Transferpuffer befüllt und die Kammer zur Kühlung des Blots mit bidest. Wasser befüllt. Der Proteintransfer erfolgte 1 h bei 30 V.

2.2.3.4.3 Immundetektion der Proteine

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur in 5%-Magermilch-Waschpuffer geschwenkt. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte in entsprechender Verdünnung bei 4 °C über Nacht. Sofern der Antikörper in TBS-T verdünnt wurde, erfolgte ein kurzer Waschschrift der Membran zur Entfernung der restlichen Magermilch. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran 3 x mit Waschpuffer gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur im sekundären Antikörper geschwenkt. Nach weiteren 3 Waschschriften erfolgte die Inkubation der Membran mit den ECL-Reagenzien, die zu gleichen Teilen gemischt wurden. Hierzu wurde die Membran auf eine Klarsichtfolie gelegt und mit dem ECL-Gemisch für 2 min überschichtet. Anschließend wurde eine weitere Folie auf den Blot gelegt und das restliche ECL durch Wischen luftblasenfrei entfernt. Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte in einer Autoradiografiekassette (Hypercasset-

te, Amersham) durch Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak BioMax Light Film, Sigma-Aldrich Co.) auf die Nitrozellulosemembran für 10 s bis 30 min. Die nachfolgende Entwicklung und Fixierung des Films machte die Proteinbanden sichtbar.

2.2.3.4.4 Strippen von Membranen

Der Nachweis phosphorylierter Proteine und der anschließende Nachweis der unphosphorylierten Form auf derselben Membran können nur durch Entfernung des Antikörpers, welcher die phosphorylierte Form nachweist, geschehen. Dazu musste die Membran in einem Strip-Puffer für 20 min bei 55 °C im Wasserbad (Köttermann) geschüttelt werden. Die Membran wurde anschließend 3 x 10 min mit Waschpuffer gewaschen und erneut mit Magermilch geschwenkt.

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden

2.2.4.1 Versuchstiere und Haltung

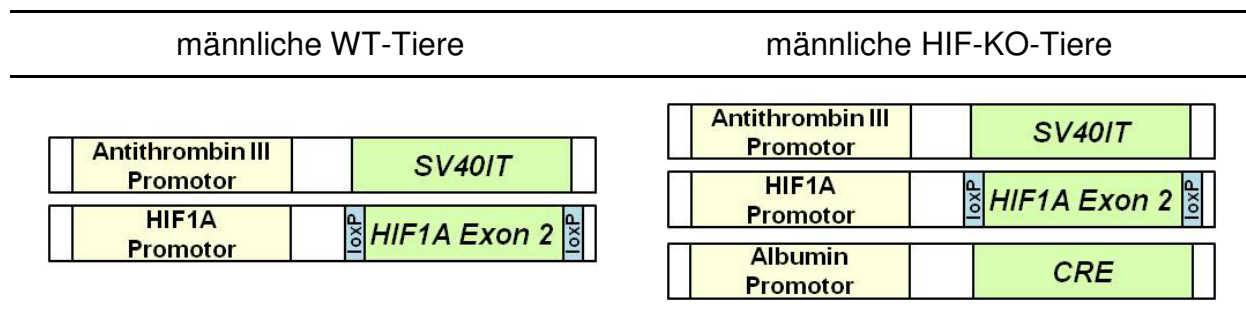
ASV-B-HCC-Mausmodell

In dem in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mausmodell erfolgt die Induktion eines Hepatozellulären Karzinom durch Verwendung des *Simian Virus large T antigen* (SV40IT) in einem C57Bl/6J-Stamm. Die spezifische Expression dieses Onkogens erfolgt durch die Verwendung des hepatozytenspezifischen Antithrombin III-Promotors (152). Diese Tiere zeigen erste Leberdysplasien im Alter von 8 Wochen, welche sich im Zeitverlauf über das adenomatöse Stadium (12 Wochen) bis hin zum Hepatozellulären Karzinom (> 16 Wochen) entwickeln (152; 153). Die Expression des *SV40IT* erfolgte aufgrund der y-chromosomalen Vererbung nur in männlichen Tieren.

Leberspezifische Hif-1 α -Inaktivierung im ASV-B-Modell

Um die Bedeutung von Hif-1 für die Pathogenese des HCC beurteilen zu können, wurde die sauerstoffabhängig regulierte Untereinheit Hif-1 α durch Verwendung des Cre/loxP-Systems konditionell inaktiviert (154). Hierbei erkennt die aus dem Bakteriophagen P1 stammende Cre-Rekombinase die loxP-Sequenzen in der DNA und schneidet den dazwischen liegenden DNA-Abschnitt heraus. Bei den in dieser vorliegenden Arbeit verwendeten Tieren ist das Exon 2 von *HIF1A* mit loxP-Sequenzen

flankiert ($HIF1A^{+/+^f}$) (155). Damit die Deletion des Hif-1 α hepatozytenspezifisch erfolgt, wurde der Cre-Rekombinase der leberzellenspezifische Albumin-Promotor vorangestellt (AlbCre) (156). Für die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden männliche Mäuse, die homozygot für das gefloxtete $HIF1A$ -Allel und hemizygot für $SV40IT$ waren, mit weiblichen Tieren, die homozygot für das gefloxtete $HIF1A$ -Allel waren, gekreuzt. Wichtig war hierbei, dass ein Zuchttier positiv für die AlbCre-Rekombinase (AlbCre+) und ein Tier negativ für die AlbCre-Rekombinase (AlbCre-) getestet wurde. Die hierbei gezüchteten Tiere, welche das $HIF1A$ -WT-Allel trugen, wurden im Folgenden als WT-Tiere, und die Tiere, die durch das Vorhandensein der AlbCre-Rekombinase eine funktionelle Inaktivierung des Hif-1 α trugen, als HIF-KO-Tiere bezeichnet.



Tierhaltung

Für das Studium der Auswirkungen einer 2-Deoxy-D-Glukose-Behandlung und der Kohlenhydratrestriktion auf das Wachstum des murinen Leberkarzinoms wurden Tiere im Alter zwischen 14 und 20 Wochen für die Versuchsreihen verwendet. Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité mit einem 12h/12h-Zyklus gehalten. Wasser und Futter standen *ad libitum* zur Verfügung.

2.2.4.2 Behandlung der Versuchstiere

2-DG-Behandlung

Die Behandlung der 15 Wochen alten ASV-B-Tiere (Wildtyp) mit 500 mg/kg 2-DG sowie die Datenerfassung (Lebergewicht, Körpergewicht) und die finale Leberentnahme erfolgten durch ein Mitglied der Arbeitsgruppe. Die Behandlung der Tiere erfolgte über einen Zeitraum von 6 Tagen. Hierbei wurde das 2-DG in PBS gelöst und in der entsprechenden Menge intraperitoneal verabreicht.

Verabreichung des Spezialfutters und 2-DG-Behandlung

Die Übersicht über die Inhaltsstoffe des Standardfutters und 15-%-KH-Futters ist im Anhang zu finden.

ASV-B-Adenom-Tiere

Ab einem Alter von $14 \pm 0,5$ Wochen erfolgten der Futterwechsel und die Verabreichung des kohlenhydratreduzierten Spezialfutters der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH (15-%-KH-Futter, Tabelle 6). Nach einer 2-wöchigen Eingewöhnungsphase wurde den Tieren zusätzlich 2-DG in 2 Zyklen je 5 Tage mit 2-tägiger Pause intraperitoneal verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten das entsprechende Lösungsmittel (PBS) (Abb. 17).

ASV-B-HCC-Tiere

Die ASV-B-HCC-Tiere erhielten das kohlenhydratreduzierte Futter in einem Alter von 16–17 Wochen. Die Fütterung erfolgte über einen Zeitraum zwischen 3,5 und 4 Wochen. Nach Beendigung der Versuche konnten die Histologien von 4 WT-Tieren und 2 WT-Tieren durch einen Pathologen analysiert werden.

Mobilitätsmessungen

Die Messung der freiwilligen Aktivität von 2 Standardfutter- und 3 15-%-KH-Futter-WT-Tieren erfolgte durch die Messung der täglich im Laufrad gelaufenen Strecke und der täglichen Durchschnittsgeschwindigkeit der Tiere. Die Laufräder wurden durch die AG Regitz-Zagrosek vom Berliner Institut für Geschlechterforschung in der Medizin der Charité zur Verfügung gestellt. Diese ASV-B-Adenom-Tiere erhielten, wie bereits beschrieben (2.2.4.2), die kohlenhydratreduzierte Kost über einen Zeitraum von 4 Wochen. 11 Tage nach Fütterungsbeginn wurden die Tiere in gesonderte Käfige gesetzt und erhielten alle jeweils ein Laufrad. In den nächsten 3 Tagen wurden keine Messungen durchgeführt, sie dienten den Tieren zu Übungszwecken und der Gewöhnung an das Laufrad. Nach 3-tägiger Übung begann die Dokumentation der gelaufenen Strecke und Laufgeschwindigkeit für 14 Tage (Abb. 21). Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die gelaufene Strecke aller Tiere notiert. Obwohl die Gruppengröße nicht gleich war, konnte die Tendenz einer gesteigerten Laufstrecke der Tiere, welche 15-%-KH-Futter erhielten, verzeichnet werden. Diese Tendenz war auch bei der Berechnung der Durchschnittstrecke je Tier zu sehen. Aus diesem

Grund wurde darauf verzichtet, die gelaufene Durchschnittstrecke jedes Tieres im Ergebnisteil dieser Arbeit zu belegen. Zusätzlich zur Laufstrecke wurde die Durchschnittsgeschwindigkeit aller Tiere einer Gruppe ermittelt.

2.2.4.3 Probenentnahme

Blutzuckerbestimmung aus der Schwanzvene

Zur Ermittlung der Blutzuckerspiegel der Tiere, die Standardfutter und 15%-KH-Futter erhielten, wurde die Schwanzvene aller Tiere mit einer 26¹/₂-G-Kanüle (B.Braun Melsungen AG) punktiert und der Blutzuckerspiegel durch das Blutzuckermessgerät Contour (Bayer AG) bestimmt.

Blutentnahme zur Bestimmung der Leberparameter AST und ALT

Die Parameter Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) geben Aufschluss über das Maß der Leberschädigung. Die Bestimmung beider Parameter sowie die Ermittlung des De-Ritis-Quotienten (AST/ALT) erfolgten nach Beendigung des Versuchs durch Blutentnahme bei den Versuchstieren. Hierbei wurden je Gruppe 5 Tiere analysiert. Die Tiere waren bei Fütterungsbeginn 18 Wochen alt und erhielten das 15%-KH-Futter für 7 Tage. Das Blut wurde aus der *Arteria carotis* der kurz zuvor getöteten Tiere entnommen. Hierzu wurde ein Kehlschnitt durchgeführt und das so gewonnene Blut sofort in Serumröhrchen überführt. Die Blutanalyse (Leberprofil) wurde durch die Firma synlab.vet GmbH durchgeführt. Die zur Bestimmung der Leberschädigung notwendigen AST- und ALT-Normwerte wurden dem Datenblatt der Firma entnommen (siehe Anhang).

Gewebeentnahme zur Einbettung in Paraffin und Lagerung im Flüssigstickstoff

Die Gewebeentnahme erfolgte nach Versuchsende. Hierfür wurde zunächst die gesamte Leber entnommen und gewogen. Die Probenentnahme für die Fixierung in 10%-Formalin, spätere Fixierung in Paraffin und histologische Aufbereitung erfolgten aus dem *Lobus lateralis sinister* (seitlicher linker Leberlappen). Es wurden je Versuchstier 2 Leberschnitte mit einer Schnittdicke < 3 mm mit dem Skalpell entnommen und in Formalin fixiert (rührend, 4 °C über Nacht). Anschließend erfolgte die Entnahme von Gewebestücken (Kantenlänge 3 mm) aus Tumorgewebe. Sofern möglich,

erfolgte die Entnahme aus demselben Leberlappen. Es wurden jeweils 4 Gewebestücke entnommen und im flüssigen Stickstoff eingefroren und gelagert.

2.2.5 Immunhistologie

2.2.5.1 Einbetten der Gewebeproben in Paraffin

Um die Gewebeproben haltbar zu machen, wurden diese rührend über Nacht in 10%-Formalin bei 4 °C fixiert, anschließend 2 x 45 min mit 1-x-PBS gewaschen und dann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe im Excelsior ES Tissue Processor (Thermo Fisher Scientific Inc.) dehydriert. Das Programm war wie folgt aufgebaut:

70%-Ethanol 1 h, 80%-Ethanol 1 h, 96%-Ethanol 30 min, 100%-Ethanol 30 min, 100%-Ethanol 1 h, 100%-Ethanol 1 h, Xylol 1h, Xylol 1 h 30 min, Xylol 1 h 30 min, Wachs 1 h, Wachs 1 h 30 min, Wachs 1 h 30 min.

Anschließend wurden die Gewebe in Paraplast (McCormick Scientific) eingebettet.

2.2.5.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Die Herstellung der Gewebeschnitte erfolgte unter Zuhilfenahme des HM 355S Mikrotoms (Microm International GmbH). Die zu schneidenden Gewebe wurden mindestens 24 h bei -20 °C gelagert. Der Kühlblock des Mikrotoms verhindert eine Aufwärmung des Paraffins und gewährleistet die ideale Schnitttemperatur. Zur Entfernung des überschüssigen Paraffins wurde der Block mit einer Schnittdicke von 20 µm angeschnitten. Sobald der Gewebeteil freigelegt wurde, erfolgte die Reduktion der Schnittdicke auf 10 µm. Es wurde solange weitergeschnitten, bis die vollständige Gewebeprobe sichtbar wurde. Nach einer erneuten Lagerung der angeschnittenen Proben bei -20 °C für mindestens 24 h erfolgte der Feinschnitt der Proben. Es wurden 1,5 µm dicke serielle Schnitte angefertigt.

2.2.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Kern-Zytoplasma-Färbung. Das Zellplasma wird hierbei rosa und die Zellkerne werden blau bis violett gefärbt. Um die Gewebe mit Hämatoxylin und Eosin färben zu können, erfolgte zunächst eine Entparaffinierung der Gewebeschnitte über eine absteigende Alkoholreihe: 3 x

10 min Xylol, 1 x 10 min 100%-Ethanol, 1 x 10 min 96%-Ethanol, 1 x 5 min 90%-Ethanol, 1 x 5 min 80%-Ethanol, 1 x 5 min 70%-Ethanol, 2 x 5 min bidest. Wasser. Anschließend erfolgte eine 10-min-Färbung mit Hämatoxylin, gefolgt von einem 10-min-Waschschritt mit fließendem Leitungswasser, der zur Blaufärbung der Zellkerne führte. Zuletzt wurde das Zellplasma für 8 s mit Eosin eingefärbt und das überschüssige Eosin mit bidest. Wasser entfernt. Alle Schnitte wurden mit Kaisers Glyceringelatine (Merck KGaA) eingedeckt.

2.2.5.4 Analyse der Tumorlast durch die Verwendung von ImageJ

Da die histologische Analyse der Tumorlast speziell zur Auswertung der im Verlauf in dieser Arbeit angefertigten H&E-Schnitte diente, wird sie unter 3.2.2.1 näher erklärt. Es wurden jeweils 2 Gewebeschnitte je Maus ausgewertet. Es konnte dadurch eine Aussage über den Anteil der tumorösen Fläche an der Gesamtfläche des Schnitts getroffen werden. Eine Anzahl der Tumorknoten konnte jedoch nicht ermittelt werden, da die einzelnen Knoten nicht gut voneinander differenzierbar waren. Es wurden 6 Tiere und sofern möglich 2 Schnitte pro Tier je Gruppe ausgewertet. Die Gruppe der HIF-KO-Tiere, die kohlenhydratreduziertes Futter und 2-DG erhielten, bestand aus 5 Tieren.

Erstellung der Gesamtschnitte

Mikroskop	Axiophot	Carl Zeiss AG
Kamera	Axio Cam HRc	Carl Zeiss AG
Kameraprogramm	Axio Vision Rel 4.7	Carl Zeiss AG
Grafikprogramm	Adobe Photoshop Elements 4.0	Adobe Systems Incorporated

Auswertung der Schnitte

Programm	ImageJ	
Mikroskop	Exclipse TS100-F	Nikon Corporation

3 Ergebnisse

Um die Bedeutung der Glykolyse für die Progression des HCC zu analysieren, wurden die 2 humanen HCC-Zelllinien Hep G2 (gut differenziert) und SK-HEP-1 (schlecht differenziert) mit dem etablierten Glykolyseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) behandelt. Anschließend sollten die *In-vitro*-Ergebnisse im etablierten ASV-B-Mausmodell validiert werden. Bei diesem Mausmodell handelt es sich um ein etabliertes HCC-Modell (2.2.4.1).

3.1 *In-vitro*-Analyse zweier Leberkrebszelllinien nach Behandlung mit 2-DG

3.1.1 Analyse des Proliferationsverhaltens

Es sollte zunächst eine geeignete Arbeitskonzentration für 2-DG, bei der nur noch 50 % der Zellen proliferieren (mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50}), ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden beide HCC-Zelllinien über einen Zeitraum von 72 h mit unterschiedlichen 2-DG-Konzentrationen behandelt. Die Zellzahlen wurden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) bestimmt. Es zeigte sich eine Hemmung der Proliferation in beiden Zelllinien. Diese Inhibition war zeitabhängig (Abb. 4).

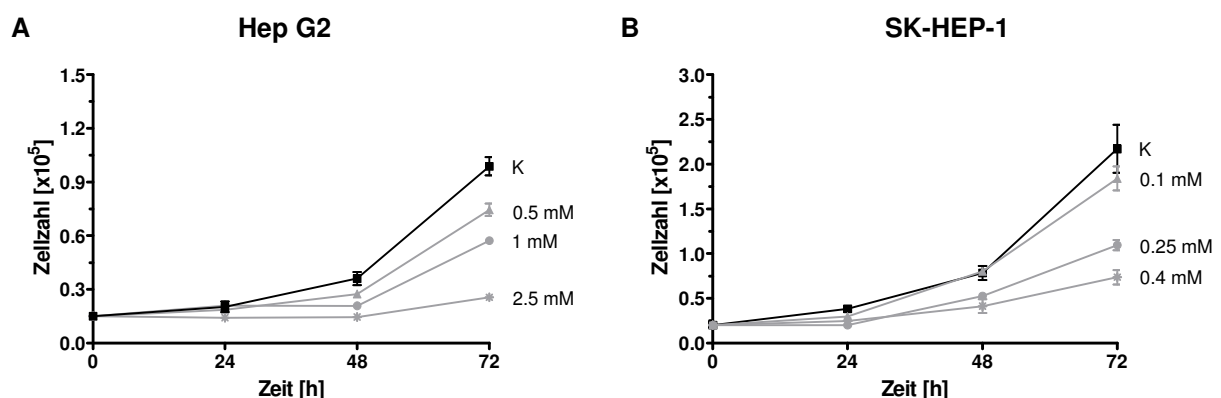


Abb. 4: Zeitabhängige Proliferationshemmung bei Behandlung mit 2-DG

Gezeigt sind die absoluten Zellzahlen von unbehandelten (schwarz) und mit 2-DG behandelten (grau) Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) bei unterschiedlichen 2-DG-Konzentrationen nach 24 h, 48 h und 72 h. K – Kontrolle

Anschließend wurde das Zellteilungsverhalten der behandelten Zellen dem der unbehandelten Zellen gegenübergestellt. Es zeigte sich neben dem zeitabhängigen

auch ein dosisabhängiger Effekt in beiden Zelllinien (Abb. 5). Im Verlauf dieser Analysen konnte 1 mM 2-DG als IC_{50} der Hep G2-Zellen und 0,25 mM 2-DG als IC_{50} der SK-HEP-1-Zellen ermittelt werden. Hierbei wies die schlecht differenzierte HCC-Zelllinie SK-HEP-1 eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber 2-DG auf (Abb. 5).

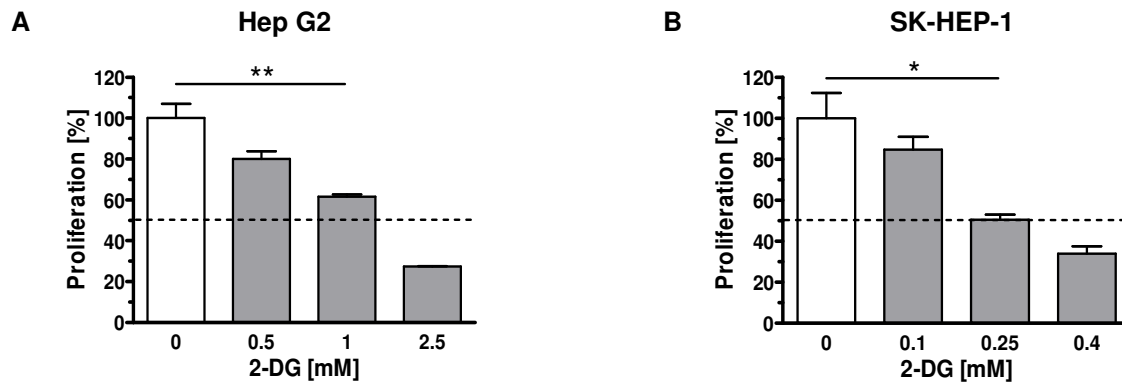


Abb. 5: Dosisabhängige Proliferationshemmung bei 2-DG-Behandlung

Gezeigt ist die Inhibition der Proliferation der Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) nach 72-stündiger Behandlung mit verschiedenen 2-DG-Konzentrationen (grau) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (weiß) in Prozent. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Alle hierauf folgenden *In-vitro*-Experimente wurden unter Verwendung der hier ermittelten zellspezifischen IC_{50} durchgeführt.

3.1.2 Zellzyklusanalyse der HCC-Zelllinien

Es ist bekannt, dass die Behandlung mit 2-DG zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose in verschiedenen Zelllinien (z. B. Glioblastomzellen und Eierstockkrebszellen) führte (69). Zellzyklusarrest und Apoptose könnten mögliche Ursachen der verminderten Proliferation beider Zelllinien bei Behandlung mit 2-DG darstellen. Hierzu wurden beide Zelllinien über einen Zeitraum von 72 h mit 2-DG behandelt und die Zellen anschließend analysiert. Sowohl bei Hep G2- als auch bei SK-HEP-1-Zellen zeigte sich eine Verteilung der Zellen in Prä-G1-, G1/G0-, S- und G2/M-Phase. Die Behandlung mit 2-DG führte in keiner der beiden Zelllinien zu Veränderungen im Zellzyklus, verglichen mit der Zellzyklusverteilung der unbehandelten Zellen (Abb. 6).

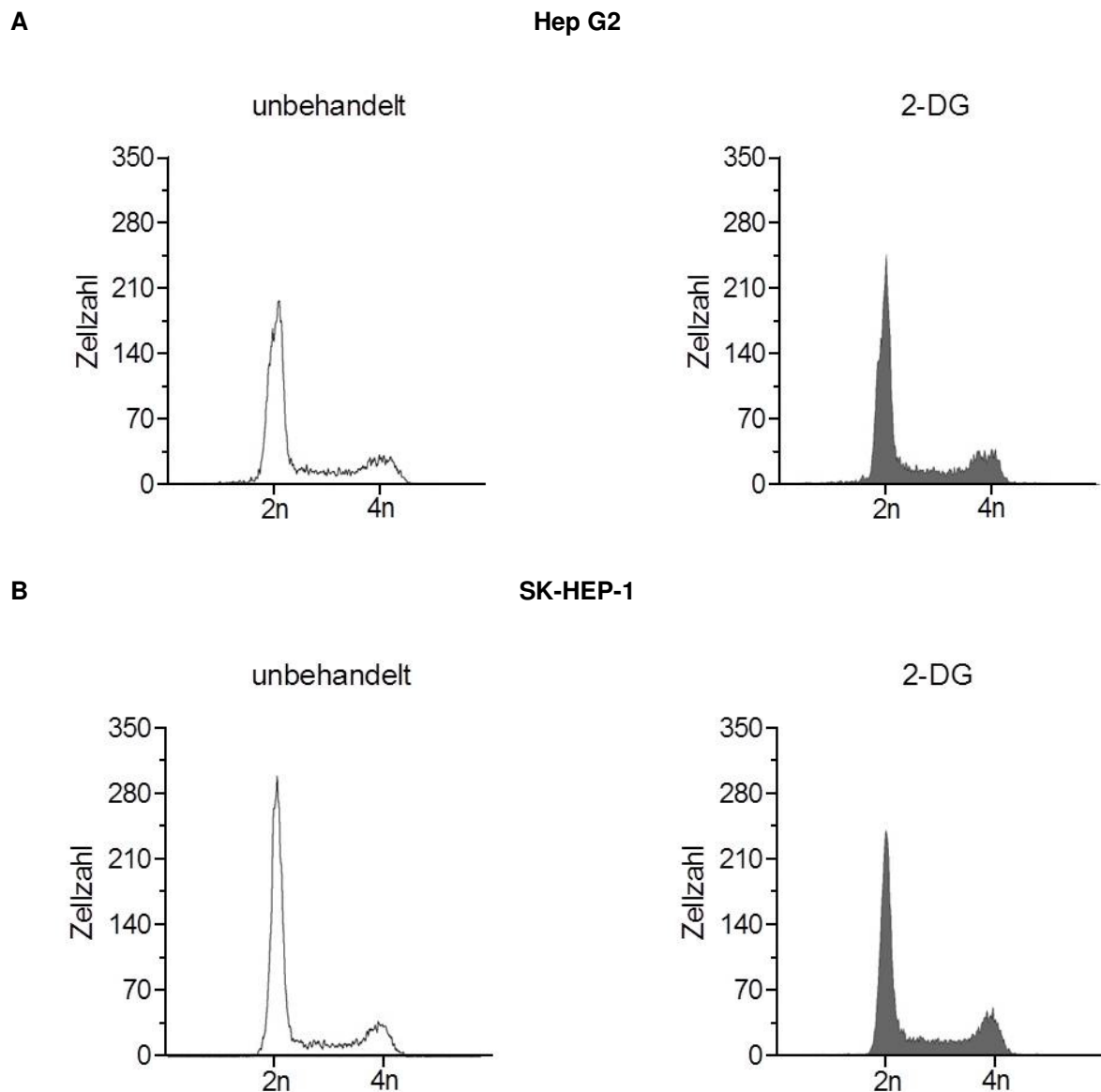


Abb. 6: Zellzyklusverteilung der Hep G2- und SK-HEP-1 Zellen nach Behandlung mit 2-DG

Gezeigt ist die Zellzyklusverteilung der Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) nach 72-stündiger Behandlung mit der jeweiligen IC_{50} von 2-DG. 2n – einfacher Chromosomensatz, 4n – doppelter Chromosomensatz

An dieser Stelle ist anzumerken, dass der unter 3.1.1 beschriebene antiproliferative Effekt von 2-DG auf beide HCC-Zelllinien nur durch den Einsatz hoher 2-DG-Konzentrationen (im millimolaren Bereich) erreicht werden konnte. Konventionelle Chemotherapeutika entfalten ihre Wirkung dagegen schon im mikro- bis nanomolaren Bereich. Der Einsatz solcher hoher 2-DG-Konzentrationen könnte ein Indiz für eine mögliche Resistenz der Zellen gegenüber 2-DG sein. Das Onkoprotein Hif-1 trägt zur Resistenzentstehung gegenüber Chemotherapeutika bei (157; 158).

3.1.3 Analyse der Expression von Hif-1 α

3.1.3.1 Analyse der Hif-1 α -Proteinexpression mittels Western-Blot

Um den Einfluss von Hif-1 auf die Resistenzentstehung gegenüber 2-DG zu analysieren, wurde die Proteinexpression der sauerstoffabhängigen Untereinheit Hif-1 α untersucht. Die Proteinexpression kann mittels Western-Blot-Analysen mit einem spezifischen, gegen Hif-1 α gerichteten Antikörper bestimmt werden. Hierzu wurden beide Leberkrebszelllinien mit der unter 3.1.1 ermittelten IC₅₀ von 2-DG für 6 h und 16 h behandelt.

Hierbei war zu sehen, dass die Behandlung mit 2-DG sowohl in SK-HEP-1 als auch in Hep G2 nach 6 h zur Inhibition des Hif-1 α -Proteins führte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von Hif-1 α durch 2-DG nach 16 h fast vollständig reversibel war (Abb. 7).

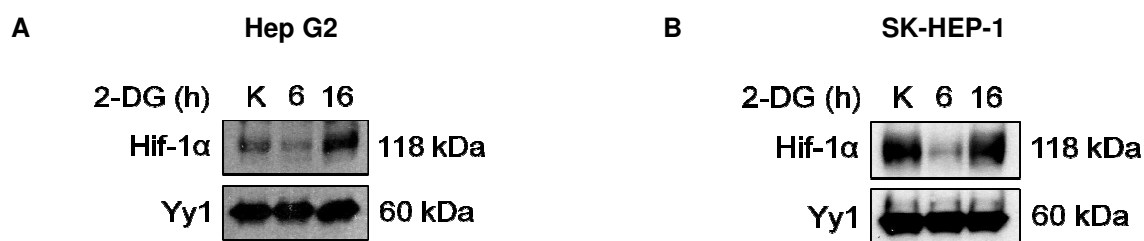


Abb. 7: Hif-1 α -Proteinexpression nach 6- und 16-stündiger Behandlung mit 2-DG

Abgebildet ist ein exemplarischer Hif-1 α -Western-Blot beider Zelllinien nach 6- und 16-stündiger 2-DG-Behandlung. Yy1 diente als Ladekontrolle. K – Kontrolle/unbehandelte Zellen

Neben der direkten Bestimmung der Hif-1 α -Proteinexpression mittels Western-Blot kann die Hif-1 α -Aktivität auch indirekt über die Analyse der Expression bekannter Hif-1-Zielgene bestimmt werden. Hierbei sollte geklärt werden, ob die Funktionalität von Hif-1 nach Behandlung mit 2-DG noch gegeben ist.

3.1.3.2 Analyse von Hif-1-Zielgenen

Zur Analyse wurden bekannte Hif-1-Zielgene (karbonische Anhydrase 9 [CA9] und Phosphoglycerat-Kinase [PGK]) verwendet. Die Behandlung beider Zelllinien erfolgte über einen Zeitraum von 24 h. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 2-DG keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Genexpression der Hif-1-Zielgene CA9 und PGK in beiden Zelllinien besaß (Abb. 8).

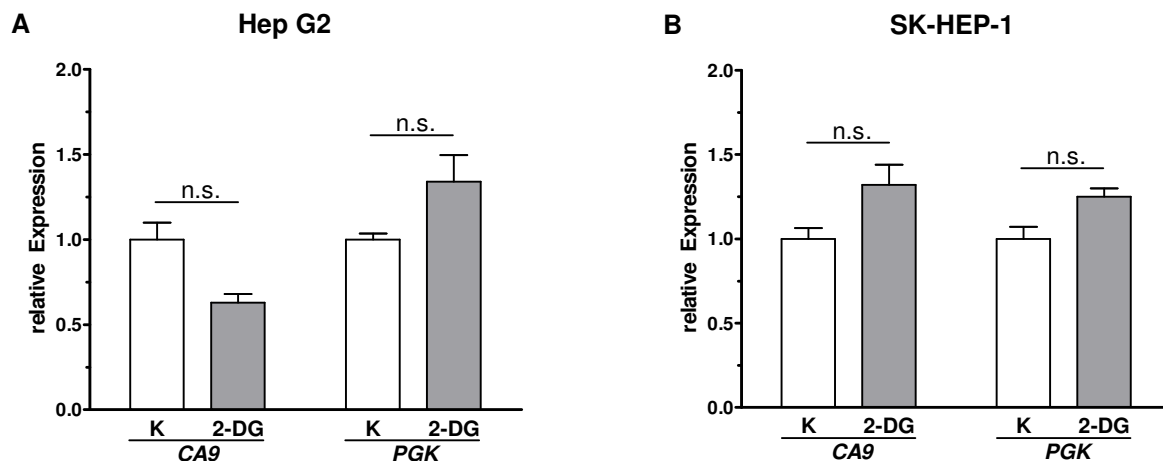


Abb. 8: Genexpressionsanalysen bekannter Hif-1-Zielgene nach 2-DG-Behandlung

Analysiert wurde die relative Expression der Hif-1-Zielgene *CA9* und *PGK* in den Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) nach 24-stündiger Behandlung mit 2-DG (grau). Die Expression wurde als x-facher Wert im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (weiß) ausgedrückt. K – unbehandelte Zellen, n.s. – nicht signifikant

Anhand der zuvor durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Hif-1 α -Proteinexpression, die nach 6-stündiger Behandlung mit 2-DG erreicht wurde, schon nach 16-stündiger Behandlung vollständig reversibel war. Auch die Tatsache, dass keine veränderte Genexpression bekannter Hif-1-Zielgene vorliegt, könnte für eine fehlende Beteiligung des Hif-1-Proteins bei einer möglichen Resistenzentstehung gegenüber 2-DG sprechen. Um auszuschließen, dass nicht doch eine Hif-1-vermittelte Resistenz der Zellen gegenüber 2-DG vorliegt, die durch Western-Blot und qPCR nicht nachweisbar war, sollten Hif-1 α -defiziente Zellen auf ihr Proliferationsverhalten bei Behandlung mit 2-DG untersucht werden. Sofern Hif-1 für die Resistenzentstehung gegenüber 2-DG verantwortlich ist, sollten Hif-1 α -defiziente Zellen sensitiver auf die Behandlung mit 2-DG reagieren.

3.1.4 Proliferationsanalyse Hif-1 α -defizienter Zellen

Durch Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe sind bereits Hif-1 α -defiziente Hep G2- und SK-HEP-1-Zellen vorhanden (147). Die funktionelle Inaktivierung von Hif-1 α (HIF-) in diesen Zellen wurde mittels lentiviral-vermittelter RNA-Interferenz (RNAi) erreicht. Als Kontrollzellen dienten Hep G2- und SK-HEP-1-Zellen, die mit einem lentiviralen Plasmid, das für eine nicht-kodierende shRNA (*scrambled*, SCR) kodiert, transduziert wurden (147). Um nun den Einfluss von Hif-1 auf die Resistenzentstehung zu prüfen, wurden Hif-1 α -kompetente (SCR) und -defiziente (HIF-) Zellen mit der unter 3.1.1

ermittelten IC_{50} von 2-DG über einen Zeitraum von 72 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen gezählt.

Wie in Abb. 9 gezeigt, hat die funktionelle Inaktivierung von Hif-1 α weder bei Hep G2 noch bei SK-HEP-1 einen Einfluss auf Zellteilung bei Behandlung mit 2-DG. Eine Hif-1-vermittelte Resistenzentstehung der Zellen gegenüber 2-DG kann somit ausgeschlossen werden.

