

Die Rolle der Nährstoffmangelsensoren AMPK und PGC-1 α bei der Regulation metabolischer Prozesse humaner Glioblastomzellen

Dissertation

zu Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)
an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Ines Bruns
Geb. 16.11.1984 in Wiesbaden

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

„Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifels.“

Richard P. Feynman (1918-1988)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glioblastom	1
1.2	Inzidenz und Klassifizierung	1
1.2.1	Therapieansätze	4
1.2.1.1	Nichtoperative Therapieoptionen	5
1.3	Mutationen - die Entstehung einer Tumorzelle	6
1.3.1	Im Glioblastom vorkommende Mutationen und ihr Einfluss auf die Chemotherapie	7
1.3.2	Aberrationen des <i>epidermal-growth-factor receptor</i> (EGFR)	7
1.3.2.1	Anti-EGFR gerichtete Therapien	8
1.4	Das Tumormilieu (Sauerstoff und Nährstoffversorgung eines Tumors)	10
1.4.1	Der Warburg-Effekt	11
1.4.2	Hypoxie	11
1.4.2.1	<i>Hypoxia-inducible factor-1α</i> (HIF-1 α)	13
1.5	Adaption an Mangelbedingungen	13
1.5.1	Der Nährstoffmangelsensor AMP-aktivierte Kinase (AMPK)	14
1.5.2	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>	16
1.6	Zielsetzung	19
2	Material	20
2.1	Biochemikalien	20
2.1.1	Pufferlösungen und Medien	21
2.2	Antibiotika	23
2.3	Antikörper	23
2.4	Reagenzien	25
2.5	Primer	26

2.6	Plasmide	27
2.7	Kits	27
2.8	Geräte	28
3	Methoden	29
3.1	Zellkultur	29
3.1.1	Etablierte Zelllinien	29
3.1.2	Zellen zählen und aussäen	29
3.1.3	Kultivierung von Primärzellen.....	30
3.1.4	Einfrieren und auftauen von Zellen	31
3.1.5	Kristallviolett-Färbung	31
3.1.6	Caspase-3 Aktivitäts Assay	32
3.1.7	BrdU-Proliferations-Assay.....	32
3.1.8	Migrationsverhalten	32
3.2	Transfektion	33
3.2.1	Züchtung von bakterieller Plasmid-DNA.....	33
3.2.2	Transformation	34
3.2.3	Plasmid-DNA- Midipräparation.....	34
3.2.4	Stabile Transfektion	34
3.2.5	Lentivirale Transfektion	35
3.3	Molekularbiologische Methoden	35
3.3.1	RNA-Isolierung	35
3.3.2	RNA-Bestimmung und cDNA-Synthese.....	35
3.3.3	<i>Real-time</i> PCR.....	36
3.4	Durchflusszytometrie	36
3.4.1	Propidiumiodid (PI)-FACS.....	36
3.4.2	ROS-FACS.....	37
3.4.3	TMRM-FACS	37
3.4.4	EGFR-FACS.....	38

3.4.5	2-NBDG-FACS	38
3.5	Metabolische Analysen	38
3.5.1	Hypoxie	38
3.5.2	Glukosemangel	39
3.5.3	Glukose- und Laktatmessung.....	39
3.5.4	Sauerstoffmessung	39
3.5.5	Bestimmung intrazellulärer Metabolite	39
3.6	Proteindetektion	40
3.6.1	Proteinisolation.....	40
3.6.2	Bradford-Proteinbestimmung.....	40
3.6.3	<i>SDS-Page</i> Gelelektrophorese	41
3.6.4	Westernblot	42
3.7	Tierversuch.....	42
3.8	Statistik	43
4	Ergebnisse	43
4.1	Die Aktivierung der AMPK moduliert die Sensitivität von Gliomzellen gegenüber einer EGFR Inhibition	43
4.1.1	Metabolische Bedingungen beeinflussen den Effekt der EGFR Inhibition	43
4.1.2	EGFR-Inhibition führt zu Caspasen-abhängigem Zelltod	45
4.1.3	EGF-Rezeptor Expression und dessen Signalkaskade	46
4.1.4	Die Aktivierung der AMPK wirkt protektiv gegenüber EGFR-Inhibition	48
4.1.5	<i>Knockdown</i> und Inhibition der AMPK sensitivieren gegenüber EGFR-Inhibition	50
4.2	Der Transkriptions-Co-Aktivatör PGC-1α fördert das charakteristische biologische Verhalten humaner Glioblastomzellen.....	52
4.2.1	Die PGC-1 α Expression ist im Glioblastom mit einer geringeren Überlebensdauer assoziiert	52
4.2.2	<i>Knockdown</i> von PGC-1 α minimiert die Expression mitochondrialer Gene, den Glukoseverbrauch und die ROS-Abwehr	54

4.2.3	Nährstoffdepletion erhöht die ATP-Konzentration von PGC-1 α supprimierten Zellen und verstärkt die Konzentration von Metaboliten des Citratzyklus (CAC) und des Pentose-Phosphat-Wegs (PPP)	59
4.2.4	<i>Knockdown</i> von PGC-1 α attenuiert Schlüsselmerkmale des neoplastischen Phänotyps von Gliomzellen	61
4.2.5	Die Expression von PGC-1 α ist mit Stammzelleigenschaften assoziiert	63
4.2.6	Der Verlust von PGC-1 α fördert die Resistenz gegenüber Hypoxie und ist mit der Runterregulation der EGFR-Expression und -Signaltransduktion verbunden	66
5	Diskussion	70
5.1	Das Nährstoffangebot moduliert die Sensibilität gegenüber EGFR-Inhibition	70
5.1.1	Nährstoffmangel mindert die EGFR-Inhibitor-vermittelte Toxizität	71
5.1.2	AMPK-Aktivierung als limitierender Faktor der EGFR-Inhibitor-vermittelten Zytotoxizität	71
5.2	PGC-1α ist in dem neoplastischen Phänotyp von Gliomen involviert	74
5.2.1	Die biologische Funktion von PGC-1 α in Glioblastomzellen	75
5.2.2	PGC-1 α fördert das migratorische und invasive Potential von Gliomzellen	77
5.2.3	Über die Regulation des EGFR beeinflusst PGC-1 α die Resistenz gegenüber Hypoxie-induzierten Zelltod	79
6	Abbildungsverzeichnis	84
7	Tabellenverzeichnis	85
8	Vektoren	85
9	Abkürzungsverzeichnis	87
9.1	Materialien	88
9.2	Proteine	90
10	Literaturverzeichnis	91
10.1	Online Daten	113
10.2	Bücherverzeichnis:	114
11	Anhang	115

11.1	Publikationen	115
11.2	Poster	115
11.3	Lebenslauf	116
11.4	Eidesstattliche Erklärung.....	117
11.5	Danksagung	118

Zusammenfassung

Das Glioblastom ist eine der aggressivsten Formen von Hirntumoren. Auf molekularer Ebene ist es durch typische Aberrationen gekennzeichnet. Sehr häufig sind dabei Mutationen und Amplifikationen des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) zu finden. Dennoch zeigte sich keine Wirksamkeit von EGFR-Inhibitoren in klinischen Studien. Der Mechanismus, der sich hinter der hohen Resistenz gegenüber dieser tumorbiologisch plausiblen Therapie verbirgt, ist noch weitgehend ungeklärt. Faktoren wie die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, die das Tumormikromilieu beeinflussen, könnten dabei eine wichtige Rolle spielen. Diese Arbeit untersuchte, wie die Verfügbarkeit von Sauerstoff und Glukose die Sensibilität gegenüber EGFR-Inhibition beeinflusst und in wieweit die Mangelsensoren AMP-aktivierte Kinase (AMPK) und *peroxisome-proliferator-activated receptor-coactivator-1 α* (PGC-1 α) in das Tumorstadium und die Entstehung von Resistenzen im Glioblastom involviert sind. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass die Reduktion der Glukoseverfügbarkeit und des Sauerstoffangebots zu einer zellulären Resistenz der Zellen gegenüber einer EGFR-Inhibition führten, während andererseits das Vorkommen hoher Glukosekonzentrationen und die Verfügbarkeit von Sauerstoff die Zellen gegenüber dieser Therapie sensibilisierten. Es stellte sich heraus, dass durch den Nährstoff- und Sauerstoffmangel die Aktivierung der AMPK stimuliert wurde. Es ist bekannt, dass es sich bei dem Glykolyseinhibitor 2-deoxyglucose (2-DG) auch um einen Aktivator der AMPK handelt. Sowohl dieser als auch der direkte AMPK-Aktivator A769662 reduzierten den Glukoseverbrauch, induzierten die Phosphorylierung der AMPK und ahmten den Effekt einer niedrigen Glukoseverfügbarkeit auf die Toxizität von PD153035 nach. In gleicher Weise reduzierte 2-DG die Toxizität von Imatinib in K562 Leukämiezellen. Die Inhibierung der AMPK durch den zellpermeablen AMPK-Inhibitor Compound C oder durch die shRNA-vermittelte Gensuppression verstärkte den EGFR-Inhibitor induzierten Zelltod und revertierte den protektiven Effekt von 2-DG und A769662. Die AMPK-vermittelte Minderung der Zytotoxizität von EGFR-Inhibitoren liefert damit einen möglichen Mechanismus, der zu der geringen Erfolgsrate von EGFR-Inhibitoren in klinischen Studien beitragen könnte. Dies suggeriert, dass der Antagonismus der AMPK-Aktivierung und der AMPK-regulierten metabolischen Veränderungen vielversprechende Ansätze sein können, um die therapeutische Wirksamkeit von EGFR-Inhibitoren zu verbessern. Die Aktivierung der AMPK stellt einen Mechanismus dar, über den die Zellen ihren Metabolismus an Alterationen des Tumormikromilieus adaptieren. Die Anpassung und

Umstellung des Metabolismus an die erfordernde Situation erfolgt auf der Ebene der Genexpression. Die Genexpression vieler Signalwege und metabolischer Programme wird wiederum auf transkriptioneller Ebene durch DNA-bindende Coaktivatoren reguliert. Diese Coaktivatoren agieren Gewebespezifisch und sprechen auf verschiedene Stimuli wie Nährstoffversorgung und Temperatur an. Einer dieser Coaktivatoren ist PGC-1 α . Es handelt sich dabei um einen Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese, der außerdem die anti-oxidative Antwort sowie posttranskriptionelle Ereignisse koordiniert. Gliome sind sehr aggressive und hypoxische Tumore und benötigen variable Nährstoffbedingungen zur Adaption ihres Energiemetabolismus an die jeweilige Bedingung. Daraus resultierte die Fragestellung, ob es sich bei PGC-1 α um einen weiteren wichtigen Faktor handeln könnte, der wie die AMPK in der Regulation der Resistenz gegenüber Nährstoffdepletion, in die metabolische Flexibilität und das Tumorwachstum von Gliomzellen involviert ist. Es konnte gezeigt werden, dass PGC-1 α in manchen etablierten als auch in primären Glioblastomzelllinien exprimiert wird. Die sh-RNA vermittelte Suppression von PGC-1 α in U343MG Zellen führte zur Reduzierung des Glukose- und Sauerstoffverbrauchs, sowie zur Verringerung des Membranpotentials. Außerdem weisen die PGC-1 α sh Zellen ein vermindertes Migrations- und Proliferationspotential in vitro auf. Entsprechend der bereits bekannten Funktion von PGC-1 α in der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), war die RNA-Konzentration von Faktoren, die am ROS-Detoxifizierungsmechanismus beteiligt sind, in PGC-1 α supprimierten Zellen reduziert. Verglichen mit den Kontrollzellen weisen sie außerdem eine erhöhte Sensibilität gegenüber H₂O₂ auf. Interessanterweise verlieh die Suppression von PGC-1 α trotz der erhöhten ROS-Akkumulation den Zellen eine hochgradige Resistenz gegenüber Hypoxie-induzierten Zelltod. Im in vivo Mausmodell wuchsen die Tumore, die sich aus PGC-1 α sh Zellen formierten, dagegen deutlich langsamer als diejenigen, die aus den Kontrollzellen entstanden. Diese Arbeit zeigt außerdem, dass die Expression von PGC-1 α mit der Stammzell-charakteristischen Formation von Zellsphroiden verbunden ist. Diese Daten weisen darauf hin, dass PGC-1 α eine wichtige Funktion in der Regulation der Proliferation, der Tumorformation und der Resistenz gegenüber ROS in diesen Zellen ausübt.

Abstract

Glioblastoma is one of the most aggressive types of brain tumors. At the molecular level, glioblastoma is characterized by typical aberrations. In particular, mutations and amplifications of the epidermal growth factor (EGFR) pathway occur frequently, but the clinical efficacy of EGFR inhibitors in malignant glioma has been disappointing. The reasons for the failure of these inhibitors are unclear but may involve factors of the tumor microenvironment such as limited glucose availability and hypoxia. The focus of this work was to examine how glucose and oxygen influence the response of glioma cells to EGFR inhibition and whether AMP-activated kinase (AMPK) and peroxisome-proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1 α are involved in tumor growth and resistances. Decreased levels of glucose and oxygen led to resistance against the inhibition of the EGFR whereas high glucose amounts and normoxia sensitized glioma cells towards this inhibitor. Low levels of glucose and oxygen stimulated AMPK activity in glioma cells. The inhibitor of glycolysis, 2-deoxyglucose (2-DG) and the AMPK activator A769662 reduced glucose consumption, induced phosphorylation of AMPK and mimicked the effects of low glucose availability on the toxicity of PD153035. It is known that 2-deoxyglucose (2-DG), an inhibitor of glycolysis, also functions as an AMPK activator. 2-DG as well as the direct AMPK activator A769662 reduced glucose consumption, induced phosphorylation of AMPK and mimicked the effect of low glucose availability. Similarly, 2-DG reduced the toxicity of imatinib in K562 leukemia cells. In line with these findings, inhibition of AMPK by compound C or by short-hairpin (sh)-mediated gene suppression increased cell death induced by the EGFR inhibitor and reverted the protective effects of 2-DG and A769662. In summary, cytotoxicity of EGFR inhibition can be diminished by AMPK activation in glioma cells. This mechanism may provide one explanation for the low activity of EGFR inhibitors in clinical trials and suggest antagonism of AMPK or of AMPK-regulated metabolic alterations as a promising approach to enhance their therapeutic efficacy. Activation of AMPK constitutes one mechanism used by tumor cells to adapt their metabolism against alterations of tumor microenvironment. The adaption and rearrangement of cell metabolism against the necessitating situation is regulated at the level of gene expression. Gene expression of many signaling pathways and metabolic programs itself is regulated at the transcriptional level by DNA binding coactivators. These coactivators act in a tissue-specific-manner and are responsive to different physiological stimuli like nutrient supply and temperature.

One of these coactivators is Peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator (PGC)-1 α . It is a master regulator of mitochondrial biogenesis which controls anti-oxidative responses and coordinates posttranscriptional events. Gliomas are very aggressive and hypoxic tumors and require variable nutritional environments to adapt their energy metabolism. We assessed if PGC-1 α is also involved in resistance against nutrient depletion, metabolic flexibility and cell growth of glioma cells besides AMPK and found PGC-1 α expression in a subset of established and primary glioma cells. Suppression of PGC-1 α expression by sh-RNA in U343MG glioma cells reduced glucose consumption and lactate production, as well as oxygen consumption and mitochondrial membrane potential. PGC-1 α -sh cells had impaired proliferation and migration in vitro. Compatible to the known PGC-1 α functions in reactive oxygen species (ROS) metabolism, glioma cells lacking PGC-1 α expression had reduced mRNA levels of factors involved in ROS detoxification mechanism, and these cells were more susceptible to death induction by H₂O₂ compared to control cells. Interestingly, the PGC-1 α -knockdown conferred protection against hypoxia-induced cell death despite increased ROS accumulation. On the other hand, in an in vivo xenograft experiment, tumors formed by PGC-1 α -suppressed glioma cells grew much slower than control tumors. It was also found that expression of PGC-1 α is linked to stem cell characteristic sphere formation. Altogether, these data indicate that PGC-1 α has an important function in the regulation of cell proliferation, tumor formation and resistance against ROS in glioma cells.

1 Einleitung

1.1 Glioblastom

Für das Glioblastom wurde früher der Begriff „Glioblastoma multiforme“ verwendet. Er leitete sich ursprünglich von der pleomorphen Natur des Glioblastoms ab. Dies zeigt sich auf histologischer Ebene durch Abnormalitäten der Zellkerne, mitotische Aktivitäten, vaskuläre Proliferation und Nekrosen (1). Auch auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene wird das Glioblastom durch seine ausgeprägte Heterogenität charakterisiert (2). Ein weiteres Charakteristikum von Glioblastomen ist außerdem die Bildung von stark hypoxischen Arealen, die nach einer anti-angiogenen Therapie in noch größerem Ausmaß vorhanden sind (3). Durch Hypoxie wird das Wachstum und der angiogene Phänotyp von Gliomzellen beeinflusst und Migration und Invasion induziert (4-6). Glioblastome können sich auf zwei unterschiedliche Art und Weisen entwickeln. Bei älteren Patienten entstehen sie überwiegend *de novo*, aus normalen Gliazellen oder ihren Vorläufern. Diese Tumore werden primäre Glioblastome genannt und besitzen histologisch keine Anzeichen einer vorhergehenden niedermalignen Läsion (7). Im Kontrast dazu stehen die sekundären Glioblastome, die sich aus histologisch diagnostizierten niedrig-gradigen Gliomen im Zuge der malignen Progression entwickeln. Laut der aktuellen WHO-Klassifikation gibt der Isocitratdehydrogenase (IDH)-Mutationsstatus Auskunft über ein primäres oder sekundäres Glioblastom, wobei die meisten Glioblastome primären Ursprungs sind (8,9). Häufige Symptome eines Glioblastoms sind, vor allem zu Beginn der Erkrankung, auftretende epileptische Anfälle oder Kopfschmerzen die durch Liquorzirkulationsstörungen und die damit verbundene Steigerung des intrakraniellen Drucks oder durch Tumordinfiltration von schmerzempfindlichen Strukturen (Meningiome, Hirnnerven) entstehen können (Sitzer M., Steinmetz H., Lehrbuch Neurologie).

1.2 Inzidenz und Klassifizierung

Gliome mit astrozytischem, oligodendroglialem oder ependymalem Ursprung machen 70 % aller Hirntumore aus. Das Glioblastom ist bei Erwachsenen der am häufigsten (65 %) auftretende hirneigene Tumor. Die mediane Überlebenszeit der Patienten beträgt

populationsbasiert immer noch unter einem Jahr. Damit gehört das Glioblastom es zu den bösartigsten Tumoren überhaupt (10,11). Der Altersgipfel der Patienten bei der Diagnosestellung liegt in einem Alter von 50-60 Jahren (12). Unbehandelt beträgt die mediane Überlebenszeit der Patienten nur 3 Monate (13). Weniger als 3 % der Glioblastom-Patienten überleben ab dem Tag der Diagnosestellung weitere fünf Jahre. Das Glioblastom ist bei primären Hirntumoren der am zweithäufigsten und bei malignen Hirntumoren der am häufigsten auftretende Tumor (Abb. 1, Abb. 2). Gliome werden durch die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation = WHO) nach ihrer wahrscheinlichsten Ursprungszelle klassifiziert und weisen histologisch und immunhistochemisch eine gliale Differenzierung auf. Sie metastasieren sehr selten außerhalb des zentralen Nervensystems und breiten sich primär unifokal aus. Damit unterscheiden sie sich deutlich von soliden Tumoren. Aus diesem Grund ist die Tumorgradierung im Falle eines Glioms von entscheidender Bedeutung. Die Tumore werden anhand histologischer Kriterien nach ihrem Malignitätsgrad in eine Skala von I-IV eingeteilt. Niedergradige, benigne Tumore (Grad-I) sind mit einer guten Prognose assoziiert. Durch die chirurgische Entfernung des Tumors kann der Patient in der Regel geheilt werden. Als niedrig-maligne Tumore werden die Grad-II Tumore bezeichnet. Diese Tumore können bereits ein invasives Wachstumsverhalten aufweisen. Über die Hälfte dieser Tumore entwickeln sich, wenn auch erst nach Jahren, zu hoch-malignen Grad-III und -IV Tumoren (9,14,15).

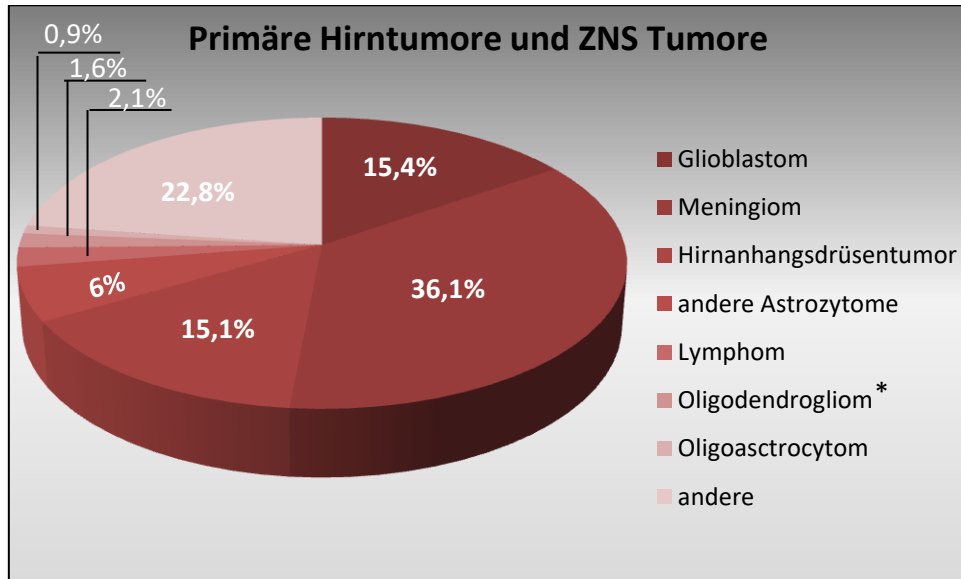


Abb. 1 Statistikanalyse von allen primären Hirntumoren durch CBTRUS (modifiziert nach Ostrom et. al 2014)
Die ermittelten Daten zeigen, dass neben den Meningiomen, das Glioblastom der zweithäufigste Hirntumor ist (oben)(16).

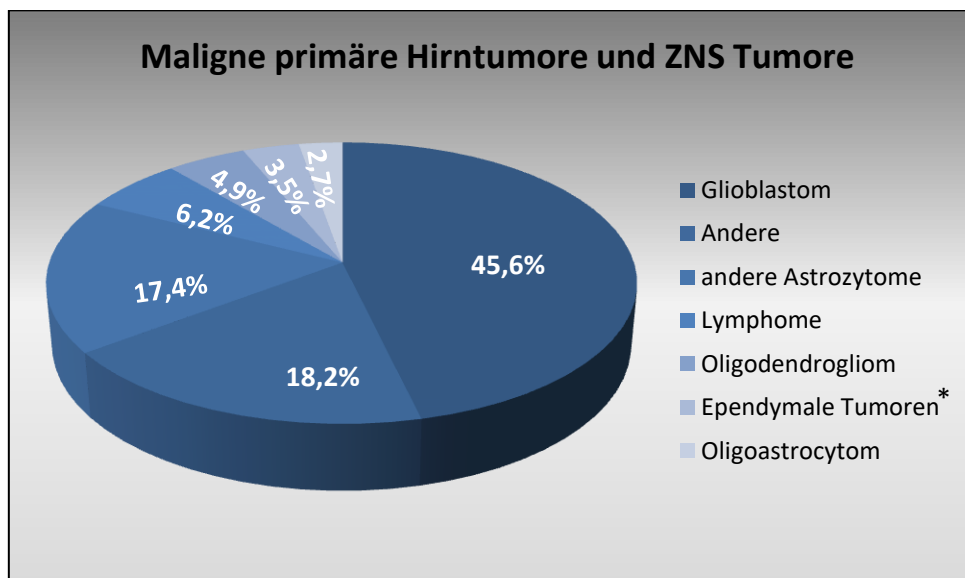


Abb. 2 Statistikanalyse der malignen Hirntumoren durch CBTRUS (modifiziert nach Ostrom et al. 2014)
Bei malignen Hirn- und ZNS-Tumoren ist das Glioblastom der am häufigsten vorkommende Tumor (16).

In der neuesten WHO Klassifikation von 2016 wurden im Gegensatz zu der aus 2007 zu den histologischen auch molekularbiologische Parameter hinzugezogen (9). In der Biomarkerbasierten Klassifikation werden die Gliome anhand verschiedener Mutationen unterteilt. Zunächst wird zwischen Isocitrat Dehydrogenase (IDH)1/2-Mutation und IDH1/2-Wildtyp unterschieden, woraufhin die IDH mutierten weiter in oligodendrogliale oder astrozytäre

Tumore unterteilt werden (siehe Abschnitt 1.3.1) (11,17). Innerhalb dieser beiden Subtypen werden die Tumore nochmals anhand verschiedener Mutationen/Codeletionen unterschieden. Wie in Abbildung 3 dargestellt, gibt das Mutationsmuster Auskunft über die voraussichtliche Prognose.

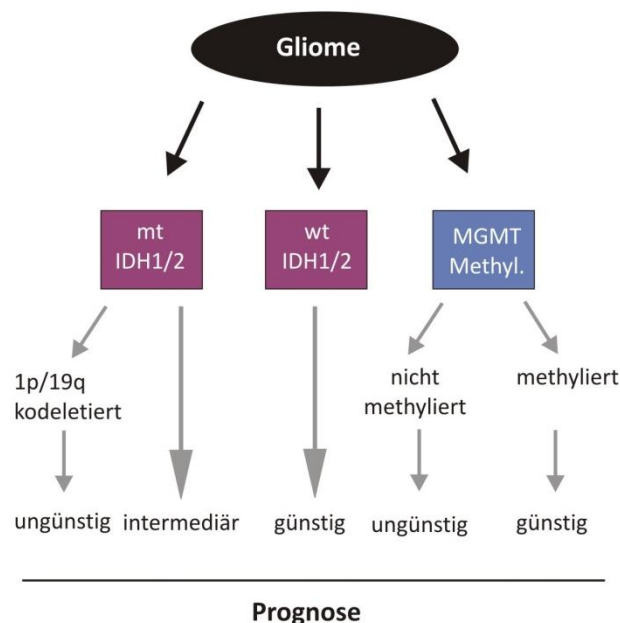


Abb. 3 Schematische Darstellung der molekularen Stratifizierung diffuser Gliome

Die IDH- und MGMT-Stati der Gliompatienten geben Auskunft über die voraussichtliche Prognose.

1.2.1 Therapieansätze

Trotz multimodaler Therapien, die Resektion, Radiotherapie und Chemotherapie mit einbeziehen, ist die Erkrankung an einem Glioblastom mit einer schlechten Prognose assoziiert (18). Mit Ausschlag gebend für die Widerstandsfähigkeit gegenüber derzeitigen konventionellen Therapie-Ansätzen sind das infiltrative Wachstumsverhalten, die ausgeprägte Heterogenität sowie die Ausbildung von zell-intrinsischen Resistenzmechanismen (19,20). Die derzeitige Therapie besteht in erster Linie aus der operativen Resektion der Tumorregion gefolgt von Radiotherapie mit simultaner oder adjuvanter Chemotherapie (13,21-23). Da es oft nicht möglich ist den gesamten Tumor zu entfernen, ohne dabei wichtige Hirnregionen zu zerstören, kommt es häufig zur Progression des Tumors. Bei Tumorprogression besitzen die Patienten eine Überlebenszeit von nur wenigen Monaten (24). Durch die postoperative Strahlentherapie ist es jedoch möglich die

mediane Überlebenszeit der Patienten zu verdoppeln und die progressionsfreie Überlebenszeit zu verlängern (1,25,26).

1.2.1.1 Nichtoperative Therapieoptionen

Bei der Radiotherapie ist eine optimale, konformierende Dosisbelastung im Bereich der erweiterten Primärtumorregion wichtig, ohne ein Überschreiten der Toleranzdosen in dem umgebenden Normalgewebe. Die Zielvolumendefinition und die Angaben zur Dosispezifikation erfolgen nach den vorgegebenen Richtlinien der ICRU (International Commission on Radiation Units) (27,28). Die Chemotherapie eines Glioblastoms besteht hauptsächlich aus der Gabe von Temozolomid (TMZ) (29). Das aus den 80er Jahren stammende Temozolomid ist eine alkylierende Substanz, die Methylgruppen an die Purin Basen der DNA anhängt (30). Präklinische Studien zeigten das Temozolomid ein breites anti-Tumor Spektrum besitzt und sich in alle Gewebe, inklusive des ZNS, ausbreiten kann. Daher kann es seine antitumor Aktivität gegen verschiedene schwer therapierbare Tumorarten einsetzen (31,32). Es weist weiterhin eine verhältnismäßig geringe Toxizität auf (31,33,34). Einige Faktoren erschweren jedoch die Chemotherapie. Dazu zählt neben diversen Tumoreigenschaften wie das invasive Zellwachstum und genetische Mutationen auch die Existenz der Bluthirnschranke. Normalerweise schützt sie das Gehirn vor Infektionen, doch diese Schutzbarriere erschwert auch das passieren von Zytostatika (35). Vor dem Einsatz von Temozolomid in der Tumorthherapie wurden bereits alkylierende Substanzen verabreicht, da diese aufgrund ihrer lipophilen Solubilität leicht die Blut-Hirn-Schranke überqueren können. Die Glioblastomzellen zeigten sich jedoch relativ resistent gegenüber diesen Substanzen (36). Bei der Therapie von Glioblastom-Patienten ist, neben den üblichen Behandlungsmethoden, auch die supportive Therapie sehr wichtig. Die Patienten leiden häufig unter epileptischen Anfällen, die eine große Beeinträchtigung der Lebensqualität zur Folge haben. Den Patienten werden in diesem Fall Antikonvulsiva verabreicht, die jedoch die Wirksamkeit von Antitumorthérapien beeinträchtigen können (37). Daher spielt die Wahl des richtigen Antikonvulsivas eine wichtige Rolle bei der Therapie. Weiterhin leiden die Patienten sehr häufig unter einem vasogenen Hirnödem, das mit Steroidpräparaten gelindert werden kann (38).

1.3 Mutationen - die Entstehung einer Tumorzelle

Bei der Entwicklung einer Tumorzelle handelt es sich um einen Prozess der aus mehreren Schritten besteht. Dabei wirken epigenetische Veränderungen bei der Tumorentstehung mit, hauptsächlich sind jedoch genetische Veränderungen dafür verantwortlich.

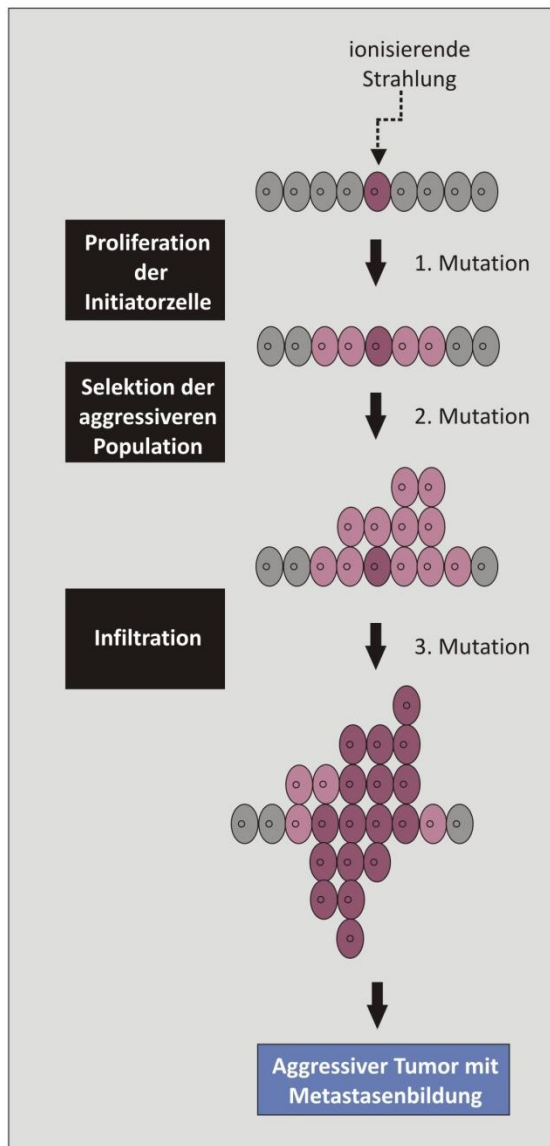


Abb. 4 Schematische Darstellung der Entwicklung einer Tumorzelle

Die Entartung einer Zelle hängt von verschiedenen Faktoren ab, u.a. sind mehrere Mutationen notwendig bis eine Zelle unkontrolliert proliferiert

Eine in einer einzelnen Zelle durch karzinogene Substanzen, ionisierende Strahlung oder Viren hervorgerufene Mutation kann zu einer Anomalie der Zelle und damit zur Tumorentstehung führen (39-41). Damit ein maligner Tumor mit entartetem Wachstum entsteht, sind jedoch Mehrfachmutationen notwendig. Aus einer anomalen Zelle bildet sich eine Population, die aus Zellklonen der initiiierenden Zelle besteht und die Aberration geerbt hat. Innerhalb dieser Population kommt es zu weiteren Mutationen, die den Zellen einen Überlebens- und Wachstumsvorteil bringen. Diese Zellen dominieren die Population, was zur Selektion führt. Normalerweise würde eine Zelle bei einer Selektionshürde, wie beispielsweise eine geringere Nährstoffkonzentration, nicht weiter proliferieren. In der Tumorphilosophie ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass eine Zelle dabei ist, die durch Mutation dazu befähigt wurde, diese Hürde zu überwinden. Auch die normalerweise vorhandene Zell-Zell-

Kontaktinhibition ist bei den entarteten Zellen durch genetische Veränderung nicht mehr vorhanden (42). Im Lauf der Tumorentwicklung führt diese klonale Selektion dazu, dass der Tumor an Wachstum und Aggressivität weiter zunimmt, bis er zuletzt die Fähigkeit besitzt

umliegendes Gewebe zu infiltrieren und sich über das Lymphsystem und die Blutgefäße weiter zu verbreiten (Alberts J. 4. Auflage 2004, Coopers GM. 2. Auflage 2000).

1.3.1 Im Glioblastom vorkommende Mutationen und ihr Einfluss auf die Chemotherapie

Ein häufig mutiertes Enzym ist die IDH1. Die IDH Enzyme katalysieren die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat im Citratzyklus. In einer Studie von 2009 wurden somatische Mutationen im Codon 132 von IDH1 in über 70 % von Grad II und Grad III Astrozytomen und Oligodendrogliomen, sowie in 12 % der Glioblastome gefunden (43). In Patienten die keine IDH1 Mutation besaßen, konnten seltener Mutationen (z.B. T172) im IDH2 Gen gefunden werden. Patienten mit einer IDH1 oder IDH2 Mutation besitzen ähnliche genetische und klinische Charakteristika und eine bessere Prognose im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp IDH (44). Sie besitzen ein medianes Überleben von 31 Monaten, während es ohne Mutation nur 15 Monate beträgt (43,45). Die IDH-Mutation ist damit ein signifikanter Marker für eine positive Prognose und Chemosensitivität in niedergradigen Gliomen (44,46-48). Ein weiterer prognostisch günstiger Faktor ist die Methylierung oder Suppression des O-6-Methylguanin DNA Methyltransferase-(MGMT)-Promotors, wodurch die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber Temozolomid verstärkt wird (49-51). Da es sich bei TMZ um eine alkylierende Substanz handelt und dessen Wirkung durch eine aktive MGMT aufgehoben werden kann, profitieren Patienten von einer MGMT-Promotormethylierung wenn sie mit TMZ behandelt werden (52).

1.3.2 Aberrationen des *epidermal-growth-factor receptor* (EGFR)

Einige Tumorarten besitzen charakteristische Mutationen, die sie vor Zell-autonomen anti-apoptotischen Mechanismen und Therapien schützen. Beim Glioblastom wird diese Eigenschaft partiell durch den EGF-Rezeptor vermittelt. Dieser wird sehr häufig überexprimiert oder liegt mutiert vor (53). Die Expression des EGFR korreliert signifikant mit einer schlechten Überlebensrate der Patienten (54). Die dabei primär vorherrschende Mutationsform ist die so genannte EGFR-Variante III (EGFRvIII). Über 50 % der Glioblastome, die eine EGFR-Gen Amplifikation aufweisen, überexprimieren diese Mutante (55,56). Der EGFRvIII besitzt eine „in-frame“ Deletion der Exons 2-7 der mRNA wodurch die Ligandenbindedomäne auf der extrazellulären Seite deletiert wird und eine konstitutive

Signalaktivität entsteht. Während andere EGFR Aberrationen ein relativ frühes Ereignis darstellen, tritt die EGFRvIII Mutation relativ spät in der Glioblastom-Entwicklung auf (19,57). Zusätzlich handelt es sich dabei um ein sehr heterogenes Ereignis innerhalb des Tumors. Die EGFRvIII Mutante fördert über die Tyrosinkinase c-SRC (Akronym aus *sarcoma* und *cellular*) Protein die *vascular endothelial growth factor* (VEGF) Sekretion und damit das angiogene Tumorwachstum (57). In *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) negativen Glioblastomzellen zeigte eine Kombination aus einem anti-EGFRvIII Antikörper (CH12) in Kombination mit dem *mammalian target of rapamycin* (mTOR) Inhibitor Rapamycin einen synergistischen Effekt auf die Suppression der Angiogenese und die Apoptose (58). Das primäre Glioblastom wird in bis zu 60 % der Fälle durch die Überexpression und Mutation des EGFR charakterisiert (59). Die Aktivierung dieses Rezeptors induziert vermehrt Signale, welche in einer erhöhten Produktion von Proteinen resultieren, die die Proliferation antreiben, die zelluläre Adhäsion modulieren, die Tumormotilität, Invasivität und die Angiogenese steigern (Abb. 5) (57,60). Weiterhin wird die Ansprechrate auf die durch Chemotherapie und Radiotherapie induzierte Apoptose unterdrückt (61). Die zielgerichtete Therapie gegen den EGF-Rezeptor könnte demnach eine viel versprechende Behandlungsmöglichkeit darstellen, allerdings sind die klinischen Ergebnisse mit EGFR-Inhibitoren bisher enttäuschend (62-64). Die Gründe für das Fehlschlagen sind bisher nicht ausreichend verstanden. Einige mögliche Faktoren werden in Kapitel 1.3.2.1 beschrieben. Es konnte bereits in verschiedenen Tumorentitäten gezeigt werden, dass das hypoxische Tumormilieu die Entstehung von Metastasen und Tumorrezidive fördert (65-67). Daher könnte das Tumormikromilieu, welches durch Areale von Nährstoff- und Sauerstoffdeprivation gekennzeichnet ist, eine wichtige Rolle bei der Effizienz von EGFR-Inhibitoren spielen (68).

1.3.2.1 Anti-EGFR gerichtete Therapien

Bei einer gegen den EGFR gerichteten Therapie handelt es sich um zielgerichtete („targeted“) Therapien. Bei dieser Therapie werden Tyrosinkinaseinhibitoren oder monoklonale Antikörper eingesetzt, die an bestimmte Zielmoleküle binden und damit zu einer Blockierung der Signalwege führen. Mit dieser Therapie ist es möglich in bestimmte Signalwege spezifisch einzugreifen, um sie damit zu blockieren oder auszuschalten und so

das Tumor-charakteristische Verhalten zu unterbinden (69). Bis jetzt konnte noch keine erfolgreiche Therapie des Glioblastoms mit EGFR-Inhibitoren erreicht werden. Vermutlich gibt es mehrere Faktoren, die die anti-EGFR-Therapie beeinflussen. Zum einen spielt eine ausreichende Inhibition des Rezeptors eine Rolle, sowie die Aktivierung von Resistenzmechanismen und auch die Heterogenität des Glioblastoms (70). Veränderungen im EGFR werden außerdem häufig von Alterationen in anderen Tyrosinkinase begleitet (71). Die gegenseitige Beeinflussung der Signalwege ermöglicht der Zelle der EGFR-Inhibitor-Therapie zu entgehen. Daher muss nicht nur die Effektivität der direkten EGFR-Inhibitor-Therapie, sondern auch mögliche Kombinationstherapien entwickelt werden. Da neben dem EGFR-Signalweg häufig noch weitere Signalwege im GBM-Patienten mutiert sind, sollte die Therapie an die genetische Alteration des Patienten angepasst sein (72). Ein weiterer Punkt der eine Rolle bei der Ansprechrate gegenüber EGFR-Inhibitoren spielt, ist die konformative Voraussetzung des mutierten EGFR. Die schlechte Ansprechrate von Glioblastomen auf EGFR-Inhibitoren im Vergleich zu Lungenkarzinomen wird beispielsweise damit erklärt, dass im Lungenkarzinom die Kinasedomäne und nicht wie beim Glioblastom die extrazelluläre Bindedomäne mutiert ist. Zielstelle von EGFR-Inhibitoren der ersten Generation (Erlotinib, Gefitinib, Lapatinib) ist jedoch die aktive Kinasedomäne (73). Resistenzen können auch über die Temozolomid-vermittelte Produktion von EGF zur autokrinen Stimulation des EGFR führen und dabei die Expression von multi-drug-resistant (MDR) Proteinen induzieren (74). Aus diesen Gründen finden die zielgerichteten Therapien im Glioblastom derzeit noch wenig Anwendung. In den meisten Fällen wird Lomustin (Alkylanz) bei Tumorprogression verabreicht, in manchen Ländern wird auch Bevacizumab (monoklonaler Antikörper der die Angiogenese inhibiert) eingesetzt (75-77).

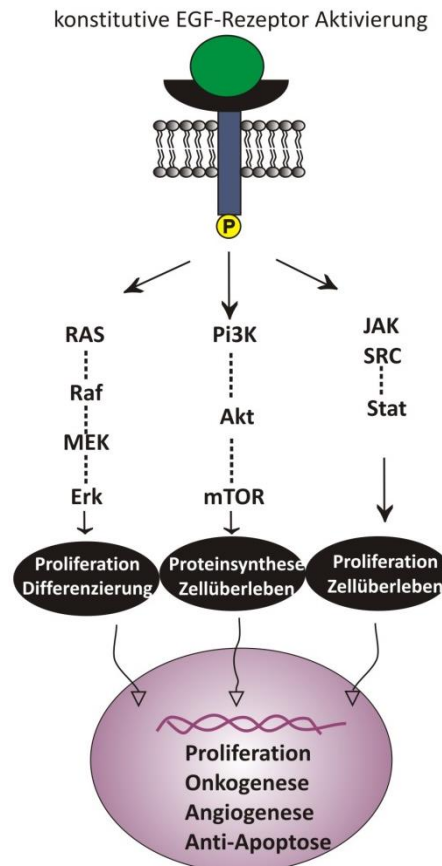


Abb. 5 Hauptsignalwege die durch die Aktivierung des EGFR reguliert werden (60)

Der multiple Einfluss von EGFR auf das Zellverhalten macht deutlich wie eine bspw. durch somatische Mutationen ausgelöste konstante Aktivierung des EGFR zur unkontrollierten Zellteilung und damit onkogenen Transformation führen kann.

1.4 Das Tumormilieu (Sauerstoff und Nährstoffversorgung eines Tumors)

Unter dem metabolischen Mikromilieu versteht man die Tumordurchblutung, die Mikrozirkulation, die Sauerstoff- und Substratversorgung, die pH-Verteilung sowie den bioenergetischen Status. Sie stehen in enger Verbindung zueinander und haben enormen Einfluss auf das Ansprechen eines Tumors auf verschiedene nicht-operative Therapien und stellen zentrale Selektionsfaktoren für die Tumorevolution dar (78). Chemo- und Radiotherapien können ebenfalls *per se* das Tumormilieu beeinflussen, wodurch das Ansprechen des Tumors auf die entsprechende Therapie verstärkt werden kann, es jedoch auch zur Bildung von Resistenzen kommen kann (79). Das Tumormilieu übt einen wichtigen Einfluss auf die Biologie der Zelle aus. Die Untersuchung des Einflusses des Tumormilieus auf das onkogene Verhalten der Zellen und derzeitige Therapien könnte daher einen wichtigen Beitrag zu der Entwicklung neuer Antitumorthérapien leisten.

1.4.1 Der Warburg-Effekt

Otto Warburg and 1927 heraus, dass proliferierende Tumorzellen in der Präsenz von Sauerstoff eine erhöhte Glukoseaufnahme und einen erhöhten glykolytischen Flux besitzen (80,81). Das durch die Glykolyse gebildete Pyruvat wird fermentiert, anstatt in den Mitochondrien durch Oxidation verstoffwechselt zu werden. Mit der oxidativen Phosphorylierung ist die ATP Ausbeute jedoch deutlich höher als mit der Glykolyse. Dementsprechend müssen proliferierende Zellen den Glukoseflux steigern, um dennoch ausreichend ATP zu generieren. Warburg postulierte, dass dieses Phänomen auf defekten Mitochondrien beruht, allerdings weiß man heute, dass der Sauerstoffkonsum von Tumorzellen ähnlich dem von normalen Gewebe ist und das Defekte in den Mitochondrien eher selten vorkommen (82,83). Welche Selektionsvorteile den Tumorzellen durch die Aktivierung der aeroben Glykolyse betreiben, wird viel debattiert. Möglicherweise haben die Tumorzellen durch den erhöhten Glukoseflux den Vorteil, dass schneller ATP zur Verfügung steht. Außerdem werden auf diesem Weg wichtige Bausteine für Proteine, Nukleinsäuren und Reduktionsäquivalente zur Verfügung gestellt, die wiederum in andere Stoffwechselwege einfließen (81). Auf diesem Weg wird nicht nur die Proliferation selbst voran getrieben, sondern auch die damit einhergehende erhöhte Nachfrage an Zwischenprodukten für verschiedene Biosyntheseabläufe (84). Zellen mit aktiver aerober Glykolyse sind darüber hinaus besser auf hypoxische Konditionen vorbereitet.

1.4.2 Hypoxie

Unter dem Begriff „Hypoxie“ versteht man eine Minderversorgung an Sauerstoff. Die völlige Abwesenheit von Sauerstoff wird dagegen als „Anoxie“ bezeichnet. In Geweben und im Blut bezieht sich das Maß der Hypoxie auf einen reduzierten Sauerstoffpartialdruck (pO_2). Während gesundes Gewebe einen pO_2 von 25 bis 60 mm Hg aufweist, findet sich in hypoxischen Tumorarealen ein pO_2 von unter 5, bis unter 2,5 mm Hg. Im gesunden Zustand erfolgt die Ausbildung von normalem Gewebe proportional zu der vorhandenen Blutversorgung wodurch eine ausreichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff gewährleistet wird (85,86). Obwohl deregulierte Tumorzellen neue Blutgefäße bilden und vorhandene inkorporieren, sind sie nur noch ineffizient mit dem Blutgefäßnetzwerk verbunden. Die Konsequenz davon ist, dass der Ressourcenbedarf der dereguliert

proliferierenden Zellpopulation nicht mehr abgedeckt werden kann (79). Es kommt zu einer Mangelversorgung mit Sauerstoff, zu intrazellulärer Hypoxie sowie zur Apoptose und Nekrose (siehe Abb. 6). Die hypoxischen Areale können dabei innerhalb eines Tumors unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Das Sauerstoffmilieu des Tumors reicht daher von moderater über starke Hypoxie bis hin zu Anoxie (86). Hypoxie entsteht zudem nicht nur durch eine höhere Distanz zu Blutgefäßen, sondern auch durch die abnormale Neubildung von Blutgefäßen. Dies führt zu einer diskontinuierlichen Hypoxie („cycling hypoxia“) (87). Dieses Mikromilieu ist spezifisch für Tumorzellen und nicht vergleichbar mit dem von normalem Gewebe. Hypoxische Areale sind bereits vor Beginn einer Therapie in Gliomen zu finden und nehmen durch anti-angiogene Therapien zu (3). Durch den Sauerstoffmangel werden auch Zelltod-resistente Klone selektioniert. Man nimmt an, dass dies auch Resistenzbildung gegen Strahlen- und Chemotherapie fördert (88). Außerdem werden durch Hypoxie verschiedene Signalwege angeschaltet, die das Überleben fördern (68).

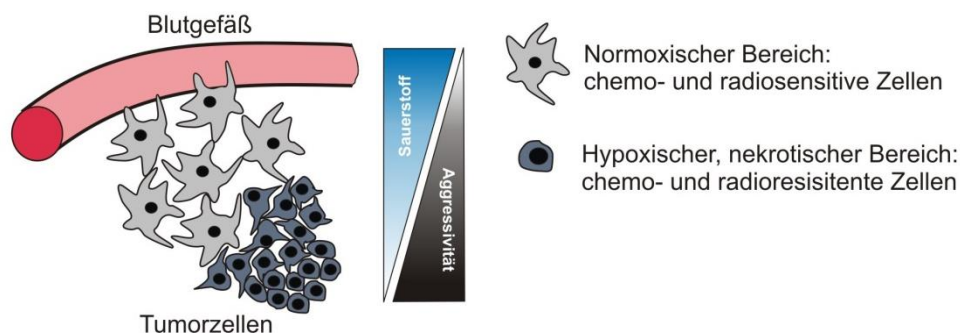


Abb. 6 Schematische Darstellung der Sauerstoffversorgung eines Tumors (modifiziert nach www.cascadeprodrug.com)

Tumorzellen, die sich in der Peripherie des Tumors befinden, werden durch die sie umgebenden Blutgefäße besser mit Sauerstoff versorgt als Zellen, die sich im Inneren des Tumors befinden. Dort entstehen ein hypoxisches Mikromilieu in dessen Folge sich sehr resistente Zellen entwickeln, sowie nekrotische Bereiche.

Durch die Hypoxie wird die biologische Aggressivität auch in Form von Invasivität und Metastasierung verstärkt. Ein weiteres Phänomen ist die Induktion der Expression von MDR's (multi drug resistance protein) und p-Glykoproteinen in hypoxischen Arealen [18]. Spezifisch bei Glioblastomzellen zeigte eine Arbeit von Ling-Chen die Entwicklung von Chemoresistenz gegenüber TMZ mit simultanen anti-apoptotischen Effekten durch „cycling hypoxia“(89).

1.4.2.1 *Hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α)

Das am besten charakterisierte Hypoxie-induzierte Protein ist HIF-1. Es besteht aus den beiden Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β . Auf transkriptioneller Ebene werden beide Untereinheiten unabhängig vom Sauerstoffgehalt konstitutiv exprimiert. Es gibt jedoch zwei Mechanismen, die die α -Untereinheit unter normoxischen Bedingungen posttranskriptionell durch Hydroxylierung inaktivieren (90). Die Hydroxylierung von Prolin führt dabei zur Bindung des von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-Proteins (pVHL), welches die α -Untereinheit damit für den proteasomalen Abbau markiert (91,92). Bei dem zweiten Mechanismus wird durch Hydroxylierung von Asparagin die Interaktion zwischen HIF-1 α und dem nuklearen Coaktivator CBP/p300 inhibiert. Durch Hypoxie werden diese Mechanismen (unterhalb 1-2 % O₂) inhibiert. Dann kann HIF-1 α in den Zellkern gelangen und einen Komplex mit HIF-1 β und dem CBP/p300 coaktivator bilden (93,94). Der Komplex aktiviert die DNA-Promotorregion HRE (hypoxia response element) und führt zur Induktion der Transkription einer Vielzahl von Genen die zur Adaption der Zelle an die vorhandene Mangelsituation notwendig sind (95,96). Einige Tumorarten regulieren HIF-1 α hoch, was die Aggressivität des Tumors durch steigende Invasivität und Therapieresistenz verstärkt (97-100).

1.5 Adaption an Mangelbedingungen

Unter dem Begriff „Mangelbedingung“ können verschiedene Faktoren fallen, die der Zelle das Überleben erschweren und die Umstellung des Metabolismus erfordern. Neben der Hypoxie führen auch ein reduziertes Nährstoffangebot und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezien (*reactive oxygen species*, ROS) zu einer Stresssituation in der Zelle. Die Zelle stellt unter Mangel- bzw Stressbedingungen ihren Stoffwechsel so um, dass sie Vorgänge mit einem hohen Energiebedarf minimiert und dafür energieliefernde Prozesse stärker aktiviert. Dazu werden verschiedene Proteine aktiviert, die eine Kaskade von Signalen auslösen und an deren Ende die Adaption der Zelle an die jeweilige Bedingung steht. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf zwei Proteinen, die unter Stressbedingungen aktiviert werden und die sich in ihre Aktivität gegenseitig begünstigen. Diese Proteine werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

1.5.1 Der Nährstoffmangelsensor AMP-aktivierte Kinase (AMPK)

Bei der AMPK handelt es sich um eine hochkonservierte Serin/Threonin Kinase die aus einem heterotrimeren Komplex (α -, β - und γ -Untereinheit (UE)) besteht. Die α 1- und α 2-Untereinheiten bilden die katalytische Domäne des Enzyms, während die β 1- und β 2-Untereinheiten das Gerüst bilden und die γ 1- γ 3-UE als regulatorischen Teil dienen (101,102). Da jede der α -, β - und γ -UE einen Komplex bilden kann, gibt es verschiedene Isoformen der AMPK. Verschiedene Splice-Varianten und alternative Promotoren tragen weiterhin zu der Vielzahl an Komplexen bei.

Die Aktivierung der AMPK erfolgt über die Phosphorylierung eines Threonin (Thr)-Restes (Thr172) innerhalb der α -UE der AMPK. Zur Phosphorylierung dieser Stelle kommt es durch die *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2* (CaMKK2), welche durch die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel aktiviert wird (103,104), oder durch Bindung von Adenosin-Monophosphat (AMP) an die AMPK. Letzteres wird nun nochmal im Detail erläutert.

Die AMPK ist ein Enzym welches durch die AMP:ATP Ratio reguliert wird (107). Diese Ratio wird durch Stress Stimuli bestimmt, wodurch die AMPK ihre Funktion als zellulärer Energiemangel- und Stresssensor erhält (102,108). Auslöser für die Aktivierung der AMPK sind beispielsweise oxidativer Stress und Hypoxie, sowie allgemeiner Nährstoffmangel (niedrige Glukoseverfügbarkeit) und Toxine, die die mitochondriale Atmung blockieren (109). Die durch Stress ausgelöste Depletion der ATP-Konzentration und die damit verbundene Erhöhung der AMP-Konzentration führen zur Bindung von AMP an die γ -Untereinheit der AMPK und damit zu deren Aktivierung (110). Die Bindung von AMP fördert die Aktivierung der AMPK über drei Wege. Zum einen wird die Phosphorylierung der AMPK (an Thr172) durch die konstitutiv aktive *liver kinase B1* (LKB1) gefördert (105). Weiterhin kann die Dephosphorylierung durch Phosphatasen inhibiert werden. Als letzte Möglichkeit fördert die Bindung von AMP die Aktivität bereits an Thr172 phosphorylierter AMPK und damit zur allosterischen Aktivierung. Die Bindung von ADP (durch Erhöhung der ADP:ATP Ratio) kann den Effekt der Bindung von AMP, bis auf die allosterische Aktivierung, nachahmen. Da die Veränderungen der AMP:ATP Ratio jedoch deutlich stärker sind als die der ADP:ATP Ratio, wird die Aktivität der AMPK durch Bindung von AMP deutlich mehr gesteigert, als durch die Bindung von ADP (111).

Eine Erhöhung des ATP-Spiegels wirkt dagegen antagonistisch. Damit die Zelle den Mangelzustand überstehen kann, benötigt sie mehr Energie und muss ihren Stoffwechsel den Anforderungen anpassen. Um mehr ATP zur Verfügung zu haben, schaltet sie daher katabolische Prozesse an und reduziert dafür ATP-verbrauchende (107,112). Über die Aktivierung von SIRT-1 und PGC-1 α (siehe Abschnitt 1.5.2) ist die AMPK außerdem an der PGC-1 α vermittelten Steigerung der mitochondrialen Biogenese und Funktion beteiligt (113,114). Wichtige Zielproteine der AMPK sind außerdem die *acetyl-CoA carboxylase -1* und *-2* (ACC-1 und ACC-2). Ihren inhibitorischen Einfluss auf diese Proteine übt die AMPK durch Phosphorylierung aus. Dabei wird die ACC-1 an Ser79 und die ACC-2 an Ser221 phosphoryliert (115). Die Phosphorylierung der ACC-1 führt zur Inhibition der Fettsäuresynthese und dient damit der Minderung des Energieverbrauchs. Die Inhibition der ACC-2 fördert dafür die β -Oxidation und erhöht die Energiebildung. Wenn ACC-2 aktiv vorliegt, dann synthetisiert sie über Carboxylierung Malonyl-CoA und inhibiert die *carnitine palmitoyltransferase* (CPT1) welche hauptsächlich an dem Import von Fettsäuren in die Mitochondrien beteiligt ist. Somit können durch die Inhibition der ACC-2 mehr Fettsäuren in die Mitochondrien importiert und damit die β -Oxidation gefördert werden. Die bei der β -Oxidation entstehenden FADH₂ und NADH-H⁺ werden in die oxidative Phosphorylierung eingeschleust und fördern damit die Produktion von ATP (116,117). Eine weitere Funktion übt die AMPK auf den mTOR Komplex aus, indem sie das TSC Protein aktiviert, welches zur Inhibition des mTOR-Komplex und damit zu einer Verringerung der Proteinsynthese und des Zellwachstums führt. Durch ihre Rolle innerhalb der LKB1 Tumorsuppressorkaskade übt sie somit Tumor-inhibierende Eigenschaften aus (118).

In Melanomzellen führt die Aktivierung der AMPK durch GSK621, A769662 und anderen AMPK Aktivatoren zur Inhibition der Proliferation *in vitro* und *in vivo* (119). Umgekehrt wurde auch gezeigt, dass Tumorzellen die AMPK-vermittelte Regulation ihres Energiestoffwechsels benötigen um Nährstoffmangel zu überstehen. Beispielsweise zeigen immunhistochemische Färbung von der Entwicklung eines Glioms, dass die Aktivierung der AMPK mit dem Grad der Entwicklung korreliert (120). Damit hat die Aktivierung der AMPK auch onkogen-ähnliche Eigenschaften. Es wird vermutet, dass die Intensität der AMPK-Aktivierung maßgeblich dafür ist, ob tumorsupremierende oder onkogene Aktivitäten von ihr ausgehen. Während eine moderate AMPK-Aktivierung der Zelle vermutlich hilft eine

Mangelperiode zu überstehen, führt eine gesteigerte Aktivierung womöglich zum Wachstumsstopp, bishin zum Zelltod (121).

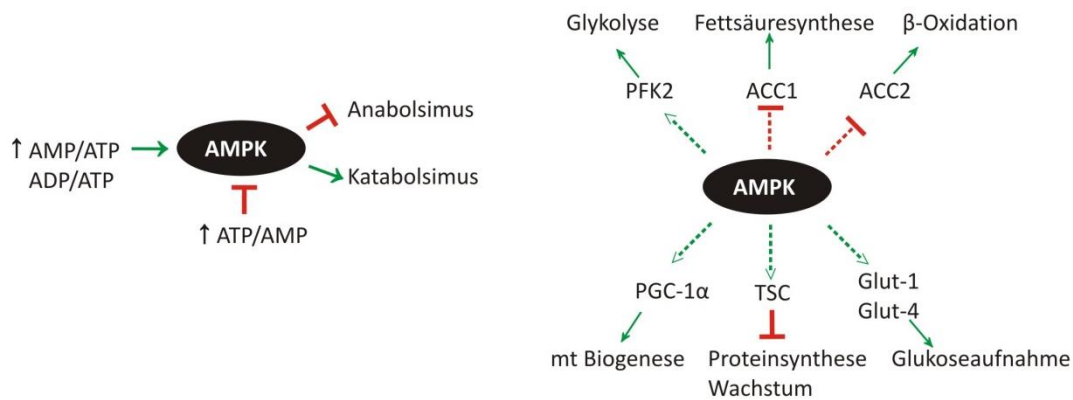


Abb. 7 Aktivierung der AMPK

Der Mangelsensor AMP-aktivierte Kinase (AMPK) wird durch Veränderungen in der AMP:ATP Ratio als Folge von zellulärem Stress aktiviert, wodurch katabole Stoffwechselprozesse gesteigert werden um die ATP-Konzentration zu erhöhen. Gleichzeitig werden ATP-verbrauchende Wege runterreguliert (links); Die AMPK nimmt über die Aktivierung und Inaktivierung verschiedener Zielproteine Einfluss auf verschiedene metabolische Signalwege. Dadurch trägt sie zur Regulation der Glukoseaufnahme, des Zellwachstums, der zellulären Atmung, der Fettsäuresynthese und des Fettsäureverbrauchs bei (rechts); ACC =; Acetyl-CoA-Carboxylase, TSC = Tuberous sclerosis protein, Glut-1/-4 = Glukosetransporter-1/-4, PFK2 = Phosphofruktokinase2.

1.5.2 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

Der Transkriptions Co-Aktivatoren *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α) gehört zur PGC Familie. Neben PGC-1 α gehören dazu auch PGC-1 β und der *PGC1-related coactivator* (PRC), die zwar Sequenzhomologien mit PGC-1 α besitzen, aber weniger stark induzierbar sind (123,124). PGC-1 α übt seine Funktion Gewebespezifisch aus und reagiert dabei auf verschiedene physiologische Stimuli, die eine Erhöhung der Verfügbarkeit von Energie erfordern. In braunem Fettgewebe reagiert PGC-1 α beispielsweise auf Temperaturstimuli und reguliert die Thermogenese. PGC-1 α kann auch durch die Muskelaktivität in Skelettmuskelzellen aktiviert werden, um dort die oxidative Phosphorylierung zu verstärken (125). In Herzmuskelzellen kooperiert PGC-1 α mit PPAR α , welches den Fettsäuretransport und die Oxidation reguliert. Dies ermöglicht eine Verstärkung des Zusammenspiels des Signalwegs der Fettsäureoxidation mit der mitochondrialen Biogenese (126). PGC-1 α ist reichlich in oxidativen Geweben vorhanden. Neben dem bereits erwähnten braunen embryonalen Fettgewebe, den Herz- und Skelettmuskelzellen, ist es daher auch in der Niere und etwas weniger reichlich im Gehirn

vorhanden (127,128). Ein weiterer Faktor der zur Induktion von PGC-1 α führt ist Hypoxie (129). Damit dient PGC-1 α , ähnlich wie die AMPK, als Mangelsensor der Zelle. Auf die Regulation von PGC-1 α durch die AMPK wird in diesem Abschnitt noch genauer eingegangen. Da PGC-1 α selbst keine DNA-bindende Aktivität besitzt, co-aktiviert es ein großes Repertoire an Transkriptionsfaktoren, von denen die meisten zur Familie der *nuclear receptor family* (NRF) gehören. Die Interaktion mit NRF's führt zur gesteigerten Expression mitochondrialer Gene und zur Regulation mitochondrialer Funktionen (130,131). PGC-1 α besitzt keine Histon-Acetyltransferase Aktivität, aber es fördert die Zusammenlagerung eines Proteinkomplexes der aus dem *steroid receptor coactivator-1* (SRC-1) und dem *CREB binding protein* (CBP)/p300 besteht (132). Durch die Bindung von PGC-1 α an den *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) entsteht eine Konformationsänderungen, die die Bindung von SRC-1 und CBP/p300 an das Protein ermöglicht. Durch die Bindung an PGC-1 α wird die transkriptionale Aktivität des Proteinkomplexes verstärkt (133). PGC-1 α wird durch viele verschiedene Proteine durch Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung oder Deacetylierung posttranslational modifiziert. Dadurch kann seine Aktivität gesteigert oder gehemmt werden. Beispielsweise führt die Phosphorylierung von PGC durch die *glykogen synthase kinase* (GSK3 β) zur Inhibition des Proteins, indem es die proteasomale Degradierung im Zellkern bei oxidativen Stress verstärkt (134). Auch die Phosphorylierung durch Akt führt zur Inhibition des Proteins, während die p38MAPK PGC-1 α durch seine Phosphorylierung stabilisiert (135) (136). Dies ist besonders wichtig, da PGC-1 α eine relativ kurze Halbwertszeit von 2-3h besitzt (137). Auch die AMPK reguliert die Expression und Aktivität von PGC-1 α . Es gibt verschiedene Mechanismen, durch die AMPK Einfluss auf PGC-1 α nimmt. Um die mitochondriale Biogenese unter Stressbedingungen anzukurbeln kann die AMPK die Expression/Transkription von PGC-1 α induzieren und direkt über Phosphorylierung an Thr-177 und Ser-538 seine Aktivität als Transkriptions-Co-Aktivator verstärken (138). Die Aktivität von PGC-1 α ist auch für die AMPK-vermittelte mitochondriale Aktivität erforderlich (139). Weiteren Einfluss auf PGC-1 α übt die AMPK indirekt über Aktivierung von *sirtuin-1* (SIRT-1) aus. SIRT1 verwendet NAD⁺ als Substrat. Somit wird SIRT1 durch die Ratio von NAD⁺/NADH mit dem Energiestatus der Zelle vernetzt (140). Durch Nährstoffmangel oder Redox-Stress erhöht die AMPK das NAD⁺Konzentration durch Verstärkung der β -Oxidation.

Das aktive SIRT1 deacetyliert PGC-1 α NAD⁺-abhängig an spezifischen Lysinresten und aktiviert es damit (141). Die Deacetylierung des bereits phosphorylierten PGC-1 α Proteins führt zur Autoaktivierung des eigenen Promotors, wodurch PGC-1 α über einen positiven *feedback loop* seine eigene Transkription reguliert. Die Deaktivierung von PGC-1 α erfolgt über Acetylierung durch die Histonacyltransferase GCN5 (142). In einem Mausmodell wurde die Auswirkung einer *high fat* (HF) Diät vs. einer Kalorien-reduzierten Diät auf die Regulation von PGC-1 α untersucht. Die Expression von GCN5 selbst wird durch den *steroid receptor coactivator* (SRC)-3 gefördert. Die HF Diät führte in dem Model zu einem Anstieg von GCN5 und SRC-3 und zu einer Erhöhung der Ratio des acetylierten PGC-1 α zum gesamt PGC-1 α Protein. Diese Ratio wurde durch Fasten reduziert und auch das mRNA Level von GCN5 und SRC-3 verringerte sich (143). In Abbildung 8 ist die Regulation von PGC-1 α nochmal schematisch dargestellt.

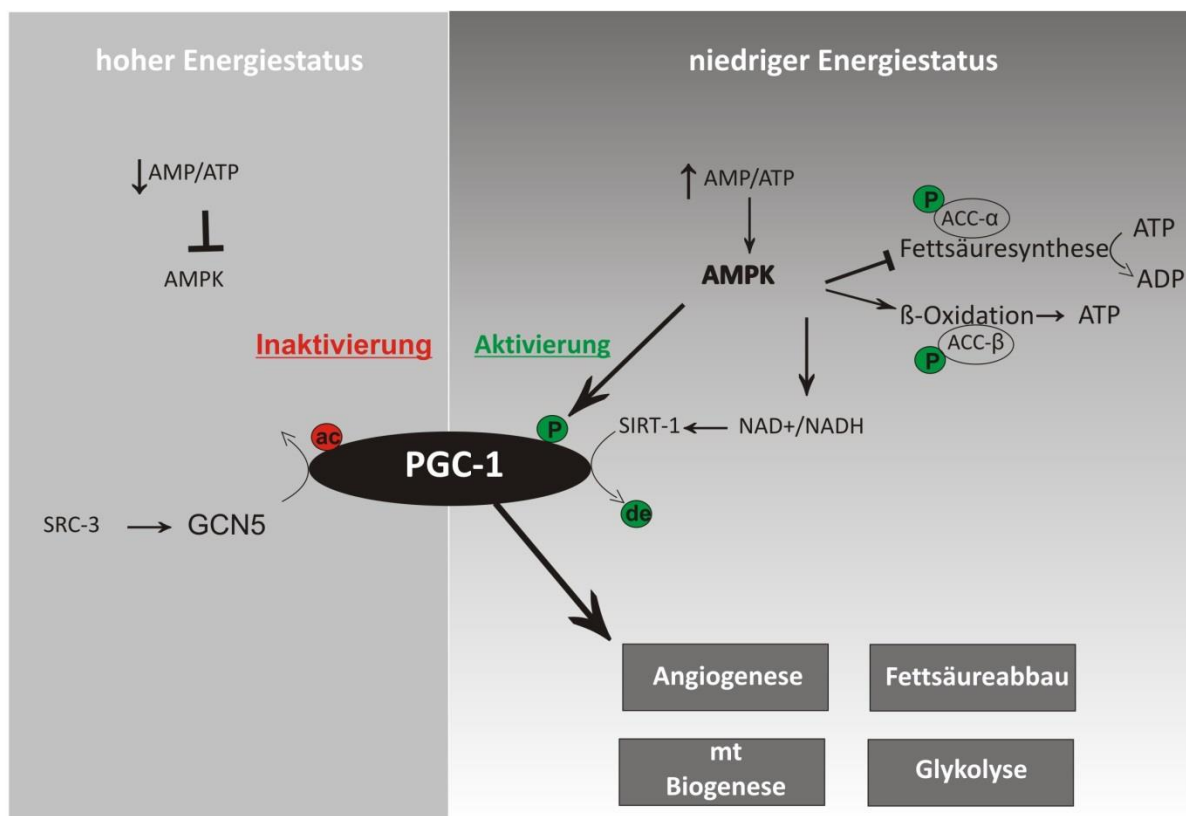


Abb. 8 Regulation von PGC-1 α

Bei einem hohen Energielevel ist ausreichend ATP vorhanden, wodurch die AMP-aktivierte Kinase (AMPK) nicht aktiviert wird, gleichzeitig wird der *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α) durch die Histonacyltransferase GCN5 acetyliert und damit inaktiviert (links). Die Expression der GCN5 wird durch den *steroid receptor coactivator* (SRC)-3 begünstigt. Unter Stress- und Mangelbedingungen verschiebt sich die AMP:ATP Ratio in Richtung AMP, was zur Aktivierung der AMPK führt.

Um die Mangelsituation zu überstehen muss die Zelle ihren Stoffwechsel runter regulieren und die ATP Produktion steigern. Dies erfolgt direkt über die AMPK durch Inhibition der Fettsäuresynthese, Förderung der β -Oxidation und durch die Aktivierung von PGC-1 α . PGC-1 α kann dabei direkt über die AMPK phosphoryliert werden oder es wird durch Deacetylierung durch Sirtuin-1 (SIRT)-1 aktiviert. Das aktivierte PGC-1 α übt eine Reihe von regulatorischen Funktionen aus, durch die die Zelle ihren Metabolismus den Anforderungen entsprechend anpasst.

1.6 Zielsetzung

Gründe für die schlechte Ansprechrate von Gliomen auf derzeitige konventionelle Therapieansätze, sind u.a. deren genetische und biologische Heterogenität, ihr infiltratives Wachstumsverhalten, Faktoren des Tumormikromilieus und Zell-autonome Mechanismen der Zelltodresistenz (19). Diese Eigenschaften werden partiell durch die Überexpression/Amplifikation und/oder Mutation des EGFR vermittelt (144,145), der daher als konzeptionell als ein plausibles und vielversprechendes Ziel von Gliomtherapien gilt. Allerdings waren bisherige Therapieversuche mit EGFR-Inhibitoren in klinischen Studien bei Glioblastomen erfolglos. Die Gründe hierfür sind bislang nicht ausreichend verstanden. Pharmakologische Probleme, die in mangelnder Inhibition resultieren spielen mutmaßlich eine erhebliche Rolle. Doch auch Mutation und Amplifikation des EGFR sind selbst in individuellen Tumoren sehr heterogen verteilt, was ebenfalls die die Therapiemöglichkeiten erschwert (20). Darüber hinaus wurde in Vorarbeiten des Labors gezeigt, dass unter Mangelbedingungen mit Hypoxie und reduzierter Verfügbarkeit von Glukose die Inhibition des EGFR zytoprotektiv wirkt [Steinbach et al. 2004 Cancer Res, 2005 J Neurochem, Ronellenfisch 2008 Brain]. Ein reduzierter Verbrauch von Glukose scheint dabei eine zentrale Rolle zu spielen. Welche Mechanismen der Generation und Detektion von Mangelsignalen unterliegen, und welche Effektoren auf diese Signale biologische Antworten erzeugen ist bislang jedoch ungeklärt. Ein Protein, das in diesen Mechanismus involviert sein könnte, ist die AMPK. Bei Mangel- und Stressbedingungen wird sie wie vorstehend ausführlich beschrieben als Sensor von der Tumorzelle aktiviert, um das Überleben der Zelle zu sichern. Ein potenzieller Mediator der metabolischen Adaption auf von der AMPK generierte Mangelsignale ist PGC-1 α .

Ziel der Arbeit war daher, die Rolle von AMPK und PGC-1 α auf den neoplastischen Phänotyp von Gliomzellen und deren Hypoxie-Resistenz zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob durch Manipulation von AMPK und PGC-1 α die unerwünschte Protektion hypoxischer Gliomzellen durch EGFR-Inhibition aufgehoben werden kann.

Die durch diese Arbeit hervorgebrachten Ergebnisse sollen damit dazu beitragen Faktoren für die Entstehung von Resistenzmechanismen in Glioblastomen zu identifizieren um damit effizientere Therapiemöglichkeiten zu erreichen.

2 Material

2.1 Biochemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Carl Roth, Applichem und Sigma Aldrich bezogen:

Acrylamid (Gel Rotiphorese)	Natriumcitrat
2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	Natriumchlorid
(H2DCFDA-AM) (Invitrogen, Kat.Nr.D-399)	Natriumhydroxid
2-Mercaptoethanol	NP-40
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Ponceau-Lösung
Bovine Serum Albumin (BSA)	Salzsäure 37 % (Riedel de Haën, Seelze)
Bradford Reagenz	Sodium Dodecyl Sulfat (SDS; MP Biochemicals)
Bromphenolblau	Sodium hydroxide-Pellets
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Entellan Propidium Iodid (PI)	TMRM Farbstoff
Ethanol	Tris (Tris-hydroxymethylaminomethan)
Glukose 40% (Braun)	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
Glycine	Trypanblau
Hefeextrakt	Trypton
Hydroxycumarin	Tween 20
Kristallviolett	Paraffinöl (VWR Chemicals, Darmstadt)
Luminol	Protease- und Phosphatase Inhibitor (Thermo Scientific, Dreieich)
Magermilchpulver (Sucofin)	Proteinmarker (Fermentas, Thermo Scientific, Dreieich)
Mercapthoethanol	Wasserstoffperoxid
Methanol	

Tab. 1 Chemikalien- und Reagenzienuflistung

2.1.1 Pufferlösungen und Medien

Medium	Hersteller
Accutase Solution	Sigma Aldrich, Steinheim
bFGF2 (<i>recombinant human</i>)	PelobioTech, Hamburg
BIT-Admixture	PelobioTech, Hamburg
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 4,5g/l D-Glucose, +L-Glu, +Pyruvate (zur Standard Kultivierung)	Gibco (Thermo Fisher Scientific), Dreieich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) -Glucose, -Glutamine, -Pyruvate (zur Untersuchung des Nährstoffmangels)	Gibco (Thermo Fisher Scientific), Dreieich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture-F12 (DMEM-F12, zur Untersuchung der Stammzeleigenschaften)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGF (<i>recombinant human</i>)	ReliaTech, Wolfenbüttel
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco (Thermo Fisher Scientific), Dreieich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (1x without CaCl ₂ and MgCl ₂)	Gibco (Thermo Fisher Scientific), Dreieich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) 100x	GE Healthcare, München
RPMI 1640	Gibco (Thermo Fisher Scientific), Dreieich
Trypsin (0,25 % EDTA, 0,02 % in PBS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

Tab. 2 Reagenzien für die Zellkultur

Die Puffer für Westernblot und Kristallviolett-färbungen wurden nach den folgenden Rezepten hergestellt.

Puffer	Rezept
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 120 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% NP-40 Pro 10ml Puffer wurde frisch 1 Tablette Protease/Phosphatase Inhibitor dazu gegeben (Roche, Mannheim)
4x Lämmli Ladepuffer	0,5M Tris-HCl pH 6,8 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycerol bis 10 ml mit VE-H ₂ O auffüllen
Sammelgel	30% Acrylamid mix 0,33 ml 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8 0,5 ml ddH ₂ O 1,15 ml 10% SDS 0,02 ml TEMED 0,002 ml 10% APS 0,02 ml
Trenngel (10 %)	30% Acrylamid mix 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8 1,3 ml ddH ₂ O 2,3 ml 10% SDS 0,05 ml TEMED 0,003 ml 10% APS 0,05 ml
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS bis 1l mit VE-H ₂ O auffüllen
10x Transferpuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycine 20 % Methanol bis 1l mit VE-H ₂ O auffüllen
10x TBS	1,5 M NaCl 77 mM Tris-HCl pH 7,5 bis 1l mit VE-H ₂ O auffüllen
TBST	TBS + 0,05% Tween
TMBSA Antikörper Puffer	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20 5 % Magermilchpulver 2 % BSA 0,01 % Natriumazid bis 500 ml mit VE-H ₂ O auffüllen
ECL-Lösung A	200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6 50 mg Luminol
ECL-Lösung B	11 mg p-Hydroxycumarinsäure 10 ml DMSO

Tab. 3 Pufferlösungen für Westernblot

Puffer	Rezept
Kristallviolett	0,5 % Kristallviolett 20 % Methanol bis 1l mit VE-H ₂ O auffüllen
Citratpuffer	0,1 M Natriumcitrat 50 % Ethanol bis 2l mit VE-H ₂ O auffüllen

Tab. 4 Pufferlösung für Kristallviolettfärbung

2.2 Antibiotika

Ampicillin (Carl Roth, Karlsruhe)

Hygromycin (Toku-E, Gent, Belgien)

Penicillin/Streptomycin 100x (GE Healthcare, München)

Puromycin (AppliChem, Darmstadt)

2.3 Antikörper

Antikörper/ Hersteller	kDa	Verdünnung	Puffer
ACC (#3662, Cell signaling, Danvers USA)	280	1:1000	5 % BSA/TBST
pACC (Ser79) (#3661, Cell signaling, Danvers USA)	280	1:1000	5 % BSA/TBST
pACC (Ser79, D7D11) (#11818, Cell signaling, Danvers USA)	280	1:1000	5 % BSA/TBST
Aktin (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	43	1:5000	5 % Milch/TBST
Akt (#9272, Cell signaling, Danvers USA)		1:1000	5 % BSA/TBST
pAkt (Ser473) (#9271, Cell signaling, Danvers USA)	60	1:1000	5 % BSA/TBST
pAMPK α	62	1:1000	5 % BSA/TBST

(Thr172) (#2535, Cell signaling, Danvers USA)			
AMPK α (#2532, Cell signaling, Danvers USA)	62	1:1000	5 % BSA/TBST
EGFR Alexa Fluor 647 (sc-101 AF647), R-1, Santa Cruz, USA	185	5 μ l auf 500.000 Zellen	2 % FCS/PBS
EGFR sc-03 1005 (Santa Cruz, USA)	185	1:1000	5 % Milch/TBST
pEGFR pY845 (44784G, Invitrogen, Karlsbad Kalifornien USA)	185	1:1000	5 % Milch/TBST
HIF-1 α (#3716, Cell signaling, Danvers USA)	120	1:500	5 % BSA/TBST
Isotyp (M5534, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)		5 μ l auf 500.000 Zellen	2 % FCS/PBS
PathScan Multiplex Western Cocktail I (#5301 Cell signaling, Danvers USA)		1:1000	5 % BSA/TBST
GAPDH (MAB374, Merck Millipore, Darmstadt)	38	1:5000	5 % Milch/TBST
PGC-1 α H300 (sc-13067, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	92	1:200	5 % Milch/TBST
Sox2 ([EPR3131] (ab92494), Abcam, Cambridge UK)	35	1:1000	5 % BSA/TBST

Tab. 5 Primärantikörper

Antikörper/ Hersteller	Verdünnung	Puffer
donkey anti-goat IgG-HRP sc-2020 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg)	1:5000	5 % Milch/TBST
goat anti-rb IgG-HRP sc-2004 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg)	1:5000	5 % Milch/TBST
Goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg)	1:5000	5 % Milch/TBST

Tab. 6 Sekundärantikörper

2.4 Reagenzien

Reagenz	Konz.	Funktion
A769662 (Tocris, Bristol UK)	10 μ M	Aktivator der AMPK
Akt8 (Merck Millipore, Darmstadt)	10 mM	Inhibitor von Akt-1,-2 und -3
2-Deoxy-D-glucose (2-DG) (Sigma Aldrich, München)	10 mM	Glukose Analogon, Blockierung der Glykolyse
<i>Compound C</i> (Merck Millipore, Darmstadt)	5 μ M	<i>Inhibitor der AMPK</i>
Erlotinib HCl (Seq. Research, Pangbourne UK)	10 μ M	Inhibitor der Tyrosinkinase EGFR
Imatinib (Enzo life Sciences, Lörrach)	10 μ M	Inhibitor der Tyrosinkinase ABL bei chron. Myel. Leukämie (CML)
Lapatinib (Sigma Aldrich, München)	5 μ M	Inhibitor der Tyrosinkinasen EGFR und HER2 bei Mammakarzinom
N-Acetyl-L-cystein (Sigma Aldrich, München)	100 μ g/ml	Antioxidanz
PD153035(Tocris, Bristol UK)	10 μ M	Inhibitor des EGFR
Rapamycin (Invivogen, Kalifornien, USA)	100 nM	Inhibitor von mTORC1 des Ser/Thr Proteinkinase mTOR (mammalian target of rapamycin)-Komplexes
Rotenon (Sigma Aldrich, München)	100 nM	Inhibitor des NADH-Dehydrogenase-Komplex
Temozolomid (TMZ; Sigma Aldrich, Taufkirchen)	200-600 μ M	alkylierendes Zytostatikum, blockiert DNA-Replikation von Tumorzellen
Torin2 (Tocris, Bristol UK)	20 mM	Inhibitor von mTORC2 des mTOR- Komplexes
TRAIL (Tocris, Bristol UK)	100 ng/ml	induziert Apoptose in Tumorzellen

zVAD (R&D, Minneapolis USA)	100 µM	Inhibitor von Pan Caspasen
--------------------------------	--------	----------------------------

Tab. 7 Auflistung der Inhibitoren und Aktivatoren

2.5 Primer

Protein	Gen	Forward Sequenz 5'-3'	Backward Sequenz 3'-5'
AMPK α 1	PRKAA1	AGAAGCAG AACACGACGGG	GCGGATTTT TCCTACCACATCA
AMPK α 2	PRKAA2	CGGCTCTTT CAGCAGATTCTGT	ATCGGCTAT CTTGGCATT CATG
ATP-Synthase	ATP5A1	TGCAAGGAACTTCCATGCCTC	CGCCCAGTTTCTTCAAGATCAA
Catalase I	CAT1	TTTGGCTACTTTGAGGTCAC	GACCAATTACGTTTACCCTT
Catalase II	CAT2	CTGTTGAAGATGCGGCGAGAC	TCCTGTGGCAATGGCGTTA
CD133(Prominin-1)	PROM-1	CAGAGTACAACGCCAAACCA	AAATCACGATGAGGGTCAGC
Cytochrom C Oxidase UE-1 (Komplex 4)	COX1	CCCTAGACCAAACCTACGCC	ATGTGGTGTATGCATCGGGG
Cytochrom C Oxidase UE-2 (Komplex 4)	COX2	CCGTCTGAACTATCCTGCCC	AAGCTAATGTGGGGACAGC
Cytochrom C	CYCS	CTTTGGGCGGAAGACAGGTC	TTATTGGCGGCTGTGTAAGAG
ERR α	ESRRA	CAAGCGCCTCTGCCTGGTCT	CAAGCGCCTCTGCCTGGTCT
FGF4	FGF4	CGGGGCGTGGTGAGCATCTT	CGGTTCCCTTCTTGGTCTTCCC
Glutaminase 1	GLS1	TGGTGGCCTCAGGTGAAAAT	CCAAGCTAGGTAACAGACCCTGTTT
Glutaminase 2	GLS2	CATGATTCATCAGAAAGTGGCAT	GCCTTTAGTGCAGTGGTGAA
Musashi	MSI1	TTCCAAGCCACAACCT	CGGGGAACTGGTAGGT
Nanog	NANOG	CCAGTCCCAAACAAAAGCTC	ATCTGCTGGAGGCTGAGGTA
NADH-Dehydrogenase (Komplex1)	ND1	TATGACGCACTCTCCCCTGA	GTAGCGGAATCGGGGGTATC
Nestin	NES	GAAACAGCCATAGAGGGAAA	TGGTTTTCCAGAGTCTTCAGTGA
Nuclear respiratory factor 1 (Nrf-1)	NRF-1	AGGAACACGGAGTGACCCAA	TGCATGTGCTTCTATGGTAGC
Nuclear respiratory factor 2 (Nrf-2)	NRF-2	TCCAGTCAGAAACCAGTGGAT	GAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
Oct4 (Oktamer- bindender	POU5F1	TATTCAGCCAAACGACCATCT	TCAGCTTCTCCACCCACTT

Transkriptionsfaktor-4)			
PPAR γ 1	PGC-1 α	AAAGAAGCCGACACTAAACC	CTTCATTACGGAGAGATCC
PPAR γ 2	PGC1- β	AGGCGAGGGCGATCTTGACAG	GATGCGGATGGCCACCTCTTT
PGC-1 α	PPARGC1A	CCTGCATGAGTGTGTGCTCT	CAGCACACTCGATGTCACTCC
PGC-1 β	PPARGC1B	GATGCCAGCGAGTTTGACTC	ACCCACGTCATCTTCAGGGA
Podoplanin	PDPN	GATGTGGAAGGTGTCAGCTC	GATCCTCGATGCGAATGCCT
Succinat-Dehydrogenase Komplex Untereinheit A	SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG
Superoxid-Dismutase 1	SOD1	TGGATCTGCCAACTACTCCC	CGTAGCCGAAGAAACCTCAT
Superoxid-Dismutase 2	SOD2	TGGACAAACCTCAGCCCTAA	TTGAAACCAAGCCAACCC
geschlechtsbestimmende Region Y- Box 2 (Sox2)	SOX2	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAG G	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGT TG
18S (ribosomale Untereinheit)	18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACGCGGCT

Tab. 8 Primersequenzen

Die Stock-Konzentration der von Sigma Aldrich gelieferten Primer betrug 100 μ M. Die Primer wurde anschließend in RNase/DNase freiem Wasser auf 20 μ M verdünnt.