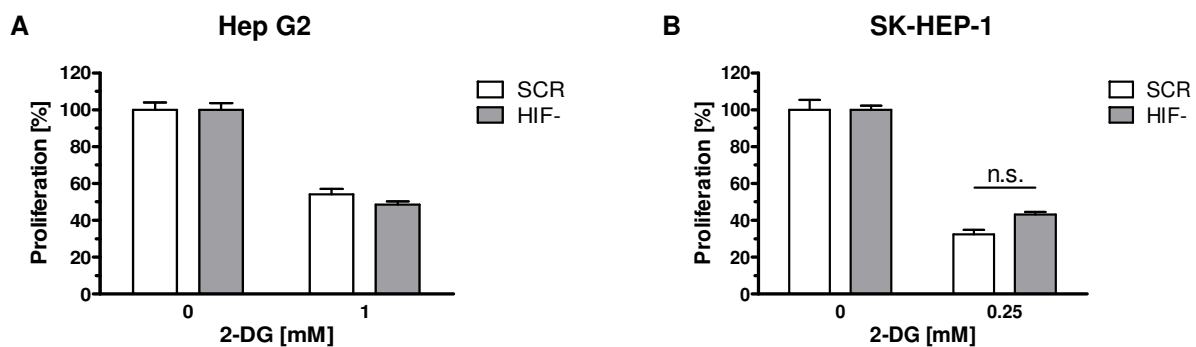


Abb. 9: Proliferationsanalysen der Hif-1 α -defizienten Zellen bei 2-DG-Behandlung

Gezeigt sind die Proliferationsanalysen der Hif-1 α -kompetenten (SCR) und -defizienten (HIF-) Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) bei 72-stündiger Behandlung mit 2-DG. n.s. – nicht signifikant

3.1.5 Die Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums

Im Verlauf der Arbeit wurde das Transkriptom beider HCC-Zelllinien mittels Microarray-Analysen untersucht. Hierzu wurden beide Zelllinien mit der jeweiligen IC_{50} von 2-DG für 24 h behandelt. Anschließend wurde die RNA über ein Kit isoliert und zur Weiterverarbeitung (cDNA-Synthese, Microarray) an die Kooperationspartner der AG Hübner am Max-Delbrück-Zentrum in Berlin übergeben.

Die Behandlung mit 2-DG resultierte in der gesteigerten Expression verschiedener Gene. Zu diesen Genen zählten auch Chaperone (Calreticulin [CALR], heat shock 70kDa protein 5 [HSPA5], heat shock protein 90kDa beta; member 1 [HSP90B1]), welche für die Regulation der Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums (ER) verantwortlich sind (Tabelle 5).

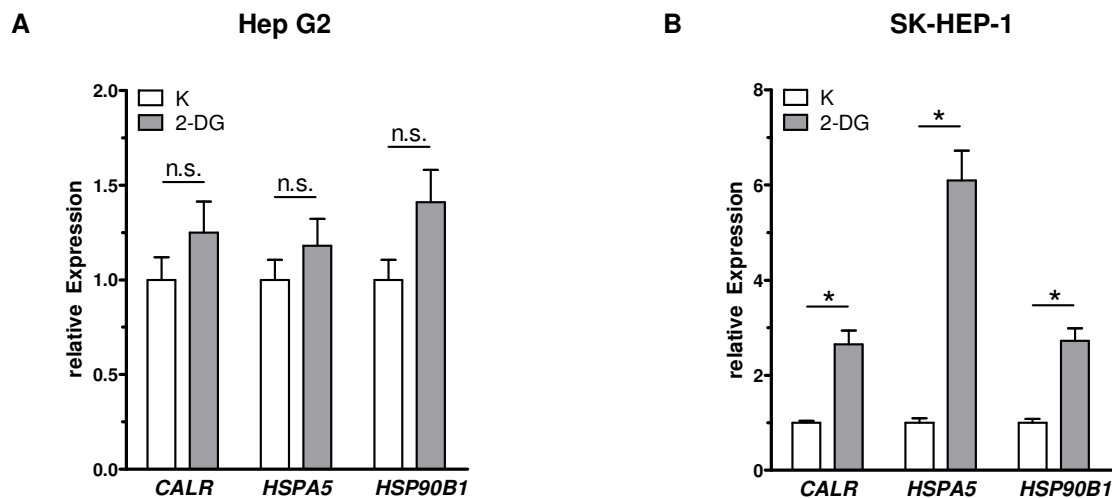
Tabelle 5: Expression von *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* bei 2-DG-Behandlung

Zelllinie	<i>CALR</i>	<i>HSPA5</i>	<i>HSP90B1</i>
Hep G2	32 x	71 x	24 x
SK-HEP-1	106 x	340 x	114 x

Die Expression aller Gene wurde als x-fache Expression der entsprechenden unbehandelten Zellen angegeben.

Um die in Tabelle 5 gezeigten erhöhten Expressionsraten zu überprüfen, wurden beide Zelllinien nochmals über einen Zeitraum von 24 h mit 2-DG behandelt. Die Bestimmung der Expressionslevel erfolgte, wie zuvor beschrieben (3.1.3.2), mittels qPCR.

Es konnte in SK-HEP-1 eine gesteigerte Expression von *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* verzeichnet werden. Die erhöhte Expression aller 3 Chaperone in Hep G2 konnte mittels qPCR jedoch nicht bestätigt werden. Die einzelnen Versuche zeigten kein einheitliches Bild und keine klaren Tendenzen (Abb. 10).

Abb. 10: Genexpression von *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* bei 2-DG-Behandlung

Abgebildet ist die Genexpression von *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* in den Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) bei 24-stündiger Behandlung mit 2-DG (grau) im Vergleich zu unbehandelten (weiß) Zellen. K – unbehandelte Zellen, * $p < 0.05$, n.s. – nicht signifikant

Parallel zu den *In-vitro*-Analysen der HCC-Zelllinien sollte der Effekt einer 2-DG-Behandlung auf das Tumorwachstum im murinen HCC-Modell untersucht werden.

3.2 Analyse der Tumorprogression im ASV-B-Mausmodell nach Behandlung mit 2-DG

Es wurden 15 Wochen alte ASV-B-Mäuse (2.2.4.2) über einen Zeitraum von 6 Tagen mit 2-DG (500 mg/kg) behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt in diesem Zeitraum das Lösungsmittel (Phosphat-gepufferte Saline, PBS) in adäquater Menge. Abschließend wurden die Tiere gewogen, getötet, ihnen wurden die Lebern entnommen und für immunhistochemische Analysen in Paraffin eingebettet.

3.2.1 Auswertung der Parameter Körpergewicht und Lebergewicht

Um einen ersten Eindruck über den physiologischen Zustand der Tiere nach dem Therapieende zu erhalten, wurden die Parameter Körpergewicht und Lebergewicht der behandelten Tiere in Relation zu denen der unbehandelten Kontrollgruppe betrachtet. Ein verringertes Lebergewicht der behandelten Tiere könnte für eine Inhibition des Tumorwachstums sprechen.

Sowohl Leber- als auch Körpergewicht der mit 2-DG behandelten Versuchsgruppe unterschieden sich nicht von den Gewichten der mit PBS behandelten Kontrollgruppe (Abb. 11 A und B).

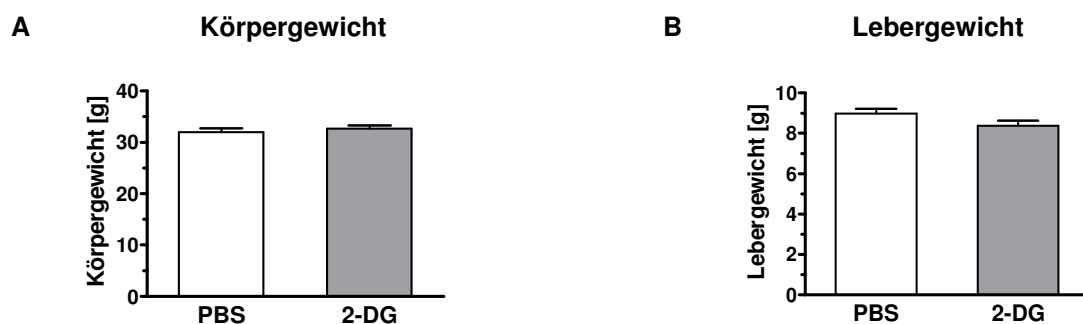


Abb. 11: Körpergewicht und Lebergewicht der ASV-B-Tiere nach 2-DG-Behandlung

Die Parameter Körpergewicht (A) und Lebergewicht (B) wurden nach einer 6-tägigen 2-DG-Behandlung (grau) (500 mg/kg) der ASV-B-Mäuse bestimmt. Als Kontrolle dienten Tiere, die das Lösungsmittel PBS (weiß) erhielten.

Ein weiterer Parameter, der zur Bestimmung der Tumorlast herangezogen werden kann, ist die Lebergewicht-Körpergewicht-Relation. Je höher der errechnete Lebergewicht-Körpergewicht-Quotient ist, desto höher ist die Tumorlast des analysierten Tieres.

Auch mithilfe dieses Quotienten konnte kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit 2-DG behandelten Gruppe festgestellt werden (Abb. 12).

Lebergewicht-Körpergewicht-Quotient

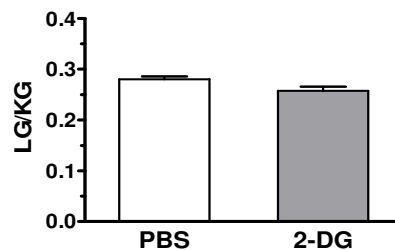


Abb. 12: Lebergewicht-Körpergewicht-Quotient nach 2-DG-Behandlung

Quotient aus Lebergewicht/Körpergewicht der 2-DG-behandelten (grau) ASV-B-Mäuse im Vergleich zur PBS-behandelten (weiß) Kontrollgruppe. LG – Lebergewicht, KG - Körpergewicht

Der Lebergewicht-Körpergewicht-Quotient scheint keine angemessene Methode zur Bestimmung der Tumorlast zu sein, da minimale Gewebsveränderungen nicht detektiert werden können. Demzufolge sollte zunächst eine geeignete Methode zur Bestimmung der Tumorlast etabliert werden.

3.2.2 Histologische Analyse der 2-DG-behandelten ASV-B-Tiere

3.2.2.1 Etablierung einer geeigneten Methode zur Bestimmung der Tumorlast *in vivo*

Zur histologischen Bestimmung der Tumorlast wurden Hämatoxylin- und Eosin gefärbte (H&E) Schnitte in 25-facher Vergrößerung mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera und dem *AxioVision*-Programm schrittweise fotografiert. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass alle Einzelbilder genügend Überlappungsbereiche zu den angrenzenden Bildern besaßen. Die Einzelbilder wurden anschließend mit der Panoramafunktion des Grafikprogramms *Adobe Photoshop Elements 4* zu einem Gesamtbild zusammengesetzt.

Die Auswertung der Bilder erfolgte unter Verwendung des Programms *ImageJ* und bei gleichzeitiger Sichtkontrolle der Schnitte am Mikroskop. Die Sichtkontrolle wurde mit 100-facher Vergrößerung vorgenommen. Um die Tumoreale zu messen, wurden diese mit der *Freehand*-Funktion des Programms umrandet. Die Bestimmung des Flächeninhalts erfolgte mithilfe der *Measure*-Funktion. Dieses Verfahren wurde

auf alle Tumorareale des Schnitts und die Gesamtfläche des Schnitts angewendet. Anschließend erfolgte die Aufsummierung aller Tumorareale, wodurch sie ins Verhältnis zur Fläche des Gesamtschnitts gesetzt werden konnten.

3.2.2.2 Bestimmung der Tumorareale

Unter Zuhilfenahme der entwickelten Analysemethode (3.2.2.1) wurden jeweils 2 H&E-Schnitte von zunächst 3 Kontrolltieren und 4 2-DG -behandelten Tieren histologisch analysiert.

Auch hier war zu sehen, dass die Behandlung der ASV-B-Tiere mit 2-DG keinen Einfluss auf das Tumorstadium besitzt (Abb. 13).

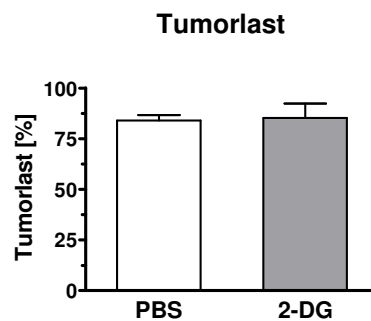


Abb. 13: Histologische Analyse der Tumorlast

Vergleich der Tumorlast der 2-DG-behandelten Tiere (grau) sowie der Kontrolltiere (PBS, weiß) nach 6-tägiger Behandlung mit 500 mg/kg 2-DG.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass 2-DG keinen antiproliferativen Effekt auf die murinen HCC-Tumorzellen *in vivo* ausübt. Zudem musste es in sehr hohen Dosen eingesetzt werden, um *in vitro* antiproliferativ zu wirken. Diese beiden Tatsachen sprechen dafür, dass eine Art Resistenz der Zellen gegenüber 2-DG vorliegen könnte. Die hohen Glukosekonzentrationen im Medium (DMEM 4,5 g/l Glukose, RPMI 2 g/l Glukose) und die Glukosemengen im Standardtierfutter (ca. 41,2 % Kohlenhydrate) könnten zur verringerten Wirksamkeit von 2-DG führen. Diese reduzierte Wirksamkeit könnte möglicherweise durch eine kompensatorische Glukoseaufnahme hervorgerufen werden. Eine Verringerung der frei verfügbaren Glukose könnte dementsprechend einen positiven Effekt auf die Aufnahme und Wirksamkeit von 2-DG ausüben.

3.3 Verringerung der Glukosekonzentration zur Optimierung der Wirksamkeit von 2-DG *in vitro*

Es sollte überprüft werden, ob die Verringerung der externen Glukosezufuhr die Wirksamkeit von 2-DG *in vitro* und *in vivo* erhöht. Dazu wurde die Glukosekonzentration der Medien auf $\frac{1}{4}$ des ursprünglichen Wertes reduziert. Hierzu wurden 2 Standardmedien mit geringeren Glukosekonzentrationen (RPMI 0,5 g/l Glukose, DMEM 1 g/l Glukose) verwendet. Des Weiteren wurden die ASV-B-Mäuse mit einer industriell hergestellten Diät gefüttert. Während die Tiere bei Fütterung des Standardfutters 58 % der Energie aus Kohlenhydraten bezogen, liefert die Diät bei gleicher Gesamtmenge an aufgenommener Energie nur noch 15 % (15-%-KH) der Gesamtenergie aus Kohlenhydraten. Es fand demnach ebenfalls eine Reduktion auf $\frac{1}{4}$ des ursprünglichen Werts statt.

3.3.1 Die Auswirkungen einer Glukoserestriktion und 2-DG-Behandlung *in vitro*

3.3.1.1 Analyse des Proliferationsverhaltens

Die Aussaat erfolgte im Medium mit hohen Glukosekonzentrationen. Nach 24 h wurde das Medium durch glukosereduziertes Medium ersetzt. Zusätzlich erfolgte eine teilweise Behandlung der Zellen mit 2-DG. Anschließend wurden die Zellzahlen beider Zelllinien nach 72 h bestimmt.

Die Reduktion der Glukosekonzentration *per se* hatte keinen Effekt auf die Proliferation der Hep G2-Zellen (Abb. 14 A, weiße Balken). Wohingegen die Kombination aus Glukosereduktion und 2-DG-Behandlung zu einem synergistischen Effekt bei der Inhibition der Proliferation führte (Abb. 14 A, graue Balken). Das konnte ebenfalls für die SK-HEP-1-Zellen beobachtet werden (Abb. 14 B, graue Balken). Im Gegensatz zu den Hep G2-Zellen wirkte die alleinige Glukosereduktion in den SK-HEP-1-Zellen antiproliferativ (Abb. 14 B, weiße Balken).

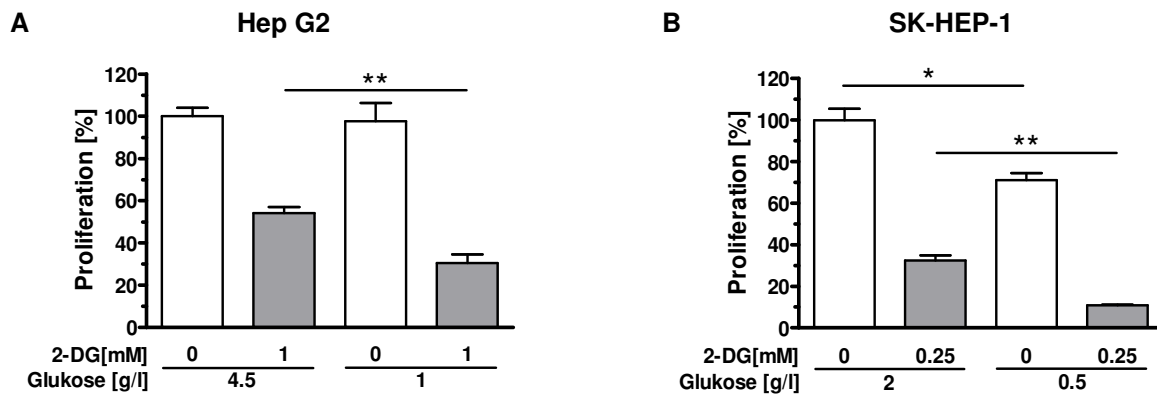


Abb. 14: Zellteilungsraten bei Inkubation in glukosereduziertem Medium und 2-DG-Behandlung
Abgebildet sind die Zellteilungsraten von Hep G2 (A) und SK-HEP-1 (B) nach 72 h Behandlung mit 2-DG (grau) und/oder bei Inkubation in glukosereduziertem Medium (jeweils 3. und 4. Balken). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (weiß). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.3.1.2 Zellzyklusanalyse der HCC-Zelllinien

Die Kombination von Glukosereduktion und 2-DG-Behandlung führte in beiden Zelllinien zu einem synergistischen Effekt, bezogen auf die antiproliferative Wirkung von 2-DG. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt im Zusammenhang mit Zellzyklusänderungen steht, wurden in diesem Teil der Arbeit die Zellen für 72 h mit glukosereduziertem Medium und ggf. mit der IC_{50} von 2-DG behandelt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Glukosekonzentration in beiden Zelllinien zu keinem sichtbaren Effekt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus führte (Abb. 15, unbehandelte Zellen). Des Weiteren zeigte sich auch bei Kombination von Glukoserestriktion und 2-DG-Behandlung kein messbarer Effekt auf den Zellzyklus (Abb. 15, 2-DG).

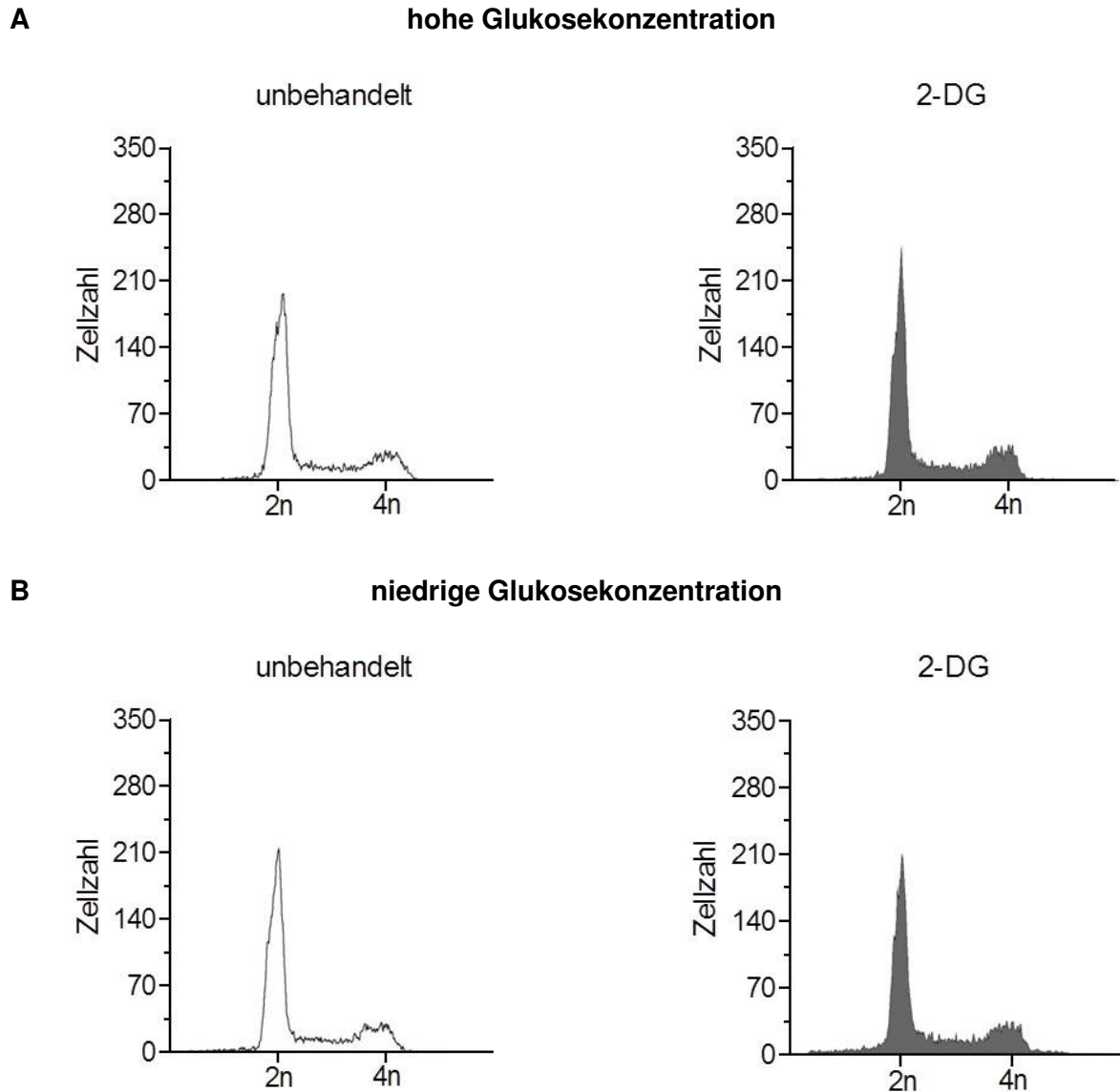


Abb. 15: Verteilung der Zellen im Zellzyklus am Beispiel von Hep G2

Die Zellen wurden im Medium mit hohen (A) und niedrigen Glukosekonzentrationen (B) kultiviert. Die Behandlung mit 2-DG (grau) erfolgte für 72 h. 2n – einfacher Chromosomensatz, 4n – doppelter Chromosomensatz

Da 2-DG die Glykolyse hemmt und eine Restriktion der frei verfügbaren Glukose einen ähnlichen Effekt haben könnte, ist es möglich, dass die 2-DG-verursachte Steigerung der Expression von *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* auch durch Glukose-restriktion erreicht werden könnte.

3.3.1.3 Analyse der Expression von ER-Stress-Chaperonen

Nach einer 24-stündigen Behandlung der Zellen mit 2-DG und glukosereduziertem Medium wurde die RNA aller Zellen isoliert und die daraus gewonnene cDNA mittels qPCR analysiert.

Es war sowohl in Hep G2 als auch in SK-HEP-1 keine gesteigerte Expression von *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* zu messen (Abb. 16, graue Balken). Eine Kombination von Glukosereduktion und 2-DG-Gabe führte jedoch zu einer erhöhten Expression der 3 Chaperone im Vergleich zur 2-DG-Gabe allein (Abb. 16 graue, gepunktete Balken).

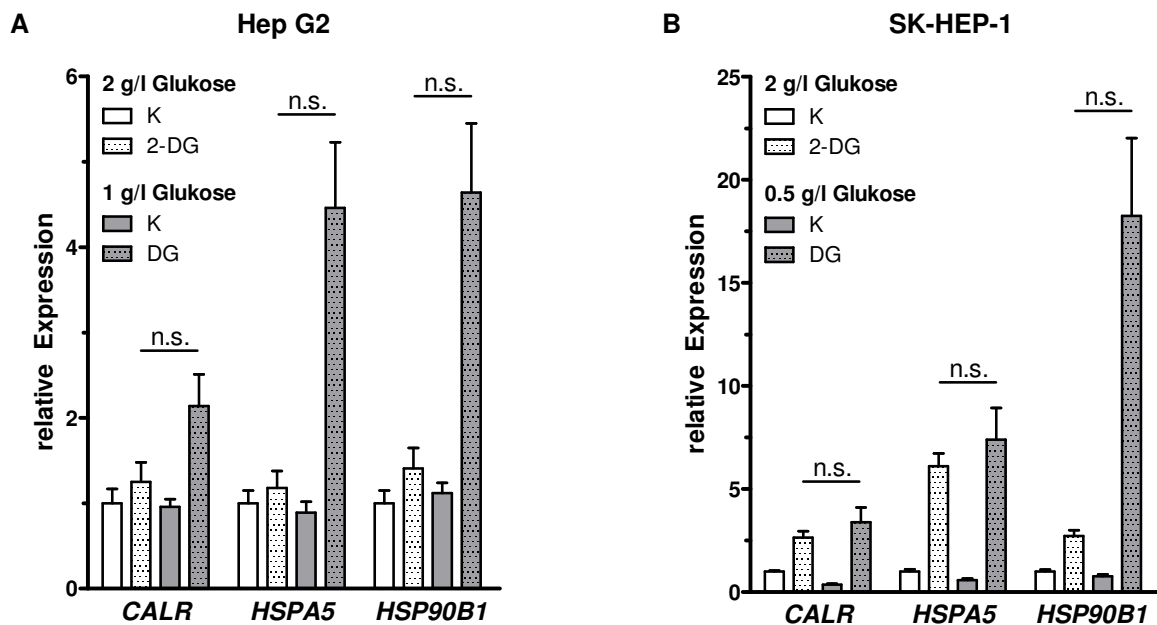


Abb. 16: Genexpression von *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* bei Wachstum im glukosereduzierten Medium

Gezeigt ist die Genexpression von *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* in Hep G2 (A) und SK-HEP-1 (B) bei 24-stündigem Wachstum im glukosereduzierten Medium (grau) und bei zusätzlicher Behandlung mit 2-DG (grau gepunktet). K – unbehandelte Zellen, n.s. – nicht signifikant

Da die Kombination von 2-DG-Behandlung und Glukoserestriktion einerseits zur verstärkten Hemmung der Proliferation beider HCC-Zelllinien und andererseits zur gesteigerten Expression der ER-Stress-Chaperone führt, sollte die Effektivität dieser Kombination im ASV-B-Mausmodell getestet werden.

3.4 *In-vivo*-Analyse der ASV-B-Mäuse nach Glukoserestriktion und 2-DG-Behandlung

Obwohl der Effekt von 2-DG auf die Proliferation *in vitro* nicht Hif-1-vermittelt ist, sollen in diesem Abschnitt der Arbeit sowohl ASV-B-Tiere mit intaktem Hif-1 α (WT) als auch Tiere mit funktionell inaktiviertem Hif-1 α (HIF-KO) analysiert werden, da die *In-vitro*-Situation nicht immer der *In-vivo*-Situation entsprechen muss. Die funktionelle Hif-1 α -Inaktivierung wurde durch Verwendung eines cre-loxP-Systems erreicht (154-156). Im Verlauf der ersten Versuchsreihe mit 15%-KH-Futter und Standardfutter wurden sowohl 12–14 Wochen alte Tiere als auch 16–17 Wochen alte Tiere mit 15%-KH-Futter gefüttert und zusätzlich mit 2-DG behandelt. Innerhalb der ersten 3 Tage nach Beginn der Fütterung mit 15%-KH-Futter verstarben 35–40 % % der 16–17 Wochen alten Tiere (Abb. 26). Es verstarb jedoch keines der 12–14 Wochen alten Tiere. Die Gruppe der älteren Tiere verträgt die Nahrungsumstellung auf 15%-KH-Futter um einiges schlechter als die Gruppe der jüngeren Tiere. Es ist bekannt, dass das murine HCC im ASV-B-Mausmodell im Zeitverlauf über das Adenom-Stadium (12 Wochen) bis hin zum HCC-Stadium (> 16 Wochen) fortschreitet (152; 153). Anhand dieser Altersklassifikation ist ersichtlich, dass nur HCC-tragende ASV-B-Tiere bei Fütterung des 15%-KH-Futters verstarben. Im Folgenden werden die Tiere als Adenom- und HCC-Mäuse bezeichnet. Auf die ASV-B-HCC-Gruppe wird an einem späteren Punkt dieser Arbeit näher eingegangen.

3.4.1 *In-vivo*-Analyse der ASV-B-Adenom-Mäuse

Den Tieren wurde ab einem Alter von $14 \pm 0,5$ Wochen kohlenhydratreduziertes Futter in Form von konventionell hergestelltem Futter der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH (15%-KH) verabreicht (Tabelle 6).

Tabelle 6: Prozentuale Zusammensetzung und kJ-%-Zusammensetzung des Standard- und 15%-KH-Futters

Futterart	Kohlenhydrate		Protein		Fett	
	kJ %	%	kJ %	%	kJ %	%
Standard	58	41,2	33	19	9	3,3
15%-KH	15	12,2	60	55,8	25	10,4

Damit sich die Tiere langsam an das Futter gewöhnen, wurden sie zunächst 2 Wochen ausschließlich mit dem 15%-KH-Futter gefüttert. Nach dieser 2-wöchigen Adaptationsphase wurden die Tiere mit 2-DG behandelt. Im Verlauf des ersten Versuchs war zu sehen, dass die Tiere bei einer Gabe von 500 mg/kg 2-DG leiden. Aufgrund ihres Zustands (Fell struppig, kaum Motilität) wurde die 2-DG Dosis schrittweise auf 125 mg/kg reduziert. Somit wurden anschließend alle Tiere mit 125 mg/kg 2-DG behandelt. Dafür wurde die Therapie im Vergleich zu der sechstägigen 2-DG-Gabe (2.2.4.2, 3.2) variiert. In diesem Versuchsabschnitt erhielten die Tiere 2-DG in 2 Blöcken mit je 5 aufeinanderfolgenden Tagen sowie einer zweitägigen Erholungsphase zwischen den Blöcken (Abb. 17).

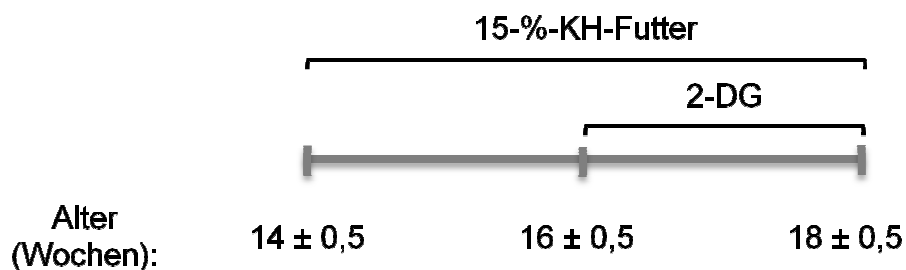


Abb. 17: Versuchsablauf bei Gabe von 15%-KH-Futter und 2-DG

Die Fütterung mit 15%-KH-Futter erfolgt 2 Wochen vor und während der 2-DG-Behandlung.

3.4.1.1 Analyse des Körpergewichts der einzelnen Versuchsgruppen

Um zu überprüfen, ob die Verabreichung des 15%-KH-Futters eine Auswirkung auf den Gewichtsverlauf der Tiere hat, wurden diese über den gesamten Zeitraum mehrfach wöchentlich gewogen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere, welche mit Standardfutter gefüttert worden.

Die Fütterung mit 15%-KH-Futter *per se* führte zu keiner Veränderung des Körpergewichts der WT- und HIF-KO-Tiere (Abb. 18). Es wird somit davon ausgegangen, dass beide Genotypen das 15%-KH-Futter sehr gut vertragen.

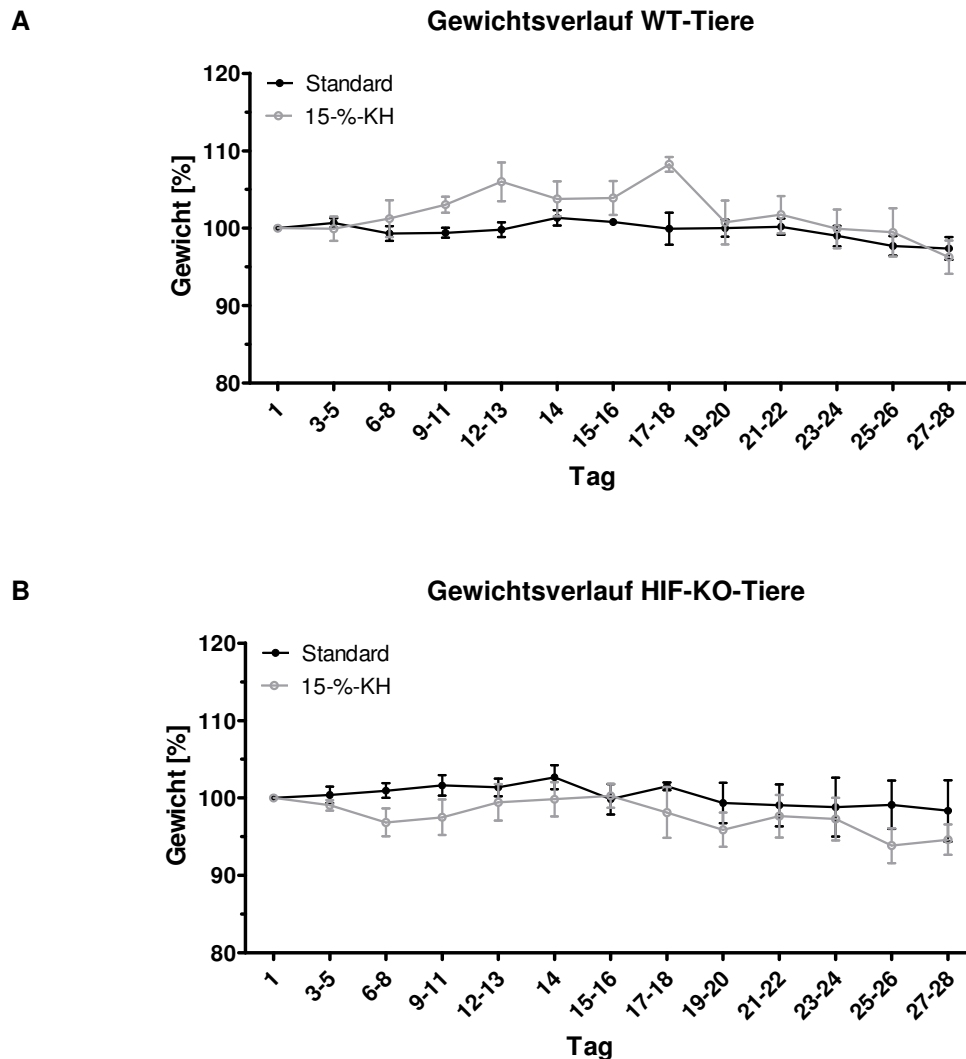


Abb. 18: Gewichtsverlauf bei Fütterung des 15%-KH-Futters

Angegeben ist das prozentuale Gewicht von ASV-B-WT- (A) und HIF-KO-Tieren (B) bei Fütterung des Standardfutters (schwarz) bzw. 15%-KH-Futters (grau). Als Ausgangsgewicht diente das Körpergewicht der Tiere vor Fütterung des 15%-KH-Futters. Als Kontrolltiere dienten Tiere, die PBS erhielten (schwarze Linie).