2.6 Plasmide

Plasmide	Zielgen	Resistenz
Addgene plasmid 1864	Non targeting scrambled	Puromycin
Addgene plasmid 10905	Non targeting scrambled	Hygromycin
TRCN0000196482	AMPK alpha 1	Puromycin
TRCN0000355739	AMPK alpha 2	Hygromycin
TRCN0000001165	PGC-1 α #1	Puromycin
TRCN0000001166	PGC-1 α #2	Puromycin

Tab. 9 Verwendete Plasmide

Die Selektion mit Hygromycin wurde in einer Konzentration von 800 μ g/ml durchgeführt. Puromycin wurde in 200 μ g/ml eingesetzt.

2.7 Kits

Caspaseaktivität: Caspase-3-colorimetric Assay Kit (Sigma Aldrich, München)
 cDNA-Synthese: SuperScript VILO Master Mix (Invitrogen, Carlsbad Kalifornien)
 Hypoxie Induktion (0,1 %): BD GasPakTM EZ Anaerobe Gas generating Pouch System (BD,

	Heidelberg)
Plasmidpräparation:	Purelink hipure Plasmid filter midiprep kit (Invitrogen, Karlsbad Kalifornien USA)
RNA-Isolierung:	TRIZOL (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts)
	PureLink RNA mini Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts)
QRT-PCR:	Absolute Blue QPCR SYBR Green Fluorescein Mix (Thermo Fisher Scientific, Dreieich)
Zellproliferation:	BrdU colorimetric Assay (Roche Applied Science, Mannheim)

2.8 Geräte

Typ	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen
Bakterienschüttler (Orbital-Shaker ES-20)	BioSan, Riga, Lettland
FACS Canto II	BD, Bioscience, Heidelberg
Glukose-Laktatmessgeräte Hitachi 917	Roche, Mannheim
Heizblock	VWR
iQ5 Real-Time PCR detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiscan Photometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Mini-PROTEAN Tetra cell electrophoresis chamber	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini Transblot TC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mikroskop	Hund, Wetzlar
Sauerstoffmessgerät Sensor Dish Reader SDR	Presens, Regensburg
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Thermomix comfort für cDNA Synthese	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter LHB 850	Schott instruments, Mainz,
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Multifuge 3S-R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Tab. 10 Auflistung der Geräte

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden bei feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert.

3.1.1 Etablierte Zelllinien

Die Glioblastomzelllinien LN-18, LNT-229, LNT-319, LN-428, T98G, U87MG (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Monika Hegi, Labor für Tumorbologie und Genetik, Lausanne, Schweiz), LN-308 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Nicolas de Tribolet, Privatklinikgruppe Hirslanden, Lausanne, Schweiz), G55 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Katrin Lamszus, Labor für Hirntumorbologie Hamburg), U343MG (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Werner Paulus, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Münster; ursprüngliche Benennung Gos-3, DSMZ no.: ACC 408) sowie die Mammakarzinom Zelllinie MDA-MB-435 (bezogen von ATCC, Wesel) und die Melanomlinie SKMEI-28 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Igor Hrgovic, Dermatologie Uniklinik Frankfurt) wurden zur Standard Kultivierung in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 4,5g/l D-Glucose, +L-Glu, +Pyruvate (Tab.2) gezüchtet, welches zusätzlich mit 10 % FCS (Tab.2) und 1x Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (Tab.2) versetzt wurde. Die Leukämiezelllinie (CML) K562 (bezogen von ATCC, Wesel) und G361 (Dr. Hrgovic, Frankfurt) wurden in RPMI Medium (Tab. 2) unter Zugabe von 1x Pen/Strep und 10 % FCS kultiviert.

3.1.2 Zellen zählen und aussäen

Für die Versuche wurden die Zellen mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Tab. 2) gewaschen und mit Trypsin (Tab. 2) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und mit FCS-haltigem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in der entsprechenden Dichte (Tab. 11) ausgesät. Für Versuche, die mit DMEM-F12 Medium durchgeführt wurden, wurden die Zellen mit Accutase gelöst und in PBS aufgenommen. Nach dem Zählen wurde das entsprechende Volumen an Zellen in 15 ml Falcon überführt und 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert um das restliche FCS-haltige

Medium zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in DMEM-F12 Medium aufgenommen und entsprechend ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht wieder angewachsen waren, konnten sie am nächsten Tag behandelt werden. Der Mediumwechsel variierte je nach Fragestellung und Versuchsbedingungen. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) -Glucose, -Glutamine, -Pyruvate (Gibco (Thermo Fisher Scientific), Dreieich) kultiviert und das Medium abhängig vom jeweiligen Experiment mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (2 mM, 5 mM, 25 mM) und Substanzen versetzt. Um die Zellen zu expandieren, wurden sie ebenfalls mit Trypsin gelöst und anschließend auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt (splitten).

Zellkulturplatte	Zelldichte
96-Well	5.000 (Wachstumskurve) 10.000 (Zellviabilität)
24-Well	80.000
6-Well	300.000
10-Well	1.700.000

Tab. 11 Auflistung der ausgesäten Zellzahlen

3.1.3 Kultivierung von Primärzellen

Die Zelllinie MNOF1300 wurde von Dr. Julia Tichy (Dr. Senckenbergisches Institut für Neuroonkologie, Goethe-Universität Frankfurt), als Kultur angelegt. Die Linie GBM22 und MNOF132 wurden freundlicherweise von Stefan Momma (Edinger Institut, Goethe-Universität Frankfurt) und die Zelllinie RAV19 von Arabel Vollmann-Zwerenz (Neuroonkologie, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Bis Passage 10-15 spricht man bei Tumorzelllinien von Primärkulturen. Diese weisen die meiste Ähnlichkeit mit dem Ursprungstumor auf. Damit diese Eigenschaften nicht verloren gehen, müssen die Zellen in einem bestimmten Medium gezüchtet werden. Dieses Primär- bzw. Stammzellmedium besteht aus Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 HAM (Gibco (Thermo Fisher Scientific), Dreieich) mit EGF, bFGF2 und BIT-Admixture (Tab. 2).

Medium: 40 ml DMEM (F12) ohne FCS
 10 ml BIT-Admixture (25 %)
 100 µl BFGF2 (0,25 %)
 100µl EGF (10µg/100µl)

Wurden die Zellen nicht verwendet oder gesplittet, so wurde einmal pro Woche unabhängig von der Zelldichte frisches EGF und bFGF2 direkt zum Zellmedium (jeweils 20 µl auf 10 ml bei einer T75 Flasche) dazu gegeben. Für die Versuche wurden die Zellen mit Accutase vom Boden gelöst und wie bereits erwähnt gezählt und ausgesät. Die Behandlung erfolgte bei diesen Zellen nicht in FCS-freiem DMEM, sondern mit Stammzellmedium. Um den primären Charakter nicht zu verlieren, wurden die Zellen max. bis zur Passage 13 kultiviert.

3.1.4 Einfrieren und auftauen von Zellen

Nachdem die Zellen wie in 3.1.2 beschrieben gelöst und resuspendiert wurden, wurden sie 5 Min. bei 1.500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und in Kryofugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden über Nacht oder länger in einen Kryofugenbehälter eingefroren (-80 °C) und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Primärzellen wurden entsprechend mit Accutase gelöst und in 96 % Stammzellmedium mit 4 % DMSO eingefroren.

3.1.5 Kristallviolett-Färbung

Kristallviolett (KV) ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der genutzt wird um adhärenente und somit vitale Zellen zu färben und dient damit als Indikator für die Zelldichte. Diese Färbungsmethode wurde daher genutzt um eine gleiche Zelldichte in verschiedenen Zelllinien bei Versuchsstart zu gewährleisten. Das Medium der zu untersuchenden Zellen wurde abgesaugt und die Zellen mit dem entsprechenden Volumen KV gefärbt (50 µl = 96-well Platte, 150 µl = 24-well Platte, 300 µl = 6-well Platte) und 1 Min. damit bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit vollentsalztem (VE)-Wasser gewaschen und bei RT getrocknet. Danach wurde das KV mit Citratpuffer (Tab.3) aus den Zellen gelöst (je nach Platte wurde dieselbe Menge wie bei der KV-Färbung verwendet) und 50 µl/well in neue 96-well Platten überführt. Konnte. Die

Platten wurden in einem Multiscan Photometer bei 595 nm gemessen. Die Extinktion ist proportional zur Zellzahl.

3.1.6 Caspase-3 Aktivitäts Assay

Zur Analyse der Aktivierung von Caspasen wurde das Caspase-3 Colorimetric-Assay-Kit (Abschnitt 2.8) verwendet und entsprechend des Hersteller-Protokolls durchgeführt. Dieser Assay basiert auf der Hydrolyse von Ac-DEVD-pNA (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide), was zur Freisetzung der funktionellen Gruppe von pNA (p-nitroanilin) führt und bei 405 nm detektiert werden kann.

3.1.7 BrdU-Proliferations-Assay

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde mittels BrdU-ELISA-Kit (Abschnitt 2.8) analysiert und entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Zellen wurden als quadruplets in einer 96-well Platten ausgesät und am nächsten Tag mit dem BrdU Reagenz für 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte im Multiscan Photometer.

3.1.8 Migrationsverhalten

Das Migrationspotential der Zellen wurde mit Corning® Transwell® *polycarbonate membrane inserts* analysiert. Die Einsätze bestehen aus einer unbeschichteten Polycarbonatmembran mit 8 µm großen Poren, durch die die Zellen migrieren können. Um das Migrationspotential zu fördern, wurde das Medium einen Tag vor Beginn des Versuchs durch FCS-freies Medium ersetzt und die Platten ÜN im Brutschrank ebenfalls mit FCS-freiem Medium equilibriert. Am nächsten Tag wurde in das untere well 600 µl FCS-freiem DMEM inklusive 10 ng Fibronectin pipettiert (Lockmedium). Die Zellen wurden gezählt und $0,5 \times 10^5$ Zellen in 100 µl SFM (2 mM) in die Einsätze der Platte pipettiert. Die Zellen wurden als Triplikate ausgesät. Die Platten inkubierten für 16 Stunden im Brutschrank damit die Zellen durch die Poren zu dem Lockmedium migrieren konnten. Nach der Inkubationszeit wurden die nicht-migrierten Zellen und das restliche Medium vorsichtig aus der Oberseite der Einsätze entfernt. Die Unterseite der Einsätze auf der sich die migrierten Zellen befanden wurde dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen und mit Kristallviolett gefärbt. Das überschüssige KV wurde durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die Membran wurde mit

einem Skalpell aus dem Einsatz herausgeschnitten und mit der Zellseite nach oben auf einen Objektträger gebracht und eingebettet. Mittels Image J wurden 10 Felder gezählt und der Mittelwert gebildet.

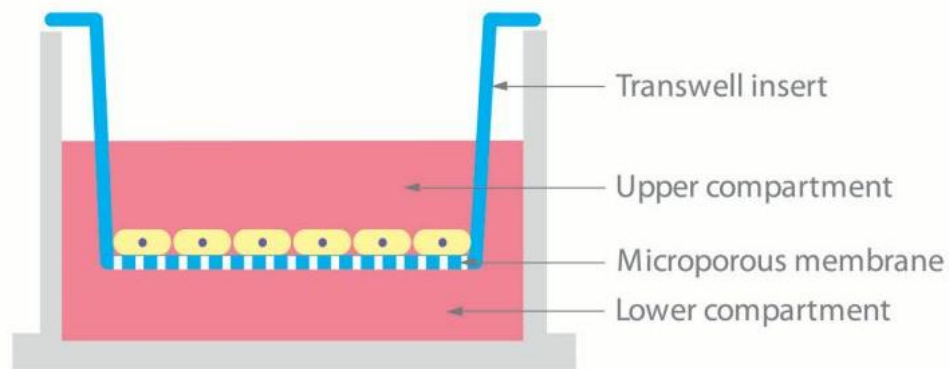


Abb. 9 Schematische Darstellung eines Transwells (www.corning.com)

Der Transwelleinsatz kann aus dem well der 24-well Platte herausgenommen werden. Im oberen Bereich (upper compartment) befindet sich die Zellsuspension, die durch die porige Polycarbonatmembran von dem Bereich, der das Lockmedium (lower compartment) enthält, getrennt ist.

3.2 Transfektion

Bei allen genetisch veränderten Linien handelt es sich um stabile Transfektionen.

Wie in den folgenden Abschnitten erklärt, wurde dies sowohl mit als auch ohne Lentiviren durchgeführt.

3.2.1 Züchtung von bakterieller Plasmid-DNA

Es wurde ein Kolben mit 100 ml LB-Medium (s.u.) + Ampicillin (100 mg/ml) gefüllt und ca. 100 µl des aufgetauten bakteriellen Glycerolstocks (indem sich die Plasmid-DNA befand) unter semi-sterilen Bedingungen zu dem Kolben gegeben. Die Bakterien inkubierten ÜN bei 37°C in einem Bakterieneschüttler. Am nächsten Tag konnte die Plasmid-DNA wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben isoliert werden.

LB-Medium: Hefeextrakt 5 g/l (Carl Roth, Karlsruhe)

Trypton 10 g/l, (Carl Roth, Karlsruhe)

NaCl 5 g/l, (Sigma Aldrich, Darmstadt)

3.2.2 Transformation

Es wurden 80 µl DH5α-Zellen aufgetaut (10 Min. auf Eis) und 20 ng Plasmid-DNA vorsichtig zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach inkubierten die Zellen für 1,5 Min. auf einem Heizblock (Tab. 4) bei 42 °C und wurden anschließend direkt auf Eis für weitere 5 Min. abgekühlt. Daraufhin inkubierten die Zellen in 500 µl LB-Medium (ohne Ampicillin) für 30 Min. bei 37 °C. Anschließend konnten sie wie in Abschnitt 3.2.1 in einen Kolben mit LB-Medium + Ampicillin semi-steril überführt und ÜN bei 37 °C hochgezüchtet werden.

3.2.3 Plasmid-DNA- Midipräparation

Die ÜN gezüchteten Bakterien wurden am nächsten Tag in 50 ml Falcons überführt und 10 Min. bei 4.000 rpm zentrifugiert. Alle weiteren Schritte der DNA-Isolierung erfolgten mittels HiPure Plasmid Mididprep Kit (siehe Abschnitt 2.8) und wurden entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Messung der DNA-Konzentration mittels Photometer (Tab. 4).

3.2.4 Stabile Transfektion

Es wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 6-Wellplatten ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium vor Beginn der Transfektion gewechselt. Für die Transfektion der PGC-1αsh Zellen wurden pro well 4 µg Plasmid DNA verwendet. Das entsprechende Volumen an Plasmid-DNA wurde 1:10 mit Serum freien Medium (SFM) gemischt und kurz runter zentrifugiert. Anschließend wurden 6 µl PeqFect zu dem Plasmidansatz dazu gegeben. Der Mix wurde nochmals gevortext und runterzentrifugiert und inkubierte anschließend 15 Min. bei RT. Danach wurde der Ansatz tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde ein Mediumswechsel mit FCS-haltigem DMEM Medium durchgeführt. Nach weiteren 24 h wurde mit der Selektion begonnen. Dazu wurde das Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Tab. 6) versetzt und erneut ein Mediumswechsel durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Well ohne Plasmid-DNA transfiziert. Durch das Selektionsmedium starben diese Zellen bereits nach wenigen Tagen und dienten damit als Marker für eine erfolgreiche Selektion. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurden die Zellen weiterhin mit Selektionsmedium kultiviert, welches einen Tag vor Beginn des Versuchs durch normales Medium ersetzt wurde.

3.2.5 Lentivirale Transfektion

Bei den AMPKsh-Zellen handelt es sich um Doppel-*knockdown*-Zellen, die mit dem lentiviralen System hergestellt wurden. Dazu wurde zunächst ein *knockdown* der AMPK α 1-Untereinheit erzeugt und mittels Puromycin-Selektionsmedium selektioniert. Nach erfolgreicher Selektion und Überprüfung des *Knockdown* mittels qPCR wurde ein AMPK α 2 *knockdown* in dieselben Zellen eingebracht. Dieses Plasmid beinhaltet eine Hygromycinresistenz. Nach erfolgreicher Selektion mit Hygromycin wurde der *knockdown* ebenfalls in der qPCR überprüft. Die Kontrollzellen wurden mit non-targeting Plasmiden transfiziert, die die entsprechenden Antibiotikaresistenzen besaßen (Tab. 6).

3.3 Molekularbiologische Methoden

Die Genspezifität der Primer wurde mittels des Basic Local Alignment Search Tool „BLAST“ kontrolliert.

3.3.1 RNA-Isolierung

Die Zellen wurden in eine 6-well Platte ausgesät und dem Versuch entsprechend behandelt. Zu Beginn der RNA-Isolierung wurde das Medium abgesaugt und 1 ml Trizol auf die Zellen gegeben und damit 5 Min. bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in dem Trizol resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 200 μ l Chloroform dazu gegeben. Die Proben wurden zügig per Hand 15 Sekunden kräftig geschüttelt und anschließend 2-3 Min. bei RT inkubiert. Im Anschluss an das Zentrifugieren bei 13.000 rpm 15 min/ 4 °C wurde die obere durchsichtige Phase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde 1:1 70% EtOH pipettiert, gemischt und auf eine Qiagen-Säule (RNAeasy) überführt. Die Aufreinigung durch die Säule erfolgte nach dem Protokoll des RNA mini Kits (Abschnitt 2.8).

3.3.2 RNA-Bestimmung und cDNA-Synthese

Wie für die Ermittlung der DNA-Konzentration bereits angegeben (Abschnitt 3.2.2) erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration ebenfalls mit einem Photometer. Für die cDNA Synthese wurden 15 ng RNA pro Probe eingesetzt. Anschließend wurde für jede Probe ein Ansatz aus 15 ng RNA, 4 μ l Vilo Master Mix (Abschnitt 2.8) und der entsprechenden Menge Wasser für ein Gesamtvolumen von 15 μ l pipettiert. Die cDNA Synthese erfolgte auf einem

Heizblock für 10 Min. bei 25 °C und 2 h bei 42 °C. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Proben anschließend für 10 Min. bei 85 °C inkubiert. Wenn die PCR nicht unmittelbar begonnen wurde, wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

3.3.3 Real-time PCR

Für die mRNA Analyse wurde folgender Ansatz pipettiert:

2 µl Probe

12,5 µl SybrGreen Fluorescein (AB-4219/b, Thermo)

7 µl Wasser

1,75 µl Primer forward/backward (10 µM → 1:10 in Wasser verdünnt)

25 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde in Tripletts pipettiert. SDHA und 16s dienten als Kontrollgene.

Die Analyse wurde mit einem *quantitative real-time* (qRT)-PCR Gerät (Tab. 4) durchgeführt und die Expression der Zielgene anschließend mit der MyQ5-Software ermittelt und auf die Expression der Kontrollgene normiert.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Propidiumiodid (PI)-FACS

Propidiumiodid dient als Zelltodindikator, da es nur über die poröse Zellwand apoptotischer Zellen in die Zelle eindringen und im Zellkern in die doppelsträngige DNA und RNA interkalieren kann. Für die PI-FACS Messung wurden $0,8 \times 10^5$ Zellen als Tripletts in eine 24-Well Platte ausgesät. Nach 24 h erfolgte die entsprechende Behandlung der Zellen. Nach weiteren 24 h, 48 h oder 72 h wurde der Überstand in ein BD-FACS-Röhrchen überführt, die Zellen mit PBS gewaschen und auch dieses zu dem entsprechenden FACS-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden anschließend mit Trypsin vom Boden gelöst, in PBS resuspendiert in das jeweilige FACS-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die FACS-Röhrchen bei RT für 5 Min. bei 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl PI-Lösung (1 µg/ml in PBS verdünnt) aufgenommen. Der PI-Gehalt wurde

mittels FACS-Analyse im FL2-A (lin)-Kanal für Propidiumiodid ermittelt und die Daten mit Hilfe des Programmes BD-FACS Diva Software ausgewertet.

3.4.2 ROS-FACS

Die Messung basiert auf dem nicht fluoreszierenden Molekül 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat (CM-H₂DCF-DA). Aufgrund seiner fehlenden Polarität kann es die Membran der Zellen passiv durchdringen und wird durch intrazelluläre Esterasen durch Abspaltung der Acetatgruppe zu CM-H₂DCF deacetyliert. Die durch bspw. Zellstress ausgelöste Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezien (ROS) führt zur Oxidation und damit Konvertierung des nichtfluoreszierenden CM-H₂DCF Molekül zu einem grün fluoreszierenden 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Aufgrund der Polarität des Reaktionsprodukts kann es die Zellmembran nicht mehr passieren und damit die Zelle nicht verlassen. Die entstehende Fluoreszenz kann mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden und dient als Indikator für die ROS-Bildung. Für die Durchführung der Messung wurden $0,8 \cdot 10^5$ Zellen in eine 24-Well Platte ausgesät und dem Versuch entsprechend behandelt. Das Medium wurde daraufhin entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Das H₂DCFDA (100 mg/ml) wurde 1:10.000 für eine Konzentration von 0,205 mM in PBS verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. im Brutschrank wurde das H₂DCFDA abgesaugt und die Zellen vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst und in PBS resuspendiert. Der Messung erfolgte anschließend im FITC Kanal.

3.4.3 TMRM-FACS

Die Messung der Membrandepolarisation wurde mit dem Farbstoff Tetramethylrodamin durchgeführt. Dies ist ein Membran-permeabler kationischer rotorange fluoreszierender Farbstoff, der in aktiven Mitochondrien akkumuliert. Zellen mit depolarisierten, defekten Mitochondrien weisen dementsprechend ein geringeres Signal auf. Dazu wurden 80.000 Zellen/Well in eine 24-Well Platte ausgesät. Nach einem Mediumswechsel am nächsten Tag mit DMEM + 10 % FCS/SFM 2mM Glukose wurden die Zellen nach weiteren 24h mit PBS gewaschen und 25 nM TMRM in PBS zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von

45 Minuten wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und direkt mittels FACS im PE-Kanal gemessen.

3.4.4 EGFR-FACS

Die Zellen wurden geerntet und 500.000 Zellen pro Probe zweimal mit FACS Puffer (PBS +2% FCS) gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1.200 x g für 3 Min. wurde das Pellet mit der Isotypkontrolle oder dem anti-EGFR Antikörper (Abschnitt 2.3) in FACS-Puffer (2 % FCS/PBS) resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Der Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen entfernt und die Proben bis zum Beginn der Messung auf Eis gehalten. Die Zellen wurden im PE-Kanal des Durchflusszytometers gemessen. Der spezifische Fluoreszenz Index (SFI) wurde durch die mittlere Fluoreszenzintensität der spezifischen Antikörper/mittlere Fluoreszenz Intensität des Isotyp-Antikörpers kalkuliert.

3.4.5 2-NBDG-FACS

Um die zelluläre Glukoseaufnahme zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem fluoreszierenden Glukoseanalogon 2-N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxyglukose-(2-NBDG) gefärbt. Dazu wurden die Zellen in einer 24-Wellplatte ausgesät und nach 24 h mit 0,1 mM/ 0,5 mM und 1 mM 2-NBDG für 10 Min. oder 1 h bei Normoxie inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, durch Trypsin abgelöst und in PBS mit 10 % FCS resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in PBS mit 10 % FCS aufgenommen und die Zellen im FITC-Kanal des Durchflusszytometers gemessen.

3.5 Metabolische Analysen

3.5.1 Hypoxie

Um ein stark hypoxisches Milieu zu erzeugen wurden die Zellen mittels anaeroben GasPaks (Abschnitt 2.7) inkubiert, wodurch ein Sauerstoffanteil von ca. 0,1 % erreicht werden konnte (146). Zur Erzeugung einer moderaten Hypoxie wurden die Zellen im Brutschrank bei 1 % O₂ inkubiert.

3.5.2 Glukosemangel

Für Versuche, die unter Nährstoffmangelbedingungen durchgeführt wurden, wurde Serum-freies Medium (SFM) verwendet, das aus DMEM (ohne Glutamin, Pyruvat, Glukose und Phenolrot) ohne FCS Zugabe bestand. Glukose wurde entsprechend den Versuchsbedingungen separat hinzugefügt (2 mM, 5 mM oder 25 mM).

3.5.3 Glukose- und Laktatmessung

Die Zellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und wie im Ergebnisteil beschrieben behandelt. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, das dann bei 1.000 rpm für 5 Min. zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand in spezielle Messgefäße überführt. Die im Medium enthaltene Glukose- (in mg/dL gemessen, umgerechnet in mmol/l: mg/dl-Wert/18) und Laktatkonzentration (in mmol/l) wurden mittels Hitachi 917-Messgerät (Abschnitt 2.8) in der Diagnostik der neurologischen Abteilung in der Universitätsklinik Frankfurt am Main gemessen.

3.5.4 Sauerstoffmessung

Es wurden 8×10^4 Zellen/Well in eine 24-Well Sensor Dish Platte (Abschnitt 2.8) ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Mediumswechsel mit FCS-haltigem DMEM vorgenommen. Die Wells wurden anschließend mit vorgewärmten Paraffinöl (600 μ l) hermetisch abgedichtet. So konnten die Zellen nur die Menge an Sauerstoff veratmen, die im Medium enthalten war. Anschließend inkubierten die Platten für 24 h im Brutschrank auf einer SDR Sensorplatte (Tab. 4). Die transparenten SensorDish Platten besitzen einen Sensor am Boden jedes Wells. Darüber kann die SDR Sensorplatte die SensorDish Platten im 15 Min. Intervall (individuell einstellbar) nicht invasiv durchmessen. Die gemessenen Werte wurden in „O₂ [%] *air saturation*“ ermittelt und der Zeitpunkt der max. vorhandenen Sauerstoffmenge als Startpunkt (100 %) für die graphische Darstellung verwendet.

3.5.5 Bestimmung intrazellulärer Metabolite

Die Zellen wurden in einer Dichte von 300.000 Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen waren, wurde das Medium durch Serum-freies DMEM (+Glk, +Gln) ersetzt und die Platten bei 21 % und 0,1 % Sauerstoff für weitere

24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Proben wie bereits beschrieben vorbereitet (147). Die Messung der Metabolite wurde von Frau Dr. Ute Hofmann am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie in Stuttgart durchgeführt. Die Quantifizierung des Adenin Nukleotids ATP erfolgte mit dem LC-MS-MS wie bereits beschrieben (148). Die Energiebilanz wurde durch die folgende Gleichung kalkuliert: $([ATP] + 0.5[ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$. Die Messung der intrazellulären Metabolite (Fumarat, Malat, Citrat, α -Ketoglutarat, Pyruvat) wurde durch GC-MS durchgeführt (147,149). Die Bestimmung von Ribulose-5-Phosphat, 6-Phosphoglukonat und Hexose-6-phosphat durch LC-MS-MS erfolgte in gleicherweise zu einer bereits publizierten Methode (150). Die Konzentrationslevels wurden auf die Zellzahl normiert.

3.6 Proteindetektion

3.6.1 Proteinisolation

Es wurden 1.500.000 Zellen in 10 cm Platten ausgesät und entsprechend dem Ergebnisteil behandelt. Nach 6 h oder 24 h Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellmembran mit flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 Min. bei 2.000 rpm, 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit Lysepuffer resuspendiert und für 30 Min. auf Eis inkubiert, wobei die Proben alle 10 Min. gevortext wurden. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (10 Min., 13.000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.6.2 Bradford-Proteinbestimmung

Für die Messung der Proteinkonzentration wurden zunächst in eine 96-well Platte pro well 50 μ l VE-Wasser vorgelegt. Anschließend wurde die Standardreihe pipettiert. Dazu wurde die BSA-stock Lösung (10 mg/ml) 1:10 mit Wasser verdünnt und entsprechend dem Pipettierschema (s.u.) auf die Platte pipettiert. Von jeder Probe wurde 1 μ l pro Well als Triplet pipettiert. Das Bradford Reagenz wurde 1:4 mit VE-Wasser verdünnt und davon 150 μ l in jedes Well der Platte gegeben. Die Platte wurde für 15 Min. inkubiert und anschließend im Multiscan-Photometer (Tab. 4) bei 570 nm gemessen.

BSA-StandardreiheProben jeweils 1 µl/well

0 µl	0 µl	0 µl	Probe1	Probe1	Probe1							
1 µl	1 µl	1 µl	Probe2	Probe2	Probe2							
2 µl	2 µl	2 µl	Probe3	Probe3	Probe3							
4 µl	4 µl	4 µl										
6 µl	6 µl	6 µl										
8 µl	8 µl	8 µl										
10 µl	10 µl	10 µl										
12 µl	12 µl	12 µl										

3.6.3 SDS-Page Gelelektrophorese

Mittels der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine anhand ihrer Molekülmasse auf einer Gelmatrix aufgetragen und anhand eines elektrischen Felds aufgetrennt. Es handelt sich hierbei um eine diskontinuierliche Auftrennung, da die Gelpuffer unterschiedliche pH-Werte besitzen, die sich zusätzlich von dem des Laufpuffers unterscheiden. Auch die Porengröße der Gele unterscheidet sich ebenfalls voneinander. Zunächst wurde das Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Gels konnte das Isopropanol entfernt und das Sammelgel in die Kammer gegossen und mit einem Taschenkamm bestückt werden. Nach erneutem durchpolymerisieren konnte der Kamm aus dem Gel gezogen werden. Die entstandenen Luftblasen wurden mit VE-Wasser entfernt, damit die Taschen mit dem Proteinlysate befüllt werden konnten. Dazu wurden zunächst 20-30 µg Proteinlysate mit 4-fachem Lämmli-puffer (Tab. 2) gemischt und denaturiert, indem es 10 Min. bei 95°C auf einem Heizblock erhitzt wurde. Die Gele wurden in die Gelelektrophoresekammer (Tab. 4) eingesetzt und mit 1x SDS Laufpuffer (Tab. 2) befüllt. Neben den Proteinlysaten wurde eine Tasche mit 7 µl des Proteinmarkers (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific) beladen. Nach der Gelbeladung wurde die Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 200 mA gestartet.

3.6.4 Westernblot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele auf eine Nitrozellulose-Membran mittels Western-Blot übertragen. Alle Schwämme, Papierfilter und Membranen wurden zunächst 5 Min. mit 1x Transfer-Puffer benetzt. Anschließend wurden sie entsprechend den Angaben des Herstellers zusammengelegt und in die Kammer gesteckt. Um eine übermäßige Erwärmung während des Transfers zu vermeiden, wurde die Kammer mit einem Kühlelement bestückt und mit kaltem Transferpuffer (4 °C, Tab.) befüllt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 Volt für 60 Min. Im Anschluss des Transfers wurde die Apparatur auseinander gebaut und die Übertragung der Proteine mit einer Ponceau Färbung überprüft. Anschließend wurde das Ponceau mit VE-Wasser ausgewaschen und die Membran für 1 h bei RT in 5 % Milchpulver/TBST geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern. Diese wurden je nach Herstellerangaben und vorhergehendem austesten wie in Tabelle 2 angegeben angesetzt, verdünnt und bei 4 °C ÜN oder 1,5 h RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 Min. mit TBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (1:5.000 in 5 % Milch/TBST) für 1 h bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift von dreimal 10 Min. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels Chemolumineszenz. Dazu wurden die wie in Tab. 2 angesetzten Lösungen zusammen pipettiert. Pro Membran wurde 1 ml der Lösung A, 100 µl der Lösung B und 0,3 µl 30 %-ige H₂O₂ gemischt, auf die Membran gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 2 Min. konnte die Membran entwickelt werden.

3.7 Tierversuch

Für den Tierversuch wurden für jede der beiden Gruppen fünf fünf-Wochen alte Nacktmäuse (*Athymic nude-Foxn1^{nu}*) bei Envigo (Indianapolis, IN) erworben. Nach einer Akklimationszeit von einer Woche wurde das Xenograft Modell mit der Genehmigung des Regierungspräsidiums Darmstadt durchgeführt und unter der Nummer FK/1038 registriert. Dabei wurden die entsprechenden Leitlinien und Vorschriften des *National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, GV-SOLAS*, eingehalten. Die athymischen Mäuse hatten einen 12 h Tages- und Nachtrythmus mit Wasser und Futter *ad libitum*. Alle Tierversuche wurden unverblindet durchgeführt. Zur Schmerzbefreiung

erhielten die sechs Wochen alten Mäuse Buprenorphin und wurden mit Ketamin und Xylazin sediert. Mittels einer stereotaktischen Fixierungs Apparatur (Stoelting, Wood Dale, IL) wurden sie immobilisiert und durch ein Trepanationsloch im Schädel mit 5×10^5 U343MG (SCRsh oder PGC-1 α sh) -Zellen in 2 μ l PBS injiziert. Dazu wurde eine 10 μ l Hamilton Spritze (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) sowie ein Quintessential Stereotaxic Injector (Stoelting) verwendet.

3.8 Statistik

Wenn nicht anders angegeben, dann wurden die Versuche in Triplikaten ausgeführt und der Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich jeweils um ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei gleichen, unabhängigen Versuchen. Die Werte wurden für die meisten Experimente mittels Zweistichproben-t-Test (Excel, Microsoft, Seattle, WA) miteinander verglichen und bei * $p < 0.05$ als signifikant und bei ** $p < 0.01$ als hoch signifikant angesehen. Werte die einen $p > 0.05$ erreichten, wurden als nicht signifikant (n.s.) betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Aktivierung der AMPK moduliert die Sensitivität von Gliomzellen gegenüber einer EGFR Inhibition

4.1.1 Metabolische Bedingungen beeinflussen den Effekt der EGFR Inhibition

Die Inhibition des EGF-Rezeptors wurde mit dem reversiblen EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor (PD153035) durchgeführt. In früheren Studien wurde gezeigt, dass PD153035 die EGFR-Autophosphorylierung in Fibroblasten der Mäuse und die EGF abhängige EGFR-Phosphorylierung verschiedener EGFR exprimierender humaner Krebszelllinien inhibiert (151). Ob metabolische Bedingungen die EGFR-Inhibition modulieren, wurde überprüft, indem LNT-229 Gliomzellen mit verschiedenen Konzentrationen der beiden wichtigsten metabolischen Faktoren, Sauerstoff und Glukose, behandelt und ohne oder mit simultaner Zugabe von PD153035 inkubiert wurden (Abb. 10 A + B). Der Hypoxie-induzierte Zelltod wurde durch geringe Glukosekonzentrationen verstärkt und führte damit zu der Annahme,

dass es sich bei der Glukoseverfügbarkeit um den limitierenden Faktor für das Überleben der Zellen unter hypoxischen Bedingungen handelt (Abb. 10 A + B). Die konkomitante Zugabe von PD153035 führte in der Anwesenheit von Hypoxie bei niedriger Glukoseverfügbarkeit (2 mM) zur Protektion gegenüber Hypoxie-induzierten Zelltod. In der Normoxie wirkte PD153035 dagegen toxisch auf die Zellen (Abb. 10 A + B). Interessanterweise wurde dieser Effekt durch ansteigende Glukosekonzentrationen verstärkt.

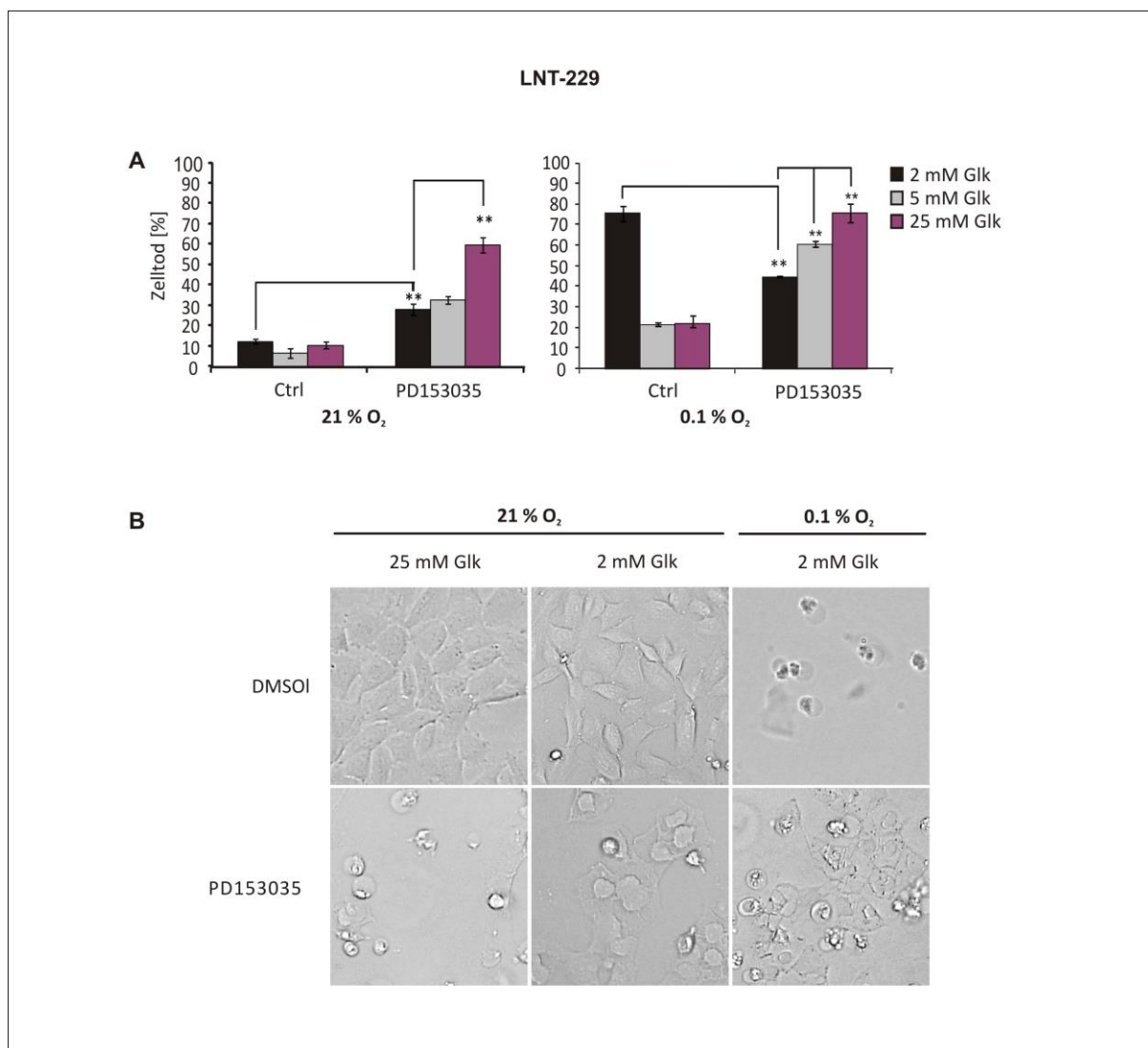


Abb. 10 Metabolische Bedingungen beeinflussen die Zytotoxizität der EGFR-Inhibition in LNT-229-Zellen
LNT-229-Zellen wurden mit dem EGFR-Inhibitor PD153035 (10 μ M) unter steigenden Glukosekonzentrationen (2 mM, 5 mM und 25 mM) sowohl in der Normoxie (21 % O₂) als auch in der Hypoxie (0.1 % O₂) behandelt, nach 48 h wurde der Zelltod im PI-FACS ermittelt. (B) LNT-229-Zellen wurden wie beschrieben behandelt und mikroskopisch untersucht.

Auch in U87MG-Zellen konnte die steigende Toxizität der EGFR-Inhibition durch zunehmende Glukosemengen in der Präsenz von Sauerstoff nachgewiesen werden (Abb.11 A). Die steigende Toxizität von PD153035 durch hohe Glukoseverfügbarkeit konnte auch in der Hypoxie gezeigt werden, allerdings war dieser Effekt in den U87MG-Zellen weniger stark ausgeprägt. Der Effekt der EGFR-Inhibition auf die Glioblastomzelllinien LNT-229 und U87MG wird in der Abbildung 10 B nochmal schematisch dargestellt.

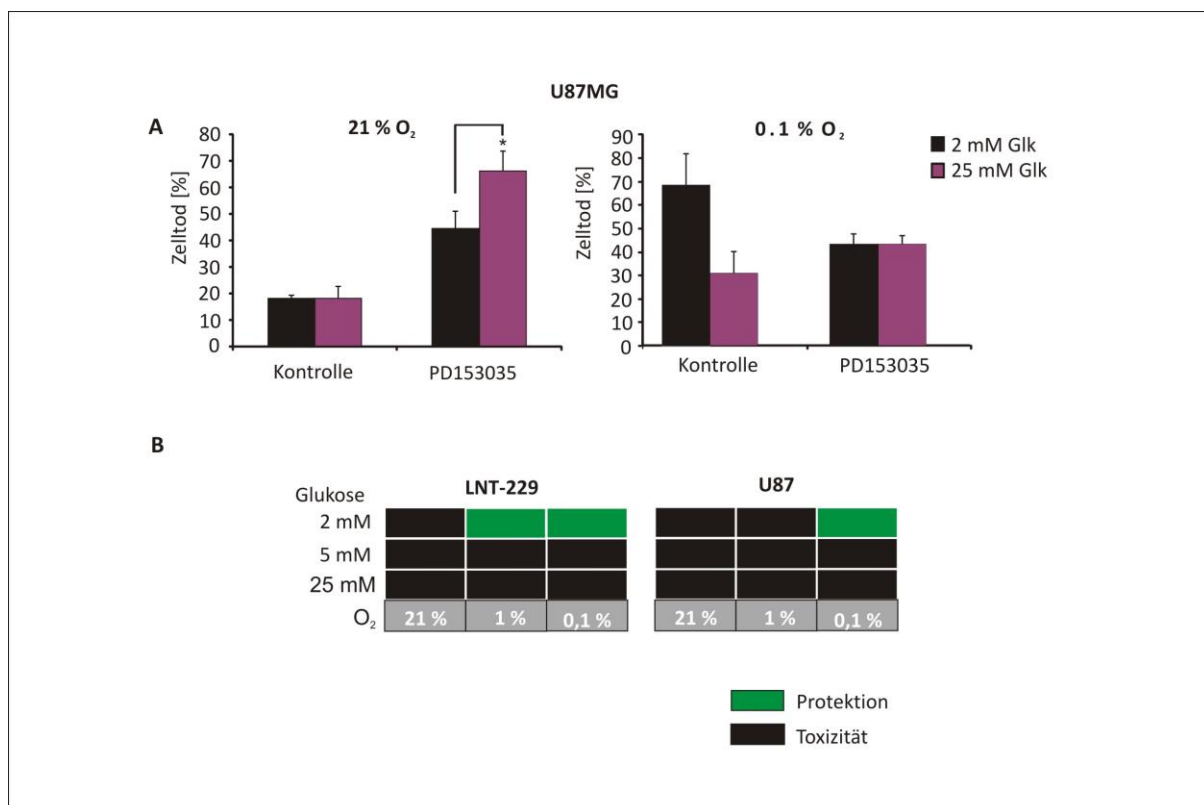


Abb. 11 Metabolische Bedingungen beeinflussen die Zytotoxizität der EGFR-Inhibition in U87MG-Zellen (A) U87MG-Zellen wurden für 72 h mit dem EGFR Inhibitor PD153015 behandelt und der Zelltod mittels PI-FACS analysiert. (B) Schematische Darstellung des Effekts der EGFR-Inhibition in Kombination mit steigender Glukosekonzentration, schwarz = zytotoxisch, grün = protektiv.

4.1.2 EGFR-Inhibition führt zu Caspasen-abhängigem Zelltod

Um den PD153035-vermittelten Zelltod in LNT-229-Zellen genauer zu charakterisieren, wurde untersucht, ob dabei Caspasen aktiviert werden. Die EGFR-Inhibition induzierte die Caspasen-Aktivierung, welche durch geringe Glukosekonzentrationen revertiert wurde (Abb. 12 A). Der pan-Caspase-Inhibitor zVAD-FMK führte dagegen zu einer starken Suppression der Caspasen-Aktivierung. Gleichzeitig wurde durch diesen Inhibitor der PD153035

vermittelte Zelltod blockiert (Abb. 12 B). Dies bestätigt die Vermutung, dass die Zytotoxizität des EGFR-Inhibitors Caspasen-abhängig ist. Um den Zusammenhang zwischen der Caspasen-Aktivierung und dem PD153035-induzierten Zelltod genauer zu untersuchen, wurde der Einfluss der EGFR-Inhibition auf den Zellzyklus untersucht (Abb. 12 C). Unter der Behandlung mit PD153035 ist ein Anstieg der sub-G1 Fraktion zu vermerken. Die simultane Behandlung mit zVAD führte zu keinem Anstieg der sub-G1 Fraktion.

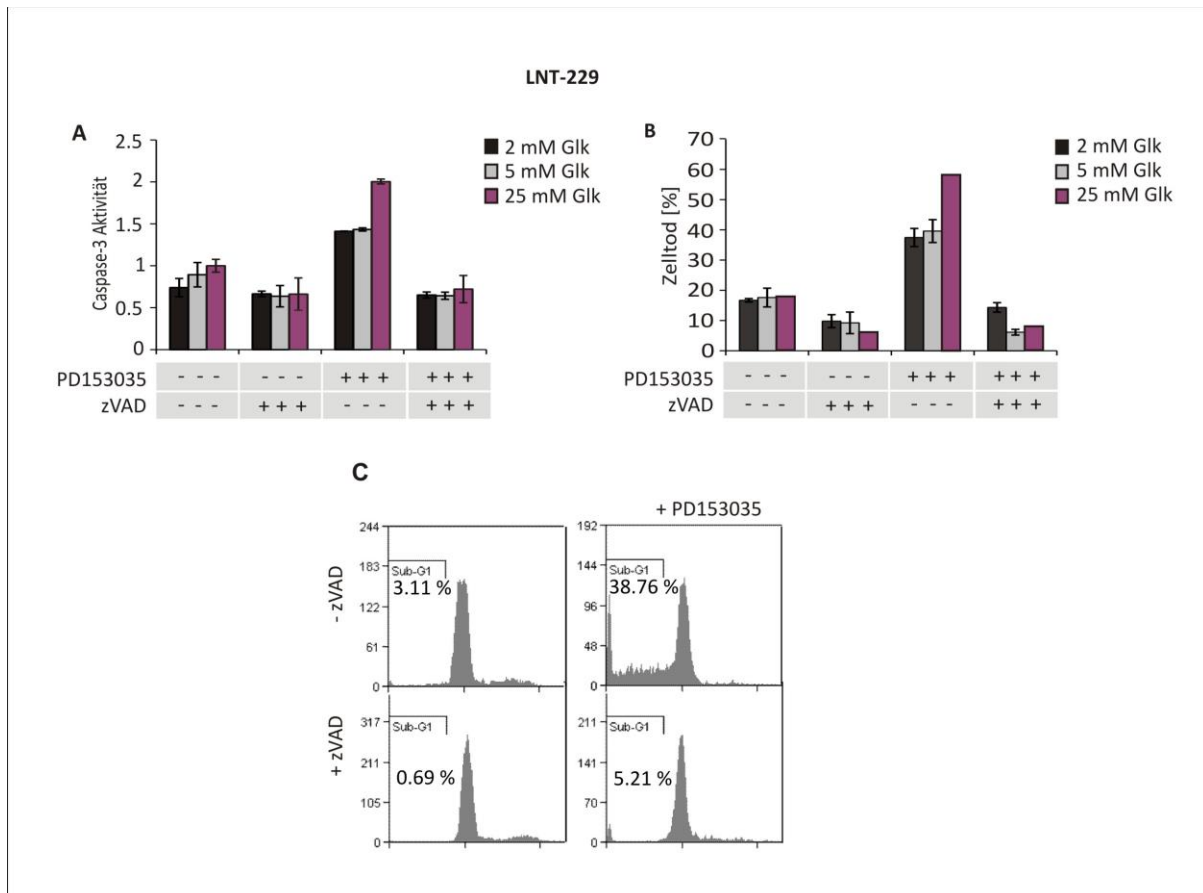


Abb. 12 Der PD153035-induzierte Zelltod basiert auf der Aktivierung von Caspasen

LNT-229-Zellen wurden mit PD153035 Monotherapie oder in Kombination mit zVAD-FMK (100 μ M) für 24 h in der Normoxie behandelt und anschließend der Zelltod analysiert. (A) Messung der Aktivität der Caspase-3 im FACS. (B) Der durch die Behandlung induzierte Zelltod wurde im PI-FACS gemessen. (C) Der Sub-G1 Anstieg wurde mittels Zellzyklus-FACS ermittelt.

4.1.3 EGF-Rezeptor Expression und dessen Signalkaskade

Nach der Etablierung des Effekts der geringen Glukoseverfügbarkeit auf die Toxizität der EGFR-Inhibition wurde untersucht, ob die Expression des EGFR selbst für die beobachteten

Effekte verantwortlich ist. Westernblot Analysen zeigen, dass die EGFR-Expression auf Proteinebene nicht durch verschiedene Glukosekonzentrationen (2 mM, 5 mM, 25 mM) moduliert wurde (Abb. 13 A). Die Analyse der oberflächlichen EGFR-Expression bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 13 B). Auch hier war durch Erhöhung des Glukoseangebots (2 mM und 5 mM) keine Veränderung in der EGFR-Expression nachweisbar. Aus diesem Grund wurde im nächsten Versuch der Effekt von steigenden Glukosekonzentrationen mit und ohne die konkomitante Behandlung mit PD153035 auf die EGFR-Signalkaskade untersucht (Abb. 13 C). Wie vermutet führte die EGFR-Inhibition durch PD153035 im Vergleich zu der Behandlung ohne EGFR-Inhibition zur Verminderung der Phosphorylierung der p90RSK, der extrazellulären Signal-regulierten-Kinase 1/2 (Erk 1/2), der Proteinkinase-B (PKB)/Akt und der S6-Kinase. Nur bei der Proteinkinase-B ist zu erkennen, dass die Menge an pAKT mit steigender Glukosekonzentration und simultaner PD153035 Inkubation abnimmt. Bei den übrigen Kinasen ist dieser Effekt jedoch nicht zu verzeichnen.

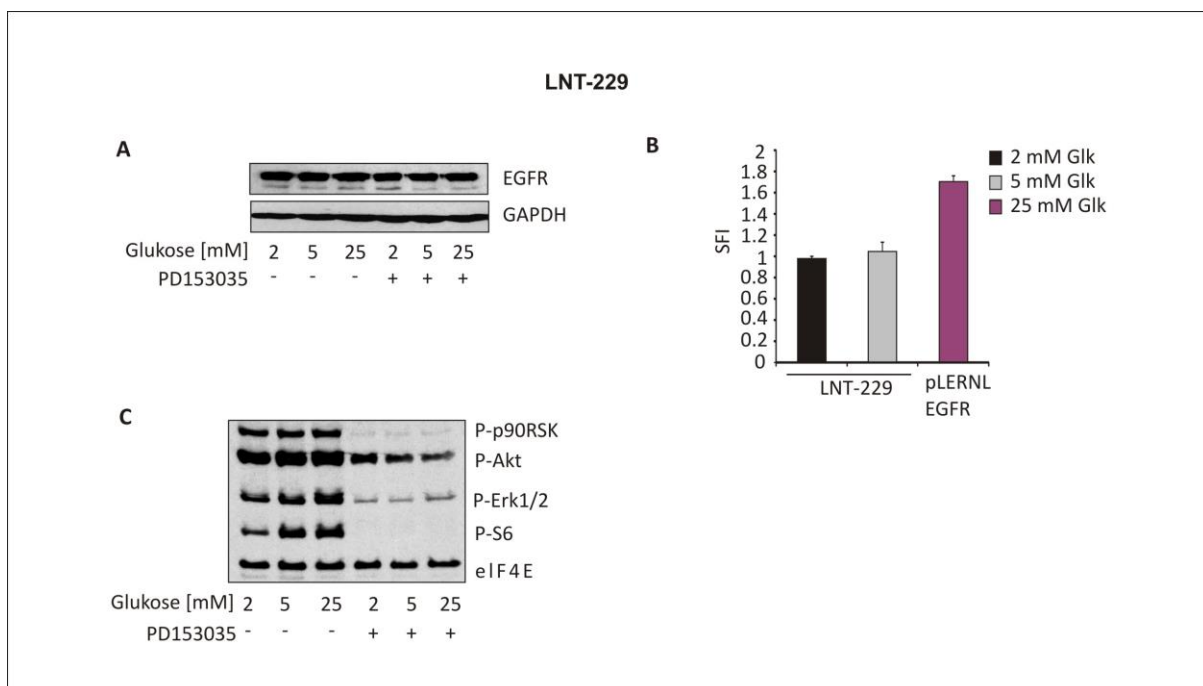


Abb. 13 Expression des EGFR und dessen *downstream* Signalkaskade

(A) Die Gliomzelllinie LNT-229 wurde wie angegeben für 6 h mit 2 mM, 5 mM oder 25 mM Glukose mit oder ohne konkomitante PD153035 (10 μ M) Zugabe in SFM behandelt und die EGFR Proteinkonzentration im Westernblot untersucht, als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. (B) Die EGFR-Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen, dazu wurden LNT-229-Zellen zunächst für 6 h mit 25 mM Glukose in SFM und anschließend 1 h mit 10 ng/ml EGF stimuliert. LNT-229-Zellen, die eine ektopische EGFR-Expression besitzen (pLERNL EGFR), dienten als Positivkontrolle, SFI = spezifische Fluoreszenz Index. (C) LNT-229-Zellen wurden in steigenden Glukosekonzentrationen +/- PD153035 für 48 h behandelt und die EGFR Signalkaskade im Westernplot detektiert (P-p90RSK, P-Akt, P-ERK1/2, P-S6; phosphorylierte Formen von

p90RSK, Akt, Erk1/2, S6 ribosomal protein). eIF4E entspricht der internen Ladekontrolle des Multiplex Antikörpers.

4.1.4 Die Aktivierung der AMPK wirkt protektiv gegenüber EGFR-Inhibition

Die Suppression der PD153035-vermittelten Toxizität durch limitierende Glukoseverfügbarkeit suggeriert, dass die Aktivierung der *AMP-activated protein kinase* (AMPK) die Auswirkung der EGFR-Inhibition beeinflussen könnte. Die Analyse der Proteindetektion zeigt, dass geringe Glukosekonzentrationen tatsächlich zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der AMPK führten (Abb. 14 A). Die Aktivierung der AMPK wurde zusätzlich durch die Analyse der Proteinexpression von ihrem Zielgen ACC überprüft. Sie phosphoryliert und inhibiert sowohl die ACC-1 (auch genannt ACC- α), als auch die ACC-2 (genannt ACC- β). ACC wurde durch Mangelbedingungen verstärkt phosphoryliert und bestätigte damit die Aktivierung der AMPK unter diesen Bedingungen (Abb. 14 A). In der Kombination mit PD153035 ist zu sehen, dass die Aktivierung der AMPK mit steigendem Glukosekonzentration abnimmt. Dennoch ist die Aktivierung der AMPK bei 25 mM Glukose in der Kombination mit PD153035 etwas höher als in den als Kontrolle (DMSO) behandelten Zelllysaten. Um eine mögliche Modulation der AMPK-Aktivierung auf die Toxizität von PD153035 unter hohen Glukosekonzentrationen zu verifizieren, wurden LNT-229 Zellen mit zwei verschiedene AMPK-Aktivatoren in der Anwesenheit von 25 mM Glukose analysiert (Abb. 14 B). Bei einem der Aktivatoren handelt es sich um 2-Deoxyglukose (2-DG). Dies ist ein Glukoseanalogon das durch die Hexokinase zu 2-Deoxyglukose-6-Phosphat (DG6P) umgesetzt wird und welches von der Phosphoglukose-Isomerase nicht weiter verstoffwechselt werden kann (152). Dies führt letztlich zum Abbruch der Glykolyse. Damit wird zum einen der Effekt eines reduzierten Glukoseangebots simuliert und es ist gleichzeitig ein bekannter Aktivator der AMPK (153). Bei A769662 handelt es sich um einen direkten Aktivator der AMPK (154). Abbildung 14 B zeigt, dass beide Aktivatoren im gleichen Ausmaß zur Phosphorylierung der AMPK und von ACC führten und dass dieser Effekt durch die konkomitierende Behandlung mit PD153035 verstärkt wurde (Abb. 14 B). Weiterhin führte die Behandlung mit 2-DG und A769662 entsprechend der Funktion der AMPK zur Suppression der Glykolyse (Abb. 14 C) und der Laktatproduktion (Abb. 14 D). Um die Auswirkung der AMPK Aktivierung auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurde der Zelltod im PI-FACS gemessen (Abb. 14 E). Wie vermutet übt 2-DG als Inhibitor der Glykolyse einen

toxischen Einfluss auf die Zellen aus. In der Kombination mit PD153035 hat die Behandlung mit 2-DG jedoch einen hochsignifikant protektiven Effekt auf die Zellviabilität verglichen mit der PD153035 Monotherapie. Auch die Kombination von PD153035 und A769662 führte zu einer hochsignifikanten Reduktion der Zytotoxizität.

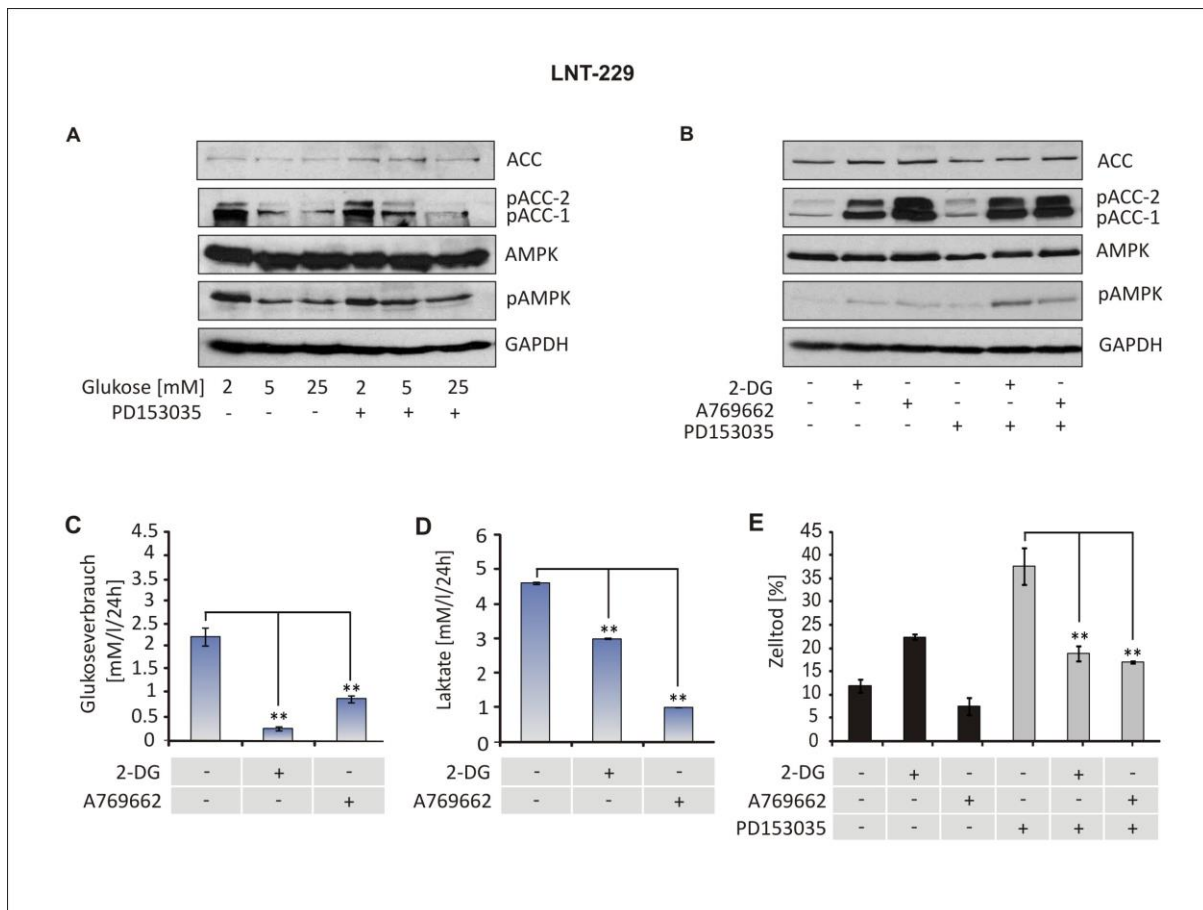


Abb. 14 AMPK-Aktivierung wirkt protektiv gegenüber EGFR-Inhibitor-induziertem Zelltod

LNT-229 Zellen wurden unter verschiedenen Glukosekonzentrationen in der Abwesenheit oder Präsenz von PD153035 für 6 h inkubiert. Die Proteinkonzentration von AMPK/pAMPK und ACC/pACC wurde im Westernblot analysiert. GAPDH diente als Ladekontrolle (B) Die Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle), 2-DG (10 mM), A769662 (100 μ M) allein oder in Kombination mit PD153035 (10 μ M) für 6 h bei 25 mM Glukose behandelt und die Proteinexpression wie in (A) untersucht. (C-D) Die Zellen wurden wie angegeben für 24 h mit 25 mM Glukose inkubiert und (C) der Glukoseverbrauch und (D) die Laktatproduktion evaluiert. (E) Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in (B) für 30 h bei 25 mM Glukose und 21 % Sauerstoff, anschließend wurde die Zellviabilität mittels PI-Färbung im FACS gemessen.

Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in U87MG und der Primärlinie MNOF132 erzielt werden (Abb. 15 A). In beiden Linien konnte die PD153035 vermittelte Toxizität durch 2-DG und A769662 signifikant revertiert werden. Um zu analysieren, ob diese antagonistischen Effekte der AMPK-Aktivatoren gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren spezifisch für

Gliomzellen sind, wurden zwei weitere Zellmodelle für den Tyrosinkinase-Inhibitor-induzierten Zelltod untersucht. In der Leukämiezelllinie K562 führte die Kombinationsbehandlung mit 2-DG und Imatinib zur signifikanten Reduktion des Zelltods im Vergleich zu Imatinib alleine (Abb. 15 B, links). Im Modell der Brustkrebslinie MDA-MB435 konnte dies nicht nachgewiesen werden, hier wirkte die Kombination von 2-DG und Lapatinib synergistisch (Abb. 15 B, rechts).

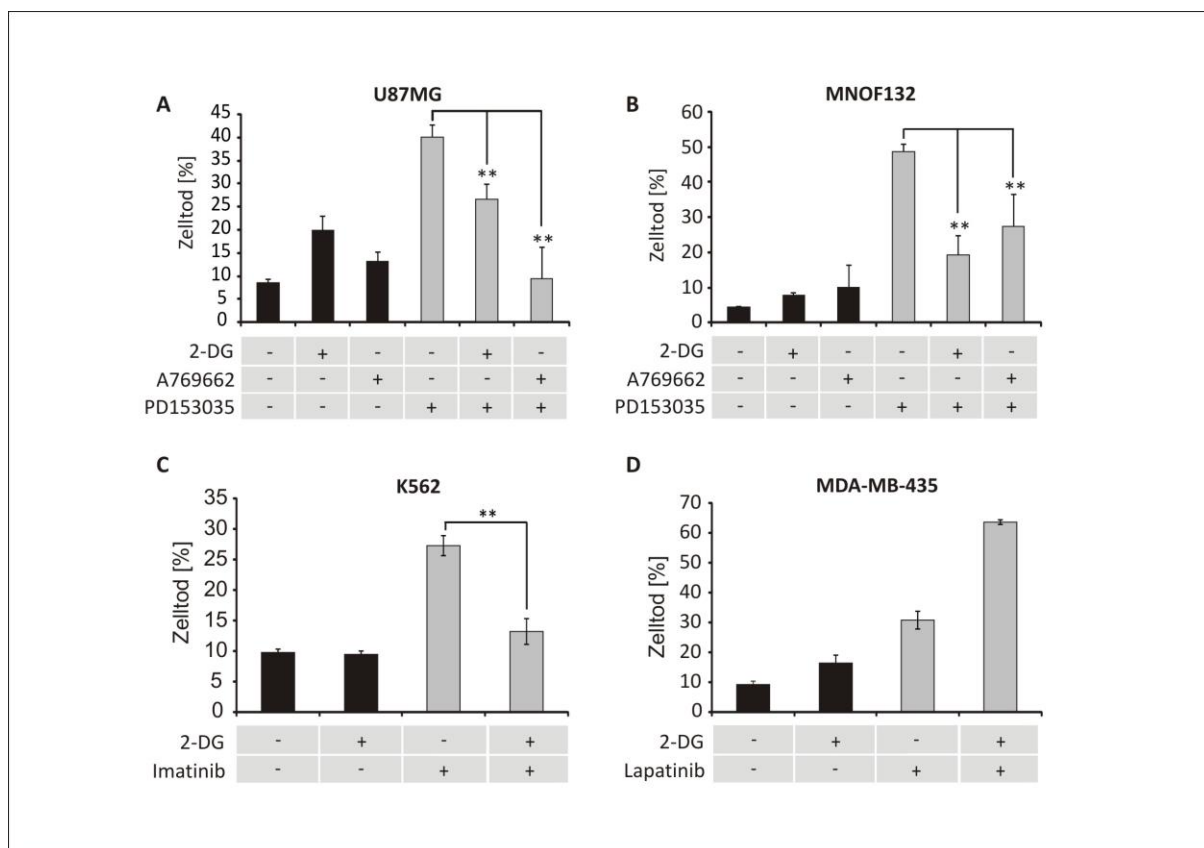


Abb. 15 Antagonistische Effekte des AMPK-Aktivators A769662 gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren

(A) Die etablierte U87MG und die primäre MNOF132 Gliomzelllinien wurden mit DMSO (Kontrolle) behandelt oder der Behandlung mit 2-DG, A769662 +/- PD153035 bei 25 mM Glk für 48 h und 21 % Sauerstoff ausgesetzt. Die Zellviabilität wurde anschließend mittels PI-FACS evaluiert. (B) Die Leukämiezelllinie K562 und die Mammakarzinomlinie MDA-MB-435 wurden wie angegeben bei 25 mM Glukose und 21 % Sauerstoff für 48 h behandelt und der Zelltod im PI-FACS analysiert.

4.1.5 *Knockdown* und Inhibition der AMPK sensitivieren gegenüber EGFR-Inhibition

Um die Rolle der AMPK in der EGFR-Inhibition zu bekräftigen, wurde die Expression der AMPK durch einen lentiviralen *knockdown* untersucht. Hierbei wurden LNT-229-Zellen zur Kontrolle mit *non-targeting* (SCRsh) und gegen die α 1- und α 2-Untereinheit (AMPKsh) gerichteten Plasmiden transfiziert. Die stabile Transfektion mit den spezifischen humanen

shRNA Plasmiden reduzierte signifikant die Expression der AMPK auf mRNA-Ebene (Abb. 16 A). Auch im Westernblot wurde deutlich weniger des nativen AMPK α 1/ α 2 Proteins, sowie des pACC Proteins detektiert (Abb. 16 B). Während die Kombination von 2-DG und A769662 mit PD153035 bei den Kontrollzellen zur signifikanten Reduktion des EGFR-Inhibitorvermittelten Zelltods führte, konnten diese AMPK-Aktivatoren den induzierten Zelltod in den AMPK *knockdown* Zellen (AMPKsh) nicht länger blockieren (Abb. 16 C). Zusätzlich zur genetischen Inaktivierung der AMPK, wurden LNT-229 Wildtyp- (Wt) Zellen mit dem pharmakologischen AMPK-Inhibitor Compound C behandelt (Abb. 16 D). Compound C simulierte den Effekt des AMPK-*knockdowns* auf Proteinebene, indem es zur Reduktion der Proteinkonzentration der pAMPK und pACC führte. Dies konnte durch die Analyse im PI-FACS bekräftigt werden, indem die Kombination von PD153035 und Compound C einen synergistischen Effekt auf die Toxizität ausübte und zu einem signifikanten Anstieg des Zelltods führte (Abb. 16 E).

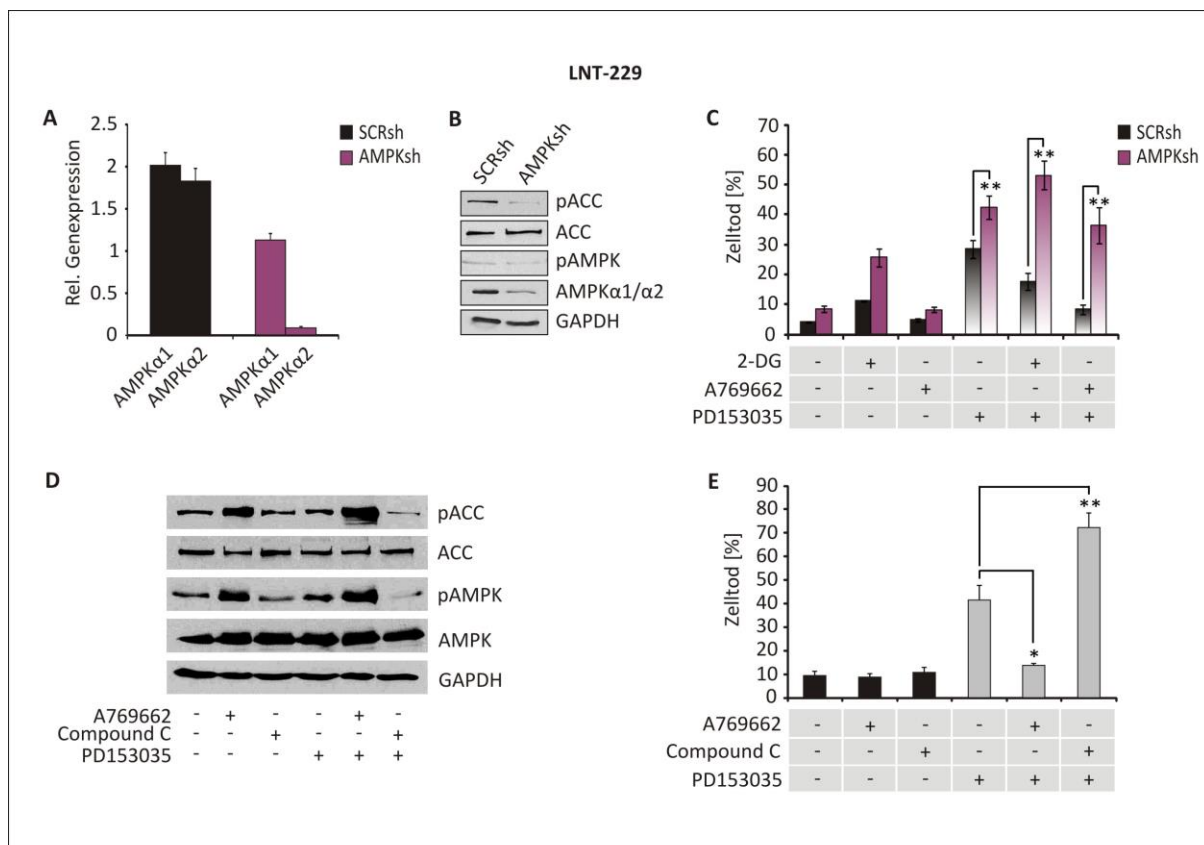


Abb. 16 Lentiviraler *knockdown* und pharmakologische Inhibition der AMPK revertieren den EGFR-Inhibitorvermittelten protektiven Effekt

(A) LNT-229-Zellen wurden stabil mit der Kontroll shRNA (SCRsh) transfiziert oder doppelt gegen die AMPK-Untereinheiten AMPK- α 1 und AMPK- α 2 (AMPKsh) transfiziert und die relative Genexpression mittels qPCR überprüft. (B) Der *knockdown* wurde durch die Detektion der Proteine AMPK/pAMPK und ACC/pACC verifiziert.

und GAPDH als Ladekontrolle genutzt. (C) SCRsh- und AMPKsh-Zellen wurden wie angegeben für 48 h in der Anwesenheit von 25 mM Glukose behandelt und die Zellviabilität im PI-FACS untersucht. (D) LNT-229-Wt-Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle), A769662 (10 μ M) oder Compound C (5 μ M) für 6 h bei 25 mM Glukose inkubiert und die Expression der AMPK und ACC, sowie ihrer phosphorylierten Formen im Westernblot analysiert. (E) LNT-229-Zellen wurden wie in (D) angegeben behandelt und der induzierte Zelltod im PI-FACS gemessen.

4.2 Der Transkriptions-Co-Aktivator PGC-1 α fördert das charakteristische biologische Verhalten humaner Glioblastomzellen

Um mögliche Resistenzmechanismen von Gliomen detaillierter zu untersuchen, wurde in den folgenden Abschnitten die Funktion von PGC-1 α in humanen Glioblastomlinien evaluiert. Wie bereits erwähnt, handelt es sich beim Glioblastom um einen Tumor der durch stark hypoxische Areale gekennzeichnet wird. PGC-1 α wird ebenfalls wie die AMPK durch Stresssituationen wie sie durch Nährstoffmangel, Hypoxie oder durch die Bildung von ROS entstehen, aktiviert. Aus diesem Grund wurde, wenn nicht anders beschrieben, die Funktion von PGC-1 α unter Mangelbedingungen untersucht. Dazu wurden die Zellen bei den Versuchen mit Glukose reduziertem (i.d.R. 2 mM Glukose) Serum-freiem Medium (SFM) und in der Anwesenheit (21 %) oder Abwesenheit (0,1 %) von Sauerstoff kultiviert.

4.2.1 Die PGC-1 α Expression ist im Glioblastom mit einer geringeren Überlebensdauer assoziiert

Durch seine Transkriptions-Cofaktor-Aktivität beeinflusst PGC-1 α ein breites Spektrum von Signalwegen. Die Analyse in der R-2 Datenbank zeigt, dass Glioblastompatienten mit einer hohen PGC-1 α -Expression im Tumorgewebe eine reduzierte Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen PGC-1 α -Expression erreichen (Abb. 17 A). Daher wurde zunächst die Expression von *PGC-1 α* in etablierten Gliomlinien, sowie in Primärkulturen untersucht (Abb. 17 B + C). Es zeigte sich, dass die Expression von *PGC-1 α* in beiden Gruppen sehr zellspezifisch ist. Bei den Linien G361 und SK-MEL-28 handelt es sich um Melanomlinien, die als Positiv- und Negativkontrolle für die *PGC-1 α* -Genexpression genutzt wurden (155).

Die *in silico* Analyse gibt einen Hinweis darauf, dass *PGC-1 α* im primären Tumorgewebe stärker exprimiert wird als in Zelllinien (Abb. 17 D). Um einen Einblick in die Rolle von PGC-1 α in Gliomen zu erhalten, wurde die Expression von *PGC-1 α* lentiviral blockiert. Dazu diente die Gliomlinie U343MG welche eine hohe *PGC-1 α* -Expression aufwies. Die mRNA-

Expression von *PGC-1 α* konnte mit der Sequenz PGC-1 α sh#1 um mehr als 94 % reduziert werden (Abb. 17 E). Aufgrund des Aufkommens zahlreicher unspezifischer Banden war die Etablierung eines PGC-1 α Anikörpers und damit der Nachweis auf Proteinebene nicht möglich. Es wurde bereits gezeigt, dass Hypoxie die PGC-1 α -Expression induziert (132). Aus diesem Grund wurde die *PGC-1 α* -Expression unter hypoxischen (0.1 %) im Vergleich zu normoxischen (21 %) Bedingungen in den PGC-1 α sh- und SCRsh-Zellen untersucht (Abb. 17 G). Wie vermutet förderte Hypoxie erheblich die *PGC-1 α* -Expression in den Kontrollzellen, jedoch nicht in den PGC-1 α sh-Zellen.

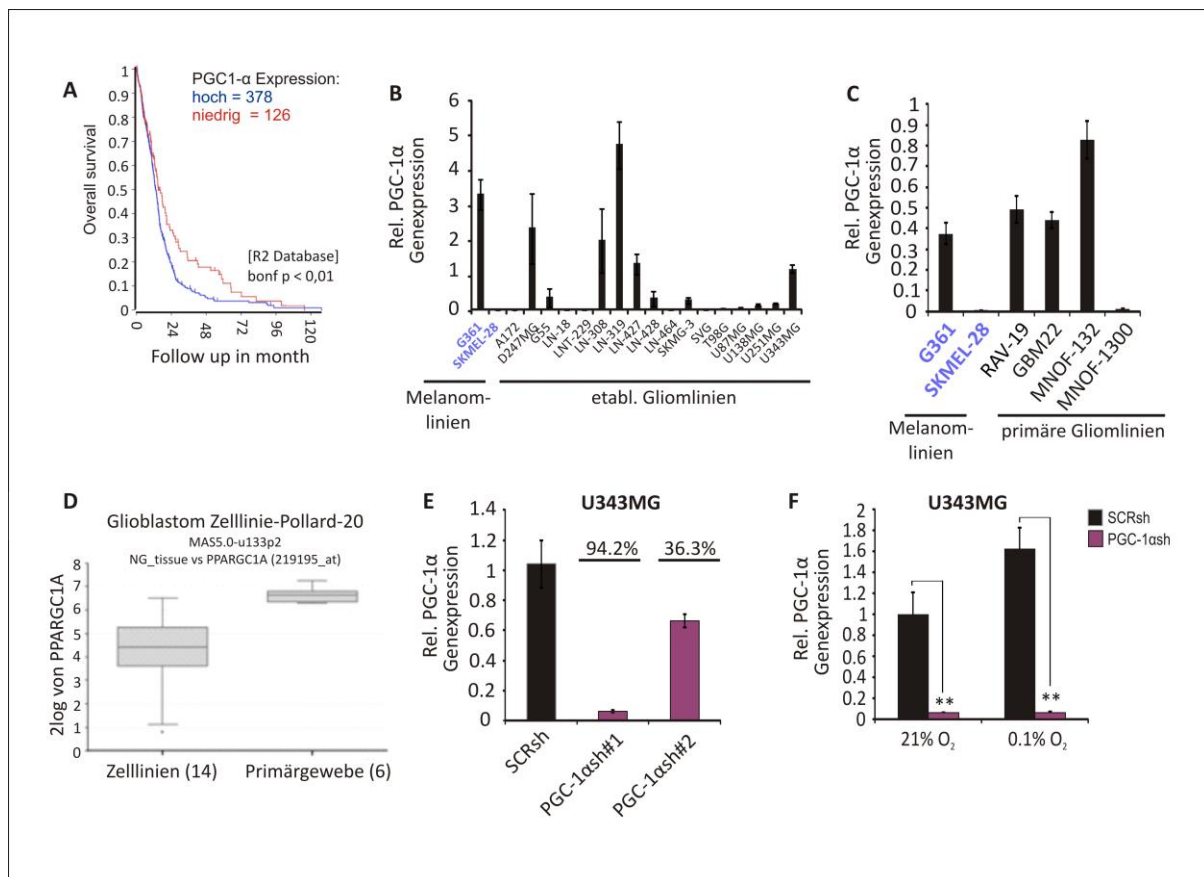


Abb. 17 PGC-1 α -Expression in humanen Gliomlinien

(A) R2-Datenbank-Analysen zeigen, dass eine verstärkte PGC-1 α Expression mit einer schlechteren Überlebensrate korreliert. (B) Quantitative *PGC-1 α* mRNA-Expression von etablierten, humanen Glioblastomlinien; die Melanomlinie G361 diene als Positivkontrolle und SK-MEL-28 als Negativkontrolle. (C) Quantitative *PGC-1 α* mRNA-Expression von primären, humanen Glioblastomlinien; die Melanomlinie G361 diene als Positivkontrolle und SK-MEL-28 als Negativkontrolle. (D) R2-Datenbank-Analyse der PGC-1 α -Expression in Zelllinien vs. Primärgewebe. (E) Stabiler *knockdown* von *PGC-1 α* mit zwei verschiedenen PGC-1 α -shRNA Plasmiden (PGC-1 α sh#1 und PGC-1 α sh#2) in U343MG-Zellen. (F) Expression von *PGC-1 α* in PGC-1 α sh- (=PGC-1 α sh#1) und SCRsh-Zellen unter 21 % Sauerstoff im Vergleich zu 0.1 % Sauerstoff.