3.4.1.2 Histologische Analyse der Tumorlast

Wie zuvor beschrieben (2.2.5.4, 3.2.2), wurde auch hier die Tumorlast aller Versuchsgruppen histologisch analysiert.

Hierbei war zu sehen, dass die Tumorlast der WT- und HIF-KO-Tiere, die 125 mg/kg 2-DG bei Standardfutter erhielten, der Tumorlast der PBS behandelten Tiere unter Standardfutter entsprach. Weiterhin war zu sehen, dass die Fütterung des 15%-KH-Futters zu einer Reduktion der Tumorlast um 29,6 % bei den WT-Tieren und um 35 % bei den HIF-KO-Tieren führte. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Be-

handlung mit 2-DG keine stärkere Hemmung der Tumorprogression bei Fütterung von 15-%-KH-Futter bewirkt (Abb. 19).

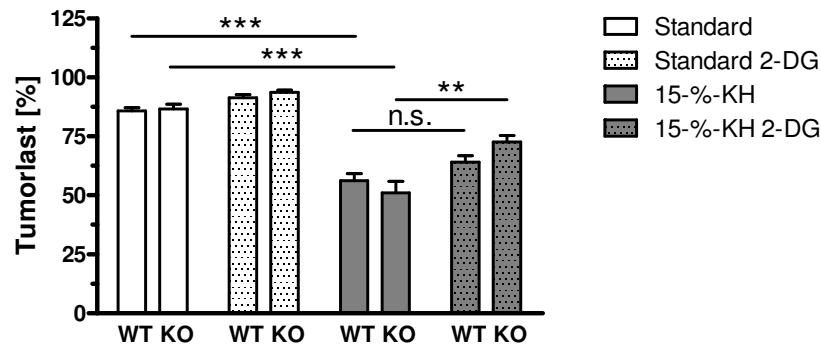


Abb. 19: Tumorlast der ASV-B-Tiere bei Fütterung des 15-%-KH-Futters

Die Tumorlast der Hif-1 α -WT- und HIF-KO-Tiere bei Fütterung von Standard- (weiß) und 15-%-KH-Futter (grau) sowie bei Verabreichung von 125 mg/kg 2-DG (gepunktet) wurde histologisch analysiert. Als Kontrollen dienten WT- und HIF-KO-Tiere, die das Lösungsmittel PBS (Standard, 15 % KH) erhielten. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. – nicht signifikant

Die Leberhistologien der WT-Tiere wurden im Anschluss durch den Pathologen Prof. Dr. Christoph Loddenkemper (PathoTres, Berlin), welcher eine hohe Expertise in der Auswertung histologischer Schnitte besitzt, nochmals in Hinsicht auf die Tumorlast untersucht.

Er konnte ebenso eine Reduktion der Tumorlast der WT-Tiere bei Fütterung von 15-%-KH-Futter ermitteln (Abb. 20). Durch diese zweite Auswertung wurde zudem gezeigt, dass die Auswertung der H&E Schnitte mit der hier etablierten Methode valide ist.

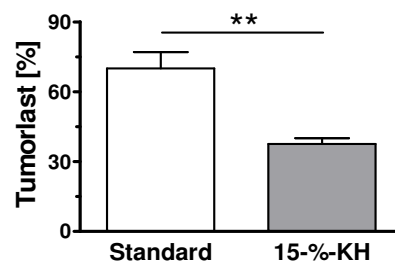


Abb. 20: Tumorlast der Hif-1 α -WT-Tiere bei Fütterung von 15-%-KH-Futter

Die Bestimmung der Tumorlast der mit Standardfutter gefütterten (weiß) und mit 15-%-KH-Futter gefütterten (grau) Tiere erfolgte durch einen Pathologen mit Expertise in der Auswertung histologischer Schnitte. ** $p < 0.01$

Während der *In-vivo*-Versuchsreihen fiel auf, dass die Tiere, welche das 15%-KH-Futter erhielten, vermehrte körperliche Aktivität zeigten. Um diese Beobachtung quantifizieren zu können, wurde einer kleinen Gruppe von WT-Tieren, die entweder Standard- oder 15%-KH-Futter erhielten, die Möglichkeit zur freiwilligen Bewegung im Laufrad gegeben.

3.4.1.3 Analyse der Mobilität von WT-Tieren bei Fütterung von 15%-KH-Futter

Zunächst erfolgte zur Adaptation der Tiere an das Futter eine 2-wöchige Fütterung mit 15%-KH-Futter. Nach dieser Anpassungsphase wurde jedem Tier ein Laufrad, welches Gesamtstrecke, Tagesstrecke und Durchschnittsgeschwindigkeit misst, zur freien Verfügung in den Käfig gestellt. Die Tiere hatten nun die Möglichkeit, über eine Dauer von 2 Wochen das Laufrad jederzeit zu nutzen (Abb. 21).

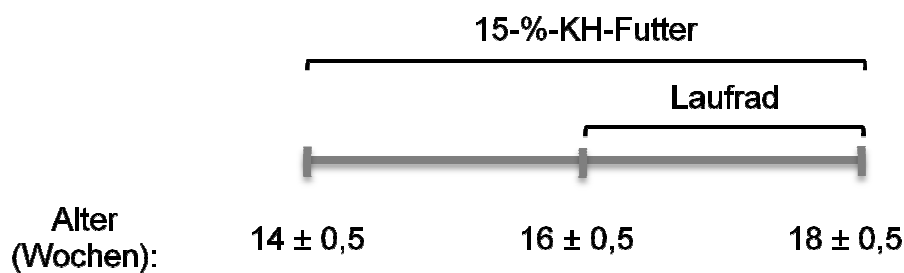


Abb. 21: Versuchsablauf bei freiwilliger Aktivität durch Laufradnutzung

Die Aktivitätsmessung erfolgte 2 Wochen nach Beginn der Fütterung des 15%-KH-Futters. Sie wurde für die darauffolgenden 2 Wochen gemessen. Der Versuch wurde gleichzeitig mit Standardfutter-gefütterten Tieren durchgeführt.

Durch die Messung der körperlichen Aktivität jedes einzelnen Tieres konnte die subjektive Beobachtung einer höheren Aktivität der Tiere mit Kohlenhydratrestriktion bestätigt werden. Die Tiere, die das 15%-KH-Futter erhielten, wiesen tagesabhängig eine bis zu 25-fach längere Gesamtstrecke auf (Abb. 22 A, grau). Zudem zeigte sich, dass die Durchschnittsgeschwindigkeit dieser Tiere ebenfalls tagesabhängig die doppelte Höhe der mit Standardfutter-gefütterten Tiere erreichte (Abb. 22 B, grau). Das Absinken der gelaufenen Gesamtstrecke der 15%-KH-Futter Tiere an den Tagen 9–12 wird durch die Messung der Laufleistung von nur 2 Tieren verursacht (Abb. 22 #).

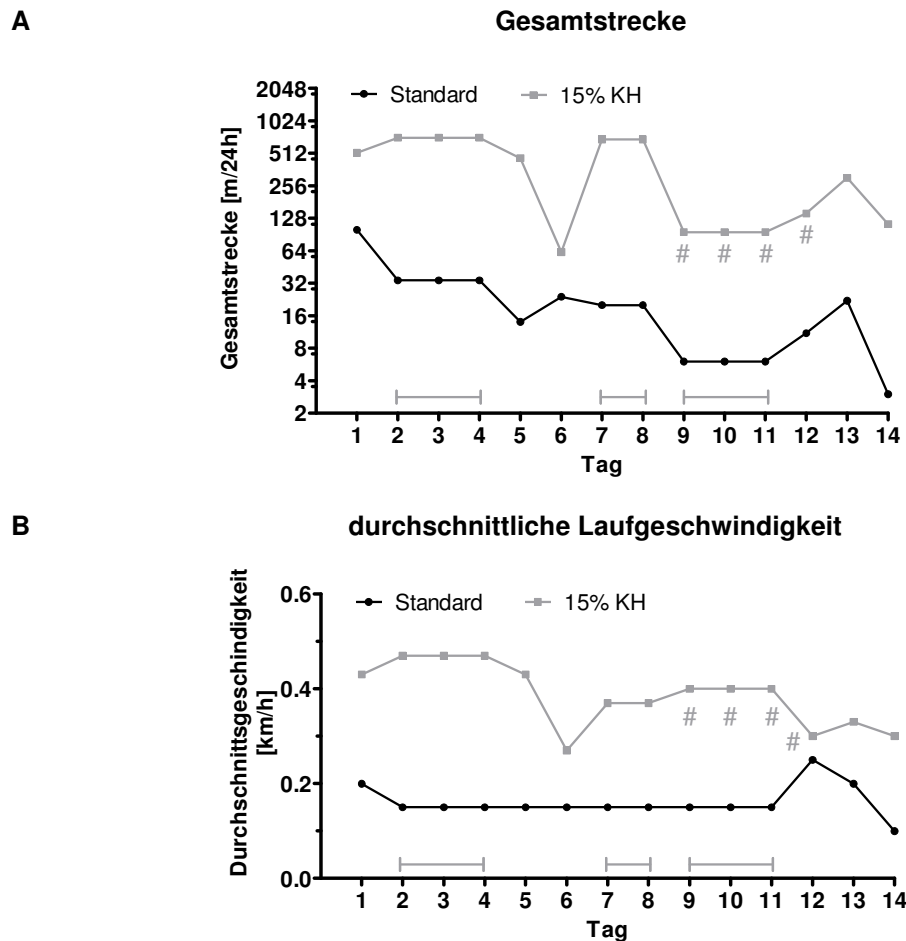


Abb. 22: Gesamtstrecke und durchschnittliche Laufgeschwindigkeit

Die Gesamtstrecke (A) und durchschnittliche Laufgeschwindigkeit (B) einer kleinen Gruppe von WT-Tieren, die Standardfutter (schwarz, 2 Tiere) oder 15%-KH-Futter (grau, 3 Tiere) erhielten, wurde gemessen. — Durchschnittswert von 2 oder 3 zusammenhängend gemessenen Tagen, # nur 2 Tiere gemessen

3.4.1.4 Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen der tumorhemmenden Wirkung

In diesem Abschnitt der Arbeit sollten die Mechanismen, die zur Reduktion des Tumorumfangs bei Fütterung von 15%-KH-Futter führten, näher charakterisiert werden. Da die Reduktion der Tumormasse scheinbar nicht von Hif-1 abhängig ist, wurden die Analysen nur an WT-Tieren durchgeführt. Die Reduktion des Tumorumfangs könnte durch folgende Mechanismen verursacht werden:

- Aktivierung der Amp-Kinase und daraus resultierende fehlende Aktivierung der ribosomalen Protein-S6-Kinase;
- Verringerte Phosphorylierung der Map-Kinasen;
- Minderversorgung der Tumorzellen mit Glukose.

Aktivierung der Amp-Kinase und daraus resultierende fehlende Aktivierung der ribosomalen Protein-S6-Kinase

Es ist bekannt, dass metabolischer Stress, beispielsweise verursacht durch kalorische Restriktion, Ampk aktiviert (159; 160). Auch ist bekannt, dass Ampk die Proliferation von HCC-Zelllinien und das Wachstum von HCC-Geweben inhibiert (161). Die Aktivierung der Amp-Kinase durch Phosphorylierung führt zur Inhibition von *mechanistic target of rapamycin* (Mtor). Mtor kann dadurch die Phosphorylierung der ribosomalen Protein-S6-Kinase, 70kDa, Polypeptid 1 (Rps6kb1) nicht mehr fördern (162). An dieser Stelle sollte die Phosphorylierung des murinen Ampk und Rps6kb1 mittels Western-Blot analysiert werden.

Anhand der Abb. 23 ist ersichtlich, dass die Fütterung von 15-%-KH-Futter keine Änderungen in der Phosphorylierung der Amp-Kinase und Rps6kb1 hervorrief. Eine Reduktion des Tumorzvolumens durch Aktivierung der Amp-Kinase kann somit ausgeschlossen werden.

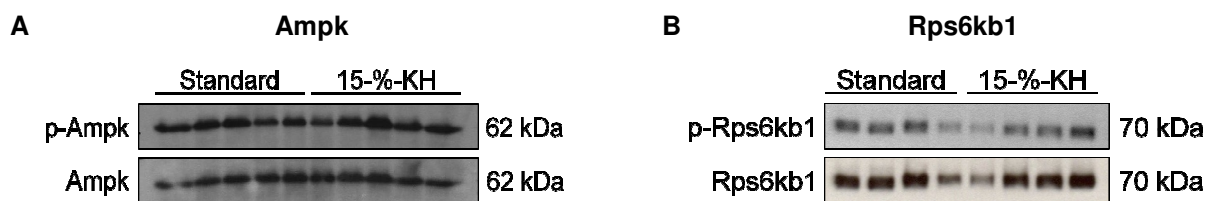


Abb. 23: Proteinexpression der murinen Amp-Kinase und der murinen Rps6kb1

Die Proteinexpression der murinen Amp-Kinase (A) und der murinen Rps6kb1 (B) nach Fütterung der ASV-B-WT-Tiere mit Standard- oder 15-%-KH-Futter wurde mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Als Ladekontrolle diente die nicht phosphorylierte Form der jeweiligen Proteinkinase. p – phosphoryliert

Verringerte Phosphorylierung der Map-Kinasen

Die Aktivierung von Map-Kinasen stellt einen zentralen Faktor in der Regulation von Zellproliferation und Überleben dar (146; 163; 164). Diese Aktivierung erfolgt über mehrere Zwischenschritte durch Rezeptortyrosinkinasen (Rtk) (146). Sowohl der Insulinrezeptor (Insr) als auch der insulinähnliche Wachstumsfaktor-Rezeptor (Igfr) gehört zur Familie der Rtk. Eine Reduktion der Glukose und dadurch verringerte Bindung an Insr und Igfr könnte somit zur reduzierten Aktivierung der Mapk führen. Um dies zu prüfen, wurde die Phosphorylierung der murinen Mapk1 und Mapk3 mittels Western-Blot überprüft.

Hierbei war zu sehen, dass sich der Phosphorylierungsgrad von Mapk1 und Mapk3 der 15%-KH-Futter-Tiere (Abb. 24 rechts) nicht vom Phosphorylierungsgrad der Tiere, die Standardfutter erhielten (Abb. 24 links), unterschied.

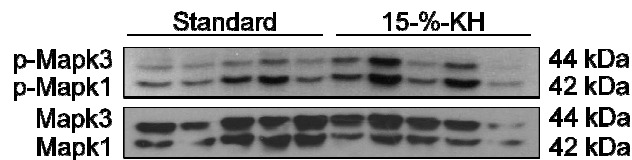


Abb. 24: Proteinexpression der murinen Map-Kinasen 1 und 3

Abgebildet ist die Proteinexpression der murinen Mapk1 und 3 nach Fütterung der ASV-B-WT-Tiere mit Standard- oder 15%-KH-Futter. Als Ladekontrolle diente die jeweils unphosphorylierte Form. p – phosphoryliert

Minderversorgung der Tumorzellen mit Glukose – Blutglukosebestimmung

Um die Auswirkung des 15%-KH-Futters auf die Blutglukose der ASV-B-Tiere zu überprüfen, wurde den Tieren am Tag der Leberentnahme Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Blutglukose wurde mithilfe eines Blutzuckermessgeräts (Contour, Bayer AG) sowie den zugehörigen Messstreifen bestimmt. Der Normwert gesunder Tiere liegt zwischen 62–175 mg/dl Glukose (165).

Es konnte gezeigt werden, dass die Blutglukose der WT- und HIF-KO-Tiere bei Fütterung von 15%-KH-Futter im Vergleich zum Standardfutter deutlich verringert ist. Die Blutglukose der mit 15%-KH-Futter gefütterten Tiere lag bei ca. 84 mg/dl, die der Tiere, die Standardfutter erhielten, bei 100–110 mg/dl (Standard) (Abb. 25).

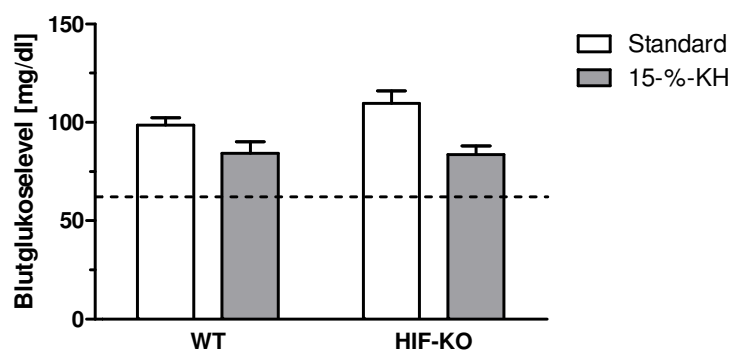


Abb. 25: Blutglukose der ASV-B-Tiere

Die Blutglukose der Kontrolltiere (Standard) und der mit 15%-KH-Futter gefütterten Tiere (grau) wurde zu Versuchsbeginn bestimmt.

Eine Minderversorgung der Tumoren kann trotz der im Normalbereich gelegenen Blutglukose der 15%-KH-Futter-Tiere nicht vollständig ausgeschlossen werden.

3.4.2 *In-vivo*-Analysen der ASV-B-HCC-Mäuse

Wie bereits unter 3.4 beschrieben, wurden die 16 Wochen alten Tiere aufgrund von Literaturdaten als HCC-tragende Mäuse charakterisiert. Diese Versuchsgruppe ist durch hohe Sterberaten bei Fütterung von 15%-KH-Futter gekennzeichnet. Es soll an dieser Stelle zunächst ein Überblick über die Sterberaten dieser Tiere gegeben werden.

3.4.2.1 Überlebensrate der ASV-B-HCC-Mäuse

In der Altersgruppe der ASV-B-HCC-Mäuse verstarben in den ersten 3 Tagen nach Beginn der Fütterung mit 15%-KH-Futter ca. 35–40 % der Tiere beider Gruppen (WT und HIF-KO). Im Verlauf der ersten 14 Tage starben insgesamt 62,5 % der WT- und 36,4 % der HIF-KO-Tiere (Abb. 26).

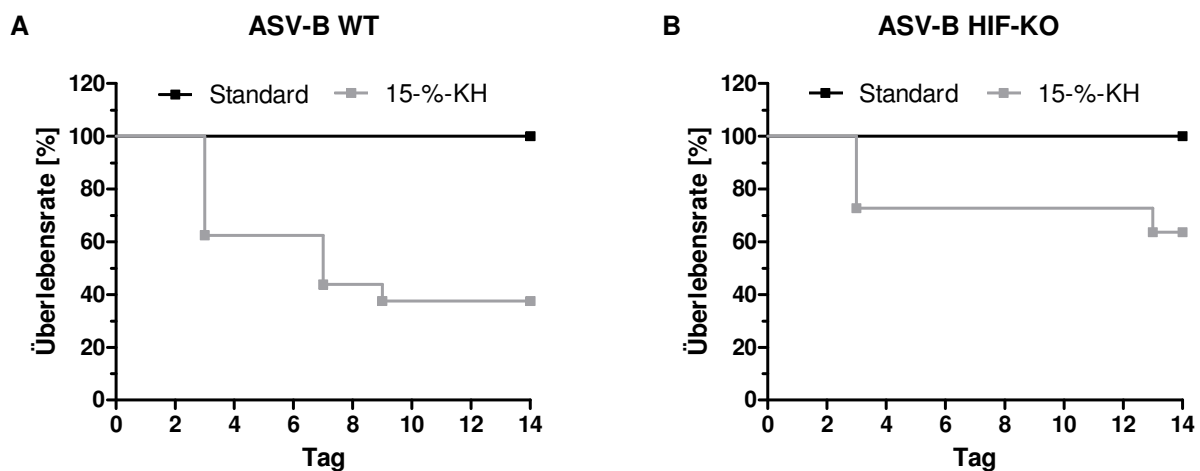


Abb. 26: Sterberaten der ASV-B-Tiere bei zweiwöchiger Fütterung mit 15%-KH-Futter

Die Sterberaten der Hif-1 α -WT- (A) und HIF-KO-Tiere (B) bei zweiwöchiger Fütterung mit 15%-KH-Futter (grau) im Vergleich zur Fütterung mit Standardfutter (schwarz) wurden unter Zuhilfenahme der Kaplan-Meier-Methode untersucht.

Die Fütterung des 15%-KH-Futters schien eine Verschlechterung des Gesundheitszustands der Tiere hervorzurufen. Es stellt sich hier die Frage, ob die Kohlenhydratreduktion beim fortgeschrittenen HCC möglicherweise zur Hypoglykämie und daraus resultierend zum Tod der Tiere führte. Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die fort-

schreitende Leberschädigung dar. Die hohe Proteinmenge des Futters könnte dadurch zur Proteotoxizität in der Leber führen.

3.4.2.2 Bestimmung der Blutglukose

Die Bestimmung der Blutglukose erfolgte, wie zuvor (2.2.4.3) beschrieben. Anhand der sehr geringen Probenzahlen konnte nur eine sehr eingeschränkte Aussage getroffen werden.

Ersichtlich war jedoch, dass die Reduktion der Kohlenhydrate im Futter nicht zur Ausbildung einer Hypoglykämie führte. Die Werte beider Genotypen bei Fütterung mit 15-%-KH-Futter blieben im Normbereich zwischen 62 und 175 mg/dl (Abb. 27). Ein unveränderter Blutglukosewert war in den HIF-KO-Tieren zu verzeichnen. Hierbei war jedoch fraglich, ob die Werte die *In-vivo*-Situation korrekt widerspiegeln, da die Blutwerte von jeweils nur 1 oder 2 Tieren bestimmt wurden.

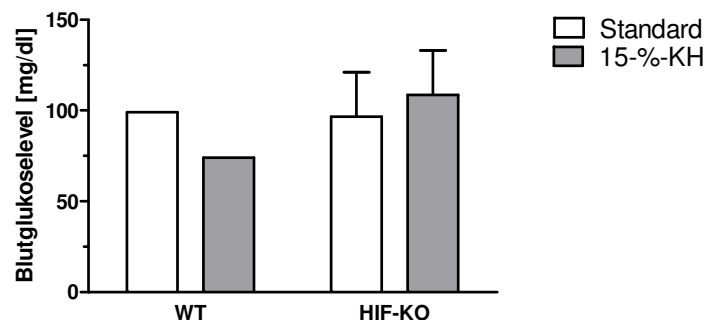


Abb. 27: Blutglukose der ASV-B-Tiere bei Fütterung des 15-%-KH-Futters

Die Bestimmung der Blutglukose der ASV-B-Tiere, die mit Standardfutter (weiß) und 15-%-KH-Futter (grau) gefüttert wurden, erfolgte bei Versuchsende.

3.4.2.3 Bestimmung der Parameter AST und ALT als Maß der Leberschädigung

Die Integrität der Leber kann mithilfe der Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) bestimmt werden. Die Werte beider Transaminasen geben Aufschluss über die Leberschädigung. Eine hohe Konzentration dieser Transaminasen im Blut spricht für eine starke Leberschädigung. Die Messung der beiden Transaminasen erfolgte aus Blutproben der Tiere. Die Analysen wurden anhand der WT-Tiere durchgeführt, da diese eine deutlich erhöhte Sterbera-

te im Vergleich zu den HIF-KO-Tieren aufwiesen. Die Messung der Blutparameter erfolgte durch ein auf Tierproben spezialisiertes Diagnostiklabor (synlab.vet GmbH). Laut Angaben dieses Labors liegt der Referenzbereich für AST zwischen 55 und 124 U/l, und der für ALT zwischen 28 und 184 U/l (Quelle: Laborbefund synlab.vet GmbH, siehe Anhang).

Die Lebern der WT-Tiere wiesen schon bei Fütterung von Standardfutter einen 9,6-fach erhöhten AST-Wert und einen 7,3-fach erhöhten ALT-Wert im Vergleich zum höchsten Normwert auf. Bei Fütterung von 15%-KH-Futter erhöhten sich diese Werte auf das 21,8-fache (AST) beziehungsweise 11,8-fache (ALT) des Normwerts (Abb. 28). Die Fütterung von 15%-KH-Futter verstärkt die schon vorhandene Leberschädigung noch um ein Vielfaches.

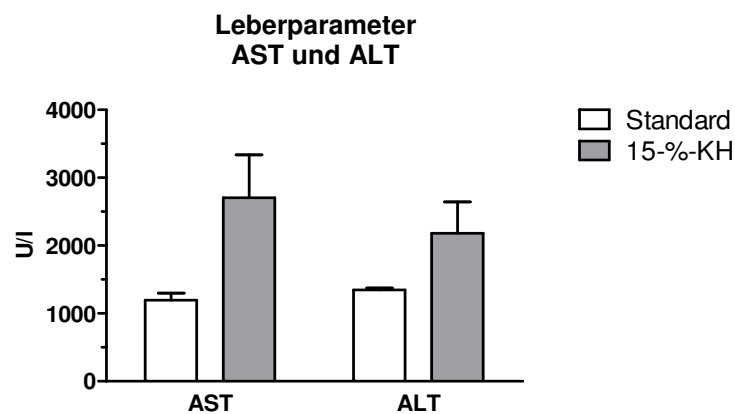


Abb. 28: AST und ALT als Maß für die Leberschädigung

Die Parameter AST und ALT wurden als Maß für die Schädigung der Leber der WT-Tiere, die mit Standardfutter (weiß) und 15%-KH-Futter (grau) gefüttert wurden, gemessen. Beide Werte wurden nach einer 7-tägigen Fütterung des 15%-KH-Futters bestimmt.

Mithilfe der AST- und ALT-Werte kann der durch de Ritis *et al.* eingeführte De-Ritis-Quotient als Maß der Leberschädigung bestimmt werden (166). Ein De-Ritis-Quotient < 1 spricht für einen geringen Leberschaden, wie er z. B. durch eine milde Hepatitis verursacht wird, ein De-Ritis-Quotient > 1 spricht für einen schwerwiegenderen Leberschaden, welcher unter anderem bei alkoholtoxischen Leberschäden auftritt (166).

Der De-Ritis-Quotient der mit Standardfutter gefütterten Tiere betrug $0,88 \pm 0,06$ und spricht somit für eine leichte Leberschädigung. Eine schwerwiegende Leberschädigung war bei Fütterung des 15%-KH-Futters zu verzeichnen. Der De-Ritis-Quotient

betrug hier $1,23 \pm 0,14$ (Abb. 29). Diese starke Leberschädigung könnte eine Begründung für die hohen Sterberaten der ASV-B-HCC-Mäuse darstellen.

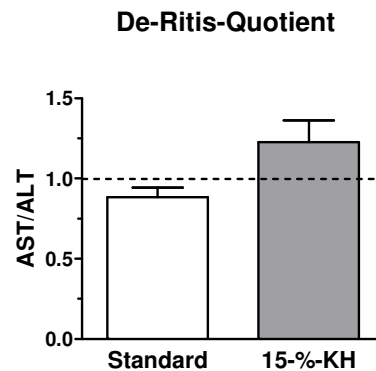


Abb. 29: De-Ritis-Quotient der ASV-B-Tiere

Der De-Ritis-Quotient der ASV-B-Tiere bei Fütterung von Standard- (weiß) und 15%-KH-Futter (grau) wurde nach Versuchsende durch Bestimmung der Parameter AST und ALT ermittelt.

3.4.2.4 Histologische Analyse der HCC-Tiere

Um den Effekt der 15%-KH-„Diät“ auf das Tumorstadium der überlebenden Tiere zu analysieren, sollten diese Tiere zunächst mit der unter 2.2.5.4 vorgestellten Methode analysiert werden. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass die Gewebe dieser Tiere sehr inhomogen und so stark geschädigt waren, dass eine valide Analyse der Tumormarkierung dieser Tiere durch Markieren der Tumoreareale nicht möglich war. Die Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Gewebe der WT-Tiere wurden aufgrund dieser Tatsache einem erfahrenen Pathologen (Prof. Dr. Christoph Loddenkemper) zur Bewertung vorgelegt.

Dieser bestätigte, dass regressive Areale in den Histologien zu sehen sind. Diese regressiven Flächen traten in Form von Nekrosearealen⁹ auf (Abb. 30 Pfeile). Eine Auswertung der 2-DG-behandelten 15%-KH-Futter-WT-Tiere sowie der HIF-KO-Tiere fand an dieser Stelle nicht statt.

⁹ Der Tod einer Zelle durch Schädigung der Zellstruktur wird als Nekrose bezeichnet.

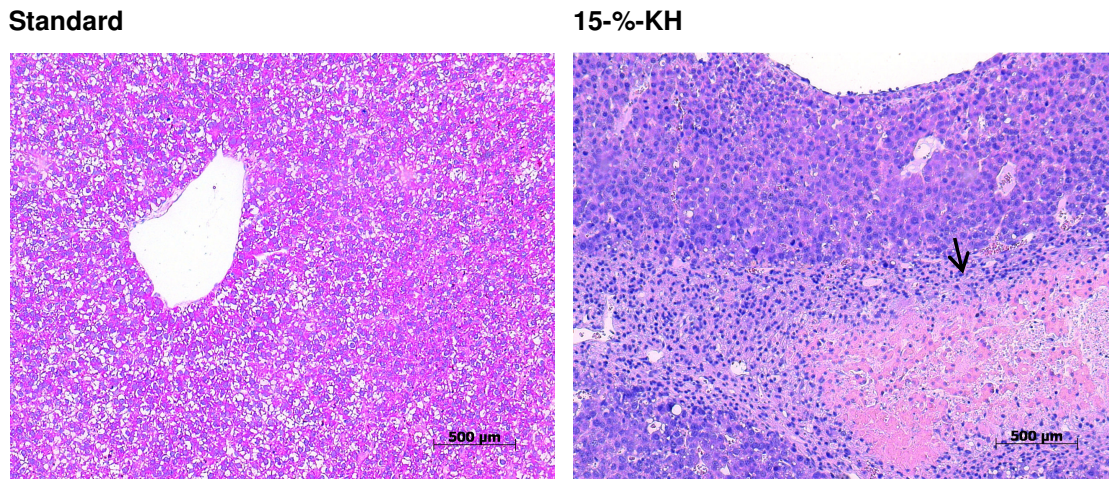


Abb. 30: Hämatoxylin- und Eosin-gefärbte murine Leberhistologien

Beispielhaft gezeigt sind ausgewählte Histologien von 2 Versuchstieren in 100-facher Vergrößerung. Links angeordnet ist die gefärbte Leber eines Tieres, welches mit Standardfutter gefüttert wurde, rechts angeordnet die Leber eines Tieres, welches 15%-KH-Futter erhielt. Das nekrotische Areal ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

3.5 Erzeugung und Untersuchung 2-DG-resistenter Zellen

Die fehlende Wirksamkeit von 2-DG im Tiermodell könnte durch eine Resistenzentstehung der Tumoren gegenüber 2-DG erklärt werden. Um die molekularen Mechanismen dieser Resistenz genauer untersuchen zu können, wurden 2-DG-resistente Derivate beider HCC-Zelllinien generiert. Hierzu wurden die Zellen mit ansteigenden 2-DG-Konzentrationen behandelt. Dieses Vorgehen ist international etabliert (148-150). Jede 2-DG-Konzentration wurde in 3 Zyklen zu je 120 h verabreicht. Nach jedem Zyklus wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 95 % in der Zellkulturflasche mit normalem Medium inkubiert. Dies diente als Erholungsphase zwischen den Behandlungen. Nachdem beide Zelllinien die 12- oder 16-fache IC_{50} -Dosis je drei Zyklen lang erhalten hatten, wurden sie auf ihre Resistenz gegenüber 2-DG getestet. Hierzu wurde zunächst die IC_{50} der resistenten Zellen ermittelt.

3.5.1 Das Proliferationsverhaltens der resistenten Zellen

Nach einer 72-stündigen Behandlung der Zelllinien mit unterschiedlichen 2-DG-Konzentrationen wurde die mittlere inhibitorische Konzentration bestimmt.

Hierbei war zu sehen, dass die IC_{50} der resistenten Hep G2 (Hep G2_R) bei einer 2-DG-Konzentration vom 3 mM liegt (Abb. 31 A). Die Hep G2_R-Zellen besitzen somit

eine 3-fach höhere IC_{50} als ihre Ausgangszellen (WT). Die IC_{50} der resistenten SK-HEP-1 (SK-HEP-1_R) liegt bei 1 mM 2-DG. Diese Zellen besitzen somit eine 4-fach höhere IC_{50} als ihre WT-Zellen (Abb. 31 B).

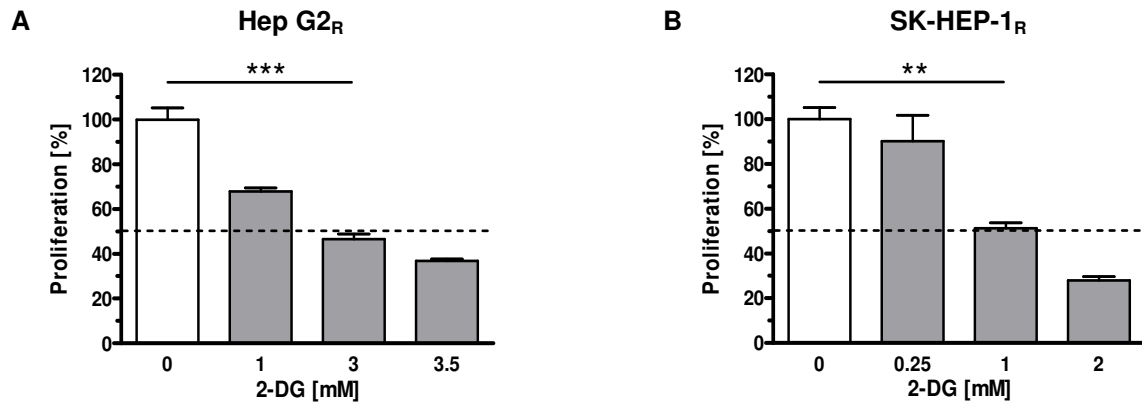


Abb. 31: Ermittlung der IC_{50} (2-DG) der resistenten Zellen

Die IC_{50} der resistenten Hep G2-Zellen (A) und der resistenten SK-HEP-1-Zellen (B) wurde nach 72-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen 2-DG-Konzentrationen (grau) bestimmt. Als Kontrolle dienten die unbehandelten Zellen jeder Zelllinie (weiß). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Weiterhin zeigte sich, dass die unbehandelten resistenten SK-HEP-1-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten SK-HEP-1-WT-Zellen eindeutig schneller proliferierten (Abb. 32).