Über PGC-1 β wurde gleichermaßen berichtet, dass es in stark oxidativ aktiven Geweben exprimiert wird (123). Dies lässt vermuten, dass PGC-1 β ebenfalls eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Biogenese und Funktion ausüben könnte. Somit könnte die Expression von PGC-1 β die Suppression von PGC-1 α möglicherweise kompensieren. Zunächst wurde die allgemeine Expression von *PGC-1 β* in verschiedenen etablierten Zelllinien untersucht. Wie es auch bei PGC-1 α der Fall war, besitzen die Gliomlinien ein sehr heterogenes Expressionslevel von *PGC-1 β* (Abb. 18 A). Um eine mögliche Kompensation der Depletion von PGC-1 α durch PGC-1 β zu überprüfen, wurden U343SCRsh- und U343PGC-1 α sh-Zellen unter 21 % und 0,1 % Sauerstoff kultiviert und die Expression von *PGC-1 β* in der quantitativen (Q)RT-PCR kontrolliert (Abb. 18 B). Es konnte keine Korrelation zwischen dem Verlust von *PGC-1 α* und einer parallelen Hochregulation von *PGC-1 β* nachgewiesen werden.

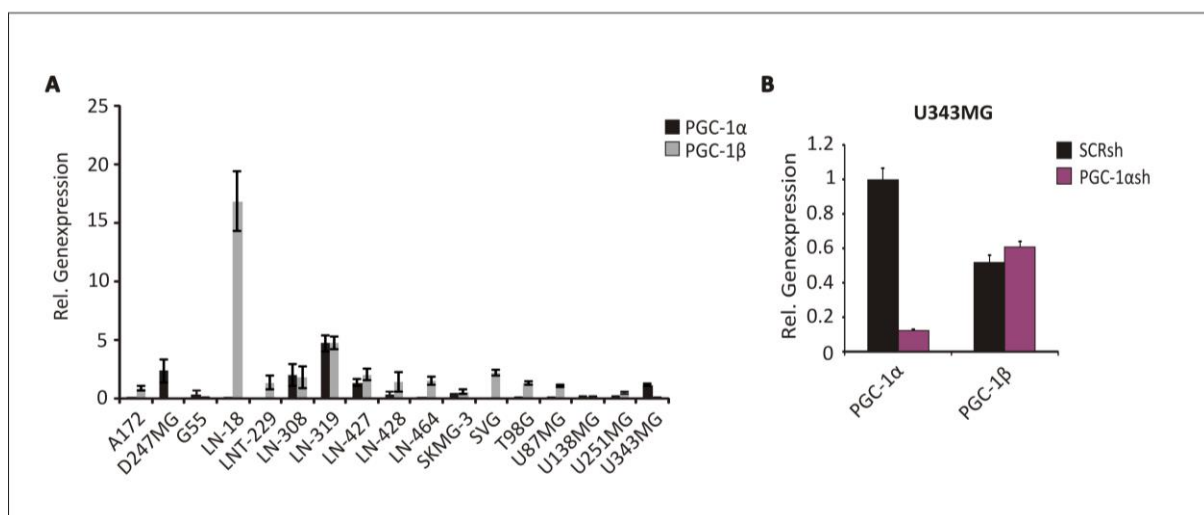


Abb. 18 Expression von PGC-1 β

(A) Dargestellt ist die mRNA Expression von *PGC-1 β* in diversen Glioblastomlinien. (B) QRT-PCR Analyse der Expression von *PGC-1 β* und *PGC-1 α* U343SCRsh- und U343PGC-1 α sh-Zellen nach 24 h unter normoxischen Bedingungen.

4.2.2 Knockdown von PGC-1 α minimiert die Expression mitochondrialer Gene, den Glukoseverbrauch und die ROS-Abwehr

Wegen der bekannten Funktion von PGC-1 α in der Regulation der mitochondrialen Biogenese wurde nun überprüft, ob diese im Glioblastom ebenfalls an der Regulation der mitochondrialen Funktion beteiligt ist. Mit Ausnahme der *ATP-SYNTHASE*, führte der *knockdown* von PGC-1 α zur Runterregulation verschiedener mitochondrialer Gene (*COXI*,

COXII, *ND1*, *CYTC*) (Abb. 19 A, links). Der *estrogen-related-receptor-alpha* (*ERRα*) und der *nuclear respiratory factor-1, -2* (*Nrf-1*, *Nrf-2*) werden durch *PGC-1α* aktiviert, coexprimiert und sie regulieren selbst die Expression von *PGC-1α* (131,156). Daher wurde anhand der mRNA-Expression überprüft, ob die Suppression von *PGC-1α* die Genexpression dieser Proteine beeinflusst. Das Expressionslevel von *ERRα*, *NRF-1* und *NRF-2* war in den *PGC-1α*sh-Zellen tatsächlich niedriger im Vergleich zu den SCRsh-Kontrollzellen (Abb. 19 A, rechts). Die *PGC-1α*-knockdown vermittelte Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials verifizierte die mitochondriale Dysfunktion in diesen Zellen (Abb. 19 B). Um die Auswirkung dieser Defizite auf die zelluläre Respiration zu evaluieren, wurde der Sauerstoffverbrauch in beiden Zelllinien gemessen (Abb. 19 C + D). Demnach resultierte aus der verringerten Expression mitochondrialer Gene und dem verminderten Membranpotential auch eine signifikante Reduktion der oxidativen Phosphorylierung in den *PGC-1α*sh-Zellen. (Abb. 19 C). Die Auftragung der Sauerstoffabnahme pro Stunde verdeutlicht nochmal die *PGC-1α*-knockdown-vermittelte Minderung des Sauerstoffverbrauchs (Abb.19 D).

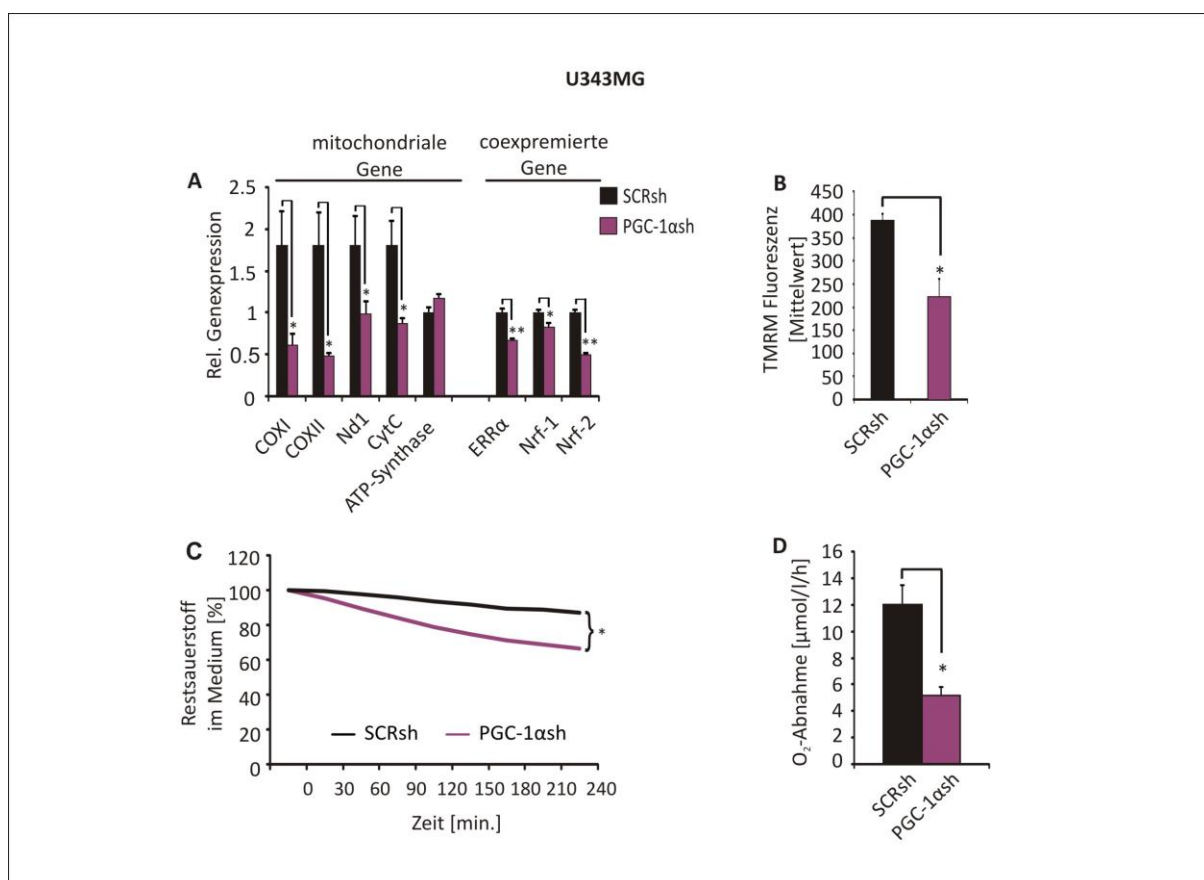


Abb. 19 *PGC-1α* reguliert die Expression mitochondrialer Gene und die zelluläre Respiration

(A) Quantifizierung der Genexpression mitochondrialer (*COXI*, *COXII*, *Nd1*, *CytC*, *ATP-synthase*) und mit PGC-1 α coexprimierter (*ERR α* , *NRF-1*, *NRF-2*) Gene der Kontrollzellen (SCRsh) und PGC-1 α -*knockdown*-Zellen (PGC-1 α sh); die Zellen wurden vor der RNA-Isolation bei 21 % Sauerstoff und mit normalem DMEM Medium behandelt. (B) Messung der mitochondrialen Membrandepolarisation mittels TMRM-FACS, die Zellen wurden für 30 h bei 21 % Sauerstoff und mit SFM mit niedriger Glukosekonzentration (2 mM) behandelt. (C) Die Zellen wurden mit FCS-haltigem DMEM inkubiert und der Verlauf der zellulären Atmung mittels Fluoreszenz basiertem PreSens System gemessen. (D) Gezeigt ist der Sauerstoffverbrauch der PreSens Messung pro Stunde.

Neben der Funktion in der mitochondrialen Biogenese, besitzt PGC-1 α weitere metabolische Kontrollfunktionen. Dabei reguliert es auch die Expression des Glukosetransporters Glut-4 in Skelettmuskelzellen (157,158). Im Gehirn handelt es sich bei den Transportern Glut-1 und -3 um die vorherrschend exprimierten Glukosetransporter und eine Überexpression dieser Transporter ist im Glioblastom mit einer schlechten Prognose assoziiert (159-161). Wie bereits lange bekannt wird das Expressionslevel von Glukosetransportern durch Hypoxie verstärkt (162,163). Daher wurde die mRNA-Expression beider Transporter sowohl in Normoxie, als auch in Hypoxie untersucht (Abb. 20 A). Wie vermutet führte Hypoxie zu einer Induktion der Transkription beider Transporter. PGC-1 α sh-Zellen induzierten jedoch ein signifikant niedrigeres *Glut-1* und *Glut-3* Expressionslevel verglichen mit den Kontrollzellen. Um die Auswirkung der geminderten Glukosetransporter-Expression der PGC-1 α sh-Zellen genauer zu evaluieren, wurde die Glukoseaufnahme mit dem fluoreszierendem Glukoseanalogon 2-NBDG gemessen. Die PGC-1 α sh-Zellen wiesen demnach eine Beeinträchtigung des Glukoseimports verglichen mit den SCRsh-Zellen auf (Abb. 20 B). Während sich bei den SCRsh-Zellen die Aufnahme von 2-NBDG mit steigender 2-NBDG-Konzentration und Inkubationszeit erhöhte, wiesen die PGC-1 α -supprimierten-Zellen eine signifikant niedrigere 2-NBDG-Konzentration auf. Um die reduzierte Glukoseaufnahme zu validieren wurde als nächstes der Glukoseverbrauch der PGC-1 α sh-Zellen im Vergleich zu den SCRsh-Zellen gemessen. Es konnte eine signifikante Abnahme sowohl des Glukoseverbrauchs (Abb. 20 C) als auch der Laktatproduktion (Abb. 20 D) unter normoxischen Bedingungen ermittelt werden. Dies zeigt, dass kein anaerober Abbau der Glukose zu Laktat stattfindet, sondern, dass Pyruvat möglicherweise im Citratzyklus weiter verstoffwechselt wird.

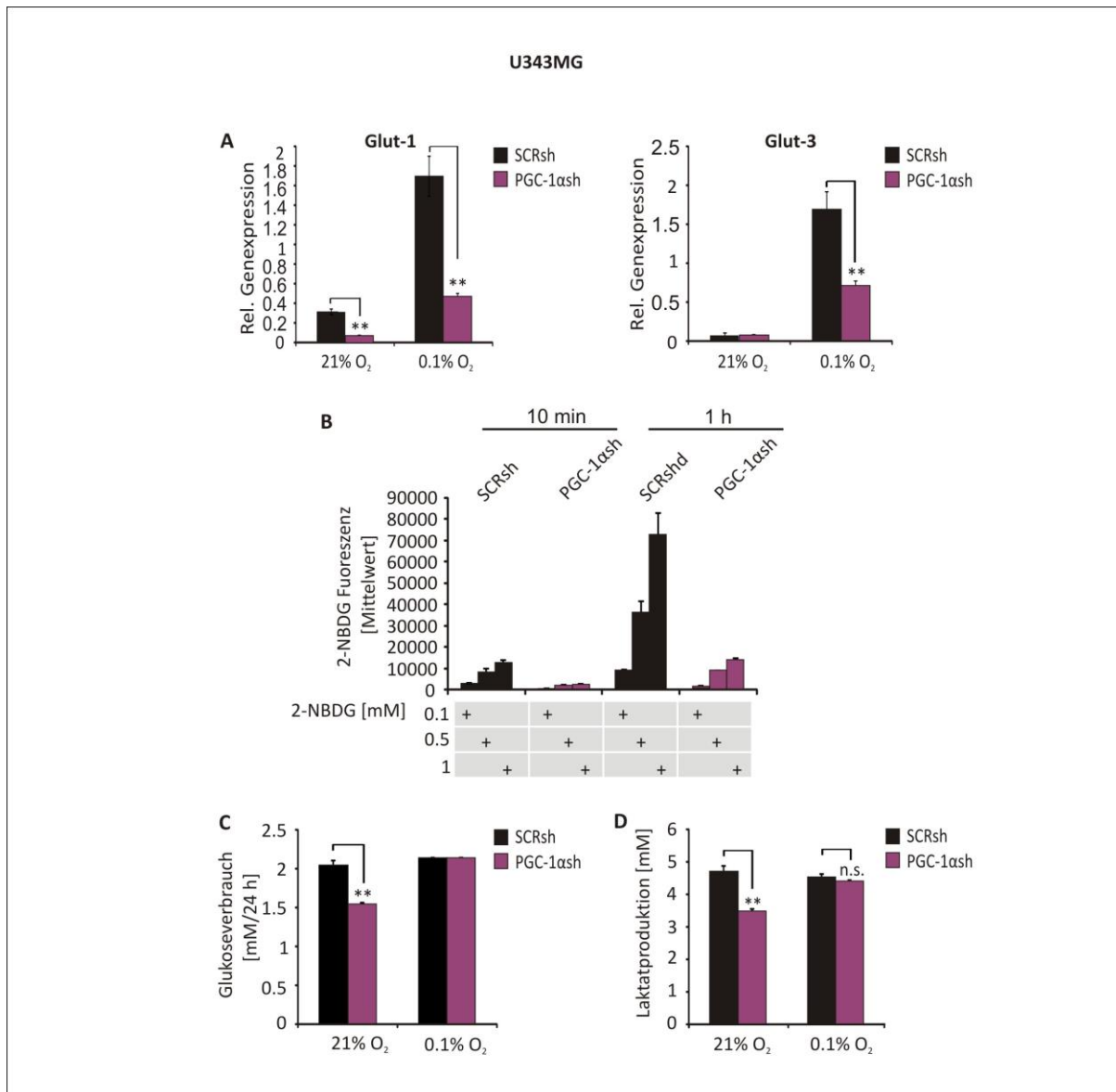


Abb. 20 Die Expression von PGC-1 α fördert die Glukoseaufnahme

Die Zellen wurden mit Glukose restringiertem (2 mM Glk) SFM für 24 h behandelt und in der Normoxie (21 % O₂) oder Hypoxie (0,1 % O₂) inkubiert. (A) Relative mRNA-Expression der Glukosetransporter *glut-1* und *glut-3* unter Nährstoffmangelbedingungen und in der Anwesenheit (21 % O₂) oder Abwesenheit (0,1 % O₂) von Sauerstoff gemessen. (B) Durchflusszytometrie zur Analyse der Glukoseaufnahme durch 2-NBDG; U343SCRsh- und PGC-1 α sh-Zellen wurden mit 2 mM Glk in SFM für 10 Min. und 1 h mit 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM 2-NBDG inkubiert. (C) Nach der Inkubation bei 21 % und 0,1 % Sauerstoff wurde (C) die Restglukose und (D) der Laktatgehalt im Medium gemessen.

Da PGC-1 α sh-Zellen einen veränderten Metabolismus aufweisen und sowohl in der Glykolyse als auch in der Respirations-Fähigkeit eingeschränkt sind, wurde im nächsten Schritt untersucht ob eine veränderte Abhängigkeit von Glutamin bei diesen Zellen vorhanden ist. In der Tat scheinen die SCRsh-Zellen bei der Betrachtung des Wachstumsverhaltens deutlich mehr von Glutamin zu profitieren als die PGC-1 α -

supprimierten-Zellen (Abb. 21 A). Abweichend dazu ist kein Unterschied in der Expression der Glutaminase (*GLS*) 1 und sogar eine Hochregulierung der *GLS2* in den PGC-1 α sh Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen vorhanden, sodass kein Zusammenhang zwischen der Expression der Glutaminasen und dem verminderten Wachstum bei Glutaminzugabe verifiziert werden konnte (Abb. 21 B).

Bei der Behandlung eines Glioblastoms ist Temozolomid ein sehr wichtiges Chemotherapeutikum. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der PGC-1 α -Suppression auf das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht, während sie verschiedenen Konzentrationen an Temozolomid ausgesetzt waren. Verglichen mit den Kontrollzellen (links) hatte der *knockdown* von PGC-1 α jedoch keinen Einfluss auf die Resistenz der Zellen gegenüber Temozolomid (TMZ) (Abb. 21 C).

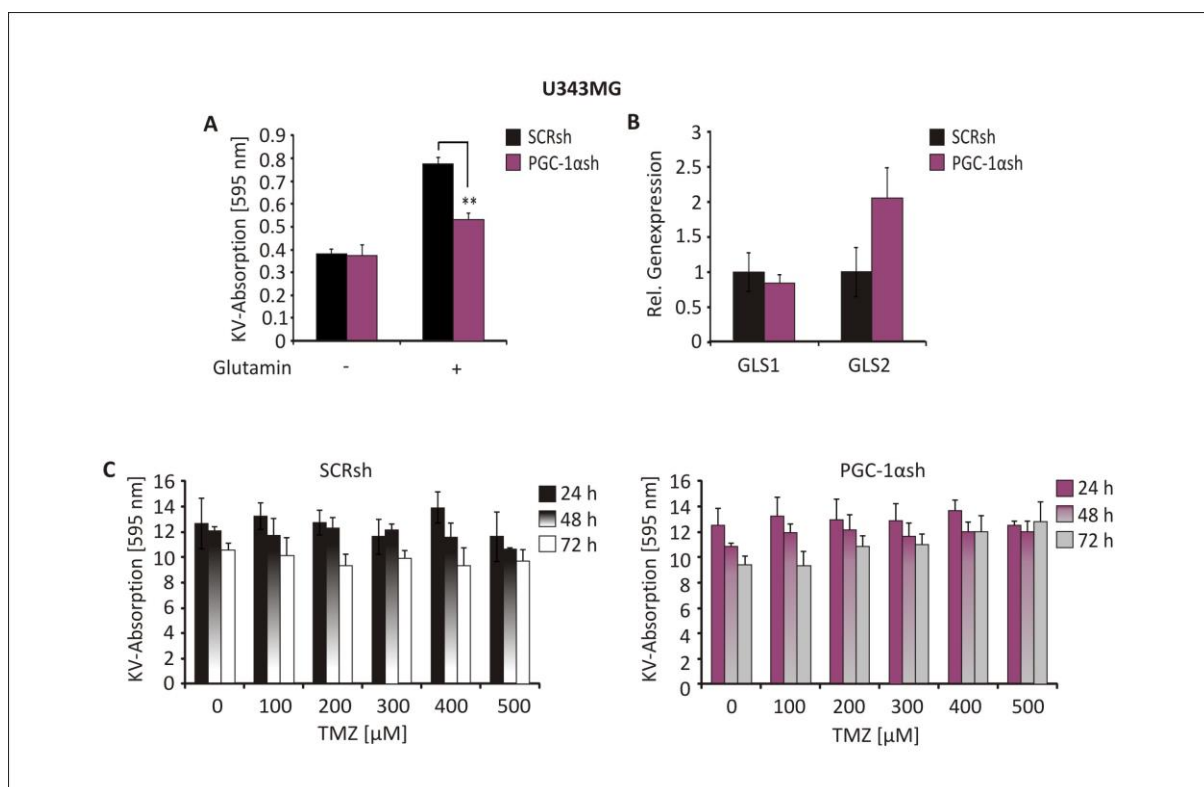


Abb. 21 Wachstumsverhalten unter der Zugabe von Glutamin und TMZ

(A) KV-Färbung nach 72 h Inkubation mit SFM und 25 mM Glukose unter Normoxie. (B) qRT-PCR Analyse der *GLS1* und *GLS2*. Die Zellen wurden in SFM mit 25 mM Glukose für 6 h inkubiert. (C) Behandlung der SCRsh- und PGC-1 α sh-Zellen mit steigenden TMZ-Konzentrationen in SFM mit 2 mM Glukose für 24-72 h bei 21 % O₂.

PGC-1 α übt auch eine wichtige Funktion im Mechanismus der ROS-Detoxifizierung aus (164-166). Für die weitere Charakterisierung der Zellen und um aufzuklären, ob die verminderte

respiratorische Aktivität zu einer Abnahme der ROS-Akkumulation führt, wurde das ROS-Level in beiden Zellen gemessen. Dazu wurde die Aufnahme des ROS-Indikators H_2DCFDA im FACS gemessen (Abb. 22 A). Interessanterweise wurde entgegen der Vermutung in den PGC-1 α supprimierten Zellen ein signifikant höheres ROS-Level nachgewiesen. Das höhere ROS-Level der PGC-1 α sh-Zellen steigerte sich außerdem von Normoxie zu Hypoxie. Entsprechend wiesen auch Gene der ROS-Abwehr in den PGC-1sh-Zellen ein vermindertes Expressionslevel auf. Sowohl *SOD1* als auch *SOD2*, jedoch nicht *CATALASE* waren signifikant runter reguliert. (Abb. 22 B). In Konsequenz der reduzierten *SOD-1* und *SOD2*-Expression erwiesen sich die PGC-1 α sh-Zellen außerdem entsprechend sensitiver gegenüber der exogenen H_2O_2 -Zugabe als die Kontrollzellen (Abb. 22 C).

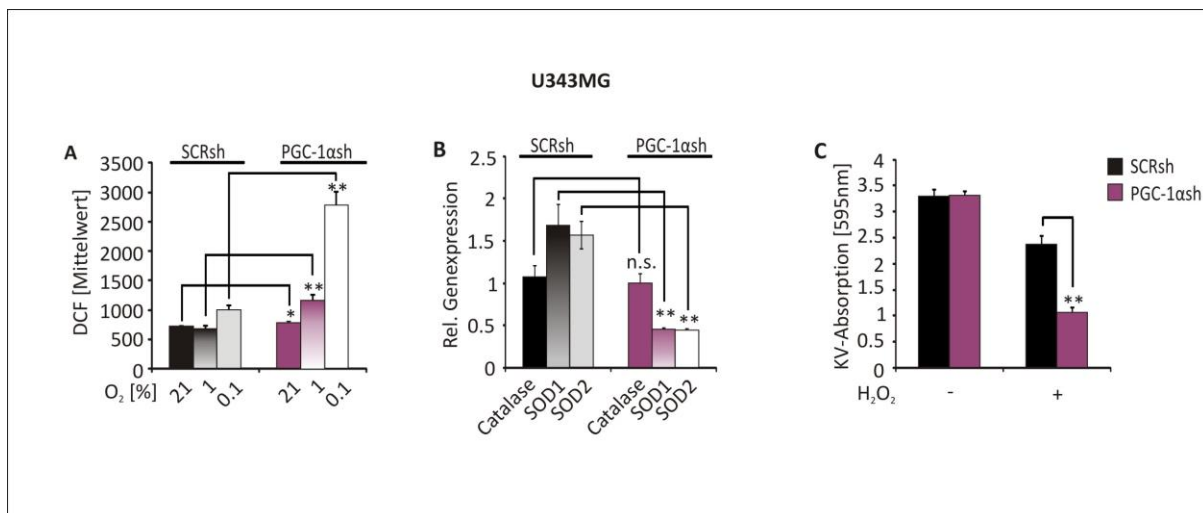


Abb. 22 PGC-1 α ist für die ROS-Abwehr verantwortlich

(A) U343SCRsh- und U343PGC-1 α sh-Zellen wurden für 24 h bei 2 mM SFM und unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit inkubiert und die Menge an ROS mit dem fluoreszierenden ROS-Indikator H_2DCFDA im FACS gemessen. (B) Gezeigt ist die qPCR Analyse von Genen die der ROS-Abwehr dienen, die Zellen wurden dazu mit 2 mM SFM in der Präsenz von 21 % Sauerstoff für 6h inkubiert. (C) Nachdem die Zellen 0,8 mM H_2O_2 für 4 h bei 21 % O_2 in DMEM Medium mit FCS ausgesetzt wurden, wurde die Zellviabilität mittels KV-Assay bestimmt.

4.2.3 Nährstoffdepletion erhöht die ATP-Konzentration von PGC-1 α supprimierten Zellen und verstärkt die Konzentration von Metaboliten des Citratzyklus (CAC) und des Pentose-Phosphat-Wegs (PPP)

Aufgrund der mangelhaften Atmungskapazität und der niedrigeren glykolytischen Aktivität der PGC-1 α sh-Zellen, wurde daher die Energiebilanz beider Sub-Zelllinien überprüft. Damit sollte untersucht werden ob womöglich alternative Signalwege in den PGC-1 α sh-Zellen

angeschaltet werden. Die bisher ermittelten Daten suggerieren, dass die PGC-1 α -*knockdown*-Zellen weniger metabolisch aktiv sind. Aus diesem Grund wurde die Vermutung aufgestellt, dass diese Zellen womöglich von einer verbesserten Energiehomöostase unter Mangelbedingungen profitieren. Daher wurde das Level von verschiedenen intrazellulären Metaboliten analysiert. Wie vermutet führte die verringerte metabolische Aktivität der PGC-1 α sh-Zellen zum Erhalt des ATP-Levels und der Energiebilanz unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 23 A), dabei muss die limitierte Verfügbarkeit von Glukose im experimentellen Ansatz berücksichtigt werden. Interessanterweise zeigte die Untersuchung der Metabolite Fumarat, Malat, Citrat und α -Ketoglutarat des Citratzyklus (Abb. 23 B) und der Metabolite Ribulose-5-Phosphat und 6-Phosphogluconat des Pentose-Phosphat-Signalwegs (PPP) (Abb. 23 C), dass die PGC-1 α -supprimierten-Zellen im Vergleich zu den SCRsh-Zellen ein höheres Level dieser Metabolite unter Hypoxie besitzen. Dies ist ebenfalls bei Hexose-6-Phosphat und Pyruvat der Fall (Abb. 23 C), die beide neben der Glykolyse auch durch den Pentose-Phosphat-Weg metabolisiert werden können.

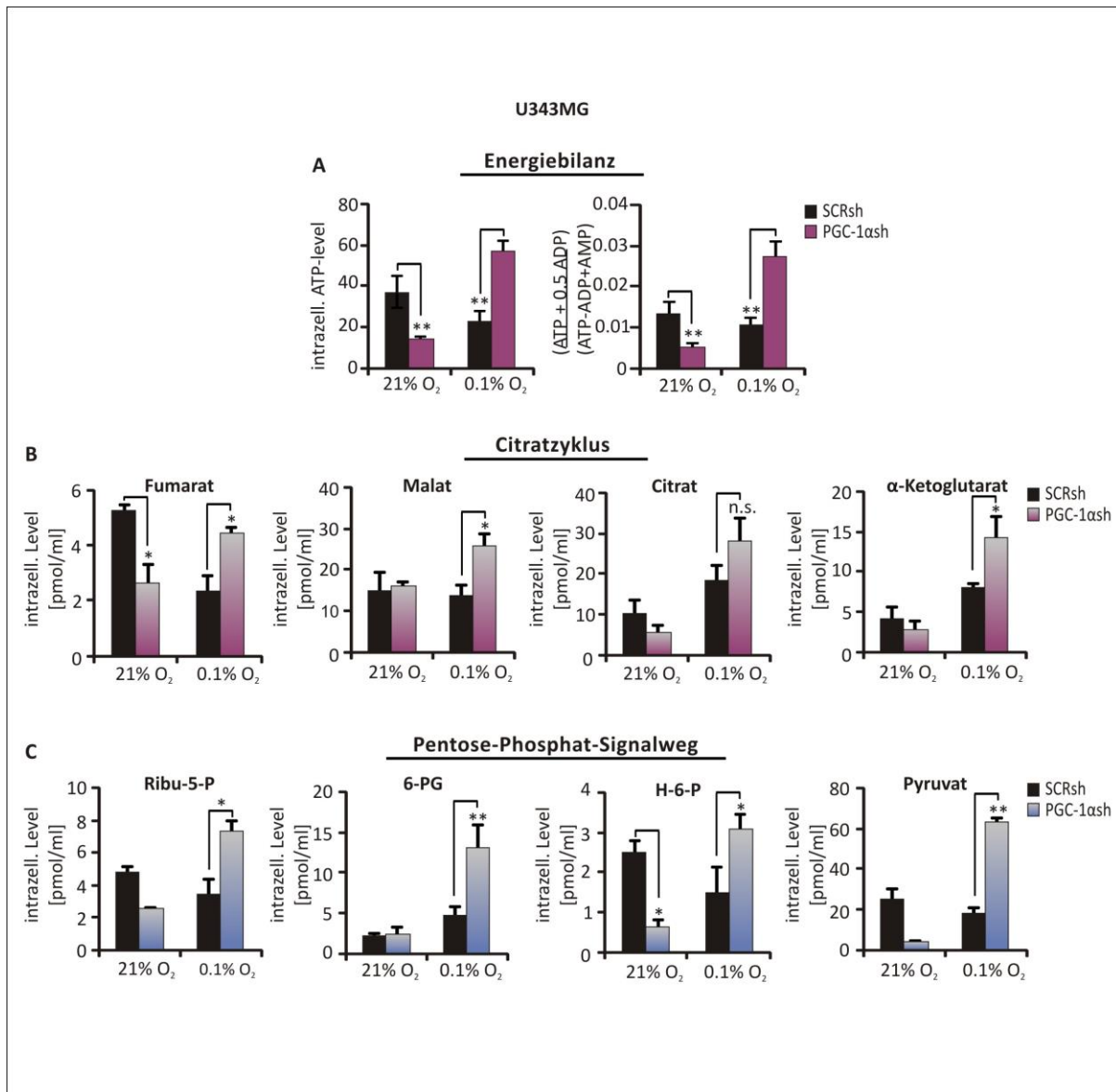


Abb. 23 Veränderungen des Levels von intrazellulären Metaboliten

Dargestellt ist die Quantifizierung von verschiedenen intrazellulären Metaboliten unter Mangelbedingungen (Normoxie vs. Hypoxie bei 2 mM Glk in SFM) in PGC-1αsh-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (SCRsh). (A) Zeigt das ATP-Level (links) und die Energiebilanz (rechts). (B) zeigt Metabolite des Citratzyklus (Fumarat, Malat, Citrat, α-Ketoglutarat). (C) Zeigt Metabolite des Pentose-Phosphat-Signalwegs (ribulose-5-phosphate (Ribu-5-P) und 6-Phosphogluconat (6-P-G)), sowie Hexose-6-Phosphat (H-6-P) und Pyruvat.

4.2.4 Knockdown von PGC-1α attenuiert Schlüsselmerkmale des neoplastischen Phänotyps von Gliomzellen

Invasive Krebszellen nutzen PGC-α und seine Funktion in der Förderung der mitochondrialen Biogenese um ihre Metastasierung zu fördern (167). Daher wurde angenommen, dass PGC-1α möglicherweise eine wichtige Funktion in der Motilität von Gliomzellen ausübt. Mittels Kristallviolett färbung wurde das Zellwachstum der Kontrollzellen mit dem der PGC-1α-

knockdown Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h verglichen. Bei allen Zeitpunkten besaßen die PGC-1 α sh Zellen eine signifikant niedrigere Zelldichte im Vergleich zu den SCRsh-Zellen (Abb. 24 A). Ein ähnliches Resultat konnte mit dem BrdU Proliferations-Assay gezeigt werden (Abb. 24 B). Die Fähigkeit der Zellen zur Formation von Zellklonen wurde mit einem Klonogenitätsassay untersucht. Durch die Auswertung der vorhandenen Klone wurde deutlich, dass die PGC-1 α sh-Zellen schlechtere klonogene Eigenschaften besitzen, da sie signifikant weniger Klone bilden als die Kontrollzellen (Abb. 24 C). Neben dem Wachstum der Zellen wurden auch die migratorischen Eigenschaften analysiert (Abb. 24 D). Man ließ die Zellen innerhalb von 16 h durch die Poren der Transwellplatten auf die Seite des Lockmediums migrieren. Dabei wurden die Platten unter normoxischen (Abb. 24 D, links) oder hypoxischen (Abb. 24 D, rechts) Bedingungen inkubiert. Beim Vergleich des Migrationsverhaltens der SCRsh-Zellen in der Normoxie zur Hypoxie ist ein deutlicher Anstieg der Anzahl an migrierten Zellen zu erkennen. Dies stimmt mit bereits veröffentlichten Daten überein, die zeigen, dass durch Hypoxie das Migrationspotential in Tumorzellen gefördert wird (168-170). Die Suppression von PGC-1 α führte dagegen in der Hypoxie zu einem signifikanten Verlust des Migrationspotentials verglichen mit den Kontrollzellen. Unter normoxischen Bedingungen besaßen die PGC-1 α sh-Zellen ebenfalls ein tendenziell niedrigeres migratorisches Verhalten, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. PGC-1 α ist durch die Regulation der Expression von VEGF auch in der Angiogenese beteiligt, was essentiell für die Ausbildung eines Tumors ist (171). Die quantitative Genexpressionsanalyse deutet auf eine erhebliche, durch den Verlust von PGC-1 α -vermittelte, Reduktion des VEGF-Levels in diesen Zellen hin (Abb. 24 E).

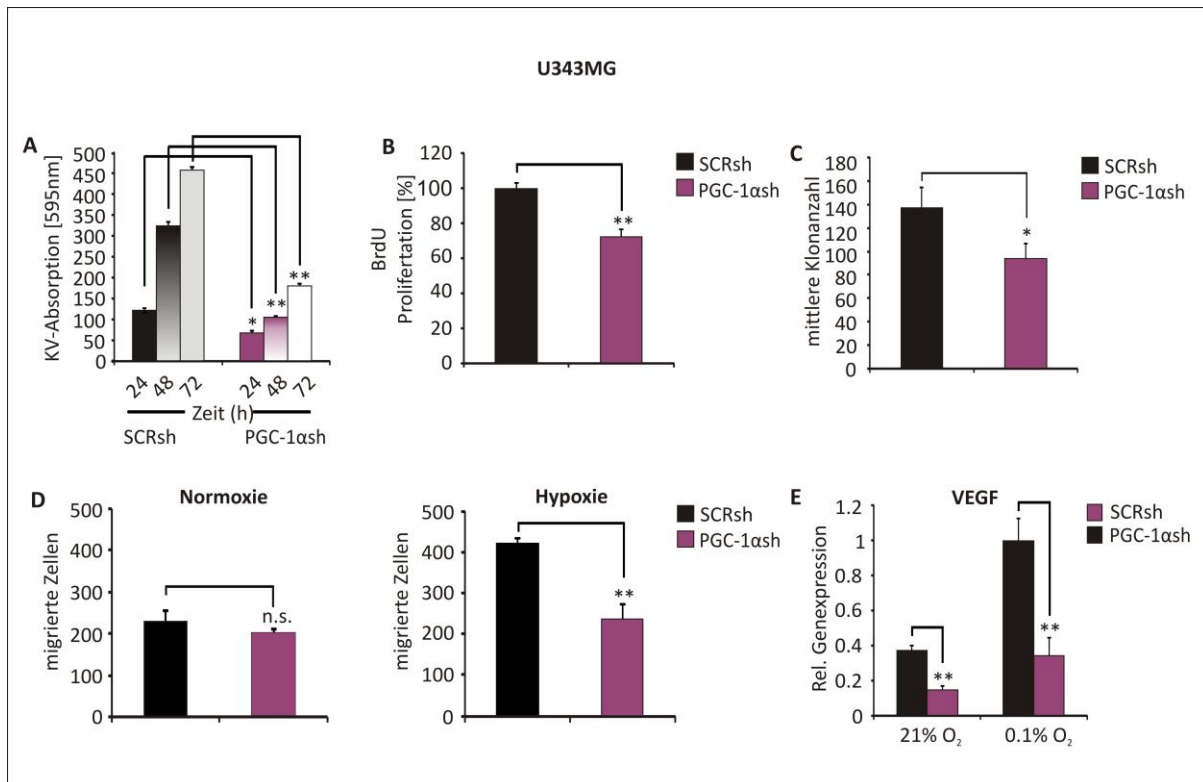


Abb. 24 PGC-1 α fördert die Zellmigration

(A) Die Zelldichte wurde durch einen KV-Assay bestimmt; SCRsh und PGC-1 α sh wurden mit DMEM +FCS in der Normoxie kultiviert und die Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h gefärbt und ausgewertet. (B) BrdU-colorimetrischer Zellproliferationsassay nach 24 h Inkubation mit BrdU labeling reagent. (C) Für den Klonogenitätsassay wurden die Zellen in FCS-haltigem Medium ausgesät, mit KV gefärbt und die Klone mittels Image J gezählt. (D) Migrations-Assay; das obere Well beinhaltet die Zellsuspension ohne FCS, in dem unteren Well das Lockmedium mit 10 ng Fibronectin, die Zellen wurden bei Normoxie (links) und Hypoxie (rechts) für 16 h inkubiert. (E) QRT-PCR Analyse der VEGF-Expression unter Nährstoffrestriktion (2 mM Glk in SFM) bei Normoxie und Hypoxie.

4.2.5 Die Expression von PGC-1 α ist mit Stammzeleigenschaften assoziiert

In MCF-7 Brustkrebszellen wurde gezeigt, dass die Inhibition von PGC-1 α über den ERR α -Inhibitor XCT790 zur Blockierung der Mammosphären-Formation durch die Inhibition der mitochondrialen Funktion, sowie der Aktivierung von verschiedenen Stammzell-zugehörigen Signalwegen führt (172). Da die primären Zelllinien die Tendenz zu einer höheren PGC-1 α -Expression besitzen (Abb. 17 C), führte dies zu der Hypothese, dass die Gliomzellen durch die Gensuppression von PGC-1 α auch die Eigenschaft verlieren könnten, Tumorspheroide unter Stammzellkultivierung zu bilden. Um den Stammzellcharakter nachzuahmen, wurden sowohl SCRsh- als auch PGC-1 α sh-Zellen mit F-12 Stammzellmedium kultiviert. In den SCRsh-Zellen führte die Kultivierung mit Stammzellmedium zur Ausbildung von Sphären (Abb. 25 A, links). Die PGC-1 α sh-Zellen bildeten dagegen den üblichen Monolayer und

schiene die Fähigkeit Spheroide zu bilden vollkommen verloren zu haben (Abb. 25 A, rechts). In ähnlicher Weise weist die mRNA-Expressionsanalyse eine supprimierte Hochregulation der Gehirn-Stammzellfaktoren *PODOPLANIN*, *MUSASHI-1* und *SOX2* in den PGC-1 α -Zellen auf (Abb. 25 B). Es wurde die Kultivierung mit Standard DMEM und dem Stammzellmedium DMEM-F12 miteinander verglichen. Unter beiden Bedingungen wiesen die PGC-1 α -Zellen eine verminderte Konzentration dieser Gene im Vergleich zu den SCRsh-Zellen auf. Die Kultivierung mit F12-Medium steigerte die Expression der Stammzellmarker in beiden Linien, allerdings war dieser Effekt in den PGC-1 α -supprimierten-Zellen weniger stark ausgeprägt. Um den Effekt der Stammzellkultivierung auf Proteinebene zu verifizieren, wurde die Expression von Sox2 im Westernblot untersucht (Abb. 25 C). Auch hier besaßen die PGC-1 α -Zellen ein deutlich niedrigeres Proteinlevel an Sox2 verglichen mit den Kontrollzellen. Die SCRsh-Zellen wiesen außerdem ein erhöhtes Level an pAkt verglichen mit den PGC-1 α -Zellen auf. Es konnte kein Unterschied in der Phosphorylierung der ACC zwischen SCRsh- und PGC-1 α -Zellen nachgewiesen werden (Abb. 25 C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von PGC-1 α mit Stammzeleigenschaften assoziiert ist.