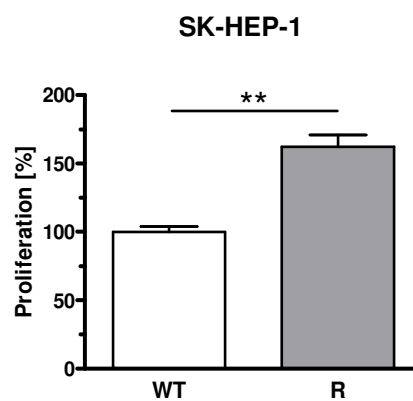


Abb. 32: Proliferationsverhalten der SK-HEP-1_R im Vergleich zu SK-HEP-1-WT

Die Proliferation der unbehandelten SK-HEP-1_R-Zellen (grau) und der Ausgangszelllinie (WT) wurde nach 72 h ermittelt. WT – Wildtyp (weiß), R – resistente (grau), ** $p < 0.01$

Es konnte gezeigt werden, dass beide Zelllinien durch die Behandlung resistenter gegenüber 2-DG wurden und die Proliferation der resistenten SK-HEP-1-Zellen um ca. 50 % im Vergleich zu den Ausgangszellen erhöht war.

Es stellt sich hier die Frage nach den resistenzvermittelnden Mechanismen. Dazu sollte zu Anfang die Glukoseaufnahme beider resistenter Zelllinien gemessen werden. Hierbei könnten 2 mögliche Mechanismen eine Rolle spielen:

- kompensatorische Glukoseaufnahme und dadurch verringerte Wirksamkeit von 2-DG;
- Verringerung der Glykolyserate in resistenten Zellen.

Die kompensatorische Glukoseaufnahme würde zu einer gesteigerten Aufnahme der Glukose durch die resistenten Zellen führen und dadurch die Glukosekonzentration im Medium im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindern.

Weiterhin ist bekannt, dass 2-DG die glykolysererelevanten Proteine Hexokinase 2 (Hk2) und Phosphoglukose-Isomerase (Pgi) inhibiert. Eine längerfristige 2-DG-Exposition könnte zur verminderten Expression beider Gene und somit zur verringerten Glykolyserate führen. Die 2-DG-resistenten Zellen könnten eventuell auf alternative Wege zur Energiegewinnung und Generierung von Redoxprodukten (z. B. Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, NADPH) zurückgreifen. In diesem Fall sollte die Glukoseaufnahme der resistenten Zellen deutlich geringer als die der Kontrollzellen sein.

3.5.2 Analyse der resistenzvermittelnden Mechanismen

3.5.2.1 Untersuchung der Glukoseaufnahme

Zur Analyse der Glukoseaufnahme durch die resistenten Zellen wurde sowohl die Expression des Glukosetransporters 1 (*GLUT1*) als auch die Aufnahme der Glukose aus dem Zellmedium untersucht.

Analyse der Expression des Glukosetransporters 1

Die Analyse des *GLUT1* erfolgte mittels qPCR. Die *GLUT1*-Expression beider resistenter Zelllinien unterschied sich nicht merklich von der Expression der Vorläuferzellen (Abb. 33).

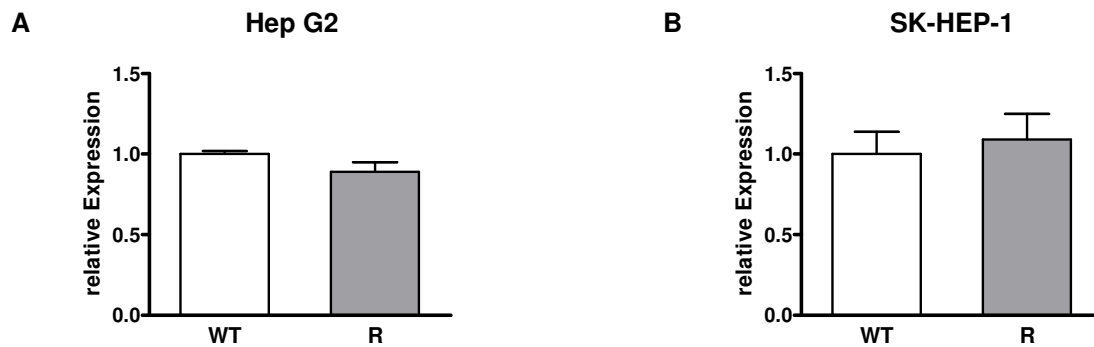


Abb. 33: Genexpression von GLUT1 in resistenten HCC-Zellen

Die Genexpression von GLUT1 wurde in den Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) ermittelt. Die Expression wurde als x-facher Wert ausgehend von den WT-Zellen berechnet. W – Wildtyp (weiß), R – resistente (grau)

Analyse der Glukoseaufnahme

Die Ermittlung der Glukosekonzentration im Medium erfolgte nach 16 und 24 h mithilfe eines Blutzuckermessgeräts (Contour, Bayer AG). Die Glukoseaufnahme wurde anschließend auf die gezählte Zellzahl normiert. Hierbei war zu sehen, dass die Glukoseaufnahme beider resistenter Zelllinien nach 16 h der Glukoseaufnahme der WT-Zellen entsprach (Abb. 34). Die Ermittlung der Medium-Glukosekonzentration der SK-HEP-1-Zellen nach 24 h gestaltete sich schwierig, da diese zumeist unterhalb der Nachweisgrenze des Geräts lag.

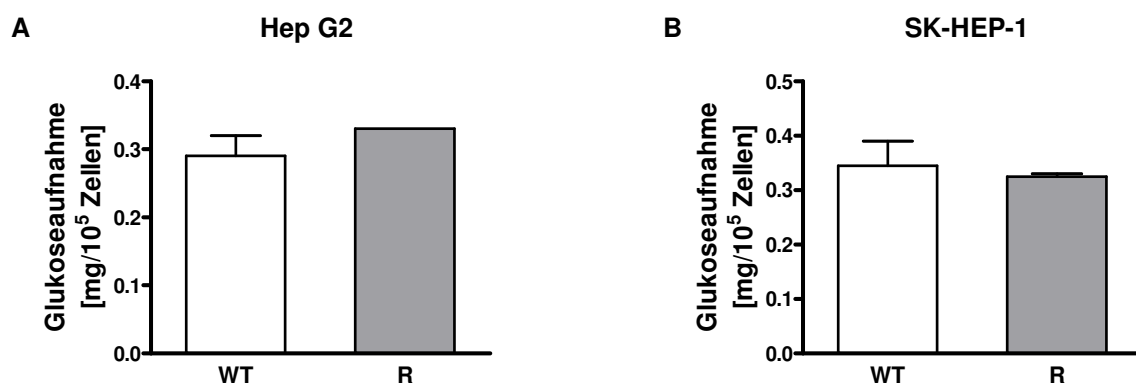


Abb. 34: Analyse der Glukoseaufnahme der 2-DG-resistenten Zellen

Gezeigt ist die Glukoseaufnahme der 2-DG-resistenten (grau) Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) im Vergleich zu den WT-Zellen (weiß). Die Bestimmung der Glukoseaufnahme erfolgte 16 h nach Mediumwechsel. WT – Wildtyp (weiß), R – resistente (grau)

Eine Modifikation der Glykolyse bzw. glykolyserrelevanter Gene und Proteine konnte somit mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Einen weiteren möglichen Resistenzmechanismus könnte die Kompensation der langfristigen 2-DG-

Behandlung der Zellen durch Steigerung der ER-Stress-Antwort darstellen. Es ist möglich, dass eine gesteigerte Expression der Chaperone *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* die Zellen vor Schädigung durch Proteinakkumulation und Zelltod schützt.

3.5.2.2 Regulation der Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums

Betrachtet man die qPCR Ergebnisse, so ist ersichtlich, dass die resistenten Hep G2-Zellen eine eindeutige, aber nicht signifikante Inhibition der Genexpression aller analysierten Chaperone (*CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1*) aufwies (Abb. 35 A, graue Balken). Die qPCR-Ergebnisse der resistenten SK-HEP-1-Zellen deuteten auf eine unveränderte Expression der 3 Chaperone hin (Abb. 35 B, graue Balken).

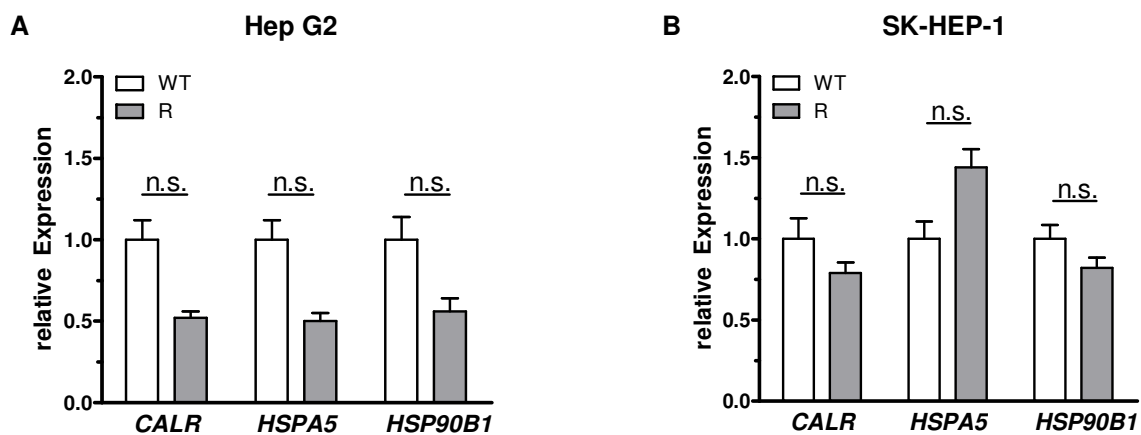


Abb. 35: Genexpression von ER-Stress-Chaperonen in resistenten Zellen

Die Genexpression der Chaperone *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* in resistenten (grau) Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) wurde im Vergleich zu den WT-Zellen (weiß) untersucht. WT – Wildtyp (weiß), R – resistente (grau), n.s. – nicht signifikant

Da die Analysen der ER-Stress-Chaperone *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* keine eindeutige Antwort bezüglich der Resistenzentstehung gegenüber 2-DG lieferten, sollte im Folgenden Hif-1 als wichtiger resistenzvermittelnder Faktor untersucht werden.

3.5.2.3 Analyse der Expression von Hif-1 α

Wie zuvor beschrieben, kann Hif-1 die Resistenz von Zellen gegenüber 2-DG vermitteln. Es ist denkbar, dass eine Resistenz der Zellen gegenüber 2-DG durch eine gesteigerte Hif-1 α -Proteinexpression vermittelt wird.

3.5.2.3.1 Analyse der Hif-1 α -Proteinexpression mittels Western-Blot

Die Isolation der Kernextrakte erfolgte, wie zuvor beschrieben (2.2.3.1). Als Kontrollzellen dienten die WT-Zellen beider Zelllinien. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hif-1 α -Proteinexpression der SK-HEP-1_R denen der SK-HEP-1-WT-Zellen entsprach. Wohingegen die Hif-1 α -Proteinexpression der Hep G2_R im Vergleich zu den Hep G2-WT-Zellen erhöht ist (Abb. 36).

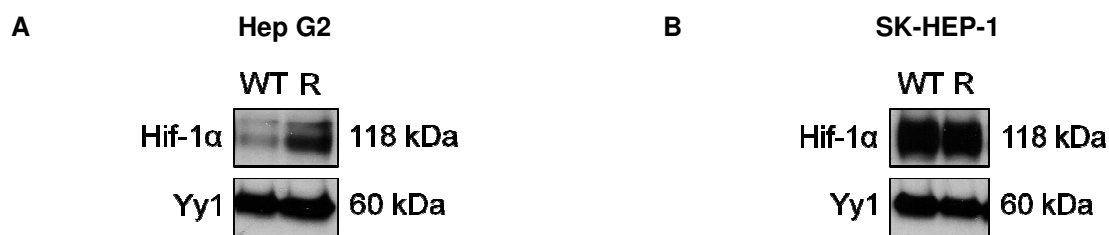


Abb. 36: Hif-1 α -Proteinexpression der resistenten HCC-Zellen

Die Hif-1 α -Proteinexpression der Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) wurde mittels Western-Blot-Analysen bestimmt. Als Ladekontrolle diente Yy1. WT – Wildtyp, R – resistente Zellen

3.5.2.3.2 Analyse der Genexpression von *HIF1A* und des Zielgens *CA9*

Nur mithilfe der Hif-1 α -Proteinexpression allein kann jedoch noch keine Aussage über die Funktionalität des Hif-1-Proteins getroffen werden. Aus diesem Grund wurde im Anschluss an die Western-Blot-Analysen die Genexpression des durch Hif-1 sehr stark aktivierten Zielgens *CA9* mittels qPCR analysiert. Hierbei war jedoch zu sehen, dass die Expression von *CA9* in den resistenten Hep G2- und SK-HEP-1-Zellen eindeutig inhibiert war (Abb. 37).

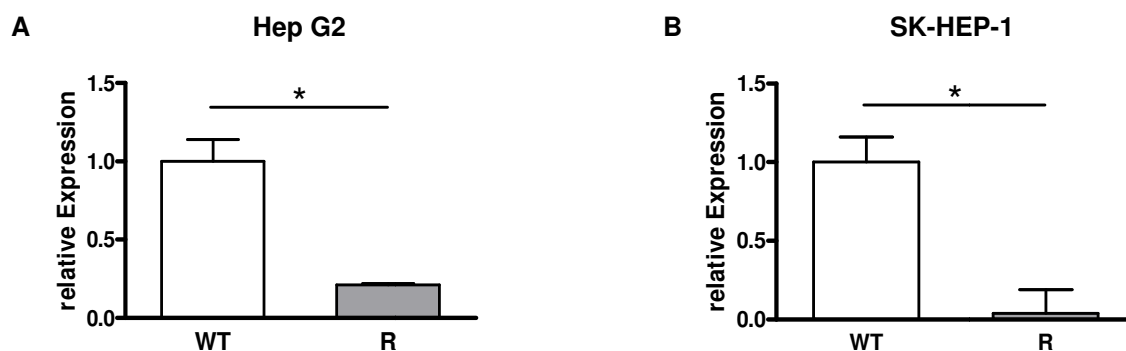


Abb. 37: Genexpression von *CA9* in resistenten HCC-Zellen

Die Expression des Hif-1-Zielgens *CA9* wurde in den Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) durch qPCR-Analysen bestimmt. Die Expression wurde als x-facher Wert ausgehend von den WT-Zellen berechnet. WT – Wildtyp (weiß), R – resistente (grau), * $p < 0.05$

Diese Beobachtung steht im klaren Gegensatz zu den Ergebnissen der Proteinexpressionsanalysen, die eine erhöhte Expression von Hif-1 α in den HepG2_R und eine gleichbleibende Expression in den SK-HEP-1_R im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten. Aufgrund dessen wurde die Genexpression von *HIF1A* in beiden Zelllinien ermittelt. Hier war zu sehen, dass die resistenten Hep G2-Zellen eine deutlich inhibierte (Abb. 38 A) und die resistenten SK-HEP-1-Zellen eine nicht signifikant erhöhte (Abb. 38 B) *HIF1A*-Genexpression aufwiesen.

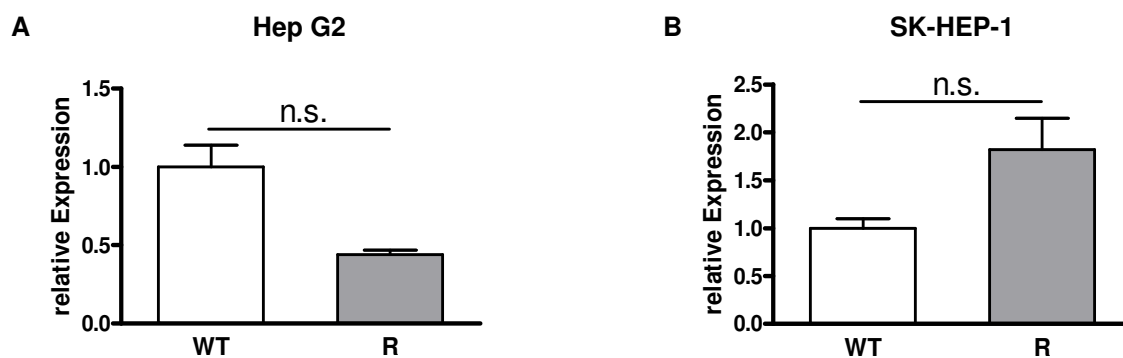


Abb. 38: Genexpression von *HIF1A* in resistenten Zellen

Die Expression von *HIF1A* wurde in den Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B) mittels qPCR bestimmt. Die Expression wurde als x-facher Wert ausgehend von den WT-Zellen berechnet. WT – Wildtyp (weiß), R – resistente (grau), n.s. – nicht signifikant

Obwohl die Genexpression von *HIF1A* in den Hep G2_R-Zellen und die des Zielgens *CA9* in beiden resistenten Zelllinien sehr stark gehemmt war, schien die Hif-1 α -Proteinexpression kaum betroffen zu sein. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei dem im Western-Blot nachgewiesenen Hif-1 α -Protein möglicherweise um eine zelluläre Akkumulation von nicht funktionalem Protein handelte und aufgrund der fehlenden Funktionalität die Genexpression des Zielgens *CA9* verringert war. Aufgrund dessen sollte die Aktivität vom Hif-1 im Folgenden mithilfe eines Luciferase-Reporter-Assays untersucht werden.

3.5.2.3.3 Bestimmung der Hif-1-Aktivität mittels Luciferase-Reporter-Assay

Die Aktivität von Hif-1 in den resistenten Zellen wurde unter Zuhilfenahme eines HRE-Luciferase-Reporter-Plasmids ermittelt. Hierbei bindet das Hif-1-Protein an die HRE-Sequenz im Promotor, der der Luciferase vorangestellt ist. Findet eine Bindung statt, kommt es zur Expression der Luciferase. Anschließend kann durch Verwendung spezifischer Substrate die Luciferase-Aktivität gemessen werden. Diese Mes-

sung gibt Aufschluss über die transkriptionelle Aktivität und Funktionalität von Hif-1. Die Ermittlung der relativen Aktivitäten der resistenten Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen zeigte eine 2,3-fach gesteigerte Aktivität in den Hep G2_R-Zellen (Abb. 39 A) sowie eine nicht signifikant erhöhte Aktivität in den SK-HEP-1_R-Zellen (Abb. 39 B).

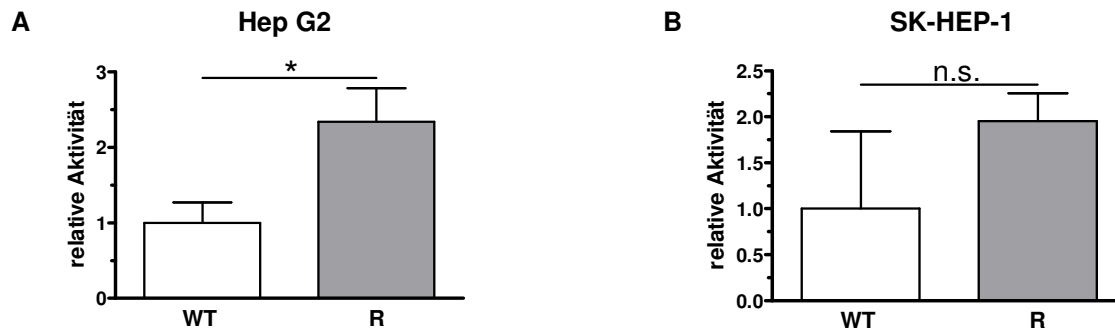


Abb. 39: Luciferase-Aktivitätsmessung der resistenten Zellen

Abgebildet ist eine exemplarische Messung der Luciferase-Aktivität der Hep G2-Zellen (A) und SK-HEP-1-Zellen (B). Die relative Aktivität der resistenten Zellen wurde als x-facher Wert der WT-Zellen bestimmt. WT – Wildtyp (weiß), R – resistente (grau), n.s. – nicht signifikant, * $p < 0.05$

Die Luciferase-Assays zeigen eindeutig, dass die Funktionalität von Hif-1 in beiden resistenten Zelllinien nicht beeinträchtigt ist. Dadurch kann die Diskrepanz zwischen der verstärkten Hif-1 α -Proteinexpression und der verringerten *HIF1A*-Genexpression in den Hep G2_R jedoch nicht erklärt werden. Zudem ist davon auszugehen, dass die verringerte Genexpression von *CA9* demnach nicht im Zusammenhang mit der Expression von Hif-1 steht und somit gesondert betrachtet werden sollte.

4 Diskussion

Die späte Diagnosestellung und das damit einhergehende Fehlen kurativer Therapieformen stellen zentrale Probleme bei der Behandlung des Hepatozellulären Karzinoms dar. Darüber hinaus weist das HCC eine ausgeprägte Resistenz gegenüber systemischen Chemotherapeutika auf. Es ist daher von großer Bedeutung, innovative Therapieformen zu entwickeln. Metabolische Veränderungen, zu denen auch die gesteigerte Glykolyse gehört, stellen ein bedeutendes Charakteristikum solider Tumoren dar. In dieser Arbeit sollte der Effekt der Glykolysehemmung durch das Glukoseanalogon 2-Deoxy-D-Glukose als potenzielles Therapeutikum zur Behandlung des Hepatozellulären Karzinoms näher charakterisiert werden. Darüber hinaus sollten potenzielle resistenzvermittelnde Mechanismen durch die Charakterisierung 2-DG resistenter Zellen untersucht werden.

4.1 Die Wirkmechanismen von 2-DG unter Standardglukosekonzentrationen *in vitro*

4.1.1 Proliferation der HCC-Zelllinien

Es konnte 1 mM 2-DG als IC_{50} der Hep G2-Zellen und 0,25 mM als IC_{50} der SK-HEP-1-Zellen ermittelt werden. Die SK-HEP-1-Zellen reagierten somit deutlich sensibler auf eine Behandlung mit 2-DG. Auch in anderen Zelllinien variierten die 2-DG-Konzentrationen, die verwendet werden mussten, um eine Proliferationshemmung zu erreichen, stark. Um eine antiproliferative Wirkung bei 2 Brustkrebszelllinien zu erzielen, setzen Aft *et al.* beispielsweise 4 mM 2-DG ein. Die 2 Brustkrebszelllinien SkBr3 und MDA-MB-468 reagieren dabei völlig unterschiedlich auf gleiche 2-DG-Konzentrationen. Während die Zelllinien MDA-MB-468 eine 30-prozentige Proliferationsinhibition zeigte, wuchs die SkBr3 Zelllinie bei gleicher 2-DG-Konzentration nicht mehr (167). Liu *et al.* zeigten in einer Melanomzelllinie eine 50-prozentige Proliferationshemmung bei Einsatz von 0,4 mM 2-DG (168). Die 2-DG-Konzentration, die eingesetzt werden muss, um antiproliferativ zu wirken, scheint demnach nicht nur zelltypspezifisch, sondern auch innerhalb gleicher Zelltypen zelllinienspezifisch zu sein. Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Empfindlichkeit der SK-HEP-1-Zellen gegenüber 2-DG könnte im geringeren Differenzierungsgrad liegen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass es sich bei Hep G2 um eine gut differenzierte und bei SK-HEP-1 um eine schlecht differenzierte Zelllinie handelt (169; 170). Anhand histologischer Analysen an Schilddrüsenkarzinomen mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden konnten Grabellus *et al.* zeigen, dass die Expression des glykolyserelevanten Proteins Glut1 mit dem Grad der Dedifferenzierung (und somit auch der Malignität) ansteigt (171). Reis *et al.* konnten Ähnliches bei der Analyse von Urothelkarzinomen zeigen (172). Schlecht differenzierte Karzinome und somit vielleicht auch schlecht differenzierte Zelllinien könnten stärker von der Glykolyse abhängig sein als ihre gut differenzierten Formen. Die stärkere Abhängigkeit der SK-HEP-1-Zellen von der Glykolyse könnte sich unter Umständen in der höheren Sensitivität gegenüber dem Glykolysehemmer 2-DG widerspiegeln.

4.1.2 Zellzyklusanalysen der Hep G2- und SK-HEP-1-Zellen

Die proliferationshemmende Wirkung von 2-DG könnte sich unter anderem in Zellzyklusunterbrechung und Apoptose begründen. Es konnte in beiden Zelllinien jedoch kein Effekt der 2-DG-Behandlung auf Zellzyklus und Zelltod gemessen werden. Diese Beobachtung geht mit Ergebnissen von Zhang *et al.* einher, die zeigten, dass der antiproliferative Effekt von 2-DG auf Hep G2 nicht durch Änderungen im Zellzyklus oder erhöhte Apoptoseraten zu erklären ist. Der mögliche antiproliferative Mechanismus wurde nicht geklärt (69). Dasselbe konnte für Osteosarkomzellen, die mit 7,3 mM 2-DG behandelt wurden, gezeigt werden (173). Im Gegensatz dazu beobachteten Aft *et al.*, dass die Behandlung von Brustkrebszellen mit 2-DG zur Apoptose führte (167). Des Weiteren führte die Behandlung mit 2-DG zu einer Erhöhung der Prä-G1-Phase oder zum G1/G0- bzw. G2/M-Phase-Arrest in verschiedenen Glioblastom-, Eierstockkrebs- und Mesotheliomzellen (69). In beiden Publikationen wurden jedoch entweder sehr hohe 2-DG-Konzentrationen verwendet oder die Zellen über einen längeren Zeitraum als den in dieser Arbeit gewählten mit 2-DG behandelt. Folglich sind auch die Effekte von 2-DG auf Zellzyklus und Apoptose vom Zelltyp abhängig.

4.1.3 Vermittelt das Hif-1-Protein die Resistenz gegenüber 2-DG?

Der für eine antiproliferative Wirkung erforderliche Einsatz hoher 2-DG-Konzentrationen könnte für eine Resistenzentstehung der Hep G2- und SK-HEP-1-Zellen

sprechen. Wie bereits erwähnt, kann Hif-1 zur Resistenzentstehung gegenüber Chemotherapeutika unter anderem durch Regulation von *MDR1* und Apoptose beitragen (123; 157). Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Behandlung mit 2-DG zur Stabilisierung von Hif-1 unter Normoxie führen könnte. Zum einen konnten Maher *et al.* eine Hif-1-vermittelte Resistenz gegen 2-DG bei Aktivierung des Hif-1 durch Hypoxie beobachten (31). Zum anderen kann Hif-1 auch sauerstoffunabhängig aktiviert werden (1.1.2.2).

Interessanterweise führte die Behandlung beider HCC-Zelllinien mit 2-DG im Verlauf der vorliegenden Arbeit nur kurzzeitig zur Inhibition der Hif-1 α -Proteinexpression. Im Einklang mit diesen Daten waren auch die Expressionslevel der Hif-1-Zielgene *PGK* und *CA9* nach 24-stündiger Behandlung mit 2-DG nicht verändert.

Es ist einerseits vorstellbar, dass die Mechanismen, welche die Hif-1 α -Proteinexpression nach 6 h inhibierten, durch beide Zelllinien so umgangen wurden, dass die Hif-1 α -Proteinexpression nach 16 h nicht mehr gehemmt wurde. Andererseits ist bekannt, dass die Plasmahalbwertszeit von 2-DG nur 5–6 h beträgt (174). Durch diese kurze Halbwertszeit und die dadurch rasch absinkende Menge der verfügbaren 2-Deoxy-D-Glukose wäre die Inhibition von Hif-1 α zeitlich sehr limitiert. Weiterhin könnte die kurzzeitige Hemmung der Hif-1 α -Proteinexpression ein indirekter Effekt der 2-DG-Behandlung sein, welcher für die durch 2-DG verursachte Proliferationshemmung nicht relevant war. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass die funktionelle Inaktivierung von Hif-1 α in beiden Zelllinien zu keiner Änderung der Sensitivität gegenüber 2-DG unter normoxischen Bedingungen führte. Somit scheint eine Hif-1-verursachte Resistenzentstehung ausgeschlossen zu sein. Diese Resultate werden durch Beobachtungen von Maher *et al.* gestützt, die zeigen, dass HeLa-Zellen mit funktioneller Inaktivierung von Hif-1 α nur unter Hypoxie sensitiver auf 2-DG reagierten. Die Zytotoxizität des 2-DG war in den Hif-1 α -defizienten Zellen konzentrationsabhängig bis zu 40 % höher (31). Eine Resistenzentstehung, verursacht durch Hif-1 unter normoxischen Bedingungen, konnte damit ausgeschlossen werden.

4.1.4 Die Induktion von ER-Stress-Genen *in vitro*

Die Auswertung von Transkriptomanalysen zeigte, dass die Behandlung beider HCC-Zelllinien mit 2-DG zur gesteigerten Expression der Chaperone *CALR*, *HSPA5* und

HSP90B1 führt. Diese Beobachtung konnte für die Zelllinie SK-HEP-1 durch qPCR-Messungen bestätigt werden.

Kommt es aufgrund einer Anhäufung ungefalteter oder falsch gefalteter Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) zum ER-Stress, werden verschiedene Signalwege, welche die *unfolded protein response* (UPR) vermitteln, aktiviert. Eine erhöhte Expression der oben genannten Chaperone erfolgt im Verlauf der UPR und dient der Wiederherstellung der zellulären Homöostase und der Rettung der Zellen vor dem Zelltod (175). Die hier gemessene erhöhte Expression der ER-Stress-Chaperone steht im Einklang mit Daten anderer Arbeitsgruppen, die zeigen, dass die Behandlung mit 2-DG zu ER-Stress in verschiedenen Zellen führte (67; 176-178). Die Induktion von ER-Stress durch 2-DG erfolgt über die Hemmung der N-Glykosylierung der Proteine im ER (67; 179). Durch Signalwege, die während der Stresssituation initiiert werden, könnte die proliferationshemmende Wirkung von 2-DG auf beide Zelllinien erklärt werden.

Zum einen kommt es bei einer persistierenden UPR zur Aktivierung apoptotischer Signalwege. Ob die proliferationsinhibierende Wirkung von 2-DG auf der Induktion von Apoptose beruht, kann mithilfe der Zellzyklusanalysen ermittelt werden. Obwohl man die Zellen, welche in der Prä-G1-Phase dargestellt werden, ohne weitergehende Untersuchungen nicht eindeutig als apoptotische oder nekrotische Zellen charakterisieren kann, gibt die Prä-G1-Phase dennoch einen Aufschluss über die Anzahl der unter 2-DG-Behandlung gestorbenen Zellen. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Zellzyklusanalysen beider 2-DG-behandelter Zelllinien jedoch eindeutig, dass die Prä-G1-Phase nicht erhöht ist. Die Aktivierung apoptotischer Signalwege als Ursache der proliferationshemmenden Wirkung von 2-DG konnte somit ausgeschlossen werden.

Weiterhin kann die Proliferationshemmung durch Mechanismen der UPR selbst verursacht werden. Ein wichtiger Signalweg, welcher zur Aktivierung der UPR führt, wird durch den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2- α Kinase 3 (Perk) vermittelt. Diese Aktivierung der Per-Kinase führt durch Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 α (Eif2 α) zu dessen Inaktivierung und resultiert dadurch in der Verringerung der Proteintranslation der *messenger* RNA (180; 181). Dies führt zur Reduktion der Proteinlast im ER, aber durch das resultierende Fehlen wichtiger Proteine zeitgleich zur Verringerung der Zellproliferation (182).

Neben der Aktivierung verschiedener UPR-Signalwege versucht die Zelle, ihre Homöostase durch Autophagiemechanismen wiederherzustellen. Die Autophagie dient hierbei als alternativer Signalweg zur Degradierung falsch gefalteter Proteine, die durch den ER-assoziierten Abbauweg (*endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*, ERAD) allein nicht beseitigt werden können (183). Die Untersuchung autophagierelevanter Proteine wurde im Verlauf dieser Arbeit nicht durchgeführt. Da jedoch bekannt ist, dass die im Verlauf der UPR verstärkt exprimierten Chaperone Hspa5 und Hsp90b1 die Apoptose supprimieren (184-186) und 2-DG Autophagie in verschiedenen Zelllinien hervorruft (187), ist es möglich, dass es auch im Fall der SK-HEP-1-Zellen zur Ausbildung von Autophagie kommt.

4.2 Auswirkung einer 2-DG-Behandlung auf das Tumorstadium des transgenen HCC-Mausmodells *in vivo*

Das Lebergewicht sowie der Lebergewicht-Körpergewicht-Quotient der Tiere sollten einen ersten Überblick über eine mögliche Reduktion des Tumorstadiums geben. Ein geringerer Lebergewicht-Körpergewicht-Quotient der mit 2-DG behandelten Tiere könnte für eine Reduktion im Tumorstadium bzw. eine Regression der Tumoren sprechen. Es konnten jedoch weder Änderungen im Lebergewicht noch im Lebergewicht-Körpergewicht-Quotienten verzeichnet werden.

Beide Analysemethoden sind allerdings limitiert. Kleinere Änderungen in der Tumorstadium können hierdurch nicht detektiert werden. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine valide Analysemethode für die Bestimmung der Tumorstadium vorhanden war, erfolgte die Etablierung einer neuen Auswertungsmethode. Hierbei wird die Tumorstadium anhand von H&E-gefärbten Schnitten quantifiziert. Auch hier zeigte sich, dass die Behandlung mit 2-DG zu keiner Veränderung der Tumorstadium im ASV-B-Modell führte. Der antiproliferative Effekt, den 2-DG *in vitro* besitzt, konnte *in vivo* demzufolge nicht bestätigt werden.