Diese kumulierten Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von PGC-1 α an eine deutliche Verminderung des aggressiven Tumorphänotyps gekoppelt ist. Um diesen Befund auch bezüglich des Tumorwachstums *in vivo* zu überprüfen, wurden SCRsh- und PGC-1 α -Zellen orthotopisch intracerebral in 5-Wochen alte Nacktmäuse injiziert (Abb. 25 D). Das Überleben der Tiere die PGC-1 α -Zellen erhalten hatten war deutlich länger als das der Tiere, denen SCRsh-Zellen injiziert worden waren. Die PGC-1 α -Tiere wiesen eine mediane Überlebenszeit von 79 Tagen im Vergleich zu 42 Tagen der SCRsh-Tiere auf ($p < 0,001809$, log rank Test). Interessanterweise wiesen die SCRsh-Tumore invasive Tumorränder mit Satelliten von Tumorzellen auf, die in das umliegende Hirngewebe migrierten, während die PGC-1 α -Tumore einen glatten Tumorrand bildeten (Abb. 25 E). Immunhistochemische Färbungen mit dem Proliferationsmarker Ki67 konnte keinen offensichtlichen Unterschied zwischen den Tumoren die sich aus SCRsh- und denen die sich aus PGC-1 α -Zellen ausbildeten, aufzeigen. Zusammengefasst suggerieren diese *in vitro* und *in vivo* Daten, dass PGC-1 α eine ausschlaggebende Rolle bei dem aggressiven biologischen Verhalten dieser Tumore hat.

Die Existenz von zwei Langzeit-überlebenden Tieren bekräftigte zusätzlich das Ergebnis, dass PGC-1 α -*knockdown*-Zellen eine geringere Kapazität besaßen, Tumore auszubilden.

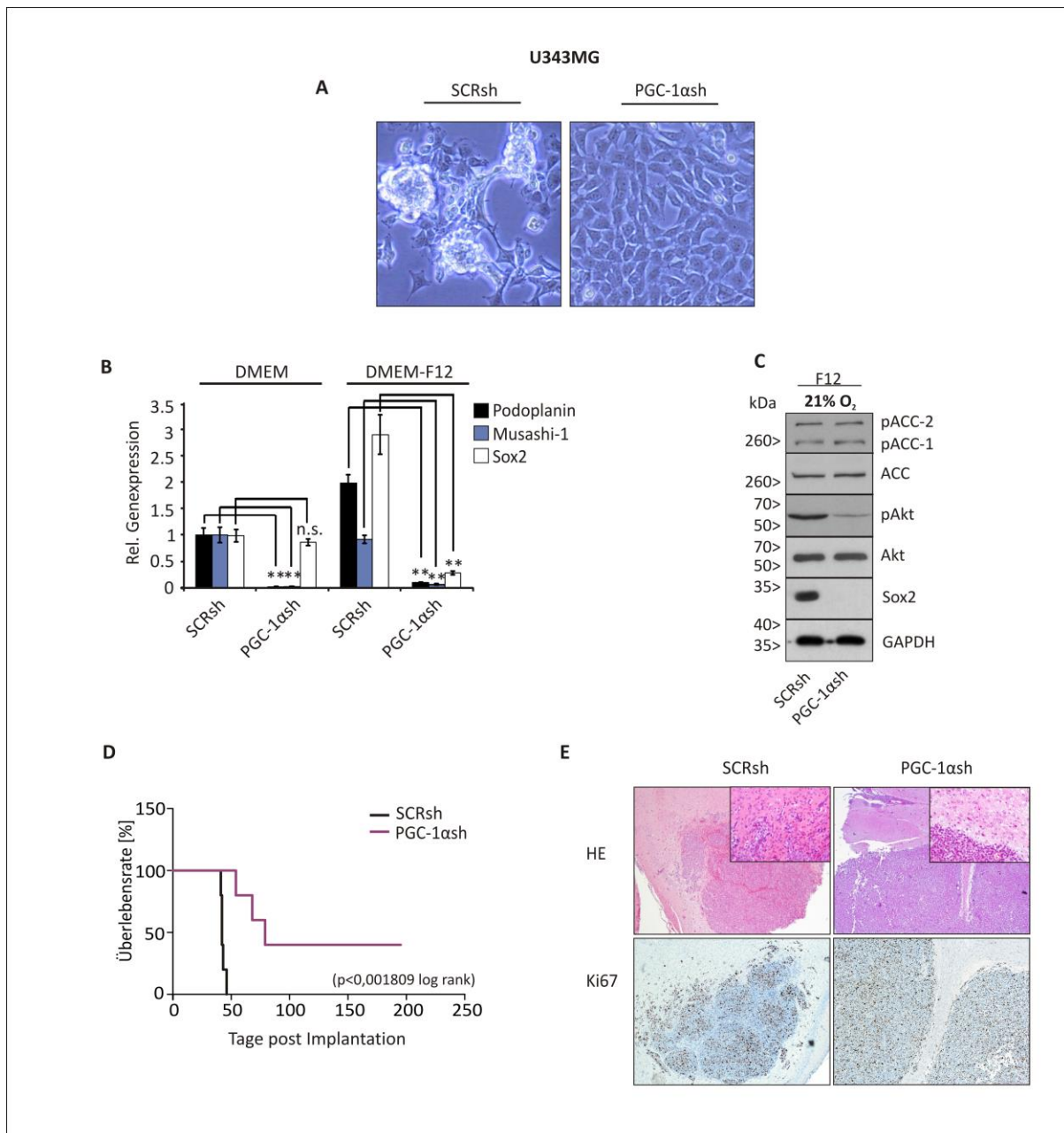


Abb. 25 PGC-1 α fördert Stammzelleneigenschaften und aggressives Wachstum *in vivo*

(A) SCRsh- (links) und PGC-1 α sh-Zellen (rechts) wurden unter Primärkulturbedingungen (DMEM-F12 Medium) kultiviert und die Ausbildung von Sphären im Phasen-Kontrast Mikroskop untersucht (B) qPCR Analyse der Stammzellmarker *PODOPLANIN*, *MUSASHI-1* und *SOX2* in SCRsh- und PGC-1 α sh-Zellen unter normalen Kulturbedingungen (DMEM) im Vergleich zu Stammzellbedingungen (DMEM-F12). (C) Kontrollzellen und PGC-1 α -*knockdown*-Zellen wurden für 24 h mit Stammzellmedium (DMEM-12) kultiviert und anschließend die Proteine extrahiert; im Westernblot ist das Proteinlevel von Sox2, pACC, ACC, pAkt und Akt gezeigt. (D) Kaplan-

Meier Kurve von sechs Wochen alten Nacktmäusen in die i.c. 500.000 SCRsh- oder PGC-1 α sh-Zellen injiziert wurden; das Experiment wurde gestoppt, nachdem die Mäuse symptomatisch wurden. (E) Immunhistochemische H&E (oben) und Ki67 (unten) Färbung von Sektionen der SCRsh- und PGC-1 α sh-Tumoren. Die Einfügungen zeigen eine Vergrößerung der Tumorränder.

Bei der Untersuchung der Zellmorphologie mittels FACS fiel auf, dass bei den Kontrollzellen eine größere Population an Zellen sowohl mit einer stärkeren Granularität (Abb. 26 A) als auch eines höheren Zellvolumens im Vergleich zu den PGC-1 α sh-Zellen vorhanden war (Abb. 26 B).

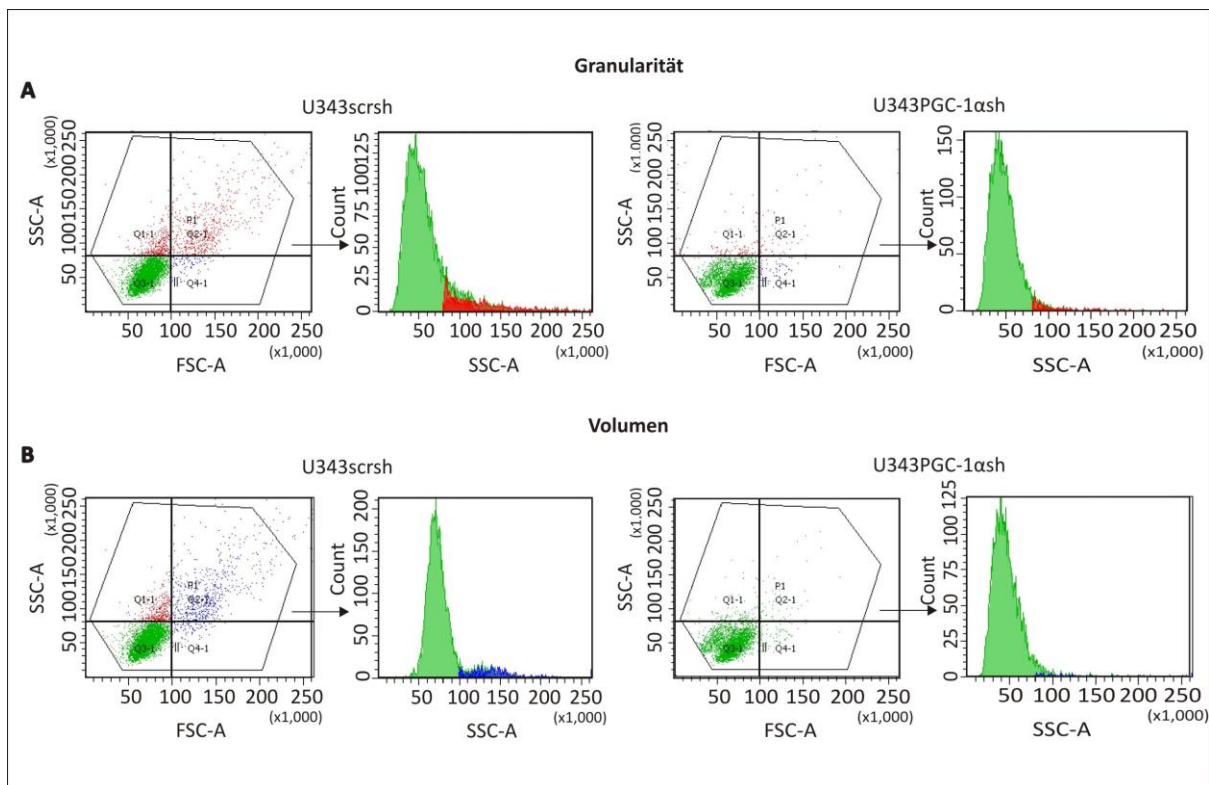


Abb. 26 Analyse der Granularität und des Zellvolumens

(A) Die Zellen wurden in FCS-haltigem Medium kultiviert und im FITC-Kanal des Durchflusszytometers gemessen. Gezeigt ist die Granularität der SCRsh-Zellen (links) und PGC-1 α sh-Zellen (rechts). (B) Unter denselben Bedingungen wurde auch das Zellvolumen beider Linien untersucht.

4.2.6 Der Verlust von PGC-1 α fördert die Resistenz gegenüber Hypoxie und ist mit der Runterregulation der EGFR-Expression und -Signaltransduktion verbunden

Um eine mögliche Funktion von PGC- α in der Entwicklung von Resistenzen zu untersuchen, wurden die Zellen Nährstoff- und Sauerstoffmangel ausgesetzt und der Zelltod analysiert.

Interessanterweise schien der Verlust von PGC-1 α einen protektiven Einfluss auf den Hypoxie-bedingten Zelltod auszuüben (Abb. 27 A). Dies war bereits bei einer moderaten Hypoxie von 1 % Sauerstoff zu erkennen. Die Analyse im Westernblot deutet darauf hin, dass bei Zellen mit PGC-1 α -*knockdown* keine Induktion von HIF-1 α stattfand. Dies könnte auf eine Disruption der Hypoxie-induzierten Signaltransduktion hindeuten (Abb. 27 B). Auch das Level an phosphorylierter Proteinkinase-B (pAkt) sowie das Level an phosphorylierter ACC (pACC), welches ein *downstream* Zielprotein der AMPK darstellt, war in den PGC-1 α sh-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert. Die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt erfolgt u.a. durch die mTORC2-Untereinheit *des mammalian target of rapamycin* (mTOR) Komplexes. Das aktivierte Akt inaktiviert den TSC1/TSC2 Komplex durch Phosphorylierung des TSC2 und fördert damit die Aktivierung des mTOR-Komplexes (173). In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass die Inhibition von EGFR, Akt und mTOR vor Hypoxie-induziertem Zelltod schützen (174,175). Um beurteilen zu können, ob der Verlust von Akt möglicherweise die PGC-1 α -*knockdown*-vermittelte Resistenz gegenüber Hypoxie-induzierten Zelltod vermittelt, wurden pharmakologische Inhibitoren von Akt und mTOR bei den SCRsh-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden dazu mit dem Akt Inhibitor-Akt8 und dem *second generation* mTOR-Inhibitor TORIN-2 behandelt. Die Behandlung mit beiden Inhibitoren führte zur signifikanten Reduktion des Zelltods im Vergleich zu den DMSO behandelten Zellen (Abb. 27 C).

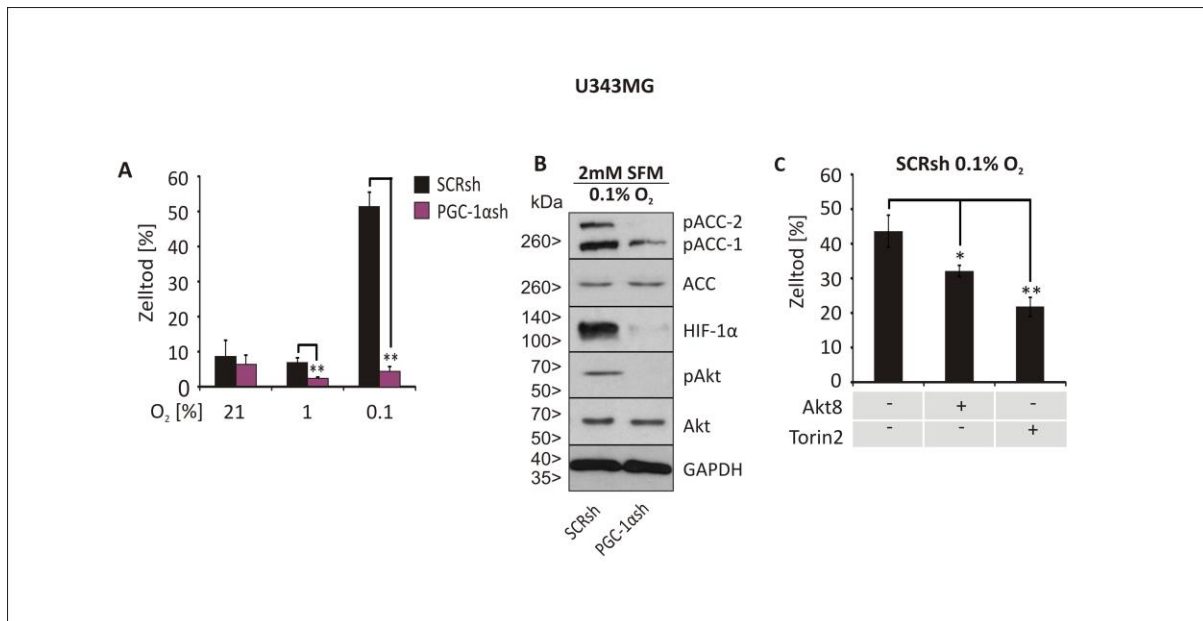


Abb. 27 Der Verlust von PGC- α wirkt protektiv gegenüber Hypoxie induzierten Zelltod

(A) Nach einer Inkubationszeit von 30 h bei 21 %, 1 % und 0,1% Sauerstoff in SFM mit 2 mM Glukose, wurden die Zellen mit PI gefärbt und im FACS analysiert. (B) Die Proteine wurden nach 24 h bei 2 mM Glukose in SFM unter 0,1 %iger Hypoxie extrahiert und die Expression von HIF-1 α , pACC, ACC, pAkt und Akt detektiert; GAPDH diente als Ladekontrolle. (C) SCRsh-Zellen wurden in SFM mit 2 mM Glukose mit DMSO, Akt8 (10 mM) oder Torin2 (20 mM) für 30 h behandelt und der Zelltod analysiert.

Die PGC-1 α sh-Zellen weisen verschiedene Phänotypen auf, die mit einer reduzierten EGFR-Signaltransduktion verbunden sind. Dazu zählt die Resistenz gegenüber Hypoxie (175,176), verringerte Glukoseaufnahme (177), verminderte Proliferation (178,179), geringere Invasivität (180,181) und eine supprimierte Kapazität Sphären zu bilden (182). Auf Grund der enormen Resistenz der PGC-1 α sh-Zellen gegenüber Hypoxie entstand die Vermutung, dass die Expression des EGFR in diesen Phänotyp involviert sein könnte. Wie angenommen wiesen die PGC-1 α -*knockdown*-Zellen eine deutliche Runterregulierung des *EGFR*-Gens auf (Abb. 28 A). Dies konnte auch auf Proteinebene verifiziert werden (Abb. 28 B). Daraufhin wurde untersucht, ob die PGC-1 α -*knockdown*-vermittelte Suppression des EGFR Einfluss auf die Sensitivität von Gliomzellen gegenüber EGFR-Inhibition hat. Die PI-FACS Analyse zeigte, dass die Behandlung mit den beiden EGFR-Inhibitoren PD153035 und Erlotinib in den SCRsh-Zellen zu einem signifikant stärkeren Anstieg des Zelltods führte als in den PGC-1 α sh-Zellen (Abb. 28 C). Entsprechend dieser Resultate sind auch Veränderungen in der EGFR-Signalkaskade zu sehen. Unter nährstoffreichen Bedingungen ist das kanonische mTORC1 Zielgen und Effektor RPS6 (ribosomales Protein S6) in den PGC-1 α -supprimierten-Zellen reduziert (Abb. 28 D, links). Parallel weisen diese Zellen ein deutlich vermindertes pAKT-

Level unter Mangelbedingungen auf (Abb.28 D, rechts). Kongruent zu dem verminderten mTOR-Signalweg, besaßen die PGC-1 α sh-Zellen ein verringertes Zellvolumen (Abb. 28 E). Auch weitere *in silico*-Analysen indizieren eine signifikante Korrelation zwischen der EGFR- und PGC-1 α -Expression in Gliomen (Abb. 28 F).

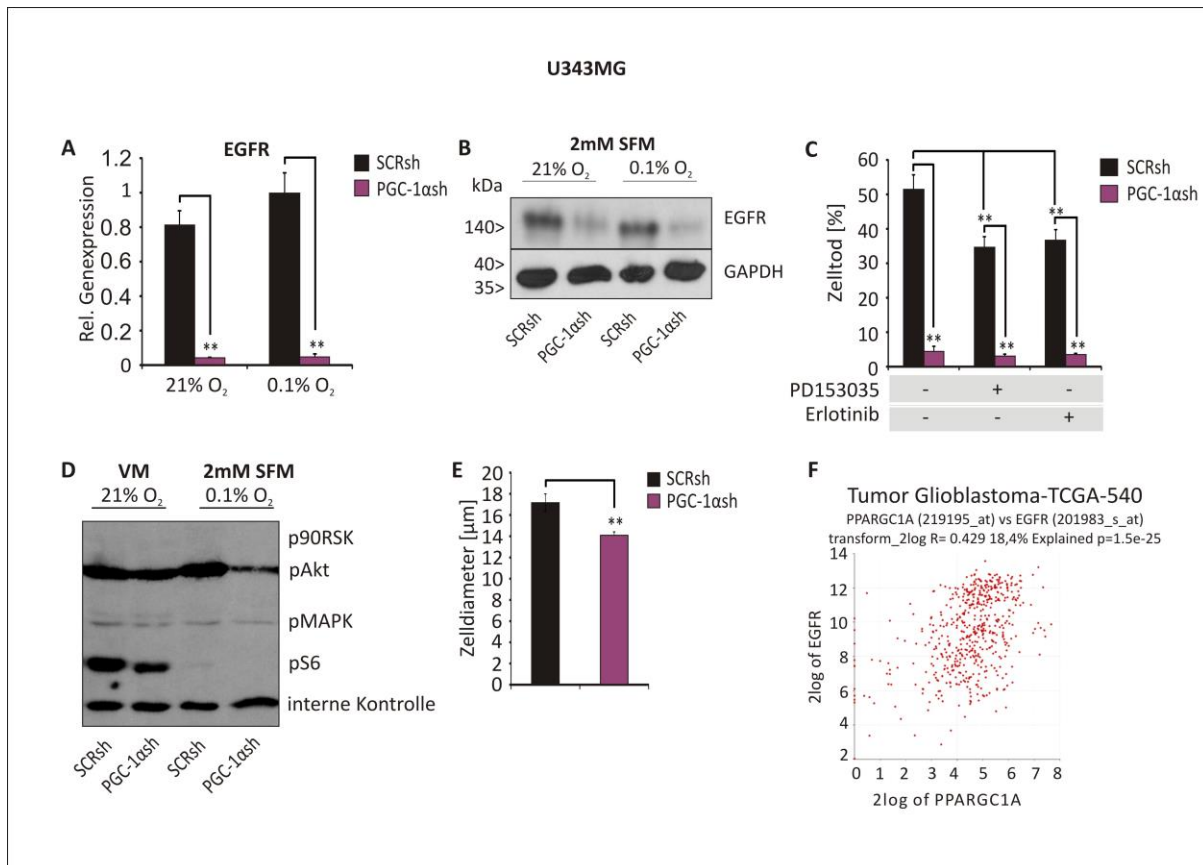


Abb. 28 Die Suppression von PGC-1 α führt zur EGFR Herrunterregulation

Relative *EGFR* mRNA-Expression in SCRsh- und PGC-1ash-Zellen nach Exposition mit Glukose reduziertem SFM in der Anwesenheit (21 % O₂) oder Abwesenheit (0,1 % O₂) von Sauerstoff. (B) Das EGFR-Proteinlevel wurde nach 6 h Inkubation in SFM mit 2 mM Glk und 10 ng/ml EGF bei Normoxie (21 %) und Hypoxie (0.1 %) untersucht; GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. (C) SCRsh-Zellen wurden DMSO oder mit den EGFR-Inhibitoren PD153035 (10 μ M) und Erlotinib (10 μ M) für 30 h bei 2 mM Glukose in SFM behandelt und der Zelltod im PI-FACS untersucht. (D) Westernblot-Analyse der EGFR-Signalkaskade mittels Multiplex Pathscan Antikörper; SCRsh und PGC-1ash-Zellen wurden für 24 h mit Vollmedium (VM) bei 21 % oder unter Mangelbedingungen (SFM mit 2 mM Glk und 0,1 % O₂) kultiviert. (E) Zellpellets der SCRsh- und PGC-1ash-Zellen wurden zur Evaluierung der Zellgröße mittels Lichtmikroskopie und Analyse Software (Olympus) genutzt. (F) Die R2-Datenbankanalyse von Glioblastomen weist eine Korrelation zwischen der Expression des EGFR und PGC-1 α auf.

5 Diskussion

5.1 Das Nährstoffangebot moduliert die Sensibilität gegenüber EGFR-Inhibition

Obwohl der EGFR in Gliomen häufig aktiviert ist und eine Inhibition des EGFR *in vitro* den Zelltod induziert, zeigten EGFR-Inhibitoren in klinischen Studien bisher keine überzeugende Effektivität bei Glioblastomen (62,183). Das Mikromilieu von Gliomen wird durch Glukose-Deprivation, welches eine Konzentration von 0.5 – 2 mM umfasst (184) und massiver

Hypoxie charakterisiert (185). Aus diesem Grund wurde spekuliert, dass diese Faktoren mit Ausschlag gebend für das Scheitern von Tyrosinkinase-Inhibitoren sind.

5.1.1 Nährstoffmangel mindert die EGFR-Inhibitor-vermittelte Toxizität

Zunächst wurde untersucht in wieweit metabolische Bedingungen die EGFR-Inhibitor-vermittelte Zytotoxizität modulieren. Dabei stellte sich heraus, dass in LNT-229-Zellen sowohl unter normoxischen (21 % O₂) als auch hypoxischen (0,1 % O₂) Bedingungen ein Anstieg der Glukosekonzentration zu einem Anstieg der Toxizität führte (Abb. 10 A). Damit schien das Nährstoffangebot offensichtlich Einfluss auf die Toxizität des EGFR-Inhibitors PD153035 zu nehmen. Nur durch ein hohes Glukoseangebot von 25 mM konnte 60 % Zelltod erreicht werden. Solch hohe Glukosekonzentrationen sind jedoch im menschlichen Organismus nicht vorhanden. Bei einem nüchternen Menschen (8-10 Stunden ohne Nahrung) befindet sich eine Glukosekonzentration von weniger als 5,6 mmol/l im Blutkreislauf (Leitlinie für die postprandiale Diabeteseinstellung, *international diabetes federation*, siehe Abschnitt 10.1), was, verglichen mit 25 mM Glukose, einer verminderten EGFR-Inhibitor Toxizität entsprechen würde. Es stellte sich außerdem heraus, dass der EGFR-Inhibitor-vermittelte Zelltod durch den pan-Caspasen-Inhibitor zVAD-FMK blockiert werden kann (Abb. 12). Dies lässt darauf schließen, dass die nukleare Fragmentierung während der Apoptose durch die zVAD-FMK ausgelöste Blockierung der Caspasen-Aktivierung inhibiert wurde. Der EGFR-Inhibitor PD153035 scheint damit den Caspasen-abhängigen Zelltod zu induzieren. Es ist jedoch bereits aus früheren Arbeiten der Gruppe bekannt, dass unter Mangelbedingungen klassische Caspasen-abhängige Apoptose bei Gliomzellen gehemmt wird [Steinbach Cell Death Diff 2003]. Da das Proteinlevel des EGFR unverändert blieb, zeigt die FACS-Analyse, dass die reduzierte EGFR-Toxizität bei einer niedrigen Glukosekonzentration (2 mM) nicht mit der Suppression der EGFR-Expression und auch nicht mit der Inhibition des EGFR-Signalwegs selbst erklärt werden konnte (Abb. 13).

5.1.2 AMPK-Aktivierung als limitierender Faktor der EGFR-Inhibitor-vermittelten Zytotoxizität

Es handelt sich bei der AMPK um ein Protein, dessen Funktion hauptsächlich darin besteht, die Zelle durch Umprogrammierung des Stoffwechsels vor Nährstoff- und Sauerstoffmangel

zu schützen. Um den Mechanismus zu identifizieren, der für die reduzierte Toxizität der EGFR-Inhibition bei niedriger Glukoseverfügbarkeit verantwortlich ist, wurde daher die AMPK als Kandidatenmolekül untersucht und zunächst ihre Aktivierung bei abfallenden Glukosekonzentrationen untersucht (Abb. 14 A). Unter niedrigen Glukosebedingungen wurde die Phosphorylierung und Aktivierung der AMPK stimuliert, was funktionell zur Resistenz der Zellen gegenüber Mangelbedingungen beitrug, weil die Aktivierung der AMPK durch 2-DG und A769662 zur Resistenz gegenüber der EGFR-Inhibition führte (Abb. 14 B). Die Erkenntnis, dass AMPK-Aktivatoren den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion reduzieren (Abb. 14 C + D), ist kongruent zu der Funktion der AMPK in der Einsparung von Energie und in einem Model der AMPK als zentraler Regulator der aeroben Glykolyse (Warburg-Effekt) (115). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in Gliomzellen der zytotoxische Effekt von EGFR-Inhibitoren durch die Aktivierung der AMPK limitiert wird. Dieses Phänomen war nicht nur auf Gliomzellen begrenzt. Durch 2-DG konnte auch die Toxizität von Imatinib in K562-Leukämiezellen reduziert werden (Abb. 15 C). In der Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 blockierte 2-DG den Zelltod nicht, sondern wirkte synergistisch in Kombination mit Lapatinib (Abb. 15 D). Letzteres stimmt mit Ergebnissen aus nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen überein, bei denen 2-DG ebenfalls die Induktion des Zelltods durch Afatinib-vermittelte EGFR-Inhibition verstärkte (186). Daher scheint der erhaltene zytoprotektive Effekt der AMPK-Aktivierung durch Tyrosinkinase-Inhibition zellspezifisch zu sein. Dies könnte eine Erklärung für die Effektivität von EGFR-Inhibitoren in Brustkrebszellen und das Scheitern in Glioblastomzellen darstellen. Dagegen revertierte die Inhibition der AMPK sowohl über den sh-vermittelten *knockdown*, als auch über die pharmakologische Blockade der AMPK den protektiven Effekt von 2-DG und A769662 (Abb. 16 C + E). Dadurch wurde der AMPK-abhängige Einfluss bei diesem Effekt bestätigt. Das Zusammenspiel von Nährstoffmangel, EGFR-Inhibition und AMPK-Aktivierung ist in Abbildung 29 noch einmal schematisch dargestellt. Interessanterweise erwies sich 2-DG in AMPK-supprimierten Zellen als toxischer, als in den Kontrollzellen (Abb. 16 C), was mit Ergebnissen von Lymphomzellen übereinstimmt (187). Eine ähnlich synergistische Induktion des Zelltods zwischen 2-DG und dem AMPK-Inhibitor Compound C wurde auch in Leukämiezellen beschrieben (188). Diese Beobachtungen bekräftigen die Hypothese, dass die AMPK wichtig ist, um die Energie-Homöostase bei Nährstoffmangel in Gliomzellen

aufrechtzuerhalten. Aktuelle Untersuchungen deuten ebenfalls daraufhin, dass die AMPK in Geweben von Glioblastomen stark aktiviert vorliegt (189). Auch wenn durch Metformin, AICAR und A769662 unterschiedliche molekulare Effekte hervorgerufen wurden, spekulierten die Autoren, dass von der Aktivierung der AMPK eine *pro-survival* Funktion ausgeht, die durch Nährstoffrestriktion ausgelöst wird. Weiterhin wird diese Annahme durch Untersuchungen gestützt, die zeigten, dass die eukaryotische translations-elongations-Faktor-Kinase (eEF2K), welche durch die AMPK aktiviert wird, wichtig für die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Nährstoffdepletion ist (190). Interessanterweise fanden diese Autoren heraus, dass die Expression der eEF2K in Gliomen erhöht und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Der exakte molekulare Mechanismus der sich hinter der Aktivierung der AMPK und der Blockierung des EGFR-Inhibitor-induzierten Zelltods verbirgt ist weiterhin unklar. Eine Möglichkeit beinhaltet die Suppression von ROS durch die AMPK (191), da ROS möglicherweise in der Toxizität von Tyrosinkinase-Inhibitoren involviert sind (192). Metabolische Veränderungen, die aus der AMPK-Inhibition resultieren, können zusätzlich die Sensitivität gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren modulieren. Dies offeriert jedoch wieder neue Möglichkeiten, um die Effektivität dieser Behandlung zu verstärken (193). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass die Aktivierung der AMPK die Toxizität von EGFR-Inhibitoren in Glioblastomzellen limitiert und damit zur Resistenz von Gliomzellen gegenüber EGFR-Inhibitor induzierten Zelltod beiträgt. Die Ermittlung der molekularen und metabolischen Mechanismen, die zu diesen AMPK-vermittelten zytoprotektiven Effekten beitragen, könnte dabei helfen, neue Strategien zu entwickeln und die Wirksamkeit von Tyrosinkinase-Inhibitoren zu optimieren.

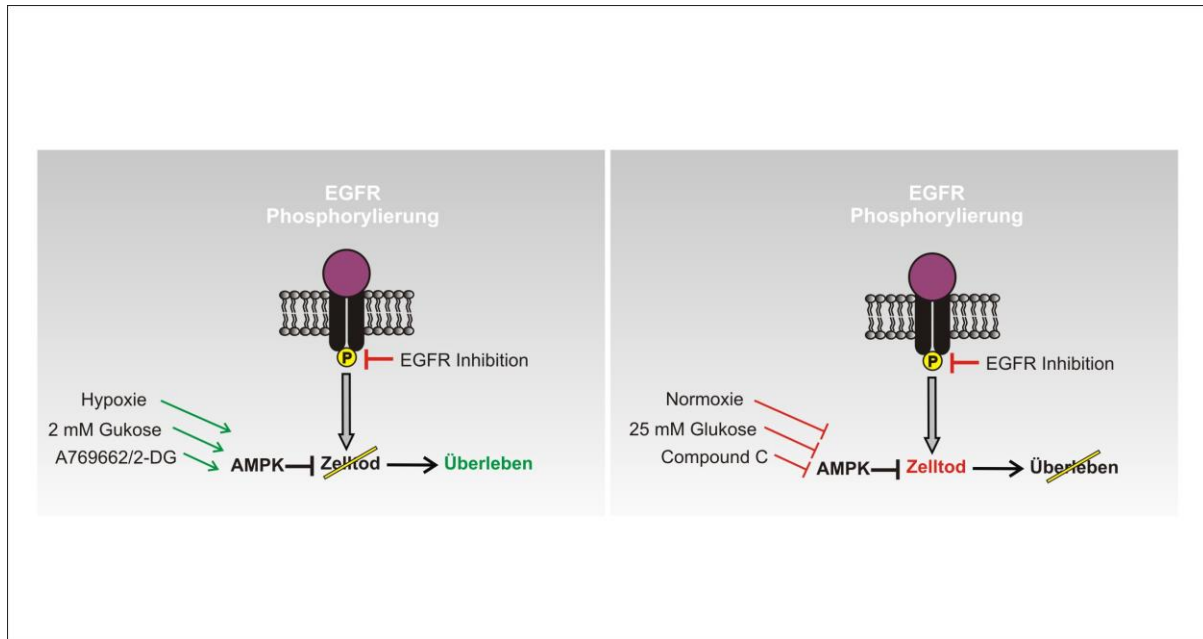


Abb. 29 Einfluss des Nährstoff- und Sauerstoffangebots auf die EGFR-Inhibition

AMPK vermittelte Blockade des EGFR-Inhibitor-induzierten Zelltods. Die durch Sauerstoff- (Hypoxie) oder Nährstoffdepletion (2 mM Glukose) induzierte Aktivierung der AMPK, sowie die direkte Aktivierung mittels A769662 oder 2-DG (2-Deoxyglukose) führen zu zytoprotektiven Effekten und fördern das Überleben der Zelle gegenüber der Inhibition des EGFR (links). Bei einem ausreichenden Sauerstoff (Normoxie)- und Nährstoffangebot (25 mM Glukose) wird die AMPK von der Zelle nicht aktiviert. Unter diesen Umständen führt die gegen den EGFR-gerichtete Therapie zum Zelltod. Auch die Inhibition der AMPK mittels Compound C potenziert die EGFR-Inhibitor-induzierte Toxizität (rechts).

5.2 PGC-1 α ist in dem neoplastischen Phänotyp von Gliomen involviert

Das Tumormilieu eines Glioblastoms, mit Gebieten von Nährstoff- und Sauerstoffmangel, hat bedeutenden Einfluss auf die Progression des Tumors und die Therapieresistenz (194).

In Kontrast zu der historischen Annahme, dass Krebszellen hauptsächlich von der Glykolyse abhängig sind, demonstrierten Forschungsergebnisse der letzten Dekaden, dass einige Krebszellen die β -Oxidation, den Citratzyklus und den mitochondrialen Metabolismus für ihre anabolischen Bedürfnisse nutzen und die oxidative Phosphorylierung für eine effiziente ATP-Produktion (195). Dies wurde ebenfalls für Gliome gezeigt (196-199). Um die oxidative Phosphorylierung aufrecht zu erhalten, müssen die Zellen ein komplexes Netzwerk von zellulären Signalwegen dirigieren. Ein bekannter Hauptregulator der oxidativen Phosphorylierung ist der Transkriptions-Coaktivator PGC-1 α . Bei der durch Defizite in der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung ausgelösten Reprogrammierung des zellulären Metabolismus spielt PGC-1 α , aufgrund seiner Eigenschaft als Regulator der Transkription, eine wesentliche Rolle. Nachdem PGC-1 α als ein wichtiges Protein identifiziert wurde, dass

die oxidative Phosphorylierung in anderen soliden Tumoren fördert, wurde in dieser Arbeit die Funktion von PGC-1 α in Gliomen untersucht. Basierend auf dieser Annahme wurde die Hypothese aufgestellt, dass PGC-1 α in das Tumorstadium und die Energiehomöostase involviert sein könnte und damit mitverantwortlich für die metabolische Flexibilität von Gliomzellen ist.

5.2.1 Die biologische Funktion von PGC-1 α in Glioblastomzellen

In silico-Analysen mittels der R2-Datenbank bestätigen eine positive Assoziation zwischen der Expression von PGC-1 α und einer schlechten Überlebensrate von Glioblastompatienten (Abb. 17 A). Es stellte sich heraus, dass PGC-1 α sowohl in einigen etablierten Glioblastomlinien als auch in Primärkulturen exprimiert wird (Abb. 17 B+C). Wie vermutet wurde die Expression von PGC-1 α außerdem durch Hypoxie verstärkt (Abb. 17 F) (129).

Übereinstimmend mit der gut etablierten Funktion in der Regulation der mitochondrialen Biogenese in anderen Tumoren, reduzierte die Suppression von PGC-1 α die Transkription verschiedener mitochondrialer Gene in der U343MG-Glioblastomzelllinie (Abb. 19 A). In dessen Konsequenz verringerte sich auch das mitochondriale Membranpotential, sowie die zelluläre Respirationsrate (Abb. 19 B+C). Dies deutet auf einen durch die PGC-1 α Gensuppression vermittelten Defekt im mitochondrialen Metabolismus hin. Übereinstimmend mit bereits publizierten Daten, die darauf hinweisen, dass PGC-1 α in der Glut-4-Expression involviert ist (200), wurde eine Runterregulation der Expression von *Glut-1* und *Glut-3* nachgewiesen, bei denen es sich im Gehirn um die dominierenden Glukosetransporter handelt (201). Wie vermutet wurde die Expression beider Gene durch Hypoxie induziert (Abb. 20 A) (202). In den PGC-1 α sh-Zellen wurde die Expression dieser Glukosetransporter jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß induziert. Übereinstimmend mit der verringerten Glukosetransporter-Expression konnte auch eine verringerte Aufnahme von Glukose aus dem Medium durch die 2-NBDG-FACS-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 20 B). Die verminderte Glukoseaufnahme ist auch verantwortlich für die Beobachtung, dass PGC-1 α sh-Zellen trotz defekter mitochondrialer Respiration, die Glykolyse nicht kompensatorisch hochregulierten. Folglich reduziert die Suppression von PGC-1 α auch den Glukoseverbrauch (Abb. 20 C) und die Laktatproduktion (Abb. 20 D). Allerdings muss einschränkend festgehalten werden, dass im Rahmen dieser

Dissertation keine Experimente durchgeführt wurden, die die funktionelle Rolle der Glukosetransporter belegen.

Verschiedene Studien demonstrierten, dass die Expression von PGC-1 α als Antwort auf oxidativen Stress erhöht und dass ROS-detoxifizierende Enzyme wie SOD1, SOD2 und Catalase durch PGC-1 α hochreguliert werden (164-166). In Einklang damit wurde eine durch die Suppression von PGC-1 α ausgelöste Akkumulation von ROS identifiziert (Abb. 22 A). Diese Zellen erwiesen sich ebenfalls susceptibler gegenüber H₂O₂, verglichen mit den Kontrollzellen (Abb. 22 B). Kongruent dazu konnte eine verminderte Expression von *sod1* und *sod2* nachgewiesen werden (Abb. 22 C). Diese Daten suggerieren, dass der erhöhte Gehalt an ROS nicht aus einer gesteigerten ROS-Produktion resultiert, sondern auf einem Defizit in der ROS-Detoxifizierungskapazität beruht. PGC-1 α scheint damit ein putativer Regulator der ROS-Abwehr via SOD1 und SOD2 Regulation zu sein. In dessen Folge führt die Runterregulierung von PGC-1 α zu einem Anstieg der ROS-Akkumulation und einer erhöhten Sensitivität gegenüber H₂O₂. Neben oxidativen Stress sind ROS Moleküle in intrazelluläre Signalwege involviert und agieren als *second messenger* (203,204). Aus diesem Grund könnte es möglich sein, dass die Akkumulation von ROS die Autophagie und andere zytoprotektive Effekte unter Mangelbedingungen fördert (205-207). Es wurde angenommen, dass ein verminderter Metabolismus, worauf der verringerte Glukosekonsum und die Beeinträchtigung der mitochondrialen Aktivität hindeuten, in einem niedrigeren Energieverbrauch der PGC-1 α sh Zellen resultiert. Die primäre Feststellung des metabolischen Profils war, dass PGC-1 α sh Zellen, im Gegensatz zu den Kontrollzellen, in der Lage waren ihr ATP-Konzentration unter hypoxischen Bedingungen aufrecht zu erhalten (Abb. 23 A).

Dies führt vermutlich zu einem Überlebensvorteil gegenüber Nährstoff- und Sauerstoffentzug. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass der Energiespeicher in den PGC-1 α -supprimierten Zellen unter hypoxischen Konditionen besser erhalten werden kann und dies womöglich zu einem Überlebensvorteil unter Mangelbedingungen beitragen könnte. Es wurde ebenfalls ein Anstieg des Basalniveaus von Metaboliten des Citratzyklus (Fumarat, Malat, Citrat, α -Ketoglutarat) beobachtet. Dies könnte als Folge einer Akkumulation entstehen, die aus der verringerten Kapazität resultiert, die Metabolite weiter zu verarbeiten (Abb. 23 B). Gewöhnlich werden diese Intermediate in anabolische,

biosynthetische Prozesse, wie die Fettsäure- und Aminosäuresynthese gelenkt, die unverzichtbar für das Zellwachstum und womöglich weniger aktiv in den PGC-1 α sh Zellen sind. Weiterhin wurde ein erhöhtes Level von Metaboliten des Pentose-Phosphat-Wegs beobachtet (Abb. 23C). Die Konzentrationen der Metabolite Glukose-6-Phosphat und Pyruvat waren bei den PGC-1 α sh Zellen in der Normoxie deutlich niedriger als in den Kontrollzellen und dafür in der Hypoxie signifikant höher (Abb. 23C). Dies könnte damit erklärt werden, dass diese Kohlenstoffe neben der Glykolyse auch alternativ über den Pentose-Phosphat-Weg (Glukose-6-Phosphat) und den Citratzyklus (Pyruvat) metabolisiert werden können (81,208). Eine wichtige Funktion des Pentose-Phosphat-Wegs ist die Generierung von NADPH, welches eine zentrale Rolle bei dem Abfangen von ROS übernimmt. Daher könnten die PGC-1 α sh Zellen den Defekt in der ROS-Abwehr durch eine Hochregulation des Pentose-Phosphat-Wegs kompensieren, wodurch sie mehr NADPH gewinnen.