Diese Beobachtung geht mit Daten anderer Arbeitsgruppen einher. Die Behandlung eines Xenograft-Pankreaskarzinommodells mit 1000 mg/kg 2-DG für 23 Tage resultierte in keiner Reduktion des Tumorgewichts. Auch hier war zuvor ein proliferationshemmender Effekt einer 2-DG-Behandlung der Pankreaskarzinomzelllinie panc-1 *in vitro* zu sehen (188). Einen ähnlichen Sachverhalt konnten auch Cheng *et al.* am Xenograft-Brustkrebsmodell beobachten, wobei hier die Behandlung der entspre-

chenden Brustkrebszelllinien mit 2-DG ebenfalls kaum antiproliferative Wirkung besaß (189). Im Gegensatz dazu belegen Daten von Merchan *et al.* einen 2-DG-verursachten antiangiogenen Effekt im transgenen Retinoblastom-Mausmodell, wobei hier keine Informationen über die Tumorlast existieren (67). Ein schwacher tumorhemmender Effekt konnte in einem heterotopen Brustkrebsmodell gezeigt werden. Um diese tumorinhibierende Wirkung zu erreichen, musste eine vierfach höhere 2-DG-Konzentration, verglichen zu den *In-vivo*-Experimenten in der vorliegenden Arbeit, verwendet werden (67; 190).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Antimetabolit 2-DG keinen antiproliferativen Effekt auf das Tumorwachstum im ASV-B-Mausmodell besaß. Die Datenlage ist hier sehr kontrovers, zeigt jedoch auch eher eine Unwirksamkeit von 2-DG hinsichtlich der Hemmung des Tumorwachstums. Es wird angenommen, dass eine Hif-1-unabhängige Resistenz gegenüber 2-DG entsteht.

Wie bereits erwähnt (1.1, 1.1.3), spielt das Tumormikromilieu bei der Entstehung von Chemotherapieresistenzen eine entscheidende Rolle. Das Tumormikromilieu könnte in diesem Fall über 2 Wege zur Entstehung der Chemotherapieresistenz gegenüber 2-DG beitragen. Einerseits herrschen sehr hohe Glukosekonzentrationen sowohl im Medium, als auch im Standardtierfutter. Die gesteigerte Aufnahme und Spaltung der Glukose im Zellstoffwechsel führt zur intrazellulären Anhäufung von Wasserstoffionen, welche aus der Zelle transportiert werden. Dies führt zur Anhäufung von Wasserstoffionen im tumorumgebenden Milieu und dadurch zum Absinken des extrazellulären pH-Werts. Es wird angenommen, dass diese Azidose zur Resistenzentstehung gegenüber Chemotherapeutika beiträgt (191). Andererseits könnten die hohen Glukosekonzentrationen im Medium sowie im Standardtierfutter zu einer kompensatorischen Glukoseaufnahme führen und dadurch die zelluläre Aufnahme von 2-DG verringern. Das führte zu der Annahme, dass die Verringerung der frei verfügbaren Glukose sowohl im Medium als auch im Tierfutter zur besseren Aufnahme und Wirksamkeit vom 2-DG führen könnte. Basierend auf diesen Überlegungen wurden die Glukosekonzentrationen im Zellkulturmedium und Tierfutter auf $\frac{1}{4}$ der zuvor verwendeten Menge reduziert.

4.3 Analyse der 2-DG-Wirkmechanismen bei Glukoserestriktion *in vitro*

4.3.1 Proliferationsverhalten beider HCC-Zelllinien

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit war zu sehen, dass die Kombination von Glukoserestriktion (1 g/l Glukose – Hep G2, 0,5 g/l – SK-HEP-1) und 2-DG-Behandlung zu einem synergistischen Effekt in Hinblick auf die Proliferationshemmung führt. Ähnliche Ergebnisse wurden durch Priebe *et al.* gezeigt. Hier war eine 2-DG-abhängige Reduktion der Proliferation von 5 verschiedenen Eierstockkrebszelllinien, die durch Kombination mit Glukosereduktion sogar noch verstärkt wurde, zu sehen (192). Wobei anzumerken ist, dass das verwendete Medium glukosefrei war. Auch ist es erstaunlich, dass Ozdemir *et al.* das 10-fache der in dieser Arbeit eingesetzten 2-DG-Konzentration verwenden mussten, um bei Hep G2 unter niedrigen Glukosekonzentrationen (1 g/l Glukose) eine 50-prozentige Proliferationshemmung zu erreichen (193).

Zudem zeigte sich in den in dieser Arbeit analysierten SK-HEP-1-Zellen allein bei Reduktion der frei verfügbaren Glukose eine Hemmung der Zellproliferation. Auch in einer Kolonkarzinomzelllinie, in einer Nierenzellkarzinomzelllinie sowie in den oben genannten Eierstockkrebszelllinien konnte dieser Sachverhalt beobachtet werden, wobei das Medium auch hier glukosefrei war (192; 194; 195). Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei SK-HEP-1 um eine schlecht differenzierte Zelllinie, von der anzunehmen ist, dass diese stärker auf die Zufuhr von Glukose angewiesen ist als die gut differenzierte Zelllinie Hep G2. Eine Reduktion der Glukose *per se* könnte auf das Wachstumsverhalten dieser Zelllinie somit einen stärkeren Einfluss besitzen.

4.3.2 Zellzyklusuntersuchungen der Hep G2- und SK-HEP-1-Zellen

Die Auswertung der Zellzyklusanalysen nach Behandlung der Zellen mit glukosereduziertem Medium und 2-DG zeigte keinen Einfluss der Kombination der Behandlungen auf die Zellzyklusverteilung beider HCC-Zelllinien. Auch die Glukoserestriktion allein hatte keinen Effekt. Im Gegensatz hierzu dokumentieren Daten von Isono *et al.* eine dreifach erhöhte Prä-G1-Phase der Nierenzellkarzinomzelllinie NC65 bei Wachstum im glukosefreien Medium (195). Weiterhin wies die Kolonkarzinomzelllinie RKO eine deutlich erhöhte Apoptose- und/oder Nekroserate bei Wachstum ohne Glukose im Vergleich zum Wachstum im Medium mit Glukose auf

(194). Der zuvor beobachtete synergistische proliferationshemmende Effekt von 2-DG und Glukosereduktion in beiden Zelllinien sowie die Verminderung der Proliferation der SK-HEP-1 bei alleiniger Reduktion der Glukosekonzentration (3.3.1.1) konnten, sofern die Effekte nicht unter der Nachweisgrenze der durchflusszytometrischen Analyseverfahren liegen, durch Änderungen im Zellzyklus nicht erklärt werden.

4.3.3 Die Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums

Das 24-stündige Wachstum beider Zelllinien im Medium mit niedrigen Glukosekonzentrationen (1 g/l Glukose Hep G2, 0,5 g/l Glukose SK-HEP-1) führte zu keiner Induktion der Genexpression der drei analysierten ER-Stress-Chaperone *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1*. In der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 konnte ebenfalls keine Proteinexpression von Hspa5 bei Wachstum im Medium mit 1 g/l Glukose verzeichnet werden. Erst der Entzug der gesamten Glukose führte zum Auftreten von ER-Stress, messbar an der Proteinexpression von Hspa5 (196). Auch Palorini *et al.* konnten in der transformierten murinen Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 nach 24-stündigem Wachstum im Medium mit 0,18 g/l Glukose keine Proteinexpression von Hspa5 nachweisen (197). Nach 72-stündigem Wachstum in glukosereduziertem Medium konnten jedoch sowohl auf Transkriptom- als zum Teil auch auf Proteinebene UPR-relevante Chaperone nachgewiesen werden (197). Die Transkriptomanalysen zeigen eine erhöhte Expression von *Hspa5* und *Hsp90b1* (197). Die Expression von *Calr* entsprach jedoch der Expression von *Calr* der Zellen, die im Medium mit hohen Glukosekonzentrationen kultiviert wurden, bzw. war diese nur minimal geringer (197). Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass möglicherweise der Zeitpunkt der RNA-Isolation später gewählt werden sollte. Palorini nimmt an, dass erst nach 72 h die Stresssituation durch das Fehlen der Glukose hervorgerufen wird. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Reduktion der Proliferation der transformierten NIH-3T3 Zellen verzeichnet (197). Zudem schien die in dieser Arbeit eingesetzte Glukosekonzentration nicht zur Induktion von ER-Stress zu führen. Mote *et al.* konnten eine Aktivierung des Hamster-ER-Stress-Chaperons *Hspa5* in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration messen. Auch hier zeigte sich eine Induktion der Genexpression erst bei Glukosekonzentrationen unter 1 g/l (198). Western-Blot-Analysen mit Hep G2-Zellen, die glukosereduziertes Medium erhielten

(≤ 5 mM Glukose, entspricht ca 0,8 g/l Glukose) zeigten eine Induktion der Proteinexpression von Hspa5 erst bei Konzentrationen unter 1 mM (entspricht ca. 0,16 g/l) Glukose (199).

In der vorliegenden Arbeit führte eine Kombination von reduzierter Glukosemenge im Medium und der Behandlung beider Zelllinien mit 2-DG in Hep G2 und SK-HEP-1 zu einer verstärkten Expression der ER-Stress-Chaperone, verglichen mit der alleinigen 2-DG-Behandlung. Es wurde angenommen, dass das Wachstum beider Zelllinien unter normalen Glukosekonzentrationen zu einer kompensatorischen Aufnahme der Glukose und dadurch zu einer verminderten Effektivität von 2-DG führte. Die Verringerung der Glukosemenge könnte nun zu einem synergistischen Effekt in Hinblick auf die gesteigerte Expression von ER-Stress-Genen, hier an *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* zu sehen, führen. Eine Steigerung der ER-Stress-Antwort durch Kombination von 2-DG-Gabe und Glukoserestriktion ist denkbar, da beide Behandlungen *per se* eine ER-Stress-Antwort verursachen. Literaturdaten liegen für eine Kombination bisher jedoch nicht vor.

Die Restriktion der verfügbaren Glukose in Kombination mit der 2-DG-Behandlung beider Zelllinien führte eindeutig zu einer Proliferationsinhibition, welche möglicherweise durch das Auslösen einer Stressantwort durch das endoplasmatische Retikulum erklärt werden könnte. Im Anschluss wurde die Auswirkung der Fütterung eines kohlenhydratreduzierten Futters auf das Tumorwachstum im HCC-Mausmodell analysiert.

4.4 Die Auswirkungen der Glukoserestriktion und 2-DG-Behandlung auf das Tumorwachstum im transgenen HCC-Mausmodell *in vivo*

Um die Auswirkungen einer Kohlenhydratrestriktion auf das Tumorwachstum im HCC-Mausmodell zu untersuchen, wurden ASV-B-WT- und HIF-KO-Tiere mit einem kommerziell hergestellten 15%-KH-Futter gefüttert und zeitgleich mit 2-DG behandelt. Ein erster Vorversuch mit ASV-B Mäusen, die 13–14 Wochen bzw. 16–17 Wochen alt waren, zeigte jedoch eine hohe Sterberate der Tiere, die bei Fütterungsbeginn 16–17 Wochen alt waren. Es ist bekannt, dass die Leberschädigung der Tiere im Alter von 12 Wochen vergleichbar mit dem adenomatösen Stadium ist. Ein Fortschreiten der Schädigung führt zur Entstehung von HCC in einem Alter von 16 Wochen und darüber hinaus (152; 153). Aufgrund dieser Altersklassifikation wurde an-

genommen, dass die Verträglichkeit des 15%-KH-Futters bei den ASV-B-Adenom- und HCC-Mäusen sehr unterschiedlich ist. Die beiden Altersgruppen wurden angesichts dieser Beobachtung gesondert voneinander untersucht.

4.4.1 *In-vivo*-Analyse der ASV-B-Adenom-Tiere

Während der ersten Versuchsreihe war zu sehen, dass die Kombination aus 15%-KH-Futter und der Behandlung mit 500 mg/kg 2-DG zu einer Verschlechterung des Gesundheitszustands der Tiere (struppiges Fell und kaum Motilität) führte. Aufgrund dessen erfolgte eine schrittweise Reduktion der 2-DG-Konzentration. Eine Konzentration von 125 mg/kg 2-DG erwies sich als geeignete Arbeitskonzentration, da sich der Zustand der Tiere hier nicht negativ veränderte. Zudem wurde das Behandlungsschema von einer 6-tägigen Behandlung auf eine 14-tägige Behandlung mit 2-tägiger Pause modifiziert. Dieses Schema ist der klinischen Behandlung von Tumorpatienten angepasst, welche therapeutische Agenzien mehrfach, mit definierten Pausen zwischen den Behandlungen, erhalten.

4.4.1.1 Untersuchung des Körpergewichts sowie Bestimmung der Tumorlast und der allgemeinen Fitness

Im Verlauf der 4-wöchigen Fütterung des 15%-KH-Futters wurde der Einfluss der Kohlenhydratreduktion auf das Körpergewicht der Versuchstiere ermittelt. Dies sollte der Bestimmung des Gesundheitszustands der Tiere dienen. Eine zu rasche Gewichtsabnahme kann unter Umständen den Gesundheitszustand der Tiere verschlechtern. Es war jedoch sowohl bei Hif-1 α -WT- als auch bei HIF-KO-Tieren keine Änderung des Körpergewichts im Versuchsverlauf messbar. Die Reduktion der Kohlenhydrate *per se* schien den Gesundheitszustand der Tiere somit nicht negativ zu beeinflussen. Auch Ho *et al.* konnten keine Reduktion des Körpergewichts in einem heterotopen Plattenepithelkarzinommodell bei Fütterung eines kohlenhydratreduzierten Futters mit ähnlicher Makronährstoffzusammensetzung verzeichnen. Zudem maßen sie ein leicht geringeres Körpergewicht bei Tieren, die spontan Brustkrebs entwickelten, wobei hier der sehr lang gewählte Versuchsrahmen (35 Wochen Fütterung) anzumerken ist (200). Ein ähnliches Verhalten dokumentierten auch Venkateswaran *et al.* an einem Xenograft-Prostatakarzinommodell. Eine Reduktion des Körpergewichts der Tiere, welche kohlenhydratreduzierte Kost erhielten, fand

hier ebenfalls erst ab einem Zeitraum von 3,5 Wochen nach Beginn der Fütterung statt (201).

Da die Bestimmung der Tumorlast durch Wiegen der Lebern nur einen groben Anhaltspunkt über den Therapieerfolg geben kann und mikroskopische Gewebsveränderungen, welche sich im Gewicht nicht niederschlagen, nicht detektierbar sind, wurden die histologisch aufbereiteten Gewebe der 4 Versuchsgruppen beider Genotypen mit der unter 2.2.5.4 beschriebenen Methode analysiert. Hierbei war zu sehen, dass sich die Tumorlast der unbehandelten WT-Tiere nicht von der Tumorlast der HIF-KO-Tiere unterschied. In einem heterotopen Mausmodell mit murinen Hepatomzellen konnte im Gegenteil dazu ein verringertes bzw. verlangsamtes Wachstum der subkutanen Tumoren, welche eine Defizienz in der β -Untereinheit des Hif-1-Proteins aufwiesen, gemessen werden (202). Ebenfalls unabhängig vom Genotyp der Tiere führte die Reduktion der Kohlenhydrate in der vorliegenden Arbeit zur signifikanten Reduktion der Tumorlast um 30–35 %.

Es kann mit dieser Untersuchungsmethode jedoch nicht ermittelt werden, ob das Tumorstadium verlangsamt wurde oder ob es zu einer Reduktion im Tumorstadium kam. Dazu müsste die Tumorlast von altersgleichen Mäusen bei Start der Fütterung ausgewertet werden. Eigene Computertomografiedaten einer sehr kleinen Gruppe von HIF-KO-Tieren (1 x HIF-KO 15%-KH-Futter, 2 x HIF-KO 15%-KH-Futter und 500 mg/kg 2-DG, in dieser Arbeit nicht gezeigt) deren Tumorlast einmal 10 Tage nach Fütterungsbeginn (Start der 2-DG-Behandlung) und nach 5-tägiger 2-DG-Behandlung gemessen wurde, zeigten jedoch eine leichte Reduktion des Tumorstadiums der gesamten Leber bei Fütterung von 15%-KH-Futter. Diese Reduktion war unabhängig von 2-DG (203). Ein verlangsamtes Tumorstadium in 2 Mausmodellen (heterotopes Plattenepithelkarzinommodell und Xenograft-Kolorektalkarzinommodell) wurde dagegen bei Fütterung mit kohlenhydratreduziertem Futter der gleichen Makronährstoffzusammensetzung gemessen (200). Ein reduziertes Tumorstadium konnte auch am Xenograft-Prostatakarzinommodell gezeigt werden (201).

Die zusätzliche Behandlung mit 2-DG führte zu keiner weiteren Reduktion der Tumorlast. Die Behandlung der ASV-B-HIF-KO-Tiere mit 2-DG zusätzlich zur Fütterung mit 15%-KH-Futter resultierte sogar in einer weniger starken Verringerung der Tumorlast, verglichen zur HIF-KO-15%-KH-Futter-Gruppe. Das ist jedoch zu vernachlässigen, da die Fehlerwerte der 15%-KH-Futter-HIF-KO-Tiere sehr hoch waren. Hieraus folgt die Frage, ob die eingesetzte 2-DG-Konzentration möglicherweise zu

gering war, oder ob die antitumorale Wirkung von 2-DG nach 2-wöchiger Gabe in der Tumorlast noch nicht detektierbar war.

Anhand der von Reagan-Shaw veröffentlichten Formel zur Kalkulation der einzusetzenden Dosis für die Verwendung von therapeutischen Agenzien im Mausmodell kann die adäquate 2-DG Menge entsprechend den klinischen Studien berechnet werden (204). In klinischen Studien werden zwischen 45 und 63 mg/kg 2-DG eingesetzt (174; 205). Eine humane Dosis von 45 mg/kg würde einer murinen Dosis von 525 mg/kg entsprechen. Es wurde in der vorliegenden Arbeit eventuell eine zu geringe 2-DG-Menge (125 mg/kg) verwendet. Jedoch führte eine Dosis von 500 mg/kg zu gesundheitlichen Beschwerden der Tiere. Es wurde nicht geklärt, ob 2-DG trotz fehlender wachstumshemmender Wirkung im Tumor potenziell andere positive Effekte in der Tumorbehandlung hervorruft. Wie bereits erwähnt, besitzt 2-DG z. B. antiangiogene Wirkung im transgenen Retinoblastom-Mausmodell. Um diesen Effekt zu bewirken, wurde jedoch mit einer 2-DG-Konzentration von 500 mg/kg gearbeitet (67).

Ein Einfluss der funktionellen Inaktivierung von Hif-1 α auf das Tumorstadium bei Verabreichung des 15%-KH-Futters sowie bei Kombination aus Kohlenhydratreduktion und 2-DG-Gabe konnte nicht beobachtet werden. Über den Zusammenhang zwischen Hif-1 und der Restriktion von Kohlenhydraten im Tiermodell ist zum jetzigen Zeitpunkt nichts bekannt. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sprechen jedoch für eine untergeordnete Rolle von Hif-1 bei der durch Kohlenhydratreduktion verursachten Wachstumsverringerng des murinen HCC. Ob das auch für andere Tumorentitäten zutrifft, muss gesondert geprüft werden. Kwon *et al.* beschrieben jedoch einen Zusammenhang zwischen dem Entzug von Glukose im Medium der humanen Prostatakarzinomzelllinie DU-145 und der verminderten Stabilisierung von Hif-1 (unter Hypoxie) *in vitro* (206).

Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass die körperliche Fitness der ASV-B-Tiere bei Restriktion der Kohlenhydrate im Futter tagesabhängig um ein Vielfaches höher war als die der Tiere, welche Standardfutter erhielten. Dies zeigte sich einerseits durch die Menge der täglich gelaufenen Gesamtstrecke und andererseits durch die Höhe der täglich gelaufenen Durchschnittsgeschwindigkeit. Die Durchschnittsgeschwindigkeit betrug das Doppelte und die Gesamtstrecke das bis zu 25-fache der Leistung der Kontrolltiere. Weiterhin war anhand der Gesamtstrecke ersichtlich, dass sich die körperliche Fitness der Kontrolltiere gegen Ende der Versuchsreihe weiter

verschlechterte. Auch die gelaufene Gesamtstrecke der 15%-KH-Tiere verringerte sich geringfügig. Hierbei ist jedoch erwähnen, dass aufgrund eines Messfehlers eines Laufrades nur 2 Tiere (Tag 9–12) gemessen werden konnten. Die Auswertung der durchschnittlich je Tier gelaufenen Strecke zeigt jedoch dieselbe Tendenz (Daten nicht gezeigt). Große Schwankungen in den Messwerten, die von der individuellen Fitness der Tiere abhängig sind, können durch die Vergrößerung der Gruppen auf 10 Tiere wahrscheinlich minimiert werden. Nichtsdestotrotz ist ersichtlich, dass die allgemeine Fitness der Tiere bei Fütterung des 15%-KH-Futters um ein Vielfaches besser war, auch wenn sie weit unter dem Durchschnitt einer gesunden Maus, welche ca. 4 km am Tag läuft, lag (207). Es konnte nicht geklärt werden, ob sich der Fitnesszustand der Tiere nach Start der Fütterung des 15%-KH-Futters nicht weiter verschlechterte oder sogar verbesserte. Nichtsdestotrotz belegt eine Metaanalyse von Tomlinson *et al.*, dass die körperliche Ertüchtigung zur Verringerung krebsbedingter Nebenwirkungen wie Depression, Schlafstörungen und dem Fatigue-Syndrom¹⁰ führen kann (208).

4.4.1.2 Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen der antiproliferativen Wirkung der Glukoserestriktion

Ampk als ATP/AMP-Sensor

Es ist bekannt, dass Änderungen im zellulären Energiehaushalt, die das AMP-zu-ATP-Verhältnis zugunsten von AMP verändern, zur Aktivierung der Amp-Kinase durch deren Phosphorylierung führen. Eine Aktivierung von Ampk resultiert unter anderem in einer Hemmung vom Mtor. Durch die Hemmung von Mtor wird die Aktivierung (Phosphorylierung) der ribosomalen Protein-S6-Kinase (Rps6kb1) verhindert (162). Rps6kb1 steuert viele zelluläre Prozesse, zu denen auch Proliferation, Zellüberleben und Proteinsynthese gehören (209). Zudem induziert Ampk Zellzyklusarrest und Apoptose durch Aktivierung von P53 (210; 211). Auch für die Prognose des HCC scheint Ampk von großer Bedeutung zu sein. Zheng *et al.* konnten durch histologische Untersuchungen an humanen HCC-Geweben eine Korrelation zwischen dem Grad an phosphoryliertem Ampk und dem Tumorstadium sowie der Überlebensrate der HCC-Patienten zeigen. Das Patientenkollektiv, welches eine geringere

¹⁰ Als Fatigue-Syndrom wird der Zustand anhaltender, schwerer Erschöpfung, der auch durch Erholungsmaßnahmen nicht zu beheben ist, bezeichnet.

Phosphorylierung von Ampk aufwies, war durch aggressivere Tumoren sowie höhere Sterberaten gekennzeichnet (212). Ähnliche Sachverhalte wurden auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses und im murinen Kolorektalkarzinommodell beobachtet (213; 214).

Aufgrund dieser Daten sollte die Phosphorylierung des murinen Ampk nach Fütterung des 15%-KH-Futters ermittelt werden. Western-Blots mit Lysaten von WT-Tieren, die entweder Standardkost oder 15%-KH-Futter erhielten, zeigten jedoch keine Unterschiede in der Phosphorylierung des murinen Ampk und der murinen Rps6kb1. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die Reduktion des finalen Tumorumfanges durch Änderungen im Phosphorylierungsgrad der Ampk-Kinase oder ihres Zielproteins Rps6kb1 zu erklären ist.

Verringerte Mapk-Phosphorylierung durch das Fehlen von Glukose

Die Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptortyrosinkinasen (Rtk) führt über mehrere Zwischenschritte zur Phosphorylierung der Map-Kinasen (146). Das wiederum aktiviert verschiedene Isoformen der ribosomalen Protein-S6-Kinase, 90kDa (Rps6ka) (146). Die Rps6ka steuern zelluläre Prozesse wie Proliferation, Überleben und Wachstum (146; 163; 164). Die zentrale Rolle des Ras/Raf/Map2k/Mapk-Signalwegs ist für verschiedene Tumoren beschrieben. Nicht zuletzt sind Mutationen in den Onkogenen *RAS* und *RAF* in humanen Tumoren nachweisbar (215; 216). Zudem ist der Mapk-Signalweg recht häufig in humanen Tumorentitäten, welche eine konstitutive Aktivität des epidermialen Wachstumsfaktor-Rezeptors (Egfr) aufweisen, aktiviert (216; 217). Der Mapk-Signalweg kann auch durch die Bindung von Insulin und dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor (Igf) an die jeweiligen Rezeptoren, welche zur Familie der Rtk gehören, aktiviert werden (218). Es ist vorstellbar, dass eine reduzierte Insulinausschüttung aufgrund der geringeren Glukosemenge im Blut zur verringerten Aktivierung der Mapk führte.

Eine Western-Blot-Analyse der Phosphorylierung von Mapk1 und 3 der 15%-KH-Futter-Tiere zeigte jedoch keine Änderung im Vergleich zu den Tieren, welche Standardfutter erhielten. Sofern die tumorhemmende Wirkung der Kohlenhydratreduktion über den Ras/Raf/Map2k/Mapk-Signalweg gesteuert wird, wäre eine Verringerung der Phosphorylierung zu erwarten gewesen. Eine Regulation durch diesen Signalweg konnte somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

Unterversorgung der Tumore mit Glukose

Auch unter Kohlenhydratrestriktion muss die Blutglukose konstant gehalten werden. Da sowohl das Gehirn als auch andere Gewebe bzw. Zellen, wie z. B. Erythrozyten, strikt auf Glukose angewiesen sind, muss genügend Glukose vom Körper bereitgestellt werden (21). Im frühen Fastenstadium, nach Absenkung des Blutglukosespiegels, erfolgt die Umwandlung des Speicherstoffs Glykogen zu Glukose (Glykogenolyse). Die hierfür notwendigen Reaktionen werden durch das Hormon Glukagon, welches bei Glukoseunterversorgung aus den α -Inselzellen des Pankreas sekretiert wird, aktiviert (21). Verbleibt der Organismus über einen längeren Zeitraum im Fastenstadium, wird dieser über die Neubildung von Glukose (Glukoneogenese) aus Proteinen (bzw. Aminosäuren) und zum geringen Teil auch aus Triacylglycerolen mit Glukose versorgt (21).

Es könnte angenommen werden, dass die Restriktion der verfügbaren Glukose durch Fütterung des 15%-KH-Futters aufgrund der geringen Glukosemenge die Glukoneogenese induziert und somit zur Glukoseunterversorgung der Tumore führt. Um diese Hypothese zu prüfen, erfolgte die Messung der Blutglukose der mit Standardfutter- und 15%-KH-Futter-gefütterten Tiere. Die Blutglukose der 15%-KH-Futter-Tiere (84 mg/dl) sank, unabhängig vom Genotyp, nicht unter den Durchschnittswert gesunder Tiere, der zwischen 62 und 175 mg/dl liegt. In der Studie von Ho *et al.* befanden sich die Blutglukosespiegel eines spontanen murinen Brustkrebsmodells sowie eines heterotopen Plattenepithelkarzinommodells bei Fütterung eines Experimentalfutters mit ähnlicher Makronährstoffzusammensetzung bei 145 bzw. 100–120 mg/dl (200). Es bleibt zu klären, ob die Verwendung des 15%-KH-Futters zur Induktion von Glukoneogenese und dadurch zur Aufrechterhaltung des Blutglukosespiegels führte, oder ob das 15%-KH-Futter noch zu viel Kohlenhydrate enthielt und dadurch keine Glukoneogenese stattfinden konnte. Literaturrecherchen zeigten, dass die Blutglukosespiegel von männlichen Mäusen (CD1-Stamm) nach 24 h Futterentzug noch im Normbereich, in diesem Fall bei 73 mg/dl, lagen. Die Menge des gespeicherten hepatischen Glukogens betrug hier nur noch 1 % der Menge der Tiere, welche keinem Futterentzug unterzogen wurden (219). Eine 48-stündige Hungerphase der weiblichen Tiere eines C57BL/6-Mausstamms führte zu Blutglukosekonzentrationen von ca. 63 mg/dl (220). In beiden Fällen lagen die Blutglukosespiegel trotz Hungerphase der Tiere noch im Normbereich. Es könnte hier angenommen werden, dass die glukoneogenetische Aktivität der Lebern der Tie-

re zur Aufrechterhaltung des Blutglukosespiegels beitrug. Unterstützt wird die Annahme dadurch, dass der CD1-Stamm nach 24-stündigem Futterentzug nur noch eine geringe Restmenge an gespeichertem Glykogen aufwies. Dieses wird während der Glykogenolyse zu Glukose abgebaut.

Durch alleinige Messung der Blutglukosekonzentration kann keine Aussage über die glukoneogenetische Aktivität der mit 15%-KH-Futter gefütterten Tiere getroffen werden. Hierzu könnte z. B. die Aktivität verschiedener glukoneogenetischer Schlüsselenzyme bestimmt werden. Zu diesen Schlüsselenzymen zählen unter anderem die Phosphoenolpyruvatkarboxykinase 2 (Pck2), die Pyruvatkarboxylase (Pc), die Fruktose-1,6-bisphosphatase (Fbp) und die katalytische Untereinheit der Glukose-6-phosphatase (G6pc).

Wang *et al.* konnten durch qPCR-Untersuchungen an humanen HCC- und angrenzenden peritumoralen Gewebeproben zeigen, dass die Genexpression der glukoneogeneserelevanten Enzyme *G6PC*, *FBP1* und *PCK2* im HCC signifikant reduziert war (221). Des Weiteren konnte eine 50-prozentige Reduktion des G6pc-Proteins im HCC im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden, was die qPCR-Ergebnisse noch unterstreicht (221). Zudem war eine Korrelation zwischen der Expression von *G6PC* und dem HCC-Tumorgrad nachweisbar. Schlecht differenzierte Tumoren wiesen eine deutlich geringere *G6PC*-Expression auf (221). Es wird hier angenommen, dass die Hemmung der Glukoneogenese zur Akkumulation von Glukose-6-Phosphat führt, welches anschließend zur Energiegewinnung und zur Herstellung wichtiger Intermediate genutzt werden kann (221). Eine Aktivierung der Glukoneogenese durch Glukoseentzug könnte den Tumorzellen die Grundlage für die Proliferation und Energiegewinnung entziehen.

Im Widerspruch zu dieser Annahme zeigten Studien an Lungenkrebszellen, dass die Aktivierung von Pck2 unter niedrigen Glukosekonzentrationen zum Überleben der Zellen führte und erst die Inaktivierung des Pck2 zur Apoptose dieser Zellen unter niedrigen Glukosekonzentrationen führt (222). Es wäre zu prüfen, ob eine mögliche Aktivierung der Glukoneogenese durch das 15%-KH-Futter durch die Reduktion der zugeführten Glukose gehemmt werden sollte.

Weitere potenzielle Mechanismen, die zur Hemmung des Tumorwachstums führen könnten

Insulin und insulin-like growth factor

Ein weiterer möglicher Mechanismus besteht in der Aktivierung von Insulinrezeptoren (Insr) und insulinähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor-Rezeptoren (IgfR). Die Expression von Insulin und Igf ist eng an den Spiegel der zirkulierenden Glukose gekoppelt. Die Bindung von Insulin und Igf an die entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt über mehrere Schritte zur Phosphorylierung des *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog* (Akt) (223). Das phosphorylierte Akt seinerseits aktiviert Mechanismen, die Glukoseaufnahme, Proliferation und Zellüberleben steuern (224). Es ist denkbar, dass die Reduktion der Kohlenhydrate im Tierfutter zur verminderten Expression und Sekretion des Insulins führte. Die dadurch ebenfalls verminderte Bindung an den Rezeptor und fehlende Phosphorylierung des Onkoproteins Akt könnte zur Wachstumsinhibition des Tumors führen. Weiterhin ist bekannt, dass auf Tumorzellen eine spezielle Isoform des Insulinrezeptors, der mitogene Insulinrezeptor-A, nachgewiesen werden kann. Gezeigt wurde dies unter anderem an Brustkrebs, Lungenkrebs, Dickdarmkrebs und am Hepatozellulären Karzinom (225; 226). Anhand eines heterotopen Plattenepithelkarzinommodells konnte eine Reduktion des Insulinspiegels bei Fütterung eines Spezialfutters mit gleicher Makronährstoffzusammensetzung beobachtet werden (200). Auch in einem Xenograft-Prostatakrebsmodell konnte eine Absenkung des Insulinspiegels bei Reduktion der Kohlenhydratmenge im Futter (auf 11 % des Gewichts) erreicht werden. Zudem zeigte sich eine komplette Reduktion der Phosphorylierung von Akt sowie ein weniger starkes Tumorwachstum (201).

Des Weiteren deuten Studien von Geng *et al.* auf einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung des Insulinrezeptor-Substrats¹¹ 1 und 2 (Irs1/2) und der Aktivierung des „*wingless-type MMTV integration site family*“/„Catenin beta 1“-Signalwegs (Wnt/Ctnnb1-Signalweg) in der Brustkrebszelllinie MCF-7 und der Gebärmutterhalsadenokarzinomzelllinie HeLa hin. Diese Aktivierung führte zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und Zellproliferation (227).

¹¹ Das Insulinrezeptor-Substrat wird durch den Insulinrezeptor phosphoryliert.

Mögliche Ampk-unabhängige Aktivierung des Tumorsuppressors P53

Lee *et al.* zeigten eine mögliche Bindung des Zitronensäurezyklusenzym Malatdehydrogenase 1 (Mdh1) mit P53. Die Stabilisierung und Aktivierung wurde unter Glukoseentzug sogar noch verstärkt. Diese Stabilisierung führte zum P53-abhängigen Zellzyklusarrest und zur Apoptose der Zellen (228). Zudem zeigten Transkriptomanalysen, dass P53 die RNA-Expression wichtiger glukoneogenetischer Enzyme, zu denen auch *G6PC* und *PCK2* gehören, in der Leberkrebszelllinie Hep G2 steuert. Dies konnte auch durch die gesteigerte Glukosekonzentration im Medium gezeigt werden (229). Nicht zuletzt erfolgt eine P53-gesteuerte Repression der Promotoraktivität verschiedener glykolyseassoziiierter Enzyme (Tabelle 2). Sofern *TP53* in seiner Wildtypform in der Krebszelle vorliegt, ist es denkbar, dass die Aktivierung von P53 zur Repression glykolyserelevanter Enzyme und gleichzeitig zur Expression glukoneogenetischer Enzyme führt. Dies könnte zur Unterversorgung der Tumorzellen mit Glukose führen. Des Weiteren wäre die Aktivierung apoptotischer Signalwege ein weiterer wichtiger Faktor in der Hemmung der Tumorzellen. Um dies zu prüfen, sollte der Einfluss des 15%-KH-Futters auf die mögliche P53-Stabilisierung mittels Western-Blot geprüft werden. Zudem wäre es ratsam, wichtige P53-Zielgene (z. B. P21) auf ihre Aktivierung zu untersuchen.

Inflammation und Makrophagen

Eine Studie von Ferreira *et al.* zeigt einen Zusammenhang zwischen der Verabreichung von hohen Kohlenhydratmengen und der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Die 8-wöchige Gabe von Futter mit einem Kohlenhydratanteil von 64 % an Swiss-Mäusen führte zur 3-fach erhöhten Sekretion des murinen Tumornekrosefaktor (Tnf) und zur erhöhten Sekretion des murinen Chemokinligand 2 (Ccl2), auch bekannt als *monocyte chemoattractant protein-1* (Mcp-1) (230). Da Tnf vorwiegend von Makrophagen sekretiert wird, welche sich auch im entzündlichen Infiltrat in der Leber befinden, könnte ein Zusammenhang zwischen der eingenommenen Kohlenhydratmenge und der Ausprägung einer entzündlichen Lebererkrankung bestehen. Darüber hinaus zeigten experimentelle Studien eine Verbindung zwischen Entzündungsreaktionen der Leber und der Hepatokarzinogenese. Neben Chemokinen und anderen Zytokinen förderte Tnf hierbei die Zellproliferation (231). Die Verabreichung des 15%-KH-Futters könnte zur Reduktion der Entzündung und dadurch zur Reduktion des Tumorwachstums führen. Darüber hinaus entstehen ca. 80 % der HCC auf der

Basis einer Leberzirrhose (129). Möglicherweise könnte die Reduktion der Kohlenhydrate hier sogar zur Prävention des HCC dienen.

4.4.2 *In-vivo*-Analyse der ASV-B-HCC-Tiere

Eine histologische Analyse mit der zuvor beschriebenen Methode war bei den Geweben von ASV-B-HCC-Tieren nicht möglich. Die Gewebe der Tiere waren zum einen sehr inhomogen und zum anderen stark geschädigt. Aufgrund dessen konnte eine valide Analyse der Tumorlast nicht durchgeführt werden. Die Untersuchung dieser Gewebe durch einen erfahrenen Pathologen zeigte das Auftreten regressiver Areale. Diese lagen in Form von Nekrosefeldern innerhalb der Tumoren vor.

Während der ersten 3 Tage des Fütterungsversuchs verstarben jedoch ca. 35–40 % der Tiere beider Genotypen. Im Verlauf des ganzen Fütterungsversuchs erhöhte sich die Zahl der verstorbenen WT-Tiere sogar nochmals. Um die Tierzahlen aus ethischen Gründen zu reduzieren, sollte nur anhand der WT-Tiere, welche zugleich die höheren Sterberaten aufwiesen, mögliche Gründe für das Versterben ermittelt werden.

Es ist vorstellbar, dass der Glukoseverbrauch der Tumoren so hoch war, dass die Tiere daraufhin an Hypoglykämie verstarben. Eine Messung des Blutzuckerspiegels ergab jedoch, dass dieser auch bei Fütterung des 15%-KH-Futters noch im Normbereich zwischen 62 und 175 mg/dl Glukose lag. Hierbei handelt es sich um die Werte einer sehr kleinen Versuchsgruppe, wodurch nur ein Anhaltspunkt über die Blutglukose gegeben werden konnte.

Die mit der Nahrung aufgenommenen Aminosäuren werden in der Leber zwischengespeichert. Dort werden diese weiter ab- oder umgebaut. Der hohe Proteingehalt des 15%-KH-Futters könnte sich toxisch auf die (schon vorgeschädigten) Hepatozyten auswirken. Ein mögliches Maß der Schädigung der Hepatozyten wurde durch die Analyse der Parameter AST und ALT bestimmt. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Fütterung des 15%-KH-Futters zu einer Steigerung der Leberschädigung, welche auch bei Fütterung des Standardfutters schon messbar war, führte. Zusätzlich sprach der De-Ritis-Quotient von $1,23 \pm 0,14$ für einen schwerwiegenden Leberschaden, welcher bei Verabreichung des Standardfutters nicht vorlag. Die hohen Sterberaten der ASV-B-HCC-Tiere könnten somit durch ein erhöhtes Maß

an Leberschädigung und daraus resultierendem möglichen Leberversagen erklärt werden.

Darüber hinaus zeigen Studien, dass eine Zufuhr von hohen Proteinmengen mit der Nahrung zur Verschlechterung der Nierenfunktion führt. Diese Untersuchungen an Wistar-Ratten, welche Futter mit einem Proteinanteil von 58 % erhielten, zeigten eine Ansäuerung des Urins, eine Vergrößerung der Nieren und der glomerulären Fläche (232). In gesunden Erwachsenen führte die Verabreichung von proteinreicher Nahrung (Proteinmenge 25 % des Gesamtkilokalorienanteils) zur leichten Erhöhung der geschätzten glomerulären Filtrationsrate. Diese kann ein Indiz für eine mögliche Nierenschädigung sein. Ob die Erhöhung pathologisch ist, konnte in der erwähnten Studie nicht geklärt werden (233). Durch die Verabreichung des 15-%-KH-Futters an die ASV-B-HCC-Tiere könnte neben der Steigerung der Leberschädigung vielleicht eine Schädigung der Nieren verursacht worden sein.

4.5 Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber 2-DG

Die Verabreichung von Chemotherapeutika kann zur Resistenzentstehung in soliden Tumoren führen (118). Auch die kontinuierliche 2-DG-Behandlung der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 führte zur Entstehung 2-DG resistenter Varianten (234). Eine Resistenzentstehung in humanen Tumoren ist zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

Es konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden, ob die fehlende antiproliferative Wirksamkeit von 2-DG, bei einer Dosis von 500 mg/kg im Tierversuch, auf einer Resistenzentstehung gegenüber 2-DG beruhte, oder ob in diesem Fall eine Unwirksamkeit vorlag. Um dies zu prüfen, sollten mögliche Mechanismen, die zur Entstehung von Chemotherapieresistenz beitragen könnten, untersucht werden. Zur Generation 2-DG -resistenter Varianten wurden 2 humane HCC-Zelllinien nach bekanntem Schema über einen längeren Zeitraum mit steigenden 2-DG-Konzentrationen behandelt (235).

4.5.1 Analyse des Wachstumsverhaltens beider resistenter Zelllinien

Bei der Bestimmung der IC_{50} von 2-DG wurde festgestellt, dass die resistenten Hep G2 (Hep G2_R) 3-fach und die resistenten SK-HEP-1 (SK-HEP-1_R) 4-fach resistenter als die jeweiligen Ausgangszelllinien waren. Hierbei wurde gleichzeitig ein bis

zu 50 % gesteigertes Wachstum der SK-HEP-1_R-Zellen im Vergleich zu den SK-HEP-1-WT-Zellen gemessen. Im Gegensatz hierzu konnten Dallas *et al.* ein reduziertes Wachstum der 5-Fluorouracil- oder Oxaliplatin-resistenten Kolorektalkarzinomzelllinie HT29 zeigen (235). Ling *et al.* beobachteten Ähnliches bei der Cisplatin-resistenten HCC-Zelllinie SK-HEP-1 (236). Eine gesteigerte Proliferation der hier erzeugten SK-HEP-1_R-Zelllinie könnte durch die 2-DG-induzierte Aktivierung von Akt erklärt werden. Eine Aktivierung von Akt konnte für Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs gezeigt werden (237-239). Darüber hinaus zeigten Zhong *et al.*, dass diese Aktivierung durch die von 2-DG gestörte Bindung zwischen Igf1 und dem Igf-Bindeprotein 3 (Igfbp3) und dadurch resultierende Bindung von Igf1 an Igf1r vermittelt werden kann (240). Dieser Sachverhalt wird jedoch kontrovers diskutiert (241). Die Phosphorylierung von Akt erhöht unter anderem die Zellproliferation. Daher könnte es möglich sein, dass eine langfristige Behandlung der SK-HEP-1-Zelllinie mit 2-DG zu einer dauerhaften Aktivierung des Igf1r-Akt-Signalwegs geführt hat. Hierfür spricht die Tatsache, dass Mutationen in der katalytischen Untereinheit der Pi3-Kinase Isoformen in vielen Tumorentitäten detektierbar sind (242; 243). Zudem wurden somatische Mutationen in der katalytischen Pi3-Kinase Untereinheit α (*PIK3CA*) in einer Studie von Lee *et al.* in ca. 36 % der HCC-Proben gefunden (244).

4.5.2 Analyse der resistenzvermittelnden Mechanismen

Nachdem die Resistenz durch die Ermittlung der IC₅₀ von 2-DG in beiden Zelllinien bestätigt wurde, sollten potenzielle resistenzvermittelnde Mechanismen untersucht werden.

Veränderte Glukoseaufnahme als Resistenzmechanismus?

Es ist möglich, dass die resistenten Zelllinien der Hemmung der Glykolyse bzw. der glykolyse relevanten Enzyme Hk2 und Pgi durch 2-DG mittels einer kompensatorischen Aufnahme von Glukose entgegensteuern. Hierbei würde mehr Glukose im Vergleich zum 2-DG in die Zelle aufgenommen und metabolisiert werden. Demnach müsste die Konzentration der Glukose im Medium durch die resistenten Zellen schneller bzw. stärker gesenkt werden. Zudem könnte eine erhöhte Expression von Glukosetransportern und glykolyse relevanten Enzymen diese Aufnahme und Spaltung begünstigen. Hierfür spricht eine Untersuchung an 2 Kolorektalkarzinom-

zelllinien, welche bei Glukoserestriktion durch Mutationen im *KRAS*-Onkogen zur erhöhten Expression von *GLUT1* befähigt sind (245).

Weiterhin könnte eine potenzielle Verringerung der Glykolyserate in den Hep G2_R und SK-HEP-1_R zur verminderten Wirksamkeit des 2-DG führen. Die Zelle würde wichtige Intermediate wie z. B. das Reduktionsmittel NADPH über alternative Signalwege generieren und die Abhängigkeit von der Glykolyse reduzieren. Dabei sollte die Glukoseaufnahme durch die resistenten Zellen stark verringert sein und die Glukosekonzentration im Medium sollte weniger stark im Vergleich zu den WT-Zellen absinken. Hierfür sprechen Daten von Maher *et al.* die eine gesteigerte Resistenz gegenüber 2-DG durch die verringerte Expression von Glut1 und verringerte Aufnahme von 2-DG in 2 Pankreaskarzinomzelllinien zeigen konnten (246). Dabei ist jedoch anzumerken, dass der abgebildete Glut1-Western-Blot keine Ladekontrolle aufweist und somit kritisch zu betrachten ist.

Entgegen den zuvor beschriebenen Hypothesen zeigte die Analyse der Glukosekonzentration im Medium beider resistenter Zelllinien jedoch keinerlei Unterschied zur Glukosekonzentration der jeweiligen WT-Zellen. Zudem konnte keine veränderte Expression des *GLUT1*-Gens in den Hep G2_R- und SK-HEP-1_R-Zellen nachgewiesen werden. Eine Veränderung der Glukoseaufnahme kann demnach ausgeschlossen werden.

Die Auswirkungen einer 2-DG-Resistenz auf die Glukoseaufnahme wurden auch in einer Arbeit von Philips *et al.* näher betrachtet. Hier wurden 2 2-DG-resistente Zelllinien mit unterschiedlichem Resistenzgrad aus einer Pankreastumorzelllinie generiert. Dabei zeigte sich, dass die 2-fach resistente Zelllinie eine geringere 2-DG-Aufnahme und die 5-fach resistenterere Zelllinie eine im Vergleich zur Vorläuferzelllinie erhöhte 2-DG-Aufnahme besaß (234). Selbst in einer isogenen Zelllinie mit unterschiedlichen Resistenzleveln konnte demnach keine einheitliche Aussage über die 2-DG-Aufnahme getroffen werden.

Die Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums als Resistenzmechanismus?

Wie bereits beschrieben, induzierte die Behandlung mit 2-DG die Expression der ER-Stress-Chaperone *CALR*, *HSPA5* und *HSP90B1* und führte darüber hinaus möglicherweise zur Induktion von Autophagie. Eine länger andauernde Behandlung mit 2-DG könnte nun zur verstärkten Expression dieser Chaperone führen. Daten von Al-Rawashdeh *et al.* belegen eine Verbindung zwischen gesteigerter Expression von

Hspa5 und der Resistenz von Hep G2-Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Doxorubicin (199). Ähnliches konnte für die Brustkrebszelllinie T47D bei Behandlung mit Doxorubicin und 5-FU gezeigt werden (247).

Eine Analyse der Genexpression aller 3 in dieser Arbeit verwendeten Gene zeigte jedoch kein einheitliches Bild in den 2 Zelllinien. Während die Expression der 3 Chaperone in den Hep G2_R um ca. 50 % verringert war, war sie in den SK-HEP-1_R gleichbleibend. Wodurch die Reduktion der Chaperonexpression in den Hep G2_R-Zellen verursacht wurde, kann nicht geklärt werden. Zudem beschreiben Daten anderer Arbeitsgruppen, dass eine Hemmung der UPR bei gleichzeitiger 2-DG-Behandlung sogar zur Verstärkung der 2-DG-vermittelten Apoptose führte (168; 237). Die Resistenz gegenüber 2-DG könnte jedoch über einen Mechanismus, welcher der UPR vorgeschaltet ist, vermittelt werden. Wie bereits erwähnt, induziert 2-DG ER-Stress über die Störung der N-Glykosylierung von Glykoproteinen (179). Dadurch kommt es zur Anhäufung falsch gefalteter Proteine im ER und dadurch zum Auslösen einer Stressantwort. Studien von Kurtoglu *et al.* weisen auf eine verringerte Wirkung von 2-DG auf die Bildung von *Lipid-Linked-Oligosacchariden* (LLO) sowie eine gesteigerte basale LLO-Produktion, welche die Basis für die N-Glykosylierung darstellt, hin (179; 234). Die dadurch verringerte Missfaltung von Glykoproteinen könnte zum Fehlen der UPR sowie zur Resistenzentstehung gegenüber 2-DG beitragen.

Führt die Langzeitbehandlung der Zellen zur Hif-1-vermittelten Resistenz gegenüber 2-DG?

Obwohl die kurzzeitige Behandlung der SK-HEP-1- und Hep G2-Zellen nicht zur Hif-1-vermittelten Resistenz gegenüber 2-DG führte, kann dadurch keine Resistenzentstehung bei einer längerfristigen Behandlung mit 2-DG ausgeschlossen werden. Die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika geschieht beispielsweise durch Regulation von *MDR1* und Apoptose (123; 157). Weiterhin zeigten Maher *et al.* eine Hif-1-vermittelte Resistenz gegenüber 2-DG unter hypoxischen Bedingungen (31). Da Hif-1 α auch sauerstoffunabhängig durch verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine reguliert werden kann, ist es vorstellbar, dass eine Stabilisierung von Hif-1 α unter normoxischen Bedingungen auch durch eine Langzeitbehandlung der Zellen mit Chemotherapie erreicht werden kann.

Erste Western-Blot-Analysen beider resistenter Zelllinien zeigten zumindest in den Hep G2_R eine gesteigerte Expression der sauerstoffabhängig regulierten Untereinheit Hif-1 α . Es war dagegen keine gesteigerte Expression in den SK-HEP-1_R zu verzeichnen. Da jedoch die Expression des Hif-1 α schon in den SK-HEP-1-WT-Zellen sehr ausgeprägt ist, ist es denkbar, dass eine weitere Steigerung der Proteinexpression nicht möglich war oder im Rahmen eines Western-Blots nicht nachweisbar war. Da neben Western-Blot-Analysen die Induktion von Hif-1 auch durch Untersuchungen der Genexpression bekannter Hif-1-Zielgene getestet werden kann, wurde das durch Hif-1 sehr stark aktivierte Zielgen karbonische Anhydrase IX (CA9) mittels qPCR analysiert. Wider Erwarten zeigte sich hier in beiden resistenten Zelllinien eine Reduktion der CA9-Genexpression. Es stellte sich nun die Frage, ob das im Western-Blot verstärkt nachgewiesene Hif-1 α möglicherweise aus einer Akkumulation von nicht funktionsfähigem Protein bestand. Dies würde auch die verringerte Expression des CA9-Gens erklären.

Hif-1-Aktivitätsmessungen mit einem Luciferase-Reporter-Assay zeigten jedoch eine 2-fach und zum Teil signifikant erhöhte Aktivität in beiden Zelllinien. Es ist dadurch anzunehmen, dass aufgrund der Diskrepanz der gemessenen Hif-1-Aktivität und der CA9-Genexpression beide Ergebnisse nicht im Zusammenhang stehen und die Genexpression von CA9 gesondert betrachtet werden sollte. Weiterhin ist es fraglich, ob die gesteigerte Proteinexpression des Hif-1 α sowie die gesteigerte funktionelle Aktivität des Hif-1 tatsächlich zur Resistenzentstehung beitragen. Aufgrund der unter 3.1.3 beschriebenen fehlenden Wirkung von 2-DG auf Hif-1 ist dies eher unwahrscheinlich. Um dies abschließend zu prüfen, müsste der Effekt einer funktionellen Hif-1 α -Inaktivierung in den resistenten Hep G2-Zellen bei Behandlung mit der IC₅₀ von 2-DG geprüft werden.

Die Rolle der karbonischen Anhydrase IX in der Resistenzvermittlung

Die karbonische Anhydrase IX (Ca9) ist an der Regulation des extrazellulären pH-Werts beteiligt. Durch die Expression von Ca9 und dadurch gesteigerte Umwandlung von Kohlenstoffdioxid und Wasser zu Wasserstoffionen und Hydrogenkarbonat säuert die Tumorzelle zusätzlich zum Export von Laktat aus der Zelle den extrazellulären Raum an. Die gesteigerte Expression von Ca9 und Ansäuerung des Tumormikromillieus korreliert mit der schlechten Prognose diverser Tumorentitäten.

Die Expression von CA9 kann beispielsweise in Tumorgewebe des Glioblastoms, in Brustkrebs und Blasenkrebs nachgewiesen werden (248-250).

Anhand der qPCR-Daten konnte jedoch sowohl bei den in dieser Arbeit analysierten resistenten Hep G2-Zellen als auch bei den resistenten SK-HEP-1-Zellen eine Reduktion der Genexpression des CA9 gemessen werden. Dies steht im Gegensatz zu der zuvor genannten Resistenzentstehung durch Ansäuerung des extrazellulären Raums. Bei vielen Chemotherapeutika handelt es sich um schwache Elektrolyte, die durch Diffusion in die Zellen eintreten. Da die Zellmembran weniger durchlässig für ionisierte Substanzen ist, kann eine Ansäuerung des extrazellulären pH-Werts (pH_e) und daraus resultierender basischer intrazellulärer pH-Wert (pH_i) wahlweise zum verbesserten oder verschlechterten Eintritt in die Zelle führen (251). Ojugo *et al.* konnten eine Abhängigkeit der Aufnahme von 5-FU in Lettre-Zellen (Aszites-Karzinom) und HT29 (humane kolorektale Adenokarzinomzellen) vom externen pH-Wert zeigen (252). Es wird davon ausgegangen, dass ein saurer pH_i (und alkaliner pH_e) zur verbesserten Aufnahme schwacher Basen und schlechteren Aufnahme schwacher Säuren führt (251; 253; 254). Eine Studie mit der HT29-Zelllinie wies einen klaren Zusammenhang zwischen der Aufnahme der schwachen Base Doxorubicin und der Ansäuerung des pH_i nach Hemmung von CA9 auf. Zudem verringert sich hier die Aufnahme und Zytotoxizität der schwachen Säure Melphalan (251). Die Inhibition von CA9 führte demnach zur verbesserten Aufnahme schwacher Basen und zur verringerten Aufnahme schwacher Säuren in die Zelle. Über 2-DG ist nicht bekannt, ob es sich hierbei um eine schwache Säure oder um eine schwache Base handelt. Eine Veröffentlichung von Beenackers beschreibt jedoch das Monosaccharid Glukose als schwache Säure (255). Nimmt man nun an, dass 2-DG eine ähnlich schwache Säure wie sein Analog D-Glukose ist, könnte die reduzierte Expression des CA9 zur verminderten Aufnahme von 2-DG führen. Die Erhöhung des pH_e und Verringerung des pH_i durch reduzierte Expression des CA9 wäre hier der ausschlaggebende Faktor.

Hierzu müsste zunächst geprüft werden, ob sich die gehemmte Expression des CA9 Gens auch im Western-Blot widerspiegelt, und darüber hinaus, ob die 2-DG-Aufnahme in die Zelle tatsächlich gehemmt ist. Sollte dies der Fall sein, wäre eines der folgenden Experimente denkbar. Nimmt man nun an, dass die pH-Wert-Situation zur verringerten Aufnahme schwacher Säuren führt, könnte gleichzeitig die Aufnahme schwacher Basen begünstigt werden. Um dies zu prüfen, müssten sowohl Aus-

gangszellen als auch resistente Zellen mit derselben Konzentration verschiedener schwacher Basen behandelt werden. Diese sollten von der resistenten Zelllinie besser aufgenommen werden und dadurch verstärkt wirken. Andererseits könnte eine Induktion der CA9 in den resistenten Zellen wieder zur verstärkten Wirkung von 2-DG und Reversion der Resistenz führen. Ausgehend von einer Erhöhung des pH_e -Werts durch Inhibition von CA9 und daraus resultierender Resistenz gegenüber 2-DG wäre es auch vorstellbar, dass eine experimentelle Reduktion des pH_e wieder zur gesteigerten Wirksamkeit des 2-DG führt.

Weitere potenzielle resistenzvermittelnde Mechanismen

Akt-Signalweg

Wie zuvor erwähnt (4.5.1), führt die Behandlung verschiedener Zelllinien mit 2-DG zur Phosphorylierung des Onkoproteins Akt (237-239). Akt steuert wichtige zelluläre Signalwege, die unter anderem Proliferation, Überleben, Metabolismus und Differenzierung kontrollieren (224). Die Aktivierung des Pi3k/Akt-Signalwegs wurde in Tumoren und Tumorzellen bei Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika gezeigt (256-258). Eine Aktivierung des Akt-Signalwegs konnte auch in Hep G2-Zellen, die eine Resistenz gegenüber Sorafenib aufwiesen, gemessen werden (259). Eine permanente Aktivierung des Pi3k/Akt-Signalwegs ist somit denkbar.

KRAS-Signalweg

Weiterhin könnte die Langzeitverabreichung von 2-DG, trotz der Tatsache, dass es sich hierbei nicht um ein klassisches Chemotherapeutikum handelt, zu weiteren somatischen Mutationen führen. Zu den häufigen Mutationen zählen Veränderungen im „*rat sarcoma viral oncogene homolog*“-Gen (*RAS*). „Kirsten *RAS*“-Mutationen (*KRAS*) finden sich häufig in Pankreas-, Lungen- und Kolorektalkarzinomen (260-262). Eine Mutation im *KRAS* führte in Eierstockkarzinomen zur Resistenz gegenüber platinbasierten Chemotherapeutika und in verschiedenen Kolorektal- und Lungenkrebszelllinien zur Resistenz gegenüber Selumetinib (263; 264). Yun *et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen der Restriktion von Glukose und der Entwicklung von Mutationen im *KRAS*-Onkogen in den Kolorektalkarzinomzelllinien HCT116 und DLD1 zeigen (245). Da die Behandlung der HCC-Zellen mit 2-DG durch Inhibition der Glykolyse möglicherweise zu ähnlichen Effekten wie die Glukoserestriktion führt, ist eine Mutation des *KRAS* bei langfristiger 2-DG Verabreichung vorstellbar. Darüber hinaus

konnte eine erhöhte *GLUT1*-Expression und verbesserte Glukoseaufnahme in den Zellen mit *KRAS*-Mutation gemessen werden (245). Beides konnte für die in der vorliegenden Arbeit generierten resistenten Zellen jedoch nicht betätigt werden. Zum einen änderte sich die Aufnahme der Glukose in keiner der beiden Zelllinien und zum anderen konnte keine gesteigerte Expression von *GLUT1* nachgewiesen werden. Neben der Regulation der Glykolyse steuert das Ras-Protein beispielsweise Zellzyklusprogression, Apoptose, Invasion und Metastasierung und könnte dadurch zur Resistenzentstehung gegenüber 2-DG beitragen (265).

Tumorprotein P53

Unter 4.2.3.1.2 wurden die Auswirkungen einer verringerten Kohlenhydratzufuhr auf P53 *in vivo* diskutiert. Es ist möglich, dass die durch 2-DG verursachte Glukoserestriktion *in vitro* ähnliche Mechanismen anspricht. Hierzu müsste zunächst der *TP53*-Status der Ausgangszellen sowie der resistenten Zellen getestet werden. Ausgehend von Daten aus der Literatur sollten sowohl Hep G2 als auch SK-HEP-1 ein Wildtyp-*TP53*-Gen tragen (266; 267). Das Wildtyp-P53 sollte bei 2-DG-induzierter Glukoserestriktion stabilisiert werden und so zur Aktivierung apoptotischer Singalwege führen (228). Es ist möglich, dass Mutationen im *TP53*, egal ob *loss-of-function* oder *gain-of-function*, zur Inhibition der Apoptose und somit zur Resistenz beitragen.

4.6 Klinische Relevanz und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die zentrale Rolle der Glykolyse für das Hepatozelluläre Karzinom gezeigt werden. Hierbei war vor allem der positive Effekt einer Kohlenhydratreduktion auf das Tumorwachstum im HCC-Mausmodell von übergeordneter Bedeutung. Es wurden mögliche der Tumorreduktion zugrundeliegende Mechanismen diskutiert. Weiterhin wurde eine Unwirksamkeit des Glukoseanalogons 2-Deoxy-D-Glukose als alleiniges therapeutisches Agens zur Behandlung des HCC festgestellt. Da dieser fehlenden Wirkung von 2-DG auf das Tumorwachstum eine Resistenz der Karzinomzellen zugrunde liegen könnte, wurden darauf folgend mögliche resistenzvermittelnde Mechanismen in zwei 2-DG-resistenten HCC-Zelllinien untersucht. Hierbei zeigte sich eine mögliche Assoziation der Balance zwischen dem intra- und extrazellulärem pH-Wert und der Aufnahme

von 2-DG in die resistenten Zellen. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse sollen die Relevanz der Kohlenhydratrestriktion auf die Tumorprogression sowie die möglichen Behandlungsformen bei Entstehung einer Therapieresistenz gegenüber 2-DG erörtert werden.

4.6.1 Kohlenhydratreduktion – Tumorprävention oder Tumorthherapie?

Zwei Studien an Xenograft-Kolorektal-, oder Prostatakarzinommodellen und am heterotopen Plattenepithelkarzinommodell beschreiben eine Tumorreduktion bei Verabreichung von kohlenhydratreduzierter Kost (200; 201). Dies ist in Übereinstimmung mit der in dieser Arbeit erstmals gezeigten Reduktion der Tumorlast im HCC-Mausmodell. Die Aktualität dieser Untersuchungen spiegelt sich auch in der Vielzahl verschiedener Ernährungskonzepte wieder. Zur Untersuchung der Auswirkung verschiedener Makronährstoffzusammensetzungen auf diverse Erkrankungen werden Diäten mit geringem Kohlenhydrat- und hohem Fett- oder Proteinanteil sowie Diäten, welche eine Kalorienrestriktion ungeachtet der Makronährstoffzusammensetzung bedingen, verwendet. Auffällig ist hierbei, dass die Definition einer Diät mit wenigen Kohlenhydraten sehr unterschiedlich gehandhabt wird. Eine Klassifizierung verschiedener Diäten nach ihrem Kohlenhydratgehalt wurde beispielsweise von Michael Liebman veröffentlicht (268). Hiernach handelt es sich bei der in dieser Arbeit verwendeten Diät um eine *very-low carbohydrate diet*, die nur aus einem 5-15-prozentigen Kohlenhydratanteil an der Gesamtkalorienmenge besteht. Viele Diäten, die auf Kohlenhydratrestriktion abzielen, beziehen zumeist immer noch ca. 40 % der Energie aus Kohlenhydraten. Dies erschwert den Vergleich verschiedener Ergebnisse. Nichtsdestotrotz konnte die Reduktion der zugeführten Kohlenhydrate mit einer Reihe von positiven Effekten in Zusammenhang gebracht werden (269). Es konnte beispielsweise eine Reduktion des Blutdrucks, des Körpergewichts und der kardiovaskulären Risikofaktoren, welche auch Bestandteil des Metabolischen Syndroms sind, gezeigt werden (270-272). Das Metabolische Syndrom stellt eines der Risikofaktoren der Entwicklung eines HCC dar. Entzündliche Erkrankungen, zu denen die Leberzirrhose zählt, sind bekannte tumorigene Faktoren (273). Auch hier führte die Verabreichung einer *very-low carbohydrate diet* zur Reduktion von verschiedenen Entzündungsmarkern (274). Darüber hinaus erfolgte eine Verringerung der hepatischen Triglyzeride, die die Grundlage der nichtalkoholischen Fettleberer-

krankung darstellen, bei Reduktion der Kohlenhydratzufuhr (275). Die Verabreichung einer kohlenhydratreduzierten Diät scheint demnach das Potenzial zur Prävention von Tumorerkrankungen, die auf der Basis von entzündlichen Erkrankungen entstehen, zu besitzen. Auch im Verlauf der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Verabreichung des 15%-KH-Futters während des adenomatösen Stadiums zur Reduktion der Tumorprogression führte. Weiterhin war jedoch ersichtlich, dass eine Ernährungsumstellung im späteren Stadium (HCC) aufgrund der hohen Sterberaten nicht zu empfehlen ist. Obwohl die Auswirkungen einer solchen Diät auf die Tumorreduktion bzw. -wachstumshemmung in der humanen Situation im HCC und anderen Tumorentitäten bis jetzt noch nicht untersucht wurden, deutet eine präliminäre Studie von Fine *et al.* mit 10 Patienten zumindest teilweise auf eine Inhibition des Fortschreitens der Tumorerkrankung hin (276). Eine Behandlung von Patienten mit Lebererkrankungen bis hin zum adenomatösen Stadium mit engmaschigen Kontrollen des Gesundheitszustands ist somit vorstellbar und möglicherweise eine Alternative oder Ergänzung zu den gängigen Behandlungsverfahren.

Neben der in dieser Arbeit gemessenen Verringerung des Tumorwachstums zeigten die Mäuse, welche die kohlenhydratreduzierte Kost erhielten, eine merklich gesteigerte Fitness. Die Analyse der Auswirkung einer freiwilligen körperlichen Ertüchtigung auf eine mögliche weitere Reduktion der Tumorlast ist eine sinnvolle Ergänzung zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen. Zudem verbessert die körperliche Ertüchtigung krebssbedingte Nebenwirkungen wie Depression, Schlafstörungen und das Fatigue-Syndrom (208). Darüber hinaus gibt es für Brustkrebspatientinnen beispielsweise Leitfäden zur Minimierung der Therapienebenwirkungen durch die Anwendung bestimmter Leibesübungen (277). Auch Betof *et al.* konnten durch Analyse verschiedener Studien einen positiven Effekt der körperlichen Fitness auf die Überlebensrate unterschiedlicher Tumorentitäten aufzeigen (278). Darüber hinaus zeigte sich eine Regression von Xenograft-Lungenkarzinomen im Mausmodell nach freiwilligem Laufen im Laufrad (279). Ein potenzieller zusätzlicher Effekt der körperlichen Aktivität der Tiere auf das Tumorwachstum im HCC-Mausmodell ist somit nicht unwahrscheinlich.

Hif-1 scheint im Zusammenhang mit der Kohlenhydratrestriktion zumindest im HCC nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen, darunter auch eine Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe durch Rohwer *et al.*, sprechen jedoch für eine zentrale Rolle von Hif-1 in Tumorprogression und Metasta-

sierung (151; 280; 281). Darüber hinaus resultierte aus einer Hif-1-Defizienz bei gleichzeitiger diätischer Beschränkung die Verlängerung der Lebensspanne von *Caenorhabditis elegans* (282). Nicht zuletzt spricht die Vielzahl der glykolyse-relevanten Hif-1-Zielgene für eine zentrale Rolle von Hif-1 im Metabolismus (Tabelle 2). Die Analyse des Zusammenhangs zwischen Glukosereduktion und möglichem verminderten Tumorwachstum in anderen Tumorentitäten stellt eine wichtige Ergänzung zu den in dieser Arbeit vorgestellten Beobachtungen dar.

4.6.2 Die Identifikation möglicher resistenzvermittelnder Mechanismen als Ziel für die Therapie resistenter Tumorzellen?

Die Chemotherapieresistenz, egal ob intrinsisch oder erworben, stellt eines der zentralen Probleme bei der Behandlung solider Tumoren dar (118). Die Aufklärung resistenzvermittelnder Mechanismen ist aufgrund dessen von erheblicher Bedeutung. Bisher ist nur wenig über eine mögliche Resistenzentstehung gegenüber dem Glukoseanalogon 2-Deoxy-D-Glukose bekannt. Im Verlauf dieser Arbeit konnten erfolgreich zwei 2-DG-resistente HCC-Zelllinien etabliert werden. Die Vermittlung der Resistenz durch Hif-1 und Modulation der Glykolyse konnte weitestgehend ausgeschlossen werden. Einen vielversprechenden Mechanismus scheint die Änderung des extrazellulären pH-Werts (pH_e) durch Inhibition der *CA9*-Genexpression darzustellen. Viele chemotherapeutische Agenzien sind ionisierbare Substanzen, deren Aufnahme stark vom pH-Gradienten zwischen dem intrazellulären und extrazellulären Raum abhängt (Phänomen des *ion trapping*) (253; 254; 283). Die beträchtliche Bedeutung der pH_e -Änderung bzw. des pH-Gradienten für die Wirksamkeit schwach basischer oder schwach saurer Chemotherapeutika wird auch durch eine *In-vivo*-Studie von Gerweck *et al.* deutlich. In dieser Studie führte die von außen erzeugte Ansäuerung des extrazellulären Tumormilieus wie erwartet zur geringeren Wirksamkeit der schwachen Base Doxorubicin und zur gesteigerten Wirksamkeit der schwachen Säure Chlorambucil (284). Es bleibt festzuhalten, dass bei der Entwicklung möglicher therapeutischer Strategien zur Überwindung der Chemotherapieresistenz das Phänomen des sogenannten *ion trapping* nicht außer Acht gelassen werden sollte.

Eine Modulation des extrazellulären pH-Werts wäre im vorliegenden Fall der 2-DG-Resistenz jedoch nicht anzuraten. Hierzu müsste der pH_e verringert werden, was zu

einer Ansäuerung des Tumormikromilieus führt. Es wurde jedoch gezeigt, dass ein saurer extrazellulärer pH-Wert mit dem Metastasierungspotenzial von Tumorzellen assoziiert ist (285; 286). Eine Möglichkeit bestünde in der Behandlung der 2-DG-resistenten Tumoren mit Chemotherapeutika, die nicht ionisierbar sind oder schwache Basen darstellen.