5.2.2 PGC-1 α fördert das migratorische und invasive Potential von Gliomzellen

Wie können die profunden Veränderungen des Metabolismus, die durch die Suppression von PGC-1 α vermittelt werden, Schlüsseigenschaften des neoplastischen Phänotyps beeinträchtigen? Sowohl Proliferation und Migration, als auch Invasion benötigen ein ausreichendes Energieangebot und Substrate für den Anabolismus, welcher maßgeblich auf die mitochondriale Funktion angewiesen ist. Die Transformation zu einem malignen, neoplastischen Phänotyp wird daher durch Alterationen in der Kontrolle des zellulären Metabolismus charakterisiert. Neoplastische Zellen besitzen die Fähigkeit, sich in das sie umgebende Gewebe auszubreiten. Diese invasive Eigenschaft von malignen Tumoren bringt sie in Kontakt mit Blut und lymphatischen Gefäßen und fördert die Metastasierung zu entfernteren Geweben. Die hier präsentierten Daten unterstützen die Beteiligung von PGC-1 α an diesem Phänotyp. Kongruent damit konnte in *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass die Depletion von PGC-1 α mit einem Verlust der Tumoraggressivität assoziiert ist, indem es die Proliferations- und Migrationsrate herabsetzt (Abb. 24 B+D). Die reduzierte Expression des *vegf* in den PGC-1 α sh Zellen trägt womöglich ebenso zu einer verminderten Tumoraggressivität bei (Abb. 24 E). Interessanterweise scheint PGC-1 α auch in Stammzeleigenschaften involviert zu sein. Der *knockdown* von PGC-1 α vermittelt unter

Stammzellmedium den Verlust der Tumorsphärenformation (Abb. 25A). Bestätigt wird diese Beobachtung durch die Runterregulation der im Gehirn vorkommenden Stammzellmarker *PODOPLANIN*, *MUSASHI-1* und *SOX2* (Abb. 25 B). In der Brustkrebslinie MCF-7 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Inhibition des $ERR\alpha$ -PGC-1 α Signalwegs durch den Inhibitor XCT790 zur Blockierung der Formation von *mammospheres* und Aktivierung von verschiedenen Stammzell-assoziierten Signalwegen führt (172). Eine Studie aus 2014 zeigte, dass CD133 positive Glioblastomzellen unter Neurosphärenkulturbedingungen eine gesteigerte Proliferationsrate besitzen (209). Dies deutet daraufhin, dass der durch PGC-1 α -Suppression vermittelte Verlust von Stammzeleigenschaften möglicherweise zu dem verminderten Migrationsverhalten der PGC-1 α sh Zellen beitragen könnte. Außerdem lagen Hypoxie-induzierte und Stammzell-assoziierte Gene wie *HIF-1 α* (Abb. 27 B), *Glut-1* (Abb. 20 A), *VEGF* (Abb. 24 E) und *EGFR* (Abb. 28 A+B) in PGC-1 α sh Zellen herunter reguliert vor. Diese fundierten Störungen essentieller onkogener Signalkaskaden übersetzte sich in ein besseres Überleben der Tiere, die orthotopische Tumore aus PGC-1 α sh Zellen ausbildeten. Dies führt zu der Annahme, dass die Gliomzellen ihren neoplastischen Phänotyp durch die Suppression von PGC-1 α attenuieren. Auffallend war auch, dass in den immunhistologischen Schnitten der PGC-1 α sh-Tumore ein weniger invasives Wachstum zu beobachten war als in den Tumoren, die sich aus SCRsh Zellen ausbildeten. Dieses Ergebnis ist mit einer Arbeit von Valerie LeBleu (167) zu vergleichen, in der invasive, humane Brustkrebszellen analysiert und eine Korrelation zwischen der Expression von PGC-1 α und der Formation von entfernteren Metastasen identifiziert wurden. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung von *primary cancer cells* (PCC), *circulating cancer cells* (CCC) und *lung metastatic cancer cells* (MCC). Mittels Invasions- und Migrationsassays wurde nachgewiesen, dass das migratorische Potential von dem PGC-1 α Expressionslevel abhängig war. LeBleu und Co-Autoren zeigten außerdem in *in vivo* Experimenten, dass die Metastasierung in den Mäusen, die PGC-1 α sh-Tumoren ausbildeten, signifikant vermindert war. Das *insulin-like growth factor 2* (Imp2) Protein ist auch ein Faktor, der eine wichtige Rolle in der oxidativen Phosphorylierung und in der Aufrechterhaltung von Gliomstammzellen spielt. Es transportiert mRNAs zu den Mitochondrien und ist darüber hinaus in der Zusammenlagerung des Komplex I und IV und in der Bewahrung der zellulären Respiration involviert (210). In ähnlicher Weise wie bei Imp2 könnte daher auch bei PGC-1 α ein eine

Verbindung zwischen seiner Funktion im oxidativen Metabolismus und der Ausbildung von Stammzeleigenschaften vorhanden sein. Diese Beobachtungen bestätigen, dass PGC-1 α in dem neoplastischen und besonders invasiven Phänotyp von Glioblastomzellen involviert ist. Zusammengefasst wird der aggressive neoplastische Phänotyp der hier untersuchten Gliomzelllinien maßgeblich von PGC-1 α vermittelt. In Übereinstimmung mit seiner etablierten Rolle im Metabolismus, ordnet diese Erkenntnis PGC-1 α eine wichtige Funktion bei der Ausbildung von Krebsmerkmalen zu (211). Aggressives Tumorwachstum ist abhängig von einem hinreichenden Sauerstoff- und Substratangebot. Stark proliferierende, anabolische Tumorzellen sind daher selektiv anfälliger für Mangelbedingungen. Um die Auswirkung von PGC-1 α auf die Resistenz gegenüber Hypoxie und Nährstoffmangel aufzuklären, wurde ein etabliertes Zellmodell verwendet und die Zellvitalität unter Mangelbedingungen entsprechend dem Mikromillieu von Gliomen charakterisiert (174,175,212).

5.2.3 Über die Regulation des EGFR beeinflusst PGC-1 α die Resistenz gegenüber Hypoxie-induzierten Zelltod

Neben der durch die Suppression von PGC-1 α beobachteten anti-Krebseffekte, vermittelt der *knockdown* dieses Proteins eine hervorstechende Resistenz gegenüber Hypoxie induzierten Zelltod (Abb. 27 A). Dieser Effekt könnte potentiell die Selektion von Zelltod-resistenten Klonen fördern und damit den Vorteil der Inhibition des PGC-1 α -Signalwegs limitieren. Es ist wahrscheinlich, dass multiple Faktoren in dem Phänomen der Hypoxieresistenz involviert sind. Ein sehr wichtiges Protein, das einen aktiven Part bei der Energieeinsparung bei Nährstoffmangel übernimmt, ist die AMPK. Die AMPK reguliert u.a. die Aktivität von PGC-1 α und die Proteinexpression von PGC-1 α ist wiederum notwendig für die AMPK vermittelte Genexpression von PGC-1 α (138). Dieser Signalweg ist für das Wachstum und den Metabolismus eines Tumors entscheidend. Die Konzentration an phospho-ACC, welche ein direktes *downstream*-Zielgen des Energiestressensors AMPK ist, war in den PGC-1 α sh Zellen niedriger (Abb. 27 B). Dies weist wiederum daraufhin, dass die aufrechterhaltene Energiehomöostase, wie sie auch durch die Messung des ATP-Levels und die Energieladung demonstriert wurde. PGC-1 α supprimierte Zellen haben ebenfalls eine niedrigere Konzentration an phospho-Akt und HIF-1 α , welche positiven Einfluss auf die

Glukoseaufnahme, die Glykolyse und die Angiogenese haben (213-215). Dies ist kongruent zu der reduzierten Glukoseaufnahme und des verminderten *VEGF* mRNA-Expression dieser Zellen. Neben dem direkten Einfluss von PGC-1 α auf die Expression von Glukosetransportern, könnte es auch indirekt über die Regulation der Akt-Signalisierung involviert sein. Durch seine Funktion als Metabolismusregulator fördert Akt die HIF-1 α Aktivierung was wiederum zur Expression von Glut-1 und VEGF führt (213,214). In diesem Zusammenhang könnte Akt die Expression von Glukosetransportern auf posttranskriptioneller Ebene regulieren. Hypoxie induziert ebenfalls die VEGF Expression. PGC-1 α ash Zellen sind jedoch resistent gegenüber Hypoxie, weshalb die fehlende HIF-1 α Aktivierung zur reduzierten Induktion von VEGF führen könnte (Abb. 24 E+27 B).

Angesichts der Veränderungen von Signalwegen und Phänotypen in den PGC-1 α ash Zellen, gibt es einige Eigenschaften die auch in Zellen beobachtet wurden, die mit EGFR-Inhibitoren behandelt wurden. Daher wurde der EGFR-mTOR-Signalweg in den PGC-1 α ash und Kontrollzellen untersucht und auch eine wesentliche Runterregulation von EGFR als auch dem mTOR-Effektor phospho-RPS6 nachgewiesen (Abb. 28 B+D). Die Abnahme der Zellgröße, die in den PGC-1 α supprimierten Zellen gefunden wurde, bestätigt die biologische Relevanz eines verminderten mTOR-Signalwegs (Abb. 28 E).

Bis jetzt war die Interaktion zwischen PGC-1 α und EGFR noch nicht bekannt, allerdings deuten *in silico*-Analysen der R2-Datenbank auf eine Korrelation der Expression beider Proteine hin und untermauern die in dieser Arbeit erhaltenen *in vitro* Daten (Abb. 28 F). Bei der Betrachtung des Mechanismus hinter dieser Interaktion demonstrieren weitere *in silico*-Analysen, dass die PGC-1 α Promotorregion Bindestellen für Transkriptionsfaktoren besitzt, die auch in der Promotorregion des *EGFR* und *GLUT-1* Gens vorkommen. Der Promotor von *PGC-1 α* besitzt Bindestellen für PPAR- α , PPAR- γ 1 und PPAR- γ 2, während PPAR- α im Promotorbereich des *EGFR* und PPAR- γ 1 und PPAR- γ 2 im Promotor von *GLUT-1* zu finden sind (<http://www.ensembl.org>). Diese Transkriptionsfaktoren werden außerdem von PGC-1 α aktiviert, was möglicherweise in einem positiven Rückkopplungsschleife resultiert. In Brustkrebszellen wurde nachgewiesen, dass der Glukosetransporter Glut-1 nicht nur den Glukosemetabolismus reguliert, sondern außerdem als Regulator des EGFR/MAPK agiert (216). Wie bereits erwähnt ist PGC-1 α an der Regulation der Expression von *GLUT-1* und *GLUT-3* beteiligt. Somit könnte es sich hiermit um einen weiteren Mechanismus handeln,

über den PGC-1 α den EGFR Signalweg beeinflusst. Umgekehrt aktiviert der EGFR selbst Akt, so dass auch der Verlust von EGFR möglicherweise zu einer verminderten pAkt-Konzentration führte (Abb. 27 B). Neu erschienene Daten deuten auch auf eine Rolle von microRNAs, insbesondere microRNA-217, in der Biologie von Gliomen als auch der PGC-1 α Expression hin (217,218).

Interessanterweise führt die Aktivierung von mTOR durch den *knockdown* von TSC2 zur Induktion der PGC-1 α Expression und fördert den anabolischen und oxidativen Phänotyp (219). In Übereinstimmung mit der Schlüsselerkenntnis das PGC-1 α den oxidischen und metabolischen Metabolismus lenkt und dieses den aggressiven Phänotyp fördert, zeigte auch eine Proteomanalyse des deutschen Gliomnetzwerks, dass in Tumorgeweben von Glioblastompatienten mit einem Kurzzeit-Überleben einige Proteine des mitochondrialen Metabolismus und der oxidativen Phosphorylierung hochreguliert waren (K. Stühler, *German Glioma Network*, Manuskript in Bearbeitung).

Eine Zusammenfassung des Mechanismus und der Konsequenz einer PGC-1 α Expression sind in Abb. 30 dargestellt. Die koordinierte Regulation von parallelen Signalwegen durch PGC-1 α ermöglicht letztendlich den oxidativen und anabolischen Metabolismus und resultiert in einem aggressiven neoplastischen Phänotyp. Alternativ wird in der Abwesenheit von PGC-1 α ein katabolischer, nicht-oxidativer Phänotyp gefördert, der die Resistenz gegenüber Hypoxie und Mangelbedingungen überträgt. Aus klinischer Sicht ist PGC-1 α daher ein interessantes Zielgen in der anti-Gliomtherapie, obwohl zurzeit keine pharmakologische Möglichkeit besteht, um PGC-1 α direkt anzugreifen. Es muss außerdem abgewogen werden, dass die Resistenz gegenüber Hypoxie vermutlich als Konsequenz einer PGC-1 α Inhibition auftreten kann. Dies wurde in ähnlicher Weise auch bei der Inhibition des EGFR, Akt und mTOR beobachtet, die als onkogene Kinasen den anabolischen Metabolismus lenken und den Verbrauch von Energie und Substraten fördern (174,176). Dies muss bei der Wahl der richtigen Kombinationstherapie bedacht werden. Wie bereits erwähnt handelt es sich beim Glioblastom um einen hypoxischen Tumor und es ist bekannt, dass durch Hypoxie ausgelöster Zellstress die Entwicklung von Therapie-Resistenzen fördert (220-222). Aktuell wird daran geforscht, wie man die charakteristische Hypoxie in der anti-Tumor Therapie nutzen kann. Dabei gibt es immer wieder neue Untersuchungen an HIF-1 α , welches eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression eines Glioblastoms spielt (223). Eine

weitere aktuelle Studie befasst sich mit gegen Hypoxie gerichteten Nanopartikeln (224). Das Glioblastom ist allerdings nicht nur ein hypoxischer, sondern auch ein angiogener Tumor. Antiangiogene Therapien induzieren wiederum häufig Hypoxie (225). In dieser Arbeit wurde deutlich, dass PGC-1 α zwar den neoplastischen Phänotyp des Tumors und damit sein aggressives Wachstums- und Migrationsverhalten inhibiert, jedoch auch zur Resistenz gegenüber Hypoxie führt. Reagenzien wie der VEGF-Antikörper Bevacizumab, die auch zur Behandlung von Gliomen eingesetzt werden, induzieren ebenfalls Hypoxie (226-229). Um einen synergistischen Effekt auszuschließen, sollte daher eine mögliche Kombinationstherapie mit einer anti-PGC-1 α Strategie mit Vorsicht behandelt werden. Es wäre daher wichtig und interessant die Signalkaskade zu identifizieren, auf die der Tumor zurückgreift, wenn PGC-1 α seine Funktion nicht ausüben kann

Dies und die in dieser Arbeit gezeigten anti-Krebs Effekte unterstützen damit die weitere Untersuchung und Forschung an PGC-1 α in Gliomen, um dessen Rolle in der Tumorgenese und als pharmakologisches Zielprotein zu analysieren.

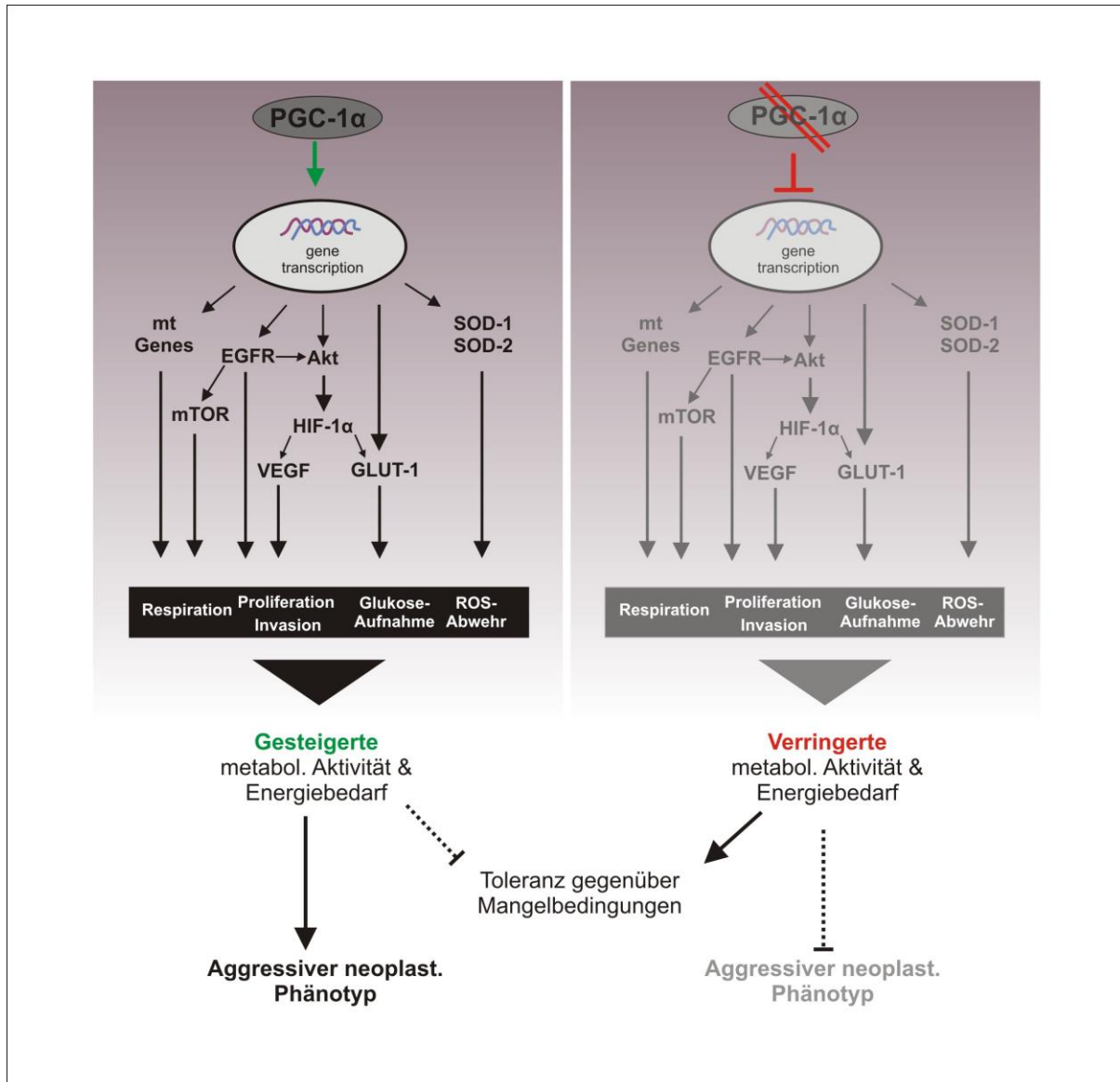


Abb. 30 Auswirkung der Suppression von PGC-1 α

Schematische Darstellung des Einflusses von PGC-1 α auf den Tumormetabolismus.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Statistikanalyse von allen primären Hirntumoren.....	3
Abb. 2	Statistikanalyse der malignen Hirntumoren.....	3
Abb. 3	Schematische Darstellung der molekularen Stratifizierung diffuser Gliome	4
Abb. 4	Schematische Darstellung der Entwicklung einer Tumorzelle	6
Abb. 5	Hauptsignalwege die durch die Aktivierung des EGFR reguliert werden	10
Abb. 6	Schematische Darstellung der Sauerstoffversorgung eines Tumors	12
Abb. 7	Aktivierung der AMPK	16
Abb. 8	Regulation von PGC-1 α	18
Abb. 9	Schematische Darstellung eines Transwells	33
Abb. 10	Metabolische Bedingungen beeinflussen die Zytotoxizität der EGFR-Inhibition.....	44
Abb. 11	Metabolische Bedingungen beeinflussen die Zytotoxizität der EGFR-Inhibition in U87MG-Zellen	45
Abb. 12	Der PD153035-induzierte Zelltod basiert auf der die Aktivierung von Caspasen	46
Abb. 13	Expressionslevel des EGFR und dessen <i>downstream</i> Signalkaskade.....	47
Abb. 14	AMPK-Aktivierung wirkt protektiv gegenüber EGFR-Inhibitor-induzierten Zelltod	49
Abb. 15	Antagonistische Effekte des AMPK-Aktivators A769662 gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren	50
Abb. 16	Lentiviraler <i>knockdown</i> und pharmakologische Inhibition der AMPK	51
Abb. 17	PGC-1 α -Expression in humanen Gliomlinien	53
Abb. 18	Expression von PGC-1 β	54
Abb. 19	PGC-1 α reguliert die Expression mitochondrialer Gene und die zelluläre Respiration.....	55
Abb. 20	Die Expression von PGC-1 α ist für die Glukoseaufnahme erforderlich	57
Abb. 21	Wachstumsverhalten unter der Zugabe von Glutamin und TMZ	58
Abb. 22	PGC-1 α ist für die ROS-Abwehr verantwortlich.....	59
Abb. 23	Veränderungen des Levels von intrazellulären Metaboliten	61
Abb. 24	PGC-1 α fördert die Zellmigration	63
Abb. 25	PGC-1 α ist mit der Formation von Zellsphären verbunden.....	65
Abb. 26	Analyse der Granularität und des Zellvolumens.....	66
Abb. 27	Der Verlust von PGC- α wirkt protektiv gegenüber Hypoxie induzierten Zelltod	68
Abb. 28	Die Suppression von PGC-1 α führt zur EGFR Runterregulierung.....	70
Abb. 29	Einfluss des Nährstoff- und Sauerstoffangebots auf die EGFR-Inhibition	74
Abb. 30	Auswirkung der Suppression von PGC-1 α	83

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Chemikalien- und Reagenzienauflistung	20
Tab. 2 Reagenzien für die Zellkultur	21
Tab. 3 Pufferlösungen für Westernblot	22
Tab. 4 Pufferlösung für Kristallviolett färbung	23
Tab. 5 Primäntikörper	24
Tab. 6 Sekundäntikörper	24
Tab. 7 Auflistung der Inhibitoren und Aktivatoren	26
Tab. 8 Primersequenzen	27
Tab. 9 Verwendete Plasmide	27
Tab. 10 Auflistung der Geräte	28
Tab. 11 Auflistung der ausgesäten Zellzahlen	30

8 Vektoren

Der pLKO.1 Vektor der Firma Sima-Aldrich wurde für den *knockdown* der AMPK α 1, der AMPK α 2, des PGC-1 α sowie für die entsprechenden Kontrollplasmide verwendet. Der Vektor beinhaltet eine Puromycin (puro) Resistenz zur Selektion.

AMPK α 1:

TRCN0000360842

Region: CDS

TRC Version: 2 Clone ID: NM_001013367.3-144s21c1

Sequence: CCGGCACGAGTTGACCGGACATAAACTCGAGTTTATGTCCGGTCAACTCGTGTTTTTG

AMPK α 2:

TRCN0000355739

Region: CDS

TRC Version: 2 Clone ID: NM_006252.3-720s21c1

Sequence: CCGGGAGCATGTACCTACGTTATTTCTCGAGAAATAACGTAGGTACATGCTCTTTTTG

PGC-1 α #1:

TRCN0000001165

Region: 3UTR

TRC Version: 1 Clone ID: NM_013261.x-4291s1c1

Sequence: CCGGGCAGAGTATGACGATGGTATTCTCGAGAATACCATCGTCATACTCTGCTTTTT

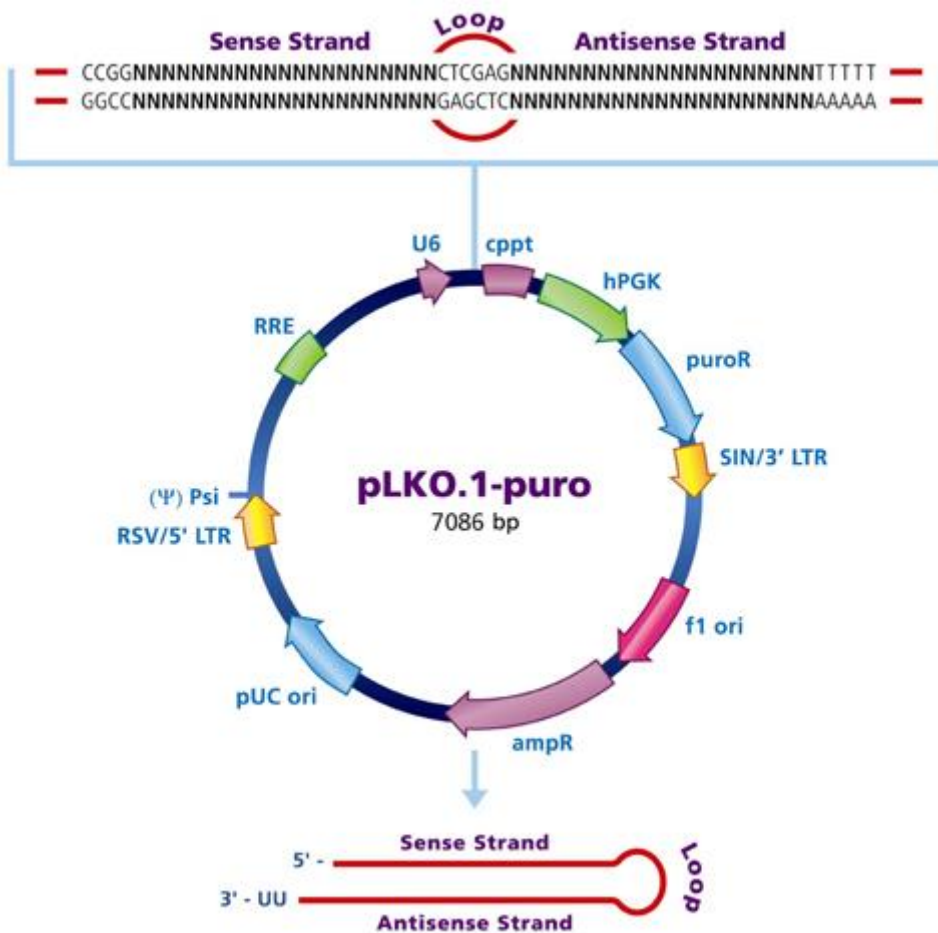
PGC-1α#2:

TRCN0000001166

Region: CDS

TRC Version: 1 Clone ID: NM_013261.x-2286s1c1

Sequence: CCGGCCGTTATACCTGTGATGCTTCTCGAGAAAGCATCACAGGTATAACGGTTTTT



- cppt Central polypurine tract
- hPGK Human phosphoglycerate kinase eukaryotic promoter
- puroR Puromycin resistance gene for mammalian selection

SIN/LTR	3' self inactivating long terminal repeat
f1 ori	f1 origin of replication
ampR	Ampicillin resistance gene for bacterial selection
pUC ori	pUC origin of replication
5' LTR	5' long terminal repeat
Psi	RNA packaging signal
RRE	Rev response element

9 Abkürzungsverzeichnis

°C:	Grad Celsius
Abb.:	Abbildung
Ak:	Antikörper
Bp:	Basenpaar
bzw.:	beziehungsweise
ca.:	circa
cm:	Zentimeter
d.h.:	das heißt
engl.	englisch
et al.:	et altera (und andere)
etc.:	et cetera (und so weiter)
g:	Gramm
h:	Stunde
Kat. Nr.	Katalognummer
kDa:	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l:	Liter
M:	Molar
Min:	Minute
ml:	Milliliter
mM:	Millimolar
mt:	mitochondrial

ng:	Nanogramm
nm:	Nanometer
rpm:	engl. round per minute
RT:	Raumtemperatur
SFI:	spezifische Fluoreszenz Index
sog.:	sogenannt
Tab.:	Tabelle
u.a.:	unter anderem
ÜN:	über Nacht
usw.:	und so weiter
V:	Volt
wt:	wildtyp
WHO:	engl. World Health Organisation
z.B.:	zum Beispiel
z.T.:	zum Teil
µg:	Mikrogramm
µl:	Mikroliter

9.1 Materialien

ac:	acetyliert
Amp:	Ampicillin
APS:	AmmoniumPerSulfat
BSA:	engl. Bovine Serum Albumin
bw:	engl. backward
cDNA:	engl. complementarity DNA
CO ₂ :	Kohlendioxid
CoA:	Coenzym A
de:	deacetyliert
ddH ₂ O:	Deuterium Depletiertes oder bidestilliertes Wasser
DMEM:	engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA:	engl. Desoxyribo Nucleic Acid

ECL:	engl. Enhanced Chemi Luminescence
EDTA:	engl. Ethylen DiamineTetraAcetat
FACS:	eng. Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS:	engl. Fetal Calf Serum
FITC:	engl. Fluorescein IsoThioCyanate (Form)
fw:	engl. forward
GBM:	Glioblastoma multiforme
Glk:	Glukose
hygro:	Hygromycin
HF:	engl. high fat
KV:	Kristallviolett
mt:	mitochondrial
mRNA:	eng. messenger RNA
mu:	mutiert
NAD ⁺ :	Nicotinamid Adenin Dinukleotid
NADH-H ⁺ :	Nicotinamid Adenin Dinukleotid-Phosphat
O ₂ :	Sauerstoff
p:	phosphoryliert
PBS:	engl. Phosphate Buffered Saline
Pen/Strep:	Penicillin/Streptomycin
PI:	Propidium Iodid
pO ₂ :	Sauerstoff-Partialdruck
puro:	puromycin
QRT-PCR:	eng. Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction
RNA:	engl. Ribonucleic Acid
ROS:	engl. Reactive Oxygen Species
SDS:	engl. Sodium Dodecyl Sulfate
Ser:	Serin
SFM:	Serum-Freies Medium
shRNA:	short hairpin RNA
TEMED:	N, N, N', N'-TetraMethylEthylenDiamin

Thr:	Threonin
TMZ:	Temozolomid (Handelsname Temodal®)
Tris:	Trishydroxymethylaminomethan
UE:	Untereinheit
VM	Vollmedium (DMEM, 25 mM Glukose mit FCS)
WB:	Western Blot
ZNS:	zentrales Nervensystem

9.2 Proteine

ACC:	Acetyl-CoA-Carboxylase
Akt/PKB:	Proteinkinase B
AMP:	Adenosinmonophosphat
AMPK:	AMP-aktivierte Kinase
ATP:	Adenosintriphosphat
CBP/p300:	engl. CREB binding protein
c-SRC:	zusammengesetztes Akronym aus cellular und sarcoma
EGFR:	engl. Epidermal Growth Factor Receptor
EGFRVIII:	engl. Epidermal Growth Factor Receptor Variante 8
ERR α :	engl. Estrogen-Related Receptor alpha
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCN5:	Histon Acetyltransferase
HIF-1 α :	engl. Hypoxia Inducible Factor-1 alpha
IDH1/2:	Isocitrat Dehydrogenase 1/2
LKB1:	engl. Liver Kinase B1
MGMT:	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
Oct4:	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
PGC-1 α/β :	engl. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PPAR- γ 1/2:	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTEN:	Phosphatase und Tensin Homolog
SIRT1:	Sirtuin-1
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor

VHL: von Hippel-Lindau

10 Literaturverzeichnis

1. Khosla, D. (2016) Concurrent therapy to enhance radiotherapeutic outcomes in glioblastoma. *Ann Transl Med* **4**, 54
2. Wirsching, H. G., and Weller, M. (2016) The Role of Molecular Diagnostics in the Management of Patients with Gliomas. *Curr Treat Options Oncol* **17**, 51
3. de Groot, J. F., Fuller, G., Kumar, A. J., Piao, Y., Eterovic, K., Ji, Y., and Conrad, C. A. (2010) Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro Oncol* **12**, 233-242
4. Wanka, C., Steinbach, J. P., and Rieger, J. (2012) Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) protects glioma cells from starvation-induced cell death by up-regulating respiration and improving cellular redox homeostasis. *J Biol Chem* **287**, 33436-33446
5. Peereboom, D. M., Shepard, D. R., Ahluwalia, M. S., Brewer, C. J., Agarwal, N., Stevens, G. H., Suh, J. H., Toms, S. A., Vogelbaum, M. A., Weil, R. J., Elson, P., and Barnett, G. H. (2010) Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* **98**, 93-99
6. Marcus, H. J., Carpenter, K. L., Price, S. J., and Hutchinson, P. J. (2010) In vivo assessment of high-grade glioma biochemistry using microdialysis: a study of energy-related molecules, growth factors and cytokines. *J Neurooncol* **97**, 11-23
7. Kleihues, P., and Ohgaki, H. (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* **1**, 44-51
8. Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* **19**, 764-772
9. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., and Ellison, D. W. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* **131**, 803-820
10. Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* **109**, 93-108
11. Omuro, A., and DeAngelis, L. M. (2013) Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Jama* **310**, 1842-1850

12. Demuth, T., Rennert, J. L., Hoelzinger, D. B., Reavie, L. B., Nakada, M., Beaudry, C., Nakada, S., Anderson, E. M., Henrichs, A. N., McDonough, W. S., Holz, D., Joy, A., Lin, R., Pan, K. H., Lih, C. J., Cohen, S. N., and Berens, M. E. (2008) Glioma cells on the run - the migratory transcriptome of 10 human glioma cell lines. *Bmc Genomics* **9**
13. Malmstrom, A., Gronberg, B. H., Marosi, C., Stupp, R., Frappaz, D., Schultz, H., Abacioglu, U., Tavelin, B., Lhermitte, B., Hegi, M. E., Rosell, J., Henriksson, R., and Ncbtsg. (2012) Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **13**, 916-926
14. Verma, V., and Mehta, M. P. (2016) Clinical ramifications of "genomic staging" of low-grade gliomas. *J Neurooncol* **129**, 195-199
15. Xu, R., Pisapia, D., and Greenfield, J. P. (2016) Malignant Transformation in Glioma Steered by an Angiogenic Switch: Defining a Role for Bone Marrow-Derived Cells. *Cureus* **8**, e471
16. Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J. (2014) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol* **16 Suppl 4**, iv1-63
17. Capper, D., and Reifenberger, G. (2015) [Classification of gliomas. Current progress and perspectives]. *Nervenarzt* **86**, 672, 674-676, 678-680, passim
18. Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 479-489
19. Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S. G., Touloumis, A., Collins, V. P., Marioni, J. C., Curtis, C., Watts, C., and Tavare, S. (2013) Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4009-4014
20. Szerlip, N. J., Pedraza, A., Chakravarty, D., Azim, M., McGuire, J., Fang, Y., Ozawa, T., Holland, E. C., Huse, J. T., Jhanwar, S., Leversha, M. A., Mikkelsen, T., and Brennan, C. W. (2012) Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3041-3046
21. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A.,

- Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., European Organisation for, R., Treatment of Cancer Brain, T., Radiotherapy, G., and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 987-996
22. Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Wang, M., Gilbert, M. R., Won, M., Bottomley, A., Mendoza, T. R., Coens, C., Werner-Wasik, M., Brachman, D. G., Choucair, A. K., and Mehta, M. (2013) Net clinical benefit analysis of radiation therapy oncology group 0525: a phase III trial comparing conventional adjuvant temozolomide with dose-intensive temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, 4076-4084
23. Stupp, R., Hegi, M. E., Gorlia, T., Erridge, S. C., Perry, J., Hong, Y. K., Aldape, K. D., Lhermitte, B., Pietsch, T., Grujicic, D., Steinbach, J. P., Wick, W., Tarnawski, R., Nam, D. H., Hau, P., Weyerbrock, A., Taphoorn, M. J., Shen, C. C., Rao, N., Thurzo, L., Herrlinger, U., Gupta, T., Kortmann, R. D., Adamska, K., McBain, C., Brandes, A. A., Tonn, J. C., Schnell, O., Wiegel, T., Kim, C. Y., Nabors, L. B., Reardon, D. A., van den Bent, M. J., Hicking, C., Markivskyy, A., Picard, M., and Weller, M. (2014) Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **15**, 1100-1108
24. Gilbert, M. R. (2011) Recurrent glioblastoma: a fresh look at current therapies and emerging novel approaches. *Semin Oncol* **38 Suppl 4**, S21-33
25. Shrieve, D. C., Alexander, E., 3rd, Black, P. M., Wen, P. Y., Fine, H. A., Kooy, H. M., and Loeffler, J. S. (1999) Treatment of patients with primary glioblastoma multiforme with standard postoperative radiotherapy and radiosurgical boost: prognostic factors and long-term outcome. *J Neurosurg* **90**, 72-77
26. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., and Mirimanoff, R. O. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 987-996

27. Jansen, E. P., Dewit, L. G., van Herk, M., and Bartelink, H. (2000) Target volumes in radiotherapy for high-grade malignant glioma of the brain. *Radiother Oncol* **56**, 151-156
28. Kneifel, S., Bernhardt, P., Uusijarvi, H., Good, S., Plasswilm, L., Buitrago-Tellez, C., Muller-Brand, J., Macke, H., and Merlo, A. (2007) Individual voxelwise dosimetry of targeted 90Y-labelled substance P radiotherapy for malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34**, 1388-1395
29. Hart, M. G., Garside, R., Rogers, G., Stein, K., and Grant, R. (2013) Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007415
30. Zhang, J., Stevens, M. F., and Bradshaw, T. D. (2012) Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol* **5**, 102-114
31. Stevens, M. F., Hickman, J. A., Langdon, S. P., Chubb, D., Vickers, L., Stone, R., Baig, G., Goddard, C., Gibson, N. W., Slack, J. A., and et al. (1987) Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res* **47**, 5846-5852
32. Friedman, H. S., Kerby, T., and Calvert, H. (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* **6**, 2585-2597
33. Plowman, J., Waud, W. R., Koutsoukos, A. D., Rubinstein, L. V., Moore, T. D., and Grever, M. R. (1994) Preclinical antitumor activity of temozolomide in mice: efficacy against human brain tumor xenografts and synergism with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* **54**, 3793-3799
34. Friedman, H. S., Dolan, M. E., Pegg, A. E., Marcelli, S., Keir, S., Catino, J. J., Bigner, D. D., and Schold, S. C., Jr. (1995) Activity of temozolomide in the treatment of central nervous system tumor xenografts. *Cancer Res* **55**, 2853-2857
35. Vieira, D. B., and Gamarra, L. F. (2016) Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine* **11**, 5381-5414
36. Khosla, D. (2016) Concurrent therapy to enhance radiotherapeutic outcomes in glioblastoma. *Ann Transl Med* **4**, 54
37. Vecht, C., Royer-Perron, L., Houillier, C., and Huberfeld, G. (2017) Seizures and Anticonvulsants in Brain Tumours: Frequency, Mechanisms and Anti-Epileptic Management. *Curr Pharm Des* **23**, 6464-6487
38. Shields, L. B., Shelton, B. J., Shearer, A. J., Chen, L., Sun, D. A., Parsons, S., Bourne, T. D., LaRocca, R., and Spalding, A. C. (2015) Dexamethasone

- administration during definitive radiation and temozolomide renders a poor prognosis in a retrospective analysis of newly diagnosed glioblastoma patients. *Radiat Oncol* **10**, 222
39. Reid, T. M., Fry, M., and Loeb, L. A. (1991) Endogenous mutations and cancer. *Princess Takamatsu Symp* **22**, 221-229
 40. Hall, E. J., and Freyer, G. A. (1991) The molecular biology of radiation carcinogenesis. *Basic Life Sci* **58**, 3-19; discussion 19-25
 41. Dulbecco, R. (1969) Cell transformation by viruses. *Science* **166**, 962-968
 42. Trosko, J. E., and Ruch, R. J. (1998) Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* **3**, d208-236
 43. Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., and Bigner, D. D. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**, 765-773
 44. Gatto, F., and Nielsen, J. (2016) Systematic analysis of overall survival and interactions between tumor mutations and drug treatment. *J Hematol Oncol* **9**, 15
 45. Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Jr., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, S. K., Shinjo, S. M., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E., and Kinzler, K. W. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807-1812
 46. Houillier, C., Wang, X., Kaloshi, G., Mokhtari, K., Guillevin, R., Laffaire, J., Paris, S., Boisselier, B., Idbaih, A., Laigle-Donadey, F., Hoang-Xuan, K., Sanson, M., and Delattre, J. Y. (2010) IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* **75**, 1560-1566
 47. Cheng, H. B., Yue, W., Xie, C., Zhang, R. Y., Hu, S. S., and Wang, Z. (2013) IDH1 mutation is associated with improved overall survival in patients with glioblastoma: a meta-analysis. *Tumour Biol* **34**, 3555-3559
 48. Beiko, J., Suki, D., Hess, K. R., Fox, B. D., Cheung, V., Cabral, M., Shonka, N., Gilbert, M. R., Sawaya, R., Prabhu, S. S., Weinberg, J., Lang, F. F., Aldape, K. D., Sulman, E. P., Rao, G., McCutcheon, I. E., and Cahill, D. P. (2014) IDH1 mutant malignant astrocytomas are more amenable to surgical resection and have a survival benefit associated with maximal surgical resection. *Neuro Oncol* **16**, 81-91