5 Zusammenfassung

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt die fünfthäufigste Krebsart und zweithäufigste Krebstodesursache weltweit dar. Die steigende Inzidenz in Europa und den Vereinigten Staaten sowie die späte Diagnosestellung und das Fehlen kurativer Therapieformen stellen zentrale Probleme dar. Daher ist die Etablierung innovativer, zielgerichteter Therapieansätze von hoher Bedeutung. Alterationen im Metabolismus, wie z. B. erhöhte Glukoseaufnahme und glykolytische Aktivität (Warburg-Effekt), sind zentrale Charakteristika solider Tumoren. Vor diesem Hintergrund sollte im ersten Abschnitt dieser Arbeit die Wirksamkeit des bekannten Glykolyseinhibitors 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) als therapeutisches Agens zur Behandlung des Hepatozellulären Karzinoms analysiert werden. Dafür wurden zwei humane HCC-Zelllinien *in vitro* mit 2-DG behandelt und weitergehend untersucht. Hierbei zeigte sich eine antiproliferative Wirkung des 2-DG, welche *in vivo* im ASV-B-HCC-Mausmodell jedoch nicht bestätigt werden konnte. Dies führte zu der Überlegung, dass hohe Glukosekonzentrationen im Medium und im Tierfutter die Wirksamkeit von 2-DG möglicherweise verringern könnten. Eine Reduktion der Glukose führte zur Verstärkung der antiproliferativen Wirkung des 2-DG *in vitro*. In immunhistologischen Untersuchungen zeigte sich jedoch kein synergistischer Effekt der Verabreichung von 2-DG mit gleichzeitiger Kohlenhydratreduktion *in vivo*. Auch in diesem Kontext scheint 2-DG keine Wirkung zu besitzen. Bemerkenswert war die Verringerung der Tumorlast bei alleiniger Verabreichung des kohlenhydratreduzierten Futters.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten mögliche resistenzvermittelnde Mechanismen untersucht werden. Hierfür wurde in zwei HCC-Zelllinien eine Resistenz gegenüber 2-DG herbeigeführt. Untersuchungen der potenziellen resistenzvermittelnden Mechanismen ergaben eine mögliche Beteiligung des Zink-Metalloenzyms karbonische Anhydrase IX, welches an der Regulation des extrazellulären pH-Werts maßgeblich beteiligt ist.

Zusammengefasst konnte eine Verringerung der Tumorlast durch alleinige Reduktion der zugeführten Kohlenhydrate erreicht werden. Zudem wurde ein möglicher molekularer Mechanismus der Resistenzentstehung gegenüber 2-DG ermittelt. Vor dem Hintergrund der schlechten Therapierbarkeit des HCC könnten beide Ansätze eine sinnvolle Ergänzung der aktuellen Behandlungsverfahren des HCC darstellen.

6 Summary

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common cancer and second leading cause of cancer-related deaths worldwide. Rising incidence in Europe and the United States, late diagnosis and the lack of curative therapies are central problems. Therefore, the establishment of innovative, targeted therapies is of great importance. Metabolic alterations such as increased glucose uptake and glycolytic activity (Warburg effect) are central characteristics of solid tumors. The aim of the first part of this study was to evaluate the efficacy of the well known glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose (2-DG) as a therapeutic agent for the treatment of hepatocellular carcinoma. Therefore, two human HCC cell lines were treated with 2-DG *in vitro* and investigated further. Results revealed an anti-proliferative effect of 2-DG which was not confirmed *in vivo* in ASV-B-HCC-mice. This led to the idea that high concentrations of glucose in the medium and in animal food can potentially decrease the efficacy of 2-DG. A reduction of glucose resulted in an amplification of the anti-proliferative effect of 2-DG *in vitro*. Immunohistochemical studies, however, showed no synergistic effect of the administration of 2-DG with simultaneous reduction of carbohydrates *in vivo*. Again 2-DG seems to have no effect. Interestingly, feeding of the low-carbohydrate food alone caused a remarkable reduction in tumour burden.

In the second part of this work possible resistance-mediating mechanisms should be investigated. The resistance towards 2-DG was induced in two HCC cell lines. Studies on potential resistance mechanisms revealed a possible role of the zinc metalloenzyme carbonic anhydrase IX, which is significantly involved in the regulation of extracellular pH.

Taken together, a reduction in the tumour burden can be achieved by the sole reduction of the supplied carbohydrates. In addition, a possible molecular mechanism that governs resistance towards 2-DG was determined. In the context of the poor treatability of HCC both approaches could be a useful addition to the current method of treatment of HCC.

Literaturverzeichnis

- 1 Gaber E, Wildner M. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 52, Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede*. Berlin: Robert Koch-Institut, Statistisches Bundesamt; 2011.
- 2 Bubendorf L, Feichter GE, Obermann EC. *Pathologie*. Dritte, neubearbeitete Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011.
- 3 Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell 2011; 144 (5): 646-74.
- 4 Kew MC. *Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma*. J Gastrointestin Liver Dis 2013; 22 (3): 305-10.
- 5 Mastrangelo G, Fedeli U, Fadda E, Valentini F, Agnesi R, Magarotto G, Marchi T, Buda A, Pinzani M, Martines D. *Increased risk of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis in vinyl chloride workers: synergistic effect of occupational exposure with alcohol intake*. Environ Health Perspect 2004; 112 (11): 1188-92.
- 6 Giannandrea F, Paoli D, Figa-Talamanca I, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. *Effect of endogenous and exogenous hormones on testicular cancer: the epidemiological evidence*. Int J Dev Biol 2013; 57 (2-4): 255-63.
- 7 Bastian BC. *The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia*. Annu Rev Pathol 2014; 9: 239-71.
- 8 Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. *Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis*. Cell Host Microbe 2014; 15 (3): 266-82.
- 9 zur Hausen H. *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer 2002; 2 (5): 342-50.
- 10 Vogelstein B, Kinzler KW. *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med 2004; 10 (8): 789-99.
- 11 Stepanenko AA, Vassetzky YS, Kavsan VM. *Antagonistic functional duality of cancer genes*. Gene 2013; 529 (2): 199-207.

- 12 Vaupel P. *Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology*. Semin Radiat Oncol 2004; 14 (3): 198-206.
- 13 Morin PJ. *Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture*. Drug Resist Updat 2003; 6 (4): 169-72.
- 14 Vaupel P. *Metabolic microenvironment of tumor cells: a key factor in malignant progression*. Exp Oncol 2010; 32 (3): 125-7.
- 15 Mueller MM, Fusenig NE. *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer*. Nat Rev Cancer 2004; 4 (11): 839-49.
- 16 Daye D, Wellen KE. *Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis*. Semin Cell Dev Biol 2012; 23 (4): 362-9.
- 17 Chen JQ, Russo J. *Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer 2012; 1826 (2): 370-84.
- 18 Santos CR, Schulze A. *Lipid metabolism in cancer*. FEBS Journal 2012; 279 (15): 2610-23.
- 19 Fuchs BC, Bode BP. *Stressing out over survival: glutamine as an apoptotic modulator*. J Surg Res 2006; 131 (1): 26-40.
- 20 Fischer CP, Bode BP, Souba WW. *Adaptive alterations in cellular metabolism with malignant transformation*. Ann Surg 1998; 227 (5): 627-34.
- 21 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5. edition ed. New York: W H Freeman; 2002.
- 22 DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. *Brick by brick: metabolism and tumor cell growth*. Curr Opin Genet Dev 2008; 18 (1): 54-61.
- 23 Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. *De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy*. Br J Cancer 2009; 100 (9): 1369-72.

- 24 Warburg O. *Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle*. Naturwissenschaften 1924; 12 (50): 1131-7.
- 25 WARBURG O, Wind F, Negelein E. *The metabolism of tumors in the body*. J Gen Physiol 1927; 8 (6): 519-30.
- 26 WARBURG O. *On respiratory impairment in cancer cells*. Science 1956; 124 (3215): 269-70.
- 27 Semenza GL. *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer 2003; 3 (10): 721-32.
- 28 Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. *Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc*. J Biol Chem 2000; 275 (29): 21797-800.
- 29 Barthel A, Okino ST, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock JP, Jr., Roth RA. *Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1*. J Biol Chem 1999; 274 (29): 20281-6.
- 30 Schwartzberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. *The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression*. Cancer Res 2004; 64 (7): 2627-33.
- 31 Maher JC, Wangpaichitr M, Savaraj N, Kurtoglu M, Lampidis TJ. *Hypoxia-inducible factor-1 confers resistance to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose*. Mol Cancer Ther 2007; 6 (2): 732-41.
- 32 Riddle SR, Ahmad A, Ahmad S, Deeb SS, Malkki M, Schneider BK, Allen CB, White CW. *Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 278 (2): L407-L416.
- 33 Kim JW, Gao P, Liu YC, Semenza GL, Dang CV. *Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1*. Mol Cell Biol 2007; 27 (21): 7381-93.

- 34 Mathupala SP, Heese C, Pedersen PL. *Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53.* J Biol Chem 1997; 272 (36): 22776-80.
- 35 Lu S, Gu X, Hoestje S, Epner DE. *Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter.* Biochim Biophys Acta 2002; 1574 (2): 152-6.
- 36 Zhong H, Simons JW. *Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia.* Biochem Biophys Res Commun 1999; 259 (3): 523-6.
- 37 Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. *Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.* J Biol Chem 1994; 269 (38): 23757-63.
- 38 Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, Martinez D, Carnero A, Beach D. *Glycolytic enzymes can modulate cellular life span.* Cancer Res 2005; 65 (1): 177-85.
- 39 Shimada N, Shinagawa T, Ishii S. *Modulation of M2-type pyruvate kinase activity by the cytoplasmic PML tumor suppressor protein.* Genes Cells 2008; 13 (3): 245-54.
- 40 Garcia-Cao I, Song MS, Hobbs RM, Laurent G, Giorgi C, de B, V, Anastasiou D, Ito K, Sasaki AT, Rameh L, Carracedo A, Vander Heiden MG, Cantley LC, Pinton P, Haigis MC, Pandolfi PP. *Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state.* Cell 2012; 149 (1): 49-62.
- 41 Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Ia-Favera R, Dang CV. *c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth.* Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94 (13): 6658-63.
- 42 Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. *HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption.* Cell Metab 2006; 3 (3): 187-97.

- 43 Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. Cell Metab 2006; 3 (3): 177-85.
- 44 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science 2009; 324 (5930): 1029-33.
- 45 Fujiwara S, Kawano Y, Yuki H, Okuno Y, Nosaka K, Mitsuya H, Hata H. *PDK1 inhibition is a novel therapeutic target in multiple myeloma*. Br J Cancer 2013; 108 (1): 170-8.
- 46 Puzone R, Savarino G, Salvi S, Dal Bello MG, Barletta G, Genova C, Rijavec E, Sini C, Esposito AI, Ratto GB, Truini M, Grossi F, Pfeffer U. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene over expression correlates with poor prognosis in non small cell lung cancer patients*. Mol Cancer 2013; 12 (1): 97.
- 47 Zhang X, He C, He C, Chen B, Liu Y, Kong M, Wang C, Lin L, Dong Y, Sheng H. *Nuclear PKM2 expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma*. Pathol Res Pract 2013; 209 (8): 510-5.
- 48 Daskalow K, Pfander D, Weichert W, Rohwer N, Thelen A, Neuhaus P, Jonas S, Wiedenmann B, Benckert C, Cramer T. *Distinct temporospatial expression patterns of glycolysis-related proteins in human hepatocellular carcinoma*. Histochem Cell Biol 2009; 132 (1): 21-31.
- 49 Krohn KA, Mankoff DA, Muzi M, Link JM, Spence AM. *True tracers: comparing FDG with glucose and FLT with thymidine*. Nuclear Medicine and Biology 2005; 32 (7): 663-71.
- 50 Mankoff DA, Eary JF, Link JM, Muzi M, Rajendran JG, Spence AM, Krohn KA. *Tumor-Specific Positron Emission Tomography Imaging in Patients: [18F] Fluorodeoxyglucose and Beyond*. Clinical Cancer Research 2007; 13 (12): 3460-9.

- 51 Higashi T, Saga T, Nakamoto Y, Ishimori T, Mamede MH, Wada M, Doi R, Hosotani R, Imamura M, Konishi J. *Relationship Between Retention Index in Dual-Phase 18F-FDG PET, and Hexokinase-II and Glucose Transporter-1 Expression in Pancreatic Cancer*. Journal of Nuclear Medicine 2002; 43 (2): 173-80.
- 52 Baker JC, Yan X, Peng T, Kasten S, Roche TE. *Marked differences between two isoforms of human pyruvate dehydrogenase kinase*. J Biol Chem 2000; 275 (21): 15773-81.
- 53 Chen W, Gueron M. *The inhibition of bovine heart hexokinase by 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate: characterization by 31P NMR and metabolic implications*. Biochimie 1992; 74 (9-10): 867-73.
- 54 Clem B, Telang S, Clem A, Yalcin A, Meier J, Simmons A, Rasku MA, Arumugam S, Dean WL, Eaton J, Lane A, Trent JO, Chesney J. *Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth*. Mol Cancer Ther 2008; 7 (1): 110-20.
- 55 Floridi A, Paggi MG, D'Atri S, De MC, Marcante ML, Silvestrini B, Caputo A. *Effect of lonidamine on the energy metabolism of Ehrlich ascites tumor cells*. Cancer Res 1981; 41 (11 Pt 1): 4661-6.
- 56 Floridi A, Paggi MG, Marcante ML, Silvestrini B, Caputo A, De MC. *Lonidamine, a selective inhibitor of aerobic glycolysis of murine tumor cells*. J Natl Cancer Inst 1981; 66 (3): 497-9.
- 57 Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen JA, Tchernyshyov I, Cole RN, Syed LH, Rao PP, Ota S, Vali M. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death*. Anticancer Res 2009; 29 (12): 4909-18.
- 58 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.

- 59 Luo F, Liu X, Yan N, Li S, Cao G, Cheng Q, Xia Q, Wang H. *Hypoxia-inducible transcription factor-1alpha promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis pathway*. BMC Cancer 2006; 6: 26.
- 60 Nakano A, Miki H, Nakamura S, Harada T, Oda A, Amou H, Fujii S, Kagawa K, Takeuchi K, Ozaki S, Matsumoto T, Abe M. *Up-regulation of hexokinase II in myeloma cells: targeting myeloma cells with 3-bromopyruvate*. J Bioenerg Biomembr 2012; 44 (1): 31-8.
- 61 Pereira da Silva AP, El-Bacha T, Kyaw N, dos Santos RS, da-Silva WS, Almeida FC, Da Poian AT, Galina A. *Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate*. Biochem J 2009; 417 (3): 717-26.
- 62 Schmidt MM, Dringen R. *Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes*. Front Neuroenergetics 2009; 1: 1.
- 63 Seo M, Kim JD, Neau D, Sehgal I, Lee YH. *Structure-based development of small molecule PFKFB3 inhibitors: a framework for potential cancer therapeutic agents targeting the Warburg effect*. PLoS One 2011; 6 (9): e24179.
- 64 Taverna RD, Langdon RG. *Reversible association of cytochalasin B with the human erythrocyte membrane. Inhibition of glucose transport and the stoichiometry of cytochalasin binding*. Biochim Biophys Acta 1973; 323 (2): 207-19.
- 65 Vera JC, Reyes AM, Velasquez FV, Rivas CI, Zhang RH, Strobel P, Slebe JC, Nunez-Alarcon J, Golde DW. *Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors*. Biochemistry 2001; 40 (3): 777-90.
- 66 Zhai X, Yang Y, Wan J, Zhu R, Wu Y. *Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells*. Oncol Rep 2013; 30 (6): 2983-91.
- 67 Merchan JR, Kovacs K, Railsback JW, Kurtoglu M, Jing Y, Pina Y, Gao N, Murray TG, Lehrman MA, Lampidis TJ. *Antiangiogenic activity of 2-deoxy-D-glucose*. PLoS One 2010; 5 (10): e13699.

- 68 Ramirez-Peinado S, cazar-Limonos F, Lagares-Tena L, El MN, Caro-Maldonado A, Tirado OM, Munoz-Pinedo C. *2-deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma*. *Cancer Res* 2011; 71 (21): 6796-806.
- 69 Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, Poulain L, Duval M, Gauduchon P, Schwartz L, Icard P. *Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro*. *Anticancer Res* 2006; 26 (5A): 3561-6.
- 70 Leung HJ, Duran EM, Kurtoglu M, Andreansky S, Lampidis TJ, Mesri EA. *Activation of the unfolded protein response by 2-deoxy-D-glucose inhibits Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication and gene expression*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56 (11): 5794-803.
- 71 Maehama T, Patzelt A, Lengert M, Hutter KJ, Kanazawa K, Zur Hausen H, Rösl F. *Selective down-regulation of human papillomavirus transcription by 2-deoxyglucose*. *Int J Cancer* 1998; 76 (5): 639-46.
- 72 Zhang F, Aft RL. *Chemosensitizing and cytotoxic effects of 2-deoxy-D-glucose on breast cancer cells*. *J Cancer Res Ther* 2009; 5 Suppl 1: S41-S43.
- 73 Coleman MC, Asbury CR, Daniels D, Du J, ykin-Burns N, Smith BJ, Li L, Spitz DR, Cullen JJ. *2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer*. *Free Radic Biol Med* 2008; 44 (3): 322-31.
- 74 Kalia VK, Prabhakara S, Narayanan V. *Modulation of cellular radiation responses by 2-deoxy-D-glucose and other glycolytic inhibitors: implications for cancer therapy*. *J Cancer Res Ther* 2009; 5 Suppl 1: S57-S60.
- 75 Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. *Differential mechanisms of radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose in the monolayers and multicellular spheroids of a human glioma cell line*. *Cancer Biol Ther* 2006; 5 (9): 1142-51.
- 76 Perumal V, Solomon PF, Jayanth VR. *Modification of 2-deoxy-D-glucose on radiation-and chemotherapeutic drug-induced chromosomal aberrations*. *J Cancer Res Ther* 2009; 5 Suppl 1: S48-S52.

- 77 Prasanna VK, Venkataramana NK, Dwarakanath BS, Santhosh V. *Differential responses of tumors and normal brain to the combined treatment of 2-DG and radiation in glioblastoma*. J Cancer Res Ther 2009; 5 Suppl 1: S44-S47.
- 78 Hulleman E, Kazemier KM, Holleman A, VanderWeele DJ, Rudin CM, Broekhuis MJ, Evans WE, Pieters R, Den Boer ML. *Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells*. Blood 2009; 113 (9): 2014-21.
- 79 Keenan J, Liang Y, Clynes M. *Two-deoxyglucose as an anti-metabolite in human carcinoma cell line RPMI-2650 and drug-resistant variants*. Anticancer Res 2004; 24 (2A): 433-40.
- 80 Eckert AW, Kappler M, Schubert J, Taubert H. *Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients*. Oral Maxillofac Surg 2012; 16 (2): 189-96.
- 81 Lu X, Kang Y. *Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis*. Clin Cancer Res 2010; 16 (24): 5928-35.
- 82 Seeber LM, Horree N, Vooijs MA, Heintz AP, van der WE, Verheijen RH, Van Diest PJ. *The role of hypoxia inducible factor-1alpha in gynecological cancer*. Crit Rev Oncol Hematol 2011; 78 (3): 173-84.
- 83 Vaupel P, Harrison L. *Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response*. Oncologist 2004; 9 Suppl 5: 4-9.
- 84 Semenza GL. *HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations*. J Clin Invest 2013; 123 (9): 3664-71.
- 85 Wang GL, Semenza GL. *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem 1995; 270 (3): 1230-7.
- 86 Lisy K, Peet DJ. *Turn me on: regulating HIF transcriptional activity*. Cell Death Differ 2008; 15 (4): 642-9.

- 87 Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. *Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem 1996; 271 (30): 17771-8.
- 88 Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. *Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha*. EMBO J 1998; 17 (22): 6573-86.
- 89 Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A. *Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1*. Kidney Int 1997; 51 (2): 553-5.
- 90 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92 (12): 5510-4.
- 91 Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. *Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension*. J Biol Chem 1997; 272 (31): 19253-60.
- 92 Li H, Dong L, Whitlock JP, Jr. *Transcriptional activation function of the mouse Ah receptor nuclear translocator*. J Biol Chem 1994; 269 (45): 28098-105.
- 93 Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (14): 7987-92.
- 94 Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G, Eck MJ. *Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99 (8): 5367-72.
- 95 Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Livingston DM. *Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription*. Nat Med 2000; 6 (12): 1335-40.

- 96 Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. Cell 2001; 107 (1): 43-54.
- 97 Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch*. Science 2002; 295 (5556): 858-61.
- 98 Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. *HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing*. Science 2001; 292 (5516): 464-8.
- 99 Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von KA, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation*. Science 2001; 292 (5516): 468-72.
- 100 Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation*. EMBO J 2001; 20 (18): 5197-206.
- 101 Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature 1999; 399 (6733): 271-5.
- 102 Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW. *Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex*. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97 (19): 10430-5.
- 103 Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, Kamura T, Conaway RC, Conaway JW, Kaelin WG, Jr. *Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2*. Mol Cell Biol 1998; 18 (2): 732-41.

- 104 Arnesen T, Kong X, Evjenth R, Gromyko D, Varhaug JE, Lin Z, Sang N, Caro J, Lillehaug JR. *Interaction between HIF-1 alpha (ODD) and hARD1 does not induce acetylation and destabilization of HIF-1alpha*. FEBS Lett 2005; 579 (28): 6428-32.
- 105 Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. *Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation*. Cell 2002; 111 (5): 709-20.
- 106 Murray-Rust TA, Oldham NJ, Hewitson KS, Schofield CJ. *Purified recombinant hARD1 does not catalyse acetylation of Lys532 of HIF-1alpha fragments in vitro*. FEBS Lett 2006; 580 (8): 1911-8.
- 107 Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH. *Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1alpha*. J Cell Sci 1999; 112 (Pt 8): 1203-12.
- 108 Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A. *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem 1996; 271 (51): 32529-37.
- 109 Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. *Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2*. Cancer Res 1999; 59 (16): 3915-8.
- 110 Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1*. Blood 1999; 94 (5): 1561-7.
- 111 Liu LZ, Hu XW, Xia C, He J, Zhou Q, Shi X, Fang J, Jiang BH. *Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells*. Free Radic Biol Med 2006; 41 (10): 1521-33.

- 112 Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T. *Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway*. FEBS Lett 2002; 512 (1-3): 157-62.
- 113 Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Semenza GL, Van OE. *Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway*. J Biol Chem 2002; 277 (31): 27975-81.
- 114 Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. *Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT*. EMBO J 1998; 17 (17): 5085-94.
- 115 Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. *Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1*. Cancer Res 2003; 63 (9): 2330-4.
- 116 Semenza GL. *Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy*. Trends Pharmacol Sci 2012; 33 (4): 207-14.
- 117 Hofer T, Desbaillets I, Hopfl G, Gassmann M, Wenger RH. *Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy*. FASEB J 2001; 15 (14): 2715-7.
- 118 Rebucci M, Michiels C. *Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy*. Biochem Pharmacol 2013; 85 (9): 1219-26.
- 119 Chen Y, Tang Y, Guo C, Wang J, Boral D, Nie D. *Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters*. Biochem Pharmacol 2012; 83 (8): 1112-26.
- 120 Martinez-Lacaci I, Garcia MP, Soto JL, Saceda M. *Tumour cells resistance in cancer therapy*. Clin Transl Oncol 2007; 9 (1): 13-20.

- 121 Williams RT. *Hepatic metabolism of drugs*. Gut 1972; 13 (7): 579-85.
- 122 Wilson TR, Longley DB, Johnston PG. *Chemoresistance in solid tumours*. Ann Oncol 2006; 17 Suppl 10: x315-x324.
- 123 Rohwer N, Cramer T. *Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways*. Drug Resist Updat 2011; 14 (3): 191-201.
- 124 Caldwell S, Park SH. *The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology*. J Gastroenterol 2009; 44 Suppl 19: 96-101.
- 125 Becker N, Holzmeier S. *Krebsatlas*. Deutsches Krebsforschungszentrum; 2010.
- 126 *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Berlin: Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2013.
- 127 Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL. *The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective*. Oncologist 2010; 15 Suppl 4: 5-13.
- 128 Thomas MB. *Systemic therapy for hepatocellular carcinoma*. Cancer J 2008; 14 (2): 123-7.
- 129 Gao J, Xie L, Yang WS, Zhang W, Gao S, Wang J, Xiang YB. *Risk factors of hepatocellular carcinoma--current status and perspectives*. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13 (3): 743-52.
- 130 Karagozian R, Derdak Z, Baffy G. *Obesity-associated mechanisms of hepatocarcinogenesis*. Metabolism 2014.
- 131 Llovet JM. *Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol 2005; 40 (3): 225-35.
- 132 Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. *Alcohol and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology 2004; 127 (5 Suppl 1): S87-S96.

- 133 Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. *The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association*. Am J Gastroenterol 2012; 107 (6): 811-26.
- 134 Rahman R, Hammoud GM, Almashrawi AA, Ahmed KT, Ibdah JA. *Primary hepatocellular carcinoma and metabolic syndrome: An update*. World J Gastrointest Oncol 2013; 5 (9): 186-94.
- 135 Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. *Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma*. Semin Liver Dis 2005; 25 (2): 181-200.
- 136 Roayaie S, Obeidat K, Sposito C, Mariani L, Bhoori S, Pellegrinelli A, Labow D, Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. *Resection of hepatocellular cancer ≤ 2 cm: results from two Western centers*. Hepatology 2013; 57 (4): 1426-35.
- 137 de Lope CR, Tremosini S, Forner A, Reig M, Bruix J. *Management of HCC*. J Hepatol 2012; 56 Suppl 1: S75-S87.
- 138 Bruix J, Sherman M. *Management of hepatocellular carcinoma: an update*. Hepatology 2011; 53 (3): 1020-2.
- 139 Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. *Hepatocellular carcinoma*. Lancet 2003; 362 (9399): 1907-17.
- 140 Rhim H, Dodd GD, III. *Radiofrequency thermal ablation of liver tumors*. J Clin Ultrasound 1999; 27 (5): 221-9.
- 141 Sandhu DS, Tharayil VS, Lai JP, Roberts LR. *Treatment options for hepatocellular carcinoma*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2008; 2 (1): 81-92.
- 142 Huang M, Shen A, Ding J, Geng M. *Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade*. Trends Pharmacol Sci 2014; 35 (1): 41-50.
- 143 Strumberg D, Schultheis B. *Regorafenib for cancer*. Expert Opin Investig Drugs 2012; 21 (6): 879-89.

- 144 Tessari A, Palmieri D, Di CS. *Overview of diagnostic/targeted treatment combinations in personalized medicine for breast cancer patients*. *Pharmgenomics Pers Med* 2013; 7: 1-19.
- 145 Chang L, Karin M. *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. *Nature* 2001; 410 (6824): 37-40.
- 146 Romeo Y, Zhang X, Roux PP. *Regulation and function of the RSK family of protein kinases*. *Biochem J* 2012; 441 (2): 553-69.
- 147 Daskalow K, Rohwer N, Raskopf E, Dupuy E, Kuhl A, Loddenkemper C, Wiedenmann B, Schmitz V, Cramer T. *Role of hypoxia-inducible transcription factor 1alpha for progression and chemosensitivity of murine hepatocellular carcinoma*. *J Mol Med (Berl)* 2010; 88 (8): 817-27.
- 148 Murakami Y, Kazuno H, Emura T, Tsujimoto H, Suzuki N, Fukushima M. *Different mechanisms of acquired resistance to fluorinated pyrimidines in human colorectal cancer cells*. *Int J Oncol* 2000; 17 (2): 277-83.
- 149 Sinha P, Hutter G, Kottgen E, Dietel M, Schadendorf D, Lage H. *Increased expression of annexin I and thioredoxin detected by two-dimensional gel electrophoresis of drug resistant human stomach cancer cells*. *J Biochem Biophys Methods* 1998; 37 (3): 105-16.
- 150 Yue P, Zhang X, Paladino D, Sengupta B, Ahmad S, Holloway RW, Ingersoll SB, Turkson J. *Hyperactive EGF receptor, Jaks and Stat3 signaling promote enhanced colony-forming ability, motility and migration of cisplatin-resistant ovarian cancer cells*. *Oncogene* 2012; 31 (18): 2309-22.
- 151 Rohwer N, Lobitz S, Daskalow K, Jons T, Vieth M, Schlag PM, Kemmner W, Wiedenmann B, Cramer T, Hocker M. *HIF-1[alpha] determines the metastatic potential of gastric cancer cells*. *Br J Cancer* 2009; 100 (5): 772-81.
- 152 Dubois N, Bennoun M, Allemand I, Molina T, Grimber G, udet-Monsac M, Abelanet R, Briand P. *Time-course development of differentiated hepatocarcinoma and lung metastasis in transgenic mice*. *J Hepatol* 1991; 13 (2): 227-39.

- 153 Dupuy E, Hainaud P, Villemain A, Bodevin-Phedre E, Brouland JP, Briand P, Tobelem G. *Tumoral angiogenesis and tissue factor expression during hepatocellular carcinoma progression in a transgenic mouse model*. J Hepatol 2003; 38 (6): 793-802.
- 154 Nagy A. *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. Genesis 2000; 26 (2): 99-109.
- 155 Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. *Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth*. Cancer Res 2000; 60 (15): 4010-5.
- 156 Postic C, Magnuson MA. *DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age*. Genesis 2000; 26 (2): 149-50.
- 157 Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. *Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene*. Cancer Res 2002; 62 (12): 3387-94.
- 158 Sermeus A, Genin M, Maincent A, Fransolet M, Notte A, Leclere L, Riquier H, Arnould T, Michiels C. *Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types*. PLoS ONE 2012; 7 (11): e47519.
- 159 Salt IP, Johnson G, Ashcroft SJ, Hardie DG. *AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release*. Biochem J 1998; 335 (Pt 3): 533-9.
- 160 Schultze SM, Hemmings BA, Niessen M, Tschopp O. *PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis*. Expert Rev Mol Med 2012; 14: e1.
- 161 Cheng J, Huang T, Li Y, Guo Y, Zhu Y, Wang Q, Tan X, Chen W, Zhang Y, Cheng W, Yamamoto T, Jing X, Huang J. *AMP-Activated Protein Kinase Suppresses then In Vitro and In Vivo Proliferation of Hepatocellular Carcinoma*. PLoS ONE 2014; 9 (4): e93256.

- 162 Rehman G, Shehzad A, Khan AL, Hamayun M. *Role of AMP-Activated Protein Kinase in Cancer Therapy*. Arch Pharm (Weinheim) 2014; 347 (7): 457-68.
- 163 Kyriakis JM, App H, Zhang Xf, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J. *Raf-1 activates MAP kinase-kinase*. Nature 1992; 358 (6385): 417-21.
- 164 Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. *Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf*. Cell 1993; 74 (1): 205-14.
- 165 Wolfensohn S, Lloyd M. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. 3. ed. Balckwell Publishing Ltd; 2003.
- 166 Dormann A. *Laborwerte*. 4. Auflage ed. München: Elsevier, Urban & Fisher; 2005.
- 167 Aft RL, Zhang FW, Gius D. *Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death*. Br J Cancer 2002; 87 (7): 805-12.
- 168 Liu H, Kurtoglu M, Cao Y, Xi H, Kumar R, Axten JM, Lampidis TJ. *Conversion of 2-deoxyglucose-induced growth inhibition to cell death in normoxic tumor cells*. Cancer Chemother Pharmacol 2013; 72 (1): 251-62.
- 169 Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line*. Nature 1979; 282 (5739): 615-6.
- 170 Heffelfinger SC, Hawkins HH, Barrish J, Taylor L, Darlington GJ. *SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin*. In Vitro Cell Dev Biol 1992; 28A (2): 136-42.
- 171 Grabellus F, Nagarajah J, Bockisch A, Schmid KW, Sheu SY. *Glucose transporter 1 expression, tumor proliferation, and iodine/glucose uptake in thyroid cancer with emphasis on poorly differentiated thyroid carcinoma*. Clin Nucl Med 2012; 37 (2): 121-7.

- 172 Reis H, Tschirdewahn S, Szarvas T, Rubben H, Schmid KW, Grabellus F. *Expression of GLUT1 is associated with increasing grade of malignancy in non-invasive and invasive urothelial carcinomas of the bladder.* *Oncol Lett* 2011; 2 (6): 1149-53.
- 173 Maher J, Krishan A, Lampidis T. *Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-d-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions.* *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53 (2): 116-22.
- 174 Raez LE, Papadopoulos K, Ricart AD, Chiorean EG, Dipaola RS, Stein MN, Rocha Lima CM, Schlesselman JJ, Tolba K, Langmuir VK, Kroll S, Jung DT, Kurtoglu M, Rosenblatt J, Lampidis TJ. *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.
- 175 Schroder M, Kaufman RJ. *ER stress and the unfolded protein response.* *Mutat Res* 2005; 569 (1-2): 29-63.
- 176 Gaddameedhi S, Chatterjee S. *Association between the unfolded protein response, induced by 2-deoxyglucose, and hypersensitivity to cisplatin: a mechanistic study employing molecular genomics.* *J Cancer Res Ther* 2009; 5 Suppl 1: S61-S66.
- 177 Yu SM, Kim SJ. *Endoplasmic reticulum stress (ER-stress) by 2-deoxy-D-glucose (2DG) reduces cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and N-glycosylation and induces a loss of COX-2 activity via a Src kinase-dependent pathway in rabbit articular chondrocytes.* *Exp Mol Med* 2010; 42: 777-86.
- 178 Shinjo S, Mizotani Y, Tashiro E, Imoto M. *Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds.* *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; 77 (4): 729-35.
- 179 Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpaichitr M, Savaraj N, Lane AN, Lampidis TJ. *Under normoxia, 2-deoxy-d-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation.* *Molecular Cancer Therapeutics* 2007; 6 (11): 3049-58.

- 180 Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. *Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells*. Mol Cell 2000; 6 (5): 1099-108.
- 181 Sarre TF. *The phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2: a principle of translational control in mammalian cells*. Biosystems 1989; 22 (4): 311-25.
- 182 Goldson TM, Vielhauer G, Staub E, Miller S, Shim H, Hagedorn CH. *Eukaryotic initiation factor 4E variants alter the morphology, proliferation, and colony-formation properties of MDA-MB-435 cancer cells*. Mol Carcinog 2007; 46 (1): 71-84.
- 183 Su J, Zhou L, Kong X, Yang X, Xiang X, Zhang Y, Li X, Sun L. *Endoplasmic reticulum is at the crossroads of autophagy, inflammation, and apoptosis signaling pathways and participates in the pathogenesis of diabetes mellitus*. J Diabetes Res 2013; 2013: 193461.
- 184 Fu Y, Li J, Lee AS. *GRP78/BiP Inhibits Endoplasmic Reticulum BIK and Protects Human Breast Cancer Cells against Estrogen Starvation-Induced Apoptosis*. Cancer Research 2007; 67 (8): 3734-40.
- 185 Reddy RK, Lu J, Lee AS. *The Endoplasmic Reticulum Chaperone Glycoprotein GRP94 with Ca²⁺-binding and Antiapoptotic Properties Is a Novel Proteolytic Target of Calpain during Etoposide-induced Apoptosis*. Journal of Biological Chemistry 1999; 274 (40): 28476-83.
- 186 Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. *Endoplasmic Reticulum Chaperone Protein GRP78 Protects Cells from Apoptosis Induced by Topoisomerase Inhibitors: Role of ATP Binding Site in Suppression of Caspase-7 Activation*. Journal of Biological Chemistry 2003; 278 (23): 20915-24.
- 187 Xi H, Kurtoglu M, Liu H, Wangpaichitr M, You M, Liu X, Savaraj N, Lampidis TJ. *2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion*. Cancer Chemother Pharmacol 2011; 67 (4): 899-910.

- 188 Goldberg L, Israeli R, Kloog Y. *FTS and 2-DG induce pancreatic cancer cell death and tumor shrinkage in mice*. *Cell Death Dis* 2012; 3: e284.
- 189 Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, McAllister D, Mackinnon AC, Jr., Joseph J, Kalyanaraman B. *Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death*. *Cancer Res* 2012; 72 (10): 2634-44.
- 190 Aft RL, Lewis JS, Zhang F, Kim J, Welch MJ. *Enhancing targeted radiotherapy by copper(II)diacetyl- bis(N4-methylthiosemicarbazone) using 2-deoxy-D-glucose*. *Cancer Res* 2003; 63 (17): 5496-504.
- 191 Barar J, Omid Y. *Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy*. *Bioimpacts* 2013; 3 (4): 149-62.
- 192 Priebe A, Tan L, Wahl H, Kueck A, He G, Kwok R, Opirari A, Liu JR. *Glucose deprivation activates AMPK and induces cell death through modulation of Akt in ovarian cancer cells*. *Gynecol Oncol* 2011; 122 (2): 389-95.
- 193 Ozdemir T, Nar R, Kilinc V, Alacam H, Salis O, Duzgun A, Gulden S, Bedir A. *Ouabain targets the unfolded protein response for selective killing of HepG2 cells during glucose deprivation*. *Cancer Biother Radiopharm* 2012; 27 (8): 457-63.
- 194 Garufi A, Ricci A, Trisciuglio D, Iorio E, Carpinelli G, Pistritto G, Cirone M, D'Orazi G. *Glucose restriction induces cell death in parental but not in homeodomain-interacting protein kinase 2-depleted RKO colon cancer cells: molecular mechanisms and implications for tumor therapy*. *Cell Death Dis* 2013; 4: e639.
- 195 Isono T, Chano T, Kitamura A, Yuasa T. *Glucose Deprivation Induces G2/M Transition-Arrest and Cell Death in N-GlcNAc2-Modified Protein-Producing Renal Carcinoma Cells*. *PLoS ONE* 2014; 9 (5): e96168.
- 196 Xi H, Barredo JC, Merchan JR, Lampidis TJ. *Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKKbeta leading to autophagy*. *Biochem Pharmacol* 2013; 85 (10): 1463-77.

- 197 Palorini R, Cammarata FP, Balestrieri C, Monestiroli A, Vasso M, Gelfi C, Alberghina L, Chiaradonna F. *Glucose starvation induces cell death in K-ras-transformed cells by interfering with the hexosamine biosynthesis pathway and activating the unfolded protein response*. Cell Death Dis 2013; 4: e732.
- 198 Mote PL, Tillman JB, Spindler SR. *Glucose regulation of GRP78 gene expression*. Mech Ageing Dev 1998; 104 (2): 149-58.
- 199 Al-Rawashdeh FY, Scriven P, Cameron IC, Vergani PV, Wyld L. *Unfolded protein response activation contributes to chemoresistance in hepatocellular carcinoma*. Eur J Gastroenterol Hepatol 2010; 22 (9): 1099-105.
- 200 Ho VW, Leung K, Hsu A, Luk B, Lai J, Shen SY, Minchinton AI, Waterhouse D, Bally MB, Lin W, Nelson BH, Sly LM, Krystal G. *A Low Carbohydrate, High Protein Diet Slows Tumor Growth and Prevents Cancer Initiation*. Cancer Research 2011; 71 (13): 4484-93.
- 201 Venkateswaran V, Haddad AQ, Fleshner NE, Fan R, Sugar LM, Nam R, Klotz LH, Pollak M. *Association of diet-induced hyperinsulinemia with accelerated growth of prostate cancer (LNCaP) xenografts*. J Natl Cancer Inst 2007; 99 (23): 1793-800.
- 202 Golinska M, Troy H, Chung YL, McSheehy PM, Mayr M, Yin X, Ly L, Williams KJ, Airley RE, Harris AL, Latigo J, Perumal M, Aboagye EO, Perrett D, Stubbs M, Griffiths JR. *Adaptation to HIF-1 deficiency by upregulation of the AMP/ATP ratio and phosphofructokinase activation in hepatomas*. BMC Cancer 2011; 11: 198.
- 203 Rothe JH*, Rudolph I*, Rohwer N, Kupitz D, Derlin T, Gregor-Mamoudou B, Furth C, Amthauer H, Brenner W, Buchert R, Cramer T, Apostolova I. *time course of contrast enhancement by micro CT with dedicated contrast agents in normal mice and mice with hepatocellular carcinoma: comparison of one iodinated and two nanoparticle-based agents*. Academic Radiology 2014; *both authors contributed equally to this work (in press).
- 204 Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. *Dose translation from animal to human studies revisited*. FASEB J 2008; 22 (3): 659-61.

- 205 Stein M, Lin H, Jeyamohan C, Dvorzhinski D, Gounder M, Bray K, Eddy S, Goodin S, White E, Dipaola RS. *Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies*. Prostate 2010; 70 (13): 1388-94.
- 206 Kwon SJ, Lee YJ. *Effect of Low Glutamine/Glucose on Hypoxia-Induced Elevation of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha in Human Pancreatic Cancer MiaPaCa-2 and Human Prostatic Cancer DU-145 Cells*. Clinical Cancer Research 2005; 11 (13): 4694-700.
- 207 Dworatzek E, Mahmoodzadeh S, Schubert C, Westphal C, Leber J, Kusch A, Kararigas G, Fliegner D, Moulin M, Ventura-Clapier R, Gustafsson JA, Davidson MM, Dragun D, Regitz-Zagrosek V. *Sex differences in exercise-induced physiological myocardial hypertrophy are modulated by oestrogen receptor beta*. Cardiovasc Res 2014; 102 (3): 418-28.
- 208 Tomlinson D, Diorio C, Beyene J, Sung L. *Effect of Exercise on Cancer-Related Fatigue: A Meta-analysis*. Am J Phys Med Rehabil 2014.
- 209 Fenton TR, Gout IT. *Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases*. Int J Biochem Cell Biol 2011; 43 (1): 47-59.
- 210 Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. *AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint*. Molecular Cell 2005; 18 (3): 283-93.
- 211 Yonish-Rouach E, Resnftzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. *Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6*. Nature 1991; 352 (6333): 345-7.
- 212 Zheng L, Yang W, Wu F, Wang C, Yu L, Tang L, Qiu B, Li Y, Guo L, Wu M, Feng G, Zou D, Wang H. *Prognostic Significance of AMPK Activation and Therapeutic Effects of Metformin in Hepatocellular Carcinoma*. Clinical Cancer Research 2013; 19 (19): 5372-80.

- 213 Li W, Hua B, Saud SM, Lin H, Hou W, Matter MS, Jia L, Colburn NH, Young MR. *Berberine regulates AMP-activated protein kinase signaling pathways and inhibits colon tumorigenesis in mice*. Mol Carcinog 2014.
- 214 Su YW, Lin YH, Pai MH, Lo AC, Lee YC, Fang IC, Lin J, Hsieh RK, Chang YF, Chen CL. *Association between Phosphorylated AMP-Activated Protein Kinase and Acetyl-CoA Carboxylase Expression and Outcome in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck*. PLoS ONE 2014; 9 (4): e96183.
- 215 De LA, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. *The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches*. Expert Opin Ther Targets 2012; 16 Suppl 2: S17-S27.
- 216 Downward J. *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nat Rev Cancer 2003; 3 (1): 11-22.
- 217 Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Critical Reviews in Oncology/Hematology 1995; 19 (3): 183-232.
- 218 Porras A, Álvarez AM, Valladares A, Benito M. *p42/p44 Mitogen-Activated Protein Kinases Activation Is Required for the Insulin-Like Growth Factor-I/Insulin Induced Proliferation, but Inhibits Differentiation, in Rat Fetal Brown Adipocytes*. Molecular Endocrinology 1998; 12 (6): 825-34.
- 219 Carmean CM, Bobe AM, Yu JC, Volden PA, Brady MJ. *Refeeding-induced brown adipose tissue glycogen hyper-accumulation in mice is mediated by insulin and catecholamines*. PLoS ONE 2013; 8 (7): e67807.
- 220 Faggioni R, Moser A, Feingold KR, Grunfeld C. *Reduced leptin levels in starvation increase susceptibility to endotoxic shock*. Am J Pathol 2000; 156 (5): 1781-7.

- 221 Wang B, Hsu SH, Frankel W, Ghoshal K, Jacob ST. *Stat3-mediated activation of microRNA-23a suppresses gluconeogenesis in hepatocellular carcinoma by down-regulating glucose-6-phosphatase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*. Hepatology 2012; 56 (1): 186-97.
- 222 Leithner K, Hrzenjak A, Trotsmuller M, Moustafa T, Kofeler HC, Wohlkoenig C, Stacher E, Lindenmann J, Harris AL, Olschewski A, Olschewski H. *PCK2 activation mediates an adaptive response to glucose depletion in lung cancer*. Oncogene 2014.
- 223 Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. EMBO J 1996; 15 (23): 6541-51.
- 224 Manning BD, Cantley LC. *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell 2007; 129 (7): 1261-74.
- 225 Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. *Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells*. Mol Cell Biol 1999; 19 (5): 3278-88.
- 226 Chettouh H, Fartoux L, Aoudjehane L, Wendum D, Claperon A, Chretien Y, Rey C, Scatton O, Soubrane O, Conti F, Praz F, Housset C, Rosmorduc O, Sbois-Mouthon C. *Mitogenic insulin receptor-A is overexpressed in human hepatocellular carcinoma due to EGFR-mediated dysregulation of RNA splicing factors*. Cancer Res 2013; 73 (13): 3974-86.
- 227 Geng Y, Ju Y, Ren F, Qiu Y, Tomita Y, Tomoeda M, Kishida M, Wang Y, Jin L, Su F, Wei C, Jia B, Li Y, Chang Z. *Insulin receptor substrate 1/2 (IRS1/2) regulates Wnt/beta-catenin signaling through blocking autophagic degradation of dishevelled2*. J Biol Chem 2014; 289 (16): 11230-41.
- 228 Lee SM, Kim JH, Cho EJ, Youn HD. *A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress*. Cell Death Differ 2009; 16 (5): 738-48.

- 229 Goldstein I, Yizhak K, Madar S, Goldfinger N, Ruppin E, Rotter V. *p53 promotes the expression of gluconeogenesis-related genes and enhances hepatic glucose production*. *Cancer Metab* 2013; 1 (1): 9.
- 230 Ferreira A, Mario E, Porto L, Andrade S, Botion L. *High-Carbohydrate Diet Selectively Induces Tumor Necrosis Factor- α Production in Mice Liver*. *Inflammation* 2011; 34 (2): 139-45.
- 231 Sun B, Karin M. *Inflammation and liver tumorigenesis*. *Front Med* 2013; 7 (2): 242-54.
- 232 Aparicio VA, Nebot E, Garcia-del MR, Hado-Vilchez M, Porres JM, Sanchez C, Aranda P. *High-protein diets and renal status in rats*. *Nutr Hosp* 2013; 28 (1): 232-7.
- 233 Juraschek SP, Appel LJ, Anderson CA, Miller ER, III. *Effect of a high-protein diet on kidney function in healthy adults: results from the OmniHeart trial*. *Am J Kidney Dis* 2013; 61 (4): 547-54.
- 234 Philips K, Kurtoglu M, Leung H, Liu H, Gao N, Lehrman M, Murray T, Lampidis T. *Increased sensitivity to glucose starvation correlates with downregulation of glycogen phosphorylase isoform PYGB in tumor cell lines resistant to 2-deoxy-d-glucose*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 73 (2): 349-61.
- 235 Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, Van BG, Samuel S, Kim MP, Lim SJ, Ellis LM. *Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition*. *Cancer Res* 2009; 69 (5): 1951-7.
- 236 Ling X, Wen L, Zhou Y. *Role of mitochondrial translocation of telomerase in hepatocellular carcinoma cells with multidrug resistance*. *Int J Med Sci* 2012; 9 (7): 545-54.
- 237 DeSalvo J, Kuznetsov JN, Du J, Leclerc GM, Leclerc GJ, Lampidis TJ, Barredo JC. *Inhibition of Akt potentiates 2-DG-induced apoptosis via downregulation of UPR in acute lymphoblastic leukemia*. *Mol Cancer Res* 2012; 10 (7): 969-78.

- 238 Estan MC, Calvino E, de Blas E, Boyano-Adanez MdC, Mena ML, Gomez-Gomez M, Rial E, Aller P. *2-Deoxy-d-glucose cooperates with arsenic trioxide to induce apoptosis in leukemia cells: Involvement of IGF-1R-regulated Akt/mTOR, MEK/ERK and LKB-1/AMPK signaling pathways*. *Biochemical Pharmacology* 2012; 84 (12): 1604-16.
- 239 Zhong D, Liu X, Schafer-Hales K, Marcus AI, Khuri FR, Sun SY, Zhou W. *2-Deoxyglucose induces Akt phosphorylation via a mechanism independent of LKB1/AMP-activated protein kinase signaling activation or glycolysis inhibition*. *Molecular Cancer Therapeutics* 2008; 7 (4): 809-17.
- 240 Zhong D, Xiong L, Liu T, Liu X, Liu X, Chen J, Sun SY, Khuri FR, Zong Y, Zhou Q, Zhou W. *The glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose activates multiple prosurvival pathways through IGF1R*. *J Biol Chem* 2009; 284 (35): 23225-33.
- 241 Mireuta M, Hancock MA, Pollak M. *Binding between insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 is not influenced by glucose or 2-deoxy-D-glucose*. *J Biol Chem* 2011; 286 (19): 16567-73.
- 242 Jiang B, Liu L. Chapter 2 PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. In: George F, V, editor. *Advances in Cancer Research*. Volume 102 ed. Academic Press; 2009. p. 19-65.
- 243 Yuan TL, Cantley LC. *PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme*. *Oncogene* 2008; 27 (41): 5497-510.
- 244 Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. *PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas*. *Oncogene* 2004; 24 (8): 1477-80.
- 245 Yun J, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H, Schmidt K, Willson JK, Markowitz S, Zhou S, Diaz LA, Jr., Velculescu VE, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N. *Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells*. *Science* 2009; 325 (5947): 1555-9.

- 246 Maher JC, Savaraj N, Priebe W, Liu H, Lampidis TJ. *Differential sensitivity to 2-deoxy-D-glucose between two pancreatic cell lines correlates with GLUT-1 expression*. *Pancreas* 2005; 30 (2): e34-e39.
- 247 Scriven P, Coulson S, Haines R, Balasubramanian S, Cross S, Wyld L. *Activation and clinical significance of the unfolded protein response in breast cancer*. *Br J Cancer* 2009; 101 (10): 1692-8.
- 248 Proescholdt MA, Merrill MJ, Stoerr EM, Lohmeier A, Pohl F, Brawanski A. *Function of carbonic anhydrase IX in glioblastoma multiforme*. *Neuro Oncol* 2012; 14 (11): 1357-66.
- 249 Ord JJ, Agrawal S, Thamboo TP, Roberts I, Campo L, Turley H, Han C, Fawcett DW, Kulkarni RP, Cranston D, Harris AL. *An Investigation Into the Prognostic Significance of Necrosis and Hypoxia in High Grade and Invasive Bladder Cancer*. *The Journal of Urology* 2007; 178 (2): 677-82.
- 250 Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouysségur J, Berra E. *HIF-1 α and CA IX staining in invasive breast carcinomas: Prognosis and treatment outcome*. *Int J Cancer* 2007; 120 (7): 1451-8.
- 251 Gieling RG, Parker CA, De Costa LA, Robertson N, Harris AL, Stratford IJ, Williams KJ. *Inhibition of carbonic anhydrase activity modifies the toxicity of doxorubicin and melphalan in tumour cells in vitro*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2013; 28 (2): 360-9.
- 252 Ojugo AS, McSheehy PM, Stubbs M, Alder G, Bashford CL, Maxwell RJ, Leach MO, Judson IR, Griffiths JR. *Influence of pH on the uptake of 5-fluorouracil into isolated tumour cells*. *Br J Cancer* 1998; 77 (6): 873-9.
- 253 Raghunand N, Mahoney BP, Gillies RJ. *Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents*. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66 (7): 1219-29.

- 254 Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ. *Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro*. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66 (7): 1207-18.
- 255 Beenackers JAWM, Kuster FM, van der Baan HS. *Ionisation and solvation of d-glucose*. *Carbohydrate Research* 1985; 140 (2): 169-83.
- 256 Feldman DR, Iyer G, Van AL, Patil S, Al-Ahmadie H, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS, Solit DB. *Presence of Somatic Mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in Cisplatin-Resistant Germ Cell Tumors*. *Clin Cancer Res* 2014.
- 257 Wang T, Li Y, Tuerhanjiang A, Wang W, Wu Z, Yuan M, Maitituoheti M, Wang S. *Twist2 contributes to cisplatin-resistance of ovarian cancer through the AKT/GSK-3beta signaling pathway*. *Oncol Lett* 2014; 7 (4): 1102-8.
- 258 Sos ML, Koker M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T, Seeger JM, Weiss J, Fischer F, Frommolt P, Michel K, Peifer M, Mermel C, Girard L, Peyton M, Gazdar AF, Minna JD, Garraway LA, Kashkar H, Pao W, Meyerson M, Thomas RK. *PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR*. *Cancer Res* 2009; 69 (8): 3256-61.
- 259 Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Osawa M, Hirose Y, Sakata J, Kobayashi T, Fujimaki S, Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y. *Valproic acid overcomes transforming growth factor-beta-mediated sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma*. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7 (4): 1299-313.
- 260 Lee J, Jang KT, Ki CS, Lim T, Park YS, Lim HY, Choi DW, Kang WK, Park K, Park JO. *Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma*. *Cancer* 2007; 109 (8): 1561-9.
- 261 Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, Xavier AC, Ozburn NC, Liu DD, Bekele BN, Herbst RS, Wistuba II. *KRAS Mutation Is an Important Predictor of Resistance to Therapy with Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer*. *Clinical Cancer Research* 2007; 13 (10): 2890-6.

- 262 Loupakis F, Pollina L, Stasi I, Ruzzo A, Scartozzi M, Santini D, Masi G, Graziano F, Cremolini C, Rulli E, Canestrari E, Funel N, Schiavon G, Petrini I, Magnani M, Tonini G, Campani D, Floriani I, Cascinu S, Falcone A. *PTEN Expression and KRAS Mutations on Primary Tumors and Metastases in the Prediction of Benefit From Cetuximab Plus Irinotecan for Patients With Metastatic Colorectal Cancer*. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27 (16): 2622-9.
- 263 Ratner ES, Keane FK, Lindner R, Tassi RA, Paranjape T, Glasgow M, Nallur S, Deng Y, Lu L, Steele L, Sand S, Muller RU, Bignotti E, Bellone S, Boeke M, Yao X, Pecorelli S, Ravaggi A, Katsaros D, Zelterman D, Cristea MC, Yu H, Rutherford TJ, Weitzel JN, Neuhausen SL, Schwartz PE, Slack FJ, Santin AD, Weidhaas JB. *A KRAS variant is a biomarker of poor outcome, platinum chemotherapy resistance and a potential target for therapy in ovarian cancer*. *Oncogene* 2012; 31 (42): 4559-66.
- 264 Sun C, Hobor S, Bertotti A, Zecchin D, Huang S, Galimi F, Cottino F, Prahallad A, Grenrum W, Tzani A, Schlicker A, Wessels L, Smit E, Thunnissen E, Halonen P, Lieftink C, Beijersbergen R, Di-áNicolantonio F, Bardelli A, Trusolino L, Bernards R. *Intrinsic Resistance to MEK Inhibition in KRAS Mutant Lung and Colon Cancer through Transcriptional Induction of ERBB3*. *Cell Reports* 2014; 7 (1): 86-93.
- 265 Giehl K. *Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis*. *Biol Chem* 2005; 386 (3): 193-205.
- 266 Schumacher G, Scheunert S, Rueggeberg A, Bachem MG, Nussler AK, Spinelli A, Mukhopadhyay T, Pratschke J, Neuhaus P. *A very low toxic agent induces apoptosis and reduces growth of human hepatocellular carcinoma cells*. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 (7): 1207-12.
- 267 Muller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. *Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53*. *J Clin Invest* 1997; 99 (3): 403-13.

- 268 Liebman M. *When and why carbohydrate restriction can be a viable option*. Nutrition 2014; 30 (7-8): 748-54.
- 269 Paoli A, Rubini A, Volek JS, Grimaldi KA. *Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets*. Eur J Clin Nutr 2013; 67 (8): 789-96.
- 270 Volek J, Phinney S, Forsythe C, Quann E, Wood R, Puglisi M, Kraemer W, Bibus D, Fernandez M, Feinman R. *Carbohydrate Restriction has a More Favorable Impact on the Metabolic Syndrome than a Low Fat Diet*. Lipids 2009; 44 (4): 297-309.
- 271 Andersen C, Fernandez M. *Dietary strategies to reduce metabolic syndrome*. Rev Endocr Metab Disord 2013; 14 (3): 241-54.
- 272 Bosse JD, Lin HY, Sloan C, Zhang QJ, Abel ED, Pereira TJ, Dolinsky VW, Symons JD, Jalili T. *A low-carbohydrate/high-fat diet reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats without deleterious changes in insulin resistance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2013; 304 (12): H1733-H1742.
- 273 Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. *Cancer-related inflammation*. Nature 2008; 454 (7203): 436-44.
- 274 Forsythe C, Phinney S, Fernandez M, Quann E, Wood R, Bibus D, Kraemer W, Feinman R, Volek J. *Comparison of Low Fat and Low Carbohydrate Diets on Circulating Fatty Acid Composition and Markers of Inflammation*. Lipids 2008; 43 (1): 65-77.
- 275 Browning JD, Baker JA, Rogers T, Davis J, Satapati S, Burgess SC. *Short-term weight loss and hepatic triglyceride reduction: evidence of a metabolic advantage with dietary carbohydrate restriction*. The American Journal of Clinical Nutrition 2011; 93 (5): 1048-52.
- 276 Fine EJ, Segal-Isaacson CJ, Feinman RD, Herszkopf S, Romano MC, Tomuta N, Bontempo AF, Negassa A, Sparano JA. *Targeting insulin inhibition as a metabolic therapy in advanced cancer: A pilot safety and feasibility dietary trial in 10 patients*. Nutrition 2012; 28 (10): 1028-35.

- 277 Casla S, Hojman P, Marquez-Rodas I, Lopez-Tarruella S, Jerez Y, Barakat R, Martín M. *Running away from side effects: physical exercise as a complementary intervention for breast cancer patients*. Clin Transl Oncol 2014; 1-17.
- 278 Betof AS, Dewhirst MW, Jones LW. *Effects and potential mechanisms of exercise training on cancer progression: A translational perspective*. Brain, Behavior, and Immunity 2013; 30, Supplement (0): S75-S87.
- 279 Higgins KA, Park D, Lee GY, Curran WJ, Deng X. *Exercise-induced lung cancer regression: Mechanistic findings from a mouse model*. Cancer 2014.
- 280 Semenza GL. *Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis*. Oncogene 2013; 32 (35): 4057-63.
- 281 Simiantonaki N, Taxeidis M, Jayasinghe C, Kurzik-Dumke U, Kirkpatrick CJ. *Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression*. BMC Cancer 2008; 8: 320.
- 282 Chen D, Thomas EL, Kapahi P. *HIF-1 Modulates Dietary Restriction-Mediated Lifespan Extension via IRE-1 in Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet 2009; 5 (5): e1000486.
- 283 Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, Gillies RJ. *Drug Resistance and Cellular Adaptation to Tumor Acidic pH Microenvironment*. Mol Pharmaceutics 2011; 8 (6): 2032-8.
- 284 Gerweck LE, Vijayappa S, Kozin S. *Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics*. Molecular Cancer Therapeutics 2006; 5 (5): 1275-9.
- 285 Moellering R, Black K, Krishnamurty C, Baggett B, Stafford P, Rain M, Gatenby R, Gillies R. *Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes*. Clin Exp Metastasis 2008; 25 (4): 411-25.
- 286 Justus CR, Dong L, Yang LV. *Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors*. Front Physiol 2013; 4: 354.

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikation

Rothe JH*; **Rudolph I***; Rohwer N; Kupitz D; Derlin T; Gregor-Mamoudou B; Furth C; Amthauer H; Brenner W; Buchert R; Cramer T, Apostolova I. time course of contrast enhancement by micro CT with dedicated contrast agents in normal mice and mice with hepatocellular carcinoma: comparison of one iodinated and two nanoparticle-based agents. Academic Radiology 2014. akzeptiert zur Publikation

* geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge

Rudolph I, Daskalow K, Rohwer N, Dupuy E, Bogdanoff B, Wiedenmann B, Cramer T. Inhibition of glycolysis displays antiproliferative efficacy against hepatocellular carcinoma. 4th Mildred Scheel Cancer Conference. Mai 2010 in Königswinter bei Bonn. Posterpräsentation

Rudolph I, Daskalow K, Rohwer N, Bogdanoff B, Apostolova I, Brenner W, Dupuy E, Wiedenmann B, Cramer T. Evaluation of deregulated tumor energetics as an innovative approach to target hepatocellular carcinoma. International Conference on Emerging Concepts in Cancer. Juni .2012 in Berlin. Posterpräsentation

Rudolph I, Rohwer N, Bogdanoff B, Apostolova I, Brenner W, Dupuy E, Wiedenmann B, Cramer T. Evaluierung des Tumor-spezifischen Metabolismus des Hepatozellulären Karzinoms. 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) mit Sektion Endoskopie/Viszeralmedizin 2012. September 2012 in Hamburg. Kurzvortrag

Rudolph I, Rohwer N, Bogdanoff B, Kempa S, Loddenkemper C, Cramer T. Evaluation of deregulated tumor energetics as an innovative approach to target hepatocellular carcinoma. Symposium Tumor Metabolism meets Immunology. April 2013 in Regensburg. Posterpräsentation

Rudolph I, Rohwer N, Bogdanoff B, Loddenkemper C, Raskopf E, Schmitz V, Cramer T. Macronutrient composition determines the malignant progression of hepatocellular carcinoma. DGVS Spring Conference. Juni 2013 in Berlin. Postervortrag

Anhang

Zusammensetzung Standardfutter (Status 06/2005)

ssniff® R/M-H

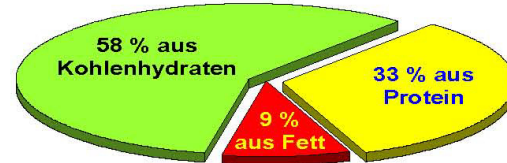
Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen



Beschreibung

Dieses Futtermittel ist für Ratten und Mäuse im Erhaltungsstoffwechsel vorgesehen. Aufgrund der ausgewogenen Nährstoffkonzentrationen bei mittlerer Energiedichte und niedrigem Nitrosamin-Gehalt ist es auch als Basisfutter für Langzeitstudien gut geeignet.

Rohnährstoffe	[%]	Energie	[MJ/kg]
Trockensubstanz	87,7	Bruttoenergie (GE)	16,3
Rohprotein (N x 6,25)	19,0	Umsetzbare Energie (ME) *	12,8
Rohfett	3,3		
Rohfaser	4,9		
Rohasche	6,4		
N-freie Extraktstoffe	54,1		
Stärke	36,5		
Zucker	4,7		



Mineralstoffe	[%]	Aminosäuren	[%]	Vitamine	per kg
Calcium	1,00	Lysin	1,00	Vitamin A	15.000 IE
Phosphor	0,70	Methionin	0,30	Vitamin D ₃	1.000 IE
Natrium	0,24	Met+Cys	0,65	Vitamin E	110 mg
Magnesium	0,22	Threonin	0,68	Vitamin K (als Menadion)	5 mg
Kalium	0,91	Tryptophan	0,25	Thiamin (B ₁)	18 mg
		Arginin	1,14	Riboflavin (B ₂)	23 mg
		Histidin	0,44	Pyridoxin (B ₆)	21 mg
		Valin	0,88	Cobalamin (B ₁₂)	100 µg
		Isoleucin	0,76	Nicotinsäure	135 mg
		Leucin	1,30	Pantothensäure	43 mg
		Phenylalanin	0,85	Folsäure	7 mg
		Phe+Tyr	1,43	Biotin	525 µg
		Glycin	0,80	Cholin-Cl	2.990 mg
		Glutaminsäure	3,90	Inositol	100 mg
		Asparaginsäure	1,61		
		Prolin	1,25		
		Alanin	0,79		
		Serin	0,89		

Futterzusammensetzung

absteigende Reihenfolge der Gruppen (FMV)

Getreide und Getreidenebenprodukte, Ölsaatprodukte, Mineralstoffe, pflanzliche Öle, Vitamine, Spurenelemente.

* ME berechnet nach der Schätzformel für Schweine, Anlage 4 der Futtermittelverordnung

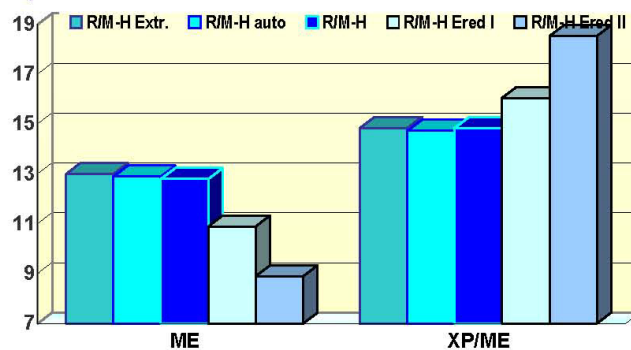
Hauptprodukte

V1530-0 Mehl, einfach vermahlen
V1534-0 10 mm Pellets
V1535-0 15 mm Pellets

Produktion und Vertrieb

ssniff Spezialdiäten GmbH
Phone: +49-(0)2921-9658-0
Fax: +49-(0)2921-9658-40
E-Mail mail@ssniff.de
www.ssniff.de

Energiedichte [MJ ME/kg] und Protein-/Energie-Verhältnis [g XP/MJ ME]



Zusammensetzung 15%-KH-Futter

Product-No.		High Protein 60 kJ% CP S0088-E030
Casein	%	62.500
Brewer's yeast	%	2.000
Corn starch, pre-gelatinized	%	3.800
Sucrose	%	6.000
Cellulose powder	%	7.700
L-Cystine	%	0.200
Vitamin premix	%	1.200
Minerals & trace elem. [Ca def.]	%	6.000
Choline Cl	%	0.600
Soybean oil	%	10.000
Crude protein	%	55.8
Crude fat	%	10.4
Crude fiber	%	7.7
Crude ash	%	5.9
Starch	%	3.9
Sugar	%	7.2
Carbohydrates (CHO) *	%	12.2
Calcium	%	0.97
Phosphorus	%	0.68
Sodium	%	0.22
Magnesium	%	0.27
Lysine	%	4.64
Met+Cys	%	2.68
Threonine	%	2.47
<i>Fatty acids</i>		
C 14:0	%	0.04
C 16:0	%	1.20
C 18:0	%	0.38
C 18:1	%	2.60
C 18:2	%	5.30
C 18:3	%	0.58
ME , Atwater **	MJ/kg	15.6
kJ% Protein		60
kJ% Fat		25
kJ% Carbohydrates		15
* = NfE = N free extracts		
** physiological fuel value		

Beispiel Laborbefund synlab.vet GmbH (Referenzbereich AST und ALT)**synlab.vet • Labor Berlin**

Turmstrasse 21 • 10599 Berlin - Mitte / Tiergarten
 Telefon 030 / 3974 - 3490 • Fax 030 / 3974 - 34999
 berlin@synlab-vet.de

Befundbericht

Charite Centrum 13
 Medizinische Klinik
 Hepatologie/ Gastroenterologie
 Campus Virchow Klinikum
 AG PD Dr. Cramer
 Augustenburger Platz 1/ Forum 4

Tierhalter:	RUDOLPH, INES	13353 Berlin	Tiername / Rasse :	LYS609WT /	Seite: 1 / 1
Tierart:	Maus		Pat.-ID:	24 7922 0001	Entnahme: 04.12.2012
Alter:	< 1 Jahr		Labor-ID:	XN 2493 3061	Eingang: 05.12.2012 13:13 Uh
Geschlecht:	männlich		Ext. ID:		Endbefund: 05.12.2012 15:21 Uh
Anamnese:	Rampun + Ketanest				
Material:	Serum				

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich	Methode
--------------	----------	---------	-----------------	---------

Leberprofil**Leber**

Alkalische Phosphatase		1826	U/l		
AST (GOT)	+	1156	U/l	55 - 124	PHO
ALT (GPT)	+	1376	U/l	28 - 184	PHO
γ-GT		<5	U/l		PHO
GLDH		356.80	U/l		PHO
Bilirubin gesamt		5.20	µmol/l		
Bilirubin direkt		2.90	µmol/l		PHO
Bilirubin indirekt		2.30	µmol/l		RECH

Proteinstoffwechsel

Albumin		29.8	g/l		PHO
Gesamteiweiß		63	g/l	54 - 78	PHO

synlab.vet lädt Sie herzlich ein: 21.11.2012 "Reptilien und Vögel im Visier" eine Fortbildungsveranstaltung in Cottbus für Tierärzte, 23.11.2012 "Wenn das Heimtier nicht frißt" eine Fortbildungsveranstaltung in Berlin für TFA/ Tierärzthelfer, 24.11.2012 "Workshop Labordiagnostik - Heimtiere" ein Workshop in Berlin für Tierärzte - Information und Anmeldung über synlab.vet Berlin, Tel: 030-3974 349 0 oder Mail an berlin@synlab-vet.de

Mit kollegialen Grüßen - validiert durch: Dr. med.vet. Hannes Maier, Geschäftsführung synlab.vet GmbH

Rechnung an: Praxis

Für diesen Befund werden berechnet: 6.00 EUR (netto)

Untersuchung bei synlab.vet: a) Augsburg, k) Leverkusen, h) Hamburg, l) Leipzig, n) Berlin / 1) Untersuchung im Synlab-Verbund / 2) Untersuchung extern / 3) Nicht akkreditiert