49. Jue, T. R., Hovey, E., Davis, S., Carleton, O., and McDonald, K. L. (2015) Incorporation of biomarkers in phase II studies of recurrent glioblastoma. *Tumour Biol* **36**, 153-162
50. Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., and Stupp, R. (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 997-1003
51. Jue, T. R., Hovey, E., Davis, S., Carleton, O., and McDonald, K. L. (2015) Incorporation of biomarkers in phase II studies of recurrent glioblastoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **36**, 153-162
52. Donson, A. M., Addo-Yobo, S. O., Handler, M. H., Gore, L., and Foreman, N. K. (2007) MGMT promoter methylation correlates with survival benefit and sensitivity to temozolomide in pediatric glioblastoma. *Pediatr Blood Cancer* **48**, 403-407
53. Fleming, T. P., Saxena, A., Clark, W. C., Robertson, J. T., Oldfield, E. H., Aaronson, S. A., and Ali, I. U. (1992) Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* **52**, 4550-4553
54. Choi, Y., Song, Y. J., Lee, H. S., Hur, W. J., Sung, K. H., Kim, K. U., Choi, S. S., Kim, S. J., and Kim, D. C. (2013) Epidermal growth factor receptor is related to poor survival in glioblastomas: single-institution experience. *Yonsei Med J* **54**, 101-107
55. Bigner, S. H., Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Mark, J., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. (1990) Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* **50**, 8017-8022
56. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2965-2969
57. Eskilsson, E., Rosland, G. V., Talasila, K. M., Knappskog, S., Keunen, O., Sottoriva, A., Foerster, S., Solecki, G., Taxt, T., Jirik, R., Fritah, S., Harter, P. N., Valk, K., Al Hossain, J., Joseph, J. V., Jahedi, R., Saed, H. S., Piccirillo, S. G., Spiteri, I., Euskirchen, P., Graziani, G., Daubon, T., Lund-Johansen, M., Enger, P. O., Winkler, F., Ritter, C. A., Niclou, S. P., Watts, C., Bjerkvig, R., and Miletic, H. (2016) EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogenous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro Oncol*

58. Xu, W., Bi, Y., Kong, J., Zhang, J., Wang, B., Li, K., Tian, M., Pan, X., Shi, B., Gu, J., Jiang, H., Kong, X., and Li, Z. (2016) Combination of an anti-EGFRvIII antibody CH12 with Rapamycin synergistically inhibits the growth of EGFRvIII+PTEN-glioblastoma in vivo. *Oncotarget*
59. Belda-Iniesta, C., de Castro Carpeno, J., Sereno, M., Gonzalez-Baron, M., and Perona, R. (2008) Epidermal growth factor receptor and glioblastoma multiforme: molecular basis for a new approach. *Clin Transl Oncol* **10**, 73-77
60. Nyati, M. K., Morgan, M. A., Feng, F. Y., and Lawrence, T. S. (2006) Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* **6**, 876-885
61. Belda-Iniesta, C., de Castro Carpeno, J., Casado Saenz, E., Cejas Guerrero, P., Perona, R., and Gonzalez Baron, M. (2006) Molecular biology of malignant gliomas. *Clin Transl Oncol* **8**, 635-641
62. van den Bent, M. J., Brandes, A. A., Rampling, R., Kouwenhoven, M. C., Kros, J. M., Carpentier, A. F., Clement, P. M., Frenay, M., Campone, M., Baurain, J. F., Armand, J. P., Taphoorn, M. J., Tosoni, A., Kletzl, H., Klughammer, B., Lacombe, D., and Gorlia, T. (2009) Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J Clin Oncol* **27**, 1268-1274
63. Raizer, J. J., Giglio, P., Hu, J., Groves, M., Merrell, R., Conrad, C., Phuphanich, S., Puduvalli, V. K., Loghin, M., Paleologos, N., Yuan, Y., Liu, D., Rademaker, A., Yung, W. K., Vaillant, B., Rudnick, J., Chamberlain, M., Vick, N., Grimm, S., Tremont-Lukats, I. W., De Groot, J., Aldape, K., Gilbert, M. R., and Brain Tumor Trials, C. (2016) A phase II study of bevacizumab and erlotinib after radiation and temozolomide in MGMT unmethylated GBM patients. *J Neurooncol* **126**, 185-192
64. Reardon, D. A., Desjardins, A., Vredenburgh, J. J., Gururangan, S., Friedman, A. H., Herndon, J. E., 2nd, Marcello, J., Norfleet, J. A., McLendon, R. E., Sampson, J. H., and Friedman, H. S. (2010) Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* **96**, 219-230
65. Hockel, M., Schlenger, K., Hockel, S., Aral, B., Schaffer, U., and Vaupel, P. (1998) Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer. *Int J Cancer* **79**, 365-369
66. Vaupel, P., Mayer, A., and Hockel, M. (2004) Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* **381**, 335-354

67. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845
68. Harris, A. L. (2002) Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**, 38-47
69. Chen, R., Cohen, A. L., and Colman, H. (2016) Targeted Therapeutics in Patients With High-Grade Gliomas: Past, Present, and Future. *Curr Treat Options Oncol* **17**, 42
70. Reardon, D. A., Wen, P. Y., and Mellinghoff, I. K. (2014) Targeted molecular therapies against epidermal growth factor receptor: past experiences and challenges. *Neuro Oncol* **16 Suppl 8**, viii7-13
71. Stommel, J. M., Kimmelman, A. C., Ying, H., Nabioullin, R., Ponugoti, A. H., Wiedemeyer, R., Stegh, A. H., Bradner, J. E., Ligon, K. L., Brennan, C., Chin, L., and DePinho, R. A. (2007) Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* **318**, 287-290
72. Thorne, A. H., Zanca, C., and Furnari, F. (2016) Epidermal growth factor receptor targeting and challenges in glioblastoma. *Neuro Oncol* **18**, 914-918
73. Vivanco, I., Robins, H. I., Rohle, D., Campos, C., Grommes, C., Nghiemphu, P. L., Kubek, S., Oldrini, B., Chheda, M. G., Yannuzzi, N., Tao, H., Zhu, S., Iwanami, A., Kuga, D., Dang, J., Pedraza, A., Brennan, C. W., Heguy, A., Liau, L. M., Lieberman, F., Yung, W. K., Gilbert, M. R., Reardon, D. A., Drappatz, J., Wen, P. Y., Lamborn, K. R., Chang, S. M., Prados, M. D., Fine, H. A., Horvath, S., Wu, N., Lassman, A. B., DeAngelis, L. M., Yong, W. H., Kuhn, J. G., Mischel, P. S., Mehta, M. P., Cloughesy, T. F., and Mellinghoff, I. K. (2012) Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov* **2**, 458-471
74. Munoz, J. L., Rodriguez-Cruz, V., Greco, S. J., Nagula, V., Scotto, K. W., and Rameshwar, P. (2014) Temozolomide induces the production of epidermal growth factor to regulate MDR1 expression in glioblastoma cells. *Mol Cancer Ther* **13**, 2399-2411
75. Okamoto, S., Nitta, M., Maruyama, T., Sawada, T., Komori, T., Okada, Y., and Muragaki, Y. (2016) Bevacizumab changes vascular structure and modulates the expression of angiogenic factors in recurrent malignant gliomas. *Brain Tumor Pathol* **33**, 129-136
76. Taal, W., Oosterkamp, H. M., Walenkamp, A. M., Dubbink, H. J., Beerepoot, L. V., Hanse, M. C., Buter, J., Honkoop, A. H., Boerman, D., de Vos, F. Y., Dinjens, W. N., Enting, R. H., Taphoorn, M. J., van den

- Berkmortel, F. W., Jansen, R. L., Brandsma, D., Bromberg, J. E., van Heuvel, I., Vernhout, R. M., van der Holt, B., and van den Bent, M. J. (2014) Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol* **15**, 943-953
77. Curry, R. C., Dahiya, S., Alva Venur, V., Raizer, J. J., and Ahluwalia, M. S. (2015) Bevacizumab in high-grade gliomas: past, present, and future. *Expert Rev Anticancer Ther* **15**, 387-397
78. Vaupel, P. W. (1997) The influence of tumor blood flow and microenvironmental factors on the efficacy of radiation, drugs and localized hyperthermia. *Klin Padiatr* **209**, 243-249
79. Stapleton, S., Jaffray, D., and Milosevic, M. (2016) Radiation effects on the tumor microenvironment: Implications for nanomedicine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*
80. Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927) The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* **8**, 519-530
81. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029-1033
82. Weinhouse, S. (1976) The Warburg hypothesis fifty years later. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* **87**, 115-126
83. Frezza, C., and Gottlieb, E. (2009) Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol* **19**, 4-11
84. Newsholme, E. A., Crabtree, B., and Ardawi, M. S. (1985) The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci Rep* **5**, 393-400
85. Rankin, E. B., and Giaccia, A. J. (2016) Hypoxic control of metastasis. *Science* **352**, 175-180
86. Vaupel, P., and Mayer, A. (2007) Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 225-239
87. Michiels, C., Tellier, C., and Feron, O. (2016) Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta* **1866**, 76-86
88. Vaupel, P., Thews, O., and Hoeckel, M. (2001) Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* **18**, 243-259
89. Chen, W. L., Wang, C. C., Lin, Y. J., Wu, C. P., and Hsieh, C. H. (2015) Cycling hypoxia induces chemoresistance through the activation of reactive oxygen species-mediated B-cell lymphoma extra-long pathway in glioblastoma multiforme. *J Transl Med* **13**, 389

90. Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., and Semenza, G. L. (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **271**, 17771-17778
91. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464-468
92. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472
93. Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., and Kim, K. W. (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Experimental & molecular medicine* **36**, 1-12
94. Brat, D. J., and Mapstone, T. B. (2003) Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Ann Intern Med* **138**, 659-668
95. Brahim-Horn, M. C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007) Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current opinion in cell biology* **19**, 223-229
96. Eckert, A. W., Wickenhauser, C., Salins, P. C., Kappler, M., Bukur, J., and Seliger, B. (2016) Clinical relevance of the tumor microenvironment and immune escape of oral squamous cell carcinoma. *J Transl Med* **14**, 85
97. Ackerstaff, E., Artemov, D., Gillies, R. J., and Bhujwalla, Z. M. (2007) Hypoxia and the presence of human vascular endothelial cells affect prostate cancer cell invasion and metabolism. *Neoplasia* **9**, 1138-1151
98. Peixoto, A., Fernandes, E., Gaiteiro, C., Lima, L., Azevedo, R., Soares, J., Cotton, S., Parreira, B., Neves, M., Amaro, T., Tavares, A., Teixeira, F., Palmeira, C., Rangel, M., Silva, A. M., Reis, C. A., Santos, L. L., Oliveira, M. J., and Ferreira, J. A. (2016) Hypoxia enhances the malignant nature of bladder cancer cells and concomitantly antagonizes protein O-glycosylation extension. *Oncotarget*
99. Spence, A. M., Muzi, M., Swanson, K. R., O'Sullivan, F., Rockhill, J. K., Rajendran, J. G., Adamsen, T. C., Link, J. M., Swanson, P. E., Yagle, K. J., Rostomily, R. C., Silbergeld, D. L., and Krohn, K. A. (2008) Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clinical*

- cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 2623-2630
100. Eckerich, C., Zapf, S., Fillbrandt, R., Loges, S., Westphal, M., and Lamszus, K. (2007) Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *International journal of cancer* **121**, 276-283
 101. Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J., and Ha, J. (2016) AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med* **48**, e224
 102. Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A., and Hudson, E. R. (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* **546**, 113-120
 103. Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M., and Carling, D. (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* **2**, 21-33
 104. Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R., and Witters, L. A. (2005) The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* **280**, 29060-29066
 105. Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* **13**, 2004-2008
 106. Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G. A., Grossman, A. B., and Korbonits, M. (2006) Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab* **17**, 205-215
 107. Hardie, D. G. (2004) The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* **117**, 5479-5487
 108. Hardie, D. G., Ross, F. A., and Hawley, S. A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 251-262
 109. Laderoute, K. R., Amin, K., Calaoagan, J. M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., and Viollet, B. (2006) 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol* **26**, 5336-5347
 110. Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* **13**, 2004-2008

111. Hardie, D. G. (2018) Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *J R Soc Interface* **15**
112. Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D. G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* **1**, 15-25
113. Ruderman, N. B., Xu, X. J., Nelson, L., Cacicedo, J. M., Saha, A. K., Lan, F., and Ido, Y. (2010) AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**, E751-760
114. Zhang, H., Guan, M., Townsend, K. L., Huang, T. L., An, D., Yan, X., Xue, R., Schulz, T. J., Winnay, J., Mori, M., Hirshman, M. F., Kristiansen, K., Tsang, J. S., White, A. P., Cypess, A. M., Goodyear, L. J., and Tseng, Y. H. (2015) MicroRNA-455 regulates brown adipogenesis via a novel HIF1 α -AMPK-PGC1 α signaling network. *EMBO Rep* **16**, 1378-1393
115. Jeon, S. M., Chandel, N. S., and Hay, N. (2012) AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* **485**, 661-665
116. Folmes, C. D., and Lopaschuk, G. D. (2007) Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity. *Cardiovasc Res* **73**, 278-287
117. O'Neill, H. M., Lally, J. S., Galic, S., Thomas, M., Azizi, P. D., Fullerton, M. D., Smith, B. K., Pulinilkunnil, T., Chen, Z., Samaan, M. C., Jorgensen, S. B., Dyck, J. R., Holloway, G. P., Hawke, T. J., van Denderen, B. J., Kemp, B. E., and Steinberg, G. R. (2014) AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* **57**, 1693-1702
118. Shaw, R. J., Bardeesy, N., Manning, B. D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R. A., and Cantley, L. C. (2004) The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**, 91-99
119. Chen, L., Chen, Q., Deng, G., Xie, W., Lian, J., Wang, M., and Zhu, H. (2016) AMPK activation by GSK621 inhibits human melanoma cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*
120. Jang, T., Calaoagan, J. M., Kwon, E., Samuelsson, S., Recht, L., and Laderoute, K. R. (2011) 5'-AMP-activated protein kinase activity is elevated early during primary brain tumor development in the rat. *Int J Cancer* **128**, 2230-2239
121. Liang, J., and Mills, G. B. (2013) AMPK: a contextual oncogene or tumor suppressor? *Cancer Res* **73**, 2929-2935
122. Liang, J., and Mills, G. B. (2013) AMPK: a contextual oncogene or tumor suppressor? *Cancer Res* **73**, 2929-2935

123. Lin, J., Tarr, P. T., Yang, R., Rhee, J., Puigserver, P., Newgard, C. B., and Spiegelman, B. M. (2003) PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem* **278**, 30843-30848
124. Wei, W., Wang, X., Yang, M., Smith, L. C., Dechow, P. C., Sonoda, J., Evans, R. M., and Wan, Y. (2010) PGC1beta mediates PPARgamma activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss. *Cell Metab* **11**, 503-516
125. Hatazawa, Y., Minami, K., Yoshimura, R., Onishi, T., Manio, M. C., Inoue, K., Sawada, N., Suzuki, O., Miura, S., and Kamei, Y. (2016) Deletion of the transcriptional coactivator PGC1alpha in skeletal muscles is associated with reduced expression of genes related to oxidative muscle function. *Biochem Biophys Res Commun* **481**, 251-258
126. Vega, R. B., Huss, J. M., and Kelly, D. P. (2000) The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* **20**, 1868-1876
127. Liang, H., and Ward, W. F. (2006) PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* **30**, 145-151
128. Mastropasqua, F., Girolimetti, G., and Shoshan, M. (2018) PGC1alpha: Friend or Foe in Cancer? *Genes (Basel)* **9**
129. Zhu, L., Wang, Q., Zhang, L., Fang, Z., Zhao, F., Lv, Z., Gu, Z., Zhang, J., Wang, J., Zen, K., Xiang, Y., Wang, D., and Zhang, C. Y. (2010) Hypoxia induces PGC-1alpha expression and mitochondrial biogenesis in the myocardium of TOF patients. *Cell Res* **20**, 676-687
130. Ping, Z., Zhang, L. F., Cui, Y. J., Chang, Y. M., Jiang, C. W., Meng, Z. Z., Xu, P., Liu, H. Y., Wang, D. Y., and Cao, X. B. (2015) The Protective Effects of Salidroside from Exhaustive Exercise-Induced Heart Injury by Enhancing the PGC-1 alpha -NRF1/NRF2 Pathway and Mitochondrial Respiratory Function in Rats. *Oxid Med Cell Longev* **2015**, 876825
131. Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., and Spiegelman, B. M. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124
132. Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., and Spiegelman, B. M. (1999) Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* **286**, 1368-1371
133. Puigserver, P. (2005) Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *Int J Obes (Lond)* **29 Suppl 1**, S5-9

134. Anderson, R. M., Barger, J. L., Edwards, M. G., Braun, K. H., O'Connor, C. E., Prolla, T. A., and Weindruch, R. (2008) Dynamic regulation of PGC-1alpha localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell* **7**, 101-111
135. Southgate, R. J., Bruce, C. R., Carey, A. L., Steinberg, G. R., Walder, K., Monks, R., Watt, M. J., Hawley, J. A., Birnbaum, M. J., and Febbraio, M. A. (2005) PGC-1alpha gene expression is down-regulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FoxO1 in insulin-stimulated skeletal muscle. *Faseb J* **19**, 2072-2074
136. Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J. C., Zhang, C. Y., Krauss, S., Mootha, V. K., Lowell, B. B., and Spiegelman, B. M. (2001) Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* **8**, 971-982
137. Sano, M., Tokudome, S., Shimizu, N., Yoshikawa, N., Ogawa, C., Shirakawa, K., Endo, J., Katayama, T., Yuasa, S., Ieda, M., Makino, S., Hattori, F., Tanaka, H., and Fukuda, K. (2007) Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *J Biol Chem* **282**, 25970-25980
138. Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B. M. (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12017-12022
139. Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056-1060
140. Houtkooper, R. H., Canto, C., Wanders, R. J., and Auwerx, J. (2010) The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev* **31**, 194-223
141. Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., and Puigserver, P. (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* **434**, 113-118
142. Lerin, C., Rodgers, J. T., Kalume, D. E., Kim, S. H., Pandey, A., and Puigserver, P. (2006) GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. *Cell Metab* **3**, 429-438
143. Coste, A., Louet, J. F., Lagouge, M., Lerin, C., Antal, M. C., Meziane, H., Schoonjans, K., Puigserver, P., O'Malley, B. W., and Auwerx, J. (2008) The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin

- sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17187-17192
144. Fenton, T. R., Nathanson, D., Ponte de Albuquerque, C., Kuga, D., Iwanami, A., Dang, J., Yang, H., Tanaka, K., Oba-Shinjo, S. M., Uno, M., Inda, M. M., Wykosky, J., Bachoo, R. M., James, C. D., DePinho, R. A., Vandenberg, S. R., Zhou, H., Marie, S. K., Mischel, P. S., Cavenee, W. K., and Furnari, F. B. (2012) Resistance to EGF receptor inhibitors in glioblastoma mediated by phosphorylation of the PTEN tumor suppressor at tyrosine 240. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 14164-14169
145. Gan, H. K., Kaye, A. H., and Luwor, R. B. (2009) The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* **16**, 748-754
146. Steinbach, J. P., Wolburg, H., Klumpp, A., Probst, H., and Weller, M. (2003) Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. *Cell Death Differ* **10**, 823-832
147. Hofmann, U., Maier, K., Niebel, A., Vacun, G., Reuss, M., and Mauch, K. (2008) Identification of metabolic fluxes in hepatic cells from transient ^{13}C -labeling experiments: Part I. Experimental observations. *Biotechnol Bioeng* **100**, 344-354
148. Hofmann, U., Heinkele, G., Angelberger, S., Schaeffeler, E., Lichtenberger, C., Jaeger, S., Reinisch, W., and Schwab, M. (2012) Simultaneous quantification of eleven thiopurine nucleotides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **84**, 1294-1301
149. Maier, K., Hofmann, U., Bauer, A., Niebel, A., Vacun, G., Reuss, M., and Mauch, K. (2009) Quantification of statin effects on hepatic cholesterol synthesis by transient (^{13}C)-flux analysis. *Metab Eng* **11**, 292-309
150. Maier, K., Hofmann, U., Reuss, M., and Mauch, K. (2010) Dynamics and control of the central carbon metabolism in hepatoma cells. *BMC Syst Biol* **4**, 54
151. Fry, D. W., Kraker, A. J., McMichael, A., Ambroso, L. A., Nelson, J. M., Leopold, W. R., Connors, R. W., and Bridges, A. J. (1994) A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* **265**, 1093-1095
152. Woodward, G. E., and Hudson, M. T. (1954) The effect of 2-desoxy-D-glucose on glycolysis and respiration of tumor and normal tissues. *Cancer Res* **14**, 599-605
153. Vincent, E. E., Coelho, P. P., Blagih, J., Griss, T., Viollet, B., and Jones, R. G. (2015) Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism. *Oncogene* **34**, 3627-3639

154. Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R., Zhao, G., Marsh, K., Kym, P., Jung, P., Camp, H. S., and Frevert, E. (2006) Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* **3**, 403-416
155. Vazquez, F., Lim, J. H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C. B., Granter, S. R., Widlund, H. R., Spiegelman, B. M., and Puigserver, P. (2013) PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell* **23**, 287-301
156. Schreiber, S. N., Emter, R., Hock, M. B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., Oakeley, E. J., and Kralli, A. (2004) The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6472-6477
157. Holloszy, J. O. (2008) Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. *J Physiol Pharmacol* **59 Suppl 7**, 5-18
158. Michael, L. F., Wu, Z., Cheatham, R. B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J. J., Kelly, D. P., and Spiegelman, B. M. (2001) Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3820-3825
159. Evans, A., Bates, V., Troy, H., Hewitt, S., Holbeck, S., Chung, Y. L., Phillips, R., Stubbs, M., Griffiths, J., and Airley, R. (2008) Glut-1 as a therapeutic target: increased chemoresistance and HIF-1-independent link with cell turnover is revealed through COMPARE analysis and metabolomic studies. *Cancer Chemother Pharmacol* **61**, 377-393
160. Liu, Y., Li, Y. M., Tian, R. F., Liu, W. P., Fei, Z., Long, Q. F., Wang, X. A., and Zhang, X. (2009) The expression and significance of HIF-1alpha and GLUT-3 in glioma. *Brain Res* **1304**, 149-154
161. Vannucci, S. J., Seaman, L. B., and Vannucci, R. C. (1996) Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 77-81
162. Loike, J. D., Cao, L., Brett, J., Ogawa, S., Silverstein, S. C., and Stern, D. (1992) Hypoxia induces glucose transporter expression in endothelial cells. *Am J Physiol* **263**, C326-333
163. Wood, I. S., Wang, B., Lorente-Cebrian, S., and Trayhurn, P. (2007) Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **361**, 468-473

164. St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D. K., Bachoo, R., and Spiegelman, B. M. (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127**, 397-408
165. Marmolino, D., Manto, M., Acquaviva, F., Vergara, P., Ravella, A., Monticelli, A., and Pandolfo, M. (2010) PGC-1alpha down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich's ataxia. *PLoS One* **5**, e10025
166. Fu, X. F., Yao, K., Du, X., Li, Y., Yang, X. Y., Yu, M., Li, M. Z., and Cui, Q. H. (2016) PGC-1alpha regulates the cell cycle through ATP and ROS in CH1 cells. *J Zhejiang Univ Sci B* **17**, 136-146
167. LeBleu, V. S., O'Connell, J. T., Gonzalez Herrera, K. N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., de Carvalho, F. M., Damascena, A., Domingos Chinen, L. T., Rocha, R. M., Asara, J. M., and Kalluri, R. (2014) PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol* **16**, 992-1003, 1001-1015
168. Gilkes, D. M. (2016) Implications of Hypoxia in Breast Cancer Metastasis to Bone. *Int J Mol Sci* **17**
169. Eckerich, C., Zapf, S., Fillbrandt, R., Loges, S., Westphal, M., and Lamszus, K. (2007) Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int J Cancer* **121**, 276-283
170. Kang, S. H., Yu, M. O., Park, K. J., Chi, S. G., Park, D. H., and Chung, Y. G. (2010) Activated STAT3 regulates hypoxia-induced angiogenesis and cell migration in human glioblastoma. *Neurosurgery* **67**, 1386-1395; discussion 1395
171. Arany, Z., Foo, S. Y., Ma, Y., Ruas, J. L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S. M., Baek, K. H., Rosenzweig, A., and Spiegelman, B. M. (2008) HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature* **451**, 1008-1012
172. De Luca, A., Fiorillo, M., Peiris-Pages, M., Ozsvari, B., Smith, D. L., Sanchez-Alvarez, R., Martinez-Outschoorn, U. E., Cappello, A. R., Pezzi, V., Lisanti, M. P., and Sotgia, F. (2015) Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget* **6**, 14777-14795
173. Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2009) mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science* **122**, 3589-3594

174. Ronellenfitsch, M. W., Brucker, D. P., Burger, M. C., Wolking, S., Tritschler, F., Rieger, J., Wick, W., Weller, M., and Steinbach, J. P. (2009) Antagonism of the mammalian target of rapamycin selectively mediates metabolic effects of epidermal growth factor receptor inhibition and protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death. *Brain* **132**, 1509-1522
175. Steinbach, J. P., Klumpp, A., Wolburg, H., and Weller, M. (2004) Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death. *Cancer Res* **64**, 1575-1578
176. Hartel, I., Ronellenfitsch, M., Wanka, C., Wolking, S., Steinbach, J. P., and Rieger, J. (2016) Activation of AMP-activated kinase modulates sensitivity of glioma cells against epidermal growth factor receptor inhibition. *Int J Oncol* **49**, 173-180
177. Dittmann, K., Mayer, C., Rodemann, H. P., and Huber, S. M. (2013) EGFR cooperates with glucose transporter SGLT1 to enable chromatin remodeling in response to ionizing radiation. *Radiother Oncol* **107**, 247-251
178. Shao, Y., Yu, Y., Zong, R., Quyang, L., He, H., Zhou, Q., and Pei, C. (2017) Erlotinib has tumor inhibitory effect in human retinoblastoma cells. *Biomed Pharmacother* **85**, 479-485
179. Xu, L., Wu, H., Jiang, C., Wang, H., Gao, B., Yan, S., Qi, Y., and Zhou, S. (2016) Dacomitinib, a new pan-EGFR inhibitor, is effective in killing ovarian cancer cells. *Discov Med* **22**, 297-309
180. Ye, J., Chen, W., Wu, Z. Y., Zhang, J. H., Fei, H., Zhang, L. W., Wang, Y. H., Chen, Y. P., and Yang, X. M. (2016) Upregulated CTHRC1 promotes human epithelial ovarian cancer invasion through activating EGFR signaling. *Oncol Rep* **36**, 3588-3596
181. Kim, T. W., Ryu, H. H., Li, S. Y., Li, C. H., Lim, S. H., Jang, W. Y., and Jung, S. (2017) PDIA6 regulation of ADAM17 shedding activity and EGFR-mediated migration and invasion of glioblastoma cells. *J Neurosurg* **126**, 1829-1838
182. Day, K. C., Lorenzatti Hiles, G., Kozminsky, M., Dawsey, S. J., Paul, A., Brodes, L. J., Shah, R., Kunja, L. P., Hall, C., Palanisamy, N., Daignault-Newton, S., El-Sawy, L., Wilson, S. J., Chou, A., Ignatoski, K. W., Keller, E., Thomas, D., Nagrath, S., Morgan, T., and Day, M. L. (2017) HER2 and EGFR Overexpression Support Metastatic Progression of Prostate Cancer to Bone. *Cancer Res* **77**, 74-85
183. Peereboom, D. M., Shepard, D. R., Ahluwalia, M. S., Brewer, C. J., Agarwal, N., Stevens, G. H., Suh, J. H., Toms, S. A., Vogelbaum, M. A.,

- Weil, R. J., Elson, P., and Barnett, G. H. (2010) Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* **98**, 93-99
184. Marcus, H. J., Carpenter, K. L., Price, S. J., and Hutchinson, P. J. (2010) In vivo assessment of high-grade glioma biochemistry using microdialysis: a study of energy-related molecules, growth factors and cytokines. *J Neurooncol* **97**, 11-23
185. Collingridge, D. R., Piepmeier, J. M., Rockwell, S., and Knisely, J. P. (1999) Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **53**, 127-131
186. Kim, S. M., Yun, M. R., Hong, Y. K., Solca, F., Kim, J. H., Kim, H. J., and Cho, B. C. (2013) Glycolysis inhibition sensitizes non-small cell lung cancer with T790M mutation to irreversible EGFR inhibitors via translational suppression of Mcl-1 by AMPK activation. *Molecular cancer therapeutics* **12**, 2145-2156
187. Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B. J., Viollet, B., Mamer, O. A., Avizonis, D., DeBerardinis, R. J., Siegel, P. M., and Jones, R. G. (2013) AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab* **17**, 113-124
188. Miwa, H., Shikami, M., Goto, M., Mizuno, S., Takahashi, M., Tsunekawa-Imai, N., Ishikawa, T., Mizutani, M., Horio, T., Gotou, M., Yamamoto, H., Wakabayashi, M., Watarai, M., Hanamura, I., Imamura, A., Mihara, H., and Nitta, M. (2013) Leukemia cells demonstrate a different metabolic perturbation provoked by 2-deoxyglucose. *Oncol Rep* **29**, 2053-2057
189. Liu, X., Chhipa, R. R., Pooya, S., Wortman, M., Yachyshin, S., Chow, L. M., Kumar, A., Zhou, X., Sun, Y., Quinn, B., McPherson, C., Warnick, R. E., Kendler, A., Giri, S., Poels, J., Norga, K., Viollet, B., Grabowski, G. A., and Dasgupta, B. (2014) Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E435-444
190. Leprivier, G., Remke, M., Rotblat, B., Dubuc, A., Mateo, A. R., Kool, M., Agnihotri, S., El-Naggar, A., Yu, B., Somasekharan, S. P., Faubert, B., Bridon, G., Tognon, C. E., Mathers, J., Thomas, R., Li, A., Barokas, A., Kwok, B., Bowden, M., Smith, S., Wu, X., Korshunov, A., Hielscher, T., Northcott, P. A., Galpin, J. D., Ahern, C. A., Wang, Y., McCabe, M. G., Collins, V. P., Jones, R. G., Pollak, M., Delattre, O., Gleave, M. E., Jan, E., Pfister, S. M., Proud, C. G., Derry, W. B., Taylor, M. D., and Sorensen, P.

- H. (2013) The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation. *Cell* **153**, 1064-1079
191. Qian, X., Li, J., Ding, J., Wang, Z., Zhang, W., and Hu, G. (2009) Erlotinib activates mitochondrial death pathways related to the production of reactive oxygen species in the human non-small cell lung cancer cell line A549. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 487-494
192. Zhao, F., Mancuso, A., Bui, T. V., Tong, X., Gruber, J. J., Swider, C. R., Sanchez, P. V., Lum, J. J., Sayed, N., Melo, J. V., Perl, A. E., Carroll, M., Tuttle, S. W., and Thompson, C. B. (2010) Imatinib resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1 α -induced metabolic reprogramming. *Oncogene* **29**, 2962-2972
193. De Rosa, V., Iommelli, F., Monti, M., Fonti, R., Votta, G., Stoppelli, M. P., and Del Vecchio, S. (2015) Reversal of Warburg Effect and Reactivation of Oxidative Phosphorylation by Differential Inhibition of EGFR Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **21**, 5110-5120
194. Jensen, R. L. (2009) Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *J Neurooncol* **92**, 317-335
195. Keibler, M. A., Wasylenko, T. M., Kelleher, J. K., Iliopoulos, O., Vander Heiden, M. G., and Stephanopoulos, G. (2016) Metabolic requirements for cancer cell proliferation. *Cancer Metab* **4**, 16
196. Maher, E. A., Marin-Valencia, I., Bachoo, R. M., Mashimo, T., Raisanen, J., Hatanpaa, K. J., Jindal, A., Jeffrey, F. M., Choi, C., Madden, C., Mathews, D., Pascual, J. M., Mickey, B. E., Malloy, C. R., and DeBerardinis, R. J. (2012) Metabolism of [U-13 C]glucose in human brain tumors in vivo. *NMR Biomed* **25**, 1234-1244
197. Marin-Valencia, I., Yang, C., Mashimo, T., Cho, S., Baek, H., Yang, X. L., Rajagopalan, K. N., Maddie, M., Vemireddy, V., Zhao, Z., Cai, L., Good, L., Tu, B. P., Hatanpaa, K. J., Mickey, B. E., Mates, J. M., Pascual, J. M., Maher, E. A., Malloy, C. R., Deberardinis, R. J., and Bachoo, R. M. (2012) Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metab* **15**, 827-837
198. Lin, H., Patel, S., Affleck, V. S., Wilson, I., Turnbull, D. M., Joshi, A. R., Maxwell, R., and Stoll, E. A. (2017) Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. *Neuro Oncol* **19**, 43-54
199. Di, K., Lomeli, N., Wood, S. D., Vanderwal, C. D., and Bota, D. A. (2016) Mitochondrial Lon is over-expressed in high-grade gliomas, and

- mediates hypoxic adaptation: potential role of Lon as a therapeutic target in glioma. *Oncotarget* **7**, 77457-77467
200. Santos, J. M., Tewari, S., and Benite-Ribeiro, S. A. (2014) The effect of exercise on epigenetic modifications of PGC1: The impact on type 2 diabetes. *Med Hypotheses* **82**, 748-753
 201. Shah, K., Desilva, S., and Abbruscato, T. (2012) The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* **13**, 12629-12655
 202. Yeh, W. L., Lin, C. J., and Fu, W. M. (2008) Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia. *Mol Pharmacol* **73**, 170-177
 203. Liou, G. Y., and Storz, P. (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* **44**, 479-496
 204. Ristow, M., and Schmeisser, K. (2014) Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response* **12**, 288-341
 205. Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* **26**, 1749-1760
 206. Lee, J., Giordano, S., and Zhang, J. (2012) Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* **441**, 523-540
 207. Wenz, T. (2009) PGC-1alpha activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease. *IUBMB Life* **61**, 1051-1062
 208. Eggleston, L. V., and Krebs, H. A. (1974) Regulation of the pentose phosphate cycle. *Biochem J* **138**, 425-435
 209. Denysenko, T., Gennero, L., Juenemann, C., Morra, I., Masperi, P., Ceroni, V., Pragliola, A., Ponzetto, A., and Melcarne, A. (2014) Heterogeneous phenotype of human glioblastoma: in vitro study. *Cell Biochem Funct* **32**, 164-176
 210. Janiszewska, M., Suva, M. L., Riggi, N., Houtkooper, R. H., Auwerx, J., Clement-Schatlo, V., Radovanovic, I., Rheinbay, E., Provero, P., and Stamenkovic, I. (2012) Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells. *Genes Dev* **26**, 1926-1944
 211. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674
 212. Wanka, C., Brucker, D. P., Bahr, O., Ronellenfitsch, M., Weller, M., Steinbach, J. P., and Rieger, J. (2012) Synthesis of cytochrome C oxidase 2: a p53-dependent metabolic regulator that promotes respiratory

- function and protects glioma and colon cancer cells from hypoxia-induced cell death. *Oncogene* **31**, 3764-3776
213. Dodd, K. M., Yang, J., Shen, M. H., Sampson, J. R., and Tee, A. R. (2015) mTORC1 drives HIF-1alpha and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene* **34**, 2239-2250
 214. Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., and Maity, A. (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* **276**, 9519-9525
 215. Hayashi, M., Sakata, M., Takeda, T., Yamamoto, T., Okamoto, Y., Sawada, K., Kimura, A., Minekawa, R., Tahara, M., Tasaka, K., and Murata, Y. (2004) Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol* **183**, 145-154
 216. Oh, S., Kim, H., Nam, K., and Shin, I. (2017) Glut1 promotes cell proliferation, migration and invasion by regulating epidermal growth factor receptor and integrin signaling in triple-negative breast cancer cells. *BMB Rep* **50**, 132-137
 217. Zhang, S., Liu, X., Liu, J., Guo, H., Xu, H., and Zhang, G. (2017) PGC-1 alpha interacts with microRNA-217 to functionally regulate breast cancer cell proliferation. *Biomed Pharmacother* **85**, 541-548
 218. Zheng, J., Liu, X., Xue, Y., Gong, W., Ma, J., Xi, Z., Que, Z., and Liu, Y. (2017) TTBK2 circular RNA promotes glioma malignancy by regulating miR-217/HNF1beta/Derlin-1 pathway. *J Hematol Oncol* **10**, 52
 219. Thiebold, A.-L., Lorenz, N. I., Foltyn, M., Engel, A. L., Divé, I., Urban, H., Heller, S., Bruns, I., Hofmann, U., Dröse, S., Harter, P. N., Mittelbronn, M., Steinbach, J. P., and Ronellenfitsch, M. W. (2017) Mammalian target of rapamycin complex 1 activation sensitizes human glioma cells to hypoxia-induced cell death. *Brain*
 220. Yasuda, H. (2008) Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radio-resistance: novel strategy for cancer therapy: nitric oxide donor as a therapeutic enhancer. *Nitric Oxide* **19**, 205-216
 221. Vaupel, P., and Mayer, A. (2005) Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus Clin Biol* **12**, 5-10
 222. Brown, J. M. (1990) Tumor hypoxia, drug resistance, and metastases. *Journal of the National Cancer Institute* **82**, 338-339
 223. Wang, G., Wang, J. J., Fu, X. L., Guang, R., and To, S. T. (2017) Advances in the targeting of HIF-1alpha and future therapeutic strategies for glioblastoma multiforme (Review). *Oncol Rep* **37**, 657-670
 224. Aldea, M., Florian, I. A., Kacso, G., Craciun, L., Boca, S., Soritau, O., and Florian, I. S. (2016) Nanoparticles for Targeting Intratumoral Hypoxia:

- Exploiting a Potential Weakness of Glioblastoma. *Pharm Res* **33**, 2059-2077
225. Rieger, J., Bahr, O., Ronellenfitch, M. W., Steinbach, J., and Hattingen, E. Bevacizumab-induced diffusion restriction in patients with glioma: tumor progression or surrogate marker of hypoxia? *J Clin Oncol* **28**, e477; author reply e478
226. Keunen, O., Johansson, M., Oudin, A., Sanzey, M., Rahim, S. A., Fack, F., Thorsen, F., Taxt, T., Bartos, M., Jirik, R., Miletic, H., Wang, J., Stieber, D., Stuhr, L., Moen, I., Rygh, C. B., Bjerkvig, R., and Niclou, S. P. (2011) Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3749-3754
227. Mao, X. G., Wang, C., Liu, D. Y., Zhang, X., Wang, L., Yan, M., Zhang, W., Zhu, J., Li, Z. C., Mi, C., Tian, J. Y., Hou, G. D., Miao, S. Y., Song, Z. X., Li, J. C., and Xue, X. Y. (2016) Hypoxia upregulates HIG2 expression and contributes to bevacizumab resistance in glioblastoma. *Oncotarget* **7**, 47808-47820
228. Cohen, M. H., Shen, Y. L., Keegan, P., and Pazdur, R. (2009) FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *The oncologist* **14**, 1131-1138
229. Fischer, I., Cunliffe, C. H., Bollo, R. J., Raza, S., Monoky, D., Chiriboga, L., Parker, E. C., Golfinos, J. G., Kelly, P. J., Knopp, E. A., Gruber, M. L., Zagzag, D., and Narayana, A. (2008) High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin: initial observations. *Neuro-oncology* **10**, 700-708

10.1 Online Daten

R2: Genomics analysis and visualization platform, Department of Oncogenomics

Academic Medical Center (AMC) UvA, the Netherlands

<https://r3platform.com>

IDF: *International Diabetes Federation*, Leitlinie für die postprandiale Diabeseinstellung

https://idf.org/webdata/docs/german_gmpg_final_110108.pdf

Promotoranalysen: <http://www.ensembl.org>

10.2 Bücherverzeichnis:

Lehrbuch Neurologie, Matthias Sitzer und Helmuth Steinmetz, Elsevier Verlag, 1. Auflage 2011

The Cell, Geoffrey M. Cooper 2nd Edition 2000,

Molekularbiologie der Zelle, Bruce Alberts et al., übersetzt von Lothar Jaenicke, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 4. Auflage 2003

11 Anhang

11.1 Publikationen

Hartel I, Ronellenfitsch M, Wanka C, Wolking S, Steinbach JP, Rieger J.

Activation of AMP-activated kinase modulates sensitivity of glioma cells against epidermal growth factor receptor inhibition. *Int J Oncol.* 2016 Jul;49(1):173-80. doi: 10.3892/ijo.2016.3498. Epub 2016 Apr 25.

Ines Bruns, Benedikt Sauer, Michael C. Burger, Jule Eriksson, Ute Hofmann, Yannick Braun, Patrick N. Harter, Anna-Luisa Luger Michael W. Ronellenfitsch, Joachim P. Steinbach and Johannes Rieger

Disruption of the transcriptional coactivator PGC-1 α reverts key features of the neoplastic phenotype of human glioma cells (*eingereicht*).

11.2 Poster

Ines Hartel, Stefan Wolking, Christina Wanka, Michael W. Ronellenfitsch, Joachim P. Steinbach, Johannes Rieger: *Activation of AMP-activated kinase (AMPK) modulates sensitivity of glioma cells against epidermal-growth factor receptor (EGFR) inhibition.* UCT Science Day 2014, Frankfurt am Main und EANO 2014, Turin, Italien.

Ines Bruns, Michael Burger, Benedikt Sauer, Michal Ronellenfitsch, Joachim P. Steinbach and Johannes Rieger: *The transcriptional coactivator PGC-1 α promotes defence against reactive oxygen species (ROS) and proliferation in human glioma cells.* UCT Science Day 2016, Frankfurt am Main und EANO 2016, Mannheim.

11.4 Eidesstattliche Erklärung

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

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

Ort, Datum

Unterschrift